



Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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

Tesis Doctoral
Programa de Doctorado en Neurociencias

Caracterización del impacto diferencial de la exposición al estrés crónico controlable e incontrolable en ratas adolescentes

Maria Sanchís Ollé

Institut de Neurociències

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

Unitat de Fisiologia Animal

Facultat de Biociències

Universitat Autònoma de Barcelona



Directores

Antonio Armario García

Institut de Neurociències

Departament de Biologia Cel·lular,
Fisiologia i Immunologia

Unitat de Fisiologia Animal

Facultat de Biociències

Universitat Autònoma de Barcelona

Roser Nadal i Alemany

Institut de Neurociències

Departament de Psicobiologia i
Metodologia de les Ciències de la Salut

Unitat de Psicobiologia

Facultat de Psicologia

Universitat Autònoma de Barcelona

2018

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

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

SAF2011-28313

SAF2014-53876-R

SAF2017-017-83430-R

RTC-2015-3898-1

Generalitat de Catalunya:

SGR2009-16, SGR2014-1020, SGR2017-457

Otras ayudas:

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

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

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

Durante gran parte del desarrollo de esta Tesis doctoral (Septiembre 2013-Septiembre 2016), la doctoranda Maria Sanchís Ollé estuvo contratada como Personal Investigador en Formación (PIF-UAB) en el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Facultad de Biociencias de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Resumen

La exposición a estrés durante la adolescencia ejerce efectos conductuales a largo plazo que pueden estar relacionados con un incremento en el desarrollo de enfermedades mentales. En adultos, la posibilidad de control de las situaciones estresantes se ha estudiado en profundidad e induce un efecto protector frente a las consecuencias negativas del estrés. No obstante, la controlabilidad del estrés en edades tempranas no ha sido apenas estudiada. En el presente trabajo se han investigado los efectos endocrinos y conductuales de la controlabilidad del estrés aplicado en la etapa adolescente.

Los sujetos fueron expuestos a estrés repetido (choque eléctrico en las patas) en la adolescencia (aproximadamente del día 33 al 57), durante 8 sesiones. Ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, se dividieron en tres grupos experimentales: (i) el grupo control (naive), que se expuso a una caja lanzadera sin recibir choques ni estímulos específicos; (ii) el grupo master (controlable), expuesto a choques eléctricos con la posibilidad de escapar/evitar en una tarea de evitación activa en dos sentidos en una caja lanzadera, y (iii) el grupo yoked (incontrolable), expuesto exactamente a los mismos choques eléctricos que los master, siendo su conducta no contingente con la finalización de los choques. Días o semanas después, los animales se expusieron a distintas situaciones de estrés o pruebas conductuales para valorar el impacto a corto y largo plazo del estrés.

En respuesta a la exposición repetida al choque durante la adolescencia, los sujetos yoked mostraron una respuesta hormonal mayor que los master en la última sesión de estrés, indicando que la controlabilidad sobre el estrés es capaz de amortiguar la respuesta del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (ACTH). A juzgar por la ausencia de cambios en el peso de los animales, la ingesta de comida y el tamaño de las adrenales y el timo, la situación de estrés en el periodo adolescente no fue de intensidad elevada, no afectando ni al grupo master ni al yoked. A corto plazo, los sujetos yoked mostraron mayor hipo-actividad en ambientes nuevos, reflejo de una mayor generalización cognitiva del miedo a otros contextos no relacionados con el asociado inicialmente al choque.

A largo plazo (a partir del día 70) se observó un efecto ansiolítico de la exposición a estrés controlable, reflejado en una mayor permanencia en los brazos abiertos del laberinto elevado, efecto que no se observó tras el estrés incontrolable. Los animales yoked mostraron una disminución en la conducta social activa, apoyando la existencia de efectos ansiogénicos de larga duración o de una disminución de la motivación social. También se observó, tras la re-exposición al contexto de la caja lanzadera, una memoria remota de miedo condicionado al contexto mayor en los sujetos yoked que los master, a pesar de no observarse diferencias en la memoria reciente.

La falta de control sobre el estrés indujo también déficits a largo plazo en la inhibición conductual. Los sujetos yoked adultos mostraron un aumento de la impulsividad motora (5CSRTT), y una mayor preferencia por las recompensas asociadas a *time-out* más cortos (tarea de gambling), efectos que no se observaron en los sujetos master. Ninguna de las dos situaciones de estrés alteró la impulsividad cognitiva (tolerancia a la demora). Finalmente, la experiencia previa con choques en la adolescencia favoreció las estrategias de afrontamiento activas tras una re-exposición a la tarea de evitación activa en la etapa adulta. Además, se observó un efecto protector en dicha tarea adulta incluso en el grupo yoked adolescente. En general, estos resultados indican que la posibilidad de control mitiga algunos de los efectos negativos del estrés en la adolescencia aunque también pueden observarse ciertos efectos protectores en ausencia de control.

Abstract

Exposure to stress during adolescence exerts long-term behavioral effects that may be associated to an increase in the development of mental diseases. In adults, the possibility to control stressors has been deeply studied and induces a protective effect in front of the negative consequences of stress. However, the stress controllability effects in early life have not been extensively studied. In the present work the endocrine and behavioral effects of stressor controllability during the adolescent period have been studied.

Subjects were exposed to repeated stress (electric foot-shock) in the adolescence (approximately from day 33 to 57) during 8 sessions. *Sprague Dawley* male rats were divided into three experimental groups: (i) control (naive) group that was exposed to a shuttle-box without any shock or specific stimuli; (ii) master (controllable) group, exposed to foot-shock with the possibility to avoid/escape in a two-way active avoidance task in a shuttle-box, and (iii) yoked (uncontrollable) group, exposed exactly to the same shocks than master group but their behavior was not contingent on the end of shocks. Days or weeks after, the animals were exposed to different stressors or behavioral tests to evaluate the short- and long-term impact of stress.

In response to repeated exposure to shocks during adolescence, yoked subjects showed a higher endocrine response than master ones in the last session of stress, indicating that stress controllability is able to buffer the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response (ACTH). Considering the lack of changes in body-weight, food intake and adrenal and thymus weight, the adolescent treatment was not a high intensity stressor, not affecting either master or yoked rats. In the short-term, yoked subjects showed a higher hypoactivity in novel environments, which reflects an increase in the cognitive generalization of fear to other contexts not related to the context previously associated with the shocks.

In the long-term (from day 70) an anxiolytic effect was observed after exposure to controllable stress, as measured by an increase in the time spent in the open arms in the elevated plus-maze, effect that was not observed after uncontrollable stress. Moreover, yoked animals showed a decrease in active social behavior, supporting the existence of long-term anxiogenic effects or reduced social motivation. Re-exposure to the shuttle-box context increased remote contextual fear memory in yoked subjects compared to master ones, whereas no differences in recent memory were observed.

Lack of adolescent stress controllability also induced a long-lasting impairment in behavioral inhibition. Yoked subjects showed in adulthood an increase in motor impulsivity (5CSRTT) and a higher preference for the options associated to shorter time-outs (gambling task). These effects were not observed in master subjects. Any of the two adolescent stress procedures affected cognitive impulsivity (delay-discounting task). Finally, previous experience with stress controllability during adolescence increased active copying in an active avoidance task in adulthood, a protective effect that was also observed in yoked rats. Overall, our results suggest that stress controllability mitigates part of the negative consequences of adolescent stress although some protective effects may be also observed when stress control is not available.

*A la meva mare Rosa,
als meus germans Victor i Júlia
i a la memòria del meu avi Josep.*

Índice

| | |
|---|-----|
| ABREVIATURAS | 13 |
| INTRODUCCIÓN GENERAL 15 | |
| 1- CONCEPTO DE ESTRÉS..... | 16 |
| 2- EL PARADIGMA DE LA INDEFENSIÓN APRENDIDA Y LA CONTROLABILIDAD DEL ESTRÉS..... | 21 |
| 3- LA IMPULSIVIDAD..... | 33 |
| 4- LA ADOLESCENCIA EN HUMANOS Y ROEDORES..... | 57 |
| 5- MODELOS DE ESTRÉS ADOLESCENTE..... | 69 |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 87 | |
| MATERIAL Y MÉTODOS 91 | |
| 1- SUJETOS DE EXPERIMENTACIÓN Y PROCEDIMIENTOS GENERALES..... | 93 |
| 2- VALORACIÓN DE LA MADURACIÓN SEXUAL..... | 94 |
| 3- TOMA DE MUESTRA DE SANGRE..... | 94 |
| 4- ANÁLISIS BIOQUÍMICO..... | 95 |
| 5- MÉTODOS DE GRABACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS PRUEBAS CONDUCTUALES..... | 96 |
| 6- TAREA DE EVITACIÓN ACTIVA EN DOS SENTIDOS..... | 97 |
| 7- PRUEBAS CONDUCTUALES..... | 100 |
| 8- TAREAS OPERANTES..... | 106 |
| 9- ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 117 |
| RESULTADOS 119 | |
| CAPÍTULO 0. EFECTOS DEL ESTRÉS DURANTE LA ADOLESCENCIA..... | 121 |
| CAPÍTULO 1. EFECTOS CONDUCTUALES Y FISIOLÓGICOS A CORTO PLAZO DEL ESTRÉS EN LA ADOLESCENCIA..... | 133 |
| CAPÍTULO 2. (I) EFECTOS CONDUCTUALES Y FISIOLÓGICOS A LARGO PLAZO. (II) EFECTOS DEL CAMBIO DE CONTROLABILIDAD DEL ESTRÉS DURANTE LA ETAPA ADULTA..... | 143 |
| CAPÍTULO 3. EFECTOS A LARGO PLAZO DEL ESTRÉS EN LA ADOLESCENCIA: IMPULSIVIDAD COGNITIVA EN DESCUENTO POR DEMORA..... | 163 |
| CAPÍTULO 4. EFECTOS A CORTO Y LARGO PLAZO DEL ESTRÉS ADOLESCENTE: CONSUMO DE SACARINA E IMPULSIVIDAD COGNITIVA EN TAREAS DE RIESGO..... | 173 |
| CAPÍTULO 5. EFECTOS A LARGO PLAZO DEL ESTRÉS ADOLESCENTE: IMPULSIVIDAD MOTORA..... | 183 |
| DISCUSIÓN GENERAL 195 | |
| 1- ESTRÉS DURANTE LA ADOLESCENCIA..... | 198 |
| 2- EFECTOS CONDUCTUALES A CORTO Y LARGO PLAZO..... | 204 |
| 3- EFECTOS A LARGO PLAZO SOBRE LA IMPULSIVIDAD..... | 214 |
| 4- IMPLICACIONES TEÓRICAS Y CLÍNICAS..... | 220 |
| CONCLUSIONES 223 | |
| REFERENCIAS 229 | |

ABREVIATURAS

5CSRTT: *5-choice-serial-reaction-time task*

5-HT1A, 5-HT 1B, 5-HT2A, 5-HT2C: receptores de serotonina

8-OH-DPAT: 8-hidroxi-2-di-n-propilamino tetralina

ACTH: hormona adrenocorticotropa

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico

CA1: cornu ammonis 1

CA2: cornu ammonis 2

CA3: cornu ammonis 3

CBG: transcortina o globulina fijadora de corticosterona

Cg1: subdivisión cingulada de la mPFC

CR: respuesta condicionada

CRH: hormona liberadora de corticotropina

CS: estímulo condicionado

CUS: estrés crónico impredecible

D1, D2, D3 y D4: receptores dopaminérgicos

DSM-V: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition*

EPM: laberinto elevado en cruz

FR: razón fija

FSH: hormona folículo-estimulante

FST: prueba de natación forzada

GEE: modelo de ecuaciones estructurales generalizadas

GENLIN: modelo lineal generalizado

GLM: modelo lineal general

GnRH: hormona liberadora de gonadotropina

GR: receptor tipo glucocorticoide

HB: plancha de agujeros

HPA: eje hipotalámico-hipofisario-adrenal

HPG: eje hipotalámico-hipofisario-gonadal

IGT: *iowa gambling task*

ITI: tiempo entre ensayos

LH (s): *limited hold*

LH: hormona luteinizante

mPFC: corteza prefrontal medial

MR: receptor tipo mineralocorticoide

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

NMDA: N-metil-D-aspartato

OF: campo abierto

OFC: corteza orbitofrontal

PET: tomografía por emisión de positrones

PND: día posnatal

PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo

RGT: *rat gambling task*

RIA: radioinmunoanálisis

SMA: sistema simpático-médulo-adrenal

SNC: sistema nervioso central

TDAH: trastorno por déficit de atención e hiperactividad

TWAA: tarea de evitación activa en dos sentidos

UR: respuesta incondicionada

US: estímulo incondicionado

Introducción General

La exposición a situaciones de estrés crónico se relaciona con la aparición de múltiples alteraciones conductuales y psicopatologías, incluyendo los trastornos asociados a la impulsividad y la inflexibilidad cognitiva. La influencia que ejerce el estrés puede ser mayor y más persistente cuando la exposición se da en las etapas tempranas, desde el período prenatal a la adolescencia. Este mayor impacto es previsible considerando que el estrés estaría afectando a un cerebro en desarrollo. Algunos estudios en animales y en humanos señalan la importancia de la falta de control sobre las situaciones estresantes para la aparición de consecuencias negativas. En este trabajo se estudiará si la experiencia repetida de estrés incontrolable durante la adolescencia causará más efectos que el estrés controlable en conductas relacionadas con una mayor predisposición a la depresión, la ansiedad o las patologías asociadas a la impulsividad y toma inadecuada de decisiones.

1- CONCEPTO DE ESTRÉS.

Para explicar el concepto moderno de estrés debemos remontarnos a las aportaciones de Claude Bernard y de Walter B. Cannon. En 1865, Claude Bernard desarrolló el concepto de “*milieu intérieur*”: “*la habilidad de un organismo para mantener un ambiente fluido constante que bañe las células del cuerpo es esencial para una vida independiente del ambiente externo*” (citado en Holmes 1986). Walter B. Cannon amplió el concepto e introdujo, a principios del siglo XX, el término de “homeóstasis” para referirse al conjunto de mecanismos fisiológicos que permitían al organismo afrontar las perturbaciones ocasionadas por los cambios en el ambiente. Destacó el papel del sistema simpático-médulo-adrenal (SMA) como eje esencial del mantenimiento de la homeóstasis y describió la respuesta de lucha – huida (*fight or flight*) como respuesta conductual a las perturbaciones en el ambiente (citado en Goldstein y Kopin 2007).

El endocrinólogo Hans Selye fue el primero que definió el término de estrés tal y como lo conocemos en la actualidad, centrándose en las respuestas mediadas por el eje hipotálamico-hipofisario-adrenal (HPA; Selye 1936, 1950): “*Si un organismo es dañado severamente...desarrolla un síndrome, cuyos síntomas son independientes de la naturaleza del agente aversivo...*”. Esta sintomatología estereotipada común se conoce como el “Síndrome General de Adaptación”. Según Selye, la respuesta evocada sería siempre la misma independientemente del tipo de estímulo estresante. En la actualidad se

sigue considerando que cuando un organismo procesa a nivel central un estímulo, si es evaluado como estresante, se activará una respuesta inespecífica de estrés que permitirá al organismo reaccionar de forma inmediata mejorando su supervivencia (Armario 2015). Esta respuesta incluye la activación del eje SMA y también del eje HPA. No obstante, en función de las características del estímulo, también se activarán de forma complementaria respuestas específicas.

Si bien Selye se centró en los estímulos estresantes físicos, posteriormente muchos autores se interesaron por los estímulos estresantes denominados psicológicos. Actualmente se clasifican los estímulos estresantes en sistémicos (físicos) y emocionales (psicológicos), aunque existen estímulos mixtos, con características de ambas categorías (Herman et al. 2003). Los estímulos sistémicos suponen una amenaza directa a la homeóstasis, v.g. hemorragia, hipoxia o infección. Los estímulos emocionales son aquellos que no suponen una amenaza directa para el equilibrio homeostático, sino que tienen un carácter anticipatorio de un peligro que sí podría ser real, v.g. ambiente nuevo u olor a depredador. Los estímulos mixtos (v.g. choque eléctrico o natación forzada) compartirían características de ambos tipos, aunque la respuesta global en el sistema nervioso central (SNC) es muy parecida a la de los de tipo emocional (v.g. Pacak y Palkovits 2001).

Tras Selye, muchos autores han criticado y revisado el concepto de estrés. En nuestro laboratorio creemos que la definición más adecuada es la propuesta por Vigas en 1984:

“Situación creada en el organismo por la exposición a agentes o estímulos estresantes que pueden alterar, real o simbólicamente, la integridad del organismo. Esta respuesta, desarrollada en el curso de la filogenia, tiene como objetivo mantener el equilibrio homeostático frente a una perturbación real que pone en peligro la integridad del organismo y no puede afrontarse con los mecanismos homeostáticos normales”.

Junto con la activación del SMA, la del eje HPA (Figura 1) es una de las principales respuestas neuroendocrinas en situaciones de estrés, jugando un papel vital en los mecanismos de adaptación del organismo frente a los desequilibrios homeostáticos (Armario 2006). Para activar el eje HPA, independientemente de la naturaleza del estímulo estresante, la información converge en la región medial parvocelular dorsal del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), donde están situadas las neuronas que sintetizan la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y otros factores que, al liberarse

en la eminencia media, estimulan la adenohipófisis para sintetizar y liberar la hormona adrenocorticotropa (ACTH). La ACTH, a su vez, actúa sobre la corteza adrenal estimulando la síntesis y la liberación de glucocorticoides (cortisol, en humanos y corticosterona, en roedores), que ejercen multitud de funciones en el organismo y contribuyen en gran medida a muchas de las consecuencias negativas del estrés. Una de las funciones de los glucocorticoides es la regulación del propio eje HPA mediante los mecanismos de retro-inhibición a nivel hipofisario, hipotalámico y supra-hipotalámico (v.g. formación hipocampal). Los distintos mecanismos de retro-inhibición (rápido, intermedio y lento) permiten controlar los niveles de glucocorticoides.

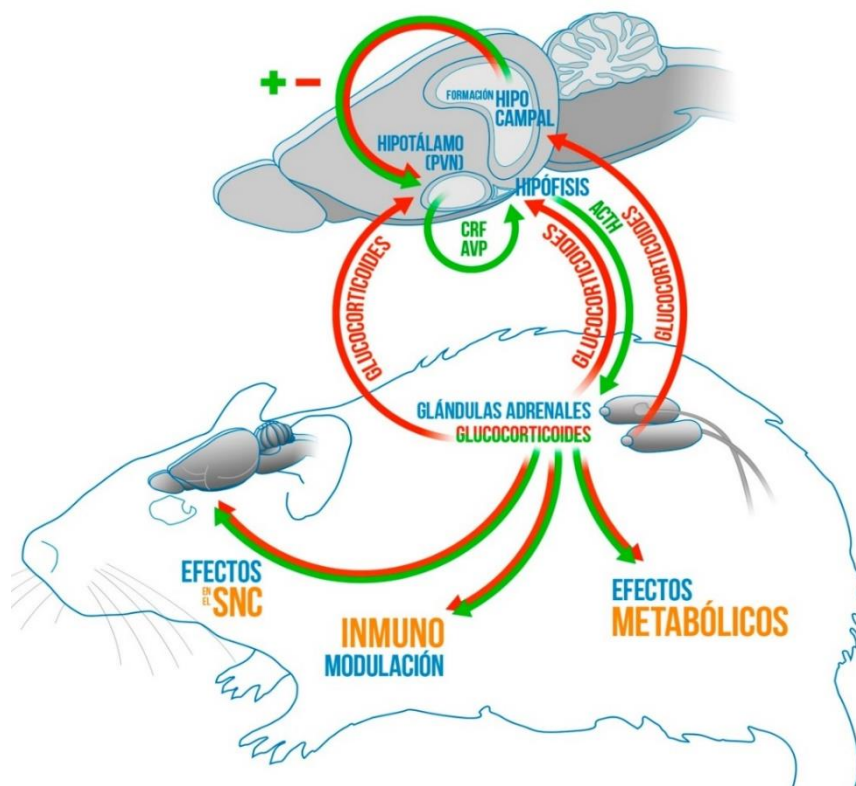


Figura 1. Esquema general del funcionamiento del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA). PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo; CRF/CRH: hormona liberadora de corticotropina; AVP: vasopresina; ACTH: hormona adrenocorticotropa; SNC: sistema nervioso central.

La acción de los glucocorticoides se ejerce a nivel periférico y dentro del SNC a través de receptores específicos, siendo sus efectos genómicos los mejor caracterizados. Estos efectos genómicos se llevan a cabo a través de dos tipos de receptores intracelulares: el receptor tipo I o mineralocorticoide (MR) y el receptor tipo II o glucocorticoide (GR) (ver

Reul y de Kloet 1985; de Kloet et al. 1998). Los MR tienen mucha más afinidad por la corticosterona que los GR y menos afinidad por otros glucocorticoides naturales o sintéticos (v.g. cortisol, dexametasona), mientras que ocurre lo contrario con los GR. Por este motivo, en rata y ratones la gran mayoría de receptores MR se encuentran ocupados en condiciones basales (especialmente en las horas de luz cuando los niveles basales son bajos en animales nocturnos como rata y ratones), mientras que tras la activación del eje HPA por el estrés se van ocupando progresivamente los GR. A nivel central, los GR se expresan de manera ubicua, mientras que los MR tienen una localización mucho más específica, siendo especialmente abundantes en la formación hipocámpal. Existe una relativa abundancia de GR en la adenohipófisis, el PVN, la formación hipocámpal y la corteza prefrontal (PFC), zonas clave para la regulación del eje HPA en general y especialmente para la retro-inhibición por glucocorticoides.

La activación del PVN, y muy especialmente de la región parvo-celular, es consecuencia de la llegada de señales procedentes de las áreas que participan en el procesamiento de las situaciones de estrés, pero las rutas de procesamiento dependen de la naturaleza de los estímulos estresantes (Sawchenko et al. 2000; Herman et al. 2003). Mientras que los estímulos sistémicos se procesan en áreas del tronco encefálico (v.g. núcleo del haz solitario, bulbo ventrolateral, núcleo parabraquial) o áreas circunventriculares (v.g. órgano vasculoso de la lámina terminal) y envían señales directas al PVN, los estímulos emocionales siguen una ruta más compleja. Dado que la PFC o las áreas límbicas, implicadas en el procesamiento de los estímulos emocionales, tienen muy pocas conexiones directas con el PVN, las señales han de hacer relevo previo en estructuras como el núcleo del lecho de la estría terminal, otros núcleos hipotalámicos o del tronco del encéfalo, antes de alcanzar el PVN.

Además de liberarse consistentemente en situaciones de estrés, las hormonas del eje HPA también son buenos marcadores de la intensidad de la situación estresante. Sin embargo, como la corteza adrenal se satura con niveles moderados circulantes de ACTH, la corticosterona sólo es un buen marcador para estímulos estresantes de intensidad baja-moderada, en tanto que la ACTH es un buen marcador para estímulos de un rango más amplio de intensidades (Kant et al. 1987; Armario et al. 2012).

Cuando la exposición a un estímulo estresante no es puntual (aguda), se utiliza el término de “estrés crónico”, que puede referirse a diferentes situaciones (Armario 2006): (a) estrés

crónico continuado, exposición permanente a una situación estresante que dura días o semanas; (b) estrés crónico repetido, exposición repetida intermitente al mismo estímulo durante días o semanas, y (c) estrés crónico variable o impredecible (*chronic unpredictable stress*, CUS) exposición crónica a una combinación de diferentes estímulos estresantes que se van cambiando a lo largo de los días (Katz et al. 1981). El estrés crónico repetido se ha utilizado ampliamente para estudiar el fenómeno de la adaptación. Cuando un individuo se expone al mismo estímulo día tras día, se observa una disminución progresiva de la respuesta del eje HPA y de otras variables fisiológicas, mientras que la respuesta a un estímulo estresante diferente (heterotípico) es normal e incluso se encuentra aumentada (Armario et al. 1984, 1986, 1988a). Aunque se ha considerado que la reducción de la respuesta del eje HPA tras la exposición repetida a un mismo estímulo estresante es un proceso de habituación, datos de nuestro laboratorio sugieren que dicha adaptación no sigue las leyes clásicas de la habituación (Rabasa et al. 2015).

A nivel conductual, desde la década de los 70 se han descrito diversos efectos adversos del estrés crónico en sus distintas modalidades, habitualmente estudiados en los días inmediatos a la finalización de la exposición al estrés: disminución de la actividad locomotora en ambientes nuevos (Katz 1981; García-Márquez y Armario, 1987a, 1987b), aumento de la ansiedad en el laberinto elevado en cruz (*elevated plus maze*, EPM) (Vyas et al. 2004), aumento de las estrategias de afrontamiento pasivas en la prueba de la natación forzada (*forced swimming test*, FST) (García-Márquez y Armario 1987b), déficit del escape en tareas operantes (Murua et al. 1991a,b), disminución de la conducta dominante y territorial en la prueba del residente y el intruso (D'Aquila et al. 1994), y anhedonia valorada mediante el consumo de soluciones dulces (Katz 1981; Willner et al. 1987; Papp et al. 1991; D'Aquila et al. 1994) o mediante la sensibilidad a los refuerzos naturales y a determinadas drogas (Papp et al. 1991). También se observan dificultades en el aprendizaje y la memoria espacial (Luine et al. 1994) y una potenciación del condicionamiento del miedo (Conrad et al. 1999; Sandi et al. 2001).

No obstante, también se han descrito efectos que podríamos definir como protectores, especialmente respecto a la ansiedad (D' Aquila et al. 1994; Harris et al. 1997). Por otro lado, la exposición previa a estrés crónico puede reducir el impacto de situaciones de estrés agudas. Este efecto se observa no solo cuando el estímulo estresante agudo y crónico es el mismo (homotípico) sino también cuando es diferente (heterotípico). Por ejemplo, la exposición crónica a la inmovilización reduce el impacto negativo que tiene

una exposición aguda al mismo estímulo en la conducta exploratoria en la plancha de agujeros (*hole-board*, HB) (Pol et al. 1992). De forma similar, se observa una disminución de las latencias de respuesta en una tarea de evitación activa tras experiencia repetida con la misma tarea (Glazer et al. 1975; Weiss et al. 1975). Aún más interesante es el hecho de que el efecto protector también aparece en respuesta a un estímulo heterotípico (Weiss et al. 1975; Anisman et al. 1983), indicando adaptación cruzada. Dicha adaptación cruzada ha sido también observada respecto al impacto negativo de la exposición aguda a la inmovilización sobre el peso corporal y el consumo de sacarina (Pastor-Ciurana et al. 2014). Puesto que muchas pruebas conductuales implican estrés, es difícil distinguir entre posibles cambios en los rasgos conductuales de los animales o una alteración de la respuesta a la situación estresante que representa la prueba.

La literatura, tanto en animales como en humanos, apoya la existencia de una gran variabilidad individual en las consecuencias de la exposición a los estímulos estresantes (Armario y Nadal 2013). Mientras que algunos sujetos son particularmente vulnerables, otros parecen ser más resistentes a los efectos del estrés. Estas diferencias podrían explicarse por la influencia de distintos factores que favorecerían o amortiguarían la susceptibilidad individual, como los rasgos de personalidad, el género/sexo o la edad (ver Sandi 2007).

2- EL PARADIGMA DE LA INDEFENSIÓN APRENDIDA Y LA CONTROLABILIDAD DEL ESTRÉS.

A partir de los trabajos pioneros de J.M. Weiss, M.E.P. Seligman y S.F. Maier está bien establecida la importancia de la controlabilidad sobre los estímulos estresantes en el impacto conductual y fisiológico de los mismos. Aunque estos modelos se han basado sobre todo en la exposición de ratas a choques eléctricos en la cola, otros estudios posteriores han utilizado la exposición a choques eléctricos en las patas, modelo clásico para inducir condicionamiento del miedo. Por esta razón incluiremos también un apartado inicial respecto a las características básicas del condicionamiento del miedo.

2.1. Condicionamiento del miedo.

Existen numerosos procedimientos para provocar, valorar y cuantificar el miedo, pero la mayoría de ellos están basados en el condicionamiento clásico o Pavloviano, que permite establecer una asociación entre un estímulo inicialmente neutro (v.g. tono) y un estímulo nocivo (US, v.g. un choque eléctrico) que provoca una respuesta de miedo (UR, del inglés *unconditioned response*). Como consecuencia de la aparición conjunta y repetida de los dos estímulos, el estímulo neutro se convertirá en un estímulo condicionado (CS) que por sí solo provocará una respuesta de miedo condicionada (CS → CR). El CS no es solo la señal sensorial específica utilizada para el condicionamiento (v.g. tono) sino también el lugar (v.g. compartimento) donde se realizó el condicionamiento, razón por la cual puede ocurrir condicionamiento del miedo tanto a la señal específica (tono) como al contexto. Para distinguirlos, se valora la conducta en el compartimento donde tuvo lugar el condicionamiento en ausencia de señal específica (condicionamiento al contexto) y en respuesta a dicha señal en un compartimento muy distinto del original (condicionamiento al tono). En muchos trabajos tan solo se estudia el condicionamiento del miedo al contexto, especialmente cuando el interés está centrado en los circuitos nerviosos específicamente implicados en la memoria de contexto. En este sentido, está bien establecido que el procedimiento denominado de huella o traza (en el cual el CS termina unos segundos antes de que aparezca el US) es dependiente de hipocampo, a diferencia del procedimiento típico de demora (en el cual el CS empieza antes que el US pero ambos finalizan al mismo tiempo) que es dependiente de amígdala. Comentaremos a continuación algunos aspectos del condicionamiento del miedo que son importantes para entender el presente trabajo (ver Rescorla 1988; Fendt y Fanselow 1999).

En roedores, la adquisición del miedo puede cuantificarse mediante muchas variables, pero la más utilizada es la conducta de *freezing* o petrificación. Se trata de una respuesta de miedo pasiva, caracterizada por la ausencia total de movimientos del animal excepto aquellos relacionados con la respiración. No obstante, algunos autores valoran otras medidas relacionadas con diversos patrones de actividad, que pueden mejorar la interpretación de los datos (v.g. Laxmi et al. 2003).

Un fenómeno de gran interés en el condicionamiento es la generalización del miedo a otros contextos o señales específicas que guardan una cierta similitud con el lugar o señal originariamente asociada al choque. Existen muchas evidencias sobre el fenómeno,

aunque el grado de generalización depende críticamente de factores como la intensidad de los choques eléctricos, el paso del tiempo, la edad, el sexo y las diferencias individuales. Nuestro laboratorio y otros han observado que el condicionamiento del miedo al contexto utilizando choques eléctricos en las patas causa hipoactividad de los animales en ambientes nuevos que no tienen ninguna similitud con aquél donde se recibieron originariamente los choques (Radulovic et al. 1998; Daviu et al. 2010, 2014). A este fenómeno le hemos denominado generalización cognitiva, para distinguirla de la generalización originada por algunas similitudes con el contexto original (Daviu et al. 2010, 2014). Es fundamental distinguir entre generalización y sensibilización, que es un incremento en la respuesta a estímulos que no es dependiente del condicionamiento en sí sino de la exposición al estímulo aversivo. Para ello se requieren diseños experimentales apropiados (v.g. desaparecer la presentación del CS respecto al US).

Cuando los animales se exponen repetidamente al CS en ausencia del US se observa una reducción progresiva de la respuesta de miedo (v.g. *freezing*), proceso al cuál se denomina extinción. La extinción del miedo es un nuevo proceso de aprendizaje en el cual el animal aprende ahora que el CS no pronostica la aparición del US. Existen varios fenómenos importantes que caracterizan la extinción (Bouton 2004 revisión; Bouton y King 1983). En primer lugar, el contexto en el cual tiene lugar la extinción es crítico para la disminución de la respuesta de miedo, de tal manera que si el CS (v.g. un tono) se presenta en un contexto distinto al de la extinción, la CR reaparece (*renewal*), en tanto que la re-exposición al CS (v.g. un tono) en el contexto mismo de la extinción da lugar a una CR muy baja o nula. En segundo lugar, la CR también puede reaparecer de manera inesperada debido al paso del tiempo (recuperación espontánea). Finalmente, la memoria de miedo no desaparece completamente tras la extinción, de manera que es susceptible de volver cuando se presenta brevemente el US (v.g. choque) (*reinstatement*).

2.2. La indefensión aprendida.

El paradigma de la indefensión aprendida es uno de los que ha dado lugar a más estudios en Psicología experimental. Los estudios originales de Seligman y Maier se llevaron a cabo en perros expuestos a una sesión de choques inescapables mediante un arnés que rodeaba el cuerpo (Overmier y Seligman 1967; Seligman y Maier 1967; Seligman et al.

1968). Veinticuatro horas después, todos los sujetos eran sometidos a una sesión de escape en dos sentidos en una caja lanzadera (*shuttle-box*). Las cajas lanzaderas tenían dos compartimentos separados por una barrera ajustable. En cada compartimento había una base de rejilla electrificada que administraba un choque eléctrico (US). Si el sujeto saltaba la barrera y cruzaba al otro compartimento, finalizaba la descarga eléctrica. Si no era capaz de saltar, recibía toda la descarga. La tarea se basa en el condicionamiento instrumental, aunque también lleva asociado un condicionamiento clásico. Los resultados de estos experimentos demostraron que la falta de control sobre los estímulos estresantes aumentaba, 24 horas después, la latencia de escape, así como el número de respuestas nulas (no escapes).

Estos datos sembraron el camino para una extensa serie de trabajos posteriores en base a los cuales se introdujo el concepto de la “indefensión aprendida”, que esencialmente sugería que tras la exposición a choques eléctricos inescapables los animales aprendían que no tenían control sobre el estímulo aversivo, dando lugar a una serie de déficits en situaciones posteriores en las cuales sí había posibilidad de control (Maier 1984). La experiencia inescapable se traduciría en déficits asociativos, motivacionales y emocionales. No obstante, existen otras teorías no cognitivas que intentan explicar el fenómeno, especialmente aquellas que recurren a déficits básicamente motores y mecanismos neuroquímicos inespecíficos, especialmente los relacionados con la actividad noradrenérgica (v.g. Weiss et al. 1975). En una de sus revisiones más recientes, Maier y Seligman (2016) definen el concepto de indefensión aprendida en humanos desde un punto de vista tanto objetivo como subjetivo. La indefensión aprendida desde un punto de vista objetivo se desarrolla cuando ante una situación aversiva (v.g. inicio de un choque eléctrico), la probabilidad de que esta situación se inicie es la misma tanto si el sujeto realiza una acción (v.g. escapar) como si no. En cambio, la indefensión aprendida subjetiva implica que el sujeto “detectará” una falta de contingencia de sus acciones (v.g. escapar) y “esperará” en el futuro que el choque eléctrico aparezca independientemente de sus respuestas.

El diseño clásico que se ha utilizado para caracterizar los efectos de la controlabilidad (o de la falta de control) fue introducido por J.M. Weiss, utilizando como sujetos experimentales roedores (Weiss 1968). En estos experimentos, los sujetos se dividen en tres grupos (*tríada*): (a) MASTER, expuesto a estrés controlable (*escapable shock*), en el que los animales son inmovilizados suavemente en un recinto y expuestos a una serie de

choques en la cola (impredecibles en el tiempo) que pueden parar (escapar) si realizan una conducta específica, que varía en función del protocolo (generalmente girar una rueda de actividad); (b) YOKED, expuestos a estrés incontrolable (*inescapable shock*), en el que los animales son expuestos a la misma situación pero reciben los choques eléctricos en función del comportamiento de los sujetos MASTER y no en función de sus propias acciones, y (c) CONTROL, situados en el recinto (o en ocasiones en la caja de estabulación) sin recibir choques. Es importante destacar que la cantidad de choques en número, tiempo e intensidad es exactamente la misma para los grupos YOKED y MASTER, con la crítica diferencia de que los sujetos MASTER pueden ejercer control sobre la aparición de los choques, mientras que los sujetos YOKED no.

Posteriormente al enorme impulso inicial en la investigación sobre la indefensión aprendida, este modelo de tríada se ha seguido utilizando durante décadas, sobre todo en el laboratorio de S. F. Maier, al objeto de estudiar los efectos específicos del control sobre el estrés (Maier 2015). Los resultados han puesto de manifiesto diversos efectos negativos a corto plazo que aparecen tras la exposición al choque inescapable, pero no cuando hay posibilidad de escapar del mismo. Estas alteraciones incluyen el déficit típico en una tarea de escape en la caja lanzadera (v.g. Maier 1993; Amat et al. 2008), un aumento del miedo condicionado a nuevas situaciones de estrés (Maier 1993; Baratta et al. 2008) y una disminución de la conducta social (Short y Maier 1993; Christianson et al. 2008, 2009) así como de las relaciones de dominancia en varias situaciones, incluyendo la prueba del residente-intruso (Rapaport y Maier 1978; Williams 1982; Amat et al. 2010). No obstante, un número importante de efectos como la reducción de la ingesta y el peso (Dess et al. 1989), la ansiedad valorada en el EPM (Grahm et al. 1995) o el consumo de sacarosa (Christianson et al. 2008) no son sensibles al control sobre el estrés. Uno de los principales problemas de este modelo es que los efectos no son duraderos, pues normalmente se disipan a las 72 h posteriores al estrés. No obstante, se ha demostrado que si los animales son expuestos repetidamente, a partir de las 48 h, al contexto donde han recibido los choques incontrolables a modo de recordatorios (*reminder*, 8 veces, 1 cada 48 h), el déficit de escape se mantiene hasta 22 días después (Maier 2001).

En contraste con la poca duración de los efectos de la exposición a choques eléctricos en la cola, numerosos trabajos han demostrado déficits en la conducta de escape en una caja lanzadera al cabo de varios días o semanas de una sesión previa de choques incontrolables (v.g. Martin et al. 1986; Murua y Molina 1991b; Valentine et al. 2008; Greenwood et al.

2010), pero en estos estudios se utilizaba el choque eléctrico en las patas en el mismo o parecido contexto en el que posteriormente se llevaba a cabo la tarea de escape. Por lo tanto, la explicación más obvia del déficit observado sería la inhibición de las conductas activas debido al condicionamiento del miedo al contexto y no propiamente al desarrollo de indefensión aprendida. De hecho, Greenwood et al. (2010) han demostrado que la lesión bilateral de la amígdala basolateral antes de la re-exposición al contexto elimina tanto el condicionamiento del miedo al contexto como el déficit de escape típico durante la tarea de evitación activa en dos sentidos (TWAA, ver más adelante), apoyando la relación entre ambos fenómenos.

Por otra lado, Seligman y Maier (1967) demostraron en perros que la exposición previa a choques eléctricos escapables era capaz de reducir los efectos negativos de una exposición posterior a un procedimiento YOKED. Este fenómeno, observado posteriormente en ratas en el laboratorio de S. F. Maier, ha sido denominado “inmunización conductual” (Maier 2015). Así, la exposición previa a un procedimiento MASTER (choque escapable en la cola) puede bloquear o reducir diversas consecuencias negativas de un protocolo YOKED posterior como el incremento de la latencia de escape en la caja lanzadera (Williams y Maier 1977; Amat et al. 2008), la reducción de la conducta social (Christianson et al. 2008; Kubala et al. 2012) o la potenciación del condicionamiento del miedo producido por un choque eléctrico en las patas, con una respuesta de *freezing* menos intensa (Amat et al. 2008; Baratta et al. 2008).

Respecto al substrato neurobiológico de los efectos de situaciones escapables o inescapables, la evidencia experimental más consistente relaciona la parte dorsal del núcleo dorsal del rafe con los efectos conductuales adversos producidos por la exposición a choques incontrolables (Maier et al. 2006). La exposición a un protocolo de estrés incontrolable, en comparación con el controlable, produce una mayor activación de las neuronas serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafe valorada mediante la liberación local de serotonina o la inducción del gen de expresión temprana c-fos (Maswood et al. 1998; Grahn et al. 1999). Además, la inactivación farmacológica del núcleo previa a los choques inescapables bloquea los efectos negativos conductuales derivados de dicha exposición (Maier et al. 1994).

La participación del núcleo dorsal del rafe involucra a la corteza prefrontal medial (mPFC), que proyecta directa e indirectamente al núcleo dorsal del rafe y procesa

información sobre la controlabilidad del estrés (Amat et al. 2005, 2006; Christianson et al. 2009). El esquema más aceptado es que el núcleo dorsal del rafe se activaría por defecto con la exposición al estrés incontrolable, pero la posibilidad de control permitiría que la mPFC (en concreto, área prelímbica) inhibiera la actividad de las neuronas serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafe a través de la activación de las interneuronas gabaérgicas de este núcleo. Los estudios de inactivación con muscimol de la corteza prelímbica indican que es necesario que ésta esté activa durante la exposición a choques escapables para que aparezca un efecto protector, siendo ineficaz al bloqueo posterior a la tarea. Por otro lado, los animales necesitan que la corteza prelímbica esté activa durante la posterior tarea inescapable para que se produzca inmunización frente a sus efectos negativos. Dicho de otro modo, la memoria sobre la experiencia previa de escapabilidad ha de ser utilizada por la corteza prelímbica durante una tarea inescapable posterior para que el efecto protector aparezca. No sabemos si los efectos protectores de la escapabilidad se extenderían a otros aspectos fisiológicos y conductuales, aunque es probable considerando el papel relevante de la mPFC en muchas respuestas al estrés, incluyendo la activación del eje HPA (ver revisiones: Herman et al. 2003; McKlveen et al. 2013).

El estriado está conectado con la corteza prelímbica (ver revisión de Balleine y O'Doherty, 2010) y la exposición a choques escapables (MASTER) causa una mayor inducción de c-fos que la situación inescapable (YOKED) en el estriado dorsomedial, pero no en el estriado dorsolateral (Amat et al. 2014). Además, en sujetos MASTER, la inactivación temporal del estriado dorsomedial, pero no del dorsolateral, justo antes de la exposición al estrés disminuye el tiempo de exploración social (marcador de ansiedad), un efecto típico de la exposición a estrés inescapable. La misma manipulación también previene del efecto protector de una sesión previa de choques escapables sobre la liberación de serotonina en el núcleo dorsal del rafe causada por choques inescapables. Todo ello sugiere que el estriado dorsomedial, pero no el dorsolateral, estaría implicado en los efectos protectores de la controlabilidad.

2.3- Evitación activa en dos sentidos.

En el aprendizaje de evitación los sujetos aprenden a realizar (evitación activa) o inhibir (evitación pasiva) una determinada acción para no recibir un estímulo aversivo. Este tipo

de condicionamiento implica dos procesos simultáneos. Por una parte, se aprende a realizar determinadas respuestas instrumentales para evitar o escapar del estímulo nocivo, obteniendo así un refuerzo negativo (Rescorla 1968). Por otra parte, se asocian estímulos inicialmente neutros, que posteriormente se convierten en CS mediante condicionamiento clásico.

Existen varios procedimientos de evitación activa. En el procedimiento habitual se utiliza una señal explícita (*signaled*), en general un tono, una luz o ambos, que se convierte en CS mediante varios emparejamientos con un US nocivo (habitualmente choque eléctrico en las patas). La presentación del CS o el US puede finalizarse mediante la realización de una respuesta activa. En muchos estudios, los sujetos se entrenan en un aparato con dos compartimentos conectados (caja lanzadera) y la respuesta a realizar es pasar de uno a otro compartimento. En los procedimientos de evitación se pueden dar dos tipos de respuestas activas: las evitaciones y las huidas (*escapes*). Una evitación (*avoidance*) implicaría realizar la conducta durante el CS dando lugar a la omisión del US (Crawford y Masterson 1982; Krypotos et al. 2015). Si la respuesta activa no se realiza durante la fase de CS que precede el US, sino una vez ha aparecido el choque, la respuesta activa se categoriza como una huida. En otros procedimientos, la aparición del US no está señalada por un estímulo explícito, siendo la señal únicamente temporal (evitación tipo Sidman).

El aprendizaje de evitación puede ser en uno (*one-way*) o dos (*two-way*) sentidos. En el primer caso, la caja lanzadera tiene un compartimento “peligroso”, en el cual los animales reciben una señal de peligro (explícita o temporal) seguida de un choque eléctrico, y otro compartimento “seguro”, en el cual ni la señal (si la hay) ni el choque aparece nunca. El compartimento “seguro” actúa como un refuerzo positivo y aumenta la motivación para aprender la respuesta instrumental (Cándido et al. 2002; Torres et al. 2005). En cambio, el aprendizaje que deben realizar los sujetos en una tarea de evitación en dos sentidos es muy complejo debido a que no existe un compartimento que siempre sea “seguro” y otro “peligroso”, sino que éste varía en función de la posición del animal dentro de la caja lanzadera (Figura 2).

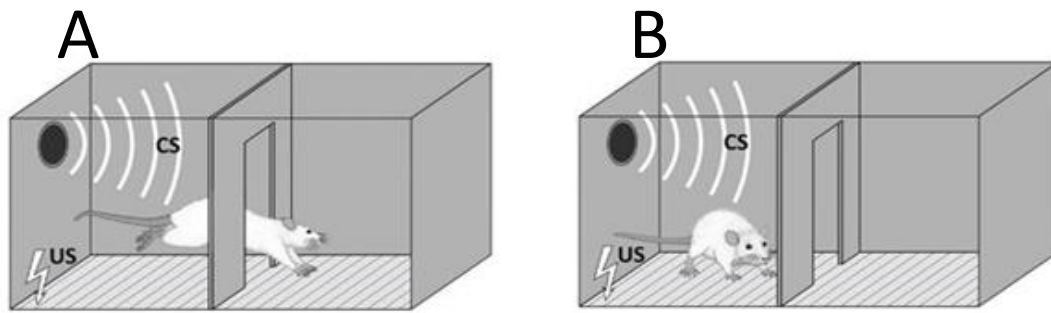


Figura 2. Esquema general del funcionamiento de la tarea de evitación activa en dos sentidos (TWAA). En (A) la caja lanzadera del sujeto MASTER. Cuando el animal cambia de compartimento, el US desaparece. En (B) la caja lanzadera del sujeto YOKED, su conducta no tiene consecuencias sobre la aparición o finalización del US, y depende totalmente del comportamiento del sujeto MASTER (adaptado de LeDoux et al. 2017).

Este tipo de procedimientos implica que, durante los primeros ensayos y sesiones, los sujetos desarrollan una respuesta emocional condicionada que favorece la aparición de *freezing* o inactividad (Wilcock y Fulker 1973) debido a los elevados niveles de ansiedad. En la mayoría de los sujetos, esta tendencia se va perdiendo a medida que avanza la sesión, al ir aprendiendo a realizar las respuestas condicionadas esperadas (Vicens-Costa et al. 2011). Aquellos sujetos que no son capaces de asociar correctamente los estímulos adoptan una estrategia de afrontamiento pasiva, mostrando niveles elevados de *freezing* y realizando respuestas únicamente de escape u omisiones (respuestas nulas). La relación negativa entre la adquisición de la evitación y la ansiedad se ha estudiado en profundidad y existen muchas evidencias que la apoyan. El uso de distintos ansiolíticos mejora, de manera dosis-dependiente, la adquisición temprana de la tarea de evitación activa en dos sentidos, aumentando el número de evitaciones (Fernández-Teruel et al. 1991). Por el contrario, los fármacos ansiogénicos favorecen las conductas de tipo pasivo (Escorihuela et al. 1993). La relación negativa entre ansiedad y ejecución de la TWAA viene apoyada por la comparación de líneas de ratas seleccionadas genéticamente (Brush 2003; Steimer y Driscoll 2003).

El paradigma de la evitación activa puede utilizarse como modelo para estudiar la controlabilidad del estrés. En los primeros trabajos que han utilizado este modelo, Richter-Levin y colaboradores estudiaron en rata los efectos de la exposición a 6 sesiones consecutivas en la TWAA. A las dos semanas, se re-expusieron los sujetos a la misma

caja lanzadera, sin estímulos específicos, y se observaron durante los primeros minutos de exposición mayores niveles de *freezing* en el grupo YOKED que en el MASTER (Ilin y Richter-Levin 2009). En otro estudio (Lucas et al. 2014), se realizó el mismo procedimiento y se compararon las consecuencias del control en varias pruebas. Un día después de la última sesión de estrés se llevó cabo una tarea de discriminación de olores para estudiar si estaban afectados los mecanismos de aprendizaje. En un laberinto con 4 brazos se presentaron dos olores, uno reforzado positivamente (bebida) y otro sin reforzar (privación). Se analizó el número de ensayos necesarios hasta que los sujetos escogían el brazo asociado al olor positivo. El grupo YOKED fue el que necesitó más ensayos para aprender la tarea, en comparación con los grupos CONTROL y MASTER, que fue el que menos ensayos necesitó. A las 48 h de la última sesión se realizó la prueba de la natación forzada observándose un aumento del tiempo de inmovilidad en el grupo YOKED respecto al CONTROL. Estos datos sugieren que, a corto plazo, la exposición a estrés incontrolable favorece la aparición de conductas de afrontamiento pasivas y dificulta el aprendizaje. Finalmente, a largo plazo (1 mes), se llevó a cabo una nueva tarea de evitación activa en otro contexto (distinto color, textura y olor), siendo el CS una luz en vez de un tono. En esta tarea todos los grupos tenían la capacidad de controlar el choque. El grupo MASTER fue el que realizó más evitaciones, en tanto que el YOKED realizó más respuestas nulas, indicando un cierto efecto negativo, aunque modesto. Estos datos sugieren que la experiencia previa de control en una tarea TWAA favorece el aprendizaje y las estrategias de afrontamiento activas frente a estímulos aversivos.

2.4- ¿Es sensible el eje HPA a la controlabilidad en animales?

Una exposición prolongada a choques eléctricos intensos produce una activación pronunciada del eje HPA. Sin embargo, la respuesta hormonal inducida por una exposición aguda a choques eléctricos escapables no difiere de la observada frente a los inescapables (Maier et al. 1986). Estos datos vienen apoyados por otros trabajos con el mismo modelo en los que se observa que ambas situaciones no difieren respecto a la activación de la transcripción de los genes para CRH, encefalina o neurotensina en el PVN (Helmreich et al. 1999). Resultados similares en la respuesta periférica del eje HPA se han observado tras dos exposiciones a choques escapables o inescapables (Helmreich et al. 2008). De hecho, la respuesta de corticosterona tampoco parece diferenciar entre

ambos tras la exposición repetida en ratas (Mormede et al. 1988) o ratones (Prince y Anisman 1990). El único estudio en el que se ha observado una mayor respuesta de adrenalina y corticosterona en función del control en una tarea de escape utilizó un procedimiento de finalización del choque más específico como es presionar una palanca (Swenson y Vogel 1983), lo que sugiere que quizás un comportamiento menos reflejo que el cambio de compartimento en la caja lanzadera sea más útil para detectar diferencias fisiológicas. En este mismo sentido, es de especial interés que sí pueden aparecer diferencias en la respuesta de corticosterona entre MASTER y YOKED cuando se utiliza una tarea de evitación y no de escape, especialmente tras una sesión muy prolongada (Tsuda y Tanaka 1985).

La posibilidad de control sobre choques eléctricos tampoco parece afectar a la sensibilización de la respuesta del eje HPA frente a nuevas situaciones de estrés (sensibilización heterotípica). Se ha observado una similar sensibilización de la respuesta del eje HPA frente a nuevos estímulos estresantes tanto emocionales como sistémicos tras la exposición a choques escapables o inescapables (Johnson et al. 2002). Esta sensibilización se observa de 24 h a 10 días post-estrés, desaparece a los 21 días, y parece asociada a una menor respuesta a la administración del glucocorticoide sintético dexametasona (O'Connor et al. 2003), lo que sugiere una alteración en los mecanismos de retro-inhibición. Sin embargo, la sensibilización no depende de los niveles de glucocorticoides ni de los mecanismos de retro-inhibición, dado que la adrenalectomía no elimina la sensibilización (O'Connor et al. 2004).

2.5- La controlabilidad en humanos.

En humanos se ha propuesto que la capacidad de los sujetos para controlar las situaciones estresantes tendría un gran impacto en las consecuencias conductuales y fisiológicas (Moscarello y Hartley 2017). Sin embargo, apenas existen estudios al respecto. Los sentimientos subjetivos de indefensión, depresión o rabia son más elevados tras la exposición a situaciones incontrolables que controlables (Markus et al. 2000; Müller, 2011). También se han descrito diferencias relacionadas con el eje HPA, observándose niveles más elevados de cortisol en saliva tras la exposición a estimulación aversiva incontrolable (cutánea) que controlable (Müller 2011). Estos datos están en consonancia con los obtenidos por Sugaya et al. (2012) y Kern et al. (2008), quienes describen una

correlación negativa entre la percepción de control y los niveles de cortisol en una situación de estrés psicosocial incontrolable. Globalmente, podemos considerar que los estímulos estresantes incontrolables darían lugar a una mayor activación del eje HPA (ver Dickerson y Kemeny, 2004).

Se desconocen en gran medida las bases neurobiológicas de la controlabilidad en humanos. En un estudio pionero (Kerr et al. 2012), voluntarios con fobia a las serpientes fueron expuestos a vídeos cortos en los que aparecían dichos animales. La mitad de los sujetos podían anticipar el inicio del vídeo y evitarlo (grupo MASTER). Mediante resonancia magnética funcional se observó un incremento de la actividad de la PFC ventromedial durante la anticipación de los vídeos solo en los sujetos que podían ejercer control (MASTER). Además, cuando la presentación de los vídeos fue controlable se observó un aumento de la conectividad funcional entre la PFC ventromedial y la amígdala, un área que muestra una actividad exagerada en las fobias (Etkin y Wager 2007). Los resultados no parecen concordar con los obtenidos en sujetos sanos (Wood et al. 2015), en los cuales la actividad de la PFC ventromedial y de la formación hipocampal fue menor cuando la amenaza (ruido blanco de 100dB a través de unos auriculares) fue predecible y controlable que en el resto de las situaciones posibles. Estas diferencias entre estudios podrían deberse a las distintas poblaciones estudiadas o al tipo de estímulo estresante. Un estudio piloto ha investigado el efecto de la estimulación intracraneal de la PFC dorsolateral para inducir resiliencia frente a las consecuencias negativas de un paradigma de indefensión aprendida (Taylor et al. 2014), utilizando la ejecución en una tarea cognitiva (anagramas) como variable dependiente. Aunque los resultados no son concluyentes, el moderado impacto negativo del estrés incontrolable parece mitigado por la estimulación prefrontal.

Resulta especialmente interesante para nuestro estudio cómo el control sobre el estrés afecta a las funciones ejecutivas. Henderson et al. (2012) expusieron sujetos sanos a la tarea *Color-Word Stroop*, que consiste en identificar el color en que está escrita la palabra cuando hay una incongruencia entre el nombre del color y el color de la tinta en el que está escrita (v.g. la palabra “rojo” escrita en color azul). Este tipo de tareas requiere inhibición conductual, para evitar responder de manera inadecuada. Cuando los sujetos tenían capacidad de control sobre una experiencia de estrés (acústico), el rendimiento en la tarea mejoraba, siempre y cuando la percepción subjetiva de estrés durante todo el procedimiento hubiera sido moderada. En cambio, en las condiciones de

incontrolabilidad, la percepción subjetiva de estrés no estaba relacionada (no podía predecir) con la habilidad del sujeto para realizar la tarea. Estos datos demuestran que la capacidad de control en situaciones de estrés moderado tiene efectos beneficiosos que potencian las habilidades cognitivas. En cambio, la falta de control o una respuesta subjetiva de estrés exagerada tiene el efecto contrario.

El control sobre el estrés también puede afectar al condicionamiento del miedo en humanos, valorado mediante la conductancia eléctrica de la piel. La exposición previa a choques eléctricos controlables (grupo MASTER) o no controlables (YOKED) afectó de forma bidireccional al condicionamiento del miedo llevado a cabo posteriormente, utilizando el mismo estímulo aversivo como US (Hartley et al. 2013): respecto a los controles no expuestos previamente al choque, el grupo YOKED mostró peor extinción del miedo y más recuperación espontánea, mientras que el grupo MASTER mejoró la extinción y redujo la recuperación espontánea.

Aunque los trabajos en humanos son escasos, muchos de los datos disponibles son compatibles con los obtenidos en experimentos con roedores, apoyando la importancia que el control y la percepción de control sobre las situaciones estresantes puede tener en la capacidad de los sujetos para resolver problemas y tomar decisiones de manera adecuada.

3- LA IMPULSIVIDAD.

Uno de los objetivos del presente trabajo es estudiar cómo el estrés influye en la aparición de trastornos asociados a la impulsividad. En este apartado, se describen las principales características de este constructo teórico en relación con las patologías típicamente asociadas a problemas en el control de impulsos. Además, se detallan las tareas de laboratorio más utilizadas para su estudio en animales, así como sus bases farmacológicas y neurobiológicas.

3.1- Concepto y patologías asociadas al control de impulsos.

De las muchas definiciones del constructo de impulsividad, destaca la que la identifica con la predisposición a reacciones rápidas y no planeadas a estímulos internos o externos, y con una escasa valoración de las consecuencias negativas de estas acciones, tanto para el propio individuo como para otras personas (citado en Hamilton et al. 2015). Generalmente se asocia con un mal funcionamiento o inmadurez de las funciones ejecutivas, y en concreto, con una disfunción de los procesos inhibitorios (Bari y Robbins 2013a).

En los estudios clínicos se utilizan cuestionarios para valorar la tendencia a la impulsividad. El más utilizado es la *Barrat Impulsivity Scale* (Patton et al. 1995) que consiste en contestar a una serie de afirmaciones como “No suelo prestar atención”, “Cambio de idea con facilidad”, “Hago las cosas sin pensar”, “Planeo mis tareas minuciosamente” o “Ahorro de manera regular”. Sin embargo, el constructo de impulsividad parece ser multidimensional, no quedando totalmente reflejado en los mencionados cuestionarios. Se acepta que la impulsividad incluye tres dimensiones diferenciadas (Winstanley et al. 2010): (i) cognitiva o de elección, reflejada en la escasa tolerancia a la demora y la apetencia por el riesgo; (ii) motora, que refleja anticipación en las acciones y (iii) no-planificación, reflejada en una falta de preocupación por las consecuencias futuras de las acciones realizadas. Además de diferentes cuestionarios, también se han propuesto en humanos diversas pruebas neuropsicológicas para abordar dicho constructo en sus diferentes dimensiones, pruebas que pueden ser trasladables a modelos animales. En animales, los modelos se centran principalmente en las dos primeras dimensiones mencionadas (Figura 3).

Las tareas de laboratorio más utilizadas para estudiar la impulsividad motora, tanto en humanos como en animales, son la *stop-signal reaction time task*, el paradigma del *go/no-go*, el *5-choice-serial-reaction-time task* (5CSRTT) y el *continuous performance test*. La tarea más conocida y utilizada para estudiar la impulsividad cognitiva y la toma de decisiones es la de descuento por demora (*delay discounting task*). Por otra parte, para valorar la toma de decisiones en situaciones que conllevan además un riesgo asociado se utiliza la tarea del *gambling* (*Iowa gambling* para humanos, IGT; *Rat gambling* para roedores, RGT).

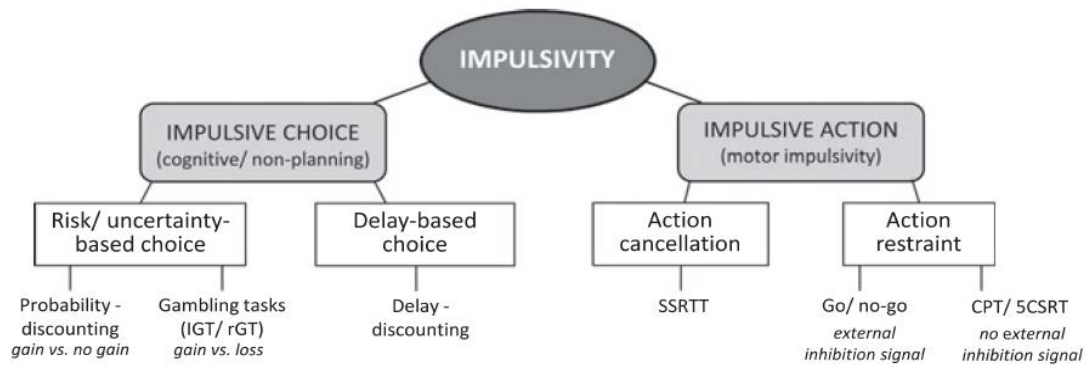


Figura 3. El constructo de la impulsividad en animales se divide en dos dimensiones: *impulsividad cognitiva e impulsividad motora*. IGT: Iowa gambling task; RGT: rat gambling task; SSRTT: stop-signal reaction time task; CPT: continuous performance test; 5CSRT: -choice-serial-reaction-time (de Winstanley et al. 2010).

La impulsividad es un rasgo que se ha conservado a lo largo de la filogenia (puede observarse en todos los vertebrados), lo que sugiere que la toma de decisiones o acciones rápidas, sin premeditar, puede tener en ocasiones consecuencias positivas. No obstante, suele considerarse como un rasgo negativo asociado al riesgo y a la búsqueda de nuevas sensaciones, siendo una de las características principales de muchas patologías psiquiátricas como el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) (Nigg 2001) o la adicción a las drogas (Jentsch y Taylor 1999). El TDAH es una patología que se inicia habitualmente a una edad temprana y sobre todo afecta a las funciones ejecutivas. Los sujetos muestran bajos niveles de atención, desorganización, hiperactividad e impulsividad, aunque no siempre se observan todos los síntomas. En muchos casos la patología persiste durante la edad adulta, lo que da lugar a problemas de interacción social y dificultades académicas u ocupacionales (Armstrong et al. 2006). Un meta-análisis ha concluido que los sujetos diagnosticados con TDAH presentan déficits inhibitorios en tareas de laboratorio (Willcutt et al. 2005). Estudios de neuro-imagen en niños (promedio de 12 años) han demostrado un menor volumen de la PFC y del estriado en los sujetos con TDAH (Aylward et al. 1996; Castellanos et al. 1996; Casey et al. 1997; Filipek et al. 1997). Además se ha observado, en adolescentes hiperactivos con respecto a los sujetos adolescentes controles, una menor activación (por resonancia magnética funcional), en respuesta a diversas tareas cognitivas en una amplia red de circuitos que involucran al estriado, el giro inferior frontal, la corteza cingulada anterior y el área premotora suplementaria (Durstun 2003; Tamm et al. 2004; Booth et al. 2005). Parece existir una

correlación entre las alteraciones morfológicas en la PFC y las medidas conductuales de desinhibición (Casey et al. 1997). Puesto que los déficits estructurales y funcionales del giro inferior frontal, el estriado y de otros núcleos de los ganglios basales se han observado repetidamente, estas áreas y los circuitos a ellas asociados podrían ser el sustrato de los déficits de inhibición y atención del TDAH.

Además de ser un rasgo distintivo del TDAH, la impulsividad también lo es de las conductas adictivas. La dificultad para ejercer control sobre la búsqueda y el consumo de drogas es un sello distintivo de la adicción. Esta desinhibición da lugar a un consumo mayor y más persistente, a pesar de las consecuencias negativas personales (DSM-V). Se ha planteado si la impulsividad es un efecto secundario al efecto neurotóxico provocado por el consumo crónico de drogas o un factor de riesgo que predispone al consumo (Winstanley et al. 2010). Para resolver esta cuestión son necesarios estudios longitudinales, tanto en humanos como en modelos animales. En roedores, niveles elevados de impulsividad están asociados a una mayor tendencia al consumo de drogas como la cocaína (Dalley et al. 2007) y la nicotina (Diergaarde et al. 2008). En humanos, trabajos con hermanos/as de consumidores (Morein-Zamir et al. 2013) han observado que los hermanos/as no consumidores muestran también un retraso en la ejecución de una tarea de inhibición, con niveles de inhibición intermedios entre sus hermanos/as adictos y los sujetos control (no hermanos de consumidores). Estos y otros datos sugieren que la impulsividad es un fenotipo de riesgo para la adicción, independientemente de que pueda ser agravada por la propia droga.

3.2- Five-choice-serial-reaction-time task.

Esta tarea evalúa la impulsividad motora a través de las respuestas prematuras o anticipadas. La versión para roedores (Figura 4) consiste en entrenar a los animales para detectar un pequeño haz de luz transitorio dentro de un agujero entre 5 presentes e introducir el hocico (*nose-poke*) en el agujero donde apareció previamente la luz para obtener una recompensa (Robbins 2002; Bari et al. 2008; Material y métodos 8.3). Si realiza la respuesta en el agujero correcto, el animal recibe una recompensa (comida) en un comedero que está en una pared del aparato opuesta a la de los agujeros. Para realizar correctamente la tarea, el sujeto debe prestar mucha atención a la localización de cada uno de los 5 agujeros (colocados todos al mismo nivel horizontal) e inhibir la respuesta

motora de *nose-poke* hasta que aparezca la luz en uno de ellos. La atención se mide mediante la proporción entre las respuestas correctas y el total de respuestas (correctas más incorrectas, excluyendo las omisiones), lo que se denomina *accuracy* (exactitud). La falta de motivación y/o la dificultad para mantener la atención sostenida pueden favorecer las omisiones (falta de respuesta). Asimismo, la latencia para recoger la recompensa también es un buen indicador de motivación. La impulsividad motora se mide a través de las respuestas prematuras, es decir, aquellas realizadas antes de que aparezca la luz (anticipadas). Esta tarea también permite estudiar la conducta perseverante o compulsiva, que aparece cuando el sujeto realiza varias respuestas en un mismo agujero justo después de que haya obtenido una recompensa asociada a dicho agujero. Aunque los conceptos de impulsividad y compulsión están separados, comparten mecanismos neurobiológicos similares (Fineberg et al. 2014) y pueden evaluarse simultáneamente en esta misma tarea, razón por la cual en este apartado se mencionaran algunos estudios relacionados con la compulsión.

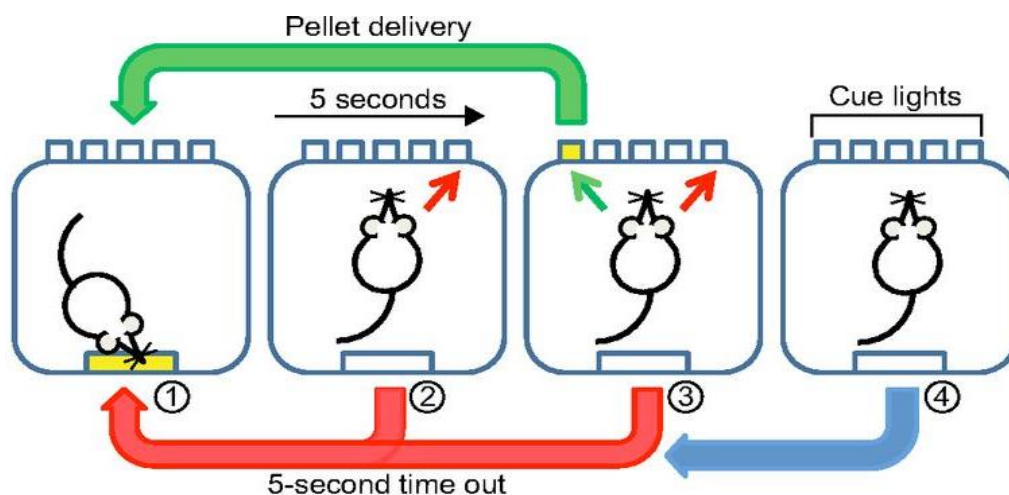


Figura 4. Esquema general del funcionamiento de la tarea del 5CSRT en roedores. 1) *nose-poke* para iniciar el ensayo; 2) respuesta prematura (en rojo) inicia el time-out; 3) respuesta correcta (en verde) libera pellet) e incorrecta (en rojo) inicia time-out; 4) omisión (en azul) inicia time-out (adaptado de Jupp et al. 2013).

El control de la impulsividad motora es dependiente de la integridad de las distintas subdivisiones de los lóbulos frontales, como se ha demostrado en modelos animales mediante lesiones específicas de dichas áreas (Tabla 1). Aunque existen distintos criterios para subdividir la PFC en roedores, en la presente tesis la dividiremos en corteza prefrontal medial (mPFC) y orbitofrontal (OFC). Dentro de la mPFC distinguiremos la

corteza cingulada anterior o ACC (que incluye Cg1), la prelímbica y la infralímbica. En general, en rata, las lesiones de la región dorsal de la corteza cingulada anterior y de la infralímbica aumentan el número de respuestas prematuras y en algunos casos también disminuye la *accuracy*, demostrando que la integridad de la PFC es necesaria para la eficacia en la realización de la tarea (Muir et al. 1996; Passetti et al. 2002; Robbins 2002; Chudasama et al. 2003). En cambio, las lesiones de la prelímbica y la OFC se han relacionado sobre todo con un aumento de la conducta compulsiva (Chudasama y Muir 2001; Chudasama et al. 2003).

Tabla 1. Efectos representativos de las lesiones de estructuras frontales implicadas en la impulsividad motora en la tarea del 5CSRRT.

| REFERENCIA | ÁREA | PROCEDIMIENTO | EFFECTOS |
|-----------------------|---------------|---|-----------------------------------|
| Chudasama et al. 2003 | ACC | Lesión excitotóxica (Ácido quinolínico) | ↓ <i>accuracy</i> |
| Robbins 2002 | ACC | Lesión excitotóxica (Ácido quinolínico) | ↑ impulsividad |
| Muir et al. 1996 | ACC | Lesión excitotóxica (Ácido quinolínico) | ↑ impulsividad |
| Muir et al. 1996 | ACC | Lesión excitotóxica (Ácido quinolínico) | ↑ impulsividad |
| Passetti et al. 2002 | ACC | Lesión excitotóxica (Ácido quinolínico) | ↓ <i>accuracy</i> |
| Chudasama y Muir 2001 | PL | Lesión excitotóxica (NMDA) | ↑ compulsión |
| Passetti et al. 2002 | PL + IL | Lesión excitotóxica (Ácido quinolínico) | ↑ compulsión ↓ <i>accuracy</i> |
| Chudasama et al. 2003 | IL | Lesión excitotóxica (Ácido quinolínico) | ↑ impulsividad |
| Passetti et al. 2002 | mPFC completa | Lesión excitotóxica (Ácido quinolínico) | ↑ compulsión |
| Chudasama et al. 2003 | OFC | Lesión excitotóxica (Ácido quinolínico) | ↑ compulsión |

ACC: corteza cingulada anterior; PL: prelímbica; IL: infralímbica; mPFC: corteza prefrontal medial; OFC: corteza orbitofrontal; NMDA: N-metil-D-aspartato.

Las regiones subcorticales implicadas en el control de la inhibición, como el estriado (tanto dorsal como accumbens), reciben proyecciones de la corteza y envían señales para interceptar y frenar las respuesta motoras (ver revisión en Dalley y Robbins 2017). De

hecho, la desconexión de los circuitos de la PFC con los ganglios basales induce un aumento de la impulsividad y de la conducta compulsiva (Christakou et al. 2001, 2004). Otros trabajos ponen de manifiesto la importancia de estructuras subcorticales en la conducta impulsiva caracterizada por un aumento de las conductas motoras no apropiadas (Tabla 2). Así, lesiones específicas de estructuras subcorticales como el tálamo medio dorsal (Chudasama y Muir 2001), el núcleo sub-talámico (Baunez y Robbins 1997), el hipocampo ventral (Abela et al. 2013) y el estriado dorsomedial (Rogers et al. 2001) también aumentan la impulsividad motora.

Tabla 2. Efectos representativos de las lesiones de áreas subcorticales implicadas en la impulsividad motora en la tarea del 5CSRTT.

| REFERENCIA | ÁREA | PROCEDIMIENTO | EFECTOS |
|-----------------------|-----------------------|---|---|
| Rogers et al. 2001 | Estriado dorsolateral | Lesión excitotóxica (Ácido quinolínico) | ↓ <i>accuracy</i> |
| Rogers et al. 2001 | Estriado dorsomedial | Lesión excitotóxica (Ácido quinolínico) | ↑ impulsividad ↑ compulsión |
| Abela et al. 2013 | HP dorsal | Lesión excitotóxica (NMDA) | NE |
| Abela et al. 2013 | HP ventral | Lesión excitotóxica (NMDA) | ↑ impulsividad ↓ <i>accuracy</i> |
| Chudasama y Muir 2001 | Tálamo medio dorsal | Lesión excitotóxica (NMDA) | ↑ impulsividad |
| Chudasama y Muir 2001 | Tálamo anterior | Lesión excitotóxica (NMDA) | NE |
| Baunez y Robbins 1997 | Núcleo subtalámico | Lesión excitotóxica (Ácido iboténico) | ↑ impulsividad ↑ compulsión ↓ <i>accuracy</i> |

NMDA: N-metil-D-aspartato; HP: hipocampo; NE: no hay efecto.

La farmacología de la impulsividad motora se ha estudiado mediante la administración sistémica o intracerebral de fármacos. En las tablas 3, 4 y 5 se resumen algunos de los efectos descritos con fármacos que alteran el funcionamiento de los sistemas dopaminérgico, noradrenérgico y serotoninérgico. La dopamina y la noradrenalina están implicadas en la modulación de la impulsividad como demuestra el uso terapéutico de fármacos que incrementan la función de las mismas en el SNC para el tratamiento de trastornos relacionados con el control de impulsos (Economidou et al. 2012). De hecho,

alteraciones en la actividad de dichas catecolaminas en la PFC dan lugar a una sintomatología similar al TDAH (ver revisión en Arnsten 2015).

Respecto a la actividad dopaminérgica en PFC, las infusiones de agonistas y antagonistas D1 son más eficientes que las de los fármacos que tienen mayor afinidad para los receptores D2. Además, los fármacos que actúan sobre los D1 en PFC tienen efectos más potentes sobre la eficiencia para realizar la tarea (*accuracy*) que sobre la impulsividad (Granon et al. 2000). En cambio, los efectos sobre las respuestas prematuras estarían mediados principalmente por circuitos subcorticales que incluyen el núcleo accumbens, observándose una reducción de la impulsividad tras la administración de antagonistas dopaminérgicos D1 y D2 (Pattij et al. 2007). En esta misma línea, la administración de agonistas D2 en el estriado dorsomedial incrementa la impulsividad y la compulsión (Agnoli et al. 2013).

Por otra parte, el uso de anfetamina o de metilfenidato podría potenciar, en ciertas circunstancias, la impulsividad motora (ver Tabla 3). La anfetamina es un agonista indirecto y, aunque sus efectos sobre impulsividad están más relacionados con la dopamina, actúa como inhibidor de la recaptación y favorecedor de la liberación tanto de dopamina, como de noradrenalina y serotonina. El metilfenidato es un inhibidor de la recaptación de dopamina y noradrenalina. El efecto paradójico de estos fármacos sobre la impulsividad es de particular importancia puesto que tanto el metilfenidato como la anfetamina se utilizan en el tratamiento del TDAH. En contra de lo que sería de esperar, los estudios con anfetamina parecen indicar consistentemente un incremento de la impulsividad motora, sea administrada sistémicamente (van Gaalen et al. 2006) o intracerebralmente (Cole y Robbins 1989).

Tabla 3. Efectos representativos de la administración sistémica e intra-cerebral de agonistas y antagonistas dopaminérgicos sobre la impulsividad motora en la tarea del 5CSRTT.

| REFERENCIA | NEUROTRANSMISOR | VIA | EFECTOS |
|------------------------|--|-------------------------|--------------------------------|
| DOPAMINA | | | |
| Cole y Robbins 1987 | Antagonistas D1/D2 (Flupenthixol) | Sistémico | ↓ impulsividad |
| van Gaalen et al. 2006 | Anfetamina | Sistémico | ↑ impulsividad |
| Caprioli et al. 2015 | Metilfenidato | Sistémico | ↑↓ impulsividad (dosis) |
| Pattij et al. 2012 | Metilfenidato | Sistémico | ↑↓ impulsividad (dosis) |
| Bizarro et al. 2004 | Metilfenidato | Sistémico | ↓ impulsividad |
| Granon et al. 2000 | Agonistas D1 (SKF38393) | PL | ↑ <i>accuracy</i> |
| Granon et al. 2000 | Antagonistas D1 (SCH23390) | PL | ↓ <i>accuracy</i> |
| Granon et al. 2000 | Antagonistas D2 (Sulpiride) | PL | NE |
| Cole y Robbins 1989 | Anfetamina | núcleo accumbens | ↑ impulsividad |
| Pattij et al. 2007 | Antagonistas D1 y D2 (SCH23390 y Eticlopride) | núcleo accumbens | ↓ impulsividad |
| Economidou et al. 2012 | Metilfenidato | AcbC | ↑ impulsividad |
| Agnoli et al. 2013 | Agonista D2 (Quinpirole) | estriado dorsomedial | ↑ impulsividad ↑ compulsión |

AcbC: núcleo accumbens core; PL: corteza prelámbica; NE: no hay efecto.

Sin embargo, los efectos del metilfenidato no siempre van en la misma dirección. Su inyección en el accumbens incrementa la impulsividad, mientras que esta no se afecta si se inyecta en la subdivisión del *shell* (Economidou et al. 2012). Cuando es administrado sistémicamente, se ha demostrado que este fármaco puede reducir las respuestas prematuras a dosis bajas, mientras que a dosis más altas las incrementa (Pattij et al. 2012), pero en otro trabajo ninguna de las dosis (altas o bajas) de metilfenidato afecta ni a las respuestas prematuras ni a la atención (Paterson et al. 2012). Las diferencias individuales en impulsividad podrían explicar algunos efectos paradójicos del metilfenidato, de acuerdo con el estudio de Caprioli et al. (2015) en el que la administración crónica del

fármaco disminuye la impulsividad en sujetos con elevada impulsividad basal y la aumenta en los que son poco impulsivos. Además, el hecho de que en algunos trabajos no se penalicen las respuestas impulsivas (mediante la presencia de *time-outs*), podría también influir en los resultados encontrados y facilitar el efecto positivo (disminución) del metilfenidato en la impulsividad (Bizarro et al. 2004).

En el caso de la noradrenalina (ver Tabla 4), el uso de inhibidores específicos de la recaptación como la atomoxetina, administrado tanto sistémicamente como intra-accumbens, aumentaría la atención y/o disminuiría el número de respuestas prematuras (Blondeau y Deltu-Hagedorn 2007; Robinson et al. 2008b; Navarra et al. 2008; Economidou et al. 2012), apoyando la idea que los efectos sobre las respuestas prematuras estarían mediados por los circuitos subcorticales. Estos datos son también de especial interés puesto que la atomoxetina se utiliza también para el tratamiento del TDAH.

Tabla 4. Efectos representativos de la administración sistémica e intra-cerebral de agonistas y antagonistas noradrenérgicos sobre la impulsividad motora en la tarea del 5CSRTT.

| REFERENCIA | NEUROTRANSMISOR | VIA | EFFECTOS |
|--------------------------------|-----------------|-----------|----------------|
| NORADRENALINA | | | |
| Blondeau y Deltu-Hagedorn 2007 | Atomoxetina | Sistémico | ↓ impulsividad |
| Robinson et al. 2008b | | | |
| Navarra et al. 2008 | | | |
| Economidou et al. 2012 | Atomoxetina | AcbS | ↓ impulsividad |

AcbS: núcleo accumbens subdivisión shell.

Se han realizado también diversos estudios sobre la relación entre serotonina e impulsividad en esta tarea. Los receptores 5-HT1A y 5-HT1B son inhibidores de la actividad serotoninérgica actuando como auto-receptores, así que su activación mediante agonistas disminuye la liberación de serotonina. Se ha descrito que los agonistas 5-HT1A administrados sistémicamente aumentan las respuestas prematuras (Carli y Samanin 2000). Estos datos estarían en consonancia con los observados por Harrison et al. (1997), en los que un vaciado, mediante 5,7-dihidroxitriptamina, de los niveles de serotonina en la PFC, el estriado y la formación hipocampal, potencia la impulsividad motora. Por otra parte, los receptores de tipo 5-HT2 son estimuladores de la actividad serotoninérgica,

pero el efecto de los de tipo 2A es opuesto a los 2C: los antagonistas 5-HT2A y los agonistas 5-HT2C disminuyen las respuestas prematuras, en tanto que los agonistas mixtos (5-HT2A/2C) y antagonistas 5-HT2C la incrementan (ver Tabla 5).

Tabla 5. Efectos representativos de la administración sistémica e intra-cerebral de agonistas y antagonistas serotoninérgicos sobre la impulsividad motora en la tarea del 5CSRTT.

| REFERENCIA | NEUROTRANSMISOR | VIA | EFFECTOS |
|-------------------------|-----------------------------------|-------------------------|----------------|
| SEROTONINA | | | |
| Carli y Samanin 2000 | Agonistas 5-HT1A (8-OH-DPAT) | Sistémico | ↑ impulsividad |
| Higgins et al. 2001 | Antagonistas 5-HT2C (SB242084) | Sistémico | ↑ impulsividad |
| Winstanley et al. 2004a | Agonistas mixtos 5-HT2A/2C | Sistémico | ↑ impulsividad |
| Koskinen et al. 2000 | Agonistas mixtos 5-HT2A/2C | Sistémico | ↑ impulsividad |
| Navarra et al. 2008 | Agonistas 5-HT2C (WAY-163909) | Sistémico | ↓ impulsividad |
| Winstanley et al. 2003a | Antagonistas 5-HT2A (M100907) | PL | ↓ impulsividad |
| Robinson et al. 2008a | Antagonistas 5-HT2A (M100907) | núcleo accumbens | ↓ impulsividad |
| Agnoli y Carli 2012 | Antagonista 5-HT2A (M100907) | estriado dorsomedial | NE |
| Agnoli y Carli 2012 | Agonista 5-HT2C (Ro60-017) | estriado dorsomedial | NE |

5-HT: serotonina; PL: corteza prefrontal; NE: no hay efecto.

En humanos muy pocos estudios utilizan la metodología del 5CSRTT o pruebas similares (4CSRTT). En esta tarea, el estímulo lumínico aparece en una pantalla táctil y los sujetos deben presionar el recuadro virtual donde aparece transitoriamente la luz, midiéndose el número de respuestas prematuras. En consonancia con los estudios preclínicos la implicación de la serotonina está apoyada por estudios en voluntarios sanos que ingieren una dieta pobre en triptófano, precursor de la serotonina. Esta dieta, que reduce temporalmente los niveles de serotonina en el SNC, aumentó significativamente el número de respuestas prematuras (Worbe et al. 2014).

3.3- La tarea de descuento por demora.

Esta tarea evalúa el proceso mediante el cual el valor recompensante de un estímulo disminuye a medida que aumenta el tiempo necesario para obtener dicha recompensa. Se muestra un esquema de la tarea en roedores en la Figura 5. En esta prueba los sujetos pueden escoger entre dos palancas: una proporciona 1 pellet inmediato, y la otra proporciona 4 pellets, pero siempre tras una demora que, en función de la fase, se va incrementando desde 0 s (no demora) a 40 s. La elección de una recompensa menor pero inmediata en vez de una recompensa mayor, pero con cierta demora, es indicativo de impulsividad cognitiva o intolerancia a la demora. Aunque este tipo de elecciones impulsivas da lugar a una recompensa final (a largo plazo) muy pequeña, en la curva de ejecución de las tareas de descuento por demora se observa lo que se conoce como “punto de indiferencia” (*indifferent point*), que aparece cuando a determinadas demoras, muy elevadas, todos los sujetos prefieren la recompensa inmediata (Evenden y Ryan 1996; Cardinal et al. 2000; Winstanley et al. 2003b; Material y métodos 8.1).

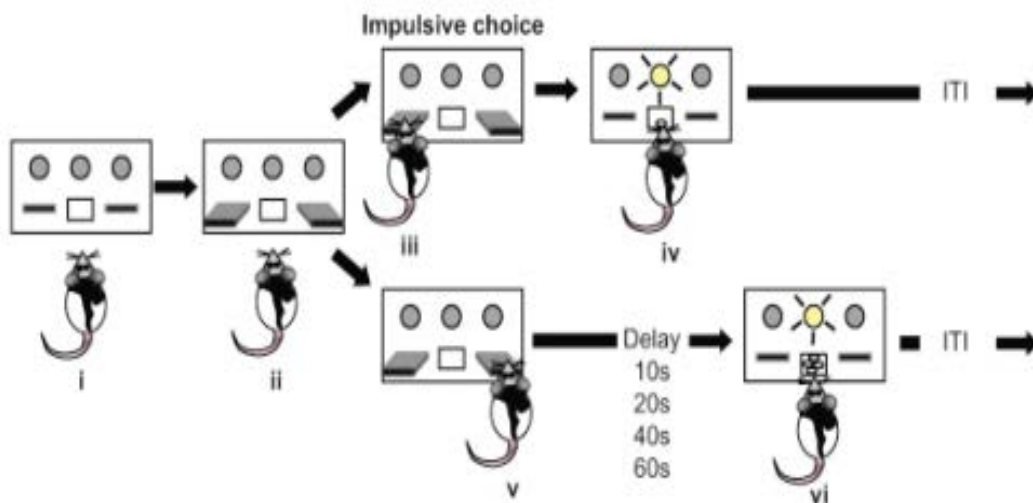


Figura 5. Esquema general del funcionamiento de la tarea de descuento por demora. ITI: tiempo entre-ensayos; delay: demora (adaptado de Eagle y Baunez, 2010).

Los experimentos de descuento por demora en animales permiten estudiar el sustrato neurobiológico de la impulsividad cognitiva. De nuevo, las regiones prefrontales juegan un papel crítico, aunque existe controversia respecto al papel específico de las diferentes subdivisiones, así como de las regiones subcorticales implicadas (Tabla 6 y 7). La impulsividad cognitiva aparece como consecuencia de un procesamiento anormal de la

magnitud de los refuerzos, y por ello los primeros estudios se centraron en el papel de distintas subdivisiones frontales y el núcleo accumbens (ver revisión Cardinal et al. 2004). Las distintas subdivisiones de la mPFC no parecen estructuras críticas para desarrollar impulsividad cognitiva, aunque sí para realizar con eficacia la tarea (Cardinal et al. 2001). En cambio, las lesiones completas de la OFC tienen efectos contradictorios; habiéndose descrito tanto un aumento (Mobini et al. 2002) como una disminución (Winstanley et al. 2004b; Mar et al. 2011) de la impulsividad, o no efecto (Abela y Chudasama, 2013). Para tratar de esclarecer estos datos aparentemente contradictorios se han realizado lesiones en distintas subregiones de la OFC: la medial, cuya actividad se relaciona con la preferencia por los refuerzos inmediatos, y la lateral, relacionada con el control inhibitorio. Las lesiones de la OFC medial aumentan la preferencia por la recompensa más grande (demorada), mientras que las de la OFC lateral aumentan la impulsividad cognitiva; es decir, la preferencia por la recompensa más pequeña (inmediata) (Mar et al. 2011). Por otra parte, las distintas subdivisiones del núcleo accumbens tienen también funciones distintas con respecto a la impulsividad cognitiva, observándose un aumento de la impulsividad en la tarea de descuento por demora tras lesiones del Core (Cardinal et al. 2001; Feja et al. 2014), en tanto que los efectos del Shell son menos consistentes (Pothuizen et al. 2005; Feja et al. 2014).

Otras estructuras estudiadas en relación con la impulsividad cognitiva son el núcleo subtalámico, la amígdala basolateral y la formación hipocampal. El subtalámico es una estructura clásicamente asociada con la actividad motora, pero más recientemente se ha estudiado su papel en el control de impulsos. Como ya se ha mencionado, los primeros estudios mostraron un aumento de la impulsividad motora tras una lesión excitotóxica de este núcleo (Uslaner y Robinson 2006). En cambio, en la tarea de descuento por demora se observa una disminución de la impulsividad cognitiva tras lesiones similares (Winstanley et al. 2005a; Uslaner y Robinson 2006), lo que apoya de nuevo la disociación entre la impulsividad motora y cognitiva. La amígdala basolateral es una estructura muy interconectada con la OFC y el núcleo accumbens, que juega un papel importante en el procesamiento de estímulos emocionales. Algunos autores sugieren que el aumento en la impulsividad cognitiva tras la lesión de la amígdala basolateral es debido a un mal procesamiento del valor anticipatorio de las recompensas, que acaba favoreciendo que los sujetos escojan de forma más impulsiva (Winstanley et al. 2004b). Por otra parte, las lesiones en la formación hipocampal ventral también aumentan la impulsividad cognitiva

en la tarea de descuento por demora (Abela y Chudasama 2013), al igual que sucedía con la impulsividad motora (Abela et al. 2013).

Tabla 6. Efectos representativos de las lesiones de las áreas corticales implicadas en la impulsividad cognitiva durante la tarea de descuento por demora.

| REFERENCIA | ÁREA | PROCEDIMIENTO | EFFECTOS |
|-------------------------|-------------|---|----------------|
| Cardinal et al. 2001 | PL + IL | Lesión excitotóxica (Ácido quinolínico) | NE |
| Cardinal et al. 2001 | ACC | Lesión excitotóxica (Ácido quinolínico) | NE |
| Mobini et al. 2002 | OFC | Lesión excitotóxica (Ácido quinolínico) | ↑ impulsividad |
| Abela y Chudasama 2013 | OFC | Lesión excitotóxica (NMDA) | NE |
| Mar et al. 2011 | OFC | Lesión excitotóxica (Ácido quinolínico) | ↓ impulsividad |
| Winstanley et al. 2004b | OFC | Lesión excitotóxica (Ácido quinolínico) | ↓ impulsividad |
| Mar et al. 2011 | OFC lateral | Lesión excitotóxica (Ácido quinolínico) | ↑ impulsividad |
| Mar et al. 2011 | OFC medial | Lesión excitotóxica (Ácido quinolínico) | ↓ impulsividad |

ACC: corteza cingulada anterior; IL: corteza infralímbica; PL: corteza prelímbica; OFC: corteza orbito frontal; NMDA: N-metil-D-aspartato; NE: no hay efecto.

Tabla 7. Efectos representativos de las lesiones de las áreas subcorticales implicadas en la impulsividad cognitiva durante la tarea de descuento por demora.

| REFERENCIA | ÁREA | PROCEDIMIENTO | EFFECTOS |
|----------------------------|----------------------|---|----------------|
| Cardinal et al. 2001 | núcleo accumbens | Lesión excitotóxica (Ácido quinolínico) | ↑ impulsividad |
| Cardinal et al. 2001, 2004 | AcbC | Lesión excitotóxica (Ácido quinolínico) | ↑ impulsividad |
| Pothuizen et al. 2005 | AcbS | Lesión excitotóxica (NMDA) | NE |
| Feja et al. 2014 | AcbS AcbC | Inactivación temporal (Muscimol) | ↑ impulsividad |
| Abela y Chudasama 2013 | HP ventral | Lesión excitotóxica (NMDA) | ↑ impulsividad |
| Winstanley et al. 2004b | amígdala basolateral | Lesión excitotóxica (Ácido quinolínico) | ↑ impulsividad |
| Uslaner y Robinson 2006 | núcleo subtalámico | Lesión excitotóxica (Ácido iboténico) | ↓ impulsividad |
| Winstanley et al. 2005a | núcleo subtalámico | Lesión excitotóxica (Ácido iboténico) | ↓ impulsividad |

HP: hipocampo; NMDA: N-metil-D-aspartato; AcbC: núcleo accumbens core; AcbS: núcleo accumbens shell; NE: no hay efecto.

El sustrato farmacológico de la impulsividad cognitiva ha sido ampliamente estudiado en modelos animales. En las tablas 8, 9 y 10 se resumen algunos de los efectos descritos con fármacos que actúan sobre los sistemas monoaminérgicos. La actividad dopaminérgica mesocorticolímbica parece estar muy ligada a la impulsividad cognitiva. En apoyo de esta idea se ha observado en ratas que la liberación de dopamina en el núcleo accumbens varía en función de la demora para obtener la recompensa, observándose una disminución a medida que la demora aumenta (Saddoris et al. 2015). Por otro lado, en animales expuestos a la tarea de descuento por demora y clasificados como “menos impulsivos” o “muy impulsivos” se ha valorado la liberación de dopamina en las regiones *core* y *shell* del accumbens y en mPFC en condiciones basales, observándose una menor liberación en los sujetos “muy impulsivos” (Diergaarde et al. 2008). Asimismo, la administración sistémica de antagonistas D1, pero no D2, aumenta la preferencia por la recompensa inmediata (van Gaalen et al. 2006), indicativo de mayor impulsividad.

Tabla 8. Efectos representativos de la administración sistémica de agonistas y antagonistas dopaminérgicos sobre la impulsividad cognitiva durante la tarea de descuento por demora.

| REFERENCIA | NEUROTRANSMISOR | VIA | EFFECTOS |
|--------------------------------|--|---------------|------------------|
| DOPAMINA | | | |
| van Gaalen et al. 2006 | Antagonista D1 (SCH23390) | Sistémico | ↑ impulsividad |
| Cardinal et al. 2000 | Antagonistas D1/D2 (Flupenthixol) | Sistémico | ↑ impulsividad |
| van Gaalen et al. 2006 | Antagonista D2 (Eticlopride) | Sistémico | NE |
| van Gaalen et al. 2006 | Inhibidor recaptación DA (GBR12909) | Sistémico | ↓ impulsividad |
| Cardinal et al. 2000 | Anfetamina | Sistémico | ↑ ↓ impulsividad |
| Winstanley et al. 2005b, 2003b | | Sistémico | ↓ impulsividad |
| van Gaalen et al. 2006 | | Sistémico | ↓ impulsividad |
| van Gaalen et al. 2006 | | Metilfenidato | Sistémico |
| Paterson et al. 2012 | | | |

NE: no hay efecto.

Tabla 9. Efectos representativos de la administración sistémica de agonistas y antagonistas noradrenérgicos sobre la impulsividad cognitiva durante la tarea de descuento por demora.

| REFERENCIA | NEUROTRANSMISOR | VIA | EFFECTOS |
|------------------------|---|-----------|--------------------------------------|
| NORADRENALINA | | | |
| Robinson et al. 2008b | Atomoxetina | Sistémico | ↓ impulsividad |
| Sun et al. 2012 | | | |
| van Gaalen et al. 2006 | Inhibidor recaptación NA (Desipramina) | Sistémico | Efectos mixtos, dosis-dependiente |
| van Gaalen et al. 2006 | Agonista $\alpha 1$ (Fenilefrina) | Sistémico | NE |
| van Gaalen et al. 2006 | Agonista $\alpha 2$ (Clonidina) | Sistémico | ↑ impulsividad |

NA: noradrenalina; NE: no hay efecto.

Podríamos esperar que la anfetamina y el metilfenidato disminuyeran la impulsividad cognitiva y así se ha observado en diversos estudios con estos fármacos (Winstanley et al. 2005b, 2003; Paterson et al. 2012) y con inhibidores específicos de la recaptación de dopamina (van Gaalen et al. 2006). No obstante, los efectos de la anfetamina sobre la impulsividad cognitiva no siempre están en consonancia con la hipótesis, observándose incluso un aumento en ciertas condiciones. Se han descrito muchas posibles razones para explicar estos datos contradictorios. Por ejemplo, la administración de anfetamina disminuye la impulsividad cognitiva cuando las distintas demoras se presentan en la sesión de forma ascendente, pero la incrementan cuando aparecen en orden descendente (Orsini et al. 2017). Otros autores han demostrado que el efecto del fármaco depende de la presencia o ausencia de una señal discreta (CS) que prediga la aparición del refuerzo en la tarea, observándose un aumento de la preferencia por la recompensa inmediata cuando no hay señal (Cardinal et al. 2000). Finalmente, los niveles basales de impulsividad también son críticos en este sentido, observándose en sujetos más impulsivos una disminución tras la administración de anfetamina y un efecto opuesto en los sujetos “menos impulsivos” (Perry y Carroll 2008), apoyando la idea de que se requiere un funcionamiento dopaminérgico intermedio para un adecuado control cognitivo. En cuanto al metilfenidato, ciertos estudios han obtenido la esperada disminución en la impulsividad cognitiva (van Gaalen et al. 2006; Paterson et al. 2012), pero algunos parámetros de la tarea podrían ser también importantes, como sugieren los datos de Tanno et al. (2014) en los que los efectos del fármaco sobre la impulsividad fueron diferentes en función de si las demoras se presentaban en orden ascendente o descendente.

La atomoxetina, que incrementa los niveles extracelulares de noradrenalina en la PFC y el estriado al inhibir su recaptación, administrada sistémicamente, disminuye la impulsividad cognitiva (Robinson et al. 2008b; Sun et al. 2012), en el mismo sentido que en los trabajos centrados en impulsividad motora (apartado 3.2). Por otra parte, los agonistas adrenérgicos α_2 (que disminuyen la liberación de noradrenalina por mediación de los auto-receptores), también administrados sistémicamente, potencian las conductas impulsivas (van Gaalen et al. 2006).

Tabla 10. Efectos representativos de la administración sistémica e intraventricular de agonistas y antagonistas serotoninérgicos sobre la impulsividad cognitiva durante la tarea de descuento por demora.

| REFERENCIA | NEUROTRANSMISOR | VIA | EFFECTOS |
|---------------------------|--|-----------|--|
| SEROTONINA | | | |
| Winstanley et al. 2005b | Agonistas 5HT1A (8-OH-DPAT) | Sistémico | ↑ impulsividad |
| Poulos et al. 1996 | Agonistas 5HT1A (8-OH-DPAT) | Sistémico | ↑ impulsividad |
| van den Bergh et al. 2006 | Agonistas 5HT1A/1B (Flesinoxan y Eltoprazine) | Sistémico | ↑ preferencia recompensa pequeña a demora 0s |
| Talpos et al. 2006 | Antagonistas 5HT2A/2C (Ketanserina) | Sistémico | NE |
| Talpos et al. 2006 | Antagonistas 5HT2C/2B (SER-082) | Sistémico | ↓ impulsividad |

5-HT: serotonina; NE: no hay efecto.

En la misma línea que con el 5CSRRT, el vaciado serotoninérgico mediante la administración de 5,7-dihidroxitriptamina aumenta la impulsividad cognitiva (Sabol et al. 1995; Winstanley et al. 2003). La administración sistémica de agonistas de los receptores 5-HT1A y 5-HT1B, que inhiben la actividad de las neuronas serotoninérgicas o la liberación de 5-HT, respectivamente, aumentan también la preferencia por la recompensa inmediata (Poulos et al. 1996; Winstanley et al. 2005b), aunque también pueden afectar a la realización de la tarea, observándose una elevada preferencia por la recompensa pequeña incluso cuando no hay demora en ninguna de las palancas (van den Bergh et al. 2006). Por otra parte, los antagonistas de los receptores de tipo 5-HT2C/2B, que son estimuladores, disminuyen la impulsividad cognitiva (Talpos et al. 2006), datos contrarios a los obtenidos con la tarea del 5CSRRT en que se observa un aumento de las respuestas prematuras (Koskinen et al. 2000; Higgins et al. 2001). De nuevo se apoya la idea de que la impulsividad es multidimensional, y que ambas tareas miden distintos aspectos del constructo, que están mediados por sustratos neurobiológicos diferentes.

En humanos se han realizado estudios en voluntarios sanos y en sujetos con patologías relacionadas con el control de impulsos y se han sugerido varios circuitos asociados a la impulsividad cognitiva, que incluyen la vía dopaminérgica mesocorticolímbica (Bari y Robbins, 2013b). En jugadores patológicos se ha estudiado la relación entre la

impulsividad cognitiva (medida mediante un cuestionario *27-item monetary choice questionnaire*) y los receptores dopaminérgicos, medidos mediante tomografía por emisión de positrones o PET (Joutsa et al. 2015). En dichos sujetos se observa una correlación negativa entre impulsividad y densidad de receptores D2/D3 en el núcleo accumbens. La misma correlación negativa aparece en el estriado de sujetos adictos a la metanfetamina (Ballard et al. 2015). En bebedores sociales (sujetos que no cumplen con los criterios de dependencia al alcohol del DSM-V) también aparece una correlación negativa entre impulsividad cognitiva y disponibilidad de receptores D2 en el estriado ventral derecho (Oberlin et al. 2015). Estos datos están en consonancia con los resultados en ratas, en las que la impulsividad (tanto cognitiva como motora) se considera factor de vulnerabilidad a la adicción (ver revisión en Jentsch et al. 2014).

3.4- La tarea del *gambling*.

El interés por el estudio de la toma de decisiones en situaciones de incertidumbre y riesgo es cada vez mayor (Winstanley, 2011). Las tareas más utilizadas para valorar la apetencia por el riesgo en roedores son las del descuento por probabilidad (*Probabilistic Delivery*, PD) y la *Rat Gambling Task* (RGT), mientras que en humanos es el *Iowa Gambling Task* (IGT).

El descuento por probabilidad se basa en la elección entre un refuerzo pequeño pero seguro y un refuerzo mayor con una probabilidad de obtención cada vez menor. Los sujetos con mayor apetencia por el riesgo serían aquellos que prefieren la recompensa de mayor tamaño, aunque la probabilidad de su obtención sea muy baja (Adriani y Laviola 2006).

El *Iowa Gambling Task* (IGT, Bechara et al. 2000, 1994; Smith et al. 2012) fue originalmente una tarea estandarizada en humanos, en la cual los sujetos debían escoger entre cuatro grupos de cartas para conseguir dinero. Dos de los grupos de cartas estaban asociados a una recompensa mayor e inmediata, pero también conllevaban pérdidas mayores de dinero. Para que la ganancia fuese mayor, el sujeto debía escoger los dos montones de cartas asociados a una recompensa pequeña, pero que también conllevaban pérdidas menores a largo plazo. La versión para roedores se ha denominado RGT, existiendo distintos procedimientos operantes (Zeeb et al. 2009; de Visser et al. 2011b;

Rivalan et al. 2013, 2009). Uno de los utilizados es el propuesto por el laboratorio de Françoise Deltu-Hagedorn (Rivalan et al. 2009) (Figura 6) en el que se requiere que los animales escojan entre 4 opciones posibles (agujeros) en vez de cartas como en el IGT. Dos de los agujeros dan lugar a una ganancia inicial mayor pero van asociadas a mayores pérdidas a largo plazo. Los sujetos deben reajustar las elecciones en función de las ganancias y los castigos (*time-out*) que aparecen de manera impredecible. Durante los *time-out* no hay liberación de recompensa y no se pueden realizar nuevas respuestas. De las 4 opciones, las dos ventajosas son las que liberan tan solo 1 pellet de comida pero con un *time-out* asociado menor. En cambio, las dos opciones menos ventajosas dan lugar a 2 pellets pero el tiempo de castigo es mayor. Otro de los procedimientos propuestos es el descrito en el laboratorio de Catherine Winstanley (Zeeb et al. 2009). La principal diferencia entre ambos protocolos es que en este último no todos los ensayos terminan con recompensa, sino que existen ensayos de “pérdida” en los que se administra un *time-out* sin que haya habido recompensa. Además, cada agujero libera un número distinto de *pellets*: las dos opciones ventajosas pueden liberar 1 o 2 *pellets* y las dos opciones no ventajosas 3 o 4. En este caso no solo es importante el *time-out* sino también la magnitud de la recompensa. La tarea propuesta por Deltu requiere menos entrenamiento previo de los sujetos que la de Winstanley. Hay otras diferencias importantes entre las dos tareas como el hecho de que en el procedimiento de Deltu se utilice un programa FR2 y en el de Winstanley uno FR1. Además, en la tarea de Deltu no hay propiamente tiempo entre ensayos, por lo que no se contabilizan las respuestas prematuras, al contrario de la de Winstanley. Independientemente del procedimiento concreto, se considera “conducta de riesgo” la preferencia por las opciones que proporcionan más refuerzos pero son menos ventajosas a largo plazo. Paralelamente se pueden contabilizar las conductas perseverantes, indicadoras de compulsión.

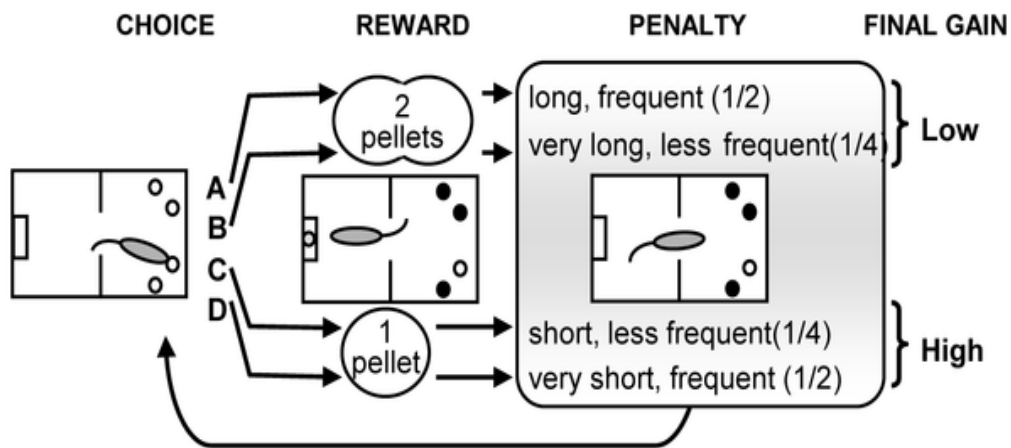


Figura 6. Esquema general del funcionamiento de la tarea de gambling para roedores desarrollada por el laboratorio de Françoise Deltu – Hagedorn. Choice: elección; Reward: recompensa; Penalty: castigo; Final gain: ganancia final. Los agujeros A y B están asociados a una ganancia final inferior en comparación con los agujeros C y D (adaptado de Rivalan et al. 2013).

Gracias a los distintos procedimientos de RGT se han podido estudiar las bases neurobiológicas de la apetencia por el riesgo (Tabla 11). Los estudios destacan la importancia de la mPFC en el aprendizaje de la tarea y el desarrollo de preferencia por las opciones más ventajosas, ya que las lesiones completas de la zona (de Visser et al. 2011a; Paine et al. 2013), así como las específicas de prelímbica (Rivalan et al. 2011; Van den Bos et al. 2014; Zeeb et al. 2015) e infralímbica (Zeeb et al. 2015), aumentan la apetencia por el riesgo. En cambio, la corteza cingulada anterior no estaría implicada en la apetencia por el riesgo *per se*, pero su lesión enlentece el desarrollo de preferencia por las opciones más ventajosas (Rivalan et al. 2011). Los trabajos relacionados con la actividad de la OFC no son tan consistentes, observándose resultados diversos, como dificultad para desarrollar preferencia por las opciones más ventajosas (Zeeb y Winstanley 2011), aumento en las conductas de riesgo (Pais-Vieira et al. 2007), ausencia de efecto (Zeeb et al. 2015) o aumento en la compulsión (Rivalan et al. 2011), esta última reflejada en una elevada preferencia por uno de los agujeros, independientemente de si libera o no refuerzo. Aunque no conocemos estudios con estas tareas en los que se compare el efecto de lesiones específicas de la OFC medial versus la lateral, los datos con descuento por probabilidad sugieren también que el papel de estas subdivisiones en las tareas de *gambling* podría ser diferente (ver comentarios en Stopper et al. 2014), al igual que sucedía también en el descuento por demora.

Tabla 11. Efectos representativos de las lesiones de las áreas corticales implicadas en la impulsividad cognitiva en tareas de riesgo.

| REFERENCIA | REGIÓN | PROCEDIMIENTO | EFFECTOS |
|-------------------------|---------|---|-----------------------------|
| Rivalan et al. 2011 | ACC | Lesión excitotóxica (NMDA) | curva aprendizaje más lenta |
| Zeeb et al. 2015 | ACC | Inactivación (Muscimol + Baclofen) | NE |
| de Visser et al. 2011a | PL + IL | Inactivación (Muscimol + Baclofen) | ↑ conducta riesgo |
| Paine et al. 2013 | PL + IL | Lesión excitotóxica (Ácido iboténico) | ↑ conducta riesgo |
| Rivalan et al. 2011 | PL | Lesión excitotóxica (NMDA) | ↑ compulsión |
| Van den Bos et al. 2014 | PL | Inactivación (Muscimol + Baclofen) | ↑ conducta riesgo |
| Zeeb et al. 2015 | PL | Inactivación (Muscimol + Baclofen) | ↑ conducta riesgo |
| Zeeb et al. 2015 | IL | Inactivación (Muscimol + Baclofen) | ↑ conducta riesgo |
| Zeeb et al. 2015 | OFC | Inactivación (Muscimol + Baclofen) | NE |
| Rivalan et al. 2011 | OFC | Lesión excitotóxica (NMDA) | ↑ compulsión |
| Zeeb y Winstanley 2011 | OFC | Lesión excitotóxica (Ácido quinolínico) | curva aprendizaje más lenta |
| Pais-Vieira et al. 2007 | OFC | Lesión excitotóxica (Ácido quinolínico) | ↑ conducta riesgo |

ACC: corteza cíngulada anterior; PL: prelímbica; IL: infralímbica; OFC: corteza orbito frontal; NMDA: N-metil-D-aspartato; NE: no hay efecto.

Por otra parte, las lesiones de la amígdala basolateral después del entrenamiento dan lugar a un mal procesamiento del valor anticipatorio de las recompensas en la tarea de descuento por demora y favorecen la elección de la recompensa inmediata pero de menor tamaño (Winstanley et al. 2004b), indicativo de una mayor impulsividad. Los estudios de RGT apoyan los de descuento por demora, dado que las lesiones excitotóxicas de la amígdala basolateral después del entrenamiento potencian las conductas de riesgo (Zeeb y Winstanley 2011). En cambio, las lesiones antes de la adquisición de la tarea dificultan

el aprendizaje, observándose una curva más lenta de la preferencia por las opciones ventajosas (Zeeb y Winstanley 2011).

La habilidad para realizar correctamente el RGT es sensible también a la administración de fármacos que modulan los niveles de monoaminas. En la tabla 12 se resumen algunos de los efectos descritos en relación con la dopamina. En concordancia con los datos previos de los apartados 3.2 y 3.3, la administración de inhibidores específicos de la recaptación de dopamina (Baarendse et al. 2013b), de anfetamina (Zeeb et al. 2009; St Onge y Floresco 2009; Baarendse et al. 2013b; Silveria et al. 2015) y de agonistas directos de los receptores D1 y D2 aumentan la impulsividad cognitiva y la apetencia por el riesgo (St Onge y Floresco 2009), observándose el efecto contrario tras la administración de sus correspondientes antagonistas (ver Tabla 12). En cambio, la administración de los agonistas D3 disminuyen la conducta de riesgo, la de sus antagonistas la aumenta, y los ligandos D4 son inefectivos (St Onge y Floresco 2009) Con respecto a la anfetamina, los datos también son contradictorios y en ocasiones no se ha encontrado un incremento por las opciones más arriesgadas (Baarendse et al. 2013b; Tremblay y Winstanley 2016) o bien éste es muy pequeño (Zeeb et al. 2017). En el caso del metilfenidato no conocemos estudios que hayan evaluado su impacto.

Respecto a la atomoxetina, inhibidor específico de la recaptación de noradrenalina, se ha descrito que disminuye la apetencia por el riesgo (Baarendse et al. 2013b), en consonancia con los trabajos centrados en impulsividad motora y descuento por demora (apartados 3.2 y 3.3).

Finalmente, puesto que la serotonina también está implicada en el desarrollo del juego patológico y conductas de riesgo en general (Weintraub et al. 2006) se han realizado diversos estudios en roedores sobre la misma. Se ha observado un aumento de la apetencia por el riesgo tras una disminución de la serotonina causado por una dieta pobre en triptófano (Koot et al. 2012) o tras la administración de agonistas 5-HT1A que inhiben la actividad de las neuronas serotoninérgicas (Zeeb et al. 2009).

Tabla 12. Efectos representativos de la administración sistémica de agonistas y antagonistas dopaminérgicos sobre la impulsividad cognitiva en tareas de riesgo.

| REFERENCIA | NEUROTRANSMISOR | VIA | EFFECTOS |
|-------------------------|--|-----------|-------------------|
| DOPAMINA | | | |
| St Onge y Floresco 2009 | Anfetamina | Sistémico | ↑ conducta riesgo |
| Baarendse et al. 2013b | Anfetamina | Sistémico | ↑ conducta riesgo |
| Zeeb et al. 2009 | Anfetamina | Sistémico | ↑ conducta riesgo |
| Silveira et al. 2015 | Anfetamina | Sistémico | ↑ conducta riesgo |
| St Onge y Floresco 2009 | Agonista D1 (SKF81297) | Sistémico | ↑ conducta riesgo |
| St Onge y Floresco 2009 | Agonista D2 (Bromocriptina) | Sistémico | ↑ conducta riesgo |
| St Onge y Floresco 2009 | Agonista D3 (PDI128907) | Sistémico | ↓ conducta riesgo |
| St Onge y Floresco 2009 | Agonista D4 (PDI168077) | Sistémico | NE |
| Paine et al. 2013 | Antagonista D1 (SCH23390) | Sistémico | ↓ conducta riesgo |
| St Onge y Floresco 2009 | Antagonista D1 (SCH23390) | Sistémico | ↓ conducta riesgo |
| Zeeb et al. 2009 | Antagonista D1 (SCH23390) | Sistémico | NE |
| Paine et al. 2013 | Antagonista D2 (Haloperidol) | Sistémico | ↓ conducta riesgo |
| St Onge y Floresco 2009 | Antagonista D2 (Eticlopride) | Sistémico | ↓ conducta riesgo |
| Zeeb et al. 2009 | Antagonista D2 (Eticlopride) | Sistémico | ↓ conducta riesgo |
| St Onge y Floresco 2009 | Antagonista D3 (Nafadotiride) | Sistémico | ↑ conducta riesgo |
| St Onge y Floresco 2009 | Antagonista D4 (L745870) | Sistémico | NE |
| Baarendse et al. 2013b | Inhibidor recaptación DA (GBR12909) | Sistémico | ↑ conducta riesgo |

DA: dopamina; NE: no hay efecto.

En humanos, las lesiones en la PFC ventromedial y la OFC van asociadas a un aumento de las conductas de riesgo durante el IGT (Bechara et al. 1994, 2000; Ouerchefani et al. 2017). También las lesiones en las regiones dorsales prefrontales potencian las conductas de riesgo y dificultan la realización de la tarea (Manes et al. 2002). En un estudio no se observaron diferencias entre las lesiones de la PFC ventromedial y la dorsolateral, mostrando los sujetos de ambos grupos un aumento de las conductas de riesgo (Fellows y Farah 2005). Estos datos están en consonancia con los estudios en animales ya comentados, en los que las lesiones o inactivaciones de la prelímbica e infralímbica (de Visser et al. 2011a; Paine et al. 2013; Zeeb et al. 2015) y también de la OFC (Pais-Vieira et al. 2007) aumentan la apetencia por el riesgo.

4- LA ADOLESCENCIA EN HUMANOS Y ROEDORES.

La adolescencia es el período de transición comprendido entre la infancia y la etapa adulta en la que tienen lugar muchos cambios conductuales, incluyendo un incremento en la búsqueda de nuevas sensaciones y experiencias, un aumento en las relaciones sociales con individuos que no forman parte del núcleo familiar y un importante desarrollo cognitivo. Todos estos cambios tienen como objetivo final adquirir las habilidades necesarias para lograr la independencia y sobrevivir sin el cuidado parental y se han asociado a la maduración y desarrollo de regiones cerebrales implicadas en el control de la motivación, la cognición y la emoción, como son la PFC, la amígdala y la formación hipocampal (ver Spear 2000; Caballero et al. 2016).

En humanos la adolescencia tiene lugar aproximadamente entre los 12 y los 18 años. No obstante, existe cierta controversia respecto a los límites exactos de este período. Algunos autores consideran que se sitúa entre los 10 y los 20 años, mientras que otros incluso lo alargan hasta los 25 años (Sawyer et al. 2018). En ratas y ratones, la infancia se podría considerar equivalente al período comprendido desde el nacimiento hasta las tres primeras semanas de vida, que es cuando tiene lugar el destete (0 a 21 días posnatales, PND). Tanto humanos como ratas o ratones son especies altriciales (muy dependientes del cuidado parental) y experimentan un profundo desarrollo durante el período infantil hasta alcanzar unos reflejos y capacidades físicas y motoras cercanas a las de los individuos adultos. La adolescencia, en sentido amplio, comprendería en roedores la etapa

que se extiende desde el destete hasta el día 60 aproximadamente (ver revisión Spear, 2000; Laviola et al. 2003; Tirelli et al. 2003). No obstante, este período se subdivide en tres fases: (i) adolescencia temprana/prepuberal/juvenil (PND 21 a 34), (ii) adolescencia media o peri-adolescencia (PND 34 a 46) y (iii) adolescencia tardía (PND 46 a 59), aproximadamente.

4.1- La pubertad.

El concepto de adolescencia gira entorno a la aparición de la pubertad, aunque este último término es más restringido y se refiere únicamente a la maduración sexual (ver revisión Spear, 2000; Schneider, 2013), mientras que el concepto “adolescencia” tiene incluso connotaciones culturales y sociales. La pubertad conlleva la maduración de los sistemas neuroendocrinos, especialmente el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal (HPG) (ver revisión Sisk y Foster 2004). Existen mecanismos de maduración que son independientes de las hormonas sexuales y otros que son dependientes de estas. En este último caso, la potente retro-inhibición que en la infancia ejercen las hormonas sexuales sobre las neuronas hipotalámicas que sintetizan la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) va amortiguándose. Gracias a esta desinhibición, la GnRH se libera de forma manifiesta e intermitente al sistema portal hipofisario de la eminencia media, alcanzando la hipófisis donde activa la síntesis y liberación de las gonadotropinas hipofisarias: la hormona luteinizante (LH) y la hormona foliculoestimulante (FSH). Ambas hormonas son liberadas a la circulación sanguínea para estimular la producción de espermatozoides (testículos) y la maduración de los ovocitos (ovarios), así como la secreción de las hormonas sexuales esteroideas

En humanos, durante dicho período tienen lugar tres importantes eventos endocrinos: la adrenarquía, incremento en la liberación de las hormonas adrenales antes del inicio de la pubertad; la gonadarquía, incremento de las hormonas gonadales, y finalmente, la activación del crecimiento. Estos cambios hormonales estimulan la maduración de las gónadas, la capacidad reproductiva, la aparición de las características sexuales secundarias y un gran incremento en el peso corporal (Blakemore et al. 2010). Aunque existe mucha variabilidad en los rangos de edad, en general, las chicas empiezan la

pubertad 1 – 2 años antes que los chicos, y alcanzan la madurez plena en un tiempo menor (Weisfield 1979; revisión en Spear 2000; Blakemore et al. 2010).

En roedores también se observa la gonadarquía, implicada en el crecimiento corporal y en la aparición de las características físicas externas (Becú-Villalobos et al. 1997; Schneider 2008). Hay evidencias de que las glándulas adrenales juegan un papel importante en la iniciación de la pubertad, y contribuyen a un proceso parecido a la adrenarquía en humanos (Pignatelli et al. 2006). Sin embargo, existen otros trabajos que indican que solo en algunos primates no humanos hay adrenarquía (Cutler et al. 1978). En roedores, al igual que en humanos, las hembras maduran antes que los machos (Figura 7). En las ratas macho, el período de pubertad se establece entre el PND 36 - 60, observándose la separación balano-preputial y la presencia de espermatozoides en los conductos deferentes. En cambio, en hembras la pubertad empieza antes, entre PND 28 - 40 y viene indicada por la abertura vaginal completa y la primera ovulación (Schneider 2008).

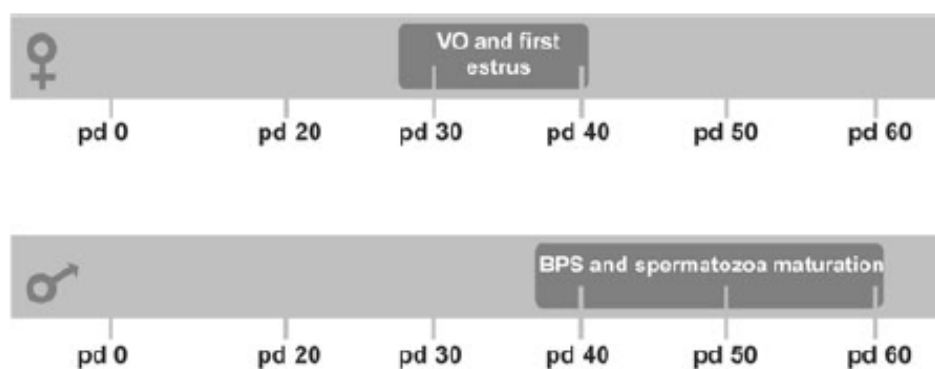


Figura 7. Esquema sobre la maduración sexual en hembras y machos roedores. Pd: postnatal day; VO: vaginal opening; BPS: balano-preputial separation (Schneider, 2008).

4.2- Cambios conductuales y maduración cognitiva.

En este apartado se describen brevemente los cambios conductuales y cognitivos que ocurren durante la adolescencia, tanto en humanos como en roedores. En concreto, aquellos relacionados con la conducta social, el desarrollo de las funciones ejecutivas, la regulación de las emociones y la apetencia por el riesgo.

4.2.1- Cambios en los patrones de la conducta social.

Durante la adolescencia se observa un aumento de las relaciones sociales. Esta conducta se conserva a lo largo de la filogenia y tiene un importante valor adaptativo, pues facilita y promueve la independencia de los futuros individuos adultos. En humanos, las relaciones sociales que se establecen durante la adolescencia son más complejas y tienen una estructura jerárquica más definida que las relaciones de amistad durante la infancia (Kilford et al. 2016). Se observa un importante incremento del tiempo en compañía de individuos del mismo rango de edad y una disminución drástica del tiempo con los padres. La conducta social que desarrollarán los individuos durante la adolescencia está muy influenciada por el entorno social que el individuo ha tenido durante la infancia y su relación con la familia más cercana (Steinberg y Morris 2001). Los adolescentes que han crecido en un entorno familiar acogedor y comprensivo son socialmente más competentes y mantienen relaciones positivas con sus iguales (Lieberman y Fisher 1999). Independientemente del entorno familiar, durante la adolescencia se registran muchos más casos de conflictos entre hijos y padres, incrementándose la aparición de conductas antisociales como engañar, contar mentiras o cometer pequeños robos (ver revisión de Spear 2000).

Al igual que en humanos, los roedores también muestran cambios en la conducta social durante la adolescencia. Un tipo de conducta social es el juego, también conocida como *rough and tumble play* o *play fighting*. El juego es importante porque facilita el desarrollo de un repertorio flexible y numeroso de conductas sociales, que pueden posteriormente observarse en contextos diferentes durante la agresión o los episodios sexuales de la edad adulta (Vanderschuren et al. 2016). Aunque es más típico durante la infancia, en la peri-adolescencia se observa un aumento de la conducta de pelea (*play fighting*), que disminuye cuando se alcanza la madurez sexual. Numerosos trabajos demuestran que la interacción social durante este período es muy gratificante (v.g. Douglas et al. 2004; Vanderschuren et al. 2016). De hecho, mediante la prueba del condicionamiento de preferencia por lugar, se ha demostrado que las ratas adolescentes, machos y hembras, prefieren pasar más tiempo en el compartimento asociado a un compañero de la misma edad, hecho que no se da en ratas adultas (Douglas et al. 2004).

4.2.2- Aumento de las conductas de riesgo.

Una de las principales características de los individuos adolescentes es que son atrevidos, temerarios y buscan constantemente nuevas experiencias y sensaciones. Este aumento en las conductas de riesgo respecto a la infancia o la etapa adulta coincide con un período en el que los circuitos cerebrales implicados en la regulación de las emociones y de la toma de decisiones están aún inmaduros (Crone et al. 2016). Aunque estas conductas también pueden encontrarse en individuos de otras edades, es en la adolescencia cuando se observan de manera desproporcionada (Arnett 1992). Estudios en humanos han demostrado que durante la adolescencia el número de muertes prevenibles se incrementa hasta un 200% debido a accidentes de coche, suicidios y homicidios (Casey et al. 2005). Otra de las consecuencias negativas asociadas a este periodo es el mayor riesgo a padecer alguna enfermedad de transmisión sexual, infecciones, embarazos no deseados y dependencia del alcohol y otras drogas. Es importante destacar que no todas las consecuencias asociadas al riesgo son negativas. En algunas situaciones tiene un elevado valor adaptativo, favoreciendo la obtención de beneficios sociales como el establecimiento de nuevas relaciones de amistad o de pareja o la maximización de ganancias económicas (Crone et al. 2016).

Dado el elevado valor adaptativo de las conductas de riesgo durante la adolescencia, no es sorprendente que otras especies también tengan comportamientos similares. Se ha observado en ratas adolescentes comparados con adultos un aumento de la conducta de búsqueda de novedad así como hiperactividad en ambientes nuevos (Adriani y Laviola 2000; Douglas et al. 2003; Stansfield et al. 2004; Stansfield y Kirstein 2006). Si se compara por ejemplo la conducta de ratones pre-púber (adolescencia temprana), peri-púberes y adultos en el EPM, los sujetos peri-púberes tienen una menor latencia de entrada y pasan más tiempo en los brazos abiertos (Laviola et al. 2003). Los autores interpretan los datos en términos de mayor motivación para explorar ambientes nuevos, lo que implica un comportamiento más arriesgado. Los roedores adolescentes también tienen mayor sensibilidad a los efectos reforzantes de comidas y sabores dulces, habitualmente reforzantes (Friemel et al. 2010), y también a los efectos reforzantes de las drogas, así como menor sensibilidad a sus efectos aversivos (ver Doremus-Fitzwater y Spear 2016; Spear 2016). Como consecuencia, los sujetos adolescentes respecto a los adultos muestran una mayor preferencia por el compartimento asociado a distintos tipos

de drogas como la nicotina (Ahsan et al. 2014), la cocaína (Brenhouse y Andersen2008) o el alcohol (Pautassi et al. 2008).

4.2.3- Desarrollo cognitivo y funciones ejecutivas.

La cognición es una función psicológica multidimensional que se refiere al acto de procesar y manipular la información de nuestro entorno. Incluye funciones tales como la atención, la memoria, el aprendizaje, el procesamiento del lenguaje, la resolución de problemas, el razonamiento abstracto y las funciones ejecutivas superiores. El gran crecimiento corporal que se observa durante la adolescencia suele ir acompañado de una maduración de las habilidades cognitivas, tanto en humanos como en otras especies de animales (Spear 2000; Baird y Fugelsang 2004).

Las funciones ejecutivas suelen dividirse en tres subdominios (Luciana 2013): el control inhibitorio, consistente en la habilidad para controlar o inhibir una acción o conducta no apropiada en un contexto determinado, la flexibilidad cognitiva o capacidad de los sujetos para adaptarse o cambiar de estrategia en función de los cambios en el ambiente, y la memoria de trabajo, que es el sistema de procesamiento activo que permite a los individuos retener una cantidad limitada de información y manipularla en respuesta a objetivos específicos. Las funciones ejecutivas son dependientes de PFC (Gogtay et al. 2004; Casey et al. 2008; Paus et al. 2008), determinan la capacidad de un individuo para resolver problemas de manera apropiada (Welsh et al. 1991) y son cruciales en situaciones de novedad o de adaptación social (Stuss y Benson 1984).

Ni en roedores ni en primates la PFC está completamente desarrollada en la adolescencia, siendo razonable asumir que en este periodo es todavía funcionalmente inmadura. Consecuentemente, durante la adolescencia se observan déficits en la regulación del control inhibitorio necesario para la integración de los impulsos afectivos/motivacionales y la toma de decisiones, junto a más elevados niveles de impulsividad, factores ambos que contribuirían a las conductas de riesgo (Casey et al. 2008; Séguin et al. 2007; Casey y Caudle 2013). Este subapartado se centrará en el estudio del control inhibitorio, uno de los temas centrales del presente trabajo.

Para el estudio del dominio del control inhibitorio se utilizan algunos de los modelos comentados de tolerancia a la demora, apetencia por el riesgo e impulsividad motora (ver

apartado 3). Recientemente se ha sugerido que se pueden diferenciar distintos tipos de funciones ejecutivas en función de si la tarea tiene o no un componente afectivo y motivacional, clasificándolas en tareas “calientes” o “frías” (Prencipe et al. 2011). Este aspecto puede ser de relevancia en el diseño de las condiciones en las que se valoran en humanos las funciones ejecutivas mediante tareas abstractas.

Cuando se ha estudiado en humanos la maduración de los procesos de toma de decisiones en situaciones de riesgo utilizando la tarea del IGT se ha observado que los adolescentes aprenden peor que los adultos jóvenes, pero mejor que los infantes, necesitando más ensayos para establecer una estrategia óptima y escoger las opciones más ventajosas en comparación con los adultos (Crone y Molen 2004). En general, en todas las tareas que valoran las conductas de riesgo (IGT o similares) la puntuación es mayor en adolescentes que adultos (Hooper et al. 2004; Cauffman et al. 2010), sobre todo cuando la tarea tiene un componente afectivo y motivacional (Figner et al. 2009). Otros trabajos indican que la búsqueda de riesgo es mayor en sujetos que se encuentran en el período de adolescencia media en comparación con sujetos más jóvenes o adultos (Burnett et al. 2010), lo que sugiere una relación menos lineal con la edad.

Respecto a la tarea de descuento por demora, los sujetos muy jóvenes (10 – 15 años), en comparación con los adultos, escogen la opción que proporciona una recompensa más pequeña pero inmediata, en vez de una mayor (Steinberg et al. 2009). Aunque el valor subjetivo que tiene la recompensa va disminuyendo a medida que la demora aumenta a cualquier edad, comparando sujetos de entre 9 y 23 años, el valor de la recompensa disminuye menos abruptamente en los adultos (Olson et al. 2007, 2009). En general, la inmediatez de la recompensa parece ser más importante en infantes que en adolescentes (v.g. Scheres et al. 2006; Prencipe et al. 2011).

Todos estos datos, en conjunto, apoyan la hipótesis de que en los adolescentes, comparados con los adultos, la toma de decisiones es inadecuada, debido a los déficits en la regulación del control inhibitorio y a los niveles más elevados de impulsividad. Todo ello, unido a la independencia de la influencia parental en la mayoría de las situaciones que tienen que afrontar, potenciaría la aparición de conductas de riesgo.

En roedores el período de adolescencia es demasiado corto para poder realizar durante esta etapa el entrenamiento tan largo que suponen algunas tareas operantes. No obstante, algunos laboratorios han adaptado la duración de dichas tareas para poder valorar la

impulsividad. En una tarea de descuento por demora que compara animales adolescentes (PND < 30) y adultos (PND > 60), se ha demostrado en rata y ratón que los sujetos adolescentes son más impulsivos (Adriani y Laviola 2003; Doremus-Fitzwater et al. 2012). En otra tarea que valora la apetencia por el riesgo, descuento por probabilidad, en la que los sujetos que tienden al riesgo mantienen la preferencia por la recompensa en situaciones de baja probabilidad de conseguir el refuerzo (Adriani y Laviola 2006), datos preliminares con una variante de dicha tarea indican que los sujetos adolescentes, tienen una moderada mayor preferencia por la opción de mayor riesgo que los adultos (Zoratto et al. 2013).

Respecto a la impulsividad motora los resultados en roedores sugieren que los sujetos adolescentes (PND 30 – 44), en comparación con los adultos (PND 86 – 99), tienen dificultades en la inhibición conductual (Andrzejewski et al. 2011). En la tarea de descuento diferencial de otra conducta (*differential reinforcement of other behavior*) se libera un refuerzo después de un periodo de tiempo durante el cual no debe realizarse ninguna acción. Los sujetos adolescentes tienen problemas para adquirir la tarea correctamente, indicativo de mayor impulsividad. Utilizando una tarea del 5CSRT modificada, consistente en reducir el número de agujeros a dos para que su duración fuese más corta y se adaptara a la etapa adolescente (PND 21 – 59), se ha observado que las ratas adolescentes realizan más respuestas prematuras que las ratas adultas y más respuestas incorrectas a lo largo de las sesiones (Burton y Fletcher 2012). No obstante, el peor control inhibitorio descrito en animales adolescentes respecto a los adultos no sería observable en todas las tareas. Por ejemplo, no se han observado diferencias en función de la edad en la tarea denominada *cued response inhibition task* (Simon et al. 2013b), que valora la capacidad de inhibición de una respuesta motora mientras se presenta una señal inhibitoria (tono) y la capacidad de reanudarla cuando esta señal inhibitoria desaparece.

En conjunto, los datos demuestran que los sujetos adolescentes son muy vulnerables a las conductas impulsivas, que van disminuyendo a medida que el cerebro madura. La maduración parece más lenta en aquellas funciones ejecutivas que tienen una componente motivacional y emocional importante.

4.2.4- Regulación de las emociones.

La vida emocional en la etapa adolescente es más intensa y volátil que en la etapa adulta o en la infancia (Guyer et al. 2016). Un muestreo sistemático de adolescentes y adultos humanos ha demostrado que los primeros son más emocionales, eufóricos, amantes de las emociones fuertes, propensos a la depresión en respuesta a distintos tipos de sucesos diarios (trabajo, interacciones sociales negativas) y muestran una menor perdurabilidad de los sentimientos positivos (Weinstein y Mermelstein 2007). Se ha relacionado dicha hiper-emocionalidad de los adolescentes especialmente con las interacciones sociales fuera del núcleo familiar, las relaciones amorosas y las conductas de riesgo y de búsqueda de novedades, características de este período. La adolescencia también se asocia a un incremento en la aparición de psicopatologías, especialmente cuando la regulación de las emociones no es adecuada (Monahan et al. 2016). En este contexto, las respuestas emocionales dejan de ser adaptativas y la hipersensibilidad a todo tipo de experiencias, incluyendo las aversivas, favorece un notable incremento en trastornos mentales e incluso en la probabilidad de muerte de los sujetos (Paus et al. 2008; Casey 2015).

Una de las emociones más básicas es el miedo, cuya aparición viene provocada por situaciones que son percibidas como amenaza. Tiene un carácter adaptativo, ya que promueve la aparición de conductas defensivas y, por este motivo, su expresión se ha conservado a lo largo de la filogenia, pudiéndose observar en humanos y otros animales. El estudio del miedo despierta un gran interés, dado que si no se regula correctamente o aparece en contextos o situaciones no adecuadas, es la base de psicopatologías, como la ansiedad, el pánico, el síndrome de estrés postraumático o las fobias (LeDoux 1995). Por lo tanto, la habilidad para detectar estímulos que son realmente peligrosos, pero también para responder de forma apropiada al peligro real que representan, es fundamental para una estrategia de afrontamiento exitosa.

Aunque en animales se ha venido prestando atención a las diferencias en el aprendizaje del miedo en roedores en la etapa infantil respecto a adolescentes o adultos (Tallot et al. 2016; Pattwell y Bath 2017), existen muchos menos datos comparando animales adolescentes y adultos. En un primer estudio comparando la adquisición del miedo condicionado al tono en ratones de 4, 6 y 8 semanas, los sujetos más jóvenes mostraban una adquisición más robusta del miedo, que no estaría relacionada con una mayor sensibilidad al dolor causada por el choque eléctrico, aunque la extinción parecía seguir

un patrón similar en los tres grupos de edad (Hefner y Holmes 2007). Durante el desarrollo, parece existir un periodo muy transitorio en el que hay una caída brusca en el miedo condicionado al contexto pero no al tono tras la primera semana post-destete, con una recuperación progresiva hasta las siete semanas de edad (Pattwell et al. 2011). Pero este cambio es un defecto en la expresión, no en la adquisición del miedo al contexto, que aparece transitoriamente en la adolescencia temprana. Con esta salvedad, el condicionamiento al tono y al contexto parece ser en general, similar en animales adolescentes y adultos (Land y Spear 2004; Hefner y Holmes 2007; Kim et al. 2011), pero se observan diferencias importantes en varios aspectos del condicionamiento. La generalización tanto al tono como al contexto es mayor en ratones adolescentes (Ito et al. 2009) y éstos también muestran más dificultades en la extinción (McCallum et al. 2010; Kim et al. 2011; Pattwell et al. 2012; Baker y Richardson 2015). Es interesante que las ratas adolescentes y adultas no difieran en el procedimiento clásico del condicionamiento del miedo al tono (procedimiento demorado), pero las adolescentes muestren más condicionamiento de traza (Den y Richardson 2013), que es dependiente de la integridad de la formación hipocampal (McEchron et al. 1998; Huerta et al. 2000).

En humanos, la adquisición del miedo, valorada mediante la conductancia de la piel ante el CS, es similar en los sujetos infantiles, adolescentes y adultos, pero la extinción es menor en los sujetos adolescentes en comparación con los infantiles y los adultos, siendo el patrón parecido al observado en ratones en el mismo estudio (Pattwell et al. 2012). Puesto que la extinción depende de la integridad de los circuitos que involucran la amígdala, la PFC ventromedial y el hipocampo (Corcoran y Quirk, 2007), los datos en humanos y animales sugieren que la regulación inmadura de las conexiones de la PFC con regiones subcorticales, como la amígdala sería la responsable de la incapacidad para extinguir las memorias de miedo (Pattwell et al. 2012; Ganella et al. 2018).

4.3-Neuroanatomía del cerebro adolescente.

Para estudiar el desarrollo del encéfalo existen varios índices de maduración. Algunos son estructurales, como el grosor cortical o los cambios en el volumen o en el área ocupada por la sustancia gris y blanca, bien en todo el encéfalo, bien en regiones delimitadas (v.g. lóbulo frontal) (ver Walhovd et al. 2017). No todas las variables de

maduración van siempre en la misma dirección y por ello es importante valorarlas en su conjunto. En este apartado, la maduración del encéfalo adolescente se considera siempre en referencia a la etapa adulta.

Los procesos de sinaptogénesis y refinamiento sináptico están muy conservados entre las distintas especies de mamíferos. Durante la infancia se observa un aumento muy importante en la producción de sinapsis, que alcanza un máximo en la etapa preadolescente, para disminuir una vez entrada ya la adolescencia y alcanzar los niveles adultos. El declive en la sinaptogénesis suele coincidir con el aumento en la producción de hormonas sexuales (maduración sexual). Es de destacar que tanto la producción como la eliminación de sinapsis es muy variable en función de la región encefálica e incluso dentro de la misma región (Brenhouse y Andersen 2011; Spear 2013), y esta diferenciación regional del desarrollo se conoce como hetero-sincronía. De hecho, las estructuras subcorticales, como el estriado y la amígdala, muestran un aumento del volumen mucho mayor que el córtex en los primeros años de vida (ver Tau y Peterson 2010). En la corteza, los procesos de maduración ocurren, a grosso modo, en dirección posterior-frontal, siendo la PFC la última región en madurar completamente (Brenhouse y Andersen 2011).

Paralelamente al refinamiento sináptico, durante la adolescencia finaliza la mielinización de diversas estructuras cerebrales, con el consecuente incremento de sustancia blanca que va en paralelo a la reducción de la sustancia gris (Lenroot et al. 2007; Giedd y Rapoport 2010; Gur y Gur 2016). Gracias al aumento de mielina, la eficiencia del flujo de información entre regiones aumenta durante la adolescencia (Lu et al. 2009). El grado y curso temporal de mielinización difiere en función del sexo y de la región, tanto en humanos como en otras especies (Benes et al. 1994). Además de estos cambios generales del desarrollo del cerebro adolescente cabe mencionar cambios específicos relevantes en PFC, amígdala y la formación hipocampal.

La remodelación y maduración de la PFC es uno de los cambios ontogénicos más importantes durante la adolescencia. Estudios de neuroimagen demuestran que la PFC dorsolateral es de las más tardías en madurar, con un pico de grosor cortical hacia los 10 años seguido de una reducción hasta alcanzar el nivel adulto el inicio de la segunda década (Giedd 2004; Shaw et al. 2011). En cambio, la sustancia blanca de la PFC dorsolateral aumenta durante la adolescencia (Blakemore y Choudhury 2006), mientras que la

activación de esta región por diferentes tareas disminuye (Blakemore 2010), indicando que la reorganización sináptica ha optimizado los recursos. Una maduración tardía implica que el control *top-down* de la PFC sobre las regiones subcorticales, que tienen un patrón de maduración más temprano, no sea probablemente operativo por completo en la adolescencia. Los cambios mencionados parecen ir en paralelo en humanos, primates no humanos y roedores (Andersen 2003).

La integridad de la PFC y de las señales provenientes de la formación hipocampal son necesarias para los procesos de la memoria de trabajo (Floresco et al. 1997), una de las funciones cognitivas que madura durante la etapa adulta temprana. Los estudios de neuroimagen indican que la formación hipocampal tiene un crecimiento volumétrico lineal durante la adolescencia para comenzar a disminuir después. No está claro si los cambios son dependientes del sexo. Se ha descrito que en los hombres el desarrollo continúa hasta la adolescencia tardía, mientras que en las mujeres se empieza ya a observar una pérdida de volumen durante este período (Goddings et al. 2014), aunque otros autores concluyen que el patrón es similar con la edad en hombres y mujeres (Foulkes y Blakemore 2018). Existe heterogeneidad en la maduración de las distintas subregiones de la formación hipocampal, observándose un crecimiento temprano no lineal en CA1 (*cornu ammonis* 1) y subículum, y una disminución lineal en CA2, CA3 y giro dentado (Tamnes et al. 2017). La neurogénesis disminuye con la edad, pero los cambios son lineales y mucho menos acentuados después de los primeros meses de vida (Spalding et al. 2013), siendo el patrón con la edad parecido en ratones y humanos (Knoth et al. 2010). Los estudios en animales sugieren el mismo patrón de desarrollo: en ratas hembras se observa un aumento en la ramificación de las dendritas de las neuronas piramidales de la región hipocampal CA1 entre PND 44 y 51, seguida de una disminución entre PND 51 a 55 (Chowdhury et al. 2014). En ratas macho, la plasticidad de PFC dependiente de señales desde la formación hipocampal tiene una maduración tardía, alrededor de PND 50 (Caballero et al. 2014).

El proceso de maduración más importante de la formación hipocampal sería anterior a la de la PFC y tendría lugar durante la infancia, y como consecuencia un historial de abuso o la exposición a estrés intenso da lugar a una disminución del volumen hipocampal sólo cuando dicho estrés tiene lugar durante la infancia, pero no más tarde (v.g. Andersen y Teicher 2004, 2008). En mujeres se ha demostrado que una exposición repetida a abusos durante la etapa infantil disminuye el volumen de la formación hipocampal; en cambio, si la exposición tiene lugar durante la adolescencia, la estructura más afectada es la PFC

(Stein et al. 1997; Driessen et al. 2000; Vythilingam et al. 2005; Andersen y Teicher 2008). El mismo patrón se ha observado en hombres con un historial previo de abusos durante la infancia (Bremner et al. 1997). Los estudios en roedores van en la misma línea: la exposición a separación materna (PND 2 a 20) disminuye en la etapa adulta los niveles de sinaptofisina, un marcador de densidad sináptica, de manera específica en la formación hipocampal, sin afectar a la PFC o la amígdala (Andersen y Teicher 2004).

La amígdala, implicada en el procesamiento emocional (Davis y Whalen 2001), es otra de las estructuras que posee proyecciones glutamatérgicas hacia PFC y viceversa. Además de la conexión con la PFC, recibe y envía proyecciones al tálamo, formación hipocampal, estriado e hipotálamo (Swanson 2003). El procesamiento de estímulos emocionales y potencialmente peligrosos aún no ha madurado completamente durante la adolescencia, y se considera en gran parte consecuencia de la inmadurez de las conexiones entre amígdala y PFC (Burghy et al. 2012). El volumen de la amígdala incrementa gradualmente durante la infancia y la adolescencia y dicho aumento es dependiente del sexo, dejando de crecer cuando los individuos alcanzan la madurez sexual (Uematsu et al. 2012). En humanos la activación de la amígdala en respuesta a expresiones faciales de miedo y en otras situaciones emocionales es mayor en sujetos adolescentes que en infantes (Monk et al. 2003; Hare et al. 2008), y esto se relaciona con la mayor hiper-emocionalidad adolescente. De acuerdo con ello, los adolescentes, en comparación con los sujetos adultos, muestran hiper-activación de la amígdala ante estímulos condicionados que predicen amenaza y no son capaces de distinguir con la misma facilidad entre un estímulo seguro y uno aversivo (Lau et al. 2011). Estos resultados concuerdan con las dificultades de extinción del miedo en adolescentes respecto a adultos (Pattwell et al. 2012), sugiriendo un menor control *top-down* de la PFC sobre la amígdala.

5- MODELOS DE ESTRÉS ADOLESCENTE.

5.1. Comentarios generales.

En humanos es difícil encontrar estudios que permitan valorar específicamente el impacto del estrés durante la adolescencia, ya que suelen existir antecedentes previos o

exposiciones posteriores. Algunos trabajos longitudinales (Tyborowska et al. 2018; Andersen et al. 2008) han caracterizado los efectos del estrés temprano (abuso sexual en infancia) combinado o no con estrés posterior en la etapa adolescente (entre 14 y 17 años) sobre los cambios volumétricos en la sustancia gris. Las experiencias más tempranas se asocian a una mayor reducción de la sustancia gris en algunas zonas de la PFC, la formación hipocampal y la amígdala, mientras que las experiencias más recientes se relacionan con una reducción de la corteza orbitofrontal y cingulada anterior, lo que sugiere una alteración de la maduración del encéfalo que podría favorecer la aparición de patologías mentales. En otro estudio en adolescentes (20 años), la exposición a estrés entre los 15 y 18 años (v.g. problemas familiares, académicos y sociales) dio lugar a una disminución de la actividad de la mPFC durante una tarea de juego recompensada económicamente y esta disminución se asoció a una mayor dependencia al alcohol a los 20 años (Casement et al. 2015).

Debido a que la mayoría de los estudios en humanos son retrospectivos y valoran etapas adversas muy amplias, en los últimos años se han desarrollado diversos modelos en animales para estudiar el impacto a corto y largo plazo de las situaciones de estrés específicamente durante la adolescencia. Estos modelos consideran la adolescencia en sentido amplio, abarcando desde PND 21 hasta 60. Aunque existen muchos más estudios en machos que en hembras, en los últimos años se ha incrementado considerablemente el número de estudios que incluyen ambos sexos, lo que ha puesto de manifiesto importantes diferencias entre ambos. Dejando de lado este aspecto, existen otros muchos a considerar respecto al uso de modelos de estrés adolescente. En primer lugar, e importante para los objetivos del presente trabajo, una pregunta crítica es hasta qué punto el cerebro adolescente es capaz de evaluar una situación estresante como controlable en igual medida que el adulto. En segundo lugar, la dirección del posible impacto que el estrés adolescente puede ejercer en la etapa adulta: si siempre es de esperar que sea negativo o puede tener efectos protectores. En tercer lugar, el curso temporal de los efectos: si pueden detectarse una vez finalizada la exposición pero no a largo plazo (efecto transitorio) o si la aparición de los efectos requiere un período latente para manifestarse. Finalmente, es importante tener en cuenta el modelo de estrés, que considerado en un sentido amplio abarca desde el aislamiento social en todo el periodo entre el destete y la etapa adulta (o gran parte del mismo), distintos tipos de estrés social que suelen incluir relaciones de jerarquía y dominancia e inestabilidad social, exposición repetida al mismo

estímulo estresante o exposición a situaciones de estrés crónico impredecible (CUS). Cada uno de estos modelos puede tener implicaciones diferentes, siendo un aspecto importante respecto a todos ellos, conocer su intensidad objetiva mediante marcadores de estrés crónico, incluyendo cambios en el peso corporal, el tamaño relativo de la adrenal y el timo o la actividad del eje HPA (Armario 2015).

Es razonable asumir que los sujetos adolescentes podrían ser poco sensibles a la dimensión del “control” dada la inmadurez de la PFC, que es clave para mediar los efectos de la controlabilidad. No obstante, en el único trabajo publicado al respecto los sujetos adolescentes sí fueron capaces de responder de manera diferencial a la controlabilidad (Kubala et al. 2012). Tras la exposición de ratas adolescentes (PND 35) al modelo de la triada (choque eléctrico en la cola), el choque inescapable indujo a corto plazo una disminución de la conducta social (investigación de juveniles), signo de un posible efecto ansiogénico y/o anhedónico, en tanto que los animales MASTER realizaron más exploración social incluso que el grupo CONTROL. Además, a largo plazo (PND 70) el grupo MASTER en la etapa juvenil protegió de los efectos negativos de una nueva exposición a choques inescapables sobre la exploración social. La lesión excitotóxica de la PFC antes de la exposición a estrés adolescente bloqueó a corto plazo los efectos beneficiosos del grupo MASTER sobre la interacción social, indicando que aunque no esté completamente madura, esta estructura sí es claramente sensible a la controlabilidad. En otro trabajo se demuestra a corto plazo que las ratas adolescentes expuestas a un procedimiento YOKED también tienen tendencia a desarrollar un fenotipo de indefensión aprendida (Leussis et al. 2012).

Describiremos los principales efectos fisiológicos, conductuales y neurobiológicos de los modelos de estrés adolescente más utilizados. Para introducir un cierto criterio organizativos, los hemos agrupado en varios bloques, aunque es difícil utilizar un solo criterio y cualquiera de ellos está expuesto a críticas. Hemos considerado en primer lugar los modelos de exposición repetida al mismo estímulo, típicamente inmovilización en tubo o choque eléctrico en las patas, porque permiten estudiar en paralelo si existe o no adaptación al estímulo repetido. En segundo lugar hemos situado los modelos de CUS, seguido en tercer lugar de variantes más cortas del modelo que suelen utilizarse cuando se estudian los efectos del estrés juvenil. Finalmente, hemos incluido estudios con diversos modelos de estrés social, que son de una relevancia especial en este periodo del desarrollo. Hemos obviado algunos artículos en los que no pueden interpretarse los datos

por razones metodológicas. Por razones de tiempo y espacio, en la presente revisión no incluiremos el modelo de aislamiento social durante el destete, que representa una situación de gran interés conceptual pero muy distinta a la de otros modelos de estrés (Robbins et al. 1996; Fone y Porkess 2008; Lukkes et al. 2009). Tampoco haremos referencia a todos los estudios de exposición al estrés social durante la adolescencia, dado que la conducta agresiva del ratón es mucho mayor que la de las ratas y las situaciones de estrés son presumiblemente mucho más intensas. No obstante, se comentará algunos trabajos considerados especialmente relevantes. En el último apartado comentaremos las principales diferencias en la respuesta al estrés entre animales adolescentes y adultos.

5.2. Modelos de estrés repetido.

La inmovilización en tubo es uno de los estímulos estresantes más ampliamente usados en la literatura. Desde el punto de vista de los cambios en los marcadores de estrés se considera como un estímulo de intensidad intermedia, mucho menos intenso que los métodos en los que hay una inmovilización real del animal (Armario et al. 1990; Campmany et al. 1996), aunque obviamente es importante la duración diaria y el número de días de exposición.

Aunque el periodo concreto de exposición varía entre estudios en su inicio, duración y otros detalles, la mayoría de los estudios sugieren que la exposición adolescente tiene en general efectos que podríamos considerar beneficiosos, tales como incremento de la actividad en EPM con pocos cambios en ansiedad y ausencia de efectos en la prueba de natación forzada (Eiland et al. 2012; Suo et al. 2013). Solo cuando se estudian algunas variables durante el propio tratamiento o al día siguiente se encuentran algunos efectos negativos como reducción de la preferencia por sacarosa (Eiland et al. 2012) o la actividad en un ambiente nuevo (Cruz et al. 2012). No se observan diferencias entre los dos sexos en conducta o en los cambios fisiológicos y endocrinos, aunque las hembras son menos sensibles a la pérdida de peso (Eiland et al. 2012).

Esta ausencia de efectos de la inmovilización en tubo contrasta con los efectos de la exposición a choques eléctricos en las patas, que suele comenzar sobre PND 28 (en algún caso antes) y durar de 4 a 10 días. En un estudio se expusieron ratas a estrés durante PND 35-49 y tiempo después (a partir de PND 77) se valoró la conducta, clasificándose a los animales en afectados y no afectados. Estos últimos mostraron inmovilidad en el contexto

del choque, incremento en la respuesta de sobresalto acústico, menores niveles de actividad y más inmovilidad en un campo abierto, menores niveles de interacción social y una estrategia de afrontamiento pasivo en la prueba de natación forzada (Aga-Mizrachi et al. 2014). Los tratamientos farmacológicos (metilfenidato, fluoxetina, desipramina o alguna combinación de ellos) corrigieron unos u otros de los efectos, dependiendo del tipo de fármaco. En otros estudios, también estudiando los cambios conductuales a largo plazo (adultez), se han observado efectos similares: descenso de la actividad en campos abiertos, incrementos en la ansiedad en el EPM y en la prueba de supresión de la ingesta en un ambiente nuevo, así como afrontamiento pasivo en la natación forzada (Li et al. 2015; Lyttle et al. 2015; Gomes y Grace 2017; Liu et al. 2017). También se han observado déficits en memoria en un laberinto en Y (alternancia espontánea) (Li et al. 2015), en el laberinto acuático (Liu et al. 2017) y en la prueba de reconocimiento de objetos (Gomes y Grace 2017). Por consiguiente, la exposición a choques eléctricos durante la adolescencia ejerce un impacto enorme sobre la conducta y sus efectos se mantienen durante mucho tiempo. Es posible que la magnitud y la larga perdurabilidad de estos efectos tengan que ver con el condicionamiento del miedo asociado a este estímulo estresante, pero no existen estudios que hayan explorado esta posibilidad.

5.3. Estrés crónico impredecible.

Los primeros trabajos que estudiaron los efectos a largo plazo de la exposición crónica al CUS en la etapa adolescente temprana fueron los de Maslova et al. (2002a, 2002b). Entre PND 21-32 se expusieron al estrés ratas de las cepas Wistar Kyoto e ISIAH (*inherited stress-induced arterial hypertension*). Los datos obtenidos a corto plazo (PND 36–38) mostraron que solo las ratas ISIAH adolescentes estresadas presentaron un aumento de la respuesta de sobresalto acústico a corto y largo plazo (4 meses). No se observaron diferencias de ansiedad en el EPM, pero el estrés redujo la actividad general en este aparato en ambas cepas, aunque solo a corto plazo. Estos primeros resultados ya indican la posibilidad de diferencias entre cepas y poco efecto sobre ansiedad. En un estudio de la misma época, la exposición a dos modelos de CUS (el estándar y otro de tipo más social) entre PND 28-59 no afectó, medida al día siguiente a su finalización, a la actividad en un campo abierto (Kabbaj et al. 2002). Con estos dos mismos modelos, no se observaron cambios a corto plazo en el aprendizaje en el laberinto acuático, pero sí

apareció un déficit a largo plazo, aunque solo tras la exposición al CUS estándar (Isgor et al. 2004). Los cambios en peso corporal, adrenal y timo ponen de manifiesto que el modelo social fue de menos intensidad, lo que podría explicar su menor efecto conductual.

En el primer estudio sobre posibles diferencias entre machos y hembras (Pohl et al. 2007), las ratas se expusieron entre PND 23-51 a CUS o a un modelo alternativo que utilizaba una exposición más esporádica a dos estímulos estresantes más intensos (inmersión en agua estando inmobilizados y choques eléctricos). Varias semanas después de la finalización de la exposición, el tratamiento esporádico incrementó la actividad global en el EPM y redujo la ansiedad en esta prueba en ambos sexos y el enterramiento de una sonda electrificada (*probe burying test*), otro modelo de ansiedad/afrontamiento, solamente en machos. En cambio, el CUS no afectó a la conducta en el EPM, pero redujo el comportamiento de enterramiento en hembras. Se observan por lo tanto diferencias entre sexos, predominando más bien un efecto positivo. En general, en aquellos estudios donde se han comparado ambos sexos, el impacto en los machos suele ser mayor en términos de pérdida de peso (Taylor et al. 2014; Rainecki et al. 2016) y los datos conductuales son más complejos: cuando aparecen efectos beneficiosos (reducción de ansiedad, incremento de afrontamiento activo), éstos son mayores en machos que en hembras (Rainecki et al. 2016), pero respecto a las consecuencias negativas también ocurre igual (Pohl et al. 2007; Taylor et al. 2014).

Los laboratorios de Gal Richter-Levin y Carmen Sandi han utilizado en numerosos estudios otros modelos de estrés durante la adolescencia en los que los animales se exponen solamente a unas pocas sesiones de estrés. Los estímulos estresante cambian según los estudios concretos pero pueden incluir exposición a una plataforma elevada, natación forzada, inmovilización en tubo, choques eléctricos o trimetiltiazolina, un compuesto presente en la orina de zorro, que se considera un olor a depredador para roedores.

En un primer estudio (Avital y Richter-Levin 2005) las ratas se expusieron durante PND 26-28 (estrés juvenil) a tres exposiciones a una plataforma elevada, observándose 4 semanas después una reducción de la actividad en un ambiente nuevo y una mejora del aprendizaje en el laberinto acuático cuando se cambiaba la posición de la plataforma (*reversal learning*), lo que sugiere efectos mixtos, positivos y negativos, que también se

observaron de forma más acentuada cuando se combinó la exposición a estrés en la etapa juvenil y en la etapa adulta. Estudios posteriores confirmaron la reducción de la actividad en ambientes nuevos y demostraron un incremento en la respuesta de sobresalto acústico, pero los datos de un mejor aprendizaje en el laberinto acuático no concordaron con los del primer estudio (Avital et al. 2006; Jacobson-Pick et al. 2008). En una variante del modelo en el que combinan varios estímulos estresantes (v.g. natación forzada, plataforma elevada, choques eléctricos), la exposición en PND 27-29 (juvenil) tuvo más consecuencias en la adultez que la exposición en PND 33-35 (adolescencia media), con menores niveles de exploración de ambientes nuevos y una peor ejecución en una tarea TWAA (Tsoory y Richter-Levin 2006; Tsoory et al. 2008). Con un modelo parecido, otros autores han encontrado también más impacto de la exposición más temprana en animales de ambos sexos, evaluados todos en la adultez (Wilkin et al. 2012).

Es importante considerar que cuando se incluyen los choques eléctricos como estímulo estresante temprano, algunos de los efectos observados podrían ser consecuencia, al menos parcialmente, de una generalización del condicionamiento del miedo al contexto, aunque el contexto inicial del choque fuera relativamente distinto al de la caja lanzadera. De hecho, en una variante del estrés llevado a cabo entre PND 30-32, en la que no se incluía la exposición previa al choque en el estrés temprano, la tarea TWAA durante la adultez solo empeoró ligeramente en un estudio (Toth et al. 2008) y más claramente en otro (Horovitz et al. 2014). En este último estudio, se observaron efectos diferentes en función del sexo: mientras que la hipoactividad en la caja lanzadera afectó a ambos sexos, la ejecución en la TWAA afectó a machos pero no a hembras, ocurriendo lo contrario con la preferencia por sacarina. Un aspecto a destacar es que el impacto de estos modelos de estrés va en dirección contraria cuando se investigan a corto plazo (unos días después) y a largo plazo (semanas después): a corto plazo los animales previamente estresados muestran más actividad y menos signos de ansiedad en ambientes como el EPM, mientras que en la adultez aparecen signos de menor actividad y mayor ansiedad (Jacobson-Pick y Richter-Levin 2010, 2012).

Sandi y colaboradores han usado sobre todo un modelo de estrés juvenil que combina la plataforma elevada y trimetiltiazolina. En un primer trabajo con machos y hembras (Toledo-Rodríguez y Sandi 2007) utilizaron estos estímulos entre PND 28-30, observando a corto plazo (PND 35-42) poco efecto sobre la actividad en campo abierto o la conducta en el EPM, aunque sí efectos sobre el condicionamiento del miedo: los

machos mostraron evidencias de mayor condicionamiento al tono, mientras que el efecto en hembras fue más pequeño y en sentido contrario. En estudios posteriores, la exposición a los estímulos estresantes tuvo lugar típicamente entre PND 28-42, e incluyó la plataforma elevada, un campo abierto intensamente iluminado y en algunas sesiones con exposición a trimetiltiazolina. En general, se observa a corto plazo reducción de la ansiedad e incremento de la preferencia por la novedad (*novelty-seeking*) y el riesgo (*risk-taking*) (Toledo-Rodríguez et al. 2011) y una menor respuesta de inmovilidad tras el condicionamiento del miedo (Toledo-Rodríguez et al. 2012). En cambio, a largo plazo se observa aumento de la ansiedad, reducción de las estrategias de afrontamiento activo en la prueba de natación forzada y reducción de la exploración social (Poirier et al. 2014; Veenit et al. 2014; Tzanoulinou et al. 2014a, 2014b; Cordero et al. 2016). Resultados de otros laboratorios obtienen datos más contradictorios respecto a la actividad/ansiedad en ambientes nuevos, pero coinciden en la reducción de ciertos aspectos de la conducta social (Toth et al. 2008; Tao et al. 2017).

Uno de los efectos más interesantes de este modelo es el incremento de la agresividad en la adultez (Márquez et al. 2013; Cordero et al. 2013, 2016; Tzanoulinou et al. 2014b). En este sentido es interesante que los efectos del estrés juvenil sobre la conducta agresiva en adultos parecen estar asociados a una respuesta diferencial de la corticosterona al estrés: en las ratas que muestran una baja respuesta al estrés los niveles basales de agresividad son más bajos que las que muestran más alta respuesta, pero el estrés solo incrementa la agresividad en las primeras (Walker y Sandi 2018).

5.4. Estrés social.

Los modelos de estrés social adolescente incluyen sobre todo la inestabilidad social y la exposición repetida a la subordinación (derrota social). Aunque no es fácil predecir si existen diferencias en la intensidad de la situación estresante generada por los distintos modelos, es presumible que los efectos sean más acentuados en ratones, que son en general mucho más agresivos que las ratas.

El modelo de inestabilidad social en ratas ha sido desarrollado por McCormick y colaboradores (McCormick et al. 2004). Consiste en 1 h de aislamiento seguido de mantenimiento en una jaula durante el resto del día con un congénere desconocido,

procedimiento que se repite a diario, aproximadamente entre PND 30-45, estudiándose sus consecuencias a corto (días) y largo plazo (semanas). En su laboratorio siempre se han utilizado ratas Long-Evans que son animales especialmente sensibles al estrés comparados con otras cepas (Sanchís-Ollé et al. en preparación). Los efectos sobre la ansiedad, valorada en el EPM, son muy ligeros, aunque la ansiedad parece reducirse a corto plazo en hembras y a incrementarse ligeramente a largo plazo en ambos sexos, con una contribución importante del estado del ciclo ovárico (McCormick et al. 2008). En la prueba de natación forzada se reduce en hembras el afrontamiento activo a corto pero no largo plazo, mientras que en machos se favorece el afrontamiento activo aunque solo a largo plazo (Mathews et al. 2008). En estudios utilizando solamente machos, la inestabilidad social favorece la agresión en una prueba de competición por la comida (Cumming et al. 2014), reduce la interacción y el reconocimiento social (Green et al. 2013; Hodges et al. 2017) y empeora el condicionamiento del miedo al tono y al contexto, efecto que aparece ya en el día siguiente a la finalización de la inestabilidad y permanece en la adultez (Morrissey et al. 2011). En un estudio posterior en hembras, el condicionamiento al contexto está empeorado poco después del período de inestabilidad, pero la extinción del condicionamiento al tono es más eficaz estudiada tanto a corto como a largo plazo tras el estrés (McCormick et al. 2013). La inestabilidad social adolescente también empeora en la adultez la memoria espacial en tareas dependientes de la formación hipocampal (laberinto acuático de Morris y localización espacial de objetos), pero no en una dependiente de PFC, como es la prueba de alternancia en un laberinto en T (McCormick et al. 2010; 2012; Green y McCormick, 2013). En conjunto, parece que el modelo afecta poco a la ansiedad y a las estrategias de afrontamiento, pero tiene más efecto sobre la interacción social y algunos tipos de memoria.

El modelo de exposición repetida a subordinación durante la adolescencia se ha estudiado sobre todo en machos y sus consecuencias solo a largo plazo (adultez). En ratas macho, este tratamiento incrementa en la adultez la actividad en ambientes nuevos y reduce la ansiedad en el EPM (Blumberg et al. 2009; Burke et al. 2010). Sin embargo, afecta negativamente al condicionamiento del miedo a un tono (Novick et al. 2016) y a la memoria de trabajo espacial (Novick et al. 2013). Utilizando una tarea operante (*strategy-shifting task*), el estrés durante la adolescencia en machos da lugar a déficits en la tarea durante la adultez pero no anteriormente (Snyder et al. 2015b), lo que sugiere un efecto latente o bien que se está afectando a la maduración de la PFC. El déficit aparece en

aquellos sujetos que muestran una estrategia de afrontamiento pasiva tanto en machos como en hembras (Snyder et al. 2015a, 2015b). Comparando ratas macho y hembras a las tres semanas de finalizada la exposición al estrés, no se observaron en machos efectos en el campo abierto, el EPM, la prueba de natación forzada o la interacción social, en tanto que en las hembras se observó reducción de la interacción social y menor latencia a adquirir la inmovilidad en la prueba de natación forzada (Weathington et al. 2012), sugiriendo mayor sensibilidad en hembras. En ratas hembras expuestas en este caso a hembras lactantes (agresivas) se ha observado un incremento en la conducta activa en la prueba de natación forzada cuando se estudia poco después de la exposición a estrés, pero el efecto casi desaparece a más largo plazo (Ver Hoeve et al. 2013). Es posible que las consecuencias de sufrir agresión sean diferentes si el animal agresor es un macho o una hembra.

5.5. Comparación de la respuesta al estrés entre adolescentes y adultos.

A lo largo de la vida de un individuo, la magnitud y duración de la respuesta fisiológica y hormonal al estrés sufre variaciones considerables. En este apartado se comparan los efectos somáticos y la respuesta del eje HPA en animales adultos y adolescentes, así como los efectos moduladores del estrés sobre la PFC y los procesos cognitivos asociados.

5.5.1- Efectos somáticos.

Varios estudios en roedores han comparado los efectos somáticos del estrés en animales adolescentes y adultos, pero la interpretación de los datos no es siempre fácil. La pérdida de peso es un efecto típico de las exposiciones a estrés de cierta intensidad, y se asocia a una reducción de la ingesta (Martí et al. 1994). Sin embargo, dado que el crecimiento de los animales durante toda la adolescencia y parte inicial de la etapa adulta es muy grande pero poco a poco se va estabilizando, la interpretación de los datos respecto al peso corporal es problemática. Una pérdida de peso en términos absolutos similar en adolescentes y adultos es muy diferente en términos de porcentaje respecto al peso inicial y los datos son confusos si no se presentan también los pesos absolutos (v.g. Doremus-Fitzwater et al. 2009; Sadler y Bailye 2016). Cuando los datos brutos son aseguibles

directamente, la exposición a CUS causa una similar pérdida de peso en la etapa adolescente que en la adulta, pero en porcentaje es lógicamente mayor en adolescentes (Jankord et al. 2011). Ocurre un problema similar de interpretación cuando se comparan machos y hembras, aunque en algunos trabajos los datos se presentan correctamente (v.g. Rainecki et al. 2016). En otros cambios fisiológicos asociados al estrés como el incremento de peso de las adrenales y la atrofia del timo no se observan diferencias claras en función de la edad y dependen de la variable concreta (Jankord et al. 2011; Hetzel y Rosenkranz 2014; Duarte et al. 2015).

5.5.2- Respuesta del eje HPA.

La respuesta al estrés del eje HPA se ha estudiado extensamente sobre todo en adultos pero también en la etapa perinatal y (Sapolsky et al. 1986; Sapolsky y Meaney 1986). En cambio, hasta la última década pocos trabajos se habían centrado en la respuesta del eje HPA durante la adolescencia. En un estudio pionero, Goldman et al. (1973) observaron una respuesta más prolongada de la corticosterona a situaciones de estrés agudo intenso (éter o choque eléctrico) en PND 25 que en PND 65, en tanto que no se observaron diferencias en respuesta a un estímulo de intensidad baja (ambiente nuevo). La respuesta más prolongada al choque eléctrico ya no fue evidente a PND 45 vs PND 65. Los datos sugieren que la mayor respuesta es observable con estímulos intensos y que es más propia de un periodo temprano posterior al destete.

En la mayoría de los estudios posteriores que comentaremos a continuación, la edad de comparación con la respuesta adulta suele corresponder a PND 28-30 (periodo juvenil) y muchos estudios la extienden hasta PND 45. En machos, la respuesta más prolongada de la corticosterona al estrés (inmovilización en tubo) observada en PND 30 es ya similar a la de los adultos en PND 40, en tanto que la respuesta de la ACTH permanece elevada entre PND 30 y 50, descendiendo en PND 60 (Foilb et al. 2011), lo que sugiere un proceso de maduración distinto en la hipófisis y en la adrenal. En cualquier caso, a estas edades no se observan cambios consistentes en los niveles basales de ACTH y corticosterona en ratas macho (Ventura 1982; Armario et al. 1987; Romeo et al. 2004a; Viau et al. 2005) o hembras (Romeo et al. 2004b; Viau et al. 2005). En los machos, tampoco se han observado diferencias entre preadolescentes y adultos en el volumen y el número de células en las subdivisiones parvo-celular y magno-celular del PVN (Romeo et al. 2007).

En cambio, la expresión basal de CRH (niveles de mRNA) es más elevada en ratas adolescentes que en adultas (Romeo et al. 2007), aunque estas diferencias no se han replicado en otros estudios (Viau et al. 2005).

En respuesta al estrés agudo, las revisiones sobre el tema insisten en una mayor respuesta del eje HPA (v.g. Romeo 2018), pero los resultados reales son menos consistentes y más matizables. En respuesta a situaciones de estrés de tipo emocional (usualmente inmovilización en tubo), es relativamente frecuente que la respuesta de la ACTH durante la exposición o en el periodo post-estrés no sea diferente (Armario et al. 1987; Romeo et al. 2004a, 2004b; Lui et al. 2012; Romeo et al. 2014), aunque ocasionalmente sea mayor (v.g. Foilb et al. 2011). Más consistente es en cambio la respuesta de corticosterona. En este caso, no suelen observarse diferencias mientras dura la exposición al estrés (Armario et al. 1987), pero los niveles son más altos en el periodo post-estrés (Romeo et al. 2004a, 2004b, 2006a, 2006b, 2014; Brunell y Spear 2005; Foilb et al. 2011; Lui et al. 2012). La mayor o más prolongada respuesta de la corticosterona parece afectar tanto a la fracción total como a la biodisponible, dado que los niveles de transcortina (*corticosteroid-binding globulin*, CBG) son similares en los sujetos preadolescentes y adultos (Romeo et al. 2006a). La expresión del receptor tipo 2 de melanocortina, mediante el cual la ACTH actúa sobre el córtex adrenal, está más elevado en ratas adolescentes que en adultas, siendo posible que esta mayor respuesta de la corticosterona sea consecuencia de cambios en la respuesta de la adrenal a la ACTH, aunque los datos son muy preliminares (Romeo et al. 2014).

A pesar de las escasas diferencias en la respuesta de la ACTH al estrés entre ratas adolescentes y adultas, la expresión de c-fos en el PVN y en las neuronas CRH+ del mismo sí es mayor en ratas adolescentes (Viau et al. 2005; Romeo et al. 2006a; Lui et al. 2012). No existe ningún estudio en el que se haya evaluado la respuesta de las células corticotropas de la hipófisis a la administración exógena de CRH o vasopresina y por lo tanto no sabemos si la sensibilidad de la hipófisis a los factores liberados desde el hipotálamo está alterada.

Para añadir más complejidad, la exposición a un estímulo estresante de tipo inmunitario como la administración de endotoxina bacteriana (lipopolisacárido) da lugar a una más prolongada respuesta de la corticosterona y de la expresión de c-fos en el PVN en adultos que en preadolescentes (Goble et al. 2011). Esta especial respuesta podría estar

relacionada con una más intensa respuesta de los adultos a un tipo de estímulo estresante muy particular (inmunitario), como se pone de manifiesto en el estudio mencionado con la respuesta de la interleucina 6 a la administración de endotoxina. No obstante, los datos ponen de manifiesto que el tipo de estímulo utilizado puede ser crítico a la hora de valorar la respuesta diferencial al estrés en función de la edad.

La exposición crónica al estrés puede alterar la funcionalidad del eje HPA y dar lugar a distintas patologías en animales adultos (ver revisión de Kloet et al. 2005; Armario 2015). Considerando que la liberación de corticosterona puede ser mayor o más prolongada en ratas adolescentes que adultas, es importante estudiar la influencia de la edad en la respuesta al estrés crónico.

Tras la exposición repetida al mismo estímulo estresante (homotípico), suele darse en los sujetos adultos un proceso de adaptación de tal manera que la respuesta hormonal, especialmente la de ACTH, es cada vez menor (Martí y Armario 1998; Rabasa et al. 2015). La respuesta de la corticosterona puede ser paradójicamente mayor tras la exposición a situaciones de estrés crónico de elevada intensidad, debido a un aumento de la respuesta máxima de la corteza adrenal a la ACTH (v.g. Armario et al. 1988b; Márquez et al. 2004). En cambio, una historia previa de estrés crónico puede causar sensibilización de la respuesta de la ACTH a nuevas situaciones de estrés (heterotípico) (Belda et al. 2015), aunque es importante destacar que la respuesta de la corticosterona es inapropiada para valorar si existe o no sensibilización heterotípica, dado que la secreción máxima de corticosterona se alcanza ya con niveles intermedios de ACTH y puede haber sensibilización de la ACTH que no se refleje en absoluto en la corticosterona.

Los datos concernientes a la adaptación del eje HPA al estrés crónico repetido en ratas adolescentes respecto a adultas son controvertidos. En algunos estudios (Gómez et al. 2002), la respuesta de la ACTH y la corticosterona a la inmovilización en tubo es claramente mayor en adolescentes que en adultas (PND 40 vs 60); en cambio, el patrón de adaptación a la exposición repetida es complejo, siendo mejor con la ACTH pero peor con la corticosterona en las ratas adolescentes. Sin embargo, en otro estudio utilizando el mismo estímulo estresante, la adaptación de la ACTH y la corticosterona fue inferior en prepuberales (PND 28) que en adultas (PND 70) (Romeo et al. 2006a). La menor capacidad de adaptación homotípica de las ratas adolescentes ha sido confirmada en otros estudio en los que solo se valoran los niveles de corticosterona (Doremus-Fitzwater et al.

2009; Lee y Hill 2013), siendo las diferencias de adaptación con la edad algo más evidentes en machos que en hembras (Doremus-Fitzwater et al. 2009).

La influencia de la edad en la respuesta del eje HPA a un estímulo heterotípico tras una historia previa de estrés crónico ha sido estudiada tan solo en tres trabajos, con resultados contradictorios, quizás debido a cuestiones metodológicas. La exposición repetida a una cámara fría no causa sensibilización de la respuesta de la ACTH a la inmovilización en tubo ni en adultos ni en adolescentes, aunque sí se observó una pequeña sensibilización de la respuesta de la corticosterona en los adolescentes (Lui et al. 2012). Sin embargo, no puede descartarse una mayor respuesta de la corticosterona a la ACTH tras la exposición crónica al frío, que no reflejaría una sensibilización central del eje HPA. Por el contrario, en otros dos trabajos, la sensibilización tras CUS es menor en ratas adolescentes (Jankord et al. 2011; Cotella et al. 2019). Ambos estudios también adolecen de problemas metodológicos: en el primero solo se valora corticosterona, mientras que en el segundo, en los que la sensibilización se observa tanto con ACTH como con corticosterona, en realidad se comparan dos cohortes diferentes de animales. No podemos concluir por lo tanto que existan diferencias importantes en este sentido.

En resumen, durante la adolescencia no se observan cambios respecto a los adultos en los niveles basales de ACTH y corticosterona, aunque pueden existir diferencias más sutiles que han sido poco investigadas. A nivel central, la expresión basal de CRH en el PVN es normal o aumentada y no se observan diferencias respecto a los GR/MR, a pesar de las posibles alteraciones en los mecanismos de retro-inhibición del eje HPA. La respuesta de la ACTH y la corticosterona a estímulos estresantes de cierta intensidad parece ser más prolongada que en la etapa adulta, coincidiendo con una mayor activación del PVN. No obstante, los resultados no son siempre claros y el tipo de estímulo estresante puede ser relevante. La adaptación homotípica del eje HPA tras la exposición repetida al mismo estímulo estresante parece deficiente en adolescentes. En conjunto, los datos obtenidos respecto a los distintos niveles y aspectos del eje HPA son fragmentarios y se requerirían más estudios comparativos para tener un esquema coherente de las diferencias reales.

5.5.3. Efectos sobre la corteza prefrontal y procesos cognitivos asociados.

Puesto que la PFC necesita más tiempo para desarrollarse completamente, es de esperar que esta maduración sea sensible a factores ambientales tanto positivos como negativos (v.g. estrés, enriquecimiento ambiental, relaciones parentales, abuso de drogas) y que aparezcan efectos que pueden ser relativamente duraderos.

Estudios pioneros en roedores adultos demostraron que la exposición al estrés crónico va asociada a una atrofia del árbol dendrítico apical, pero no del basal, de las neuronas piramidales de la región CA3 de la formación hipocampal (Watanabe et al. 1992; Magariños y McEwen 1995a). Posteriormente se observó un incremento en el número de espinas dendríticas en el árbol apical y basal (Sunanda et al. 1995). Los efectos sobre el árbol dendrítico en CA3 parecen mediados por glucocorticoides (Woolley et al. 1990; Magariños y McEwen 1995b), son reversibles después de varias semanas (Conrad et al. 1999) y no se observan en hembras (Galea et al. 1997). Tras los estudios en la formación hipocampal, otros investigadores dirigieron la atención a dos áreas críticas en la regulación de la respuesta al estrés: amígdala y mPFC. En contraste con su efecto en la formación hipocampal, el estrés crónico incrementa la arborización dendrítica de las neuronas de amígdala basolateral, estando el efecto ligado a la intensidad de la situación estresante (Vyas et al. 2002). También en contraste con lo observado en la formación hipocampal, los efectos en la amígdala son duraderos y van en paralelo a un incremento en la ansiedad (Vyas et al. 2004).

Los cambios en mPFC van en la misma dirección que los observados en la formación hipocampal. La administración crónica de corticosterona o la exposición crónica al estrés reducen el árbol dendrítico apical de las neuronas piramidales de la mPFC (Wellman 2001; Cook y Wellman 2004; Radley et al. 2004). Posteriormente se ha observado también una reducción de las espinas dendríticas, más evidente en las dendritas apicales (Radley et al. 2008). La mPFC parece especialmente sensible a los efectos del estrés, observándose cambios con situaciones estresantes tan débiles como la administración repetida de vehículo (Seib y Wellman 2003) o una o pocas exposiciones al estrés (Brown et al. 2005; Izquierdo et al. 2006). No obstante, como ocurre en la formación hipocampal, incluso los efectos de situaciones de estrés más intensas son reversibles (Radley et al. 2005). También el sexo juega un papel fundamental dado que en hembras el estrés crónico incrementa la arborización dendrítica apical de las neuronas piramidales mientras que la

reduce en machos, efecto diferencial que depende de estrógenos (Garrett y Wellman 2009). Es importante destacar que los efectos negativos del estrés sobre las neuronas piramidales de mPFC correlacionan con el déficit en una tarea dependiente de PFC como el *perceptual attentional set-shifting* (Liston et al. 2006).

Los efectos del estrés sobre mPFC en animales jóvenes han sido estudiados más recientemente. En general, aparecen diferencias importantes en función de la edad. En ratas adolescentes, la exposición crónica a estrés (inmovilización en tubos) entre PND 20-41 reproduce los efectos observados en adultos (atrofia del árbol dendrítico de las neuronas piramidales CA3 de la formación hipocámpal, de las neuronas piramidales del área prelímbica de mPFC e hipertrofia dendrítica en amígdala), pero el efecto se observa en ambos sexos (Eiland et al. 2012). Además, los efectos perduran en el tiempo, de tal manera que tras 5 sesiones consecutivas de choques eléctricos (PND 21-25) en ratas macho se produce, a largo plazo (PND 105), una disminución del grosor de las regiones prelímbica e infralímbica de la mPFC, junto a una reducción de la arborización dendrítica apical y basal en la región prelímbica (Lyttle et al. 2015).

Los cambios morfológicos observados tras el estrés crónico en mPFC también se reflejan en aspectos funcionales. La exposición de ratas de 3-4 semanas a 5-7 días de inmovilización repetida en tubo o a un modelo de CUS, reduce a corto plazo (24 h) la transmisión sináptica ligada a los receptores AMPA y NMDA en las neuronas piramidales de mPFC y estos cambios van en paralelo a un déficit en la memoria temporal de objetos (Yuen et al. 2012), que es dependiente de PFC. La exposición de ratas a estrés repetido por inmovilización en tubo (PND 42-49), da lugar a corto plazo a una disminución de la transmisión sináptica excitadora en las neuronas de la capa I de la corteza prelímbica mPFC, con una disminución de la amplitud de los potenciales postsinápticos excitatorios de campo y de la expresión de la depresión a largo plazo (Negrón-Oyarzo et al. 2014, 2015), desapareciendo los efectos en la adultez. Los cambios electrofisiológicos se acompañaron de un déficit a corto plazo en la extinción del miedo condicionado (Negrón-Oyarzo et al. 2014). En otro trabajo reciente con exposición repetida a estrés social en distintas etapas, adolescencia temprana (PND 30-36), adolescencia media (PND 42-46) o adultez (PND 69-76), se ha observado en ambos sexos una disminución a corto plazo de la excitabilidad intrínseca de las neuronas piramidales de la capa V de la corteza prelímbica y de la frecuencia de potenciales postsinápticos excitadores, efecto que es más potente en la adolescencia media (Urban y Valentino 2017).

Es interesante destacar que 30 días después de finalizada la exposición repetida a inmovilización en tubo de PND 45 a 60, no se han observado efectos (o éstos son menores) sobre ansiedad, estrategias de afrontamiento o preferencia por sacarosa (Abush y Akirav, 2013), pero sí aparecen déficits en memoria de reconocimiento o localización de objetos, que son dependientes de PFC y formación hipocampal respectivamente

Es de esperar que el impacto del estrés adolescente sobre la PFC afecte a tareas cognitivas relacionadas con las funciones ejecutivas. Utilizando una tarea operante (*strategy-shifting task*), el estrés durante la adolescencia en machos da lugar a déficits en dicha tarea durante la adultez pero no anteriormente (Snyder et al. 2015b), lo que sugiere un efecto latente o bien que se está afectando a la maduración de la PFC. Resultados similares se han observado en ratones expuestos a un modelo de derrota social durante 10 días desde PND 28: la inflexibilidad cognitiva (*attentional set-shifting task*) no cambia a corto plazo pero empeora en la adultez (Xu et al. 2016) y este efecto está ligado a un descenso de la expresión de BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) en PFC (Xu et al. 2018). En algunos casos, los efectos negativos pueden aparentemente desvanecerse a largo plazo pero existe un déficit latente: la exposición de ratas adolescentes a un modelo de CUS favorece en la etapa adulta la flexibilidad cognitiva y no afecta a la memoria de trabajo, pero ésta se reduce drásticamente cuando se introduce una perturbación estresante (Chaby et al. 2015).

Tomados en conjunto, los resultados sugieren que la exposición a varios modelos de estrés crónico en la etapa adolescente puede causar efectos a corto y largo plazo sobre la morfología de las neuronas corticales, su actividad electrofisiológica y conductas dependientes de PFC. Se requieren muchos más estudios combinando distintas técnicas y estudiando sistemáticamente los efectos a corto y largo plazo para tener un perfil más preciso de los efectos del estrés adolescente y sus consecuencias.

Hipótesis y Objetivos

La adolescencia se caracteriza por un importante desarrollo cognitivo y emocional que conlleva una remodelación del encéfalo. Estos procesos de maduración hacen de la adolescencia un período de especial oportunidad pero también de vulnerabilidad. En sujetos adultos, las exposiciones a estrés incontrolable parecen favorecer la vulnerabilidad a los efectos negativos del estrés, en tanto que la exposición a estrés controlable hace a los sujetos resilientes frente a algunos de los efectos negativos de dicho estrés. En base a ello, nuestras hipótesis son:

1. La exposición a estrés incontrolable durante la adolescencia dará lugar a corto y largo plazo a un aumento de las conductas relacionadas con la ansiedad y/o la depresión, así como a una mayor activación del eje HPA. En cambio, la exposición a estrés controlable protegerá a los sujetos de algunos de los efectos negativos.
2. La exposición a estrés incontrolable en la adolescencia favorecerá las estrategias de afrontamiento pasivas tras una re-exposición al mismo estímulo estresante en la etapa adulta. En cambio, la experiencia de estrés controlable tendrá efectos protectores, potenciando las estrategias activas.
3. La exposición a estrés durante la adolescencia probablemente afectará al desarrollo de la corteza prefrontal, y por lo tanto pueden verse alteradas funciones cognitivas y emocionales asociadas al funcionamiento de dicha corteza. En concreto, sugerimos que el estrés de tipo incontrolable dará lugar a una disfunción de los procesos inhibitorios, potenciando las conductas impulsivas. La exposición a estrés controlable protegerá a los sujetos de dichos efectos negativos.
4. Puesto que la impulsividad es un constructo multifactorial, el estrés durante la adolescencia podría tener efectos diferenciales en función del tipo de impulsividad estudiado (motora *versus* cognitiva).

Objetivos

1. Estandarizar una tarea de evitación activa de dos sentidos en una caja lanzadera como modelo de estrés (choque eléctrico en las patas) controlable repetido en la etapa adolescente. En dicha tarea el animal puede evitar/escapar del choque cruzando de un compartimento a otro de la caja lanzadera. Se compararán los efectos del grupo controlable con un grupo *yoked* que recibirá el mismo tipo de estrés pero sin posibilidad de control y con un grupo que no recibirá estrés.
2. Valorar el impacto global de la exposición a estrés repetido y el control sobre el mismo durante la adolescencia evaluando efectos somáticos como los cambios en el peso corporal, el peso relativo de las adrenales y el timo y la maduración sexual.
3. Estudiar la influencia del estrés en la adolescencia y el control sobre el mismo en la respuesta del eje HPA a la propia tarea y también a otros estímulos estresantes nuevos para detectar si existe o no sensibilización heterotípica.
4. Estudiar la influencia del control sobre el estrés a corto y largo plazo en conductas que valoran la generalización del miedo, la ansiedad, las estrategias de afrontamiento y la anhedonia.
5. Valorar si la memoria de miedo condicionada al contexto reciente y remota se ve afectada tras la exposición repetida al estrés adolescente y muy especialmente si esta memoria es sensible a la controlabilidad.
6. Estudiar los efectos a largo plazo del estrés controlable e incontrolable durante la adolescencia sobre la impulsividad cognitiva, la impulsividad motora y la toma de decisiones en situaciones de riesgo.

Material y Métodos

En este apartado se describen los sujetos de experimentación y las condiciones de estabulación. Así mismo, se definen en detalle los procedimientos generales utilizados y las pruebas conductuales realizadas en todos los experimentos. Los diseños experimentales se mostrarán en el apartado de resultados (página 121).

1- SUJETOS DE EXPERIMENTACIÓN Y PROCEDIMIENTOS GENERALES.

En todos los experimentos se utilizaron ratas macho de la cepa *Sprague-Dawley* procedentes del *Servei Estabulari* de la Universidad Autónoma de Barcelona. La edad de los animales fue, de promedio, de 33 días posnatales (PND 33) al inicio del procedimiento de estrés. En función del experimento, los animales se estabularon de manera individual o de dos en dos en jaulas de 800 cm³. Se utilizó viruta absorbente (Lignocel) como lecho. Se mantuvieron en condiciones estándar de luz (foto-período de 12 h), temperatura (21 ± 1 °C) y humedad (40-60 %). Durante las primeras fases experimentales, los animales dispusieron de comida (dieta para cría #2018S y de mantenimiento #2014S, Harlan) y agua *ad libitum*, aunque se controlaba la cantidad de comida que ingerían. Durante la realización de las distintas tareas operantes, los animales dispusieron de comida de mantenimiento, aunque con distintos grados de restricción (habitualmente 60 – 80 % de la ingesta *ad libitum*).

Desde su llegada (las más jóvenes en el PND 21), los animales fueron aclimatados a la sala de estabulación y se realizaron entre 3 y 4 sesiones de *handling*. El procedimiento consistía en colocar el animal en el interior de un trapo, realizar un suave masaje por la espalda y la cola durante unos 10 s, y luego levantar el animal durante unos 10 s. Este método es el que simula mejor las condiciones experimentales posteriores. También se realizaron durante varios días distintos procedimientos de habituación a manipulaciones experimentales como la toma de muestra de sangre por incisión en la cola y el pesado. La finalidad de la habituación a estos procedimientos fue minimizar el posible impacto del estrés asociado a los mismos. Todos los procedimientos experimentales descritos fueron previamente aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación Animal y Humana de la Universidad Autónoma de Barcelona y de la Generalitat de Catalunya, de acuerdo con las Directivas de la Unión Económica Europea (2010/63/EU) y de España (RD53/2013).

En la etapa adolescente los animales fueron expuestos a estrés por choque eléctrico en una caja lanzadera (TWAA, ver apartado 6), estudiándose en algunos de los experimentos la respuesta hormonal durante la tarea (ver apartados 3 y 4). Durante la exposición al estrés se estudiaron además sus posibles efectos sobre el condicionamiento del miedo al contexto (ver apartado 6) y la maduración sexual (ver apartado 2). Tras finalizar el estrés, se valoraron los efectos a corto y largo plazo sobre la actividad locomotora y exploratoria (ver apartado 7.1), la ansiedad (ver apartados 7.3, 7.5 y 7.6) y las conductas similares a la depresión (ver apartados 7.2 y 7.4). Finalmente, a largo plazo se estudiaron los efectos del estrés adolescente sobre la toma inadecuada de decisiones y el control de impulsos, mediante distintas tareas operantes (ver apartados 8).

2- VALORACIÓN DE LA MADURACIÓN SEXUAL.

En humanos, la maduración sexual durante la pubertad puede verse afectada por múltiples factores intrínsecos y extrínsecos, como la desnutrición, las infecciones o el estrés (Parent et al. 2003). Existen pocos estudios en estrés adolescente en animales, pero los datos indican un retardo de la maduración sexual en machos (Almeida et al. 2000). Para su valoración en machos se observó la separación del prepucio siguiendo un procedimiento establecido (de Jong y van der Schoot 1979; Vetter-O'Hagen y Spear 2012). Brevemente, se sujetaron las ratas por la piel de la espalda, se colocaron con el abdomen hacia el experimentador y con suavidad se retiró manualmente el prepucio del glande realizando una ligera presión. En cada valoración, se puntuó el estado de la separación balano-prepucial como: cerrado (0), parcialmente abierto (1) o abierto (2). Este procedimiento se realizó cada 4 días, empezando aproximadamente en el PND 24 hasta que la separación del prepucio se completó.

3- TOMA DE MUESTRA DE SANGRE.

Las muestras de sangre se obtuvieron por el método de incisión en la cola, ampliamente validado en nuestro laboratorio y en otros, permitiendo en condiciones adecuadas, obtener niveles hormonales realmente basales (v.g. Belda et al. 2004; Vahl et al. 2005). El

procedimiento consistió en realizar una pequeña incisión de unos 2 mm en una de las dos venas laterales, por la parte más distal de la cola, y realizar un suave masaje para estimular el flujo sanguíneo. La sangre se recogió con un capilar conteniendo EDTA (Microvette CB 300, STARSTEDT), extrayéndose un máximo de 300 µL por capilar. Esta técnica permite extraer muestras posteriores de sangre durante el mismo día, sin necesidad de realizar más incisiones. Todo el procedimiento debe realizarse en un máximo de 2 min para evitar que se alteren los parámetros hormonales. Al finalizar la extracción, las muestras se conservaron a 4° C hasta su centrifugación (25 min, 7100 rpm) para la obtención del plasma. El plasma obtenido se dividió en dos alícuotas y se congeló a -20 °C hasta su análisis. El objetivo de extraer muestras de sangre fue el análisis de los niveles plasmáticos de las hormonas del eje HPA (ACTH y corticosterona, ver 2.4).

4- ANÁLISIS BIOQUÍMICO.

Para determinar la concentración de ACTH en sangre se siguió el protocolo del radioinmunoanálisis (RIA) de doble anticuerpo en no equilibrio descrito por el Dr. W.C. Engeland (Department of Surgery, University of Minnesota, Minneapolis, EEUU) y posteriormente modificado en nuestro laboratorio (García et al. 2000). Todo el procedimiento se realizó a una temperatura de 4 °C para evitar la posible degradación de la hormona. El tampón fosfato 0,05 M (pH 7,2) contiene EDTA disódico 0,25 M, Tritón X-100 al 0,1 % y albúmina bovina al 0,25 % en agua Milli Q. Se utilizó ACTH 1-39 de rata (Sigma) como estándar, ¹²⁵I-ACTH (Perkin Elmer) como trazador y un anticuerpo contra ACTH de rata (Ab Rb 7), generosamente suministrado por el Dr. W.C. Engeland. Para separar la fracción libre de la unida se usó un segundo anticuerpo (*goat anti-rabbit* IgG, Chemicon) diluido 1:32, conteniendo suero de conejo no inmunizado al 0,3 % y polietilenglicol al 9 %. Después de la incubación se procedió a la centrifugación posterior a 4700 rpm (SIGMA-Laboratory Centrifuges 6K15) durante 30 min a 4° C. El coeficiente de variación intra-ensayo fue del 4 – 6 % y el inter-ensayo del 7 %. La sensibilidad del método fue de 12,5 pg/ml utilizando 10 µl de muestra.

Los niveles de corticosterona en plasma se determinaron por un RIA de doble anticuerpo en equilibrio siguiendo el protocolo escrito por el Dr. G.B. Makara (Institute of Experimental Medicine, Budapest, Hungría). Se utilizó un tampón fosfato sódico 0,2 M

disuelto en agua Milli Q. Las muestras fueron incubadas previamente durante 2 h en ácido cítrico 0,1 M para desnaturalizar la proteína transportadora de corticosterona (transcortina o *corticosteriod-binding globulin*, CBG). Se utilizó corticosterona sintética (Sigma) como estándar, ¹²⁵I-corticosterone-carboxi-methyloxime-tyrosine-methyl (ICN-Biolink 2000) como trazador y un anticuerpo contra corticosterona (amablemente donado por el Dr. G. B. Makara) en tampón de ensayo con 0,15 % de suero de conejo no inmunizado. La fracción libre se separó con un segundo anticuerpo (*goat anti-rabbit* IgG, Chemicon) diluido 1:48 en tampón de ensayo con polietilenglicol al 7,5 % (en agua Milli Q) y 10 µl/tubo de suero de vaca, seguido de 30 min de centrifugación a 4700 rpm (4 °C). El coeficiente de variación intra-ensayo fue del 5 – 8 % y el inter-ensayo de un 9 %. La sensibilidad del método fue de 1 ng/ml utilizando 2 µl de muestra.

La radioactividad de los *pellets* (precipitado) se midió con un contador gamma (Wallac 1272 Clinigamma). Los cálculos para determinar la concentración de ACTH y de corticosterona se obtuvieron utilizando una transformación log-logit. Todas las muestras que fueron comparadas estadísticamente se analizaron simultáneamente.

5- MÉTODOS DE GRABACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS PRUEBAS CONDUCTUALES.

Durante la realización de las tareas operantes se utilizaron cámaras en posición frontal o cenital, conectadas a un videograbador digital. Cada una de las jaulas operantes tenía una o dos cámaras (en función de si la jaula tenía un único compartimento o dos) con las que se grababa la conducta de los animales durante la prueba. La instalación de las cámaras en las jaulas operantes no sólo permite analizar la conducta posteriormente, sino que también sirve para detectar cualquier problema durante la realización de la prueba.

Para el análisis de la conducta, se utilizaron distintos programas. El programa *SMART* (versión 2.5.19-21, Panlab S.L.U., Barcelona, España) detecta los píxeles que ocupa un animal mediante su centro de gravedad, y permite analizar, entre otras variables, el recorrido de los sujetos durante la realización de las pruebas. Mediante el programa *The Observer XT 11* (Noldus Information Technology bv, Wageningen, Netherlands) se pueden analizar múltiples conductas (continuas y/o puntuales) de manera simultánea, y se obtiene el tiempo y la frecuencia durante todo la prueba o por bloques de tiempo. En

otros casos se utilizó un cronómetro (manual) para evaluar los tiempos durante los cuales los sujetos realizaban una conducta concreta. En cualquier caso, todos los análisis se realizaron a ciegas.

6- TAREA DE EVITACIÓN ACTIVA EN DOS SENTIDOS.

Esta tarea utiliza una caja lanzadera e implica que el animal ha de saltar de un compartimento a otro adyacente para evitar un choque eléctrico en las patas (US) que se presenta inmediatamente después de un estímulo inicialmente neutro (auditivo y/o luminoso). El paradigma implica dos tipos de condicionamiento: el operante y el clásico (*Pavloviano*). Mediante el condicionamiento instrumental (u operante), el sujeto aprende a realizar una acción activa que evita o reduce el US, lo que actúa como refuerzo negativo de dicha conducta. Mediante el condicionamiento clásico, el US es asociado a los estímulos inicialmente neutros y se convierten en condicionados (CS). Además, el contexto (la caja lanzadera) actúa también como CS. Mediante este condicionamiento clásico el sujeto aprenderá que el CS predice al US.

Este paradigma permite dos posibles estrategias de afrontamiento (v.g. Vicens-Costa et al. 2011): (i) una estrategia activa, en la cual el sujeto puede realizar dos tipos de respuestas; la evitación, cuando el sujeto cambia de compartimento durante el CS, y el escape, cuando cambia de compartimento durante el US, antes de que termine; y (ii) una estrategia pasiva, en la cual el sujeto permanece en el mismo compartimento donde se administra el US en estado de petrificación o *freezing* debido al condicionamiento clásico del miedo inducido por el US.

La TWAA es una tarea compleja dado que no hay un compartimento “seguro” y otro “peligroso”, puesto que dependiendo de la posición del animal en la caja lanzadera (detectada por unos sensores debajo del suelo de rejilla), el US se administrará en cualquiera de los dos compartimentos. Esta situación representa un conflicto para los animales, sobre todo durante las primeras fases de la adquisición, cuando no tienen experiencia con ninguno de los estímulos. Cabe destacar que, aunque la tarea es compleja y pueden darse ambas estrategias, la de tipo pasiva es poco frecuente, en condiciones habituales, ya que los sujetos aprenden a escapar (no así a evitar) con relativa facilidad. La TWAA ha sido utilizada para

el estudio del aprendizaje aversivo (v.g. Galatzer-Levy et al. 2014; Bock et al. 2013; Shanmugasundaram et al. 2015) y viene muy influida por la ansiedad, que afecta negativamente a la eficacia del aprendizaje de la tarea (Fernández-Teruel et al. 1991; Brush 2003; Steimer y Driscoll 2003). Más recientemente, se ha utilizado para estudiar la controlabilidad de estímulos estresantes (Ilin y Richer-Levin 2009). En la misma línea, cabe mencionar datos publicados sobre la controlabilidad del estrés que señalan que las hembras no son tan sensibles al factor de la controlabilidad como los machos (Dalla et al. 2008; Baratta et al. 2018), uno de los motivos por el cual no se han utilizado ratas hembra en el presente estudio.

Se utilizaron 4 cajas lanzaderas individuales con aislamiento acústico. Cada caja (LE 1005, Panlab S.L.U.) está construida de plexiglás negro (pared posterior, laterales y superior) y transparente (puerta frontal) y está dividida en 2 compartimentos (25 x 25 x 25 cm), conectados por una abertura (8 x 10 cm). El suelo es de rejilla de metal removible de 19 barras (0,3 cm de diámetro, espaciadas 1 cm) vinculadas a un generador de choques eléctricos (LE100-26, Panlab S.L.U.). Cada compartimento de la caja tiene una luz (4 cm diámetro 2,4-W, 24-V) en la pared posterior a 19,5 cm de la base, un altavoz y una puerta por donde se introducen los animales. Cada caja está aislada por otra caja de metal insonorizada (66 x 50 x 55 cm) que genera un ruido de fondo de 60 dB. Cada sujeto MASTER realizó 6 - 8 sesiones (en función del experimento) no consecutivas a lo largo 30 días de promedio. El programa utilizado fue el *Packwin* v1.2 (Panlab S.L.U.) y se siguió el siguiente protocolo:

- Tiempo de habituación al contexto: 5 min durante los cuales no se administra ningún estímulo. El sujeto se familiariza con la caja lanzadera.
- Intensidad del choque: 0,7 mA.
- Duración del choque: 10 s.
- Duración de los estímulos condicionados (luz 7 W y sonido 2400 Hz 80 dB): 10 s. Estos aparecen simultáneamente. La luz aparece en el compartimento donde se encuentra el sujeto, y el sonido en el medio de ambos compartimentos.
- El US empieza justo al terminar el CS, no hay intervalo de tiempo entre estímulos. Este tipo de condicionamiento se conoce como de demora.
- Número de ensayos: 50.
- ITI (tiempo entre-ensayos): 5 – 55 s, aleatorio, con un promedio de 30 s.

- *Ratio* de respuesta: 1 cruzamiento (FR1).
- Tiempo de duración de una sesión: 35 – 40 min.

Los animales fueron transportados desde el animalario en cajas de metacrilato blancas. Entre cada ensayo se limpiaron las cajas lanzadera con etanol al 70 % v/v. Las variables que se analizan en esta prueba son: (i) evitaciones, (ii) escapes, (iii) latencia de respuesta, que se refiere al tiempo desde que se presenta el CS hasta que el animal salta al otro compartimento (con independencia de que realice una evitación o una huida), (iv) respuestas nulas (cuando el animal no cruza al otro compartimento), (v) cruzamientos de un compartimento a otro (*intercrossings*) durante los 5 min de habituación y durante los ITI, y (vi) *freezing* y *rearings* durante los 5 min de habituación. Los cruzamientos durante los ITI sólo se pueden contabilizar para las cajas lanzadera asociadas al protocolo MASTER (más detalle a continuación), debido a una cuestión técnica del programa.

Los grupos MASTER y YOKED fueron expuestos simultáneamente en dos cajas lanzaderas diferentes (pareja MASTER-YOKED) y las parejas se mantuvieron fijas a lo largo de todo el experimento. Las cajas lanzaderas estaban conectadas mediante un cable a una *interface*, de manera que ambas seguían siempre el mismo protocolo. La luz aparecía solo en el compartimento donde se encontraba en ese momento el sujeto MASTER (detectado mediante los sensores de la base). Esto era así también en la caja lanzadera de los sujetos YOKED. La diferencia entre grupos era que, aunque ambos grupos podían asociar los CS con el US, solo los MASTER podían aprender a huir o evitar el US. Los grupos YOKED eran totalmente dependientes de las acciones de los sujetos MASTER y recibían el mismo número de choques eléctricos en las patas y durante el mismo tiempo que éstos, sin poder hacer nada para evitarlos ni para huir. Los grupos CONTROL fueron expuestos individualmente a las cajas lanzadera sin ningún estímulo específico durante 35 – 40 min aproximadamente, de manera que los animales podían deambular libremente por el aparato.

Durante el procedimiento de estrés adolescente así como posteriormente (a corto y largo plazo) se puede medir el condicionamiento de miedo al contexto de la caja lanzadera (LeDoux 2014). Durante el estrés adolescente se valoró dicho condicionamiento en los primeros 5 min de habituación en las sesiones 1, 2 y 8. En el capítulo 2, se valoró además en la etapa adulta (primeros 5 min) y durante una nueva re-exposición al mismo contexto (10 min). En la re-exposición, no aparecen ni los estímulos específicos, ni el choque

eléctrico. Se utilizó la misma ruta y método de transporte que durante la exposición al choque y entre tandas se limpiaron las cajas con el mismo estímulo olfativo, etanol al 70 % v/v. Las medidas de miedo condicionado al contexto para todos los experimentos fueron el tiempo de *freezing* (Fendt y Fanselow 1999) y la actividad, medida por el número de cruzamientos y los *rearings* (Laxmi et al. 2003).

7- PRUEBAS CONDUCTUALES.

7.1- Plancha de agujeros.

La plancha con agujeros fue introducida por Boissier y Simon (ver File y Wardill 1975) y permite analizar la actividad y la conducta exploratoria en un ambiente nuevo. Esta prueba puede ser sensible a los niveles de ansiedad y a la exposición previa a situaciones de estrés, que en general da lugar a hipoactividad y disminución de la exploración (Armario et al. 1991; Albonetti y Farabollini 1992; Takeda et al. 1998).

El aparato utilizado ha sido un recinto de madera blanca rectangular (62 x 53 x 28 cm) con una base dividida en 16 cuadrados iguales y provista de 4 agujeros regularmente espaciados, de 4,5 cm de diámetro. Los dos animales de la misma caja de estabulación se colocaron al mismo tiempo en una esquina de dos aparatos diferentes, separados por una plancha negra opaca. Los HB estaban iluminados con una bombilla de 25 W a 1,5 m de distancia respecto al suelo del aparato y rodeados por cortinas negras para reducir posibles influencias externas. Entre las distintas tandas, los dos aparatos se limpiaban con agua y jabón. La duración de la prueba fue de 5 min. Las variables analizadas fueron: (i) nº de deambulaciones externas e internas (cuadrados de la periferia o centrales) considerándose una deambulación cada vez que las cuatro patas del animal cruzan el cuadrado; (ii) nº de incorporaciones o *rearings* (externos e internos) o veces que el animal levanta ambas patas delanteras, apoyándose o no en las paredes; y (iii) nº de *head-dips* o veces que el animal coloca la cabeza dentro de los agujeros del aparato, hasta la altura de las orejas. Las deambulaciones y los *rearings* se han relacionado clásicamente con actividad (locomoción), y los *head-dips* con exploración.

7.2- Prueba de natación forzada.

Es una prueba ampliamente utilizada para la validación de fármacos antidepresivos (Porsolt et al. 1977; Armario et al. 1988c; Cryan et al. 2005) y para evaluar estrategias de afrontamiento activas/pasivas frente situaciones estresantes (Martí y Armario 1993; Commons et al. 2017). La tendencia a adoptar estrategias pasivas se considera propias del estado depresivo. La prueba también es considerada un estímulo estresante mixto, predominantemente emocional, de mediana intensidad y puede utilizarse también al objeto de evaluar la respuesta hormonal al estrés (Dal-Zotto et al. 2000; Rabasa et al. 2015). La exposición a estrés previo puede dar lugar a una disminución de las estrategias activas de escape y a un aumento del tiempo de inmovilidad (v.g. Armario et al. 1991; Bielajew et al. 2003; Lucas et al. 2014), aunque los efectos no siempre son consistentes (v.g. Eiland et al. 2012; Suo et al. 2013).

Se utilizaron cilindros de plástico (plexiglás) transparente de 40 cm de altura y 20 cm de diámetro apoyados sobre una base de 25 x 25 cm, con agua a 36 °C hasta una altura de 24 cm. Para evitar posibles influencias del animal adyacente, cada tanque fue aislado mediante mamparas negras y opacas. Los animales fueron expuestos de dos en dos durante 20 min y al finalizar la prueba, se secaron brevemente con toallas de algodón, realizándose a continuación la extracción de sangre. El agua de los tanques se cambió siempre entre sujetos. Se utilizó como luz ambiental el fluorescente de la sala. Las variables conductuales que se analizaron fueron las siguientes: (i) el tiempo de escape (*struggling*), conducta de afrontamiento activa, durante la cual el animal mueve de forma enérgica las 4 patas (las 2 delanteras pueden estar o no apoyadas en las paredes del tanque), rompiendo la superficie del agua; incluye también las inmersiones (*diving*) y los saltos (*climbing*); (ii) el tiempo de inmovilidad (*immobility*), durante el cual el animal se mantiene flotando en el agua totalmente inmóvil o realizando leves movimientos con el fin de mantener la cabeza fuera del agua y (iii) el tiempo de natación suave (*mild swim*): diferencia entre el tiempo total de la prueba menos los tiempos correspondientes a las conductas anteriores; en este caso, el animal hace movimientos más allá de los necesarios para mantenerse a flote en el agua, v.g. nadar en círculos por el tanque.

7.3- Laberinto elevado en cruz.

El EPM ha sido ampliamente utilizado como un modelo para valorar ansiedad en rata (Pellow y File 1986), siendo una de las pruebas conductuales más utilizadas y mejor caracterizadas. Se ha descrito un efecto ansiogénico de la exposición a estímulos estresantes de distinto tipo e intensidad (Liberzon et al. 1997; Adamec et al. 2001, 2004, 2005; Louvart et al. 2005; Yamamoto et al. 2009). No obstante, la literatura relacionada con la influencia del estrés sobre la ansiedad es controvertida (Armario y Nadal 2013).

El aparato está compuesto por cuatro brazos de madera (46,5 cm de largo x 12 cm de ancho) conectados en ángulo recto a un cuadrante central, de forma que dos de los brazos opuestos tienen paredes de 42 cm de altura (brazos cerrados), mientras que los otros dos solo tienen un pequeño reborde de 0,5 cm de ancho x 0,3 cm de alto (brazos abiertos). Se utilizaron dos aparatos, uno blanco y el otro negro, en función del experimento. Los aparatos se colocaron a 50 cm del suelo en dos condiciones diferentes: (i) en una sala de paredes blancas, cada uno de ellos rodeado por cortinas negras para aislar cada aparato o (ii) cada aparato separado en dos salitas de paredes negras. Se disponía, en ambos casos, de una luz blanca de 25 W de potencia a 1,5 m de altura y se limpió entre tandas con ácido acético al 0,1% v/v o con agua y jabón (en función del experimento). Los dos animales de la misma caja de estabulación se colocaron en aparatos diferentes situados en la misma habitación, en el centro del EPM mirando hacia uno de los dos brazos cerrados. La duración de la prueba en todos los experimentos fue de 5 min. Se tomó como criterio de entrada a un brazo que el animal tuviese las cuatro patas en el mismo brazo. Las variables analizadas fueron las siguientes: (i) número de entradas en brazos cerrados y totales (las entradas en brazos cerrados son el índice de actividad motora inespecífica); (ii) porcentaje de entradas en los brazos abiertos con respecto a las entradas totales (índice de ansiedad), y (iii) porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos abiertos, considerando el tiempo de permanencia en brazos abiertos + cerrados como el 100 % (índice de ansiedad).

7.4- Consumo voluntario de sacarina.

Cuando se les da a escoger entre agua o una solución azucarada, los roedores suelen mostrar preferencia por las soluciones que contienen sacarina o sacarosa, ya que ambos

compuestos tienen sabor dulce y propiedades hedónicas. La disminución en el consumo de soluciones dulces se considera un buen indicador de un estado anhedónico, una conducta asociada a la depresión. Numerosos trabajos han demostrado como el consumo de sacarosa se ve disminuido tras la exposición a estímulos estresantes crónicos de intensidad media y severa, siendo en muchos casos el efecto revertido por la administración crónica de antidepresivos (v.g. Willner et al. 1987; Papp et al. 1991; Rygula et al. 2008; ver revisión en Willner 2017). No obstante, los resultados con sacarina son menos consistentes (v.g. Ayensu et al. 1995; Harris et al. 1997), y cuando se ha estudiado directamente, la exposición al estrés crónico impredecible reduce el consumo de sacarosa pero no el de sacarina (Gronli et al. 2005). De hecho existe una importante discusión metodológica, dado que algunos autores consideran que podría haber una relación entre la reducción de la ingesta de comida y el consumo de sacarosa, que tiene valor calórico (Weiss 1997). Por este motivo, parece más aconsejable el uso de la sacarina para valorar la anhedonia con independencia de la anorexia.

Para realizar la prueba los sujetos debían permanecer en jaulas individuales. Se utilizaron botellas anti-goteo de 250 ml para calcular la cantidad de agua o solución de sacarina consumida. La solución de sacarina (*saccharin sodium salt*, Sigma, S1002-500G) al 0,1 % (w/v en agua del grifo) se preparaba todos los días. Otra botella similar se rellenaba con agua. Ambas se colocaban en las jaulas de estabulación, al lado de la comida sólida, cada día en una posición diferente (izquierda o derecha) para evitar la preferencia por lugar. Los sujetos siempre dispusieron de bebida y comida *ad libitum* durante todo el día.

El primer día de habituación se colocaban dos botellas anti-goteo con agua, al objeto de que los animales se acostumbraran a beber con el mecanismo de muelle (los animales deben apretar con la lengua para que salga el agua). Una vez todos se habituaron a las botellas, se realizó una línea base de 4 días para valorar el consumo y la preferencia. Cada día a la misma hora se retiraban las botellas y se pesaban para calcular el consumo. También se pesaban los animales, así como la comida sólida ingerida. Las botellas con sacarina se mantuvieron hasta el primer día de la TWAA, retirándose justo antes de empezar la misma. Durante los días en que se realizaba la TWAA los animales dispusieron de agua *ad libitum* en botellas normales. El día antes de terminar la tarea, se colocaron de nuevo las dos botellas anti-goteo conteniendo agua. El último día de TWAA, al empezar la tarea, se retiraron las botellas anti-goteo con agua, se comprobó que todos

los sujetos habían podido beber bien durante las últimas 24 h, y una de las botellas se rellenó con solución de sacarina al 0,1 %. Al terminar la sesión de TWAA se colocaron las dos botellas (con sacarina o agua), controlándose el consumo de ambas soluciones durante 3 días consecutivos.

7.5- Prueba de interacción social.

La prueba consiste en observar los patrones de interacción social no agresiva que se establecen entre dos sujetos adultos del mismo sexo. Las variables evaluadas son conductas típicas de la especie que se observan de forma natural en un ambiente concreto. En muchas ocasiones ha sido utilizada para evaluar la ansiedad en un contexto etológico (File y Hyde 1978; File y Seth 2003). Los tratamientos estresantes como la exposición previa a derrota social, olor a depredador, estímulos físicos variables o choques eléctricos incontrolables disminuyen la interacción social activa (Short y Maier 1993; Oztan et al. 2011), mientras que los fármacos ansiolíticos tienen el efecto contrario (File 1985; Rex et al. 2004). La prueba se puede utilizar también como un reflejo de anhedonia, ya que en ratas en condiciones normales la conducta social es gratificante tanto para sujetos adolescentes como para adultos (Douglas et al. 2004).

La interacción social se potencia cuando los sujetos se estudian en condiciones de familiaridad con el aparato y/o la pareja, así como en condiciones ambientales poco estresantes (v.g. poca luz), mientras que es mínima cuando no existe familiaridad o hay mucha luz. Para evitar patrones de conducta agresiva y territorial, los dos sujetos deben tener la misma experiencia con el aparato donde tiene lugar la prueba (bien ninguna experiencia o bien una sesión previa individual) y no puede haber una gran diferencia de peso entre ellos. La prueba se realizó en un campo circular blanco (80 cm diámetro y 34 cm alto) con una base negra y lisa. La sala tenía las paredes negras y estaba iluminada con dos bombillas de 25 W cada una. En nuestro caso, no se realizó ninguna habituación al aparato, los dos sujetos de la pareja debían tener la misma experiencia previa de estrés y no podían estar estabulados juntos ni ser hermanos. Veinticuatro horas antes se pintó con un marcador permanente negro (tinta no tóxica) la cabeza o el lomo de los dos sujetos, para poder diferenciarlos y analizar la conducta individual. Se evaluaron simultáneamente dos parejas en dos salas separadas. Entre las distintas tandas, los dos aparatos se limpiaron con agua y jabón. La duración de la prueba fue de 15 min.

Las variables que pueden cuantificarse se dividen en tres grupos que representan aspectos conductuales muy distintos (Koolhaas et al. 1980): (i) conducta social activa, que incluye el *grooming* social, saltar por encima o pasar por debajo (*pass and jump*), perseguir (*following*) u oler (*sniffing*) al otro sujeto, (ii) conducta social pasiva, cuando los sujetos mantienen sus cuerpos en contacto o solo las colas, pero no realizan conductas activas, y (iii) conducta no social, cuando los sujetos no interactúan entre ellos pero sí pueden explorar el ambiente o permanecer quietos sin estar en contacto. También pueden observarse conductas como *self-grooming*, *rearings* o *freezing*, y puede analizarse la conducta motora individual para detectar algún efecto inespecífico del tratamiento.

7.6- Prueba de emergencia.

Los roedores tienden a evitar de forma innata los ambientes no familiares y abiertos. Sin embargo, estos animales son también, por naturaleza, exploradores y tienden a investigar el entorno en busca de posibles recursos (Blanchard et al. 1974). Estas características innatas permiten a los investigadores elaborar modelos para evaluar, en una situación concreta, el conflicto entre el miedo y la motivación por la exploración (Archer 1973; Bruneau et al. 1980). Clásicamente se le ha llamado *timidity test* (test de la timidez) y consiste en exponer al sujeto a un ambiente no familiar que contiene un recinto que le confiere seguridad. Se analiza la latencia de salida del recinto (más seguro) hacia la zona de “no confort”. Los sujetos más miedosos o “tímidos” prefieren resguardarse en zonas familiares o protegidas (Aitken 1972). Existen muchas variaciones del test de la timidez original, utilizándose distintos campos abiertos o laberintos, ruidos de fondo o diferentes intensidades de luz. En la literatura se ha descrito tras la exposición a estímulos estresantes un aumento de la latencia de salida del recinto seguro así como un menor porcentaje de tiempo en el compartimento abierto (Bluett et al. 2014; Patki et al. 2015; Liu et al. 2017; Rock et al. 2017).

En nuestro caso, la prueba se realizó en un campo circular blanco (80 cm diámetro y 34 cm alto) con una base blanca y lisa. En el interior, y en contacto con la pared del aparato, se situó un recinto negro (10 x 15,7 x 26,5 cm) con una abertura en uno de los laterales. La sala estaba iluminada con una bombilla de 25 W. Se estudiaron dos sujetos simultáneamente, en dos salas separadas de paredes negras. Entre las distintas tandas, los dos aparatos se limpiaron con una solución de ácido acético al 0,1% v/v. La duración de

la prueba fue de 5 min. Las variables analizadas fueron: (i) el tiempo empleado en salir del recinto seguro (latencia), (ii) el tiempo de permanencia en el recinto no protegido (si salían y volvían a entrar), y (iii) el número de veces que entraban de nuevo en el recinto seguro. El criterio para considerar que los sujetos salían o entraban de nuevo al recinto fue que las 4 patas estuviesen en la misma zona.

8- TAREAS OPERANTES.

En la etapa adulta se realizaron tres tareas cognitivas diferentes relacionadas con la corteza prefrontal: (i) la tarea de descuento por demora (capítulo 3), (ii) el *rat gambling task* (capítulo 4) y (iii) el 5CSRTT (capítulo 5). Como ya se ha comentado previamente, estudios en animales indican que la PFC es muy sensible al estrés (v.g. Caballero et al. 2016) y algunos datos también indican que la exposición a estrés adolescente aumenta los niveles de impulsividad en la etapa adulta (Baarendse et al. 2013a; Comeau et al. 2014).

8.1- Tarea de descuento por demora.

La tarea del descuento por demora es una de las más utilizadas para estudiar la denominada impulsividad cognitiva o de elección y los procesos de toma de decisiones (Winstanley et al. 2003b, 2004b; Winstanley 2011; Fuentes et al. 2014). Valora la incapacidad de los sujetos para priorizar la elección de una recompensa de mayor valor, pero demorada en el tiempo, frente a una gratificación más pequeña pero inmediata, teniendo en cuenta que el valor percibido de la recompensa va disminuyendo a medida que incrementa la demora para obtenerla. En un contexto de tarea operante, la rata puede escoger entre dos palancas: una de ellas proporciona 1 *pellet* inmediato, y la otra 4 *pellets*, pero tras una demora que, en función de la fase, se va incrementando desde 0 s a 40 s. Para obtener una mayor ganancia a largo plazo la estrategia a seguir sería escoger siempre la palanca demorada, evitando las pequeñas gratificaciones inmediatas.

Previamente a la tarea, se controlaba la ingesta de comida para cada caja (dos animales) durante 3 o 4 días, durante los cuales no se realizaba ningún otro procedimiento. Con estos valores se obtenía una línea base de ingesta estimada para los dos sujetos de la caja y se les proporcionaba una restricción de comida acorde con su ingesta previa. Un día

antes de empezar la tarea, se privaba a todos los sujetos de comida durante 24 h (agua *ad libitum* siempre) para favorecer el aprendizaje. Luego se mantenía la restricción de comida al 80 % de la línea base. La comida se proporcionaba siempre unos 30 min después de finalizar la tarea del día, nunca antes ni inmediatamente después. Durante la tarea se utilizaban como refuerzo *pellets* de BIO-SERV (Ref. #F0021, Dustless Precision Pellets®, 45 mg, Rodent Purified Diet). Estos *pellets* tienen una composición nutricional equilibrada, y entre sus ingredientes contienen sacarosa y dextrosa, para aumentar la palatabilidad. La cantidad de *pellets* extra que el sujeto ingería durante la tarea debía restarse de la cantidad de comida que se les proporcionaba al finalizar. Paralelamente, se controlaba el peso corporal y la comida proporcionada fue suficiente para conseguir una ganancia media de peso de 110 ± 5 g a lo largo de todo el período de duración de la tarea.

La tarea se llevaba a cabo en una sala iluminada solo por una lámpara tenue. Se utilizaron 8 cajas operantes (Panlab S.L.U. LE1005). Cada caja ($25 \times 25 \times 25$ cm) está construida de plexiglás negro (pared posterior, laterales y superior) y una cara frontal transparente, con un suelo de rejilla de metal removible de 19 barras (3 mm diámetro, espaciadas por 1 cm). Cada aparato está aislado por una caja de metal insonorizada ($66 \times 5 \times 55$ cm) que contiene una luz tenue, un ventilador para enmascarar los ruidos exteriores (60 dB) y una cámara frontal. En la pared derecha, a 22 cm de la base, hay una luz de 4 cm de diámetro que actúa como *house-light*. En la pared izquierda, a 6 cm de la base, hay dos palancas retráctiles de metal, una a cada lado del comedero ($3,5 \times 3,5$ cm). El comedero tiene un detector electromagnético para los *nose-poke*, respuesta que consiste en la introducción del hocico en un agujero. Encima de cada palanca se encuentra una luz, con otra luz adicional encima del comedero (3 en total en el lado izquierdo). Existe un botón manual de manera que el experimentador puede liberar los *pellets* necesarios para facilitar la asociación entre el “click” que se produce tras la caída del *pellet* al comedero y la obtención de dicho refuerzo. El programa utilizado controla la administración de los distintos estímulos y registra todos los datos (*Packwin 2.00.2*, Panlab S.L.U.). Se utilizó siempre un programa en FR1 (solo se requeriría una respuesta). Entre tandas, las jaulas se limpiaban con una solución de agua y jabón. La prueba se divide en 3 fases de pre-entrenamiento y el test propiamente dicho. Se comentan las características de cada una a continuación.

Fase 1 del pre-entrenamiento: en esta fase se realizan sesiones *overnight* de 12 h para entrenar a los animales a apretar la palanca. Se introduce una botella de agua en la pared derecha, debajo de la *house-light*. Dicha luz está siempre encendida y las dos palancas están siempre accesibles, excepto durante los 5 s siguientes a la administración del *pellet*, que es cuando se retraen (apagándose también cada una de las luces de las palancas). Ninguna de las dos palancas implica demora para la obtención del refuerzo y ambas proporcionan 1 solo *pellet*. No existen propiamente ensayos, siendo una sesión continua de forma que el animal puede presionar las palancas en todo momento. La opción del botón manual está disponible. Al finalizar la sesión, se apagan todas las luces y las palancas se retraen. Se realizan tantas sesiones como sean necesarias hasta que el animal se auto-administra 100 refuerzos, no existiendo tiempo límite en esta fase del entrenamiento. El número de sesiones necesarias hasta adquirir el aprendizaje fue de entre 1 y 6. Es importante revisar los datos registrados para observar si el sujeto muestra preferencia por alguna de las palancas. Si fuera el caso, se realiza una sesión *overnight* sólo con la palanca que menos veces elige el sujeto. Esto sucedió en una minoría de los casos.

Fase 2 del pre-entrenamiento: en esta fase se introducen los ensayos denominados de “elección forzada”, dado que aparece una sola de las dos palancas y el sujeto puede apretarla o no. Al iniciar la sesión y durante un período de 3 min, todas las luces están apagadas y las palancas se encuentran retraídas. Posteriormente, se administra 1 *pellet* no contingente y se encienden la luz del comedero y la *house-light*. Cuando el animal introduce el hocico en el comedero (*nose-poke*) para coger el *pellet* liberado, se apaga la luz del comedero y aparece una de las dos palancas (con su luz respectiva encima de la palanca). Si el animal presiona la palanca en un periodo máximo de 120 s (*limited hold*) se retrae la palanca y se administra 1 *pellet*, apagándose la luz del comedero cuando el animal lo ingiere. Si la rata no responde en este periodo de tiempo, se registra como omisión, la palanca se retrae pero no se administra el *pellet* (ni se enciende la luz del comedero) y la luz de la palanca y la *house-light* se apagan, todo al mismo tiempo. Una vez apagada la luz del comedero, se inicia a los 5 s un nuevo ensayo señalado por la iluminación de la luz del comedero y la *house-light*. Las dos palancas van apareciendo en orden aleatorio. La sesión finaliza cuando se auto-administran 100 *pellets* (sin tiempo límite). Esta fase se va repitiendo en días sucesivos hasta que el animal obtiene al menos 60 refuerzos y presiona al menos 30 veces cada una de las dos palancas. El número de

sesiones necesarias hasta adquirir el aprendizaje fue de entre 1 y 3.

Fase 3 del pre-entrenamiento: en esta fase, que es parecida a la anterior, se introduce un periodo máximo de 10 s entre la iluminación de la luz del comedero (y la *house-light*) para que el animal realice el *nose-poke* en el comedero e ingiera el refuerzo. Si en estos 10 s no se efectúa un *nose-poke*, se contabiliza una omisión. Se reduce además a 10 s el periodo de tiempo entre la aparición de las palancas y su desaparición (y por lo tanto el animal solo tiene estos 10 s para responder y apretar la palanca). El ITI es de 60 s. La sesión finaliza a los 100 ensayos (se incluyen las omisiones) o a los 90 min (lo que acontezca antes). Esta fase se va repitiendo en días sucesivos hasta que el animal obtiene al menos 60 refuerzos y presiona al menos 30 veces cada una de las dos palancas. El número de sesiones necesarias hasta adquirir el aprendizaje fue de entre 1 y 7.

Test: esta fase consiste en alternar ensayos de “elección forzada” con “elección libre” (implicando solo estos últimos una decisión). En los ensayos de “elección forzada”, el animal tiene acceso únicamente a una de las dos palancas, bien la inmediata, bien la demorada. En cambio, en los ensayos de “elección libre”, el animal debe escoger entre una de las dos. En las jaulas impares la izquierda es la demorada y en las pares es la derecha. La palanca inmediata proporciona siempre 1 *pellet*. La palanca demorada proporciona 4 *pellets* tras una demora variable a lo largo de varias sesiones. La estructura de una sesión es la siguiente: 5 bloques de 12 ensayos en cada bloque, de los cuales 6 ensayos son forzados (se administran en primer lugar) y 6 de elección (en segundo lugar). En el caso de los ensayos forzados, en la mitad se extiende la palanca demorada y en la otra mitad la inmediata (intercalados al azar). Por consiguiente, a lo largo de la sesión hay 15 ensayos forzados con palanca demorada, 15 ensayos con palanca inmediata y 30 ensayos de elección. Se estableció una duración máxima de la sesión de 90 min, finalizando antes cuando se llegaba a los 60 ensayos. Cada sesión se inicia con la luz del comedero y la *house-light* encendidas. Las dos palancas están retraídas. En un tiempo máximo de 10 s, el animal debe realizar un *nose-poke* en el comedero, se apaga la luz del comedero, se extiende una o dos palancas (en función de si es un ensayo forzado o libre) y se enciende la luz que hay encima de cada palanca. Cuando el animal aprieta una palanca se apaga la *house-light* y se retraen las palancas disponibles. Durante la demora no se enciende ninguna luz, lo que aumenta la dificultad de la tarea al no estar dicha

demora señalizada por ningún estímulo discriminativo. La luz del comedero se enciende en el momento que se deposita el refuerzo y permanece encendida hasta que se efectúa el *nose-poke* o hasta que se acaba el ensayo (10 s). Si el animal no realiza el *nose-poke* en el comedero o no aprieta la palanca (en 10 s), se considera omisión y finaliza el ensayo, entrando en ITI (que en esta fase dura 40 s). Durante el ITI no hay ninguna luz encendida.

Se realizaron 10 sesiones con demora 0 s, 3 sesiones con demora 10 s, 2 sesiones con demora 20 s, 2 sesiones con demora 40 s y de nuevo 3 sesiones con demora 0 s. Las sesiones que se consideraron representativas de cada fase fueron la última sesión con demora 0 s (10^a), la primera sesión de las demoras 10 s, 20 s y 40 s, y la última sesión con demora de 0 s (3^a).

Las principales variables que pueden extraerse de esta prueba son: (i) las sesiones necesarias para superar todas las fases, (ii) el total de *pellets* liberados (y consumidos), (iii) el tiempo de duración de las sesiones, (iv) el número de ensayos terminados en cada fase, (v) las latencias de respuesta y de decisión, (vi) el número de omisiones, y (vii) el porcentaje de preferencia por la palanca demorada (la de mayor refuerzo). Esta última es la variable que indica los niveles de impulsividad cognitiva, a más preferencia, menos impulsividad.

8.2- Rat Gambling Task.

La tarea del *gambling* se ha desarrollado para estudiar el proceso de la toma de decisiones durante situaciones que conllevan riesgo. En el presente trabajo, de entre los varios procedimientos de la tarea que se han desarrollado para ratas hemos utilizado el del laboratorio de Françoise Deltu-Hagedorn (Rivalan et al. 2009, 2013). Los animales deben escoger entre 4 agujeros y obtener el máximo número posible de *pellets* (BIO-SERV, Ref. #F0021, Dustless Precision Pellets®, 45 mg, Rodent Purified Diet). Se siguió el mismo protocolo de restricción de comida que en la tarea del descuento por demora (80 % de la ingesta de la línea base). Paralelamente, se controlaba el peso corporal y la comida proporcionada fue suficiente para conseguir una ganancia media de peso de 109 ± 3 g a lo largo de todo el procedimiento experimental.

La prueba se llevó a cabo en una sala iluminada solo por una lámpara tenue. Se utilizaron 4 jaulas operantes (25 x 25 x 25 cm) muy similares a las utilizadas durante la tarea de descuento por demora (Panlab S.L.U.). Las paredes laterales son de aluminio; en la pared izquierda está el acceso al comedero y al bebedero (lo que permite colocar una botella en las sesiones *overnight*) y una *house-light* de 4 cm de diámetro encima del comedero, el cual tiene un detector electromagnético. La pared derecha es curvada y tiene 5 agujeros de 2,4 cm de diámetro, cada uno de ellos con una luz interna. Los agujeros están situados a 2,8 cm por encima de la base y separados entre ellos por 2,5 cm. Si nos situamos enfrente de los agujeros, de izquierda a derecha éstos estarían numerados como H1 (A), H2 (B), H3 (bloqueado), H4 (C) y H5 (D). La pared posterior y la puerta frontal son de plexiglás transparente. El suelo es una rejilla de metal removible de 19 barras (3 mm diámetro, espaciadas 1 cm). Cada caja está aislada por otra caja (63,5 × 40 × 60,5 cm) de PVC insonorizada, dotada de un ventilador, una luz y una cámara de vídeo frontal. El programa utilizado controla la administración de los distintos estímulos y registra todos los datos (*Packwin 2.00.2*, Panlab S.L.U.). Entre tandas, las jaulas se limpiaron con una solución de agua y jabón. La tarea se divide en tres fases de pre-entrenamiento y en el Test propiamente dicho. Se efectuó también un Re-Test. Se comentan a continuación las características de cada fase.

Fase 1 del pre-entrenamiento: la duración de la fase es de 30 min o hasta que se cumpla el criterio, consistente en obtener 20 *pellets* y explorar los 4 agujeros una vez como mínimo. La introducción de la cabeza del animal en cualquiera de los agujeros supone la obtención de 1 *pellet* en el comedero. La sesión empieza con la *house-light* encendida y los cuatro agujeros iluminados al mismo tiempo. El sujeto debe escoger en qué agujero responder (FR1, hacer un *nose-poke*). Una vez realiza un *nose-poke*, el agujero dónde se ha efectuado la respuesta se mantiene iluminado hasta que el sujeto recoge el refuerzo del comedero. En cambio, el resto de los agujeros no se mantienen iluminados. Siempre se obtiene refuerzo cuando se realiza un solo *nose-poke*, a diferencia de lo que ocurre en otras fases. Cuando el sujeto se ha comido el *pellet* (o al menos introducido la cabeza en el comedero), los 4 agujeros se iluminan de nuevo. La sesión finaliza con todas las luces apagadas. En esta fase no hay castigo (*time-out*). El número de sesiones necesarias hasta adquirir el aprendizaje fue de entre 1 y 10. En ocasiones, los sujetos desarrollan fijación por alguno de los 4 agujeros. También es posible que no realicen nunca *nose-poke* en alguno de ellos. Cuando se observan estos patrones de respuesta, los sujetos deben realizar

una sesión *overnight* (o las que sean necesarias) en la cual solo está activado o inactivado el agujero problema. Esto sucedió en una minoría de los casos.

Fase 2 del pre-entrenamiento: la única diferencia con respecto a la fase 1 es que el entrenamiento es FR2, de tal manera que el sujeto solo obtiene refuerzo cuando efectúa un *nose-poke* dos veces consecutivas en el mismo agujero, no pudiendo ni hacer *nose-poke* en otro agujero ni ir al comedero entre cada *nose-poke*. Si el sujeto responde incorrectamente, ha de iniciar de nuevo el proceso para obtener refuerzo. El número de sesiones necesarias hasta adquirir el aprendizaje fue de entre 1 y 13.

Fase 3 del pre-entrenamiento: es parecida a la anterior y se sigue utilizando un programa de refuerzo FR2. La sesión dura 30 min y se divide en dos partes, ambas de 15 min. En la primera parte el refuerzo es siempre de 2 *pellets* (puede obtener un máximo de 40 *pellets*) y en la segunda parte de 1 *pellet* (puede obtener un máximo de 20 *pellets*). Siempre se obtiene refuerzo independientemente del agujero donde se realice la respuesta, si se cumple el mismo criterio de *nose-poke* consecutivo en el mismo agujero. Una vez superada la fase, se establece una semana de reposo hasta realizar la prueba. Durante esta semana se mantiene la restricción de comida. El número de sesiones necesarias hasta adquirir el aprendizaje fue de entre 1 y 5.

Test: la sesión dura 60 min o hasta que se hayan obtenido 250 *pellets*. Empieza la sesión con la *house-light* y las luces de los 4 agujeros encendidas. El animal debe escoger en qué agujero realizar los dos *nose-poke* consecutivos (FR2) para obtener el refuerzo. En el test, a diferencia de durante el pre-entrenamiento, puede aparecer un periodo de *time-out* (castigo) después del refuerzo y en función de la posición de los agujeros cambia la magnitud del refuerzo, el periodo de *time-out* y la probabilidad de que aparezca o no *time-out*. En la tabla 13 se indica el número de *pellets* y los segundos de *time-out* para cada agujero, así como el porcentaje de ensayos que conllevan castigo. Durante el *time-out*, las respuestas no se contabilizan y la luz del agujero dónde se ha realizado el *nose-poke* se mantiene encendida. El resto de las luces están apagadas. Cuando finaliza el *time-out*, todas las luces se mantienen apagadas durante 1 s adicional mientras se libera la recompensa correspondiente. Por consiguiente, no existe propiamente un período de ITI. Después se iluminan de nuevo los 4 agujeros y la *house-light*. Si el sujeto no va a recoger el *pellet* al comedero, no se inicia el siguiente ensayo. Al finalizar la sesión, todas las

luces se apagan. El beneficio máximo teórico para cada agujero es de 60 *pellets* para las opciones H1 y H2, y 300 *pellets* para las opciones H4 y H5. Por lo tanto, la estrategia más ventajosa sería escoger siempre los agujeros H4 y H5, los cuales van asociados a *time-out* más cortos.

Re-Test: tiene exactamente las mismas características que la prueba pero los sujetos tienen ya experiencia con los castigos y recompensas asociadas a cada uno de los agujeros. La razón de realizar una segunda exposición, una semana después de la primera, fue estudiar la posible estabilidad de los efectos.

Tabla 13. Resumen de las condiciones en que se realiza la sesión de TEST en la RGT.

| AGUJERO | PELLETS | | TIME-OUT | |
|---------|---------|---------|----------|---------|
| | NÚMERO | ENSAYOS | SEGUNDOS | ENSAYOS |
| H1 | 2 | 100 % | 222'' | 50% |
| H2 | 2 | 100 % | 444'' | 25% |
| H4 | 1 | 100 % | 12'' | 25% |
| H5 | 1 | 100 % | 6'' | 50% |

Se indica el número de pellets, los segundos de time-out para cada agujero y el porcentaje de ensayos que conllevan castigo. H: agujero.

Las medidas que suelen analizarse a lo largo de toda la duración de la tarea en sus distintas fases son: (i) los días para superar las fase de pre-entrenamiento, (ii) el tiempo de duración de las sesiones, (iii) el número de refuerzos obtenidos por agujero, (iv) el número de respuestas válidas en cada agujero, así como el de respuestas totales, (v) el número de ensayos completados, (vi) las respuestas perseverantes y (vii) las latencias para la primera respuesta y para ingerir los refuerzos. El número de respuestas válidas para cada agujero durante las sesiones del test y el re-test son los indicadores de una toma de decisiones inadecuada, considerando como tal el realizar más respuestas en los agujeros H1 y H2, asociados a un menor beneficio teórico global. El número de respuestas perseverantes se asocia a la conducta compulsiva.

8.3- Five Choice-Serial-Reaction-Time Task.

Este tipo de tarea se desarrolló inicialmente para estudiar los procesos atencionales, la impulsividad motora y la compulsión en diversas poblaciones humanas y en roedores (Bari et al. 2008; Fuentes et al. 2014). La versión para roedores consiste en entrenar el animal para detectar un pequeño haz de luz que aparece transitoriamente dentro de uno de los agujeros entre los 5 presentes y realizar un *nose-poke* en el agujero previamente iluminado para obtener una recompensa (1 *pellet* por respuesta correcta). Para realizar correctamente la tarea, el sujeto debe prestar mucha atención a la localización horizontal de cada uno de los 5 agujeros e inhibir su respuesta motora hasta que aparezca la luz en uno de los agujeros. La atención se mide mediante la relación entre las respuestas correctas y el total de respuestas (correctas más incorrectas, excluyendo omisiones), a lo que se denomina *accuracy*. La falta de motivación y/o la dificultad para mantener la atención sostenida pueden favorecer las omisiones (falta de respuesta). Asimismo, la latencia para ingerir el refuerzo también es un buen indicador de motivación. La impulsividad motora se mide a través de las respuestas prematuras, es decir, las que se dan antes de que aparezca la luz (anticipadas). Las respuestas durante el *time-out* son también una medida de control inhibitorio. La compulsión se mide a través de las respuestas perseverantes (repetitivas en un mismo agujero tras haber sido ya reforzadas).

Se siguió el mismo procedimiento de restricción de comida que en el resto de las tareas, aunque la restricción fue mayor, al 60% de la línea base, al ser la tarea más compleja. No obstante, todos los sujetos mostraron un aumento continuo del peso a lo largo de las sesiones (ganancia media de 116 ± 9 g). La tarea se llevó a cabo en una sala iluminada solo por una lámpara tenue. Se utilizaron dos jaulas operantes de 5 agujeros (Ref. MED-NP5M-D1, Med-Associates Inc., Albans VT, EEUU). Las jaulas ($31,8 \times 25,4 \times 34,3$ cm) tienen las dos paredes laterales de aluminio, la pared posterior y la puerta de plexiglás transparente y el techo también transparente. Una de las paredes laterales está curvada y contiene los 5 agujeros (2,5 cm de diámetro, 2,4 cm de profundidad) colocados a 6 cm de la base y a 33 cm del comedero, situado en la pared de enfrente. Cada agujero tiene una luz en el interior (LED, 6,4 mm diámetro) y un detector de infrarrojos (a 1 cm de la apertura) para los *nose-poke*. La pared lateral opuesta es plana y está equipada con un comedero con detector de infrarrojos, conectado a un dispensador de *pellets*. El suelo es de rejilla de metal no electrificada y justo debajo se coloca una base de metal removible.

La *house-light* está a 30 cm encima del comedero. Cada caja está aislada por otra caja de PVC insonorizada ($63,5 \times 40 \times 60,5$ cm) con un ventilador que mantiene un ruido de fondo de 60 db, y una cámara cenital. Las jaulas operantes están controladas por el programa de *Med-Associates IV*. Entre tandas, las jaulas se limpiaron con una solución de agua con jabón.

Antes de empezar propiamente las sesiones se realizaron una o dos habituaciones consecutivas al aparato (15 min cada una). Se colocaban varios *pellets* en el comedero y uno dentro de cada agujero. El criterio para superar la habituación fue que el animal debía explorar todos los agujeros y el comedero. Posteriormente, las sesiones duraban 90 - 100 ensayos (en función de la fase) o 30 min (lo que se consiguiera primero). Se iniciaba la sesión con el encendido de la *house-light* y la luz del comedero. Se administraba 1 *pellet* no contingente, apagándose la luz del comedero cuando el sujeto lo recogía. A continuación, se administraba un corto estímulo luminoso en uno de los 5 agujeros. Cuando el animal realizaba un *nose-poke* en el agujero correcto (aquél en el que previamente se había encendido la luz), recibía una recompensa (siempre 1 *pellet*) en el comedero, en el cual se había encendido la luz. Cuando el animal recogía el refuerzo, se apagaba la luz del comedero y se iniciaba un nuevo ensayo. Existe un ITI que marca el intervalo entre ensayos, el cual puede cambiar a lo largo de las distintas fases de la prueba.

Si el animal realizaba una respuesta considerada como incorrecta, prematura, o bien hacía una omisión, no recibía refuerzo y se entraba en *time-out* durante 5 s. En este período de tiempo se apagaba la *house-light*. Si se realizaban respuestas de *nose-poke* en los agujeros durante el *time-out*, se reiniciaba el tiempo de 5 s. Cuando se acababa el *time-out*, empezaba otro ensayo y se iluminaban de nuevo la *house-light* y la luz del comedero. A lo largo de las sesiones, las condiciones iban siendo más exigentes y la realización de la tarea se complicaba, requiriendo altos niveles de atención y de control inhibitorio: la duración del estímulo (haz de luz) disminuía, el ITI aumentaba (y podía ser aún más variable) y el tiempo que se le daba al animal entre la aparición de la luz en el agujero y la realización de la respuesta (*limited hold*, LH) también disminuía. El tiempo entre la obtención del refuerzo y su recogida no se restringía, pero no se iniciaba un nuevo ensayo hasta que no se recogía el *pellet*. El número de veces que se presentaba la luz en cada agujero determinado (en orden aleatorio) fue la misma en una sesión. Las fases y los criterios para pasar de una a otra fase se encuentran en la figura 8. Debido a la dificultad de la tarea se decidió que los animales fueran entrenados solo hasta una duración del

estímulo de 1 s y un *limited-hold* (LH) de 5 s. Posteriormente, los animales permanecieron en estas condiciones pero aumentando el ITI de 5 a 7 s. Tras estabilizarse la respuesta a lo largo de varios días, el ITI se aumentó de nuevo a 9 s. El objetivo del aumento del ITI fue potenciar la aparición de respuestas impulsivas, ya que los ITI largos están asociados a más respuestas prematuras (Harrison et al. 1997; Chudasama et al. 2003; Dalley et al. 2004). La duración total de esta sesión con ITI 9 s fue de 45 min.

| Training stage | Stimulus duration (s) | ITI (s) | LH (s) | Criterion to move to next stage |
|----------------|-----------------------|-------------|--------|--|
| 1 | 30 | 2 | 30 | ≥ 30 Correct trials |
| 2 | 20 | 2 | 20 | ≥ 30 Correct trials |
| 3 | 10 | 5 | 10 | ≥ 50 Correct trials |
| 4 | 5 | 5 | 5 | ≥ 50 Correct trials > 80% Accuracy |
| 5 | 2.5 | 5 | 5 | ≥ 50 Correct trials > 80% Accuracy < 20% Omissions |
| 6 | 1.25 | 5 | 5 | ≥ 50 Correct trials > 80% Accuracy < 20% Omissions |
| 7 | 1 | 5 7 9 | 5 | ≥ 50 Correct trials > 80% Accuracy < 20% Omissions |

Figura 8. Características de las 7 fases y criterios para superar cada una de las fases en la tarea del 5CSRT. La fase 7 tiene una duración del estímulo de 1 s, el tiempo de respuesta es de 5 s (*limited hole*, LH) y el tiempo entre ensayos (ITI) es de 5 s. El ITI se alargó a 7 s, y luego a 9 as (Adaptado de Bari et al. 2008).

Las variables que se analizan clásicamente son: (i) número de días en cada fase, (ii) número de ensayos superados, (iii) número de respuestas correctas, incorrectas y omisiones, (iv) *accuracy*, (v) latencia para realizar una respuesta correcta o incorrecta, (vi) latencia de recogida del refuerzo, (vii) número de respuestas perseverantes y prematuras, y (viii) número de respuestas durante los *time-out*. Las respuestas perseverantes, prematuras y durante los *time-out* se asocian a la conducta impulsiva y compulsiva.

9- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se realizó mediante el programa *SPSS* (Statistical Program for Social Science, 2015. IBM SPSS Statistics para Windows, versión 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.). El factor entre-sujetos fue el GRUPO, con 3 niveles: CONTROL (naïve), MASTER y YOKED. Cuando fue necesario se introdujo un factor intra-sujeto que varió en función de la variable dependiente.

En algunos casos, el factor GRUPO se estudió utilizando el ANOVA de un factor y, si se incorporaban medidas repetidas, el modelo lineal general (GLM). Sin embargo, en otros casos se utilizó el modelo lineal generalizado (para uno o más factores, GENLIN) (McCulloch y Searle, 2001) y cuando se incorporaban medidas repetidas el modelo de ecuaciones estructurales generalizadas (GEE) (Hardin y Hilbe, 2003). Las pruebas generalizadas (GENLIN y GEE) pueden realizarse cuando no se obtiene homogeneidad de varianzas, incluso después de hacer una transformación logarítmica (\log_{10}), y también cuando se han perdido algunos datos (*missings*). La significación de los efectos estadísticos encontrados mediante el ANOVA se determinó mediante la prueba F de Fisher, mientras que para los modelos generalizados (GENLIN y GEE) se determinó mediante la prueba de chi-cuadrado de Wald (X^2) usando el método de estimación de la casi-verosimilitud restringida. En el caso de encontrar interacciones significativas se realizó la descomposición por pares pertinente. En todos los casos se realizaron contrastes *a posteriori* comparando todos los grupos entre sí mediante la corrección de Bonferroni secuencial. Los datos sobre la maduración sexual se analizaron mediante el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier, mientras que las correlaciones entre variables se analizaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson (r , dos colas). En todos los casos, el criterio de significación se estableció en $p \leq 0.05$, aunque las tendencias a la significación entre $p > 0.05$ y $p < 0.06$ también se mencionaron. Los gráficos se realizaron mediante el programa *Graph-Pad Prism* (versión 5 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, California, EEUU).

Resultados

CAPÍTULO 0. EFECTOS DEL ESTRÉS DURANTE LA ADOLESCENCIA.

Planteamiento y objetivos.

En los últimos años, se ha prestado atención al impacto de las situaciones estresantes durante la adolescencia utilizando diversos modelos de estrés en animales de laboratorio (ver apartado 5 de la introducción). Por otra parte, gracias al uso del diseño de la tríada en el que solo hay posibilidad de escape, se ha descrito un efecto inmunizante de la exposición al estrés controlable, aunque prácticamente todos los estudios se han llevado a cabo en sujetos adultos (v.g. Seligman y Maier 1967; Amat et al. 2006; Maier 2015). Recientemente, la tarea de evitación activa en dos sentidos (TWAA) ha sido utilizada para el estudio del aprendizaje aversivo y la controlabilidad de estímulos estresantes (Lucas et al. 2014; Hadad-Ophir et al. 2016, 2017). Los únicos trabajos en que se ha descrito el efecto del estrés controlable en la adolescencia son los de Kubala et al. (2012) y Leussis et al. (2012) y los resultados indican que esta etapa es sensible a la dimensión de controlabilidad. En la presente tesis se utiliza la TWAA durante la adolescencia para manipular la controlabilidad y evaluar su impacto. En este capítulo 0 se resume la conducta de los animales durante la exposición a la tarea de evitación activa en la etapa adolescente, analizando el conjunto de experimentos. Se muestran tanto los efectos conductuales como fisiológicos de la exposición crónica a la tarea (grupo MASTER) y su correspondiente grupo YOKED.

Diseño experimental.

Se utilizaron un total de 292 animales: 92 del grupo CONTROL, 100 del grupo MASTER y 100 del grupo YOKED. Todos los sujetos fueron expuestos a 6 - 8 sesiones no consecutivas (50 ensayos por sesión) de estrés desde PND 33 a PND 57 (promedio \pm 1).

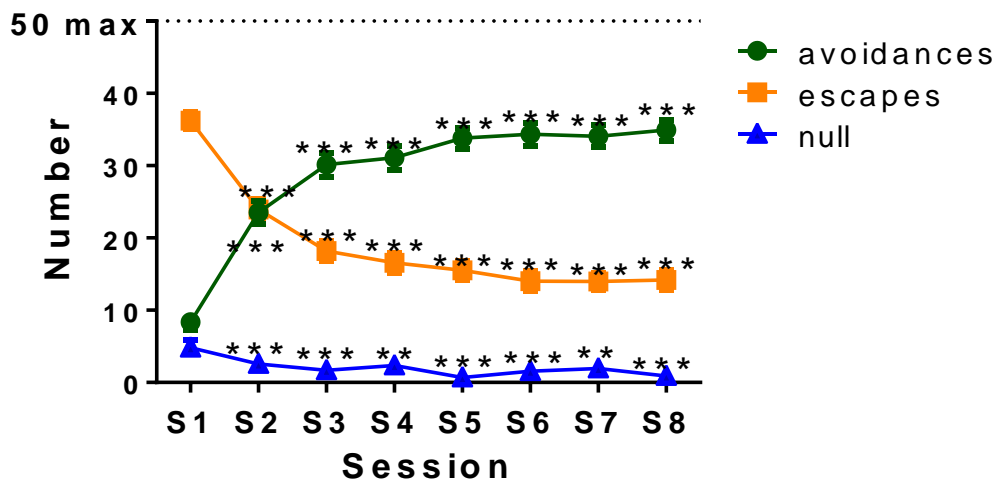
Resultados.

En el primer experimento, se eliminaron 2 sujetos del grupo MASTER debido a problemas técnicos durante la tarea TWAA. La exposición a la tarea se realizó en 6 sesiones no consecutivas (CONTROL n = 12; MASTER n = 18; YOKED n = 20). Para abarcar todo el período adolescente e intentar obtener efectos más robustos, las sesiones se aumentaron a 8 en las siguientes cohortes experimentales. Debido a que el efecto COHORTE no fue estadísticamente significativo, se muestra el análisis y la curva de aprendizaje de todos los sujetos MASTER expuestos a 8 sesiones de la tarea TWAA. Del total de estos sujetos, se han eliminado de la estadística 16 (6 CONTROL, 8 MASTER y 2 YOKED) debido a problemas diversos durante las distintas tareas (v.g. exceso de respuestas nulas en la TWAA, sujetos que no superan las fases de pre-entrenamiento, *outliers* o fallecimiento por causas naturales). La muestra final fue de 224 sujetos: CONTROL n = 74, MASTER n= 72 y YOKED n = 78.

1- Tarea de evitación activa en dos sentidos (TWAA).

1.1- Curva de aprendizaje y latencia de respuesta.

La figura 9 representa las respuestas de evitación, escape y nulas durante las 8 sesiones de estrés no consecutivas en el grupo MASTER. Se realizó un análisis general de medidas repetidas (GLM) de 1 factor: SESIÓN. Los datos mostraron un efecto de la SESIÓN en el número de evitaciones [$F(7, 497) = 123$ $p < 0,001$; contraste polinomial lineal $F(1, 71) = 249$ $p < 0,001$ y cuadrático $F(1, 71) = 154$ $p < 0,001$] y de escapes [$F(7, 497) = 72,5$ $p < 0,001$; contraste polinomial lineal $F(1, 71) = 147$ $p < 0,001$ y cuadrático $F(1, 71) = 87,2$ $p < 0,001$]. Las respuestas nulas se mantuvieron a un nivel muy bajo, pero hubo efecto de la SESIÓN [$F(7, 497) = 5,8$ $p < 0,001$; contraste polinomial lineal $F(1, 71) = 10,9$ $p < 0,001$ y cuadrático $F(1, 71) = 8,1$ $p < 0,01$], debido a una ligera disminución de las respuestas a lo largo de las sesiones. Los datos demuestran que los sujetos incrementaban el número de evitaciones sobre todo a partir de la S3, con un promedio de 35 evitaciones en la última sesión (S8). En consonancia, el número de escapes fue disminuyendo a partir de la S3 hasta alcanzar un promedio de 14 escapes en la S8.



*Figura 9. Curva de aprendizaje en la tarea de evitación activa en dos sentidos durante la adolescencia. Para cada una de las sesiones se grafican el número de evitaciones, escapes y respuestas nulas de los sujetos del grupo MASTER (n = 72). Se representa las medias \pm SEM. *** $p \leq 0,001$ vs S1.*

El tiempo durante el cual recibieron choques a lo largo de las sesiones (figura 10) se analizó con un GLM de un factor (SESIÓN). El análisis mostró un efecto de la SESIÓN [F (7, 497) = 26,5 $p < 0,001$; contraste polinomial lineal F (1, 71) = 58,5 $p < 0,001$ y cuadrático F (1, 71) = 46,2 $p < 0,001$]. Durante la S1, los sujetos recibieron más tiempo de choque que en las otras sesiones, dato en consonancia con el aumento de las evitaciones a lo largo de las sesiones. Evidentemente cada pareja de MASTER y YOKED recibió el mismo número y tiempo de choques.

En la figura 10 se muestra la duración de cada sesión. El análisis GLM de 1 factor mostró un efecto de la SESIÓN [F (7, 497) = 47,01 $p < 0,001$; contraste polinomial lineal F (1, 71) = 105 $p < 0,001$ y cuadrático F (1, 71) = 86,3 $p < 0,001$]. La S1 fue la de más duración, ya que casi todos los sujetos recibían todos los estímulos (tono, luz y choque eléctrico) en la mayoría de los ensayos.

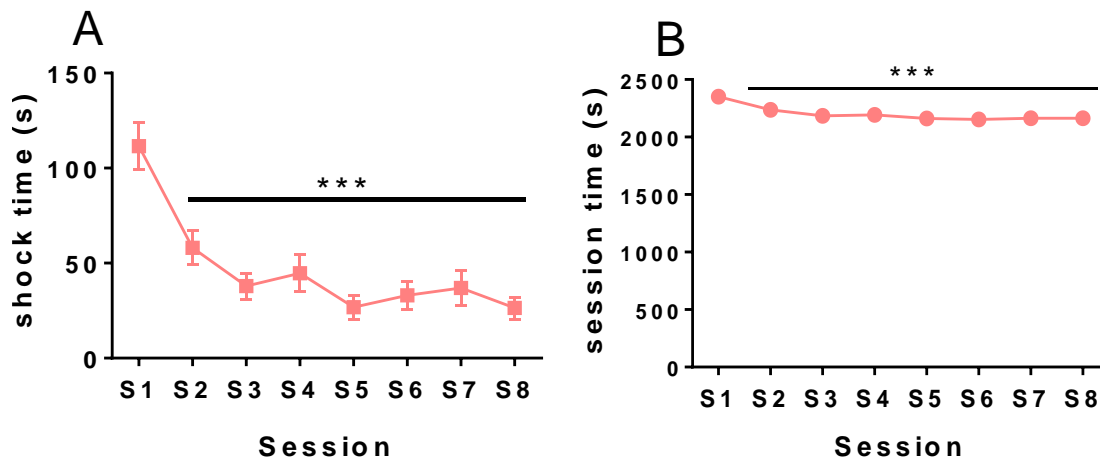


Figura 10. Tiempo de choque y duración media de las sesiones en la tarea de evitación activa en dos sentidos durante la adolescencia. Para cada una de las sesiones, en (A) el sumatorio del tiempo de choque y en (B) el tiempo de sesión del grupo MASTER ($n = 72$). Se representa las medias \pm SEM. *** $p \leq 0,001$ vs S1.

La latencia de respuesta (Figura 11) se refiere al tiempo desde que se presenta el CS hasta que el animal salta al otro compartimento (con independencia de que realice una evitación o una huida), y se analizó con un GLM de 1 factor (SESIÓN). Se observó un efecto del factor SESIÓN [F (7, 497) = 63,9 $p < 0,001$; contraste polinomial lineal F (1, 71) = 116 $p < 0,001$ y cuadrático F (1, 71) = 139 $p < 0,001$]. Los sujetos mostraron una disminución de las latencias de respuesta. También se contabilizaron las latencias de evitación y de escape, pero sólo cuando los sujetos realizaban dichas respuestas, y no se observaron diferencias significativas entre las sesiones (datos no mostrados).

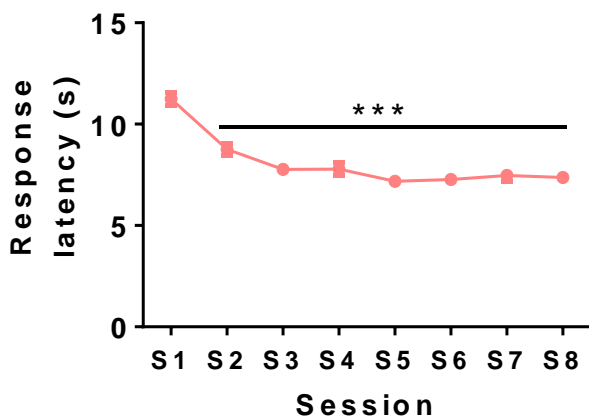


Figura 11. Latencia de respuesta durante las sesiones de evitación activa en dos sentidos durante la adolescencia. Se representa solo para el grupo MASTER ($n = 70 - 72$). Se representa las medias \pm SEM. *** $p \leq 0,001$ vs S1.

1.2- Conducta durante la fase de habituación pre-sesión en la caja lanzadera.

Durante los 5 primeros minutos de habituación a la caja lanzadera en las sesiones 1, 2 y 8 (Figura 12A) se registraron, en los dos grupos experimentales expuestos a choques MASTER y YOKED, tres posibles medidas de miedo: *freezing*, *rearings* y cruzamientos entre compartimentos.

En la S1 el nivel de *freezing* fue imperceptible, ya que los sujetos aún no habían experimentado choques, y los datos de S1 no se incluyen en el análisis. Se estudió el *freezing* en las sesiones 2 y 8 mediante un GEE de 2 factores. Se observó un efecto de la SESIÓN [$X^2(1) = 7,3$ $p < 0,01$], pero no del GRUPO ni de la interacción GRUPO x SESIÓN, siendo el nivel de *freezing* mayor en la última sesión para ambos grupos (S8). En el grupo CONTROL el *freezing* fue imperceptible.

El número de *rearings* también se analizó durante los 5 primeros min de las sesiones 1, 2 y 8 (Figura 12B). El análisis GEE mostró un efecto de la SESIÓN [$X^2(2) = 374$ $p < 0,001$], pero no del GRUPO ni de la interacción GRUPO x SESIÓN. En la S1 el número de *rearings* fue mayor con respecto a las S2 y S8.

Por otra parte, el análisis GEE de los cruzamientos durante los 5 min de la habituación, en este caso en todas las sesiones (Figura 12C), mostró un efecto del GRUPO [$X^2(1) = 5,3$ $p < 0,05$] y de la SESIÓN [$X^2(7) = 623$ $p < 0,001$], pero no de la interacción GRUPO x SESIÓN. Las comparaciones por pares mostraron que los niveles de actividad en la primera exposición (S1) fueron similares en ambos grupos, observándose a partir de la S2 una disminución de los cruzamientos en los dos grupos que recibieron choques. No obstante, éstos fueron inferiores en el grupo YOKED que en el MASTER.

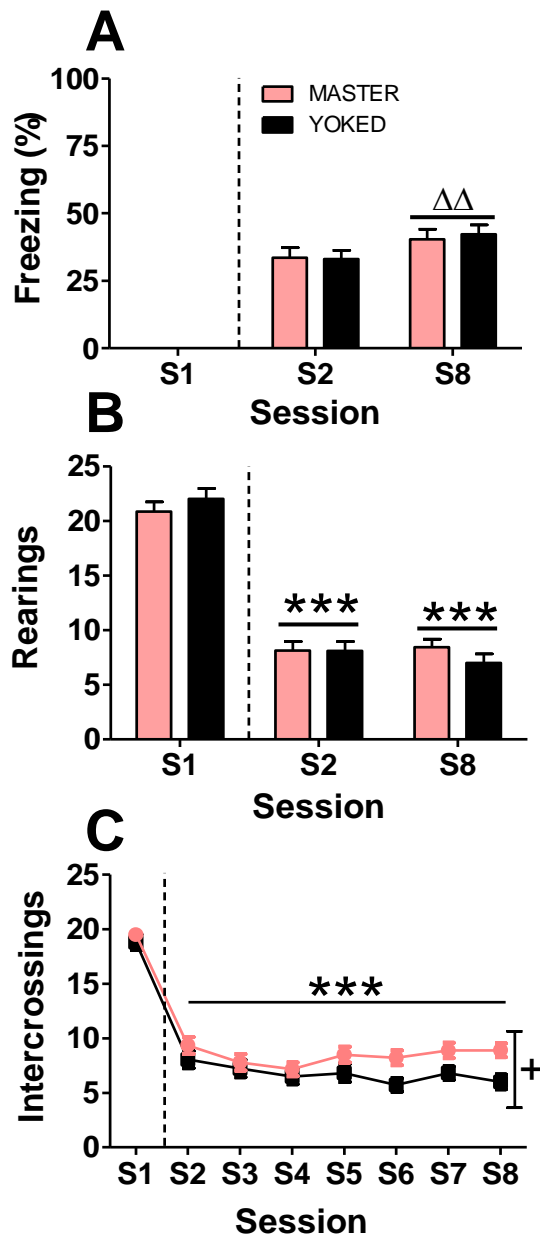


Figura 12. Conducta durante los 5 minutos de habituación en la tarea de evitación activa en dos sentidos. Se grafica (A) el tiempo de freezing, (B) el número de rearings, y (C) el número de cruzamientos. Se representa las medias \pm SEM. Grupos: MASTER ($n = 72$) y YOKED ($n = 78$). No hay datos disponibles del grupo CONTROL para ninguna de las variables. Cuando los símbolos están sobre las barras horizontales, el efecto es independiente del grupo. *** $p \leq 0,001$ vs S1; $\Delta\Delta$ $p < 0,01$ vs S2; + $p \leq 0,05$ vs MASTER.

El número de cruzamientos (Figura 13) durante los tiempos entre ensayos se analizó en todas las sesiones, por razones técnicas solo en el grupo MASTER. El análisis GEE reveló efecto de la SESIÓN [$X^2(2) = 66,4$ $p < 0,001$], de tal manera que los animales realizaban cada vez más cruzamientos a medida que iban avanzando las sesiones (en todas las sesiones de S2 a S8, $p < 0,001$ vs S1).

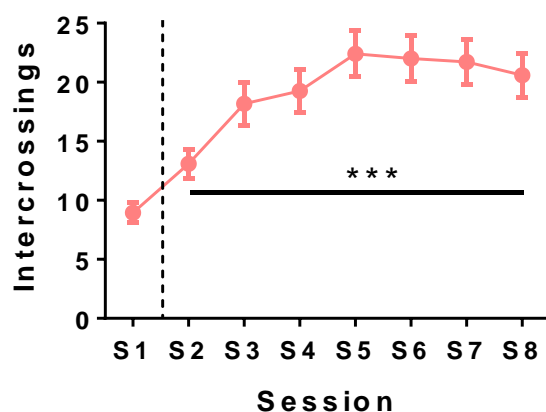


Figura 13. Cruzamientos durante el tiempo entre ensayos en la tarea de evitación activa en dos sentidos durante la adolescencia. Sólo se contabilizaron para los sujetos del grupo MASTER ($n = 72$). Se representa las medias \pm SEM. *** $p \leq 0,001$ vs S1.

Puesto que los sujetos MASTER a medida que avanzaban las sesiones, realizaban un mayor número de evitaciones y también de cruzamientos, se calculó una correlación de Pearson entre el número de cruzamientos entre ensayos y el número de evitaciones en todas las sesiones, observándose una correlación positiva significativa a partir de la S3 en todos los casos (datos no mostrados).

2- Efectos fisiológicos del estrés repetido.

El estudio de los efectos hormonales durante la exposición a la TWAA se llevó a cabo en los experimentos 3 (descuento por demora), 4 (*gambling*) y 5 (5CSRTT), en todos los cuales los sujetos fueron expuestos a 8 sesiones. Las variables analizadas fueron la respuesta hormonal (ACTH y corticosterona) durante las sesiones 1 y 8, así como los efectos sobre el peso y la ingesta. La muestra global para este análisis fue de: CONTROL ($n = 29$), MASTER ($n = 29$) y YOKED ($n = 30$).

2.1- Respuesta hormonal durante la tarea de evitación activa.

Los datos hormonales se grafican en la figura 14. Los niveles basales (día -1 experimental) se analizaron mediante ANOVA de 1 factor (GRUPO). No se observaron diferencias significativas entre los grupos en los niveles basales de ACTH o de corticosterona, como era de esperar puesto que son previos al tratamiento. Los datos hormonales de la respuesta a la tarea fueron analizados mediante un GEE de 3 factores: GRUPO, SESIÓN y TIEMPO. En la ACTH se observó efecto del GRUPO [$X^2(2) = 452$ $p < 0,05$], del TIEMPO [$X^2(1) = 708$ $p < 0,05$], de la SESIÓN [$X^2(1) = 345$ $p < 0,05$] y de las interacciones GRUPO x TIEMPO [$X^2(2) = 654$ $p < 0,05$], GRUPO x SESIÓN [$X^2(2) = 222$ $p < 0,05$], SESIÓN x TIEMPO [$X^2(2) = 289$ $p < 0,05$] y GRUPO x SESIÓN x TIEMPO [$X^2(2) = 249$ $p < 0,05$]. La posterior descomposición de las interacciones indicó que todos los grupos expuestos a estrés mostraron en ambas sesiones un aumento de los niveles de ACTH respecto a los niveles basales en la toma de muestra inmediatamente posterior a la tarea (POST-SHUTTLE), así como una recuperación casi total de los niveles basales a los 45 min de su finalización (R45). Ambos grupos MASTER y YOKED fueron distintos estadísticamente del grupo CONTROL ($p < 0,001$ vs POST-SHUTTLE y R45). Durante la S8, los niveles hormonales de todos los grupos fueron menores en comparación con la S1, debido a la adaptación al ambiente en el caso del grupo CONTROL y al menor número de choques recibidos por el aumento de las evitaciones en los grupos MASTER y YOKED. Más importante aún, en la S8 (pero no en la S1) se observaron diferencias debidas a la controlabilidad entre los sujetos MASTER y YOKED en los dos tiempos (POST-SHUTTLE, $p < 0,01$; R45, $p < 0,05$), siendo la respuesta menor en los MASTER. Estos datos demuestran que las diferencias debidas a la controlabilidad van surgiendo con la experiencia repetida de control o no control sobre el choque.

En el GEE de la corticosterona se observó un efecto del GRUPO [$X^2(2) = 291$ $p < 0,05$], del TIEMPO [$X^2(1) = 602$ $p < 0,05$], de la SESIÓN [$X^2(1) = 191$ $p < 0,05$], y de las interacciones GRUPO x TIEMPO [$X^2(2) = 428$ $p < 0,05$], SESIÓN x TIEMPO [$X^2(1) = 29$ $p < 0,05$], GRUPO x SESIÓN [$X^2(2) = 51$ $p < 0,05$] y GRUPO x SESIÓN x TIEMPO [$X^2(2) = 11$ $p < 0,05$]. La descomposición de la interacción triple mostró que en la S1 los dos grupos expuestos a choques tenían niveles altos (pero similares entre sí) de corticosterona respecto al grupo CONTROL, tanto en la toma de muestra posterior a la exposición a la tarea (POST-SHUTTLE) como en R45. En la S8, los niveles hormonales de todos los grupos fueron menores en comparación con la S1. Asimismo, se observó una

tendencia a la significación estadística en la diferencia entre los sujetos MASTER y YOKED en la toma de muestra POST-SHUTTLE ($p=0,053$) pero no en R45. Los datos de corticosterona apoyan que las diferencias debidas a la controlabilidad aparecen con el desarrollo de la experiencia de control. En ambos análisis, de forma adicional, el tiempo de choque recibido durante la sesión se utilizó como covariable, no observándose diferencias importantes en los resultados obtenidos respecto a cuándo no se introducía como covariable.

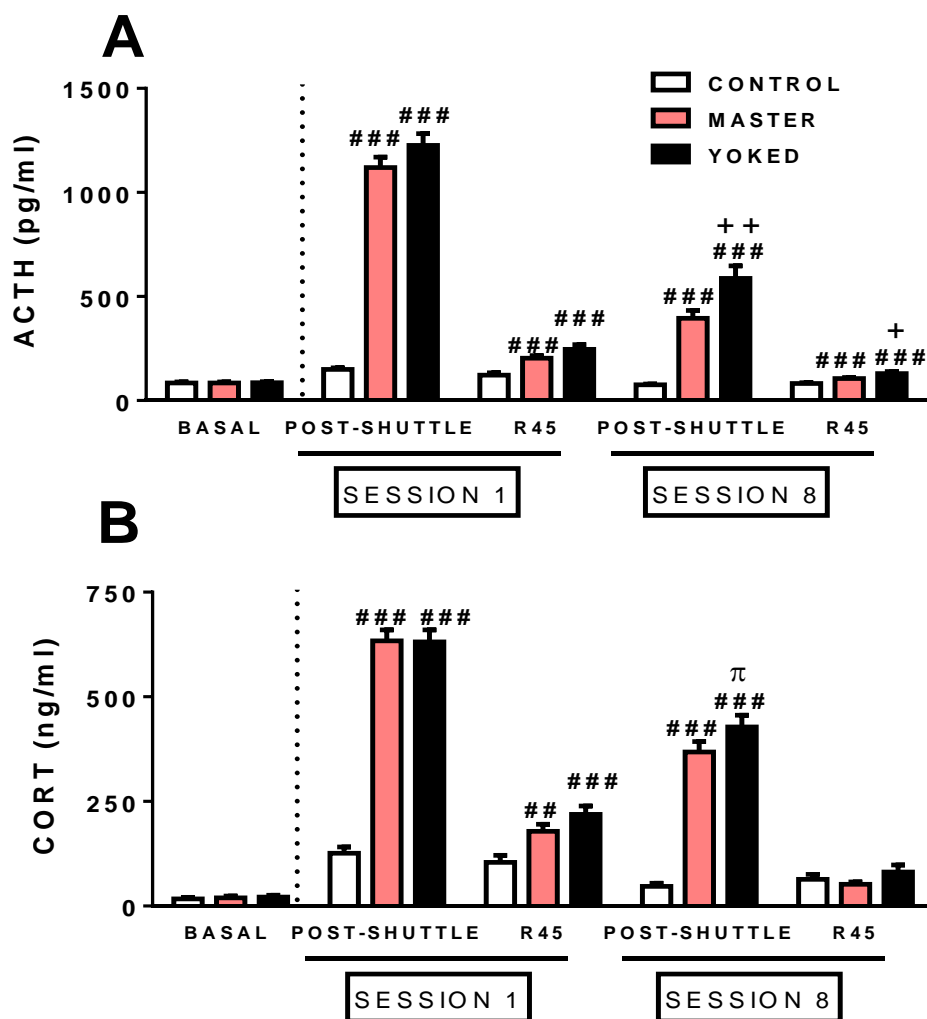


Figura 14. Respuesta hormonal a la exposición repetida a la tarea de evitación activa en dos sentidos durante la adolescencia. En el panel (A) se muestran los niveles de ACTH. En el panel (B) la respuesta de corticosterona. Se representa las medias \pm SEM. Grupo CONTROL ($n = 29$), MASTER ($n = 29$) y YOKED ($n = 30$). ### $p \leq 0,001$ vs CONTROL; + $p \leq 0,05$, ++ $p \leq 0,01$; π tendencia ($p=0,053$) vs MASTER.

La respuesta hormonal en las sesiones S1 y S8 correlacionó, mediante el coeficiente de Pearson, con el tiempo total de choque. Los niveles de ACTH inmediatamente después de terminar la S8 correlacionaron con el tiempo total de choque recibido en las ratas YOKED [$r(28) = +0,51, p < 0,01$], pero no en las MASTER [$r(27) = +0,36, NS$]. Los niveles de corticosterona no correlacionaron en ningún caso con el tiempo de choque.

2.2- Efectos sobre el incremento de peso y la ingesta.

Los cambios en el peso y la ingesta durante el procedimiento de estrés se analizaron por separado mediante un GEE de dos factores (GRUPO y DÍA) para cada cohorte, no observándose diferencias globales importantes entre los grupos. En la figura 15 se muestran los datos representativos de ganancia de peso e ingesta en el experimento de *gambling*.

El GEE de la ganancia de peso mostró un efecto del DÍA [$X^2(4) = 8198 p < 0,05$], pero no del factor GRUPO ni de la interacción GRUPO x DÍA, observándose un aumento progresivo del peso a medida que los sujetos iban creciendo. El análisis de la ingesta mostró también efecto del factor DÍA [$F(5, 300) = 644 p < 0,05$] pero no del factor GRUPO o de la interacción GRUPO x DÍA. En conclusión, no se observaron diferencias debidas a la exposición al estrés en estas variables, lo que indica que la intensidad del estrés no fue muy elevada.

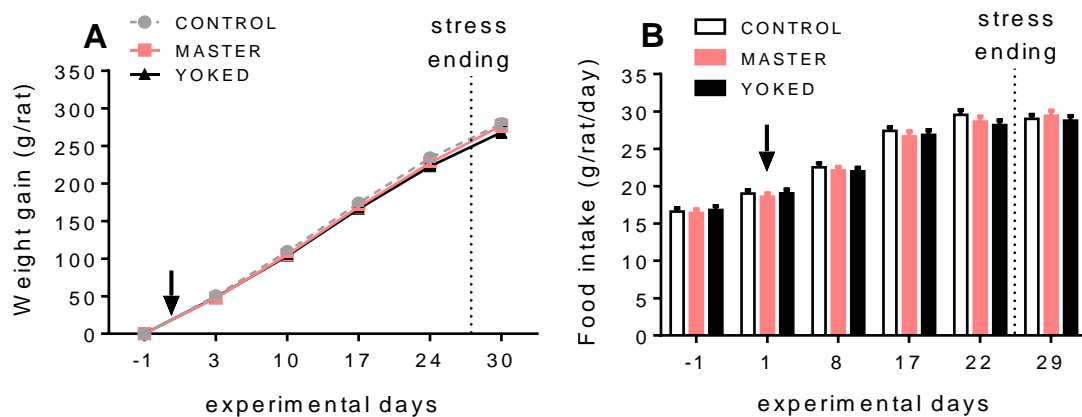


Figura 15. Datos representativos del incremento de peso e ingesta de comida durante la exposición a estrés en la adolescencia. En el panel (A) se muestra la ganancia de peso; en el (B) los datos de ingesta se obtienen por caja de estabulación (2 sujetos) y no de manera individual. La flecha en negrita (\downarrow) indica el inicio del estrés adolescente. La línea discontinua vertical marca el final del periodo de estrés. Se representa las medias \pm SEM. Grupo CONTROL ($n = 26$), MASTER ($n = 25$) y YOKED ($n = 29$). No se observaron diferencias entre los grupos.

Conclusión general.

Los sujetos MASTER adolescentes fueron capaces de adquirir la tarea de evitación activa en dos sentidos, valorada mediante la curva de aprendizaje y la latencia de respuesta. La controlabilidad sobre el estrés no ejerció un efecto diferencial respecto a la adquisición del miedo al contexto (caja lanzadera) valorado mediante el *freezing*, pero sí en los índices de actividad motora (cruzamientos), siendo menor en el grupo YOKED.

La respuesta de ACTH dependía de la experiencia repetida de estrés, observándose además una mayor y más prolongada respuesta en los sujetos YOKED en comparación con los MASTER en la S8. A nivel fisiológico, la exposición al estrés no afectó al incremento de peso ni a la ingesta de alimento.

CAPÍTULO 1. EFECTOS CONDUCTUALES Y FISIOLÓGICOS A CORTO PLAZO DEL ESTRÉS EN LA ADOLESCENCIA.

Planteamiento y objetivos.

Una vez estandarizada la tarea en ratas adolescentes, se valoraron los efectos a corto plazo de dicho modelo de estrés. Los objetivos de este primer experimento fueron: (i) valorar los efectos fisiológicos a corto plazo de la exposición repetida a estrés adolescente, (ii) estudiar los efectos conductuales a corto plazo, y (iii) comprobar si la exposición a estrés controlable tenía efectos diferenciados respecto al estrés incontrolable. Como ya se ha comentado, se espera un mayor impacto negativo conductual y fisiológico del estrés incontrolable en pruebas de ansiedad, exploración, y de afrontamiento ante situaciones estresantes.

Diseño experimental.

En este experimento se utilizaron un total de 52 animales: 12 del grupo CONTROL, 20 del grupo MASTER y 20 del grupo YOKED. Todos los sujetos fueron expuestos a 6 sesiones no consecutivas de estrés desde los días PND 32 y PND 52 (promedio ± 1). Se realizó una toma de muestra en condiciones basales 2 días antes de iniciar la última sesión (entre la S5 y la S6) para valorar el posible efecto del estrés adolescente sobre la actividad basal del eje HPA. Al finalizar el periodo de estrés, todos los sujetos fueron expuestos a una batería de pruebas para estudiar los efectos conductuales a corto plazo: (i) el laberinto elevado en cruz (EPM), (ii) la plancha de agujeros (HB) y (iii) la prueba de natación forzada (FST), 24 h, 48 h y 5 días después de la última sesión de TWAA, respectivamente. Entre 4 y 5 días después de la última prueba conductual, todos los sujetos fueron perfundidos en condiciones basales para la extracción del encéfalo, el timo y las adrenales. En la tabla 14 se muestra un resumen del diseño experimental.

Tabla 14. Grupos experimentales y diseño del capítulo 1.

| GRUPO | N | PND 28-36 a 48-56 | PND 49-57 | PND 50-58 | PND 51-59 | PND 57-65 |
|---------|----|--------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| CONTROL | 12 | EXPOSICIÓN A LA CAJA LANZADERA | EPM | HB | FST | PERFUSIÓN |
| MASTER | 20 | ESTRÉS CONTROLABLE | EPM | HB | FST | PERFUSIÓN |
| SLAVE | 20 | ESTRÉS INCONTROLABLE | EPM | HB | FST | PERFUSIÓN |

De los días 1 a 21 experimentales, se llevó a cabo la exposición a estrés (TWAA). Los días 22, 23 y 25 experimentales, los sujetos se expusieron al laberinto elevado en cruz (EPM, 5 min), a la plancha de agujeros (HB, 5 min) y al test de la natación forzada (FST, 20 min), respectivamente. Se realizó una toma de muestra previa y después del FST. El día 31, se sacrificaron mediante perfusión intracardiaca. Obsérvese que en la tabla se indica la edad de los animales, no el día experimental.

Resultados.

En el primer experimento se eliminaron 2 sujetos del grupo MASTER debido a problemas técnicos durante la tarea de TWAA. La exposición a la tarea se realizó en 6 sesiones no consecutivas. La muestra final fue CONTROL $n = 12$, MASTER $n = 18$, YOKED $n = 20$.

1- Efectos sobre el tamaño de las adrenales y el timo.

Los animales se perfundieron 10 días después de la última sesión de estrés (S6). Los datos del peso relativo de las adrenales y el timo se muestran en la figura 16. El ANOVA de 1 factor (GRUPO) no mostró diferencias debidas al tratamiento de estrés.

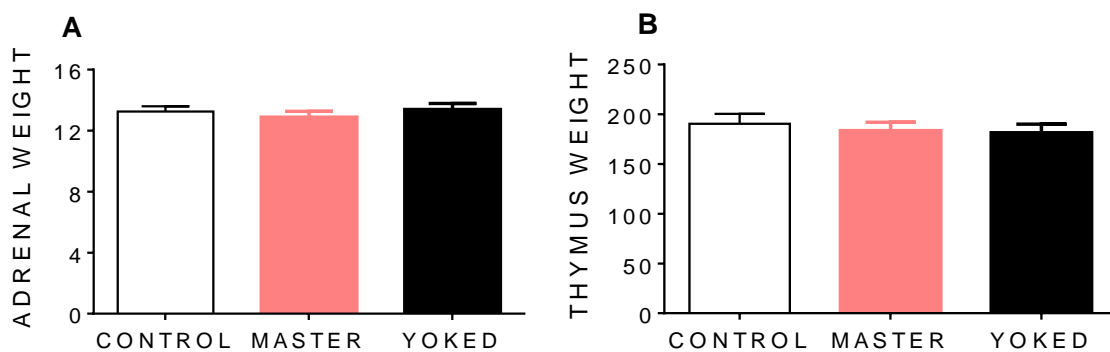


Figura 16. Impacto fisiológico del estrés adolescente valorado a corto plazo. En el panel (A) el peso relativo de las adrenales. En el panel (B) el peso relativo del timo. Se representa las medias \pm SEM. Grupos CONTROL ($n = 12$), MASTER ($n = 18$) y YOKED ($n = 20$). No se observaron diferencias entre los grupos.

2- Conducta a corto plazo.

2.1- Laberinto elevado en cruz (EPM).

En la figura 17 se muestran los datos conductuales en el EPM, valorado un día después de la última sesión (S6). El ANOVA de 1 factor (GRUPO) no mostró diferencias debido al tratamiento de estrés en ninguno de los índices clásicos de ansiedad, tiempo y entradas en brazos abiertos, ni en la actividad motora (valorado de manera indirecta con el total de entradas a los brazos).

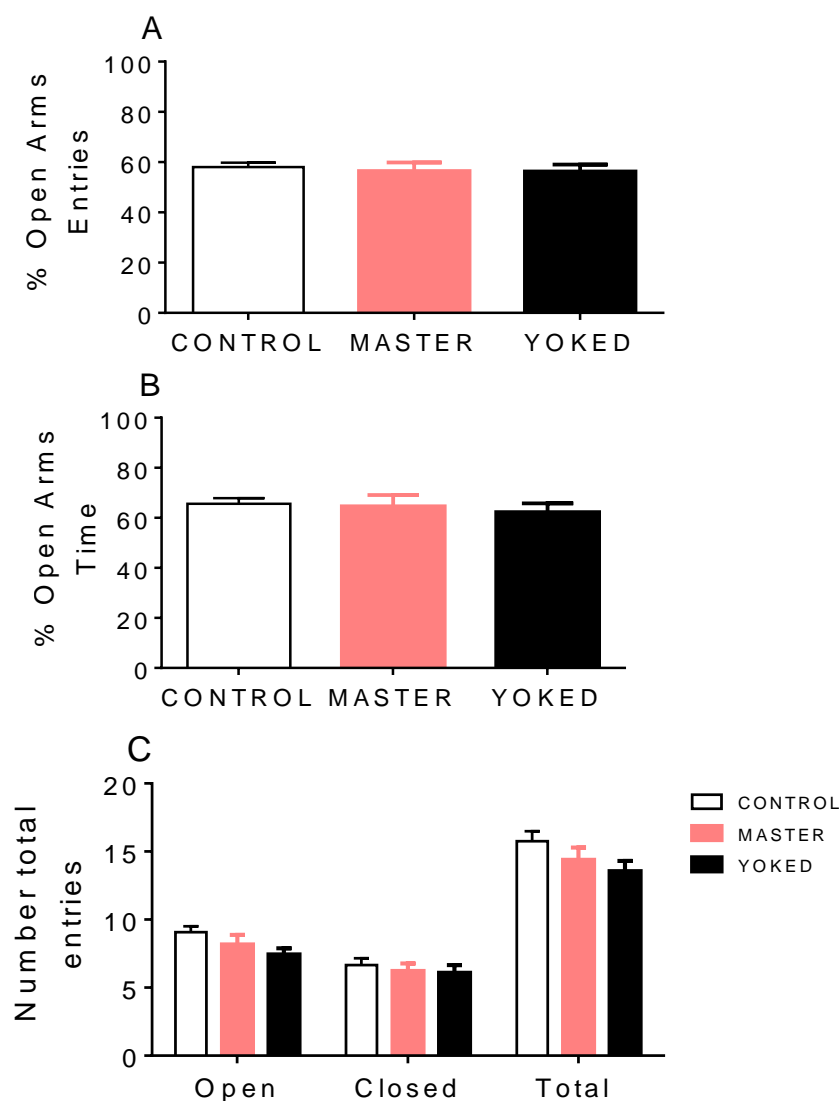


Figura 17. Impacto del estrés adolescente sobre la conducta en el laberinto elevado en cruz. En (A) el porcentaje de entradas en los brazos abiertos respecto a las entradas totales. En (B) el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos (excluyendo el tiempo en el centro). En (C) el número total de entradas. Se representa las medias \pm SEM. Grupos CONTROL ($n = 12$), MASTER ($n = 18$) y YOKED ($n = 20$). No se observaron diferencias entre los grupos.

2.2- Plancha de agujeros (HB).

En la figura 18 se muestran los datos conductuales en el HB, valorado dos días después de la última sesión (S6). El análisis lineal generalizado (GENLIN) de 1 factor mostró un efecto significativo del factor GRUPO en las siguientes variables: deambulaciones totales [$X^2(2) = 6,4$ $p < 0,05$], *rearings* externos [$X^2(2) = 9$ $p < 0,05$], *rearings* internos [$X^2(2) = 6,5$ $p < 0,05$] y *rearings* totales [$X^2(2) = 10,06$ $p < 0,05$].

Las comparaciones por pares revelaron hipoactividad de los sujetos YOKED versus los CONTROL ($p < 0,05$), mientras que no existían diferencias entre los MASTER y los CONTROL. Se observó una tendencia a la significación ($p = 0,056$) entre los sujetos MASTER y YOKED, siendo la hipoactividad mayor en estos últimos. Sin embargo, en los *rearings* los dos grupos estresados diferían del CONTROL en el mismo grado: *rearings* externos ($p < 0,01$ vs YOKED; $p < 0,01$ vs MASTER), internos ($p < 0,05$ vs YOKED; $p < 0,05$ vs MASTER) y totales ($p < 0,01$ vs YOKED; $p < 0,01$ vs MASTER). Finalmente, el análisis de los *head-dips*, como medida de exploración, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

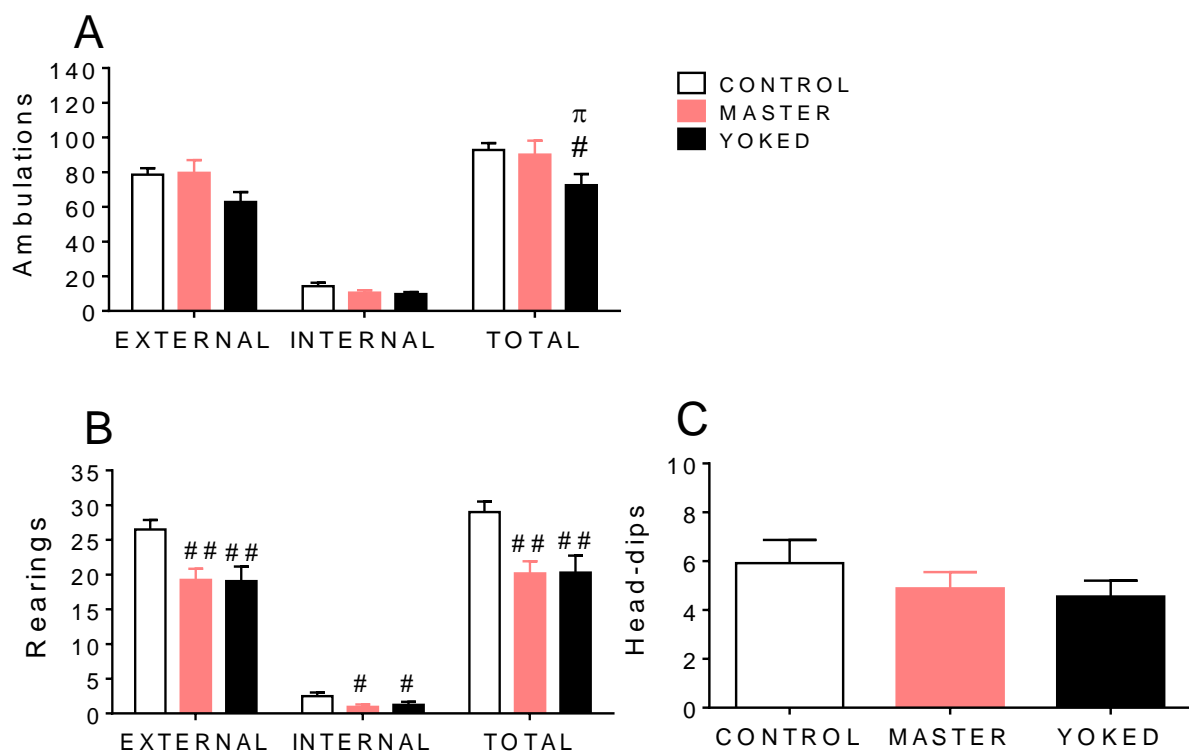


Figura 18. Impacto del estrés adolescente sobre la conducta en la plancha de agujeros. En el panel (A) el número de deambulaciones en la zona exterior, zona interior y totales. En (B) el número de rearings en la zona exterior, zona interior y totales. En (C) el número de head-dips. Se representa las medias \pm SEM. Grupos CONTROL ($n = 12$), MASTER ($n = 18$) y YOKED ($n = 20$). ## $p \leq 0,01$, # $p \leq 0,05$ vs CONTROL; π tendencia ($p = 0,056$) vs MASTER.

2.3- Prueba de la natación forzada (FST).

En la figura 19 se muestran los datos del FST valorado a las 72 h posteriores a la última sesión de estrés (S6), en tres intervalos de tiempo. El análisis GEE de 2 factores (GRUPO e INTERVALO) mostró un efecto significativo del factor INTERVALO para las variables escape [$X^2(2) = 323$ $p < 0,05$], inmovilidad [$X^2(2) = 353$ $p < 0,05$] y natación suave [$X^2(2) = 25,7$ $p < 0,05$]. En ningún caso se observó un efecto significativo del factor GRUPO o de la interacción GRUPO x INTERVALO. Las comparaciones por pares del factor INTERVALO revelaron diferencias entre los distintos bloques de tiempo (no se indican en los gráficos), observándose una reducción de las conductas activas, más evidente en el escape que en la natación suave, y un aumento de la inmovilidad, en el segundo y tercer intervalo.

En cambio, el GENLIN de 1 factor para la latencia de inmovilidad reveló diferencias estadísticamente significativas entre los GRUPOS [$X^2(2) = 6,5$ $p < 0,05$]. Los sujetos MASTER mostraron una mayor latencia hasta realizar el primer episodio de inmovilidad en comparación con los CONTROL ($p < 0,05$) y los YOKED ($p < 0,05$). Estos datos sugerirían una conducta de afrontamiento más activa durante el primer bloque de tiempo en los sujetos MASTER.

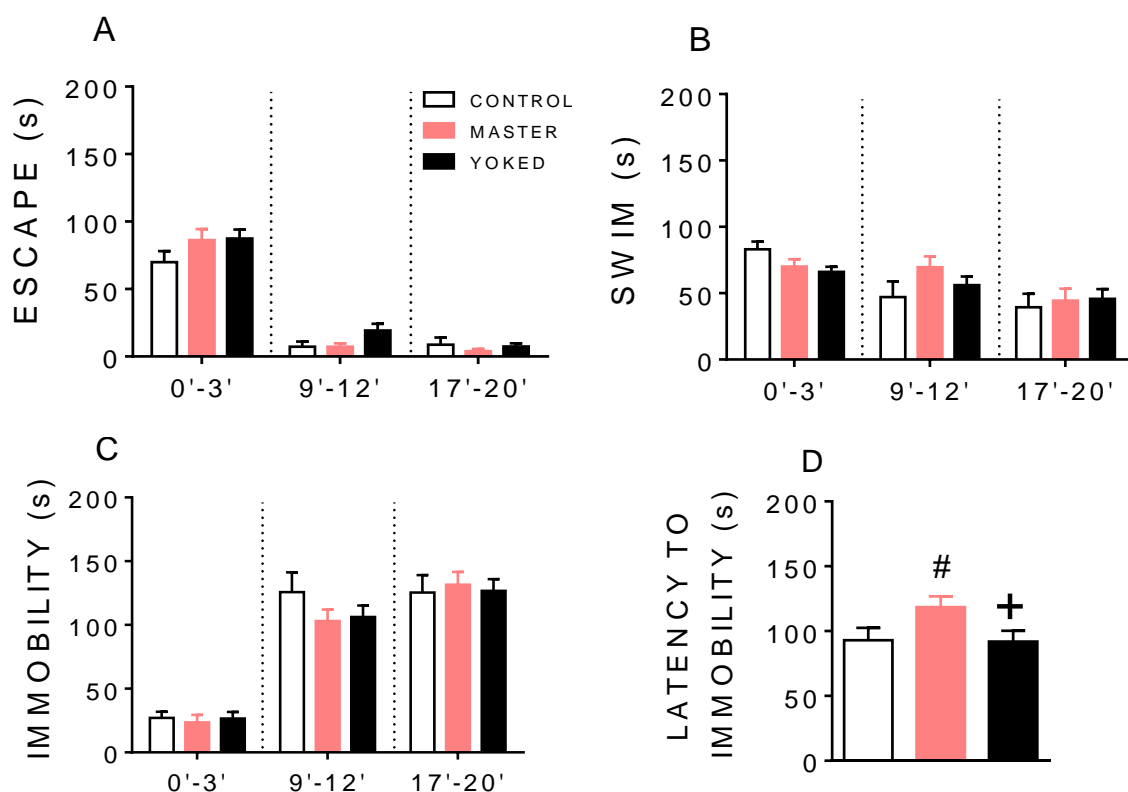


Figura 19. Impacto del estrés adolescente sobre la conducta en la prueba de natación forzada. En el panel (A) el tiempo realizando conducta de escape. En (B) el tiempo de inmovilidad. En (C) el tiempo de natación suave. En (D) la latencia hasta realizar el primer episodio de inmovilidad mayor de 3 segundos. Se representa las medias \pm SEM. Grupos CONTROL ($n = 12$), MASTER ($n = 18$) y YOKED ($n = 20$). $\#p \leq 0,05$ vs CONTROL; $+p \leq 0,05$ vs MASTER.

3- Respuesta hormonal: ACTH y corticosterona.

Los datos hormonales de la respuesta a la natación forzada fueron analizados mediante un GLM de 2 factores (GRUPO y TIEMPO). En la ACTH (Figura 20A) se observó un efecto del GRUPO [$F(2,47) = 4,8$ $p < 0,05$], del TIEMPO [$F(1,47) = 3134$ $p < 0,05$] y de la interacción de ambos factores [$F(2,47) = 6,5$ $p < 0,05$]. La descomposición de la interacción mostró que la exposición al estrés (FST) incrementó los niveles de ACTH en todos los grupos en comparación con los niveles pre-estrés ($p < 0,001$ todas las comparaciones). Más importante, se observaron, tras el estrés, niveles más elevados de ACTH en los grupos MASTER y YOKED que en el grupo CONTROL ($p < 0,01$ y $p < 0,001$ respectivamente). En cambio no se observaron diferencias entre MASTER y YOKED.

Respecto a la corticosterona (Figura 20B) se observó efecto del TIEMPO [F (1,47) = 799 $p < 0,05$] y de la interacción GRUPO x TIEMPO [F (2,47) = 4,5 $p < 0,05$]. El factor GRUPO no fue significativo. La descomposición de la interacción mostró una disminución de los niveles hormonales basales (PRE-FST) en el grupo YOKED en comparación con los CONTROL ($p < 0,05$). La exposición al estrés (FST) incrementó los niveles de corticosterona en todos los grupos ($p < 0,001$) y se observaron tras el estrés niveles aún más elevados en los YOKED que en el grupo CONTROL ($p < 0,01$). Las diferencias entre los grupos MASTER y YOKED o entre el grupo CONTROL y MASTER no fueron estadísticamente significativas.

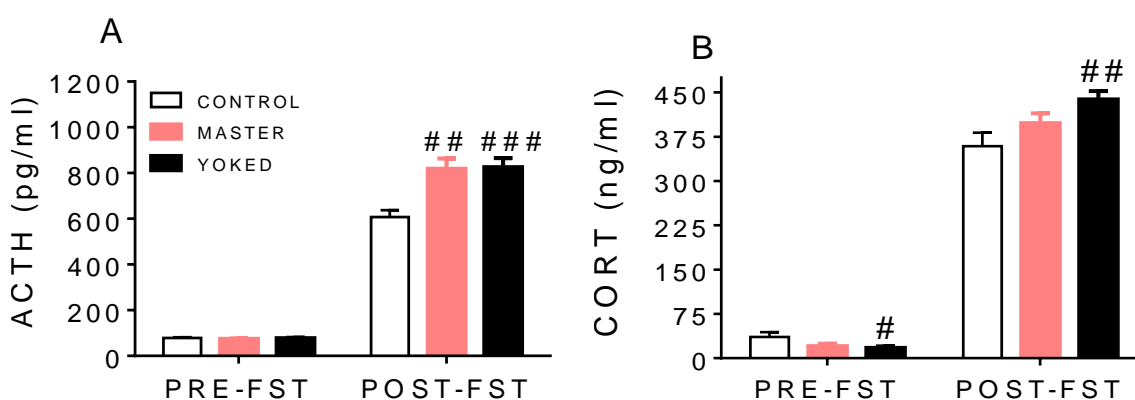


Figura 20. Niveles basales y en respuesta a la prueba de natación forzada. En el panel (A) la respuesta de ACTH. En el panel (B) la corticosterona. Se representa las medias \pm SEM. Grupos: CONTROL ($n=12$), MASTER ($n=18$) y YOKED ($n=20$). ### $p \leq 0,001$; ## $p \leq 0,01$; # $p \leq 0,05$ vs CONTROL. No se ha graficado la significación correspondiente al efecto TIEMPO.

Conclusión general.

Nuestro modelo de exposición repetida a estrés en la etapa adolescente puede considerarse como un estrés crónico solo moderado, ya que los índices clásicos de intensidad (peso relativo de las adrenales y el timo) no se vieron afectados respecto al grupo CONTROL.

Los efectos a corto plazo afectaron específicamente a la actividad locomotora, observándose hipoactividad en la plancha de agujeros en los grupos expuestos a estrés. El efecto sobre la hipoactividad fue mayor en el grupo YOKED que en el MASTER. No

se observaron efectos del estrés en las medias clásicas de ansiedad (EPM). En el FST, la latencia hasta realizar el primer episodio en inmovilidad, indicativo de una conducta proactiva, fue mayor en los sujetos MASTER.

Finalmente, el eje HPA mostró sensibilización ante un estímulo heterotípico (FST) que parece afectar, con algún matiz diferencial respecto a la corticosterona, a los grupos MASTER y YOKED.

CAPÍTULO 2. (I) EFECTOS CONDUCTUALES Y FISIOLÓGICOS A LARGO PLAZO. (II) EFECTOS DEL CAMBIO DE CONTROLABILIDAD DEL ESTRÉS DURANTE LA ETAPA ADULTA.

Planteamiento y objetivos.

En el capítulo 1 se han descrito los efectos a corto plazo de nuestro modelo de estrés. No obstante, la exposición a estrés durante este período de edad podría tener efectos mucho más duraderos (McCormick et al. 2008; Avital et al. 2006; Tsoory et al. 2006; Toledo-Rodríguez et al. 2007; Brydges et al. 2012; Suo et al. 2013; Cordero et al. 2013). Existen tres posibilidades a nivel teórico: que ciertos efectos se mantengan en el tiempo, que se desvanezcan, o bien que aparezcan tras un período de “incubación” y se manifiesten a largo plazo ciertas conductas que no eran evidentes poco después de la exposición al estrés. El único trabajo que ha investigado los efectos diferenciales del estrés controlable versus el incontrolable en la etapa adolescente (MASTER vs YOKED) demostró, utilizando el modelo clásico del choque en la cola y una tarea posterior de escape, un aumento de la interacción social en los sujetos MASTER, en comparación con los control, mientras que el procedimiento YOKED no tuvo efecto ansiogénico. Por otra parte, como ya se ha comentado, se observó que el estrés controlable en la etapa adolescente protegía de los efectos negativos de una nueva exposición a estrés incontrolable en términos de exploración social en la etapa adulta (Kubala et al. 2012).

Por consiguiente, una vez valorados los efectos a corto plazo, se plantearon varios experimentos para valorar los efectos a largo plazo tras 8 sesiones no consecutivas de la tarea de TWAA. En concreto, los objetivos de este experimento fueron a largo plazo (i) valorar los efectos fisiológicos y conductuales relacionados con ansiedad e interacción social, (ii) estudiar el afrontamiento ante una reexposición a estrés, y (iii) analizar el posible establecimiento de memoria contextual de miedo remota. Se espera que los animales expuestos a estrés incontrolable manifiesten más ansiedad en ambientes nuevos, menos interacción social, estrategias de afrontamiento pasivas ante situaciones controlables y una memoria de miedo potenciada.

Diseño experimental.

Se utilizaron un total de 90 animales: 30 CONTROL, 30 MASTER y 30 YOKED. Los MASTER fueron expuestos a 8 sesiones no consecutivas de estrés entre PND 34 a PND 60 (promedio ± 1). En la etapa adulta, en el PND 93-95, se subdividieron de forma contrabalanceda todos los animales en dos grandes cohortes de 46 y 44 sujetos. Cada subgrupo realizó solo una de las dos pruebas conductuales siguientes: (i) el EPM o (ii) la prueba de interacción social. Datos previos no publicados de nuestro laboratorio sugieren que dichos estímulos son de intensidad muy baja, insuficiente para generar efectos a largo plazo.

Posteriormente, aproximadamente en el PND 120 se realizaron dos tomas de muestra basal a todos los animales, una por la mañana y otra por la tarde. Finalmente, entre el PND 123 y 128, todos los sujetos fueron expuestos a una única sesión en la TWAA. El objetivo era valorar cómo la experiencia previa de estrés y controlabilidad afectaba la ejecución de una tarea de TWAA en la etapa adulta. Para llevar a cabo este objetivo, cada grupo de animales CONTROL, MASTER y YOKED se dividió en 3 subgrupos de CONTROL, MASTER y YOKED (ver Tabla 15 para más detalle).

Dos días después de la sesión en el TWAA, los sujetos fueron expuestos al test de emergencia para valorar la exploración y el miedo en un ambiente nuevo que contiene un recinto “seguro” para el sujeto. Cinco días después, fueron re-expuestos al mismo contexto donde se realizó la TWAA, pero sin estímulos explícitos (ni choque eléctrico ni tono ni luz) con el objetivo de valorar el posible mantenimiento del miedo condicionado al contexto.

Tabla 15. Grupos experimentales y diseño del capítulo 2.

| GRUPO | PND 33-35 a 59-61 | PND 93-95 a 94-96 | PND 120-122 | N | PND 123-125 a 126-128 | PND 125-127 a 128-130 | PND 130-132 a 133-135 |
|-----------------|-----------------------------------|----------------------|----------------|----|-----------------------------------|--------------------------|---|
| CONTROL N=30 | EXPOSICIÓN A LA CAJA LANZADERA | EPM | TM BASAL | 10 | EXPOSICIÓN A LA CAJA LANZADERA | TEST DE EMERGENCIA | RE-EXPOSICIÓN A LA CAJA LANZADERA |
| | | PIS | | 10 | ESTRÉS CONTROLABLE | TEST DE EMERGENCIA | RE-EXPOSICIÓN A LA CAJA LANZADERA |
| | | | | 10 | ESTRÉS INCONTROLABLE | TEST DE EMERGENCIA | RE-EXPOSICIÓN A LA CAJA LANZADERA |
| MASTER N=30 | ESTRÉS CONTROLABLE | EPM | | 10 | EXPOSICIÓN A LA CAJA LANZADERA | TEST DE EMERGENCIA | RE-EXPOSICIÓN A LA CAJA LANZADERA |
| | | PIS | | 10 | ESTRÉS CONTROLABLE | TEST DE EMERGENCIA | RE-EXPOSICIÓN A LA CAJA LANZADERA |
| | | | | 10 | ESTRÉS INCONTROLABLE | TEST DE EMERGENCIA | RE-EXPOSICIÓN A LA CAJA LANZADERA |
| SLAVE N=30 | ESTRÉS INCONTROLABLE | EPM | | 10 | EXPOSICIÓN A LA CAJA LANZADERA | TEST DE EMERGENCIA | RE-EXPOSICIÓN A LA CAJA LANZADERA |
| | | PIS | | 10 | ESTRÉS CONTROLABLE | TEST DE EMERGENCIA | RE-EXPOSICIÓN A LA CAJA LANZADERA |
| | | | | 10 | ESTRÉS INCONTROLABLE | TEST DE EMERGENCIA | RE-EXPOSICIÓN A LA CAJA LANZADERA |

En los días 1 a 27 experimentales, se llevó a cabo la exposición a estrés adolescente (TWAA). En los días 61 a 63 experimentales se realizaron las pruebas del laberinto elevado en cruz (EPM, 5 min) e interacción social (PIS, 15 min). En los días 91 a 101 experimentales se expusieron a una sesión de TWAA adulta, y a las 48 h al test de emergencia (5 min). Finalmente, una re-exposición al contexto (10 min) tuvo lugar en los días 101 a 103 experimentales. Obsérvese que en la tabla se indica la edad de los animales, no el día experimental.

Resultados.

En este estudio se eliminaron 3 sujetos del grupo MASTER debido a problemas durante la realización de la tarea TWAA. La muestra final fue CONTROL n = 30, MASTER n = 27 y YOKED n = 30.

1- Efectos conductuales a largo plazo sobre la ansiedad y la actividad.

1.1- Laberinto elevado en cruz.

A los 30 días de la finalización del estrés adolescente, se realizó el EPM a la mitad de los sujetos. Todas las variables conductuales se analizaron mediante un GENLIN de 1 factor (GRUPO) (Figura 21). El análisis mostró efecto del GRUPO para la variable de entradas en brazos cerrados [$X^2(2) = 15$ $p < 0,05$], índice de actividad motora inespecífica, y porcentaje de tiempo en brazos abiertos [$X^2(2) = 6$ $p < 0,05$], índice este último clásico de efectos ansiolíticos. Las comparaciones por pares mostraron diferencias significativas entre los grupos CONTROL vs MASTER ($p < 0,001$) y MASTER vs YOKED ($p < 0,05$) siendo los MASTER los que menor número de entradas en los brazos cerrados mostraron. Por otra parte, los MASTER también mostraron un mayor porcentaje de tiempo en los brazos abiertos en comparación con los CONTROL ($p < 0,01$). Los grupos CONTROL y YOKED no difirieron en ninguna de las variables analizadas.

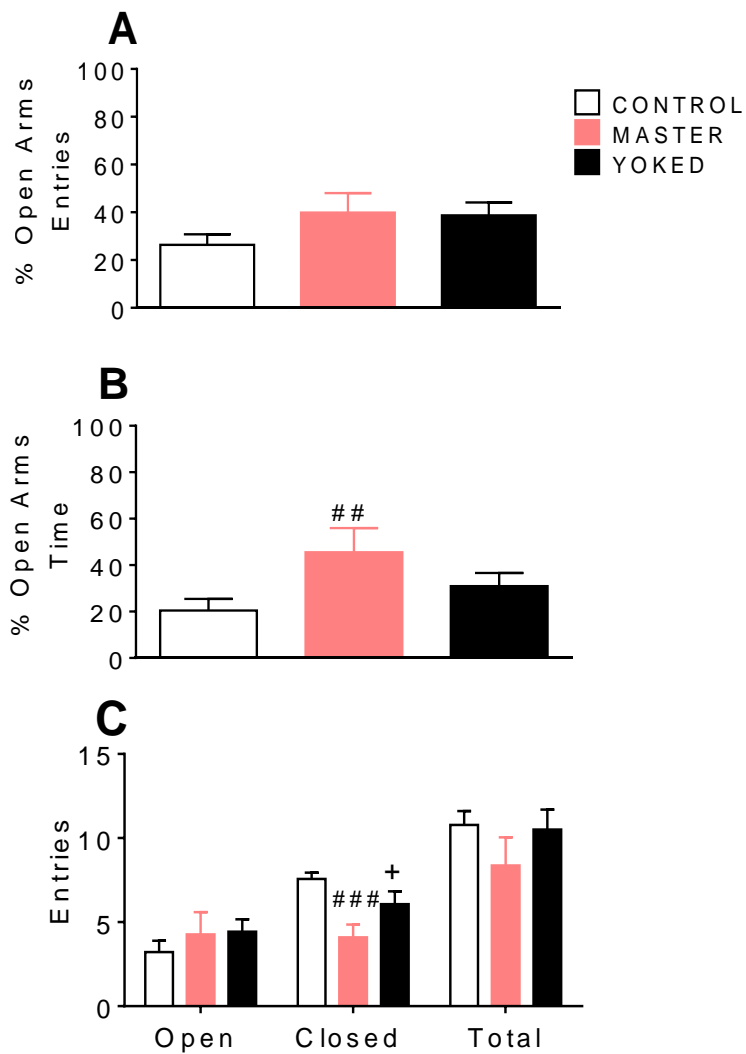


Figura 21. Efectos a largo plazo del estrés adolescente en el laberinto elevado en cruz. En el panel (A) el porcentaje de entradas en brazos abiertos, en (B) el porcentaje de tiempo en brazos abiertos y en (C) el número de entradas en los dos tipos de brazos y en total. Se representa las medias \pm SEM. Grupos CONTROL ($n = 14$), MASTER ($n = 11$) y YOKED ($n = 14$). #### $p \leq 0,001$, ## $p \leq 0,01$ vs CONTROL; + $p < 0,05$ vs MASTER.

1.2- Prueba de interacción social.

A los 30 días de la finalización del estrés adolescente, se realizó la prueba de IS a la mitad restante de los sujetos (aquellos no expuestos al EPM). La conducta en el test de interacción social (Figura 22) se analizó mediante un GENLIN de 1 factor (GRUPO). No se observó ningún efecto del GRUPO en la variable de conducta social “activa” pero sí en la variable de conducta “pasiva” [$X^2(2) = 10,6$ $p < 0,05$]. La descomposición del factor GRUPO mostró dos patrones conductuales distintos, ya que los sujetos YOKED permanecieron más tiempo realizando conducta social de tipo pasiva en comparación con los sujetos CONTROL y MASTER ($p < 0,01$ en ambos casos). Estos dos últimos grupos no difirieron ni en la conducta de tipo social ni en la no social. No obstante, se realizó a continuación un análisis más pormenorizado de las distintas pautas de interacción social activa. Como resultado, en la conducta de “seguimiento” (*following*) se observó un efecto del factor GRUPO [$X^2(2) = 10,8$ $p < 0,05$], encontrándose una disminución de esta pauta de conducta social activa en los sujetos YOKED respecto a los otros dos grupos, CONTROL ($p < 0,05$) y MASTER ($p < 0,001$). La distancia recorrida se evaluó para cada sujeto de la pareja individualmente y el GENLIN de 1 factor mostró un efecto estadísticamente significativo del GRUPO [$X^2(2) = 19$ $p < 0,05$]. La comparación por pares mostró hipoactividad en los sujetos YOKED en comparación con los MASTER y los CONTROL ($p < 0,001$).

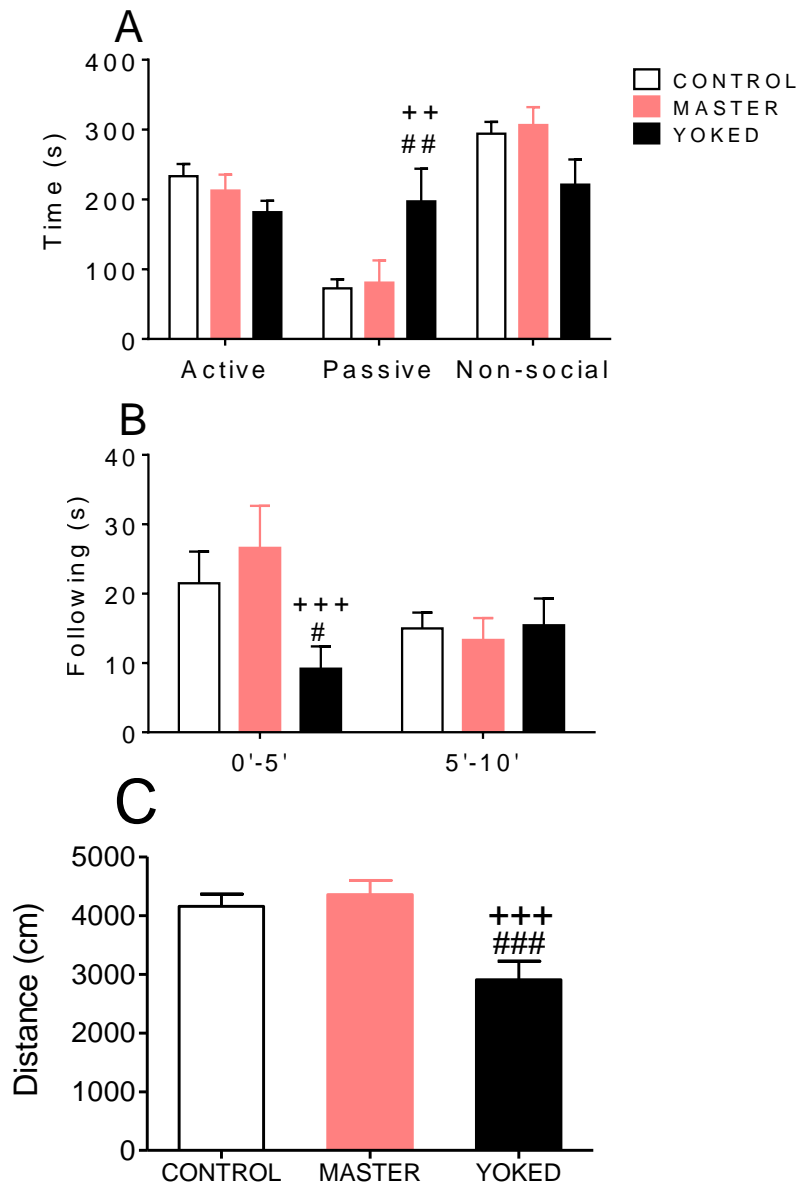


Figura 22. Efectos a largo plazo del estrés adolescente en la prueba de interacción social. En (A) para cada pareja de sujetos se ha graficado el tiempo (s) transcurrido realizando conducta social activa, pasiva y no social. En (B) se indica la conducta social de seguimiento (s). En (C) se ha graficado la actividad individual durante el total de la sesión. Se representa las medias \pm SEM. Grupos CONTROL ($n = 14$), MASTER ($n = 15$) y YOKED ($n = 16$). $## p \leq 0,01$, $### p \leq 0,001$ vs CONTROL; $++ p \leq 0,01$, $+++ p \leq 0,001$ vs MASTER.

2- Niveles hormonales en condiciones basales.

Se llevaron a cabo tomas de muestra basales durante dos fases del ritmo circadiano, aproximadamente 60 días después de la última sesión de estrés (S8), al objeto de estudiar los posibles efectos del estrés adolescente sobre los niveles basales de ACTH y corticosterona. Los datos (Figura 23) se analizaron mediante un GLM de 2 factores (GRUPO y TIEMPO). Tanto en la ACTH como en la corticosterona se observó efecto del TIEMPO [$F(1,2) = 54$ $p < 0,05$; $F(1,2) = 1071$ $p < 0,05$, respectivamente], no existiendo en ningún caso efecto del GRUPO o de la interacción GRUPO x TIEMPO. Los niveles hormonales en ambos casos fueron mayores durante la tarde ($p < 0,001$), como era de esperar, aunque las diferencias fueron mucho más evidentes en la corticosterona.

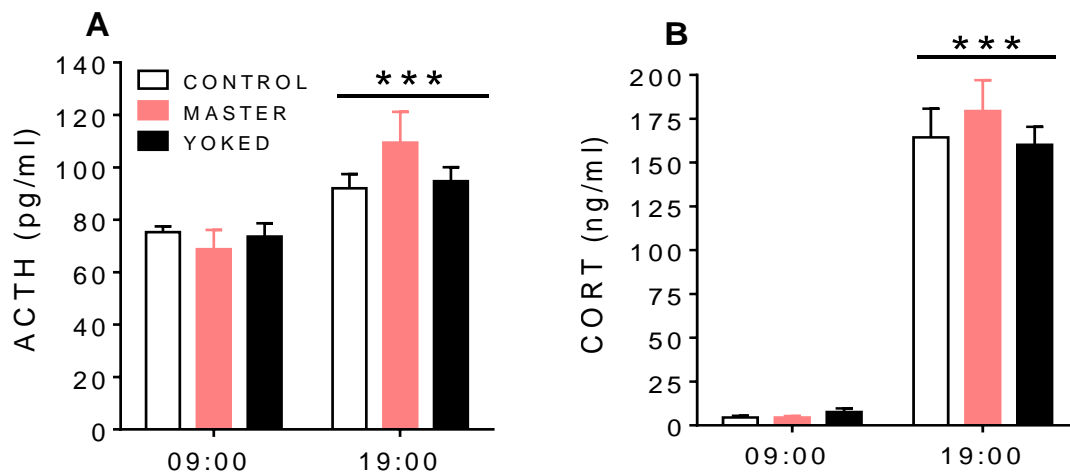


Figura 23. Efectos a largo plazo del estrés adolescente sobre los niveles basales hormonales. En (A) la ACTH y en (B) la corticosterona en dos fases del ritmo circadiano. Las tomas de muestra se realizaron durante los PND 120 – 122, una durante el período de luz (09 h) y otra al inicio del período de oscuridad (19 h). Se representa las medias \pm SEM. Grupos: CONTROL ($n = 10$), MASTER ($n = 8 - 9$) y YOKED ($n = 10$). Cuando los símbolos están sobre las barras horizontales, el efecto es independiente del grupo. *** $p \leq 0,001$ vs 09h. No se observaron diferencias entre los grupos.

3- Efectos sobre la memoria de miedo al contexto a largo plazo.

Para valorar el mantenimiento a largo plazo de la memoria condicionada al contexto se re-expusieron los sujetos a la jaula lanzadera, aproximadamente 63 días después de la última sesión de estrés (S8) y se midieron durante los 5 primeros minutos el tiempo de *freezing*, y el número de *rearings* y cruzamientos en ausencia de estímulos adicionales. Los análisis estadísticos correspondientes (GENLIN de 1 factor) revelaron un efecto del GRUPO en los tres parámetros [$X^2(2) = 96$ $p < 0,05$; $X^2(2) = 102$ $p < 0,05$; $X^2(2) = 52$ $p < 0,05$, respectivamente] (Figura 24). En el caso del *freezing*, las comparaciones por pares mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CONTROL vs MASTER y YOKED ($p < 0,001$ en ambos casos) y entre MASTER y YOKED ($p < 0,01$), siendo los animales YOKED los que más *freezing* mostraron, seguidos de los MASTER y finalmente de los CONTROL. En las otras dos medidas de actividad (*rearings* y cruzamientos) se siguió un patrón inverso, como es lógico. El grupo YOKED fue el que mayor hipoactividad mostró en comparación con el CONTROL ($p < 0,001$ ambas variables) y el MASTER ($p < 0,05$ *rearings*; $p < 0,001$ cruzamientos). Además, el grupo MASTER también fue estadísticamente distinto al grupo CONTROL, mostrando un menor número de *rearings* y cruzamientos ($p < 0,001$ *rearings*; $p < 0,01$ cruzamientos).

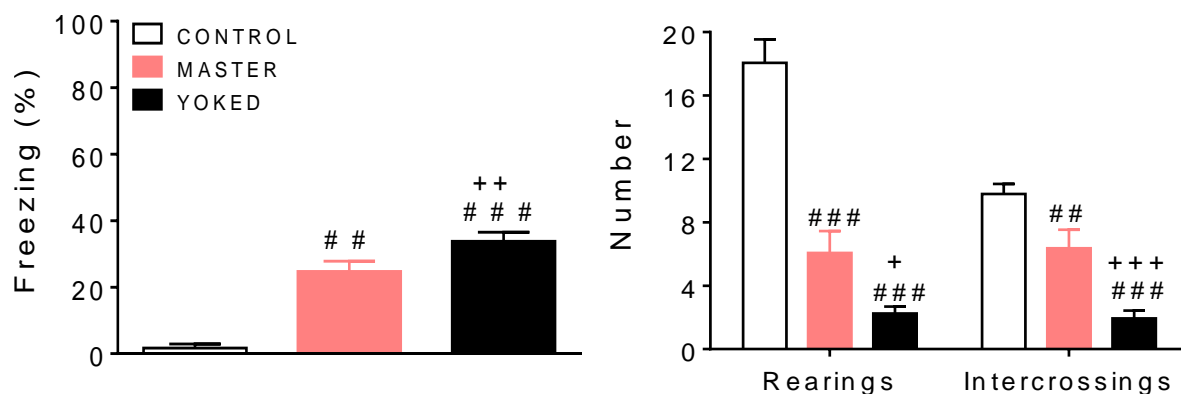


Figura 24. Efectos a largo plazo del estrés adolescente sobre la memoria de miedo remota: conducta durante los 5 minutos de re-exposición al mismo contexto (caja lanzadera) de los choques en la etapa adolescente. En (A) el porcentaje de tiempo en *freezing*; en (B) el número de *rearings* y cruzamientos. Se representa las medias \pm SEM. Grupos: CONTROL ($n = 30$), MASTER ($n = 27$) y YOKED ($n = 30$). ### $p \leq 0,001$, ## $p \leq 0,01$, # $p \leq 0,05$ vs CONTROL; +++ $p \leq 0,001$, ++ $p \leq 0,01$, + $p \leq 0,05$ vs MASTER.

4- Efectos del cambio de controlabilidad en la TWAA.

4.1- Efectos sobre la conducta en la TWAA.

La conducta para los animales MASTER en la sesión adulta de TWAA (63 días posteriores a la S8 adolescente) se analizó mediante un GENLIN de 1 factor (Figura 25). El análisis del número de evitaciones mostró efecto del GRUPO ADOLESCENTE [$X^2(2) = 48$ $p < 0,05$]. Las comparaciones por pares mostraron diferencias significativas entre los tres grupos: CONTROL-MASTER vs MASTER-MASTER ($p < 0,001$), CONTROL-MASTER vs CONTROL-YOKED ($p < 0,05$) y MASTER-MASTER vs YOKED-MASTER ($p < 0,001$). Los sujetos con experiencia previa de control (MASTER-MASTER) fueron los que mejor realizaron la tarea, mostrando un elevado número de evitaciones en comparación con los otros dos grupos. No obstante, la experiencia previa de falta de controlabilidad (YOKED-MASTER) también dio lugar a un mayor número de evitaciones en comparación con los sujetos que nunca habían recibido choques previamente y tenían su primera experiencia con la tarea en la etapa adulta (CONTROL-MASTER). De manera similar, el análisis del número de escapes mostró un efecto del GRUPO ADOLESCENTE [$X^2(2) = 50$ $p < 0,05$]. De nuevo, las comparaciones por pares mostraron diferencias significativas entre los grupos CONTROL-MASTER vs MASTER-MASTER ($p < 0,001$), CONTROL-MASTER vs CONTROL-YOKED ($p < 0,05$) y MASTER-MASTER vs YOKED-MASTER ($p < 0,001$). Las respuestas nulas se mantuvieron en un nivel muy bajo y el análisis no mostró ningún efecto estadísticamente significativo.

El número de cruzamientos entre compartimento durante el ITI en la sesión de TWAA adulta (Figura 26) se analizó mediante un GENLIN de 1 factor. Los datos mostraron un efecto del GRUPO ADOLESCENTE [$X^2(2) = 8,16$ $p < 0,05$], observándose un mayor número de cruzamientos en los animales con experiencia previa de control (MASTER-MASTER) en comparación con los CONTROL-MASTER ($p < 0,01$) y los YOKED-MASTER ($p < 0,05$). En cambio los CONTROL-MASTER no diferían del YOKED-MASTER.

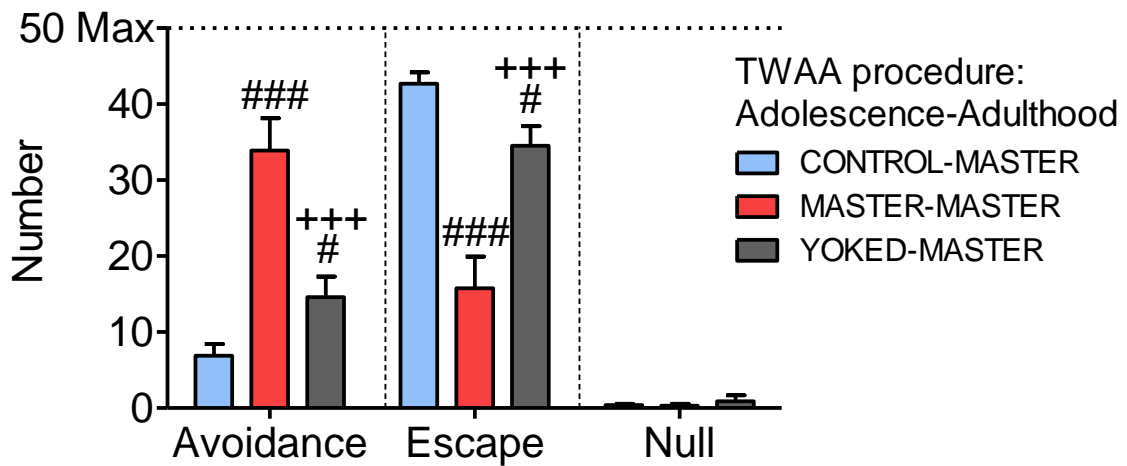


Figura 25. Efectos de la experiencia previa de estrés adolescente sobre la conducta durante una sesión de evitación activa en dos sentidos en la etapa adulta. Se grafican el número de evitaciones, escapes y respuestas nulas realizadas por los sujetos que siguieron el protocolo “MASTER” en la etapa adulta. Se representa las medias \pm SEM. Grupos: CONTROL-MASTER ($n = 10$), MASTER-MASTER ($n = 9$) y YOKED-MASTER ($n = 10$). ### $p \leq 0,001$, # $p \leq 0,05$ vs CONTROL; +++ $p \leq 0,001$ vs MASTER.

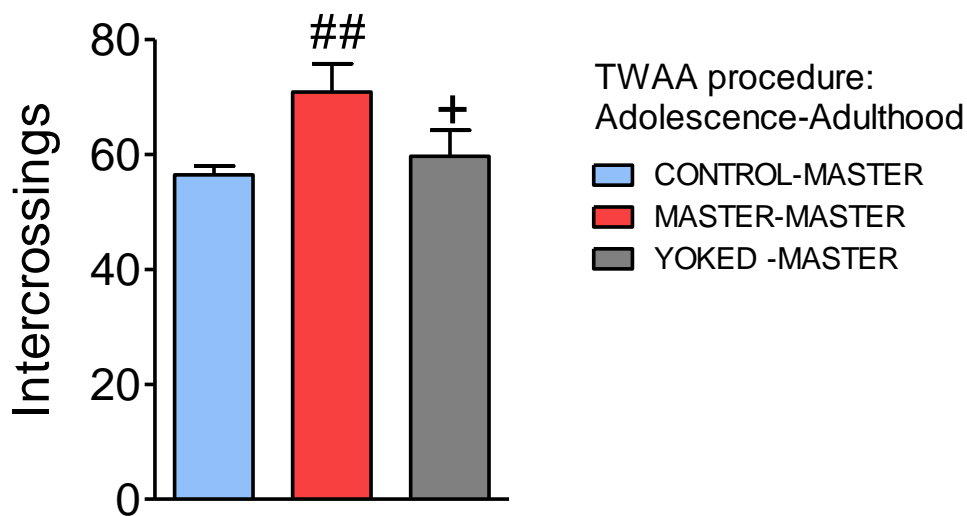


Figura 26. Efectos de la experiencia previa de estrés adolescente sobre el número de cruzamientos durante el ITI en la sesión adulta de evitación activa en dos sentidos. Se grafican sólo el número cruzamientos de los sujetos “MASTER” durante la etapa adulta. Se representa las medias \pm SEM. Grupos CONTROL-MASTER ($n = 10$), MASTER-MASTER ($n = 9$) y YOKED-MASTER ($n = 10$). ## $p \leq 0,01$ vs CONTROL; + $p \leq 0,05$ vs MASTER.

La latencia de respuesta, como medida adicional de aprendizaje, se analizó con un GENLIN de 1 factor (GRUPO) (Figura 27). Se observó un efecto del GRUPO [$X^2(2) = 38,1$ $p < 0,05$], siendo dicha respuesta más rápida en los animales con experiencia previa de control (MASTER-MASTER) en comparación con los CONTROL-MASTER y los YOKED-MASTER ($p \leq 0,001$ para ambas comparaciones). En este caso no se observaron diferencias entre CONTROL-MASTER y YOKED-MASTER.

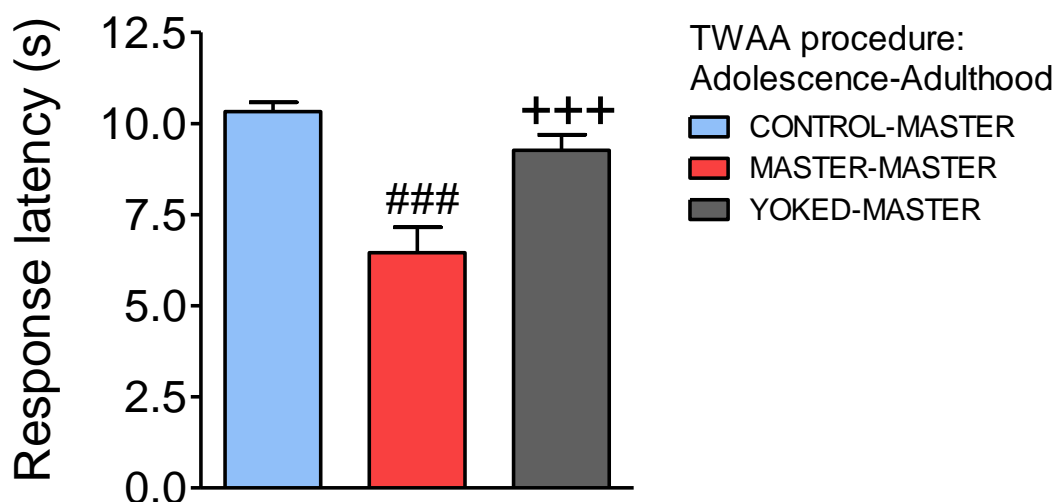


Figura 27. Latencia de respuesta durante la sesión adulta de evitación activa en dos sentidos. Se representa las medias \pm SEM de los grupos con un procedimiento "MASTER" en la etapa adulta. Grupos CONTROL-MASTER ($n = 10$), MASTER-MASTER ($n = 9$) y YOKED-MASTER ($n = 10$). ### $p \leq 0,001$ vs CONTROL-MASTER; +++ $p \leq 0,001$ vs MASTER-MASTER.

4.2- Efectos hormonales en la TWAA: ACTH y corticosterona.

Inmediatamente después de finalizar la tarea adulta (POST-SHUTTLE) y a los 45 min de recuperación (R45), se realizó una extracción de sangre con el objetivo de medir los niveles plasmáticos de ACTH y de corticosterona. El análisis estadístico se realizó mediante un GEE de 3 factores para cada hormona: GRUPO ADOLESCENTE, GRUPO ADULTO y TIEMPO. El análisis de la ACTH (Figura 28A) mostró un efecto del GRUPO ADULTO [$X^2(2) = 197$ $p < 0,05$], del TIEMPO [$X^2(1) = 465$ $p < 0,05$], de las interacciones GRUPO ADOLESCENTE x GRUPO ADULTO [$X^2(4) = 18$ $p < 0,05$], GRUPO ADULTO x TIEMPO [$X^2(2) = 217$ $p < 0,05$] y de la triple interacción GRUPO ADOLESCENTE x GRUPO ADULTO x TIEMPO [$X^2(4) = 20$ $p < 0,05$]. La descomposición de la triple interacción mostró diferencias significativas en función del estrés agudo o adulto. Dentro de los grupos del mismo tratamiento adolescente, el grupo

CONTROL adulto mostró, como era de esperar, una menor respuesta de la ACTH que sus respectivos MASTER y YOKED ($p < 0,001$ para POST-SHUTTLE y $p < 0,001$, $p < 0,01$, $p < 0,05$ para R45). No hubo diferencias entre MASTER y YOKED adultos, independientemente del grupo de estrés previo, en ninguno de los tiempos. Finalmente, el impacto del estrés adolescente seguía presente en la etapa adulta en los animales que no recibieron choque en la etapa adulta, sugiriendo la existencia de una respuesta condicionada del eje HPA al contexto en el que se habían recibido los choques durante la adolescencia. Así, el grupo CONTROL-CONTROL tenía valores más bajos que los grupos MASTER-CONTROL y YOKED-CONTROL ($p < 0,01$ en POST-SHUTTLE y $p < 0,05$ en R45). Por otra parte, los sujetos CONTROL-MASTER, que tuvieron su primera exposición a estrés en la etapa adulta, tenían niveles más elevados que los MASTER-MASTER ($p < 0,01$ POST-SHUTTLE) y YOKED-MASTER ($p < 0,05$ POST-SHUTTLE), ambos con experiencia previa con los choques. Estas diferencias solo se observaron durante el período POST-SHUTTLE. En el caso de grupos CONTROL-YOKED, MASTER-YOKED y YOKED-YOKED no se observaron diferencias significativas. Cabe destacar que debido a la experiencia previa de estrés en la TWAA, el número de choques recibidos en los grupos con una doble exposición fue menor, y por este motivo, los niveles de ACTH podrían ser menores en estos sujetos. Recuérdese que los YOKED adultos estaban asociados a sus correspondientes MASTER.

El análisis de la corticosterona (Figura 28B) mostró un efecto del GRUPO ADULTO [$X^2(2) = 62$ $p < 0,05$], del TIEMPO [$X^2(1) = 493$ $p < 0,05$], de la interacción GRUPO ADOLESCENTE x GRUPO ADULTO [$X^2(4) = 16$ $p < 0,000$], GRUPO ADULTO x TIEMPO [$X^2(2) = 22$ $p < 0,001$] y de la triple interacción GRUPO ADOLESCENTE x GRUPO ADULTO x TIEMPO [$X^2(4) = 14$ $p < 0,001$]. La descomposición de la triple interacción mostró diferencias significativas en función del tratamiento adulto, los grupos CONTROL adultos mostraron niveles más bajos de corticosterona que los MASTER y YOKED adultos ($p < 0,05$) en ambos tiempos (POST-SHUTTLE y R45). No se observaron diferencias entre los grupos MASTER vs YOKED adultos. Se observaron también diferencias debidas al tratamiento previo (adolescente) entre los grupos CONTROL-CONTROL vs MASTER-CONTROL y YOKED-CONTROL ($p < 0,001$ en ambos casos) en las dos tomas de muestra, siendo la respuesta de corticosterona mayor en los animales con experiencia previa de estrés, indicando de nuevo la existencia de una respuesta condicionada de corticosterona al contexto.

Finalmente, cabe destacar que de forma paralela, tanto para la ACTH como para la corticosterona, el tiempo de choque recibido durante la sesión se utilizó como covariable, y no se observó un efecto diferencial en los factores principales (GRUPO ADOLESCENTE, GRUPO ADULTO y TIEMPO).

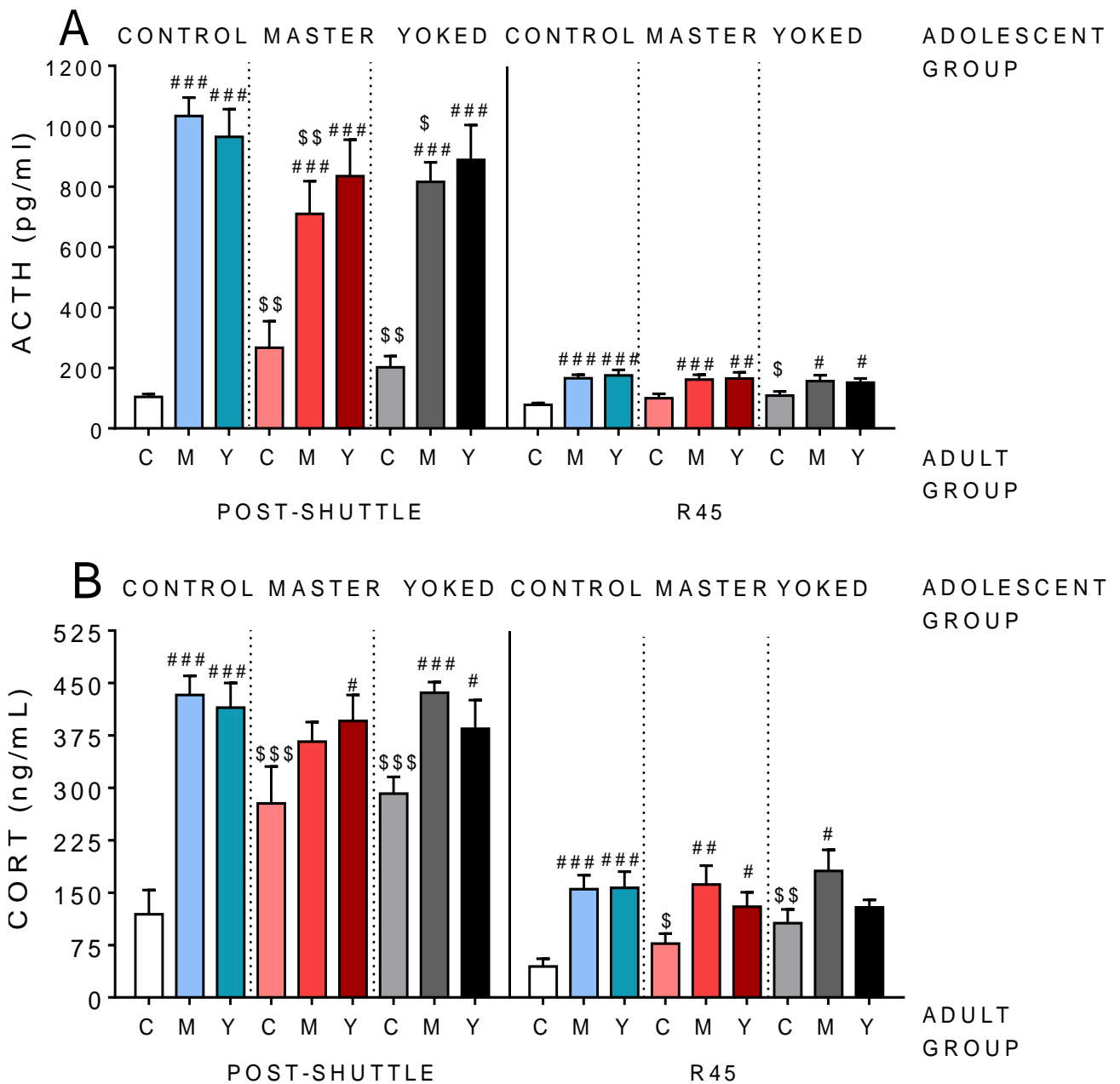


Figura 28. Niveles hormonales después de la exposición a la sesión adulta de evitación activa en dos sentidos. En el panel (A) se grafica la ACTH y en el panel (B) la corticosterona. Se representa las medias \pm SEM. Grupos (Adolescente – Adulto): CONTROL-CONTROL ($n = 10$), CONTROL-MASTER ($n = 10$), CONTROL-YOKED ($n = 10$), MASTER-CONTROL ($n = 9$), MASTER-MASTER ($n = 9$), MASTER-YOKED ($n = 9$), YOKED-CONTROL ($n = 10$), YOKED-MASTER ($n = 10$) y YOKED-YOKED ($n = 9$). ### $p < 0,001$, ## $p < 0,01$, # $p < 0,05$ vs grupo con el mismo tratamiento adolescente; \$\$\$ $p < 0,001$, \$\$ $p < 0,01$, \$ $p < 0,05$ vs grupo con el mismo tratamiento agudo (adulto). La significación del factor TIEMPO no está representada.

5- Efectos conductuales a largo plazo sobre el test de emergencia.

Dos días después de la TWAA en la etapa adulta, se expuso a todos los sujetos a un test de emergencia. Los datos de la latencia de salida del recinto durante la prueba de emergencia (Figura 29) se analizaron mediante una ANOVA de 2 factores. Se observaron diferencias estadísticamente significativas debidas únicamente al factor GRUPO ADOLESCENTE [$F(2, 87) = 3,2$, $p < 0,05$]. Los grupos expuestos a un procedimiento YOKED en la etapa adolescente mostraron una latencia de salida mayor que los grupos CONTROL y MASTER ($p < 0,05$ en ambos casos).

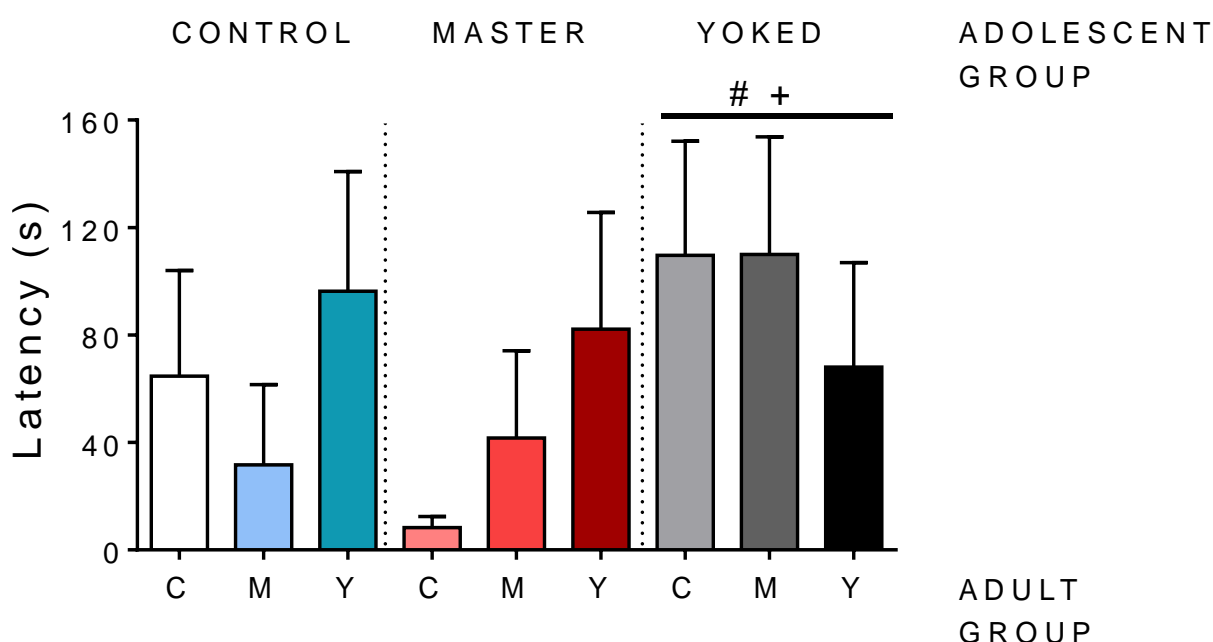


Figura 29. Efectos de la doble exposición a la tarea de evitación activa en dos sentidos sobre la latencia de salida en el test de emergencia. Se representa las medias \pm SEM. Grupos en función de la experiencia adolescente y adulta: CONTROL-CONTROL ($n = 10$), CONTROL-MASTER ($n = 10$), CONTROL-YOKED ($n = 10$), MASTER-CONTROL ($n = 9$), MASTER-MASTER ($n = 9$), MASTER-YOKED ($n = 9$), YOKED-CONTROL ($n = 10$), YOKED-MASTER ($n = 10$) y YOKED-YOKED ($n = 9$). Cuando los símbolos están sobre las barras horizontales, el efecto es independiente del grupo adulto. # $p < 0,05$ vs CONTROL adolescente; + $p < 0,05$ vs MASTER adolescente.

6- Segunda reexposición a la shuttle-box: memoria de miedo al contexto.

Finalmente, todos los animales fueron re-expuestos por segunda vez a las cajas lanzaderas, sin ningún estímulo específico, 7 días después de la sesión de TWAA en la

etapa adulta. Se registraron tres medias: *freezing*, *rearings* y cruzamientos. Los datos se analizaron mediante un GEE de dos factores: GRUPO ADOLESCENTE y GRUPO ADULTO. El análisis del tiempo de *freezing* reveló un efecto de los factores GRUPO ADOLESCENTE [$X^2(2) = 12$ $p < 0,05$] y GRUPO ADULTO [$X^2(2) = 75$ $p < 0,05$]. De manera similar, el análisis del número de *rearings* mostró un efecto del factor GRUPO ADOLESCENTE [$X^2(2) = 11$ $p < 0,05$] y GRUPO ADULTO [$X^2(2) = 17$ $p < 0,05$]. Y lo mismo ocurrió con el número de cruzamientos: GRUPO ADOLESCENTE [$X^2(2) = 16$ $p < 0,05$] y GRUPO ADULTO [$X^2(2) = 12$ $p < 0,05$]. Las comparaciones por pares de ambos factores revelaron las siguientes diferencias: los sujetos YOKED adolescentes mostraron mayores niveles de *freezing* ($p < 0,001$) y un menor número de *rearings* ($p < 0,01$) y cruzamientos ($p < 0,01$) en comparación con los grupos CONTROL adolescente, sin experiencia previa de estrés. Los sujetos MASTER adolescentes no difirieron de los CONTROL en el tiempo de *freezing* pero sí mostraron menos cruzamientos ($p < 0,05$). No se observaron diferencias entre MASTER y YOKED adolescente en el tiempo de *freezing* ni en los cruzamientos, pero sí en los *rearings*, siendo el grupo YOKED el que menos realizó ($p < 0,01$).

Los grupos MASTER y YOKED adultos mostraron un mayor nivel de *freezing* durante la reexposición en comparación con los CONTROL ($p < 0,001$, ambos casos). Además, los sujetos YOKED adultos realizaron menor actividad valorada mediante los *rearings* en comparación con los CONTROL ($p < 0,001$) y también con los MASTER ($p < 0,05$). En los cruzamientos, ambos grupos MASTER y YOKED adultos fueron los que menor actividad realizaron, en comparación con los CONTROL ($p < 0,05$ y $p < 0,001$ respectivamente).

En general, los datos parecen indicar que los grupos expuestos tanto en adolescencia como en etapa adulta a un procedimiento incontrolable (YOKED-YOKED) fueron los más afectados, con los niveles de *freezing* más elevados y los menores niveles de actividad, mostrando un efecto sumatorio de las exposiciones.

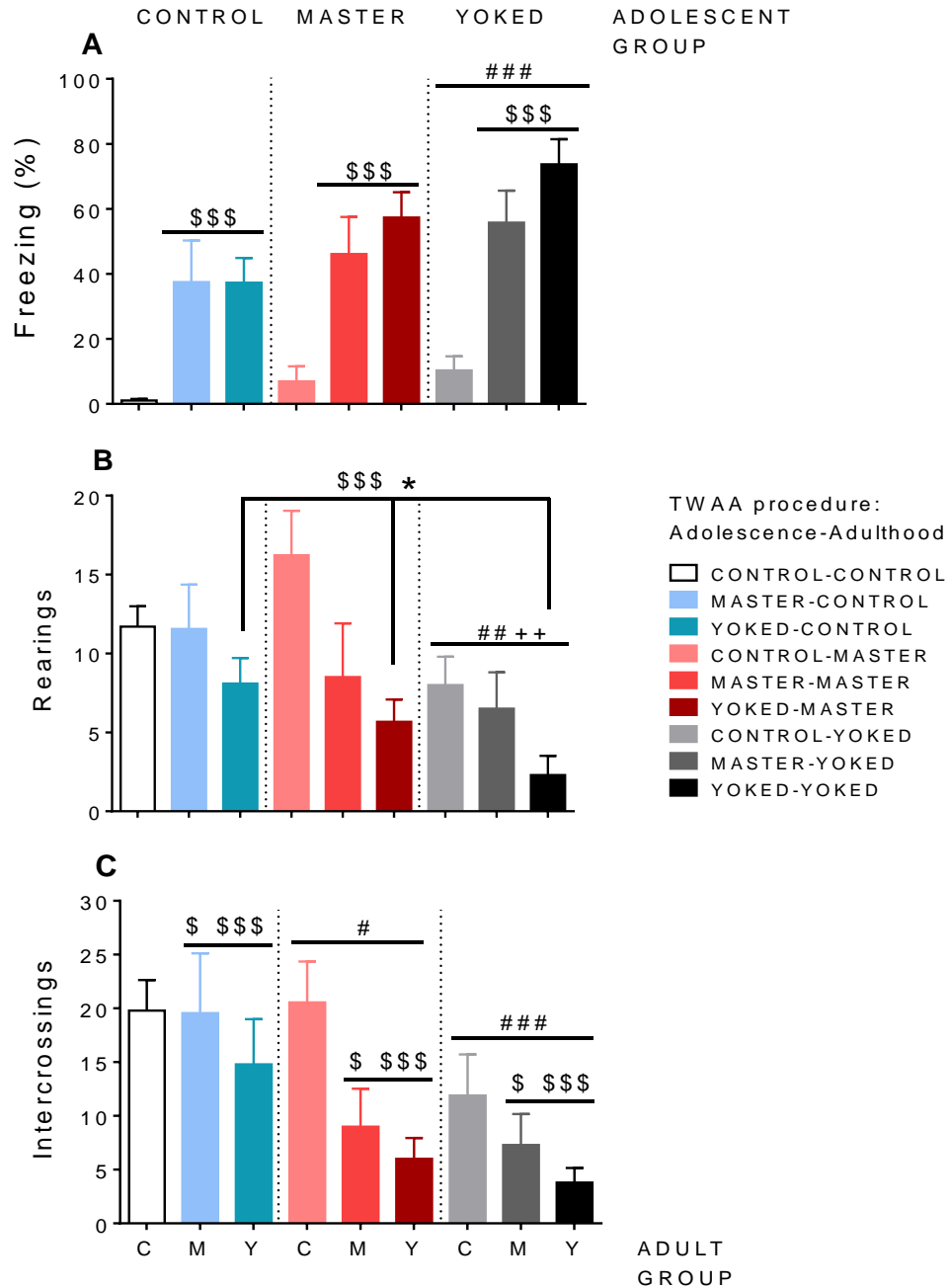


Figura 30. Conducta durante los 10 minutos de reexposición a la caja lanzadera tras la exposición adulta a la tarea de evitación activa en dos sentidos. En (A) el porcentaje de freezing, en (B) el número de rearings y en (C) el número de cruzamientos. Se representa las medias \pm SEM. Grupos en función del tratamiento adolescente y adulto: CONTROL-CONTROL ($n = 10$), CONTROL-MASTER ($n = 10$), CONTROL-YOKED ($n = 10$), MASTER-CONTROL ($n = 9$), MASTER-MASTER ($n = 9$), MASTER-YOKED ($n = 9$), YOKED-CONTROL ($n = 10$), YOKED-MASTER ($n = 10$) y YOKED-YOKED ($n = 9$). ### $p < 0,001$, ## $p < 0,01$, # $p < 0,05$ vs CONTROL adolescente; \$\$\$ $p < 0,001$, \$\$ $p < 0,01$, \$ $p < 0,05$ vs CONTROL agudo (adulto); ++ $p < 0,01$ vs MASTER adolescente; * $p < 0,05$ vs MASTER agudo (adulto).

Conclusión general.

A largo plazo, en los sujetos MASTER se observó un efecto ansiolítico reflejado en un aumento del tiempo de permanencia en los brazos abiertos en el EPM, efecto no observable tras la exposición a estrés incontrolable. Además, los sujetos YOKED mostraron una disminución de la conducta social activa, evidenciando un efecto ansiogénico o motivacional.

La experiencia previa de controlabilidad favoreció las estrategias de afrontamiento activas durante la reexposición a la tarea de evitación activa en la etapa adulta. Además, los animales que habían recibido estrés incontrolable también ejecutaban mejor la tarea que el grupo sin estrés. A nivel del eje HPA no se observaron diferencias significativas entre los grupos MASTER y YOKED. No obstante, sí se observó una respuesta condicionada del eje HPA en aquellos grupos sin experiencia de estrés adulta (MASTER-CONTROL y YOKED-CONTROL vs CONTROL-CONTROL) meramente re-expuestos a la caja lanzadera. La memoria remota contextual de miedo fue mayor en los sujetos YOKED, que en los MASTER, sobre todo tras la doble experiencia de no control en la etapa adolescente y la adulta (YOKED-YOKED).

CAPÍTULO 3. EFECTOS A LARGO PLAZO DEL ESTRÉS EN LA ADOLESCENCIA: IMPULSIVIDAD COGNITIVA EN DESCUENTO POR DEMORA.

Planteamiento y objetivos.

La impulsividad se asocia a un mal funcionamiento o inmadurez de las funciones ejecutivas (Bari y Robbins 2013). Algunos resultados indican que la exposición a estrés crónico durante la adolescencia potencia la conducta impulsiva y la intolerancia a la demora (v.g. Brydges et al. 2015). El objetivo concreto de este experimento fue valorar los posibles efectos a largo plazo del estrés controlable e incontrolable sobre la impulsividad cognitiva en una prueba de tolerancia a la demora. Se sugiere que la exposición a estrés incontrolable debería dar lugar a un fenotipo vulnerable, aumentando los niveles de impulsividad en la etapa adulta, mientras que la exposición a estrés controlable no debería ejercer dichos efectos o ser incluso beneficiosa, disminuyendo dicha impulsividad. Sin embargo, se desconoce si existe un impacto diferencial en función de la controlabilidad.

Diseño experimental.

Se utilizaron un total de 30 animales: 10 del grupo CONTROL, 10 del grupo MASTER y 10 del grupo YOKED. Se expusieron a los sujetos a 8 sesiones no consecutivas de estrés, entre PND 36 y PND 57 (promedio ± 1). Se valoró la maduración sexual antes y durante la exposición a estrés adolescente (PND 32-44). Al finalizar, todos los sujetos llevaron a cabo la tarea de descuento por demora. En la tabla 16 se presenta un resumen del diseño experimental.

Tabla 16. Grupos experimentales y diseño del capítulo 3.

| GRUPO | N | PND 32 - 44 | PND 33-39 a 54-60 | PND 70-72 a PND 112-114 |
|---------|----|-------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| CONTROL | 10 | MADURACIÓN SEXUAL | EXPOSICIÓN A LA CAJA LANZADERA | TAREA DE DESCUENTO POR DEMORA |
| MASTER | 10 | MADURACIÓN SEXUAL | ESTRÉS CONTROLABLE | TAREA DE DESCUENTO POR DEMORA |
| SLAVE | 10 | MADURACIÓN SEXUAL | ESTRÉS INCONTROLABLE | TAREA DE DESCUENTO POR DEMORA |

Previamente a la exposición a la TWAA, se empezó a valorar el inicio de la maduración sexual (entre PND 32-44). Los días 1 a 29 experimentales, se llevó a cabo la exposición a estrés en la TWAA. A partir del día 36 experimental (PND 70-72) se realizó la tarea de descuento por demora. Obsérvese que en la tabla se indica la edad de los animales, no el día experimental.

Resultados.

En el estudio de descuento por demora se eliminó un sujeto del grupo CONTROL debido a que no superó las fases de pre-entrenamiento de la tarea. La muestra final es de: CONTROL $n = 9$, MASTER $n = 10$ y YOKED $n = 10$.

1- Efectos sobre la maduración sexual en la adolescencia.

Antes y durante la exposición a estrés, se valoró el proceso de maduración sexual, mediante un sistema de calificación del 0 al 2. En este experimento, se inició la valoración en PND 32. La figura 31 muestra el porcentaje de sujetos en cada estadio de maduración, del PND 32-44. El análisis de supervivencia de Kaplan-Meier mostró que no hubo ningún efecto del factor GRUPO en la curva de maduración sexual, siendo por lo tanto independiente de la exposición a estrés repetido (controlable o incontrolable).

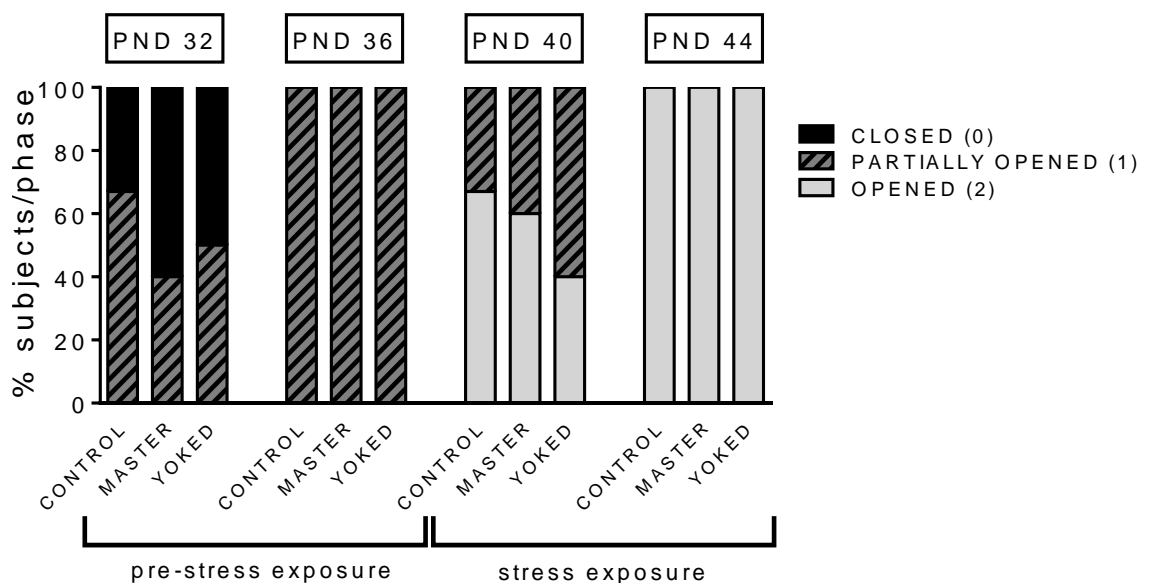


Figura 31. Evolución de la maduración sexual antes y durante la exposición a estrés adolescente. Se representa el porcentaje de sujetos en cada estadio de maduración, según la apertura del prepucio. Se asigna un valor para cada uno de los 3 estadios: 0 cerrado, 1 parcialmente abierto y 2 completamente abierto. Se realizaron 4 valoraciones cada 4 días, empezando el PND 32. Grupos CONTROL ($n = 9$), MASTER ($n = 10$) y YOKED ($n = 10$). No se observaron diferencias entre los grupos.

2- Tarea de descuento por demora.

Cuando todos los sujetos alcanzaron la edad de PND 70 iniciaron el pre-entrenamiento de la tarea de descuento por demora.

2.1- Pre-entrenamiento.

Los días necesarios para superar todas las fases del pre-entrenamiento de la tarea de descuento por demora (Figura 32) se analizaron independientemente mediante el ANOVA de 1 factor. No se observaron diferencias entre los grupos en ninguna de las fases.

También se analizó, como representativa, la conducta durante el primer día de cada una de las 3 fases de pre-entrenamiento. En concreto, el número de refuerzos (o respuestas) obtenidos con cada una de las 2 palancas (figura 33) y el tiempo de sesión (figura 34). Ambas variables se analizaron con un ANOVA de 1 factor y no se observaron diferencias entre los grupos.

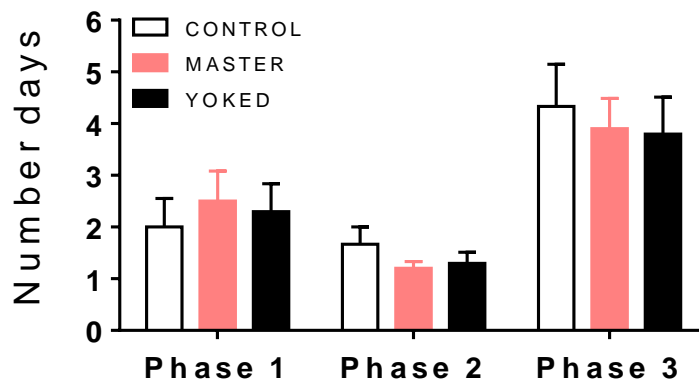


Figura 32. *Días empleados en cada una de las distintas fases de pre-entrenamiento de la tarea de descuento por demora. Ver texto en métodos para el significado de cada fase. Se representa las medias \pm SEM. Grupos CONTROL ($n = 9$), MASTER ($n = 10$) y YOKED ($n = 10$). No se observaron diferencias entre los grupos.*

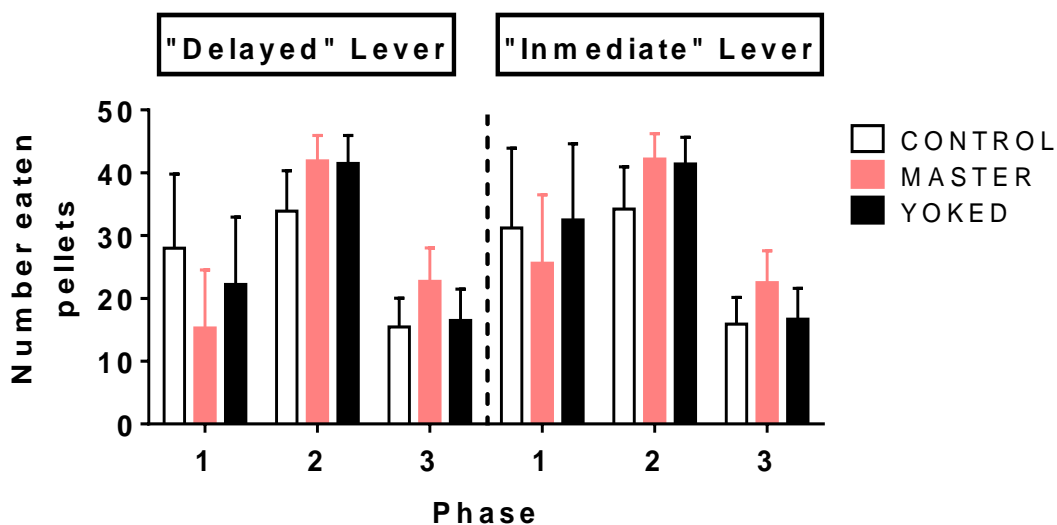


Figura 33. Conducta en el primer día en cada fase de pre-entrenamiento de la tarea de descuento por demora. Se indican los refuerzos obtenidos con cada una de las dos palancas, sin demora. Se representa las medias \pm SEM. CONTROL ($n = 9$), MASTER ($n = 10$) y YOKED ($n = 10$). No se observaron diferencias entre los grupos.

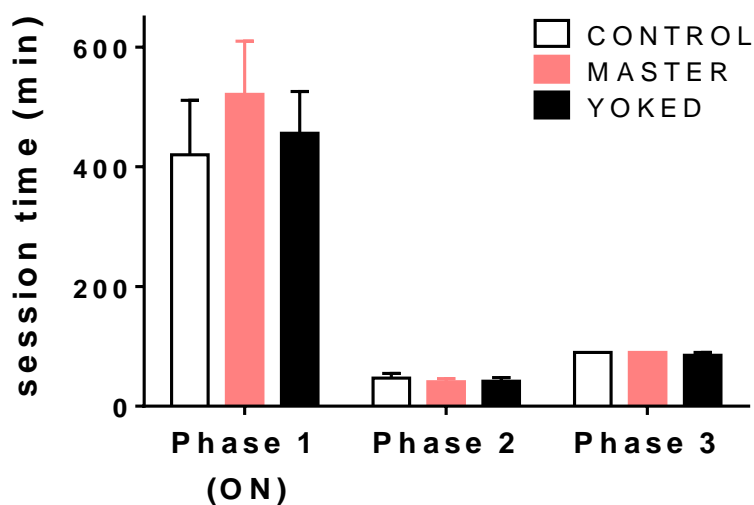


Figura 34. Tiempo de duración de las sesiones de pre-entrenamiento de la tarea de descuento por demora. Ver texto en métodos para el significado de cada fase. Se representa las medias \pm SEM. Grupos CONTROL ($n = 9$), MASTER ($n = 10$) y YOKED ($n = 10$). ON: overnight. No se observaron diferencias entre los grupos.

2.2- Test.

Durante el TEST la medida principal fue el porcentaje de respuestas realizadas en la palanca demorada durante los ensayos de libre elección (Figura 35). El análisis estadístico se realizó mediante un GLM de dos factores (GRUPO y DEMORA). No se observó efecto del GRUPO ni de la interacción GRUPO x DEMORA, pero sí del factor DEMORA [$F(4,104) = 136$ $p < 0,05$]. Las comparaciones por pares del factor DEMORA mostraron que la preferencia por la palanca demorada fue distinta en todas las fases en comparación con 0 s inicial ($p \leq 0,001$ para todas las comparaciones), excepto en la comparación 0 s inicial vs 0 s final ($p \leq 0,05$), donde las diferencias fueron menores. No obstante, todos los grupos mostraron el mismo patrón de preferencia, sin diferencias en función del tratamiento de estrés adolescente. Los resultados indican que la preferencia por la palanca demorada disminuye, como era de esperar, con la duración de la demora. Además, cuando no existe demora todos los sujetos prefieren la palanca que proporciona 4 *pellets* (la demorada) respecto a la que proporciona 1 *pellet* (la inmediata).

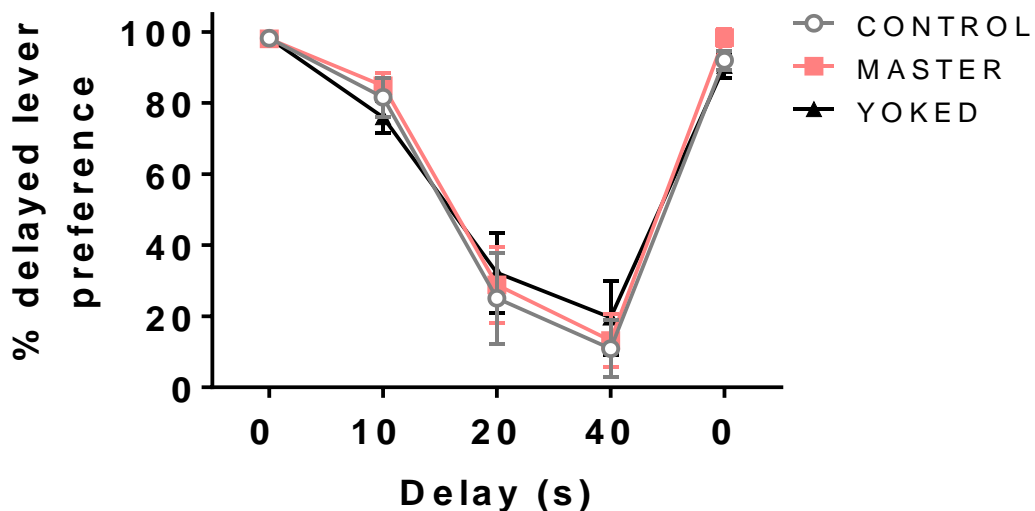


Figura 35. Curva de preferencia por la palanca demorada durante las distintas demoras del TEST de la tarea de descuento por demora. El TEST se divide en distintas fases, y cada una de ellas tiene una demora diferente: 0 s, 10 s, 20 s, 40 s y de nuevo 0 s. Se grafica el porcentaje de preferencia por la palanca que libera un refuerzo mayor en cada demora. Se representa las medias \pm SEM. Grupos CONTROL ($n = 9$), MASTER ($n = 10$) y YOKED ($n = 10$). No se representa el factor DEMORA. No hubo diferencias entre los grupos.

Otras variables analizadas durante la fase del TEST fueron (i) el tiempo de duración de las sesiones, (ii) el número de ensayos totales realizados, (iii) el número de omisiones y (iv) las latencias de decisión y de recogida del refuerzo.

La duración de las sesiones (Figura 36) se analizó mediante un GEE de dos factores. No se observó efecto del GRUPO, pero sí del factor DEMORA [$X^2(4) = 37$ $p < 0,05$] y de la interacción GRUPO x DEMORA [$X^2(8) = 23$ $p < 0,05$]. La descomposición de la interacción mostró que en la sesión de demora 40 s los sujetos YOKED necesitaron más tiempo para finalizar la sesión que los MASTER ($p \leq 0,05$), pero no que los CONTROL.

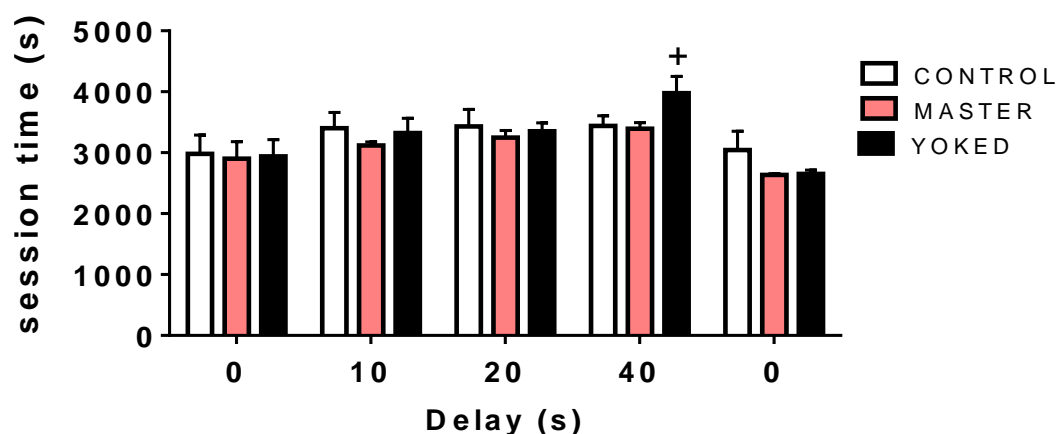


Figura 36. Duración de las sesiones del TEST de la tarea de descuento por demora. El TEST se divide en distintas fases, y cada una de ellas tiene una demora diferente: 0 s, 10 s, 20 s, 40 s y de nuevo 0 s. Se representa las medias \pm SEM. Grupos CONTROL ($n = 9$), MASTER ($n = 10$) y YOKED ($n = 10$). + $p < 0,05$ vs MASTER.

Para el análisis del número de ensayos (Figura 37) y omisiones (Tabla 17) se realizó un GEE de dos factores (GRUPO y DEMORA). La mayoría de los animales realizaron los 60 ensayos máximos de los que constaba la sesión, y las omisiones se mantuvieron en un nivel muy bajo. No se observaron diferencias en ninguna de las variables.

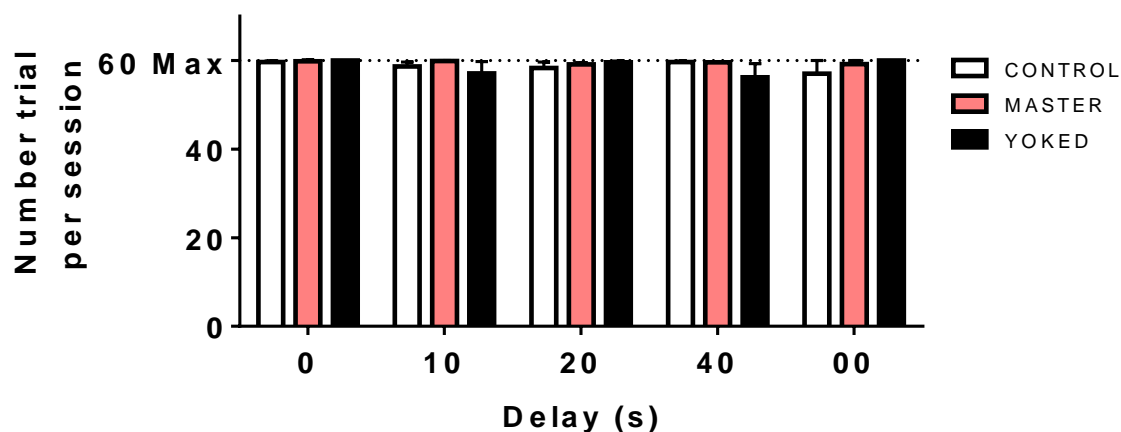


Figura 37. Número de ensayos totales en las sesiones del TEST de la tarea de descuento por demora. El TEST se divide en distintas fases y cada una de ellas tiene una demora diferente: 0 s, 10 s, 20 s, 40 s y de nuevo 0 s. Se representa las medias \pm SEM. Grupos CONTROL ($n = 9$), MASTER ($n = 10$) y YOKED ($n = 10$). No se observaron diferencias entre los grupos.

Tabla 17. Número de omisiones en los grupos CONTROL, MASTER y YOKED en las sesiones del TEST de la tarea de descuento por demora.

| | CONTROL | MASTER | YOKED |
|------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 0 s | 0,22 \pm 0,15 | 0,10 \pm 0,10 | 0,00 \pm 0,00 |
| 10 s | 0,33 \pm 0,24 | 0,10 \pm 0,10 | 0,60 \pm 0,34 |
| 20 s | 0,33 \pm 0,24 | 0,70 \pm 0,40 | 0,40 \pm 0,27 |
| 40 s | 0,33 \pm 0,24 | 0,40 \pm 0,16 | 0,50 \pm 0,40 |
| 0 s | 0,00 \pm 0,00 | 0,80 \pm 0,80 | 0,00 \pm 0,00 |

El TEST se divide en distintas fases, y cada una de ellas tiene una demora diferente: 0 s, 10 s, 20 s, 40 s y de nuevo 0 s. Se representa las medias \pm SEM. Grupos CONTROL ($n = 9$), MASTER ($n = 10$) y YOKED ($n = 10$). No se observaron diferencias entre los grupos.

Las latencias de decisión (Figura 38) y de recogida (Figura 39) del refuerzo se analizaron con un GEE de dos factores. La mayoría de los animales tuvieron latencias muy bajas y en ambas variables se observó un efecto del factor DEMORA [$X^2(4) = 44$ $p < 0,001$; $X^2(4) = 95$ $p < 0,001$, respectivamente]. Tanto la latencia de decisión como de recogida aumentaron con la primera demora ($p \leq 0,001$ ambas comparaciones), para ir disminuyendo progresivamente hasta los niveles iniciales.

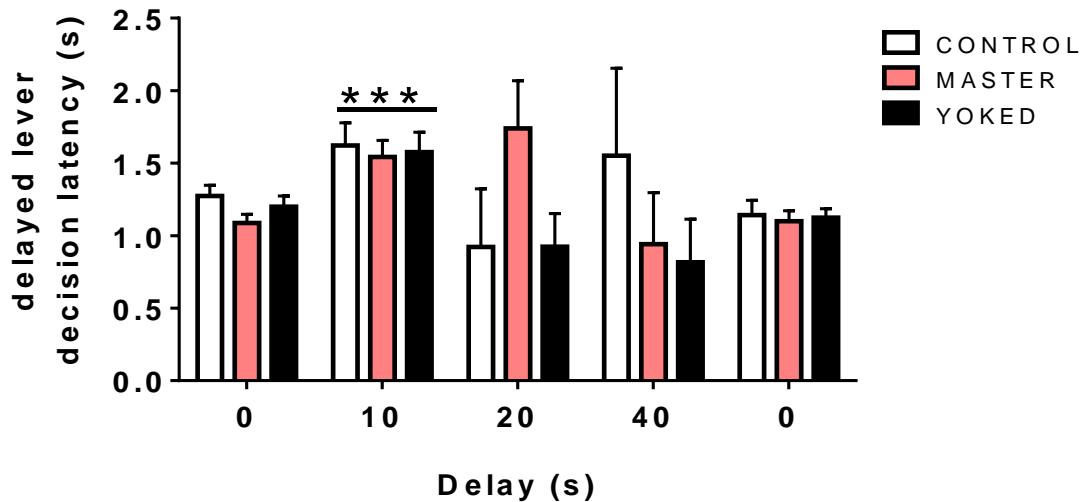
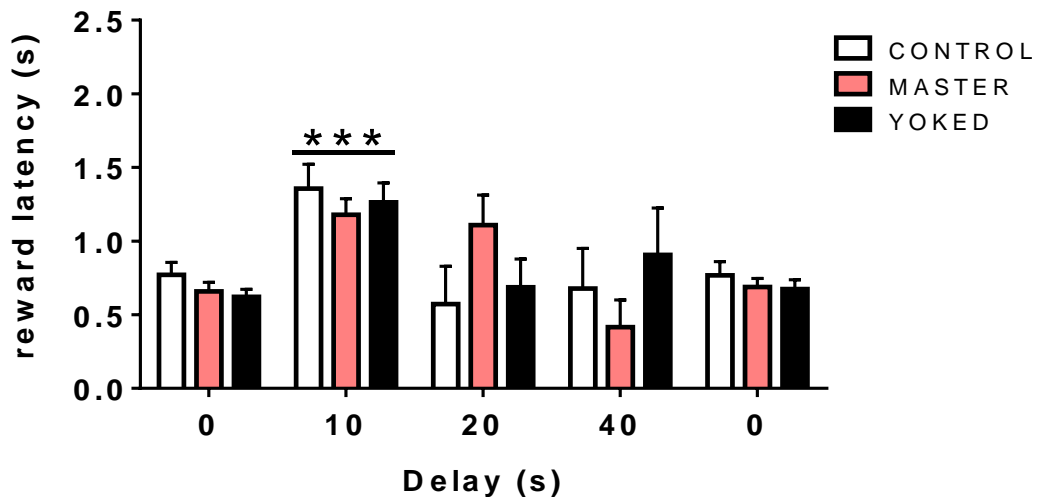


Figura 38. Latencia de decisión para presionar la palanca demorada durante los ensayos de libre elección en las sesiones del TEST de la tarea de descuento por demora. El TEST se divide en distintas fases, y cada una de ellas tiene una demora diferente: 0 s, 10 s, 20 s, 40 s y de nuevo 0 s. Se representa las medias \pm SEM. Grupos CONTROL ($n = 9$), MASTER ($n = 10$) y YOKED ($n = 10$). Cuando los símbolos están sobre las barras horizontales, el efecto es independiente del grupo. *** $p \leq 0,001$ vs 0 inicial.



*Figura 39. Latencia de recogida del pellet liberado por la palanca demorada durante los ensayos de libre elección en las sesiones del TEST de la tarea de descuento por demora. El TEST se divide en distintas fases, y cada una de ellas tiene una demora diferente: 0 s, 10 s, 20 s, 40 s y de nuevo 0 s. Se representa las medias \pm SEM. Grupos CONTROL ($n = 9$), MASTER ($n = 10$) y YOKED ($n = 10$). Cuando los símbolos están sobre las barras horizontales, el efecto es independiente del grupo. *** $p \leq 0,001$ vs 0 inicial.*

Conclusión general.

La exposición previa al estrés adolescente no afectó la impulsividad cognitiva evaluada en la etapa adulta mediante una tarea de descuento por demora. Todos los grupos mostraron, como era de esperar, una disminución de la preferencia por la palanca demorada (mayor refuerzo) a medida que aumentaba la demora. Además, el estrés no ejerció efectos inespecíficos a nivel de la adquisición general del aprendizaje, número de omisiones o latencias de decisión y de recogida del refuerzo.

CAPÍTULO 4. EFECTOS A CORTO Y LARGO PLAZO DEL ESTRÉS ADOLESCENTE: CONSUMO DE SACARINA E IMPULSIVIDAD COGNITIVA EN TAREAS DE RIESGO.

Planteamiento y objetivos.

En la literatura numerosos trabajos acerca de los efectos del estrés crónico en animales adultos sobre el consumo de sacarina como índice de anhedonia observan una disminución progresiva del consumo de sacarina con respecto a los sujetos control (v.g. Naert et al. 2011; Shimamoto et al. 2011). En cambio, el papel que juega el factor controlabilidad sobre el estrés en el consumo de soluciones dulces ha sido muy poco estudiado. En Christianson et al. (2008), los sujetos fueron expuestos a un procedimiento agudo de MASTER o YOKED (choque en la cola) y posteriormente se valoró el consumo de sacarosa. Ambos protocolos de estrés disminuyeron la preferencia por la sacarosa, pero sin diferencias entre los dos grupos. Sin embargo, no existe información sobre la importancia de la controlabilidad en el estrés en etapas adolescentes sobre el posible desarrollo de anhedonia en la etapa adulta.

Por otra parte, la exposición a un tratamiento de estrés durante la adolescencia podría afectar la toma de decisiones y las conductas de riesgo en la etapa adulta. Sin embargo, no existen aún trabajos previos que hayan estudiado los efectos del estrés incontrolable en la adolescencia en una tarea de *gambling*.

Los objetivos de este experimento fueron (i) estudiar los efectos inmediatos del estrés crónico controlable e incontrolable sobre la anhedonia y (ii) valorar los posibles efectos a largo plazo del estrés controlable e incontrolable sobre la impulsividad en situaciones de riesgo. Dado que la prueba de anhedonia no afecta a la conducta posterior se utilizó la misma cohorte de animales. La exposición a estrés incontrolable se espera que aumente las conductas de riesgo en la etapa adulta, mientras que la exposición a estrés controlable debería disminuir las conductas propensas al riesgo.

Diseño experimental.

Este experimento se realizó en dos tandas independientes. Una primera tanda de 30 animales (10 CONTROL, 10 MASTER y 10 YOKED) y una segunda tanda de 60 animales (20 CONTROL, 20 MASTER y 20 YOKED). Independientemente de la tanda, todos los sujetos fueron expuestos a 8 sesiones no consecutivas de estrés, entre PND 35 y PND 57 (promedio ± 1). En la etapa adulta, todos los sujetos llevaron a cabo la RGT que evalúa impulsividad cognitiva en situaciones de riesgo. Además, en la primera tanda se volvió a evaluar los efectos del estrés adolescente en la maduración sexual, mientras que en la segunda tanda se valoraron los posibles efectos inmediatos del estrés incontrolable sobre la anhedonia medida en el test de consumo de sacarina. En la tabla 18 se presentan ambos diseños experimentales, aunque los datos se han analizado conjuntamente, cuando ha sido pertinente.

Tabla 23. Grupo experimentales y diseño del capítulo 4.

| GRUPO | N | PND 28 - 44 | PND 33-39 a 54-60 | | PND 66-70 a PND 96-100 |
|---------|----|---------------------|--------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| CONTROL | 10 | MADURACIÓN SEXUAL | EXPOSICIÓN A LA CAJA LANZADERA | | TAREA DEL RGT |
| MASTER | 10 | MADURACIÓN SEXUAL | ESTRÉS CONTROLABLE | | TAREA DEL RGT |
| SLAVE | 10 | MADURACIÓN SEXUAL | ESTRÉS INCONTROLABLE | | TAREA DEL RGT |
| GRUPO | N | PND 26-30 a 30-34 | PND 31-35 a 53-57 | PND 53-57 a 56-60 | PND 66-70 a PND 100-104 |
| CONTROL | 20 | LÍNEA BASE SACARINA | EXPOSICIÓN A LA CAJA LANZADERA | TEST DE LAS DOS BOTELLAS | TAREA DEL RGT |
| MASTER | 20 | LÍNEA BASE SACARINA | ESTRÉS CONTROLABLE | TEST DE LAS DOS BOTELLAS | TAREA DEL RGT |
| SLAVE | 20 | LÍNEA BASE SACARINA | ESTRÉS INCONTROLABLE | TEST DE LAS DOS BOTELLAS | TAREA DEL RGT |

En el panel superior, la primera tanda de animales y en el panel inferior, la segunda. De los días 1 a 23-29 experimentales, se llevó a cabo la exposición a estrés. De los días 23 a 26 experimentales, se realizó el test de las dos botellas (segunda tanda). Del día 37 al 67-71 experimental se realizó el Rat Gambling Task (RGT), en las dos tandas. Obsérvese que en la tabla se indica la edad de los animales, no el día experimental.

Resultados.

En el estudio de la RGT se eliminaron un total de 10 sujetos: 4 del grupo CONTROL (3 no superaron las fases de pre-entrenamiento de la tarea y 1 era *outlier*), 5 del grupo MASTER (3 por problemas técnicos durante la TWAA y 2 *outliers*) y 1 del grupo YOKED (no superó las fases de pre-entrenamiento de la tarea). La muestra final fue de CONTROL $n = 26$, MASTER $n = 25$ y YOKED $n = 29$.

1- Efectos sobre la maduración sexual en la adolescencia.

Antes y durante la exposición a estrés, se valoró el proceso de maduración sexual, mediante un sistema de calificación del 0 al 2. En este experimento, se inició la valoración cuando los sujetos tenían PND 28. La figura 40 muestra, para cada PND, el porcentaje de sujetos en cada estadio de maduración, del PND 28 al 44. El análisis de supervivencia de Kaplan-Meier mostró que no había ningún efecto del factor GRUPO en la curva de maduración sexual, siendo por lo tanto independiente de la exposición al estrés, en consonancia con los resultados del experimento anterior.

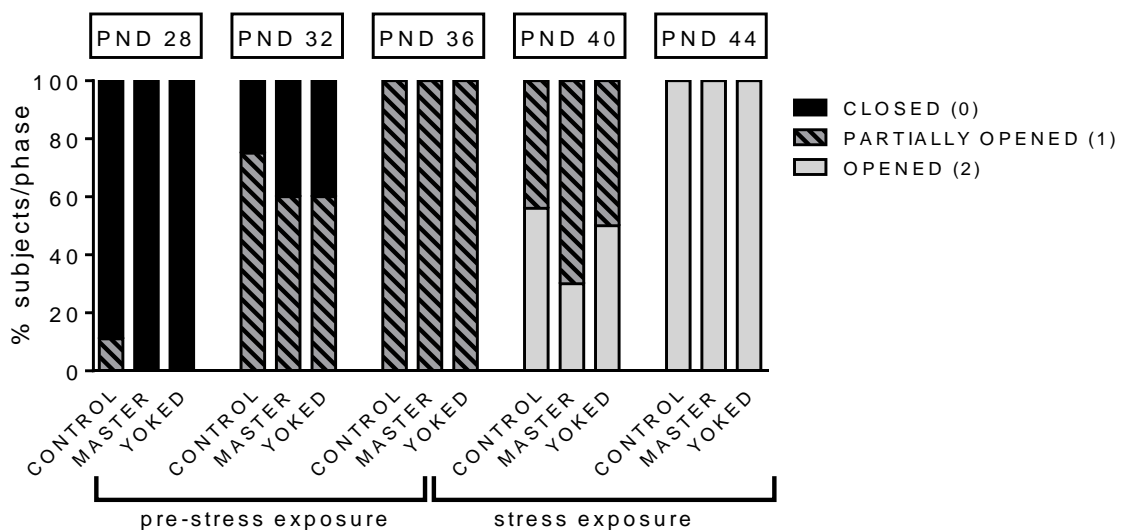


Figura 40. Evolución de la maduración sexual antes y durante la exposición a estrés adolescente. Se representa el porcentaje de sujetos en cada estadio de maduración. Para valorar la maduración sexual, se observa la apertura del prepucio. Se asigna un valor para cada uno de los 3 estadios: 0 cerrado, 1 parcialmente abierto y 2 completamente abierto. Se realizaron 5 valoraciones cada 4 días, empezando el PND 28. Grupos CONTROL ($n = 9$), MASTER ($n = 10$) y YOKED ($n = 10$). No se observaron diferencias entre los grupos.

2- Efectos a corto plazo sobre el consumo de soluciones dulces.

Los datos del consumo de sacarina se analizaron mediante un GEE de 2 factores: GRUPO y DÍA (Figura 41). El consumo de agua durante dicha prueba fue mínimo, mostrándose una elevada preferencia por las soluciones dulces. El análisis mostró que la exposición a estrés no modificó el consumo de sacarina, y la ingesta se mantuvo estable a lo largo de los días.

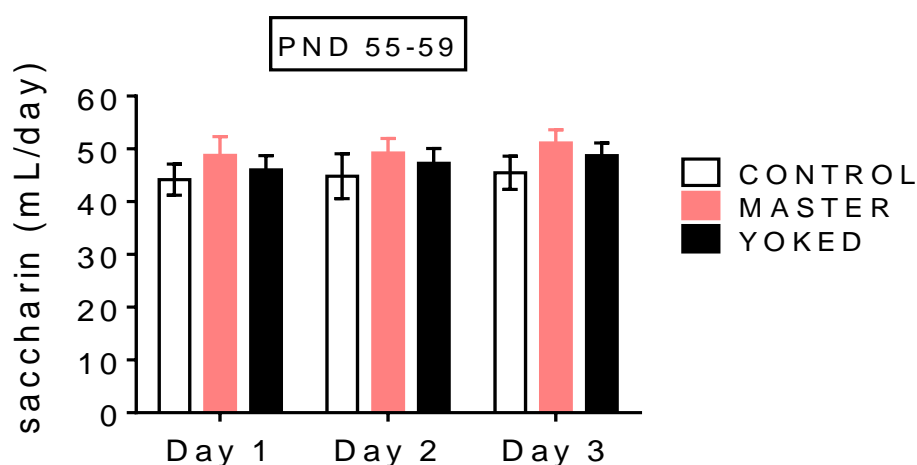


Figura 41. Efectos del estrés adolescente sobre el consumo de sacarina en la prueba de consumo voluntario de soluciones dulces. Se analizaron 3 días consecutivos post-estrés (POST). Inmediatamente después de la última sesión de estrés (S8) se colocaron las botellas de sacarina y agua. Se representa las medias \pm SEM. Grupos CONTROL ($n = 15 - 17$), MASTER ($n = 12 - 15$) y YOKED ($n = 16 - 19$). No se observaron diferencias entre los grupos.

3- Rat gambling task.

Entre PND 66 y PND 70 todos los sujetos iniciaron el pre-entrenamiento de la tarea de riesgo.

3.1- Pre-entrenamiento.

Los días empleados en cada fase del pre-entrenamiento (Figura 42) se analizaron mediante un GENLIN de un factor. Se observaron diferencias significativas en los días empleados para superar la fase 1 del pre-entrenamiento: GRUPO [$X^2(2) = 18,8$ $p \leq 0.05$]. Las comparaciones por pares mostraron que el grupo MASTER necesitó más días que el CONTROL ($p \leq 0,001$) y el YOKED ($p \leq 0,01$). En las fases 2 y 3 no hubo efecto GRUPO.

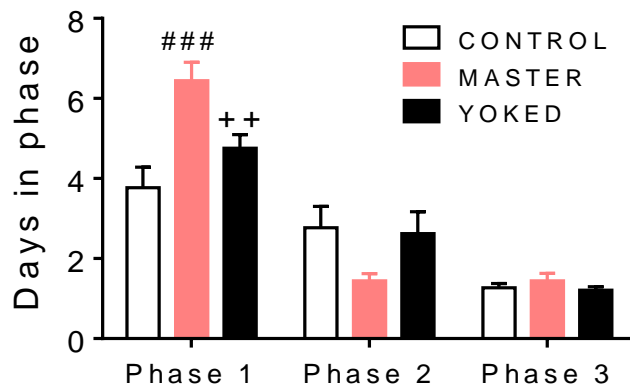


Figura 42. Días en cada fase de pre-entrenamiento durante la tarea del RGT. Se representa las medias \pm SEM. Grupos CONTROL ($n = 26$), MASTER ($n = 25$) y YOKED ($n = 29$). ### $p \leq 0,001$ vs CONTROL; ++ $p \leq 0,01$ vs MASTER.

La duración de cada fase de pre-entrenamiento (Figura 43) se ha analizado con un GENLIN de 1 factor (GRUPO). No se observaron diferencias en la duración de la sesión en las fases 1 y 2, pero sí en la fase 3, detectándose un efecto del GRUPO [$X^2(2) = 6,2$ $p \leq 0,05$]. Los sujetos YOKED necesitaron menos tiempo que los MASTER para finalizar la primera sesión de fase 3 ($p \leq 0,05$), observándose una tendencia a la significación con respecto a los CONTROL ($p = 0,056$). No se observaron diferencias entre CONTROL y MASTER.

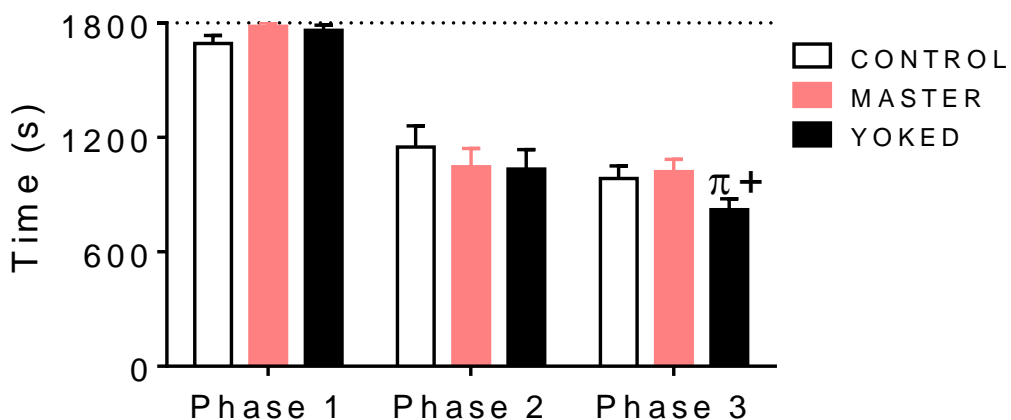


Figura 43. Duración de las sesiones en el primer día de cada fase de pre-entrenamiento durante la tarea del RGT. La duración máxima de las 3 fases de pre-entrenamiento fue de 30 min (o hasta alcanzar el número de pellets objetivo). Se representa las medias \pm SEM. Grupos CONTROL ($n = 26$), MASTER ($n = 25$) y YOKED ($n = 29$). π tendencia ($p = 0,056$) vs CONTROL; + $p \leq 0,05$ vs MASTER.

Finalmente, el número de *pellets* obtenidos en el primer día de cada fase (Figura 44) también se analizó con un GENLIN de 1 factor (GRUPO). Se observó efecto GRUPO en las fases 1 y 2: [fase 1: $X^2(2) = 11,1$ $p \leq 0,01$ y fase 2: $X^2(2) = 6,9$ $p \leq 0,05$]. Los sujetos CONTROL lograron más *pellets* durante el primer día en fase 1 respecto a los MASTER y los YOKED ($p \leq 0,01$, ambas comparaciones). No se observaron diferencias entre los grupos de estrés adolescente. Sin embargo, en la fase 2 fueron los sujetos MASTER los que mayor número de *pellets* obtuvieron, comparado con los CONTROL ($p \leq 0,01$).

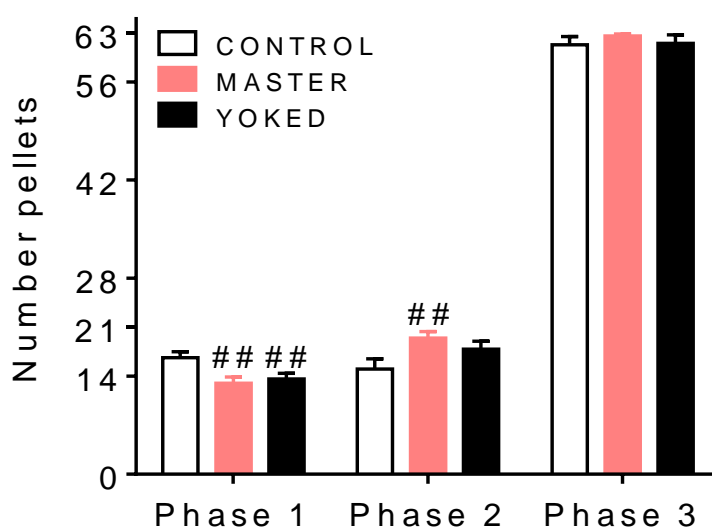


Figura 44. Número de *pellets* conseguidos durante el primer día de cada fase de pre-entrenamiento durante la tarea del RGT. Durante las fases 1 y 2 de pre-entrenamiento, el número máximo de *pellets* a conseguir era de 21, mientras que en la fase 3 era de 63. Se representa las medias \pm SEM. Grupos CONTROL ($n = 26$), MASTER ($n = 25$) y YOKED ($n = 29$). ## $p \leq 0,01$ vs CONTROL.

3.2- Test y Re-test.

Los datos de la principal conducta evaluada durante la tarea del RGT se muestran en la figura 45, y representan el número de respuestas válidas realizadas en cada agujero, que son las que proporcionan refuerzo al finalizar el ensayo. El análisis de las variables se realizó mediante un GEE de 3 factores: GRUPO, SESIÓN y AGUJERO. El análisis del número de respuestas totales mostró efecto del factor GRUPO [$X^2(2) = 9$ $p < 0,05$], de la SESIÓN [$X^2(1) = 10$ $p < 0,05$], del AGUJERO [$X^2(3) = 20$ $p < 0,05$] y de las interacciones SESIÓN x AGUJERO [$X^2(3) = 15$ $p < 0,05$] y GRUPO x AGUJERO [$X^2(6) = 16$ $p < 0,05$]. No se observó efecto de las interacciones GRUPO x SESIÓN o GRUPO x AGUJERO x

SESIÓN. La descomposición de la interacción GRUPO x AGUJERO mostró que los sujetos YOKED realizaban más respuestas en los agujeros H4 y H5 (asociados a *time-out* más cortos) que el grupo CONTROL, siendo este efecto independiente de la SESIÓN ($p \leq 0,05$ en todas las comparaciones). Los sujetos MASTER no mostraron diferencias ni con el grupo CONTROL ni con el YOKED.

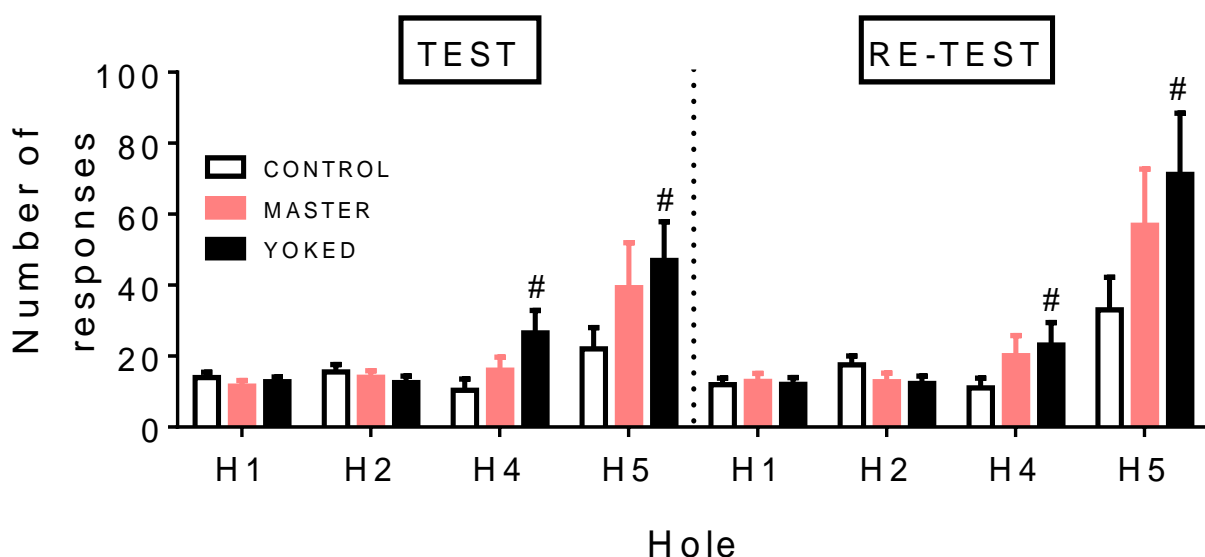


Figura 45. Número de respuestas válidas (liberan pellet) en todos los agujeros disponibles durante las sesiones del TEST y el RE-TEST durante la tarea del RGT. Los 4 agujeros se numeran de H1 a H5 (el H3 está bloqueado). El H1 libera 2 pellets y tiene un *time-out* de 222 s en el 50% de ensayos; H2 libera 2 pellets y tiene un *time-out* de 444 s en el 25% de ensayos; H4 libera 1 pellet y su *time-out* es de 12 s en el 25% de ensayos; finalmente, el H5 libera 1 pellet y tiene un *time-out* de 6 s en el 50% de ensayos. Se representa las medias \pm SEM. Grupos CONTROL ($n = 26$), MASTER ($n = 25$) y YOKED ($n = 29$). # $p \leq 0,05$ vs CONTROL para el mismo agujero.

Otras variables analizadas durante las fases del TEST y el RE-TEST fueron: (i) los ensayos realizados, (ii) los *pellets* obtenidos en total, (iii) el total de respuestas perseverantes durante los *time-out* y (iv) por cada agujero por separado, (v) la latencia de respuesta por agujero y (vi) la latencia para coger el refuerzo.

Los ensayos realizados (Figura 46A) se analizaron con un GEE de 2 factores, GRUPO y SESIÓN. Se observó un efecto del GRUPO [$X^2(2) = 8,07$ $p \leq 0,05$] y de la SESIÓN [$X^2(1) = 13,1$ $p \leq 0,001$], pero no de la interacción. La comparación por pares del factor GRUPO mostró que los sujetos YOKED realizaron un mayor número de ensayos en ambas sesiones, que el grupo CONTROL. Los grupos CONTROL y MASTER no

mostraron diferencias significativas. El total de *pellets* obtenidos (Figura 46B) también se analizó con un GEE de dos factores, que mostró un efecto estadísticamente significativo de la SESIÓN [$X^2(1) = 21$ $p \leq 0,001$], pero no del factor GRUPO ni de la interacción. Los grupos obtuvieron un mayor número de refuerzos durante la reexposición al test que en el test.

Las respuestas perseverantes (Figura 46C) y la latencia para ingerir el refuerzo (Figura 46D) se analizaron con un GLM de medidas repetidas de dos factores (GRUPO y SESIÓN), observándose un efecto estadísticamente significativo de la SESIÓN únicamente en las respuestas perseverantes [$F(1, 77) = 73,6$ $p \leq 0,001$]. El factor GRUPO y la interacción GRUPO x SESIÓN no fue estadísticamente significativo en ninguno de los casos.

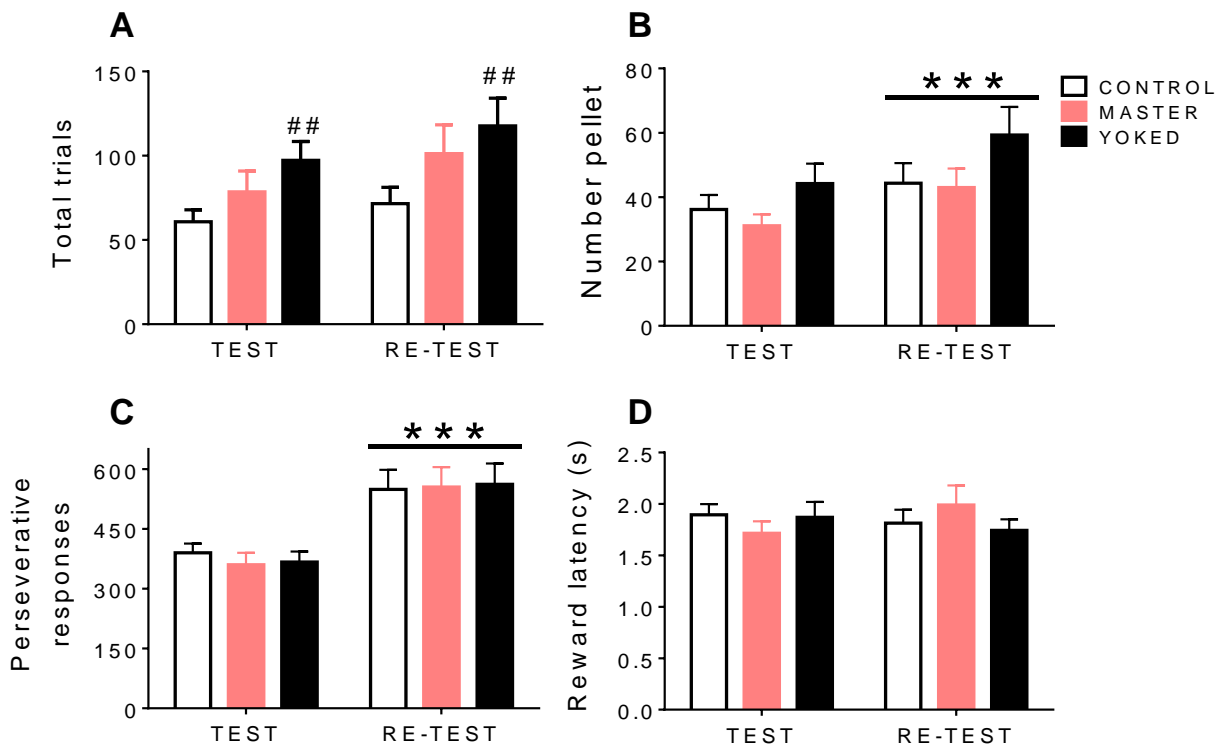


Figura 46. Variables analizadas durante las sesiones del TEST y el RE-TEST durante la tarea del RGT. En (A) ensayos realizados, en (B) total de pellets obtenidos, en (C) sumatorio de respuestas perseverantes durante los time-out y en (D) latencia para comer el refuerzo. Se representa las medias \pm SEM. Grupos CONTROL ($n = 26$), MASTER ($n = 25$) y YOKED ($n = 29$). Cuando los símbolos están sobre las barras horizontales, el efecto es independiente del grupo. ## $p \leq 0,01$ vs CONTROL; *** $p \leq 0,001$ vs TEST.

En la tabla 19 se muestra el número de *pellets* obtenidos en cada agujero. El análisis GEE de tres factores (GRUPO, SESIÓN y AGUJERO) mostró un efecto de los factores

SESIÓN [X^2 (1) = 21,4 $p \leq 0,001$] y AGUJERO [X^2 (3) = 22,1 $p \leq 0,001$] y de las interacciones GRUPO x AGUJERO [X^2 (6) = 15,8 $p \leq 0,05$] y SESIÓN x AGUJERO [X^2 (3) = 17,02 $p \leq 0,001$]. No se observó un efecto significativo del factor GRUPO ni de las interacciones GRUPO x SESIÓN o GRUPO x AGUJERO x SESIÓN. Las comparaciones por pares de las interacciones mostraron diferencias significativas en el número de refuerzos obtenidos por agujero en cada sesión, observándose un mayor número de refuerzos en los agujeros H4 y H5 que en el resto de los agujeros en el TEST ($p < 0,05$ y $p < 0,001$, respectivamente) y el RE-TEST ($p < 0,001$). Además, en las dos sesiones, el grupo YOKED obtuvo un menor número de refuerzos del agujero H2 (asociado a un *time-out* más elevado) en comparación con los CONTROL y los MASTER ($p < 0,05$ en ambos casos).

Tabla 19. Número de pellets obtenidos en cada agujero para los grupos CONTROL, MASTER y YOKED en las sesiones del TEST y el RE-TEST durante la tarea del RGT.

| SESSION | HOLE | CONTROL | | | MASTER | | | YOKED | | |
|----------------|------|---------|------|------|--------|------|------|-------|------|------|
| | | MEAN | SEM | Sig. | MEAN | SEM | Sig. | MEAN | SEM | Sig. |
| TEST | H1 | 4,54 | 0,60 | | 5,72 | 0,67 | | 5,55 | 0,72 | |
| | H2 | 7,54 | 0,92 | | 7,56 | 0,97 | | 4,72 | 0,71 | # + |
| | H4 | 8,15 | 1,78 | ∨ | 7,52 | 2,67 | ∨ | 9,52 | 2,62 | ∨ |
| | H5 | 15,92 | 4,36 | ^^^ | 10,32 | 2,81 | ^^^ | 24,44 | 6,27 | ^^^ |
| RE-TEST *** | H1 | 5,73 | 0,95 | | 5,68 | 0,94 | | 6,66 | 1,04 | |
| | H2 | 8,42 | 1,26 | | 7,80 | 1,24 | | 5,03 | 0,96 | # + |
| | H4 | 8,04 | 2,00 | | 8,32 | 2,15 | | 10,86 | 3,36 | |
| | H5 | 22,26 | 5,90 | ^^^ | 21,16 | 5,63 | ^^^ | 36,93 | 9,29 | ^^^ |

Los 4 agujeros se numeran de H1 a H5 (el agujero H3 está bloqueado). Se representa las medias \pm SEM. Sig: significación estadística. CONTROL ($n = 26$), MASTER ($n = 25$) y YOKED ($n = 29$). *** $p \leq 0,001$ (efecto SESIÓN); # $p \leq 0,05$ vs CONTROL (mismo AGUJERO); + $p \leq 0,05$ vs MASTER (mismo AGUJERO); ∨ $p \leq 0,05$ vs H1 en la misma SESIÓN; ^^ $p \leq 0,001$ vs H1-H2-H4 en la misma SESIÓN.

La latencia para realizar una respuesta (*nose-poke*) en cada agujero se muestra en la tabla 20. Se analizó mediante un GEE de tres factores. Se observó un efecto de la SESIÓN [X^2 (1) = 34,2 $p \leq 0,001$] y del AGUJERO [X^2 (3) = 9,1 $p \leq 0,05$], pero no del GRUPO o de

las interacciones de los factores. Las comparaciones por pares del factor AGUJERO mostraron diferencias significativas en la latencia de respuesta entre los agujeros H1 vs H4 y H5 ($p \leq 0,05$ y $p \leq 0,01$, respectivamente), siendo en ambas sesiones la latencia menor en el H5 (asociado a *time-out* más cortos).

Tabla 20. Latencia de respuesta en cada agujero para los grupos CONTROL, MASTER y YOKED en las sesiones de TEST y el RE-TEST durante la tarea del RGT.

| SESSION | HOLE | CONTROL | | | MASTER | | | YOKED | | |
|----------------|------|---------|------|------|--------|------|------|-------|------|------|
| | | MEAN | SEM | Sig. | MEAN | SEM | Sig. | MEAN | SEM | Sig. |
| TEST | H1 | 17,03 | 2,60 | | 18,91 | 2,22 | | 17,15 | 3,81 | |
| | H2 | 16,11 | 1,72 | | 16,59 | 1,43 | | 17,02 | 2,44 | |
| | H4 | 13,18 | 1,39 | ∨ | 16,75 | 2,01 | ∨ | 16,13 | 2,93 | ∨ |
| | H5 | 12,11 | 1,48 | ∨∨ | 13,72 | 1,74 | ∨∨ | 15,64 | 4,16 | ∨∨ |
| RE-TEST *** | H1 | 11,47 | 1,52 | | 9,78 | 0,90 | | 9,60 | 1,37 | |
| | H2 | 13,18 | 3,69 | | 8,97 | 0,83 | | 8,85 | 1,14 | |
| | H4 | 9,24 | 1,31 | ∨ | 9,05 | 1,16 | ∨ | 9,51 | 1,76 | ∨ |
| | H5 | 7,53 | 0,94 | ∨∨ | 8,55 | 0,75 | ∨∨ | 8,39 | 1,57 | ∨∨ |

Los 4 agujeros se numeran de H1 a H5 (el agujero H3 está bloqueado). Se representa las medias \pm SEM. Sig: significación estadística. CONTROL ($n = 26$), MASTER ($n = 25$) y YOKED ($n = 29$).
*** $p \leq 0,001$ efecto SESIÓN; ∨∨ $p \leq 0,01$; ∨ $p \leq 0,05$ vs H1 en la misma SESIÓN.

Conclusión general.

La exposición previa al estrés adolescente afectó a la ejecución de la tarea de *gambling* evaluada en la etapa adulta. La exposición a estrés incontrolable potenció la preferencia por las recompensas más pequeñas pero asociadas a *time-out* más cortos, mientras que los sujetos expuestos a estrés controlable no difirieron con respecto al grupo control.

CAPÍTULO 5. EFECTOS A LARGO PLAZO DEL ESTRÉS ADOLESCENTE: IMPULSIVIDAD MOTORA.

Planteamiento y objetivos.

Como se ha comentado, la disociación entre la impulsividad cognitiva y motora se ha manifestado repetidas veces (v.g. Fuentes et al. 2014), y existen tareas específicas para estudiar cada constructo por separado. La exposición a aislamiento social o CUS en machos adolescentes aumenta la impulsividad motora en la etapa adulta, sin afectar la impulsividad cognitiva en la tarea de descuento por demora (Baarendse et al. 2013a; Comeau et al. 2014). Sin embargo, tampoco en este caso se ha valorado el posible impacto diferencial de la controlabilidad sobre el estrés.

El objetivo de este experimento fue valorar los posibles efectos a largo plazo del estrés incontrolable y controlable sobre la impulsividad motora y la compulsión mediante la tarea del 5CSRTT. Se asume que la exposición a estrés incontrolable aumentaría las conductas impulsivas y compulsivas motoras (respuestas prematuras y perseverantes) en la etapa adulta, mientras que la exposición a estrés controlable disminuiría dichas respuestas.

Diseño experimental.

Se utilizaron un total de 30 animales: 10 del grupo CONTROL, 10 del grupo MASTER y 10 del grupo YOKED. Todos los sujetos fueron expuestos a 8 sesiones no consecutivas de estrés entre PND 31 y PND 55 (promedio ± 1) y, una vez en la etapa adulta, realizaron la tarea del 5CSRTT. En la tabla 21 se presenta un resumen del diseño experimental.

Tabla 21. Grupos experimentales y diseño del capítulo 5.

| GRUPO | N | PND 30-33 a 53-56 | PND 73-76 a PND 216-219 |
|---------|----|--------------------------------|-------------------------|
| CONTROL | 10 | EXPOSICIÓN A LA CAJA LANZADERA | TAREA DEL 5CSRTT |
| MASTER | 10 | ESTRÉS CONTROLABLE | TAREA DEL 5CSRTT |
| SLAVE | 10 | ESTRÉS INCONTROLABLE | TAREA DEL 5CSRTT |

De los días 1 a 24 experimentales, se llevó a cabo la exposición a estrés. De los días 44 a 187 experimentales se realizó el 5CSRTT. Obsérvese que en la tabla se indica la edad de los animales, no el día experimental.

Resultados.

En el estudio del 5CSRTT se eliminaron dos sujetos, uno del grupo CONTROL y otro del grupo YOKED, debido a que murieron de manera repentina durante el experimento sin causa identificada. La muestra final fue de CONTROL $n = 9$, MASTER $n = 10$ y YOKED $n = 9$.

1- Conducta hasta alcanzar la fase 7 en la tarea del 5CSRT.

La conducta de los sujetos de la F1 a F7 se resume en la tabla 22. Las variables (i) días hasta superar cada fase, (ii) número de ensayos, (iii) porcentaje de respuestas correctas, (iv) porcentaje de respuestas incorrectas, (v) porcentaje de omisiones y (vi) porcentaje de *accuracy* durante el primer día de cada fase se analizaron con un GEE de 2 factores: GRUPO (CONTROL, MASTER y YOKED) y FASE (1 a 7).

El análisis GEE de los días empleados en cada fase mostró un efecto de la FASE [$X^2(6) = 490$ $p < 0,05$] y de la interacción GRUPO x FASE [$X^2(12) = 43,5$ $p < 0,05$], pero no del factor GRUPO. Los datos demuestran que todos los grupos necesitaron más días para superar la F1 que para superar las fases 2 a 4. A partir de la F5, las condiciones de la tarea fueron más exigentes y de nuevo requirieron más sesiones para superar los criterios de cada fase. En la F6, los YOKED fueron los que menos sesiones necesitaron para superar dicha fase, en comparación con los CONTROL ($p < 0,05$) y los MASTER ($p < 0,01$).

El análisis GEE del número de ensayos mostró un efecto del GRUPO [$X^2(2) = 9,03$ $p < 0,05$], de la FASE [$X^2(4) = 1233$ $p < 0,05$] y de la interacción GRUPO x FASE [$X^2(8) = 23,6$ $p < 0,05$]. De nuevo los datos demuestran que todos los grupos realizaron menos ensayos en el primer día en F1, pero en el primer día de las fases 2 a 4 lograron terminar la sesión. No obstante, en las fases 5 a 7 las condiciones de la tarea fueron más exigentes y el número de ensayos más elevado (de 90 a 100), y la mayoría de los sujetos no terminaron la sesión el primer día. De hecho, en la F5 el grupo YOKED completó un menor número de ensayos en comparación con los MASTER ($p < 0,01$).

El análisis GEE del porcentaje de respuestas correctas mostró un efecto de la FASE [$X^2(6) = 2627$ $p < 0,05$], pero no del GRUPO o de la interacción GRUPO x FASE. El análisis GEE del porcentaje de respuestas incorrectas mostró un efecto de la FASE [$X^2(6) = 192$ $p < 0,05$] y de la interacción GRUPO x FASE [$X^2(12) = 55,3$ $p < 0,05$]. Todos los grupos mostraron un aumento significativo de las respuestas correctas el primer día de cada fase

a partir de la F2, aunque a pesar de la interacción no se observaron diferencias significativas entre los grupos. Lógicamente, se realizaron cada vez menos respuestas incorrectas por fase, aunque con algunos matices: el grupo YOKED realizó un mayor número de incorrectas en la F3 en comparación con los MASTER ($p < 0,05$), mientras que los MASTER fueron los que realizaron un menor número de dichas respuestas en la F4 en comparación con los CONTROL ($p < 0,01$).

El análisis GEE de la *accuracy* mostró un efecto del GRUPO [$X^2(2) = 8,4$ $p < 0,05$], de la FASE [$X^2(6) = 3364$ $p < 0,05$] y de la interacción GRUPO x FASE [$X^2(12) = 35,4$ $p < 0,05$]. El análisis GEE del porcentaje de omisiones mostró un efecto significativo de la FASE [$X^2(6) = 381$ $p < 0,05$] y de la interacción GRUPO x FASE [$X^2(12) = 30,4$ $p < 0,05$] y una tendencia a la significación del factor GRUPO [$X^2(2) = 5,7$ $p = 0,056$]. El promedio de *accuracy* aumentó a partir de la F2 y se mantuvo estable a lo largo de las sesiones, en todos los grupos, siendo ligeramente mayor en los MASTER en comparación con los CONTROL solo en la F4 ($p < 0,05$). Por otra parte, el porcentaje de omisiones disminuyó ligeramente en las fases 2 y 3, pero aumentó de nuevo en las siguientes fases, en las cuales las condiciones fueron de mayor dificultad. El grupo CONTROL mostró un mayor número de omisiones respecto a los sujetos YOKED en las F3 y F5 ($p < 0,01$ y $p < 0,05$). En cuanto a los sujetos MASTER, mostraron también un mayor número de omisiones con respecto a los YOKED en las F3, F4, F5 y F6 ($p < 0,001$ en los tres primeros casos, y $p < 0,01$ en la F6).

En estas fases de la tarea, el número de respuestas prematuras, las respuestas perseverativas y las respuestas durante los *time-out* no se muestran, aunque no se observaron diferencias relevantes entre los grupos.

Tabla 22. Resumen de la conducta durante las fase 1 a 7 en la tarea del 5CSRT.

| VARIABLE | PHASE | CONTROL | | | MASTER | | | YOKED | | |
|-----------------------|-------|---------|------|------|--------|------|------|-------|------|-------|
| | | MEA | SEM | Sig. | MEAN | SEM | Sig. | MEAN | SEM | Sig. |
| DAYS IN PHASE | 1 | 4,89 | 0,59 | | 4,50 | 0,27 | | 4,89 | 0,51 | |
| | 2 | 1,00 | 0,00 | | 1,00 | 0,00 | | 1,00 | 0,00 | |
| | 3 | 1,11 | 0,11 | | 1,00 | 0,00 | | 1,44 | 0,24 | |
| | 4 | 3,11 | 0,95 | | 3,10 | 0,87 | | 3,33 | 1,04 | |
| | 5 | 4,22 | 0,57 | | 6,30 | 1,11 | | 7,44 | 1,68 | |
| | 6 | 16,56 | 3,77 | | 20,60 | 4,44 | | 8,55 | 1,63 | # ++ |
| | 7 | 10,22 | 3,31 | | 12,75 | 3,17 | | 15,11 | 4,11 | |
| TRIALS | 1 | 61,33 | 3,87 | | 69,2 | 1,99 | | 64,44 | 1,97 | |
| | 2 | 90,00 | 0,00 | | 90,00 | 0,00 | | 90,00 | 0,00 | |
| | 3 | 90,00 | 0,00 | | 90,00 | 0,00 | | 90,00 | 0,00 | |
| | 4 | 90,00 | 0,00 | | 90,00 | 0,00 | | 90,00 | 0,00 | |
| | 5 | 80,89 | 4,64 | | 88,50 | 1,07 | | 71,66 | 5,75 | ++ |
| | 6 | 98,22 | 1,78 | | 100,00 | 0,00 | | 96,89 | 2,33 | |
| | 7 | 100,0 | 0,00 | | 97,00 | 3,00 | | 99,33 | 0,67 | |
| % CORRECT RESPONSES | 1 | 4,67 | 0,87 | | 7,30 | 0,90 | | 5,33 | 0,94 | |
| | 2 | 56,44 | 2,89 | | 56,70 | 2,56 | | 54,67 | 3,62 | |
| | 3 | 58,67 | 2,65 | | 61,40 | 2,41 | | 57,67 | 4,46 | |
| | 4 | 51,67 | 3,46 | | 53,30 | 2,04 | | 56,67 | 3,34 | |
| | 5 | 44,00 | 3,17 | | 41,90 | 3,29 | | 40,22 | 2,83 | |
| | 6 | 47,00 | 2,85 | | 46,40 | 3,14 | | 50,89 | 3,85 | |
| | 7 | 61,44 | 2,67 | | 58,88 | 3,15 | | 57,78 | 3,32 | |
| % INCORRECT RESPONSES | 1 | 38,33 | 3,72 | | 43,30 | 2,85 | | 39,11 | 4,32 | |
| | 2 | 32,11 | 2,66 | | 29,80 | 2,68 | | 34,55 | 3,37 | |
| | 3 | 26,00 | 2,57 | | 21,4 | 2,14 | | 30,44 | 4,36 | + |
| | 4 | 19,89 | 1,37 | | 13,50 | 1,89 | ## | 19,44 | 2,07 | |
| | 5 | 19,56 | 1,34 | | 17,20 | 1,15 | | 17,89 | 2,41 | |
| | 6 | 18,33 | 2,17 | | 17,00 | 1,56 | | 23,22 | 2,73 | |
| | 7 | 15,00 | 2,31 | | 12,25 | 2,46 | | 17,67 | 2,35 | |
| % ACCURACY | 1 | 11,00 | 1,58 | | 14,30 | 1,41 | | 11,56 | 2,11 | |
| | 2 | 63,67 | 3,06 | | 65,60 | 2,94 | | 61,22 | 3,89 | |
| | 3 | 69,33 | 3,04 | | 74,10 | 2,59 | | 65,33 | 4,94 | |
| | 4 | 71,78 | 2,60 | | 80,10 | 2,56 | # | 74,11 | 3,07 | |
| | 5 | 69,00 | 1,67 | | 70,60 | 1,45 | | 69,78 | 2,54 | |
| | 6 | 72,22 | 2,69 | | 72,90 | 2,47 | | 68,44 | 3,91 | |
| | 7 | 80,78 | 2,60 | | 82,75 | 3,39 | | 77,00 | 2,83 | |
| % OMISSIONS | 1 | 31,11 | 2,89 | | 27,70 | 2,94 | | 32,11 | 6,12 | |
| | 2 | 1,44 | 0,58 | | 3,80 | 1,46 | | 6,56 | 5,70 | |
| | 3 | 6,11 | 0,73 | | 8,10 | 1,39 | | 3,00 | 0,85 | ##+++ |
| | 4 | 20,44 | 2,76 | | 25,90 | 2,40 | | 15,22 | 2,58 | +++ |
| | 5 | 20,67 | 3,41 | | 33,50 | 4,24 | | 18,22 | 2,56 | ##+++ |
| | 6 | 33,11 | 4,13 | | 36,60 | 3,43 | | 23,22 | 3,59 | ++ |
| | 7 | 23,56 | 3,63 | | 26,25 | 2,62 | | 24,00 | 3,74 | |

Se representa las medias \pm SEM. Sig.: significación estadística. CONTROL $n = 9$, MASTER $n = 10$ y YOKED $n = 9$. ## $p < 0,01$; # $p < 0,05$ vs CONTROL; +++ $p < 0,001$, ++ $p < 0,01$, + $p < 0,05$ vs MASTER.

2- Conducta en las fases con ITI prolongado en la tarea del 5CSRT.

Aunque el propósito original fue que los animales progresaran hasta una duración de la luz de 0,5 s, debido a la excesiva dificultad de la tarea se decidió mantener a todos los animales en las condiciones de F7 y variar el ITI, para potenciar la aparición de respuestas impulsivas. Todos los sujetos realizaron dos días consecutivos en fase 7 con ITI de 5 s (condiciones estándar), luego se aumentó a 7 s (durante 17 sesiones) y finalmente a 9 s (9 sesiones). Se calculó, para cada ITI, el promedio de todas las sesiones mencionadas y se analizaron todas las variables con un GEE de dos factores: GRUPO e ITI (5, 7 y 9 s).

El análisis GEE de dos factores del número de ensayos (Figura 47A) reveló un efecto significativo del factor ITI [$X^2(2) = 18,3$ $p < 0,05$] pero no del GRUPO o de la interacción GRUPO x ITI. Se observó una disminución general del número de ensayos terminados durante las sesiones con ITI 7 s en comparación con las de ITI 5 s. No obstante, en las sesiones de ITI 9 s se observó de nuevo un aumento del número de ensayos terminados, lo que podría indicar que los sujetos ya se han habituado por completo a las sesiones de fase 7 con ITI más largos. El análisis del porcentaje de respuestas correctas e incorrectas (Figura 47B y C) reveló en ambos casos un efecto significativo de la interacción GRUPO x ITI [$X^2(4) = 9,6$ $p < 0,05$; $X^2(4) = 11,8$ $p < 0,05$ respectivamente], pero no de los factores por separado. A pesar de estas interacciones, no se observaron diferencias entre grupos dentro de cada fase. En la primera descomposición por pares se observó que los sujetos MASTER realizaban un menor número de respuestas correctas en las sesiones de ITI 9 s en comparación con las sesiones de ITI 7 s (mismo intra-sujeto). No se observaron diferencias en los grupos CONTROL y YOKED. En el caso de las respuestas incorrectas, se observó una disminución de dichas respuestas en los sujetos YOKED en las sesiones de ITI 9 s en comparación con las de ITI 7 s (mismo intra-sujeto). No se observaron diferencias en los otros grupos. El análisis del porcentaje de *accuracy* y de las omisiones (Figura 47D y E) no reveló efecto alguno de los distintos factores. El análisis del tiempo de duración de las sesiones (figura 47F) mostró un efecto del factor ITI [$X^2(2) = 496$ $p < 0,05$] pero no del GRUPO o de la interacción GRUPO x ITI.

El análisis de la latencia en realizar una respuesta correcta o incorrecta (figura 48A y B) reveló un efecto estadísticamente significativo del factor ITI [$X^2(2) = 18$ $p < 0,05$; $X^2(2) = 14$ $p < 0,05$ respectivamente], pero no del GRUPO o de la interacción. El patrón del efecto fue similar en ambos tipos de respuesta, observándose una disminución de las latencias a

medida que el ITI fue en aumento ($p < 0,001$ todas las comparaciones). En el análisis de la latencia promedio en recolectar el *pellet* (Figura 48C) se eliminó un sujeto del grupo MASTER ($n = 9$) al considerarse un *outlier* (promedio de 15, 10 y 29 s para cada uno de los ITI). El análisis no mostró efecto significativo de los factores GRUPO e ITI o de la interacción.

Los resultados más interesantes son los relacionados con la medida de impulsividad. El análisis del porcentaje de respuestas prematuras (Figura 49A) reveló un efecto estadísticamente significativo del factor ITI [$X^2(2) = 104$ $p < 0,05$] y de la interacción GRUPO x ITI [$X^2(4) = 13$ $p < 0,05$]. La descomposición de la interacción mostró un aumento progresivo de las respuestas prematuras en los tres grupos a medida que el ITI aumentó ($p < 0,001$ ITI 5s vs ITI 9s). Además, el grupo YOKED fue el que más respuestas prematuras realizó en las sesiones de ITI 9 s en comparación con los grupos CONTROL ($p < 0,01$) y MASTER ($p < 0,05$). Los grupos CONTROL y MASTER no mostraron diferencias significativas entre ellos. Este efecto fue muy específico de las respuestas prematuras, ya que el análisis del porcentaje de respuestas perseverantes (Figura 49B) no mostró ningún efecto estadísticamente significativo.

Otro índice de inhibición conductual viene proporcionado por las respuestas realizadas durante el *time-out* (Figura 49C). El análisis estadístico reveló un efecto estadísticamente significativo del factor ITI [$X^2(2) = 22$ $p < 0,05$], aunque no del GRUPO o de la interacción. En las comparaciones por pares se observó un aumento de estas respuestas a medida que el ITI aumentaba, siendo este efecto similar en los tres grupos.

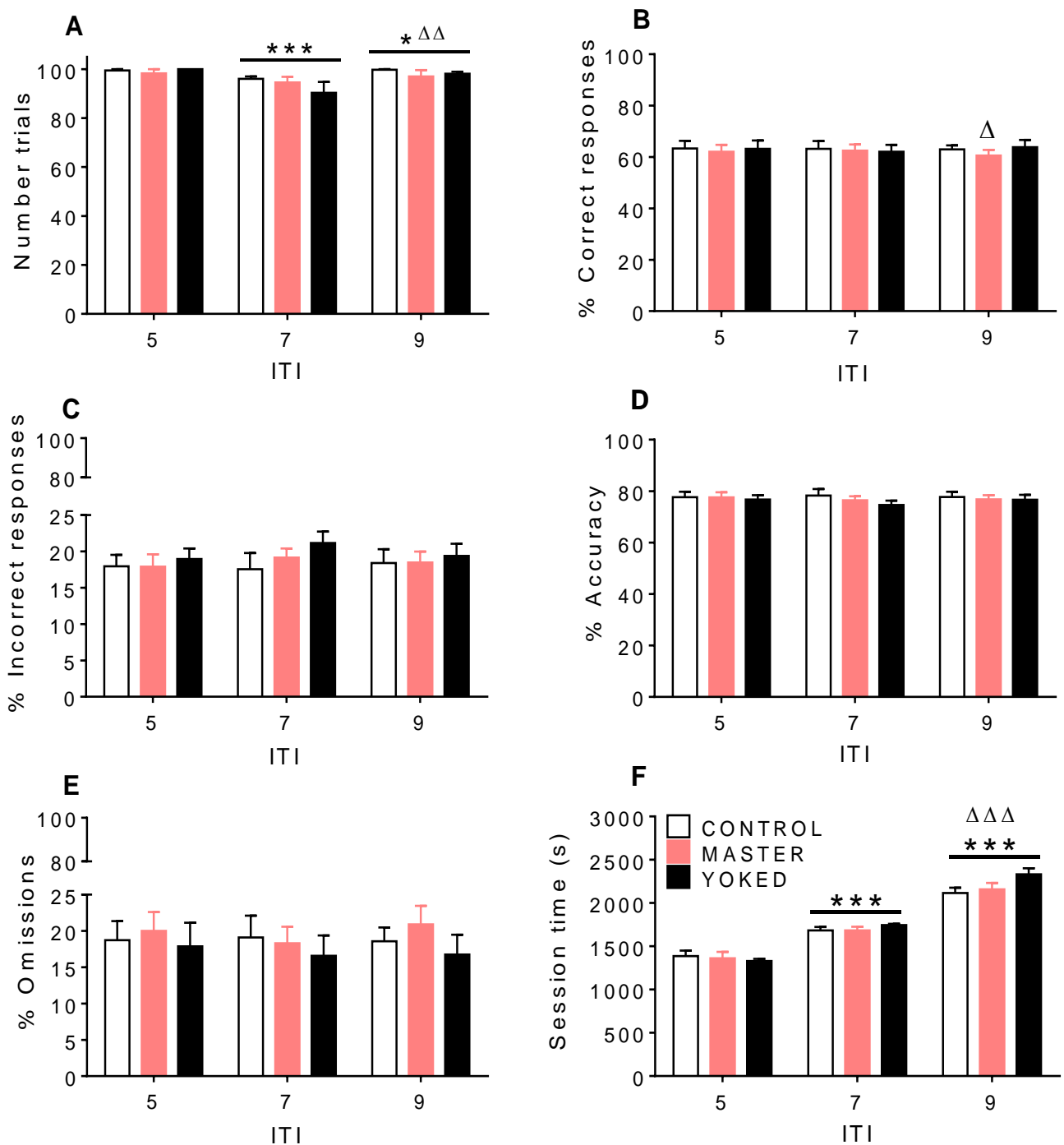


Figura 47. Datos de las sesiones de habituación a la fase 7 y de ITI largo (7 y 9 s) del 5CSRTT en los tres grupos de estrés adolescente. En (A) el número de ensayos, en (B) el porcentaje de respuestas correctas y en (C) el de las incorrectas, en (D) el porcentaje de accuracy, en (E) el porcentaje de omisiones, y en (F) la duración de las sesiones. Se representa las medias \pm SEM. Grupos CONTROL ($n = 9$), MASTER ($n = 10$) y YOKED ($n = 9$). Cuando los símbolos están sobre las barras horizontales, el efecto es independiente del grupo. # $p < 0,05$ vs CONTROL; + $p < 0,05$ vs MASTER; *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ vs ITI 5 s; $\Delta\Delta$ $p < 0,01$, Δ $p < 0,05$ vs ITI 7 s.

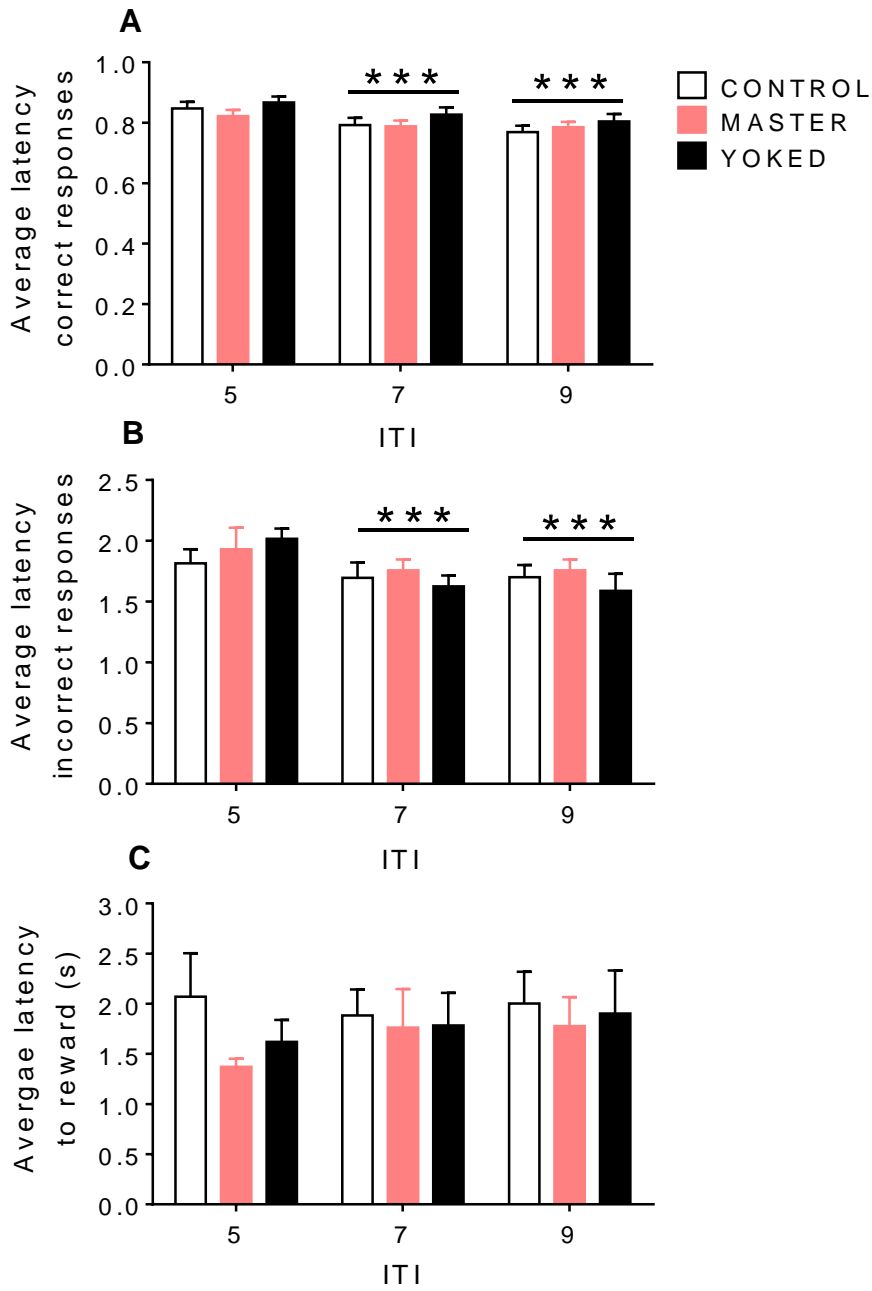


Figura 48. Datos de las sesiones de habituación a la fase 7 y de ITI largo (7 y 9 s) del 5CSRTT en los tres grupos de estrés adolescente. En (A) la latencia media en hacer una respuesta correcta y en (B) una incorrecta, en (C) la latencia media de recogida del pellet. Se representa las medias \pm SEM. Grupos CONTROL ($n = 9$), MASTER ($n = 9$) y YOKED ($n = 9$). Cuando los símbolos están sobre las barras horizontales, el efecto es independiente del grupo. *** $p < 0,001$ vs ITI 5 s.

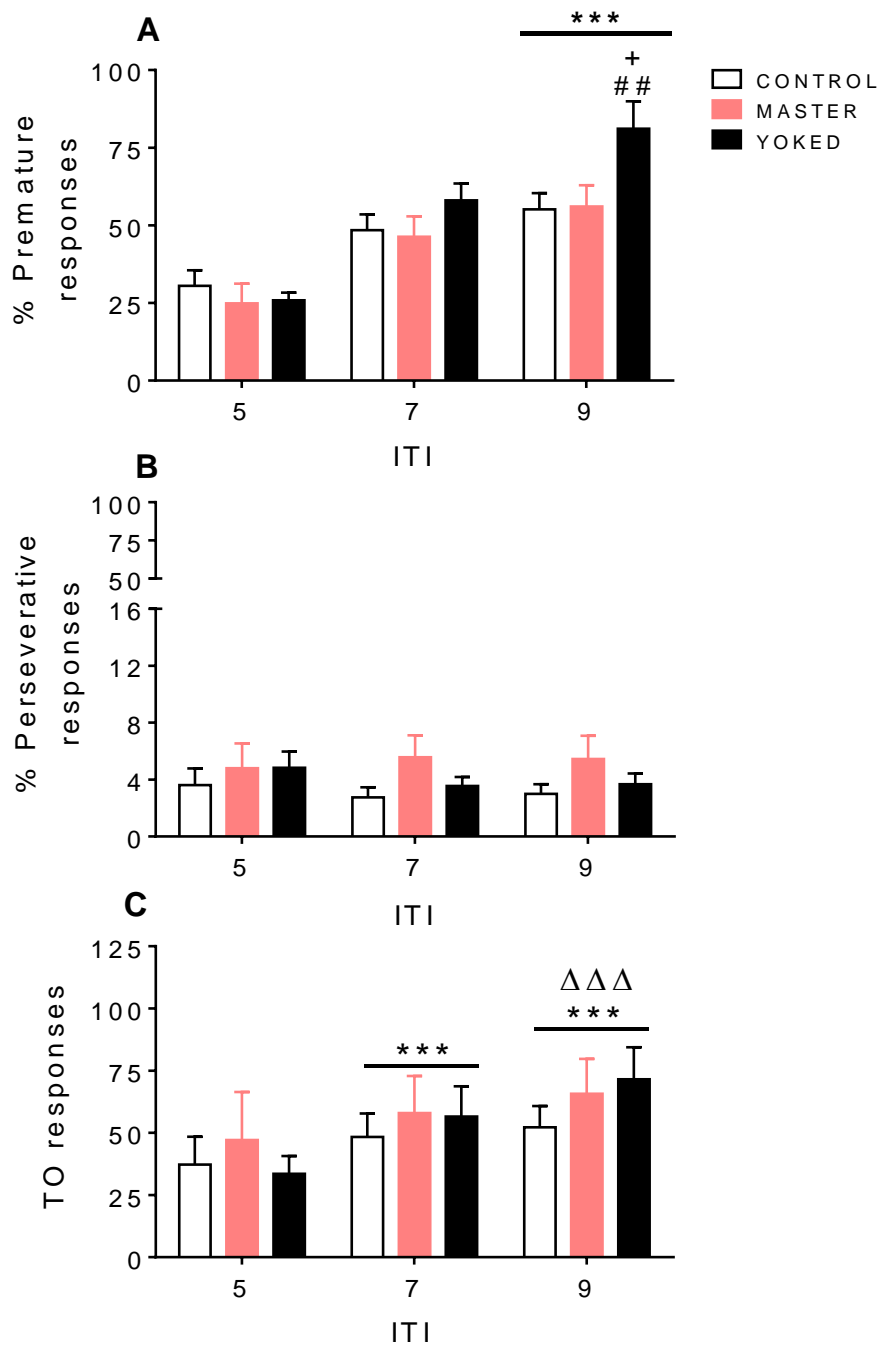


Figura 49. Datos de las sesiones de habituación a la fase 7 y de ITI largo (7 y 9 s) del 5CSRTT en los tres grupos de estrés adolescente. En (A) el porcentaje de respuestas prematuras y en (B) el de perseverantes y en (C) las respuestas durante el time-out. Se representa las medias \pm SEM. Grupos CONTROL ($n = 9$), MASTER ($n = 10$) y YOKED ($n = 9$). Cuando los símbolos están sobre las barras horizontales, el efecto es independiente del grupo. # $p < 0,05$ vs CONTROL; + $p < 0,05$ vs MASTER; *** $p < 0,001$ vs ITI 5 s; $\Delta\Delta\Delta$ $p < 0,001$ vs ITI 7 s.

Conclusión general.

La exposición previa al estrés adolescente afectó a la impulsividad motora evaluada en la etapa adulta mediante la tarea de 5CSRT. La exposición a estrés incontrolable (YOKED) potenció las respuestas prematuras, cuando las condiciones de la tarea fueron muy exigentes, en comparación con los grupos MASTER y CONTROL, los cuales no mostraron diferencias en las variables relacionadas con la conducta impulsiva o compulsiva. Otros parámetros atencionales y motivacionales de la tarea no se vieron afectados.

Discusión General

En el presente trabajo se han investigado los efectos endocrinos y conductuales, a corto y largo plazo, del control sobre el estrés aplicado en la etapa adolescente. Los sujetos fueron expuestos a estrés repetido (choque eléctrico en las patas) durante la adolescencia, utilizando una tarea activa de evitación/escape en una caja lanzadera (TWAA) para el grupo MASTER y un grupo expuesto exactamente a los mismos choques eléctricos que el MASTER pero sin posibilidad de que su conducta fuera contingente con los choques (YOKED). Un grupo CONTROL (naive) se situó en la caja lanzadera sin recibir choques. Unos días o semanas después, los animales se evaluaron en distintas situaciones de estrés o pruebas conductuales para valorar el impacto a corto y largo plazo del estrés.

En respuesta a la exposición repetida al choque durante la adolescencia, los sujetos YOKED mostraron una respuesta hormonal mayor que los MASTER en la última sesión de estrés, indicando que el control sobre el estrés es capaz de amortiguar la respuesta del eje HPA. A juzgar por la ausencia de cambios en el peso de los animales y el tamaño de adrenales y timo, la situación de estrés en el periodo adolescente no fue de intensidad elevada, no afectando ni al grupo MASTER ni al YOKED.

Respecto a las consecuencias posteriores a la exposición al estrés, los sujetos YOKED mostraron a corto plazo mayor hipoactividad en ambientes nuevos, muestra de una mayor generalización del miedo a otros contextos no relacionados con el asociado inicialmente al choque. A largo plazo se observó un efecto ansiolítico de la exposición a estrés controlable, reflejado en una mayor permanencia en los brazos abiertos del EPM, efecto que no se observó tras el estrés incontrolable. Por otro lado, los animales YOKED mostraron una disminución en la frecuencia de ciertas pautas de conducta activa durante el test de interacción social, apoyando la existencia de efectos ansiogénicos de larga duración. También se observó una memoria remota de miedo condicionado al contexto mayor en los sujetos YOKED, mientras que no se observaron diferencias en la memoria reciente.

La falta de control sobre el estrés indujo déficits a largo plazo en la inhibición conductual. Así, los sujetos YOKED adultos mostraron un aumento de la impulsividad motora (respuestas prematuras en el 5CSRTT), así como una mayor preferencia por las recompensas asociadas a *time-out* más cortos (menos tiempo de espera en la tarea de gambling). Dichos efectos no se observaron en los sujetos MASTER y en ninguno de los dos grupos de estrés se demostraron tampoco efectos en pruebas de impulsividad cognitiva (tolerancia a la demora). Finalmente, la experiencia previa con choques en la

adolescencia favoreció las estrategias de afrontamiento activas tras una re-exposición a la tarea de evitación activa en la etapa adulta, observándose un efecto protector incluso en el grupo YOKED respecto al grupo CONTROL, aunque dicho efecto fue mayor en el grupo MASTER. Estos resultados van en contra de la teoría clásica de la indefensión aprendida. En conjunto, los datos indican que la posibilidad de control mitiga algunos de los efectos negativos del estrés en la adolescencia.

1- ESTRÉS DURANTE LA ADOLESCENCIA.

Adquisición adolescente de la tarea de evitación activa en dos sentidos (capítulo 0).

El grupo de animales MASTER (estrés controlable) fue expuesto durante la etapa adolescente a varias sesiones de evitación activa en dos sentidos administradas de forma impredecible en cuanto al día y la hora concreta. Esta tarea permite evaluar la capacidad de aprendizaje/memoria de tipo implícito (o procedimental), viéndose afectada por las estrategias de afrontamiento y la ansiedad de los sujetos (Brush 2003; Steimer y Driscoll 2003). Como se ha comentado, en este tipo de aprendizaje se dan dos procesos de condicionamiento simultáneos, el aprendizaje clásico y el instrumental.

Aunque con notables diferencias individuales, en nuestro trabajo se ha observado un correcto aprendizaje de la tarea con un aumento de las evitaciones a lo largo de las sesiones (especialmente a partir de la S3), mientras que los escapes evidentemente fueron disminuyendo y las respuestas nulas se mantuvieron a un nivel muy bajo. No obstante, el aprendizaje en la mayoría de los sujetos nunca fue completo observándose una asíntota aproximadamente en 30 evitaciones/día (respecto a las 50 posibles), lo que no es sorprendente dado que se considera una tarea difícil al no existir un compartimento “seguro” y otro “peligroso”. Sin embargo, en base a nuestra experiencia el aprendizaje de la tarea es más rápido en sujetos adolescentes que en adultos, en consonancia con los estudios de Bauer (1978), que muestran que el aprendizaje de esta tarea es dependiente de la edad, con un óptimo en roedores entre los 21 y 51 días de edad, aunque no todos los autores están de acuerdo (ver Introducción). Respecto a otras conductas registradas durante la tarea, cabe mencionar que el número de cruzamientos entre ensayos se incrementó también a lo largo de las sesiones (a partir de la S3), de forma paralela al número de evitaciones, observándose una correlación positiva entre ambas variables.

Aunque el número de sujetos MASTER en cada experimento no fue suficientemente alto como para abordar el tema de las diferencias individuales, sería interesante en futuros estudios relacionar las distintas estrategias de aprendizaje desarrolladas en la tarea con el impacto a largo plazo de dicho estrés. Análisis de clúster no publicados de nuestro laboratorio (Cordón-Morillas et al. no publicado) indican, de acuerdo con datos previos (Galatzer-Levy et al. 2014), que existen al menos 4 tipos de animales: los que evitan mucho ya desde la segunda sesión (*rapid-avoiders*), los que van evitando de forma progresiva a lo largo de las sesiones (*model-avoiders*), los que van adquiriendo la evitación pero muy lentamente (*slow-avoiders*) y los que no evitan nunca (*non-avoiders*). En un importante número de estudios, especialmente estos últimos suelen eliminarse.

Desarrollo de miedo condicionado al contexto (capítulos 0 y 2).

Cuando los animales son expuestos a un estímulo aversivo (v.g. choque eléctrico en las patas) en un compartimento concreto, desarrollan condicionamiento de miedo al contexto. El miedo al contexto se da incluso ante un solo choque eléctrico, siempre y cuando los sujetos dispongan de tiempo previo para explorar el ambiente y permitirles elaborar una representación cognitiva de dicho contexto (Fanselow 1984; Landeira-Fernandez et al. 2006; Daviu et al. 2010).

Para caracterizar el posible desarrollo de miedo condicionado al contexto durante el aprendizaje de la tarea en la etapa adolescente se analizó en ambos grupos de estrés el comportamiento durante la habituación al contexto (5 min previos al primer choque). En todos los sujetos expuestos al choque (tanto MASTER como YOKED) se desarrolló, después de la primera sesión, condicionamiento del miedo al contexto, valorado mediante el tiempo de *freezing* y el número de *rearings* y cruzamientos. La exposición repetida a la tarea y al contexto no disminuyó los niveles de miedo en ninguno de los dos grupos (S8 versus S2). Y lo que es más importante, los niveles de *freezing* no fueron diferentes entre ambos tratamientos de estrés, lo que indica que a corto plazo la memoria de miedo al contexto no está afectada por la posibilidad de control. Aunque los resultados en el número de *rearings* apoyan la falta de diferencias entre ambos grupos de estrés, los animales YOKED realizaron progresivamente a lo largo de las sesiones menos cruzamientos en el periodo de habituación (previo al choque) que los MASTER. Discernir si los cruzamientos son una medida más sensible a la intensidad del condicionamiento que el propio *freezing* o si los cruzamientos representan al menos en parte una estrategia

conductual que favorece el aprendizaje de los animales MASTER requiere estudios específicamente designados a tal fin.

El desarrollo de miedo condicionado al contexto tras estrés controlable e incontrolable ha sido previamente evaluado por Liu et al. (2009) y Pryce et al. (2012) en ratones adultos, utilizando una tarea en la que solo el escape es posible (sin posibilidad de evitar). Sorprendentemente, los sujetos MASTER mostraron más *freezing* al contexto que los YOKED. Aunque estos resultados parecen en contradicción con los nuestros, las diferencias en el paradigma de control (evitación/escape versus escape) pueden ser críticas. De hecho, en nuestro laboratorio hemos observado en ratas, utilizando la tarea de escape en la caja lanzadera, que el condicionamiento del miedo al contexto es mayor en las MASTER que en las YOKED (Escrig et al, no publicado). Los procesos subyacentes a este efecto diferencial de la tarea de evitación respecto a la de escape no han sido estudiados previamente, aunque es posible que ese aparente *freezing* sea en realidad un mecanismo de inmovilidad selectiva, preparatorio para escapar más eficientemente del choque.

Aparte de la memoria reciente de miedo al contexto, otro aspecto de gran relevancia es cómo la experiencia previa de control afecta a la memoria remota. En nuestro trabajo, los animales fueron de nuevo re-introducidos en el contexto de la jaula lanzadera (sin tono y sin choque) en la etapa adulta. Los datos muestran que los animales MASTER manifestaban mayores niveles de *freezing* que el grupo CONTROL pero menores que los YOKED, y se observó el patrón inverso en las variables *rearings* y cruzamientos, indicando que la controlabilidad mitiga el impacto del estrés a muy largo plazo (63 días post-estrés). Estos datos están de acuerdo con los del laboratorio de Richter-Levin (Ilin y Richter-Levin 2009; Horovitz et al. 2017), utilizando nuestro mismo modelo MASTER-YOKED. Cuando ambos grupos fueron re-expuestos al contexto de la TWAA (caja lanzadera) dos semanas después, se observaron mayores niveles de *freezing* e inactividad en los sujetos YOKED que en los grupos MASTER y CONTROL.

Puesto que los mecanismos que regulan la memoria reciente del miedo (durante las sesiones de realización de la tarea en la etapa adolescente) pueden ser distintos de los de la memoria remota (Frankland et al. 2006; Restivo et al. 2009; Xu et al. 2012; Tayler et al. 2013; Gräff et al. 2014; Einarsson et al. 2015), es posible que la posibilidad de control sobre el estrés o la falta del mismo afecte de manera diferente a ambos tipos de mecanismos. No obstante, una explicación alternativa es que haya un efecto techo en el

freezing durante la memoria más reciente (durante el periodo adolescente), de tal manera que las diferencias aparecen porque la memoria del miedo es más potente en el grupo YOKED que en el MASTER, siendo por lo tanto más perdurable en el tiempo.

Efectos sobre el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (capítulo 0).

Tras la primera sesión en la tarea de evitación activa (S1) se observó un aumento de los niveles de ACTH y corticosterona típicos de la exposición a estímulos estresantes de elevada intensidad como los choques eléctricos (Márquez et al. 2002; Belda et al. 2004; Lanza et al. 2012). Sin embargo, ni en la toma de muestra posterior a la finalización de la exposición estresante ni durante la fase de recuperación (45 min) se observaron diferencias en la respuesta hormonal debidas a la posibilidad de control.

La exposición repetida al mismo estímulo da lugar habitualmente a una disminución progresiva de la actividad del eje HPA, así como de otras variables fisiológicas (v.g. Armario et al. 1988a,1988b; Márquez et al. 2004). Sin embargo, la adaptación no se da con la misma intensidad en todos los estímulos estresantes y en el caso del choque eléctrico no se observa adaptación bajo algunas circunstancias (Rabasa et al. 2011). En el presente trabajo, la exposición repetida al choque dio lugar a una disminución de los niveles de ACTH y corticosterona en la última sesión (S8) respecto a los observados durante la primera sesión, pero es importante mencionar que el tiempo y la cantidad de choques recibidos fue disminuyendo a lo largo de las sesiones, como consecuencia del aprendizaje de los animales MASTER (que lógicamente afectaba también a los animales YOKED).

Tras la experiencia repetida con la situación estresante (S8), aparecieron diferencias en la respuesta HPA debidas a la posibilidad de control, siendo la respuesta hormonal al choque, especialmente la de ACTH, mayor en los animales YOKED que en los MASTER, a pesar de que los choques recibidos fueron los mismos. Por otro lado, los niveles de ACTH inmediatamente después de la tarea (S8) correlacionaron positivamente con el tiempo de choque solo en los sujetos YOKED y no en los MASTER, sugiriendo que la posibilidad de control añade complejidad a la relación esperada entre intensidad del estrés y respuesta HPA.

La similitud en la respuesta del eje HPA entre los animales MASTER y YOKED en la primera sesión está en consonancia con otros trabajos publicados en ratas con paradigmas de escape o cuando no hay ninguna señal que preceda (anteceda) al choque (evitación tipo

Sidman). Así, no se han encontrado diferencias en la respuesta HPA debidas a la posibilidad de control tras una sola exposición a choques eléctricos en la cola (Helmreich et al. 1999; Maier et al. 1986) o tras exposición repetida a choques eléctricos en las patas en rata o ratón (Mormede et al. 1988; Prince y Anisman, 1990; Helmreich et al. 2008). Sin embargo, en procedimientos en los que una señal antecede al choque y se permite la evitación del mismo (no solo el escape), las ratas YOKED tienen mayores niveles basales de corticosterona el día después de la S6 en comparación con las ratas MASTER, que no difieren de las CONTROL (Lucas et al. 2014). Puesto que los niveles basales a las 24-48 h post-estrés están relacionados con la intensidad del estímulo estresante (v.g. Belda et al. 2016), los datos sugieren que la experiencia repetida de control puede amortiguar el impacto sobre el eje HPA en tareas de evitación pero no de escape, en consonancia con un resultado previo utilizando una sesión muy prolongada de evitación/escape (Tsuda y Tanaka 1985). Es también posible que el eje HPA sea sensible incluso durante la primera sesión a aquellas tareas de escape que requieran una conducta más elaborada que el mero cambio de compartimento, como es el caso de la presión de una palanca (Swenson y Vogel 1983). Por consiguiente, la relación entre posibilidad de control y respuesta HPA es compleja y la presencia de una señal específica (CS) predictiva del estímulo aversivo o la complejidad de la tarea necesaria para escapar del mismo pueden ser de gran relevancia.

Aunque pocos trabajos han evaluado cómo la exposición repetida a estrés controlable durante la adolescencia afecta a la respuesta del eje HPA, el hecho de que en la primera exposición no haya diferencias entre los grupos, pero sí las haya en la última, apoya la hipótesis de que al menos en la tarea TWAA la *experiencia de control* se desarrolla a lo largo del tiempo (Ilin y Richter-Levin 2009). En humanos los datos que indican que la posibilidad de control mitiga el impacto del estrés están realizados tras estrés agudo (Kern et al. 2008; Müller, 2011; Sugaya et al. 2012), por lo que se precisan más estudios en condiciones de exposición repetida.

Otros efectos fisiológicos del estrés durante la adolescencia (capítulos 0, 1, 3 y 4).

La evaluación de la ganancia de peso corporal y la ingesta de comida durante el estrés adolescente no mostró grandes diferencias entre los grupos. La disminución de peso es un efecto típico de las situaciones de estrés de cierta intensidad y suele ir ligada a la reducción de la ingesta (Martí et al. 1994; Pastor-Ciurana et al. 2014). Otros cambios

fisiológicos típicos asociados a la exposición repetida de estrés son el aumento del tamaño de las adrenales y la atrofia del timo (v.g. Márquez et al. 2004). En nuestras condiciones, no se observaron diferencias significativas en el peso relativo de las adrenales o del timo en ninguno de los grupos estudiados. Todos los datos fisiológicos demuestran que la exposición repetida a choques eléctricos en la caja lanzadera durante la adolescencia no tiene los efectos típicos observados con otros estímulos estresantes de elevada intensidad. Es posible que la exposición en días alternos y repartidos en varias semanas diluya el efecto del estrés. Se precisarían estudios adicionales para discernir si la plasticidad del cerebro adolescente induce cierta resiliencia en las condiciones del present trabajo. Los datos previos que comparan la sensibilidad al estrés en adolescentes y en adultos han obtenido resultados distintos en función de las variables analizadas, que han sido desde cambios en el peso y el tamaño de la adrenal hasta ansiedad, estrategias de afrontamiento e interacción social (Doremus-Fitzwater et al. 2009; Jankord et al. 2011; Hetzel y Rosenkranz 2014; Duarte et al. 2015; Sadler y Bailey, 2016; Cotella et al. 2019).

La adolescencia es un período de maduración de los sistemas neuroendocrinos, entre ellos el eje hipotalámico-pituitario-gonadal (Sisk y Foster 2004) y en humanos existen evidencias de un impacto de diversos tipos de estrés sobre la maduración sexual (Parent et al. 2003). Por consiguiente era posible un impacto del estrés en este periodo. Sin embargo, durante la exposición al estrés no observamos tampoco ningún efecto sobre la velocidad de maduración sexual (valorada mediante la separación balano-prepucial) y en PND 44 todos los sujetos alcanzaron el criterio de maduración completa. Aunque en nuestro caso no se ha observado ningún efecto del estrés sobre el inicio de la pubertad, otros protocolos más intensos o de inicio más temprano podrían afectara a la maduración sexual y podría realmente demostrarse si la posibilidad de control afecta o no a la maduración sexual. En la literatura existen pocos datos de estrés en la etapa adolescente, pero la exposición de ratas a CUS durante este periodo no afecta a la maduración sexual en hembras (Comeau et al. 2015), mientras que la exposición repetida a la inmovilización en tubo causa en machos un déficit de maduración testicular valorado a corto plazo (Almeida et al. 2000) y situaciones como la sumisión repetida o la inestabilidad social provocan en la adultez déficits en su comportamiento sexual (Frahm et al. 2011; McCormick et al. 2013).

2- EFECTOS CONDUCTUALES A CORTO Y LARGO PLAZO.

Ansiedad, actividad motora y conductas similares a la depresión (capítulos 1, 2 y 3).

En nuestras condiciones, no se observó a corto plazo (24 h pos-estrés) ningún efecto de la exposición repetida al choque sobre la conducta en el EPM. En cambio, a largo plazo, siguió sin observarse efecto en el grupo YOKED pero sí se observaron en el grupo MASTER, mostrando estos animales un incremento del tiempo en los brazos abiertos, en ausencia de efectos globales en el número de entradas totales. Estos resultados reflejan probablemente una ansiedad reducida y por consiguiente un efecto protector de la experiencia de control en la adolescencia. No existen estudios acerca del impacto de la controlabilidad sobre el estrés en la conducta del EPM en animales adolescentes. En adultos se ha demostrado que la conducta en el EPM no es sensible a la posibilidad de control tras una sola sesión de choques en la cola (Grahn et al. 1995). Nuestros datos apoyan pues la idea de que el control sobre el estrés en la adolescencia podría favorecer la resiliencia.

La literatura general relacionada con la influencia del estrés adolescente sobre la ansiedad es muy controvertida, habiéndose descrito tanto efectos ansiogénicos como ansiolíticos en el EPM y otras pruebas de ansiedad (ver Introducción 5.2-5.4). Algunos de los datos contradictorios podrían explicarse por el tipo o intensidad del estímulo estresante utilizado, pero también por el uso de animales especialmente susceptibles. Por ejemplo, tras la exposición repetida a inmovilización en tubo, los animales que mostraron un incremento en el tamaño de la adrenal fueron clasificados como vulnerables y los que no como resilientes, mostrando los primeros un incremento de la ansiedad en el EPM cuando se valoraba 1 h después de la última inmovilización mientras que se observa una reducción de la ansiedad en los resilientes (v.g. Hetzel y Rosenkranz 2014). De hecho, cada vez se publican más datos sobre un efecto protector, en este caso ansiolítico, del estrés en la etapa adolescente (Parihar et al. 2011; Wilkin et al. 2012; Suo et al. 2013), lo que sugiere que conocer la vulnerabilidad de la cepa de rata o ratón con la que trabajamos es fundamental.

Es importante destacar, dentro de la complejidad de la literatura, que predominan los efectos negativos (ansiogénicos) en los estudios acerca del impacto del estrés adolescente cuando se estudian los animales una vez han alcanzado la etapa adulta (v.g. Avital et al.

2006; Jacobson-Pick et al. 2008; Poirier et al. 2014; Veenit et al. 2014), en comparación con aquellos estudios que han evaluado la conducta a corto plazo (Toledo-Rodriguez y Sandi 2007; Toledo-Rodriguez et al. 2011). Cuando se han comparado en el mismo estudio los efectos a los pocos días (corto plazo) o semanas después (largo plazo), también se observan pocos efectos o efectos ansiolíticos a corto plazo y efectos predominantemente negativos a largo plazo (v.g. McCormick et al. 2008).

Está bien determinado que tras el establecimiento de miedo condicionado al contexto con choques eléctricos en las patas se desarrolla hipoactividad en distintos tipos de ambientes nuevos (Radulovic et al. 1998; Daviu et al. 2014, 2010; Fuentes et al. 2018), efecto que hemos denominado “generalización cognitiva” del miedo dado que aparece en contextos completamente diferentes del original en el que se desarrolló el condicionamiento (Daviu et al. 2014). Por ello, en nuestros estudios a corto plazo los animales fueron expuestos a un ambiente nuevo (HB) a los dos días de finalizar la exposición al estrés con el objetivo de estudiar dicha generalización cognitiva. Se observó hipoactividad tanto en los sujetos MASTER como YOKED (*rearing*s), aunque el efecto fue más robusto en los YOKED, que presentaron también una disminución en el número de deambulaciones. Podemos deducir que el desarrollo de generalización cognitiva es amortiguado parcialmente por la posibilidad de control. Los animales con una historia previa de ausencia de control sobre el estrés percibirían en mayor grado todos los ambientes nuevos como potencialmente peligrosos, de modo que adoptan una conducta de cautela ante ellos. No se ha investigado con anterioridad si la posibilidad de control sobre el estrés mitiga la generalización cognitiva del miedo para poder comparar nuestros resultados con otros previos.

Aunque no podemos descartar un efecto residual del estrés adolescente sobre la actividad en el HB, lo consideramos poco probable por dos razones. En primer lugar, no hemos observado cambios en la actividad general en el EPM. En segundo lugar, los resultados de la literatura sugieren que hay pocos efectos en este sentido 1-2 días después de finalizada la exposición (v.g. Negrón-Oyarzo et al. 2014; Zhang et al. 2017), excepto cuando se utilizan choques eléctricos en las patas, en cuyo caso la hipoactividad es muy consistente y puede persistir semanas después (Spinelli et al. 2013; Aga-Mizrachi et al. 2014; Li et al. 2015, Lyttle et al. 2015; Liu et al. 2017).

También se evaluaron en el presente trabajo las estrategias de afrontamiento en el test de la natación forzada 5 días después de finalizar el estrés (corto plazo). La inmovilidad en esta prueba se reduce tras los tratamientos antidepressivos farmacológicos y no farmacológicos (Porsolt et al. 1977) y se ha interpretado siempre como un indicador de afrontamiento pasivo, similar al que se produce en la depresión (Armario et al. 1988c; Martí y Armario 1993). Los sujetos MASTER mostraron un aumento en la latencia de inmovilidad con respecto a los grupos CONTROL y YOKED, un posible indicativo de conductas de afrontamiento más activas, si bien las medidas clásicas (tiempo de inmovilidad y de escape) no se vieron afectadas. Como respecto a la ansiedad, los efectos del estrés repetido en la adolescencia sobre la conducta en la natación forzada son controvertidos, aunque es muy importante diferenciar entre efectos a corto y largo plazo. Respecto a los efectos a corto plazo, los estudios indican que no suele haber efectos en machos (Mathews et al. 2008; Jankord et al. 2011a; Wulsin et al. 2016), o se incrementa el afrontamiento activo (Eiland et al. 2012), aunque si hay un incremento en la conducta pasiva en hembras (Mathews et al. 2008). En cambio, a largo plazo puede observarse ausencia de efecto (Caruso et al. 2017), incremento (Mathews et al. 2008; Suo et al. 2013) o reducción (Wulsin et al. 2016; Zhang et al. 2017) en el afrontamiento activo.

Respecto al posible impacto específico de la controlabilidad en la prueba de natación forzada, no existen estudios en animales adolescentes, pero sí uno en la etapa adulta utilizando, como en nuestro caso, el modelo de TWAA para el grupo MASTER y sus correspondientes YOKED. Se ha demostrado un aumento de la inmovilidad tras la exposición repetida a estrés incontrolable, así como un aumento de la conducta más activa (*struggling*) en los sujetos expuestos a estrés controlable (Lucas et al. 2014). Se desconoce hasta qué punto el impacto puede ser relativamente permanente.

En general, los efectos observados en el presente trabajo respecto a conductas asociadas a ansiedad y depresión son pequeños comparados con los efectos observados por otros autores tras la exposición a choques eléctricos en la etapa adolescente (ver Introducción 5.2). Una posible explicación, que merece ser comprobada directamente, es la importancia que pudiera tener el que el choque eléctrico en las patas tenga lugar en un compartimento único (el diseño característico cuando el choque se utiliza simplemente como estímulo estresante) respecto a nuestro modelo YOKED en el que el animal se puede mover entre dos compartimentos aunque ninguno de los dos sea seguro. Esta

posibilidad podría reducir el impacto del choque incluso en ausencia de control sobre la situación.

La exposición a la prueba de natación forzada sirvió también para evaluar cómo la experiencia de estrés en la adolescencia podía modificar a corto plazo la respuesta del eje HPA a un estímulo estresante de distinta naturaleza (heterotípico). Lógicamente se evaluó también cómo el estrés en la adolescencia afectaba a la actividad basal del eje HPA cuando aún estaban siendo expuestos al estrés, pero siempre 24 h después de la última exposición. No se observaron diferencias entre grupos en los niveles basales de ACTH, pero sí un ligero descenso en el grupo YOKED en los niveles de corticosterona que no tiene una explicación obvia. Un incremento en los niveles basales, especialmente de corticosterona, suele observarse tras la exposición a situaciones de estrés crónico de elevada intensidad (v.g. Armario et al. 1988b; Marquez et al. 2004; Marti et al. 1993), lo que no parece el caso a juzgar por la ausencia global de efectos sobre distintos marcadores globales de estrés crónico (peso corporal y de las adrenales) a los 10 días de finalizada la exposición al estrés adolescente. Lo esperado sería una ausencia de efecto, dado que el modelo no parece de gran intensidad, o en todo caso un ligero incremento en el grupo YOKED, teniendo en cuenta que este grupo respondía más que el grupo MASTER en la última sesión.

La respuesta hormonal a la prueba de natación forzada cinco días después de la última sesión de choque, fue mayor en los animales con experiencia previa de estrés. Mientras que los niveles de ACTH en respuesta al nado fueron superiores a los del grupo CONTROL tanto en el grupo MASTER como en el YOKED, en el caso de la corticosterona solamente se observaron diferencias significativas respecto al CONTROL en el grupo YOKED. Aunque la pequeña discrepancia entre los grupos MASTER y YOKED es difícil de explicar, nuestros resultados indican que la experiencia previa de estrés ha sido capaz de sensibilizar a la respuesta del eje HPA frente a nuevas situaciones de estrés.

En animales adultos, la exposición aguda y crónica a situaciones de estrés de elevada intensidad puede inducir sensibilización de la respuesta del eje HPA y también de otras respuestas fisiológicas y conductuales, aunque se ha abusado de una excesiva generalización de dicha conclusión (ver revisión Belda et al. 2015). Una de las razones fundamentales de las discrepancias radica en la intensidad y naturaleza del estímulo estresante inductor de la sensibilización, pero nuestros experimentos con situaciones de

estrés agudo han puesto de manifiesto que la duración y, en menor medida, la intensidad del nuevo estímulo estresante es crítica para detectar sensibilización (Belda et al. 2016). Estos parámetros pueden explicar las discrepancias e inconsistencias en la literatura. Teniendo en cuenta que la exposición al nado tuvo lugar 5 días después de la última sesión de choques y que el tiempo de exposición al nado y su intensidad (20 min, moderada) no son las óptimas para detectar sensibilización (Belda et al. 2016), el efecto es notable. No es descartable la posibilidad de que el choque eléctrico sea un estímulo estresante que predisponga especialmente a la sensibilización (Rabasa et al. 2011).

Una explicación alternativa es que la sensibilización heterotípica tras un estrés crónico sea más potente o duradera en animales jóvenes que en adultos. Sin embargo, en el único estudio comparable, la exposición a CUS en la etapa adulta pero no en etapas adolescentes, incrementó al día siguiente la respuesta de la corticosterona a un nuevo estímulo (natación forzada) (Jankord et al. 2011). Puesto que no se estudió la respuesta de la ACTH, no puede descartarse que el efecto sea una mera consecuencia de un incremento en la respuesta máxima de la adrenal a la ACTH, efecto que es típico de la exposición a CUS en la etapa adulta (Armario et al. 1985; Ulrich-Lai et al. 2006). Cuando se ha estudiado en machos la influencia de la edad de exposición al estrés crónico sobre la sensibilización del eje HPA más a largo plazo (semanas después), los resultados indican sensibilización tras CUS adulto pero no adolescente (Cotella et al. 2019). Con un modelo de inestabilidad social, la exposición adolescente no alteró la respuesta de la corticosterona a la inmovilización en tubo ni en machos ni en hembras, pero la exposición adulta incrementó la respuesta de la corticosterona al estrés agudo, aunque solo en hembras (McCormick et al. 2005). En los estudios que se han limitado a trabajar con animales adolescentes, los resultados son poco consistentes (Cruz et al. 2012; McCormick et al. 2008; Mathews et al. 2008; Wulsin et al. 2016) con el agravante de que no se ha estudiado la respuesta de la ACTH.

La disminución en el consumo de soluciones dulces es un indicador de anhedonia o de la incapacidad para experimentar placer (v.g. Katz 1982; Willner et al. 1987). En nuestro caso no se han observado diferencias debidas a la exposición al estrés. Diversos trabajos han demostrado que el consumo de sacarosa disminuye tras la exposición a modelos de CUS (ver revisión Willner, 2017). Los resultados no son tan evidentes cuando se utiliza el consumo de sacarina (v.g. Gronli et al. 2005), pero las situaciones de estrés de elevada intensidad son capaces de reducir también el consumo de sacarina (Pastor-Ciurana et al.

2014). Por lo tanto, los resultados vuelven a apoyar la idea de que los modelos de estrés crónico utilizados en el presente trabajo no han sido de elevada intensidad. En cuanto a los escasos trabajos con sujetos adolescentes que han evaluado los efectos del estrés sobre el consumo/preferencia de sacarosa, los resultados indican un descenso si se estudian durante la situación crónica de estrés o al día siguiente pero no unas semanas después (Eiland et al. 2012; Zhang et al. 2017). En ratones expuestos a un modelo de estrés social adolescente, solamente se observa, transcurridas unas dos semanas, un descenso en hembras (Caruso et al. 2017). En un modelo de CUS en ratas también se observa descenso en la preferencia por sacarosa en hembras pero no en machos (Pohl et al. 2007) y, de hecho, con diversos modelos de estrés adolescente, los resultados indican consistentemente que los machos no están afectados (Chaby et al. 2013; Luo et al. 2014; Kim y Anderson 2015).

No se han encontrado trabajos en que se valoren los efectos de la posibilidad de control sobre la anhedonia en sujetos adolescentes. En ratas adultas, la exposición tanto a choques en la cola escapables (MASTER) como inescapables (YOKED) reduce la preferencia por sacarosa y la exposición previa a choque escapable no previene de la reducción causada por el choque inescapable, a pesar de que sí previene del impacto negativo sobre la interacción social (Christianson et al. 2008). Por consiguiente, no parece que esta variable sea sensible al control sobre el estrés.

Tras experiencias de estrés repetido en la adolescencia se ha descrito, en sujetos ya adultos, una disminución del tiempo de exploración social y/o una disminución de la frecuencia de los encuentros sociales (Toth et al. 2008; Cordero et al. 2013; Márquez et al. 2013; Poirier et al. 2014; Veenit et al. 2014, 2013). En nuestras condiciones, el test de interacción social ha demostrado ser sensible a los efectos a largo plazo de la posibilidad de control, observándose más conducta activa en los MASTER y más conducta pasiva en los YOKED. Además, los animales YOKED realizaban menos conducta activa de seguimiento o *following*. Por otra parte, durante la prueba de interacción social los sujetos YOKED mostraban menos actividad motora, lo cual apoya los datos encontrados más a corto plazo en el HB.

Una disminución en la interacción social se considera normalmente asociada a un aumento de la ansiedad (File et al. 2003) y suele ir paralela a cambios en el EPM (v.g.

Parent et al. 2012). En nuestro caso no se observaron efectos ansiogénicos en el EPM tras la exposición a estrés incontrolable, a pesar de la disminución en la interacción social, apoyando otros estudios en que ambas medidas están disociadas (v.g. Seillier y Giuffrida 2018). La conducta social es compleja y se ve influenciada por múltiples factores, pudiendo reflejar también cambios en la motivación. Por consiguiente, este efecto del estrés incontrolable podría deberse también a anhedonia o falta de interés para realizar contactos sociales. De hecho algunos autores interpretan la falta de exploración social como un fenotipo asociado a una conducta similar a la depresión (v.g. Seiglie et al. 2015). Se requerirían estudios paralelos dirigidos a medir más específicamente otras formas de conducta social para precisar más los efectos (v.g. condicionamiento de la preferencia por un lugar, la prueba de los tres compartimentos, o bien tareas basadas en el esfuerzo).

Nuestros datos sobre interacción social están en consonancia con los publicados por el laboratorio de Maier (v.g. Christianson et al. 2008; Amat et al. 2016; Dolzani et al. 2016), en los que la exposición a una única sesión de estrés incontrolable en animales adultos reducía a corto plazo la interacción con ratas juveniles. En la literatura sólo tenemos constancia de un trabajo comparando el impacto a largo plazo del estrés controlable *versus* el incontrolable en la etapa adolescente (PND 35). En esta etapa, la exposición a una sesión de choques escapables (MASTER) favorece la conducta social medida al día siguiente, en tanto que la exposición a choques inescapables (YOKED) la reduce (Kubala et al. 2012), lo que indica un efecto bidireccional del factor controlabilidad. El efecto positivo MASTER puede observarse aún 5 semanas después, pero el negativo YOKED ha desaparecido. Como ocurre con otros parámetros, también se observa inmunización, dado que la experiencia previa de escapabilidad protege de los efectos de una exposición a choques inescapables. Es interesante que el grupo YOKED adolescente no experimente una reducción de la interacción social tras una nueva experiencia YOKED en la etapa adulta, sugiriendo también un cierto grado de protección homotípica.

Re-exposición adulta a la tarea de evitación activa en dos sentidos (capítulo 2).

Al objeto de estudiar cómo la experiencia de control en la adolescencia podía afectar a largo plazo a las estrategias de afrontamiento en situaciones futuras similares, cada uno de los tres grupos experimentales adolescentes (CONTROL, MASTER y YOKED) fueron expuestos a cada una de las tres situaciones en la etapa adulta, obteniéndose 9 grupos experimentales diferentes. Los dos objetivos fundamentales fueron: (i) cómo al

cambio en el control podía afectar a la respuesta hormonal a la situación estresante; y (ii) cómo la experiencia de estrés adolescente afectaba a la conducta en una tarea TWAA en la etapa adulta (grupos MASTER adulto).

En la TWAA, los sujetos sin experiencia previa de estrés (grupo CONTROL adolescente) ejecutaron la tarea de forma relativamente ineficiente (10% de evitaciones) si se comparan con los datos de los animales expuestos a la tarea en la etapa adolescente (20% de evitaciones). Estos datos concuerdan con algunos resultados previos de la literatura comparando la ejecución de esta tarea en ratas adolescentes respecto a adultas (Bauer 1978; Myslivecek y Hassmannová 1979), aunque otros estudios sugieren una cierta mejora progresiva con la edad desde la etapa juvenil a la adultez (Spröwitz et al. 2013). Más importante es cómo la experiencia de estrés adolescente afectó a la TWAA. Las ratas con experiencia previa de control (MASTER-MASTER) realizaron en la etapa adulta un 70 % de evitaciones, un nivel de ejecución muy superior a los animales CONTROL-MASTER. Esta mejora de la evitación activa adulta con la experiencia previa en la tarea viene apoyada por estudios previos de Braun y colaboradores en roedores (Gruss et al. 2010; Spröwitz et al. 2013), de tal manera que, tanto en ratas como en ratones, los sujetos pre-expuestos a la tarea entre los PND 24 - 42 tienen un aprendizaje mucho más rápido y eficiente de la misma tarea en la etapa adulta. La experiencia repetida de control en la TWAA también favorece en ratas adultas el aprendizaje ulterior de una tarea similar pero cambiando el estímulo condicionado y mejora la ejecución de una tarea de discriminación olfativa asociada a un refuerzo positivo (Lucas et al. 2014).

Los datos más sorprendentes de este experimento son los obtenidos con los animales del grupo YOKED adolescente que fueron expuestos a la TWAA en la etapa adulta (YOKED-MASTER). Dichos sujetos realizaron la tarea de forma claramente más eficiente que el grupo CONTROL-MASTER, aunque no tan bien como el grupo MASTER-MASTER. Nuestros resultados indican que una historia previa de ausencia de control sobre el estrés en la adolescencia no ha favorecido el desarrollo de estrategias de afrontamiento pasivas, sino al contrario. El hecho es más sorprendente cuando consideramos el comportamiento de los animales durante el período de habituación previo a la tarea. Como ya comentamos en el apartado del condicionamiento del miedo al contexto, tanto los animales MASTER como los YOKED adolescentes mostraron signos de memoria del miedo condicionado al contexto (caja lanzadera) comparados con el grupo CONTROL, siendo el efecto más intenso en las YOKED. Aunque esta tendencia

a la conducta pasiva en las MASTER podría verse compensada por la experiencia previa con la tarea, que favorecería la evitación, esto no explica la mejora observada en las YOKED respecto al grupo CONTROL.

Estos datos se contraponen a la teoría de la indefensión aprendida, basada en los experimentos de Seligman y Maier, que predice que la exposición a situaciones de estrés inescapable dificulta la adquisición posterior de aprendizajes durante los cuales el estímulo estresante es ahora controlable (Seligman y Maier 1967; Maier y Watkins 2005). En concreto, la exposición previa a estrés incontrolable (choque en la cola) da lugar a una disminución del aprendizaje de escape que suele manifestarse en las 24-48 h posteriores (Maier y Watkins 2005). Utilizando, al igual que nosotros, la exposición a una tarea de evitación activa (TWAA) como modelo de estrés controlable, aunque en su caso en ratas adultas, Lucas et al. (2014) han observado un marcado efecto positivo de la experiencia MASTER y tan solo un ligero efecto negativo de la experiencia YOKED en una tarea similar en la que se cambia el estímulo condicionado. Parece por lo tanto que en tareas de evitación, al contrario que en las de escape, los efectos de la ausencia de control son poco obvios.

Por otro lado, en animales adultos, una sola exposición a choques eléctricos inescapables mejora 2 o 3 semanas después la ejecución de los animales en una tarea TWAA (van Dijken et al. 1992; Koba et al. 2001). De forma similar, la exposición a choques inescapables en la cola favorece, al día siguiente, una tarea de evitación de choques en las patas que implica apretar una palanca para evitar/escapar del castigo (Brennan et al. 2005). Los datos en conjunto apoyarían la idea de un cierto efecto protector de la experiencia previa con choques eléctricos cuando el estímulo aversivo de la tarea también es el choque eléctrico y la tarea implica la posibilidad de control. La experiencia previa con choques eléctricos podría reducir el impacto de la re-exposición al mismo estímulo estresante, siendo el efecto más potente si la experiencia ocurre durante la adolescencia que si tiene lugar en la etapa adulta. El efecto protector parece extenderse a otras tareas operantes, pero sería importante conocer si también se extiende a otros estímulos aversivos.

Una explicación adicional, no mutuamente excluyente con la anterior, es que los estímulos estresantes en la adolescencia induzcan, al menos bajo ciertas condiciones, una mayor resiliencia que la misma exposición en la etapa adulta. Sin embargo, como ya hemos comentado anteriormente, si consideramos una serie de variables sensibles al

estrés. los resultados experimentales no indican que existan diferencias claras en este sentido.

En el presente trabajo no solo se estudió cómo la experiencia previa de control sobre el estrés en la adolescencia era capaz de modificar la eficacia en una tarea TWAA, sino también cómo se afectaba la respuesta hormonal en presencia o ausencia de control en la etapa adulta. Aunque los resultados son a primera vista complejos, podemos destacar los aspectos más relevantes.

En primer lugar, los animales expuestos en la etapa adulta al mismo contexto de los choques que en la etapa adolescente (MASTER o YOKED), pero sin recibir choques durante la exposición adulta, mostraron niveles superiores de ACTH y corticosterona que los animales que fueron CONTROL en la adolescencia. Puesto que los grupos MASTER y YOKED mostraron también niveles superiores de miedo al contexto, podemos interpretar esta respuesta del eje HPA como reflejo del condicionamiento del miedo al contexto. Está bien establecido en nuestro laboratorio que el eje HPA es sensible a dicho condicionamiento (Muñoz-Abellán et al. 2009; Daviu et al. 2014, 2012, 2010).

En segundo lugar, tanto los MASTER como YOKED adolescentes respondieron menos que el grupo CONTROL adolescente a la tarea TWAA (grupos MASTER) adulta en términos de ACTH. Sin embargo, no se observaron diferencias en función del tratamiento adolescente en los animales que no podían controlar en la etapa adulta (grupos YOKED). Los datos de ACTH respecto a la tarea TWAA son en gran medida concordantes con los datos conductuales en los que se observó una mejor ejecución de las MASTER y YOKED adolescentes respecto a su grupo CONTROL adolescente. No obstante, las diferencias conductuales entre MASTER y YOKED adolescentes no se reflejaron en la ACTH, probablemente porque la respuesta conductual suele ser más sensible que la hormonal. Esta menor respuesta de aquellos animales con experiencia previa con el choque apoyaría la idea de que dicha experiencia puede haber reducido el afecto aversivo del choque eléctrico, sugiriendo una cierta adaptación homotípica. Sin embargo, es importante destacar que el número e intensidad de choques de los YOKED adultos fue igual al de sus correspondientes MASTER adultos y sin embargo no hubo diferencias entre los grupos YOKED adultos en función del tratamiento adolescente. Por consiguiente, no es una mera menor respuesta al estímulo aversivo *per se*, sino una menor respuesta ligada a la experiencia presente de control sobre el mismo. No se observaron apenas diferencias

en los niveles de corticosterona, muy probablemente por su dificultad para reflejar niveles de estrés que no sean de intensidad baja o moderada.

Después de la exposición a la TWAA adulta (o a la correspondiente situación CONTROL o YOKED), todos los animales se expusieron a una prueba de emergencia, que presumiblemente valora miedo/ansiedad (Aitken 1972). Esta prueba permite a aquellos animales más miedosos resguardarse en zonas protegidas, mientras que los más atrevidos tienen la posibilidad de explorar el ambiente desprotegido y por lo tanto más peligroso. Se observaron diferencias significativas en la latencia de salida del recinto solamente en función del tratamiento adolescente pero no adulto. En concreto, la latencia de salida fue globalmente mayor en los grupos YOKED adolescente que en los grupos CONTROL o MASTER adolescente, sin diferencias entre los dos últimos grupos. Los datos de esta prueba sugieren que la exposición repetida a estrés incontrolable durante la adolescencia incrementa a largo plazo los niveles de ansiedad, efecto que no se observó en otra prueba como el EPM, aunque sí con la interacción social. Dejando de lado el hecho de que puedan existir explicaciones alternativas a la ansiedad en la reducción de la interacción social en el grupo YOKED adolescente, las distintas pruebas conductuales pueden valorar aspectos diferentes de la ansiedad. En el caso de la prueba de emergencia respecto al EPM, el animal está mucho más protegido en la zona segura de la prueba de emergencia que en los brazos cerrados del EPM. No conocemos ningún trabajo previo que haya estudiado el efecto del estrés adolescente sobre la prueba de emergencia, pero en animales adultos, la exposición a una sola sesión de choques eléctricos en las patas incrementa a largo plazo la latencia de salida del recinto (Bruijnzeel et al. 2001).

3- EFECTOS A LARGO PLAZO SOBRE LA IMPULSIVIDAD.

Efectos conductuales y bases neurobiológicas (capítulos 3, 4 y 5).

La exposición a estrés incontrolable durante la adolescencia ha demostrado tener efectos a muy largo plazo relacionados con una disfunción del control de impulsos, valorada por el incremento de respuestas prematuras en la tarea del 5CSRTT. No se observaron alteraciones relevantes en ninguna de las otras medidas en dicha tarea, ni en la adquisición de las diferentes fases, ni en la ejecución final en parámetros atencionales ni motivacionales. Este efecto sobre el control de impulsos fue específico de las respuestas

prematuras, ya que no se observaron diferencias en las respuestas perseverantes. La principal diferencia entre impulsividad y compulsividad reside en que el segundo constructo se caracteriza por realizar de manera persistente una acción inapropiada, no orientada a un objetivo y que da lugar a consecuencias negativas no deseadas (Chamberlain et al. 2006; Fineberg et al. 2010). El aumento de respuestas prematuras sólo se observó cuando las condiciones de la tarea fueron mucho más exigentes, con un tiempo entre ensayos (ITI) de 9 s, pero no cuando el ITI fue de 5 s o 7 s. Muchos trabajos han modificado la duración del ITI (v.g. Fletcher et al. 2007; Robinson, 2012) porque afecta el número de respuestas prematuras basales sin afectar a otros aspectos críticos relacionados con la capacidad para realizar las tareas operantes correctamente (Harrison et al. 1997).

Por otra parte, nuestros datos indican que al estrés adolescente no afectó a la impulsividad cognitiva (tolerancia a la demora), lo que viene a dar apoyo a la disociación entre los distintos tipos de impulsividad, en humanos (MacKillop et al. 2016) y en roedores (Bari y Robbins 2013; Dalley y Robbins 2017; Winstanley et al. 2010). Todos los grupos mostraron una preferencia por la palanca asociada a un mayor refuerzo cuando no existía demora y desarrollaron la esperada disminución de la preferencia por dicha opción a medida que aumentaba la demora entre la realización de la conducta de apretar la palanca y recibir el refuerzo. Otros parámetros evaluados en la tarea de descuento por demora relacionados con motivación (latencia de recogida de pellets) o capacidad de decisión (latencia de elección) tampoco se vieron afectados, indicando de nuevo que el estrés adolescente no ejerció una afectación cognitiva generalizada.

Nuestros resultados son concordantes con datos previos. Se ha descrito que la exposición a aislamiento social durante la adolescencia aumenta la impulsividad motora (5CSRTT), sin afectar la impulsividad cognitiva en la tarea de descuento por demora (Baarendse et al. 2013a). Resultados similares se han observado tras la exposición adolescente a CUS que aumenta la impulsividad motora en 5CSRTT, especialmente cuando se combina con exposición prenatal al alcohol (Comeau et al. 2014), sin afectar a la impulsividad cognitiva en la tarea de descuento por demora (Brydges et al. 2015).

Nuestros datos respecto a la impulsividad motora están en cierta manera en consonancia con los obtenidos en la tarea de riesgo (*gambling*). Los sujetos YOKED mostraron una mayor preferencia por los agujeros H4 y H5, los cuales van asociados a *time-out* muy cortos, de entre 6 s y 12 s. En cambio las opciones asociadas con *time-out* más

prolongados (donde se requiere “esperar” más tiempo antes de la posibilidad de realizar de nuevo la elección y recibir refuerzo) no fueron escogidas por los animales expuestos con anterioridad a situaciones de estrés incontrolable. Sin embargo, en nuestras condiciones, sorprendentemente, los sujetos CONTROL no mostraron una amplia preferencia por ninguna de las opciones ni en el TEST ni en el RETEST, cuando los sujetos ya tienen experiencia con los *time-out* y las contingencias. Estos datos podrían indicar que las condiciones de entrenamiento no fueron óptimas y los sujetos no han aprendido correctamente la tarea. No se han encontrado otros trabajos que hayan abordado los efectos del estrés adolescente sobre la toma de decisiones en condiciones de riesgo para poder compararlos con los nuestros.

La afectación de la impulsividad motora apoya otros estudios de nuestro laboratorio (Sanchís-Ollé et al. en revisión) utilizando otras tareas de control inhibitorio como es la de *probabilistic reversal learning*, que permite evaluar la flexibilidad cognitiva (Bari et al. 2010). Los sujetos YOKED mostraron un mayor número de errores perseverantes y menos *reversals* durante la tarea en la etapa adulta. Estos datos están en consonancia con otros trabajos publicados en sujetos adolescentes expuestos a derrota social (Xu et al. 2016), CUS (Page et al. 2018; Zhang et al. 2017), choques eléctricos (Spinelli et al. 2013) o aislamiento social (Quan et al. 2010). En cambio, cuando hemos evaluado a corto y a largo plazo la ejecución en un laberinto acuático de Morris, tarea hipocampo-dependiente, tras el estrés adolescente controlable/incontrolable, no habiéndose observado efectos (datos no publicados). Aunque los resultados de nuestros estudios sugieren, de acuerdo con la idea de algunos investigadores (Andersen 2003), que las tareas dependientes de PFC podrían estar más afectadas tras la exposición a estrés adolescente, los datos experimentales no permiten concluir por ahora que las tareas dependientes de PFC sean más sensibles al estrés adolescente que las dependientes de hipocampo. Los resultados al respecto son controvertidos, quizás por la variedad de modelos de estrés crónico utilizado (Avital y Richter-Levin 2005; McCormick et al. 2010; 2012; Green y McCormick 2013; Li et al. 2015; Gomes y Grace 2017).

El estrés controlable (MASTER) no tuvo efecto en el presente trabajo sobre ninguna de las tareas operantes utilizadas para valorar la impulsividad. En otros estudios de nuestro laboratorio los efectos se restringen a un impacto negativo muy ligero en algunos parámetros de la tarea de *probabilistic reversal learning* (Sanchís-Ollé et al. en revisión). Nuestros resultados están en consonancia con los del laboratorio de Richter-Levin (Lucas

et al. 2014), en los cuales la exposición repetida a estrés controlable da lugar a un fenotipo resiliente, demostrado mediante el aumento de las estrategias activas en la prueba de natación forzada así como por la mayor capacidad de aprendizaje en una tarea de discriminación de olores. En un contexto más general, los datos presentados apoyan la idea de que la posibilidad de control minimiza los efectos negativos de la exposición a estrés incontrolable (Maier 2015), pero extienden los resultados a la etapa adolescente.

Globalmente el incremento específico en las respuestas prematuras y la preferencia por opciones asociadas a menor tiempo de espera inducidos por la exposición a estrés incontrolable en la etapa adolescente apoyan la idea general (revisada en Watt et al. 2017) de que el estrés en esta etapa afecta a los procesos inhibitorios asociados a las funciones ejecutivas, como consecuencia de su impacto en la actividad de la PFC y los núcleos estriados.

Las estructuras implicadas en el procesamiento del control de los estímulos estresantes son, principalmente, la PFC y el estriado dorsomedial (Amat et al. 2014; Maier, 2015). Está descrito que la exposición a estrés controlable activa las neuronas glutamatérgicas de la PFC (prelímica), las cuales proyectan a las interneuronas (GABA) del núcleo dorsal del Rafe e inhiben la liberación de serotonina. Esta regulación de la serotonina potencia los efectos resilientes observados en los sujetos expuestos a estrés controlable. No obstante, la PFC no es la única área responsable de controlar la conducta en función de si un estímulo estresante es controlable o no. Son necesarias también las proyecciones que envía y recibe del estriado dorsomedial (Maier 2015).

Por otra parte, los déficits descritos en las funciones ejecutivas son debidos a una desregulación de los circuitos que conectan las regiones frontales con los ganglios basales (estriado dorsal y accumbens), y dichos déficits suelen ir asociados a una disfunción dopaminérgica y glutamatérgica (Volkow et al. 2009; Pine et al. 2010; Eagle et al. 2011). La interacción entre las proyecciones dopaminérgicas y glutamatérgicas en el estriado dorsomedial parecen ser críticas para el control de impulsos (Amalric et al. 1994; Chase y Oh 2000; Chiara et al. 1994).

En nuestro laboratorio hemos iniciado el estudio de los posibles cambios en la actividad dopaminérgica causados por el control sobre el estrés en la adolescencia, empezando por la implicación del estriado dorsomedial (Sanchís-Ollé et al. en revisión). Tras la exposición a estrés incontrolable (YOKED), hemos observado, tanto a corto como a largo

plazo, un aumento de las neuronas D2R+ en la región dorsomedial del estriado, pero no en las otras subdivisiones (dorsolateral, ventrolateral y ventromedial). Este aumento no se observó en el grupo MASTER y por lo tanto no es consecuencia del estrés *per se* y podría estar relacionado con la desinhibición conductual observada en el grupo YOKED.

Las poblaciones de las neuronas que expresan receptores D2 en el estriado tienen características particulares. Existen dos tipos de neuronas estriatales de proyección (denominadas neuronas espinosas de tamaño medio) en función de sus proyecciones axónicas y de sus patrones de expresión neuroquímica (ver Dudman y Gerfen 2015 para revisión). Las neuronas espinosas reciben proyecciones dopaminérgicas del mesencéfalo y expresan receptores D1 y D2. Las neuronas que expresan D1 constituyen la “vía directa” que proyecta a la sustancia negra *pars reticulata* y al globo pálido interno, mientras que las que expresan D2 forman la “vía indirecta”, que proyecta a la sustancia negra de forma indirecta a través del globo pálido externo y el núcleo subtalámico. Los receptores D1 activan la adenilciclasa y la actividad electrofisiológica de las neuronas del estriado, en tanto que los receptores D2 inhiben el enzima y reducen la activación electrofisiológica de las neuronas. Por consiguiente, la activación D2 disminuye la actividad de la vía indirecta.

Los datos obtenidos en nuestro laboratorio con los receptores D2 del estriado dorsomedial son especialmente interesantes puesto que se ha sugerido que estas neuronas están implicadas en el control de impulsos y en la compulsión (ver Eagle y Baunez 2010). No obstante, los datos experimentales son aún poco concluyentes. La administración de un agonista D2 en la región dorsomedial incrementa las respuestas prematuras y perseverantes en la tarea del 5CSRTT, sin afectar la atención (Agnoli et al. 2013) y la activación de los receptores D1 en esta estructura empeora la *accuracy* pero no las respuestas perseverantes (Agnoli et al. 2013). Sin embargo, existen resultados opuestos respecto al papel D2 utilizando una tarea de *stop-signal* (Eagle et al. 2011). La hipótesis de que la vía indirecta estaría involucrada en los procesos de “no-go” viene apoyada por datos electrofisiológicos, que indican que las (presumibles) neuronas espinosas de la vía indirecta tienden a “descargar” de forma más pronunciada durante los ensayos en los que se requiere una inhibición de la conducta (Bryden et al. 2012). Los efectos locales de los agonistas D2 inyectados en el dorsomedial sobre la conducta impulsiva/compulsiva son muy similares a sus efectos sistémicos (ver Carli y Invernizzi 2014).

El hecho de que nuestros estudios indiquen que el mismo tratamiento de estrés afecte a la expresión de receptores D2 en el estriado dorsomedial pero no en el dorsolateral es también particularmente interesante. El núcleo dorsomedial está involucrado en la conducta dirigida a objetivos/metras (*goal-directed*) y, como se ha comentado, recibe proyecciones preferentemente de PFC, mientras que el dorsolateral está relacionado con la formación de hábitos y recibe proyecciones preferencialmente de las cortezas sensoriomotoras (v.g. Balleine y O'Doherty 2010 para una revisión). Por otra parte, como ya se ha comentado anteriormente, las lesiones del núcleo dorsomedial incrementan las conductas impulsivas y compulsivas mientras que las del estriado dorsolateral no tienen dicho efecto en la tarea de 5CSRT (Rogers et al. 2001). No existen datos previos sobre el efecto de la lesión del núcleo dorsomedial del estriado en tareas de impulsividad cognitiva, tareas que no se vieron afectadas en la presente tesis. Otros estudios han demostrado que las lesiones en el estriado dorsolateral incrementan la impulsividad cognitiva en una tarea de descuento por demora (Tedford et al. 2015), evidenciando de nuevo la disociación entre los distintos tipos de impulsividad. Nuestros datos son compatibles con la hipótesis de que en adultos el estrés repetido favorece la conducta basada en hábitos sobre la basada en metas (Schwabe y Wolf 2011), al menos en parte a través de la reducción de la complejidad dendrítica de las neuronas de la PFC y del estriado dorsomedial y el aumento de las arborizaciones de las neuronas del estriado dorsolateral (Dias-Ferreira et al. 2009).

Aunque ha sido poco estudiado, el estriado dorsal en humanos está aún en maduración durante la adolescencia (Larsen y Luna 2015). Las ratas adolescentes, pero no las adultas, tienen una gran proporción de neuronas en el estriado dorsal que se activan en anticipación de recompensa (Sturman y Moghaddam 2012). Ya se ha comentado en la Introducción que los adolescentes son más propensos que los adultos a las conductas impulsivas y de riesgo, y, entre otras estructuras, el estriado dorsal podría estar implicado en estas diferencias. En pacientes con trastorno por abuso de sustancias se ha encontrado un número menor de receptores D2 en el estriado dorsal (v.g. Fehr et al. 2008; Lee et al. 2009) y estos niveles de receptores correlacionan negativamente con los efectos subjetivos positivos de la conducta de *gambling* y con la impulsividad (v.g. Boileau et al. 2013). En ratas, niveles bajos de receptores D2 en el estriado dorsal están también asociados a mayor conducta de riesgo (Simon et al. 2011).

En conclusión, los datos sugieren que las neuronas espinosas de tamaño medio de la vía indirecta que expresa receptores D2 y proyectan desde el dorsomedial podrían ser especialmente sensibles a la exposición a estrés adolescente incontrolable, pero no controlable. Se necesitarían estudios futuros para profundizar en el substrato neurobiológico del impacto diferencial a largo plazo del estrés controlable versus el incontrolable en impulsividad y compulsión. Sería necesario también manipular circuitos en la PFC y en el núcleo del estriado dorsomedial para modificar el impacto del estrés en tareas asociadas al control de impulsos. De momento los datos sugieren que el núcleo dorsomedial podría ser de particular importancia en trastornos desarrollados durante la adolescencia que conllevan una transición desde conductas basadas en metas hacia hábitos, como la adicción a drogas, la ludopatía y otros trastornos relacionados con la impulsividad y la compulsión.

4- IMPLICACIONES TEÓRICAS Y CLÍNICAS.

La interpretación de los resultados se enmarca dentro de las teorías que relacionan las experiencias estresantes tempranas con la respuesta a nuevas situaciones de estrés en la etapa adulta. Simplificando, existen dos hipótesis que intentan explicar dicha interacción. La más clásica es la hipótesis del estrés acumulativo, que sugiere que las experiencias de estrés en etapas tempranas incrementan las consecuencias negativas de exposiciones al estrés en etapas posteriores (teoría de *2/3-hits*, McEwen 1998, 2000). La segunda es la teoría del *match/mismatch* (Schmidt 2011; Santarelli et al. 2014), que asume que las consecuencias de las experiencias tempranas dependen de la concordancia entre las condiciones tempranas y las condiciones que se encontrarán posteriormente en la etapa adulta, de tal manera que el impacto negativo del estrés en la etapa adulta será mayor cuando existe discordancia entre ambas etapas (no experiencia de estrés en etapas tempranas pero sí en la etapa adulta) que cuando hay concordancia (estrés en ambas etapas). De alguna manera, las experiencias de estrés tempranas prepararían a los sujetos para experiencias de estrés en la etapa adulta.

En el marco de las dos teorías, nuestros datos ofrecen apoyo parcial a ambas. Por un lado, los datos hormonales y conductuales en respuesta a la tarea TWAA adulta apoyarían la idea de que el estrés adolescente, incluso en ausencia de control, podría ejercer efectos

positivos sobre las consecuencias de nuevas situaciones de estrés, pero los resultados en el FST o en la prueba de emergencia no van en la misma dirección y son más bien neutros respecto a la teoría. En cambio, la adquisición de condicionamiento de miedo al contexto indica que las experiencias de estrés incontrolable en la adolescencia y la etapa adulta dan lugar a un efecto sumatorio.

En la interpretación de los datos obtenidos se ha de tener en cuenta varios aspectos fundamentales. En primer lugar, la aparición de efectos condicionados, incluyendo el condicionamiento al contexto y la generalización cognitiva, que son muy típicos de la exposición a choques eléctricos, el estímulo aversivo utilizado en el presente trabajo. Los efectos condicionados causados por choques eléctricos son muy permanentes y pueden confundirse con efectos no condicionados, hecho especialmente destacable en el fenómeno de la generalización cognitiva. En segundo lugar, siempre que el estímulo aversivo asociado a la experiencia adolescente sea similar al utilizado en algunas pruebas en la etapa adulta, cabe la posibilidad de una adaptación al estímulo. Finalmente, se ha de tener en cuenta que las pruebas conductuales, incluyendo la exposición a ambientes nuevos, van asociadas a un cierto nivel de estrés y cuando se observan diferencias como consecuencias de situaciones de estrés previas es muy difícil distinguir si han aparecido diferencias fenotípicas relativamente estables (de rasgo) o si son fruto de la interacción entre la historia de estrés previo y la nueva situación de estrés, lo que podría interpretarse en términos de sensibilización. Esta duda conceptual surge respecto a la interpretación de los efectos a largo plazo del estrés adolescente sobre los niveles de ansiedad.

El presente trabajo y otros estudios en roedores y humanos ponen de manifiesto la importancia del control y la percepción de control sobre los estímulos aversivos en la vulnerabilidad/resiliencia a los efectos del estrés. La habilidad para controlar las situaciones estresantes en el entorno es un factor crítico para desarrollar un fenotipo resiliente/resistente. Existen muchas diferencias individuales en humanos en la percepción de la posibilidad de control sobre los estímulos aversivos que están relacionadas con las estrategias de afrontamiento (Salomons et al. 2007). En sujetos sanos, en situación de laboratorio, ya se ha comentado que tras la exposición a situaciones no controlables los sentimientos negativos asociados a la rabia, la depresión y a la indefensión son más elevados (Markus et al. 2000; Müller 2011). Además, se ha demostrado que las situaciones incontrolables tienen efectos negativos sobre las

funciones ejecutivas (Henderson et al. 2012) y sobre la memoria del miedo y su extinción (Hartley et al. 2013).

La existencia (o no) de control sobre los estímulos estresantes o la percepción de control tiene también implicaciones clínicas. Es conocido que un factor de riesgo para desarrollar psicopatologías es la atribución de falta de control sobre los eventos estresantes. Por ejemplo, en víctimas de agresiones, la sintomatología de estrés postraumático tiene peor pronóstico cuando la percepción de control sobre los eventos estresantes en general es baja (Kushner et al. 1993). En un estudio con mujeres víctimas de violencia doméstica, se ha observado que los mejores predictores de la aparición de estrés postraumático y depresión son el miedo y la percepción de indefensión (Salcioglu et al. 2017), en consonancia con otros estudios en poblaciones supervivientes de desastres naturales y guerras (Başoğlu et al. 2002; Leticia-Crepulja et al. 2011). Por otra parte, en sujetos adolescentes, los eventos o estados emocionales negativos que se atribuyen a situaciones no controlables están directamente relacionados con una mayor probabilidad de desarrollar depresión, en tanto que no es así cuando estos sentimientos negativos se atribuyen a situaciones controlables (Brown y Siegel 1988). Recientemente, un estudio preliminar en refugiados supervivientes ha demostrado que la percepción de incontrolabilidad y de estrés durante la exposición a torturas puede ser un factor de riesgo muy significativo para el desarrollo de enfermedades mentales como la depresión, el síndrome de estrés postraumático y trastornos relacionados con la agresividad (Le et al. 2018).

Debido a que la adolescencia es un periodo especialmente sensible al estrés, una aproximación para disminuir la vulnerabilidad adulta a las psicopatologías relacionadas con la desinhibición del control de impulsos, podría centrarse durante esta etapa en incrementar la percepción de control mediante terapias psicológicas específicas, como podría ser el entrenamiento en estrategias de afrontamiento activas basadas en la resolución de problemas, o bien la modificación de atribuciones cognitivas negativas. Como afirma el investigador a quien se atribuye la propuesta por primera vez del término “resiliencia” en un contexto científico, dicha resiliencia al estrés se puede fomentar a través de la exposición controlada a retos manejables, más que a través de la evitación de dichos retos (Rutter 2013).

Conclusiones

1. La exposición a estrés repetido controlable (grupo MASTER, tarea TWAA) o incontrolable (grupo YOKED) durante la adolescencia se comporta como un estímulo estresante de intensidad más bien moderada. No se ha observado reducción en el peso corporal o la ingesta de comida, ni tampoco aumento de las glándulas adrenales o atrofia del timo. Tampoco se ha alterado la maduración sexual.
2. Tras la experiencia repetida de estrés adolescente (última sesión) los niveles de la hormona ACTH son mayores en los animales YOKED que en los MASTER, correlacionando estos niveles positivamente con el tiempo de choque únicamente en los sujetos YOKED. Los resultados con la corticosterona apoyan a los de ACTH. Estos datos ponen de manifiesto que solamente con la experiencia repetida en una tarea de evitación/escape la respuesta hormonal del eje HPA es sensible a la posibilidad de control.
3. A corto plazo, la respuesta hormonal de la ACTH ante un estímulo heterotípico como la natación forzada fue mayor en ambos grupos expuestos a estrés (MASTER y YOKED) en comparación con el grupo CONTROL, independientemente de la controlabilidad. Con la corticosterona solo se observa sensibilización heterotípica en el grupo YOKED.
4. A corto plazo, se observa hipoactividad en un ambiente nuevo en los dos grupos expuestos a estrés, siendo más acusada en el grupo YOKED. Además, la latencia de inmovilidad en la prueba de natación forzada es mayor en los sujetos MASTER. Nuestros datos indican que el desarrollo de generalización cognitiva del miedo está mitigado por la posibilidad de control y que dicha controlabilidad potencia parcialmente las estrategias de afrontamiento más activas.
5. A largo plazo, se observa un efecto ansiolítico después de la exposición a estrés controlable en el laberinto elevado en cruz. Por el contrario, la exposición a estrés incontrolable disminuye ciertas pautas de interacción social activa e incrementa la interacción pasiva, apoyando un efecto ansiogénico o una disminución de la motivación social.

6. La memoria contextual de miedo reciente (durante la exposición a la caja lanzadera) fue similar en los grupos MASTER y YOKED y no disminuyó por la exposición repetida al contexto. Sin embargo, la memoria de miedo remota sí fue sensible a la posibilidad de control, siendo el grupo YOKED el que mostró mayores niveles de *freezing*.
7. Tras la exposición a la TWAA en la etapa adulta, los animales con experiencia previa de control en la etapa adolescente (grupo MASTER) mejoraron notablemente la ejecución de la tarea. Sorprendentemente, la experiencia adolescente de incontrolabilidad (grupo YOKED) también tuvo un efecto positivo en la adquisición de la tarea adulta.
8. La respuesta hormonal durante la re-exposición a la caja lanzadera en la etapa adulta muestra un condicionamiento de la respuesta del eje HPA (ACTH y corticosterona) en los dos grupos con experiencia previa de estrés. En los grupos con posibilidad de control en la etapa adulta (tarea TWAA), pero no los de la situación incontrolable, la experiencia previa de estrés en la adolescencia redujo la respuesta de ACTH, sugiriendo una cierta adaptación al estímulo aversivo solamente cuando hay posibilidad de control en la etapa adulta.
9. La exposición a estrés incontrolable durante la etapa adolescente ha demostrado tener efectos a largo plazo sobre la impulsividad motora en la tarea de 5CSRTT, observándose un aumento de las respuestas prematuras en los sujetos YOKED en comparación con los MASTER y los CONTROL. Otros aspectos de la tarea que evalúan atención, motivación o conducta compulsiva no se vieron afectados.
10. En una tarea de riesgo en la etapa adulta, el grupo expuesto a estrés incontrolable en la adolescencia muestra preferencia por las recompensas menores pero asociadas a *time-out* más cortos, es decir, las más inmediatas, lo que apoya posibles alteraciones en la impulsividad.

11. El estrés repetido adolescente no afecta a la impulsividad cognitiva en la etapa adulta, evaluada en la tarea de descuento por demora, demostrando una disociación entre las distintas dimensiones del constructo de impulsividad.

12. En general los resultados sugieren que la posibilidad de control amortigua en algunas condiciones el impacto negativo del estrés repetido en la etapa adolescente. Sin embargo, en contra de lo previsto por la teoría de la indefensión aprendida, hemos observado algunos efectos protectores de exposición previa al estrés en ausencia de control sobre el mismo.

Referencias

- Abela A. R., Chudasama Y. (2013). Dissociable contributions of the ventral hippocampus and orbitofrontal cortex to decision-making with a delayed or uncertain outcome. *Eur J Neurosci*, 37, 640–647.
- Abela A. R., Dougherty S. D., Fagen E. D., Hill C. J. R., Chudasama, Y. (2013). Inhibitory control deficits in rats with ventral hippocampal lesions. *Cereb Cortex*, 23, 1396-149.
- Abush H., Akirav I. (2013). Cannabinoids ameliorate impairments induced by chronic stress to synaptic plasticity and short-term memory. *Neuropsychopharmacology*, 38, 1521-1534.
- Adamec R. (2001). Does long term potentiation in periaqueductal gray mediate lasting changes in rodent anxiety-like behavior produced by predator stress? Effects of low frequency stimulation of PAG on place preference and changes in ALB produced by pred. *Behav Brain Res*, 120, 111–135.
- Adamec R., Walling S., Burton P. (2004). Long-lasting, selective, anxiogenic effects of feline predator stress in mice. *Physiol Behav*, 83, 401–410.
- Adamec R., Shallow T., Burton P. (2005). Anxiolytic and anxiogenic effects of kindling-role of baseline anxiety and anatomical location of the kindling electrode in response to kindling of the right and left basolateral amygdala. *Behav Brain Res*, 159, 73–88.
- Adriani W., Laviola G. (2000). A unique hormonal and behavioral hyporesponsivity to both forced novelty and d-amphetamine in periadolescent mice. *Neuropharmacology*, 39, 334–346.
- Adriani W., Laviola G. (2003). Elevated levels of impulsivity and reduced place conditioning with d-amphetamine: two behavioral features of adolescence in mice. *Behav Neurosci*, 117, 695-703.
- Adriani W., Laviola G. (2006). Delay aversion but preference for large and rare rewards in two choice tasks: implications for the measurement of self-control parameters. *BMC Neurosci*, 7, 52.
- Aga-Mizrachi S., Cymerblit-Sabba A., Gurman O., Balan A., Shwam G., Deshe R., ... Avital A. (2014). Methylphenidate and desipramine combined treatment improve PTSD symptomatology in a rat model. *Transl Psychiatry*, 4, 447.
- Agnoli L., Carli M. (2012). Dorsal-striatal 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors control impulsivity and perseverative responding in the 5-choice serial reaction time task. *Psychopharmacology*, 219, 633-645.
- Agnoli L., Mainolfi P. (2013). Dopamine D₁-like and D₂-like receptors in the dorsal striatum control different aspects of attentional performance in the 5-Choice Serial Reaction Time Task under a condition of increased activity of corticostriatal inputs. *Neuropsychopharmacology*, 38, 701–714.
- Ahsan H. M., de la Peña J. B. I., Botanas C. J., Kim H. J., Yu G. Y., Cheong J. H. (2014). Conditioned place preference and self-administration induced by nicotine in adolescent and adult rats. *Biomol Ther*, 22, 460–466.
- Aitken P. P. (1972). Aversive stimulation and rat's preference for familiarity. *Psychon Sci*, 28, 281–282.
- Albonetti M. E. E., Farabollini F. (1992). Behavioural responses to single and repeated restraint in male and female rats. *Behav Processes*, 28, 97–110.
- Almeida S. A., Petenusci S. O., Franci J. A. A., Rosa e Silva A. A. M., Lamano Carvalho T. L. (2000). Chronic immobilization-induced stress increases plasma testosterone and delays testicular maturation in pubertal rats. *Andrologia*, 32, 7–11.
- Amalric M., Ouagazzal C., Baunez C., Nieoullon A. (1994). Functional interactions between glutamate and dopamine in the rat striatum. *Neurochem Int*, 25, 123–131.

- Amat J., Baratta M. V., Paul E., Bland S. T., Watkins L. R., Maier S. F. (2005). Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. *Nat Neurosci*, 8, 365–371.
- Amat J., Paul E., Zarza C., Watkins L. R., Maier S. F. (2006). Previous experience with behavioral control over stress blocks the behavioral and dorsal raphe nucleus activating effects of later uncontrollable stress: role of the ventral medial prefrontal cortex. *J Neurosci*, 26, 13264–13272.
- Amat J., Paul E., Watkins L. R., Maier S. F. (2008). Activation of the ventral medial prefrontal cortex during an uncontrollable stressor reproduces both the immediate and long-term protective effects of behavioral control. *Neuroscience*, 154, 1178–1186.
- Amat J., Alekseyev R. M., Paul E., Watkins L. R., Maier S. F. (2010). Behavioral control over shock blocks behavioral and neurochemical effects of later social defeat. *Neuroscience*, 165, 1031–1038.
- Amat J., Christianson J. P., Alekseyev R. M., Kim J., Richeson K. R., Watkins L. R., Maier S. F. (2014). Control over a stressor involves the posterior dorsal striatum and the act/outcome circuit. *Eur J Neurosci*, 40, 1–7.
- Amat J., Dolzani S. D., Tilden S., Christianson J. P., Kubala K. H., Bartholomay K., ... Maier S. F. (2016). Previous ketamine produces an enduring blockade of neurochemical and behavioral effects of uncontrollable stress. *J Neurosci*, 36, 153–161.
- Anisman H., Irwin J. Beauchamp C., Zacharko R. (1983). Cross-stressor immunization against the behavioral deficiencies introduced by uncontrollable shock. *Behav Neurosci*, 97, 452–461.
- Andersen S. L. (2003). Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci Biobehav Rev*, 27, 3–18.
- Andersen S. L., Teicher M. H. (2004). Delayed effects of early stress on hippocampal development. *Neuropsychopharmacology*, 29, 1988–1993.
- Andersen S. L., Teicher M. H. (2008). Stress, sensitive periods and maturational events in adolescent depression. *TINS*, 31, 183–191.
- Andersen S. L., Tomada A., Vincow E. S., Valente E., Polcari A., Teicher M. H. (2000). Preliminary evidence for sensitive periods in the effect of childhood sexual abuse on regional brain development. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 20, 292–301.
- Andrzejewski M. E., Schochet T. L., Feit E. C., Harris R., McKee B. L., Kelley A. E. (2011). A comparison of adult and adolescent rat behavior in operant learning, extinction, and behavioral inhibition paradigms. *Behav Neurosci*, 125, 93–105.
- Archer J. (1973). Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav*, 21, 205–235.
- Armario A., Castellanos J. M., Balasch J. (1984). Adaptation of anterior pituitary hormones to chronic noise stress in male rats. *Behav Neural Biol*, 41, 71–76.
- Armario A., Restrepo C., Castellanos J. M., Balasch J. (1985). Dissociation between adrenocorticotropin and corticosterone responses to restraint after previous chronic exposure to stress. *Life Sci*, 36, 2085–2092.
- Armario A., López-Calderón A., Jolin T., Balasch J. (1986). Response of anterior pituitary hormones to chronic stress. The specificity of adaptation. *Neurosci Biobehav Rev*, 10, 245–250.
- Armario A., Restrepo C., Hidalgo J., López-Calderón A. (1987). Differences in prolactin and LH responses to acute stress between peripuberal and adult male rats. *J Endocrinol*, 112, 9–13.

- Armario A., Hidalgo, J., Giralt, M. (1988a). Evidence that the pituitary-adrenal axis does not cross-adapt to stressors: comparison to other physiological variables. *Neuroendocrinology*, 47, 263–267.
- Armario A., García-Márquez C., Giralt M. (1988b). Previous chronic chlorimipramine treatment did not modify some physiological responses to acute and chronic stress in rats. *Psychopharmacology* 94, 217-220.
- Armario A., Gavalda A., Martí O. (1988c). Forced swimming test in rats: effect of desipramine administration and the period of exposure to the test on struggling behavior, swimming, immobility and defecation rate. *Eur J Pharmacol*, 158, 207–212.
- Armario A., Martí J., Gil M. (1990). The serum glucose response to acute stress is sensitive to the intensity of the stressor and to habituation. *Psychoneuroendocrinology*, 15, 341-347.
- Armario A., Gil M., Martí J., Pol O., Balasch J. (1991). Influence of various acute stressors on the activity of adult male rats in a holeboard and in the forced swim test. *Pharmacol Biochem Behav*, 39, 373–377.
- Armario A. (2006). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: what can it tell us about stressors? *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 5, 485–501.
- Armario A., Daviu N., Muñoz C., Rabasa C., Fuentes S. Belda X., Gagliano H., Nadal N. (2012). What can we know from pituitary–adrenal hormones about the nature and consequences of exposure to emotional stressors? *Cell Mol Neurobiol*, 32, 749-758.
- Armario A., Nadal R. (2013). Individual differences and the characterization of animal models of psychopathology: a strong challenge and a good opportunity. *Front Pharm*, 4, 1–13.
- Armario A. (2015). Studying chronic stress in animals: purposes, models and consequences, in *Neuroendocrinology of Stress*, 1st Edition. Edited by: John A. Russell, Michael J. Shipston.
- Armstrong C. L., Hayes K. M., Martín, R. (2006). Neurocognitive problems in attention deficit disorder: alternative concepts and evidence for impairment in inhibition of selective attention. *Ann N Y Acad Sci*, 931, 196–215.
- Arnett J. (1992). Reckless behavior in adolescence: a developmental perspective. *Develop Rev*, 12, 339–373.
- Arnsten A. F. T. (2015). Stress weakens prefrontal networks: molecular insults to higher cognition. *Nat Neurosci*, 18, 1376–1385.
- Avital A., Richter-Levin G. (2005). Exposure to juvenile stress exacerbates the behavioural consequences of exposure to stress in the adult rat. *Int J Neurosychopharmacology*, 8, 163–173.
- Avital A., Segal M., Richter-Levin G. (2006). Contrasting roles of corticosteroid receptors in hippocampal plasticity. *J Neurosci*, 26, 9130-9134.
- Ayenu W.K., Pucilowski O., Mason G.A., Overstreet D.H., Rezvani A.H., Janowsky D.S. (1995). Effects of chronic mild stress on serum complement activity, saccharin preference, and corticosterone levels in flinders lines of rats. *Physiol Behav*, 57, 165-169.
- Aylward E. H., Reiss A. L., Reader M. J., Singer H. S., Brown J. E., Denckla M. B. (1996). Basal ganglia volumes in children with attention-deficit hyperactivity disorder. *J Child Neurology*, 11, 112–115.
- Baarendse P. J., Counotte D. S., O'Donnell P., Vanderschuren L. J. (2013a). Early social experience is critical for the development of cognitive control and dopamine modulation of prefrontal cortex function. *Neuropsychopharmacology*, 38, 1485-1494.

- Baarendse P. J. J., Winstanley C. A., Vanderschuren L. J. (2013b). Simultaneous blockade of dopamine and noradrenaline reuptake promotes disadvantageous decision making in a rat gambling task. *Psychopharmacology*, 225, 719–731.
- Baird A. A., Fugelsang J. A. (2004). The emergence of consequential thought: evidence from neuroscience. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 359, 1797–1804.
- Baker K. D., Richardson R. (2015). Forming competing fear learning and extinction memories in adolescence makes fear difficult to inhibit. *Learn Mem*, 22, 537-543.
- Ballard M. E., Mandelkern M. A., Monterosso J. R., Hsu E., Robertson C. L., Ishibashi K., ... London E. D. (2015). Low dopamine D2/D3 receptor availability is associated with steep discounting of delayed rewards in methamphetamine dependence. *Int J Neuropsychopharmacology*, 18, 1–10.
- Balleine B. W., O’Doherty J. P. (2010). Human and rodent homologues in action control: corticostriatal determinants of goal-directed and habitual action. *Neuropsychopharmacology*, 35, 48–69.
- Baratta M. V., Lucero T. R., Amat J., Watkins L. R., Maier, S. F. (2008). Role of the ventral medial prefrontal cortex in mediating behavioral control-induced reduction of later conditioned fear. *Lear Mem*, 15, 84–87.
- Baratta M. V., Leslie N. R., Fallon I. P., Dolzani S. D., Chun L. E., Tamalunas A. M., ... Maier S. F. (2018). Behavioural and neural sequelae of stressor exposure are not modulated by controllability in females. *Eur J Neurosci*, 47, 959-967.
- Bari A., Dalley J. W., Robbins T. W. (2008). The application of the 5-choice serial reaction time task for the assessment of visual attentional processes and impulse control in rats. *Nat Protocols*, 3, 759–767.
- Bari A., Theobald D. E., Caprioli D., Mar A. C., Aidoo-Micah A., Dalley J. W., Robbins T. W. (2010). Serotonin modulates sensitivity to reward and negative feedback in a probabilistic reversal learning task in rats. *Neuropsychopharmacology*, 35, 1290–1301.
- Bari A., Robbins T. W. (2013a). Inhibition and impulsivity: behavioral and neural basis of response control. *Prog Neurobiol*, 108, 44–79.
- Bari A., Robbins T. W. (2013b). Noradrenergic versus dopaminergic modulation of impulsivity, attention and monitoring behaviour in rats performing the stop-signal task. *Psychopharmacology*, 230, 89–111.
- Başoğlu M., Salcioğlu E., Livanou M. (2002). Traumatic Stress Responses in Earthquake Survivors in Turkey. *J Traum Stress*, 15, 269–276.
- Bauer R. H. (1978). Ontogeny of two-way avoidance in male and female rats. *Dev Psychobiol*, 11, 103–116.
- Baunez C., Robbins T.W. (1997). Bilateral lesions of the subthalamic nucleus induce multiple deficits in an attentional task in rats. *Eur J Neurosci*, 9, 2086–2099.
- Bechara A., Damasio A. R., Damasio H., Anderson S. W. (1994). Insensitivity to future consequences following damage to human prefrontal cortex. *Cognition*, 50, 7–15.
- Bechara A., Tranel D., Damasio H. (2000). Characterization of the decision-making deficit of patients with ventromedial prefrontal cortex lesions. *Brain*, 123, 2189–2202.
- Becú-Villalobos D., Iglesias A. G., Díaz-Torga G., Hockl P., Libertun C. (1997). Brain sexual differentiation and gonadotropins secretion in the rat. *Cellular Mol Neurobiol*, 17, 699–715.

- Belda X., Márquez C., Armario A. (2004). Long-term effects of a single exposure to stress in adult rats on behavior and hypothalamic-pituitary-adrenal responsiveness: comparison of two outbred rat strains. *Behav Brain Res*, 154, 399–408.
- Belda X., Fuentes S., Daviu N., Nadal R., Armario A. (2015). Stress-induced sensitization: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and beyond. *Stress*, 18, 269–279.
- Belda X., Nadal R., Armario, A. (2016). Critical features of acute stress-induced cross-sensitization identified through the hypothalamic-pituitary-adrenal axis output. *Sci Rep*, 6, 1–12.
- Benes F. M., Turtle M., Khan Y., Farol P. (1994). Myelination of a key relay zone in the hippocampal formation occurs in the human brain during childhood, adolescence and adulthood. *Arch Gen Psychiatry*, 51, 477–484.
- Bielajew C., Konkle A. T. M., Kentner A. C., Baker S. L., Stewart A., Hutchins A. A., ... Fouriez G. (2003). Strain and gender specific effects in the forced swim test: effects of previous stress exposure. *Stress*, 6, 269–280.
- Bizarro L., Patel S., Murtagh C., Stolerman I.P. (2004). Differential effects of psychomotor stimulants on attentional performance in rats: nicotine, amphetamine, caffeine and methylphenidate. *Behav Pharmacol*, 15, 195-206.
- Blakemore S. J., Choudhury S. (2006). Development of the adolescent brain: implications for executive function and social cognition. *J Child Psychol Psychiatry*, 47, 296–312.
- Blakemore S. J., Burnett S., Dahl R. E. (2010). The role of puberty in the developing adolescent brain. *Human Brain Mapping*, 31, 926–933.
- Blanchard R. J., Kelley M. J., Blanchard D. C. (1974). Defensive reactions and exploratory behavior in rats. *J Comp Physiol Psychol*, 87, 1129–1133.
- Blondeau C., Dellu-Hagedorn F. (2007). Dimensional analysis of ADHD subtypes in rats. *Biol Psychiatry*, 61, 1340–1350.
- Bluett R. J., Gamble-George J. C., Hermanson D. J., Hartley N. D., Marnett L. J., Patel S. (2014). Central anandamide deficiency predicts stress-induced anxiety: behavioral reversal through endocannabinoid augmentation. *Transl Psychiatry*, 4, 1-5.
- Blumberg M., Watt M. J., Burke A. R., Renner K. J., Fortser G.L. (2009). Adolescent male rats exposed to social defeat exhibited altered anxiety behavior and limbic monoamines as adults. *Behav Neurosci*, 123, 564-576.
- Bock J., Poeggel G., Gruss M., Wingenfeld K., Braun K. (2013). Infant cognitive training preshapes learning-relevant prefrontal circuits for adult learning: learning-induced tagging of dendritic spines. *Cereb Cortex*, 24, 2920–2930.
- Boileau I., Payer D., Chugani B., Lobo D., Behzadi A., Rusjan P. M.... (2013). The d2/3 dopamine receptor in pathological gambling: a positron emission tomography study with [¹¹C]-(+)-propylhexahydro-naphtho-oxazin and [¹¹C]raclopride. *Addiction*, 108, 953-963.
- Booth J. R., Burman D. D., Meyer J. R., Lei Z., Trommer B. L., Davenport N. D., ... Mesulam, M. M. (2005). Larger deficits in brain networks for response inhibition than for visual selective attention in attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *J Child Psychol Psychiatry*, 46, 94–111.
- Bouton M. E., King D. A. (1983). Contextual control of the extinction of conditioned fear: tests for the associative value of the context. *J Exp Psychol*, 9, 248–265.
- Bouton M.E. (2004). Context and behavioral processes in extinction. *Learn Mem*, 11, 485-494.

- Bremner J. D., Randall P., Vermetten E., Staib L., Bronen R. A., Mazure C., ... Charney D. S. (1997). Magnetic resonance imaging-based measurement of hippocampal volume in posttraumatic stress disorder related to childhood physical and sexual abuse - A preliminary report. *Biol Psychiatry*, 41, 23–32.
- Brenhouse, H. C., Andersen, S. L. (2008). Delayed extinction and stronger reinstatement of cocaine conditioned place preference in adolescent rats, compared to adults. *Behav Neurosci*, 122, 460–465.
- Brenhouse, H. C., Andersen, S. L. (2011). Developmental trajectories during adolescence in males and females: A cross-species understanding of underlying brain changes. *Neurosci Biobehav Rev*, 35, 1687-1703.
- Brennan F. X., Beck K. D., Ross R. J., Servatius R. J. (2005). Stress-induced increases in avoidance responding: An animal model of post-traumatic stress disorder behavior? *Neuropsychiatr Dis Treat*, 1, 69-72.
- Brown J. D., Siegel J. M. (1988). Attributions for negative life events and depression: the role of perceived control. *J Pers Soc Psychol*, 54, 316–322.
- Brown S. M., Henning S., Wellman C. L. (2005). Mild, short-term stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex*, 15, 1714-1722.
- Bruijnzeel A. W., Stam R., Wiegant V. M. (2001). Effect of a benzodiazepine receptor agonist and corticotropin-releasing hormone receptor antagonists on long-term foot-shock-induced increase in defensive withdrawal behavior. *Psychopharmacology* 158, 132-139.
- Bruneau N., Simon H., Le Moal M. (1980). A dark-light emergence test: study at two times of the nycthemeral cycle in four-and twelve-week-old rats. *Behav Processes*, 5, 281–285.
- Brunell S. C., Spear L. P. (2005). Effect of stress on the voluntary intake of a sweetened ethanol solution in pair-housed adolescent and adult rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 29, 1641-1653.
- Brush F. R. (2003). Selection for differences in avoidance learning: the Syracuse strains differ in anxiety, not learning ability. *Behav Genet*, 33, 677–696.
- Bryden D. W., Burton A. C., Kashtelyan V., Barnett B. R., Roesch M. R. (2012). Response inhibition signals and miscoding of direction in dorsomedial striatum. *Front Integr Neurosci*, 6, 69.
- Brydges N. M., Hall L., Nicolson R., Holmes M. C., Hall, J. (2012). The effects of juvenile stress on anxiety, cognitive bias and decision making in adulthood: a rat model. *PLoS ONE*, 7, 1–8.
- Brydges N. M., Holmes M. C., Harris A. P., Cardinal R. N., Hall J. (2015). Early life stress produces compulsive-like, but not impulsive, behavior in females. *Behav Neurosci*, 129, 300–308.
- Burghy C. A., Stodola D. E., Ruttle P. L., Molloy E. K., Armstrong J. M., Oler J. A., ... Birn R. M. (2012). Developmental pathways to amygdala-prefrontal function and internalizing symptoms in adolescence. *Nat Neurosci*, 15, 1736–1741.
- Burke A. R., Renner K. J., Forster G. L., Watt M. J. (2010). Adolescent social defeat alters neural, endocrine and behavioral responses to amphetamine in adult male rats. *Brain Res*, 1352, 147-156.
- Burnett S., Bault N., Coricelli G., Blakemore S. J. (2010). Adolescents' heightened risk-seeking in a probabilistic gambling task. *Cogn Dev*, 25, 183–196.
- Burton C. L., Fletcher P. J. (2012). Age and sex differences in impulsive action in rats: the role of dopamine and glutamate. *Behav Brain Res*, 230, 21–33.

- Caballero A., Flores-Barrera E., Cass D. K., Tseng K. Y. (2014). Differential regulation of parvalbumin and calretinin interneurons in the prefrontal cortex during adolescence. *Brain Struct Funct*, 219, 395–406.
- Caballero A., Granberg R., Tseng K. Y. (2016). Mechanisms contributing to prefrontal cortex maturation during adolescence. *Neurosci Biobehav Rev*, 70, 4–12.
- Campmany L., Pol O., Armario A. (1996). The effects of two chronic intermittent stressors on brain monoamines. *Pharmacol Biochem Behav*, 53, 517–523.
- Cándido A., Maldonado A., Rodríguez A., Morales A. (2002). Successive positive contrast in one-way avoidance learning. *Q J Exp Psychol*, 55B, 171–184.
- Caprioli D., Jupp B., Hong Y. T., Sawiak S. J., Ferrari V., Wharton L., ... Dalley J. W. (2015). Dissociable rate-dependent effects of oral methylphenidate on impulsivity and D2/3 receptor availability in the striatum. *J Neurosci*, 35, 3747–3755.
- Cardinal R. N., Robbins T. W., Everitt B. J. (2000). The effects of d-amphetamine, chlordiazepoxide, α -flupenthixol and behavioral manipulations on choice of signaled and unsignaled delayed reinforcement in rats. *Psychopharmacology*, 152, 362–375.
- Cardinal R. N., Pennicott D. R., Sugathapala C. L., Robbins T. W., Everitt B. J. (2001). Impulsive choice induced in rats by lesions of the nucleus accumbens core. *Science*, 292, 2499–2501.
- Cardinal R. N., Winstanley C. A., Robbins T. W., Everitt B. J. (2004). Limbic corticostriatal systems and delayed reinforcement. *Ann N Y Acad Sci*, 1021, 33–50.
- Carli M., Samanin R. (2000). The 5-HT₁(A) receptor agonist 8-OH-DPAT reduces rats' accuracy of attentional performance and enhances impulsive responding in a five-choice serial reaction time task: role of presynaptic 5-HT₁(A) receptors. *Psychopharmacology*, 149, 259–268.
- Carli M., Invernizzi R. W. (2014). Serotonergic and dopaminergic modulation of cortico-striatal circuit in executive and attention deficits induced by NMDA receptor hypofunction in the 5-choice serial reaction time task. *Front Neural Circuits*, 8, 58.
- Caruso M. J., Kamens H. M., Cavigelli S. A. (2017). Exposure to chronic variable social stress during adolescence alters affect-related behaviors and adrenocortical activity in adult male and female inbred mice. *Dev Psychobiol*, 59, 679–687.
- Casement M. D., Shaw D. S., Sitnick S. L., Musselman S. C., Forbes E. E. (2015). Life stress in adolescence predicts early adult reward-related brain function and alcohol dependence. *SCAN*, 10, 416–423.
- Casey B. J., Castellanos F. X., Giedd J. N., Marsh W. L., Hamburger S. D., Schubert A. B., ... Rapoport, J. L. (1997). Implication of right frontostriatal circuitry in response inhibition and attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 36, 374–383.
- Casey B. J., Galvan A., Hare T. A. (2005). Changes in cerebral functional organization during cognitive development. *Curr Opin Neurobiol*, 15, 239–244.
- Casey B. J., Jones R. M., Hare T. A. (2008). The adolescent brain. *Ann N Y Acad Sci*, 1124, 111–126.
- Casey B. J., Caudle K. (2013). The teenage brain: self-control. *Curr Dir Psychol Sci*, 22, 82–87.
- Casey B. J. (2015). Beyond simple models of self-control to circuit-based accounts of adolescent behavior. *Annu Rev Psychol*, 66, 295–319.
- Castellanos F. X., Giedd J. N., Marsh W. L., Hamburger S. D., Vaituzis A. C., Dickstein D. P., ... Rapoport J. L. (1996). Quantitative brain magnetic resonance imaging in attention deficit hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 53, 607–616.

- Cauffman E., Shulman E.P., Steinberg L., Claus E., Banich M.T., Graham S., Woolard J. (2010). Age differences in affective decision making as indexed by performance on the Iowa gambling task. *Dev Psychol*, 46, 193-207.
- Chaby L. E., Cavigelli S. A., White A., Wang K., Braithwaite V. A. (2013). Long-term changes in cognitive bias and coping response as a result of chronic unpredictable stress during adolescence. *Front Hum Neurosci*, 7, 328.
- Chaby L. E., Cavigelli S. A., Hirrlinger A. M., Lim J., Wang K. M., Braithwaite V. A. (2015). Chronic stress during adolescence impairs and improves learning and memory in adulthood. *Front Behav Neurosci*, 9, 1-11.
- Chamberlain S. R., Fineberg N. A., Blackwell A. D., Robbins T. W., Sahakian B. J. (2006). Motor inhibition and cognitive flexibility in obsessive-compulsive disorder and trichotillomania. *Am J Psychiatry*, 163, 1-3.
- Chase T. N., Oh J. D. (2000). Striatal dopamine- and glutamate-mediated dysregulation in experimental parkinsonism. *TINS*, 23, 86-91.
- Chiara G. Di, Morelli M., Consolo S. (1994). Modulatory functions of neurotransmitters in the striatum: ACh / dopamine / NMDA interactions. *TINS*, 17, 228-233.
- Chowdhury T. G., Ríos M. B., Chan T. E., Cassataro D. S., Barbarich-Marsteller N. C., Aoki C. (2014). Activity-based anorexia during adolescence disrupts normal development of the CA1 pyramidal cells in the ventral hippocampus of female rats. *Hippocampus*, 24, 1421-1429.
- Christakou A., Robbins T. W., Everitt B. J. (2001). Functional disconnection of a prefrontal cortical-dorsal striatal system disrupts choice reaction time performance: implications for attentional function. *Behav Neurosci*, 115, 812-825.
- Christakou A., Robbins T. W., Everitt B. J. (2004). Prefrontal Cortical-Ventral Striatal Interactions Involved in Affective Modulation of Attentional Performance: implications for Corticostriatal Circuit Function. *J Neurosci*, 24, 773-780.
- Christianson J. P., Paul E. D., Irani M., Thompson B. M., Kubala K. H., Yirmiya R., ... Maier, S. F. (2008). The role of prior stressor controllability and the dorsal raphe nucleus in sucrose preference and social exploration. *Behav Brain Res*, 193, 87-93.
- Christianson J. P., Thompson B. M., Watkins L. R., Maier S. F. (2009). Medial prefrontal cortical activation modulates the impact of controllable and uncontrollable stressor exposure on a social exploration test of anxiety in the rat. *Stress*, 12, 445-450.
- Chudasama Y., Muir J. L. (2001). Visual attention in the rat: a role for the prelimbic cortex and thalamic nuclei? *Behav Neurosci*, 115, 417-428.
- Chudasama Y., Passetti F., Rhodes S. E. V., Lopian D., Desai A., Robbins T. W. (2003). Dissociable aspects of performance on the 5-choice serial reaction time task following lesions of the dorsal anterior cingulate, infralimbic and orbitofrontal cortex in the rat: differential effects on selectivity, impulsivity and compulsivity. *Behav Brain Res*, 146, 105-119.
- Cole B. J., Robbins T. W. (1987). Amphetamine impairs the discriminative performance of rats with dorsal noradrenergic bundle lesions on a 5-choice serial reaction time task: new evidence for central dopaminergic-noradrenergic interactions. *Psychopharmacology*, 91, 458-466.
- Cole B. J., Robbins T.W. (1989). Effects of 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens septi on performance of a 5-choice serial reaction time task in rats: implications for theories of selective attention and arousal. *Behav Brain Res*, 33, 165-79.
- Comeau W. L., Winstanley C. A., Weinberg J. (2014). Prenatal alcohol exposure (PAE) and adolescent stress: unmasking persistent attentional deficits in rats. *Eur J Neurosci*, 40, 3078-3095.

- Comeau W. L., Lee K., Anderson K., Weinberg J. (2015). Prenatal alcohol exposure and adolescent stress increase sensitivity to stress and gonadal hormone influences on cognition in adult female rats. *Physiol Behav*, 148, 157-165.
- Commons K.G., Cholanians A.B., Babb J.A., Ehlinger D.G. (2017). The rodent forced swim test measures stress-coping strategy, not depression-like behavior. *ACS Chem Neurosci*, 8, 955-960.
- Conrad C. D., LeDoux J. E., Magariños A. M., McEwen B. S. (1999). Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. *Behav Neurosci*, 113, 902–913.
- Cook S. C., Wellman C. L. (2004). Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J Neurobiol*, 60, 236–248.
- Corcoran K., Quirk G. (2007). Recalling safety: cooperative functions of the ventromedial prefrontal cortex and the hippocampus in extinction. *CNS Spectrums*, 12, 200–206.
- Cordero M. I., Ansermet F., Sandi, C. (2013). Long-term programming of enhanced aggression by peripuberty stress in female rats. *Psychoneuroendocrinology*, 38, 2758–2769.
- Cordero M. I., Jus, N., Poirier G. L., Sandi C. (2016). Effects of paternal and peripubertal stress on aggression, anxiety, and metabolic alterations in the lateral septum. *Eur Neuropsychopharmacology*, 26, 357–367.
- Cotella E. M., Gómez A. S., Lemen P., Chen C., Fernández G., Hansen C., ... Paglini M. G. (2019). Long-term impact of chronic variable stress in adolescence versus adulthood. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 88, 303–310.
- Crawford M., Masterson F. A. (1982). Species-specific defense reactions and avoidance learning - an evaluative review. *Pavlov J Biol Sci*, 17, 204–214.
- Crone E. A., van der Molen M. W. (2004). Developmental changes in real life decision making: performance on a gambling task previously shown to depend on the ventromedial prefrontal cortex. *Dev Neuropsychol*, 25, 251–279.
- Crone E. A., Van Duijvenvoorde A. C. K., Peper J. S. (2016). Annual research review: neural contributions to risk-taking in adolescence - developmental changes and individual differences. *J Child Psychol Psychiatry*, 57, 353–368.
- Cruz F. C., Marin M. T., Leão R. M., Planeta C. S. (2012). Behavioral and neuroendocrine effects of the exposure to chronic restraint or variable stress in early adolescent rats. *Int J Dev Neuroscience*, 30, 19–23.
- Cryan J.F., Valentino R.J., Lucki I. (2005). Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev*, 29, 547-596.
- Cumming M. J., Thompson M. A., McCormick C. M. (2014). Adolescent social instability stress increases aggression in a food competition task in adult male Long-Evans rats. *Dev Psychobiol*, 56, 1575–1588.
- Cutler G., Glenn M., Bush M., Hodgen G., Graham C., Loriaux D. (1978). Adrenarche: a survey of rodents, domestic animals, and primates. *Endocrinology*, 103, 2112–2118.
- D'Aquila P. S., Brain P., Willner P. (1994). Effects of chronic mild stress on performance in behavioral tests relevant to anxiety and depression. *Physiol Behav*, 56, 861–867.
- Dal-Zotto S., Martí O., Armario A. (2000). Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioral and physiological responses to the stressor. *Behav Brain Res*, 114, 175–81.

- Dalla C., Edgecomb C., Whetstone A. S., Shors T. J. (2008). Females do not express learned helplessness like males do. *Neuropsychopharmacology*, 33, 1559-1569.
- Dalley J. W., Theobald D. E., Bouger P., Chudasama Y., Cardinal, R. N., Robbins, T. W. (2004). Cortical cholinergic function and deficits in visual attentional performance in rats following 192 igg-saporin-induced lesions of the medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex*, 14, 922-932.
- Dalley J. W., Fryer T. D., Brichard L., Robinson E. S. J., Theobald D. E. H., Laane K., ... Robbins T. W. (2007). Nucleus accumbens D2/3 receptors predict trait impulsivity and cocaine reinforcement. *Science*, 315, 1267–1270.
- Dalley J. W., Robbins T. W. (2017). Fractionating impulsivity: neuropsychiatric implications. *Nat Rev Neurosci*, 18, 158–171.
- Davis M., Whalen P. J. (2001). The amygdala: vigilance and emotion. *Mol Psychiatry*, 6, 13–34.
- Daviu N., Fuentes S., Nadal R., Armario A. (2010). A single foot-shock causes long-lasting hypoactivity in unknown environments that is dependent on the development of contextual fear conditioning. *Neurobiol Learn Mem*, 94, 183–190.
- Daviu N., Delgado-Morales R., Nadal R., Armario A. (2012). Not all stressors are equal: behavioral and endocrine evidence for development of contextual fear conditioning after a single session of foot-shocks but not of immobilization. *Front Behav Neurosci*, 6, 1-14.
- Daviu N., Andero R., Armario A., Nadal R. (2014). Sex differences in the behavioral and hypothalamic-pituitary-adrenal response to contextual fear conditioning in rats. *Horm Behav*, 66, 713–723.
- Den M. L., Richardson R. (2013). Enhanced sensitivity to learning fearful associations during adolescence. *Neurobiol Learn Mem*, 104, 92-102.
- Dess N. K., Minor T. R., Brewer J. (1989). Suppression of feeding and body weight by inescapable shock: modulation by quinine adulteration, stress reinstatement and controllability. *Physiology and Behavior*, 45, 975-983.
- de Jong R. A. P. van der Schoot P. (1979). Advancement of sexual maturation in male rats by pituitary transplants. *Biol Reprod*, 21, 1263–1271.
- de Kloet, E.R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M. S., Jöels, M. (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrinology*, 19, 269-301.
- de Kloet E. R., Joëls M., Holsboer F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*, 6, 463–475.
- de Visser L., Baars A. M., van 't Klooster J., van den Bos R. (2011a). Transient inactivation of the medial prefrontal cortex affects both anxiety and decision-making in male Wistar rats. *Front Neurosci*, 5, 1–8.
- de Visser L., Homberg J. R., Mitsogiannis M., Zeeb F. D., Rivalan M., Fitoussi A., ... Dellu-Hagedorn, F. (2011b). Rodent versions of the Iowa gambling task: opportunities and challenges for the understanding of decision-making. *Front Neurosci*, 5, 1–21.
- Dias-Ferreira E., Sousa J. C., Melo I., Morgado P., Mesquita A. R., Cerqueira J. J., ... Sousa N. (2009). Chronic stress causes frontostriatal reorganization and affects decision-making. *Science*, 325, 621–625.
- Dickerson S. S., Kemeny M. E. (2004). Acute stressors and cortisol responses: a theoretical integration and synthesis of laboratory research. *Psychol Bull*, 130, 355–391.

- Diergaarde L., Pattij T., Poortvliet I., Hogenboom F., de Vries W., Schoffelmeer A. N. M., De Vries T. J. (2008). Impulsive choice and impulsive action predict vulnerability to distinct stages of nicotine seeking in rats. *Biol Psychiatry*, 63, 301–308.
- Dolzani S. D., Baratta M. V., Amat J., Agster K. L., Saddoris M. P., Watkins L. R., Maier S. F. (2016). Activation of a habenulo-raphé circuit is critical for the behavioral and neurochemical consequences of uncontrollable stress in the male rat. *eNeuro*, 3, 1–17.
- Doremus-Fitzwater T. L., Varlinskaya E. I., Spear L. P. (2009). Social and non-social anxiety in adolescent and adult rats after repeated restraint. *Physiol Behav*, 97, 484–494.
- Doremus-Fitzwater T. L., Barreto M., Spear L. P. (2012). Age-related differences in impulsivity among adolescent and adult sprague-dawley rats. *Behav Neurosci*, 126, 735–741.
- Doremus-Fitzwater T. L., Spear L. P. (2016). Reward-centricity and attenuated aversions: an adolescent phenotype emerging from studies in laboratory animals. *Neurosci Biobehav Rev*, 70, 121–134.
- Douglas L. A., Varlinskaya E. I., Spear L. P. (2003). Novel-object place conditioning in adolescent and adult male and female rats: effects of social isolation. *Physiol Behav*, 80, 317–325.
- Douglas L. A., Varlinskaya E. I., Spear L. P. (2004). Rewarding properties of social interactions in adolescent and adult male and female rats: impact of social versus isolate housing of subjects and partners. *Dev Psychobiol*, 45, 153–162.
- Driessen M., Herrmann J., Stahl K., Zwaan M., Meier S., Hill A., ... Petersen D. (2000). Magnetic resonance imaging volumes of the hippocampus and the amygdala in women with borderline personality disorder and early traumatization. *Arch Gen Psychiatry*, 57, 1115–1122.
- DSM-V (2014). Manual Diagnóstico, Estadístico de los Trastornos mentales. Ed American Psychiatric Association. Editorial Médica Panamericana S.A. (5a ed).
- Duarte J. O., Cruz F. C., Leão R. M., Planeta C. S., Crestani C. C. (2015). Stress vulnerability during adolescence: comparison of chronic stressors in adolescent and adult rats. *Psychosom Med*, 77, 186–199.
- Dudman J. T., Gerfen C. R. (2015). Chapter 17- The basal ganglia. In *The Rat Nervous System*, 4th ed, pp. 391-440.
- Durston S. (2003). A review of the biological bases of ADHD: what have we learned from imaging studies? *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 9, 184–195.
- Eagle D. M., Baunez C. (2010). Is there an inhibitory-response-control system in the rat? Evidence from anatomical and pharmacological studies of behavioral inhibition. *Neurosci Biobehav Rev*, 34, 50–72.
- Eagle D. M., Wong J. C. K., Allan M. E., Mar A. C., Theobald D. E., Robbins T. W. (2011). Contrasting roles for dopamine D1 and D2 receptor subtypes in the dorsomedial striatum but not the nucleus accumbens core during behavioral inhibition in the stop-signal task in rats. *J Neurosci*, 31, 7349–7356.
- Economidou D., Theobald D. E. H., Robbins T. W., Everitt B. J., Dalley J. W. (2012). Norepinephrine and dopamine modulate impulsivity on the 5-choice serial reaction time task through opponent actions in the shell and core sub-regions of the nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology*, 37, 2057–2066.
- Eiland L., Ramroop J., Hill M. N., Manley J., McEwen B. S. (2012). Chronic juvenile stress produces corticolimbic dendritic architectural remodeling and modulates emotional behavior in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*, 37, 39–47.

- Einarsson E., Pors J., Nader K. (2015). Systems reconsolidation reveals a selective role for the anterior cingulate cortex in generalized contextual fear memory expression. *Neuropsychopharmacology*, 40, 480–487.
- Escorihuela R. M., Fernández-Teruel A., Zapata A., Núñez J., Tobeña A. (1993). Flumazenil prevents the anxiolytic effects of diazepam, alprazolam and adinazolam on the early acquisition of two-way active avoidance. *Pharmacological Research*, 28, 53–58.
- Etkin A., Wager T. D. (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.
- Evenden J. L., Ryan C. N. (1996). The pharmacology of impulsive behaviour in rats: the effects of drugs on response choice with delays of reinforcement. *Psychopharmacology*, 128, 161–170.
- Fanselow M. S. (1984). What is conditioned fear? *TINS*, 7(12), 460–462.
- Fehr C., Yakushev I., Hohmann N., Buchholz H. G., Landvogt C., Deckers H., ... Schreckenberger M. (2008). Association of low striatal dopamine d2 receptor availability with nicotine dependence similar to that seen with other drugs of abuse. *Am J Psychiatry*, 165, 507-514.
- Feja M., Hayn L., Koch M. (2014). Nucleus accumbens core and shell inactivation differentially affects impulsive behaviors in rats. *Prog Neuropsychopharmacology Biol Psychiatry*, 54, 31–42.
- Fellows L. K., Farah M. J. (2005). Is anterior cingulate cortex necessary for cognitive control? *Brain*, 128, 788–796.
- Fendt M., Fanselow M. S. (1999). The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev*, 23, 743–760.
- Fernández-Teruel A., Escorihuela R., Núñez J., Zapata A., Boix F., Salazar W., Tobeña A. (1991). The early acquisition of two-way (shuttle-box) avoidance as an anxiety-mediated behavior: psychopharmacological validation. *Brain Res Bull*, 26, 173–176.
- Figner B., Mackinlay R. J., Wilkening F., Weber E. U. (2009). Affective and deliberative processes in risky choice: age differences in risk taking in the Columbia Card Task. *J Exp Psychol Learn Mem Cogn*, 35, 709–730.
- File S. E., Wardill A. G. (1975). The reliability of the hole-board apparatus. *Psychopharmacology*, 44, 47–51.
- File S. E., Hyde J. R. G. (1978). Can social interaction be used to measure anxiety? *Br J Pharmac*, 62, 19–24.
- File S. E. (1985). Animal models for predicting clinical efficacy of anxiolytic drugs: social behavior. *Neuropsychobiology*, 13, 55–62.
- File S. E., Seth P. (2003). A review of 25 years of the social interaction test. *Eur J Pharmac*, 463, 35–53.
- Filipek P. A., Semrud-Clikeman M., Steingard R. J., Renshaw P. F., Kennedy D. N., Biederman J. (1997). Volumetric MRI analysis comparing subjects having attention-deficit hyperactivity disorder with normal controls. *Neurology*, 48, 589–601.
- Fineberg N. A., Potenza M. N., Chamberlain S. R., Berlin H. A., Menzies L., Bechara A., ... Hollander E. (2010). Probing compulsive and impulsive behaviors, from animal models to endophenotypes: a narrative review. *Neuropsychopharmacology*, 35, 591–604.
- Fineberg N. A., Chamberlain S. R., Goudriaan A. E., Stein D. J., Vanderschuren L. J.M.J., ... Potenza, M. N. (2014). New developments in human neurocognition: clinical, genetic, and brain imaging correlates of impulsivity and compulsivity. *CNS Spectrums*, 19, 69-89.

- Fitoussi A., Le Moine C., De Deurwaerdère P., Laqui M., Rivalan M., Cador M., Dellu-Hagedorn F. (2015). Prefronto-subcortical imbalance characterizes poor decision-making: neurochemical and neural functional evidences in rats. *Brain Struct Funct*, 220, 3485–3496.
- Fletcher P. J., Tampakeras M., Sinyard J., Higgins G. A. (2007). Opposing effects of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptor antagonists in the rat and mouse on premature responding in the five-choice serial reaction time test. *Psychopharmacology*, 195, 223–234.
- Floresco S. B., Seamans J. K., Phillips A. G. (1997). Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without a delay. *J Neurosci*, 17, 1880–1890.
- Foils A. R., Lui P., Romeo R. D. (2011). The transformation of hormonal stress responses throughout puberty and adolescence. *J Endocrinology*, 210, 391–398.
- Fone K. C., Porkess M. V. (2008). Behavioral and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev*, 32, 1087-1102.
- Foulkes L., Blakemore S. J. (2018). Studying individual differences in human adolescent brain development. *Nat Neurosci*, 21, 315–323.
- Frahm K. A., Lumia A. R., Fernandez E., Strong R., Roberts J. L., McGinnis M. Y. (2011). Effects of anabolic androgenic steroids and social subjugation on behavior and neurochemistry in male rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 97, 416-422.
- Frankland P. W., Ding H., Takahashi E., Suzuki A., Kida S., Silva A. J. (2006). Stability of recent and remote contextual fear memory stability of recent and remote contextual fear memory. *Learn Behav*, 13, 451–457.
- Friemel C. M., Spanagel R., Schneider M. (2010). Reward sensitivity for a palatable food reward peaks during pubertal developmental in rats. *Front Behav Neurosci*, 4, 1–10.
- Fuentes S., Daviu N., Gagliano H., Garrido P., Zelena D., Monasterio N., ... Nadal R. (2014). Sex-dependent effects of an early life treatment in rats that increases maternal care: vulnerability or resilience? *Front Behav Neurosci*, 8, 1-22.
- Fuentes S., Daviu N., Gagliano H., Belda X., Armario A., Nadal R. (2018). Early life stress in rats' sex-dependently affects remote endocrine rather than behavioral consequences of adult exposure to contextual fear conditioning. *Horm Behav*, 103, 7–18.
- Galatzer-Levy I. R., Moscarello J., Blessing E. M., Klein J., Cain C. K., LeDoux J. E. (2014). Heterogeneity in signaled active avoidance learning: substantive and methodological relevance of diversity in instrumental defensive responses to threat cues. *Front Systems Neurosci*, 8, 1–12.
- Galea L. A., McEwen B. S., Tanapat P., Deak T., Spencer R. L., Dhabhar F. S. (1997). Sex differences in dendritic atrophy of ca3 pyramidal neurons in response to chronic restraint stress. *Neuroscience*, 81, 689-697.
- Ganella D. E., Barendse M.E.A., Kim J.H., Whittle S. (2017). Prefrontal-amygdala connectivity and state anxiety during fear extinction recall in adolescents. *Front Human Neurosci*, 11, 1–9.
- García-Márquez C., Armario A. (1987a). Interaction between chronic stress and clomipramine treatment in rats. Effects on exploratory activity, behavioral despair, and pituitary-adrenal function. *Psychopharmacology*, 93, 77–81.
- García-Márquez C., Armario A. (1987b). Chronic stress depresses exploratory activity and behavioral performance in the forced swimming test without altering ACTH response to a novel acute stressor. *Physiol Behav*, 40, 33–38.

- García A., Martí O., Vallès A., Dal-Zotto S., Armario A. (2000). Recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. *Neuroendocrinology*, 72, 114-125.
- Garrett J. E., Wellman C. L. (2009). Chronic stress effects on dendritic morphology in medial prefrontal cortex: Sex differences and estrogen dependence. *Neuroscience*, 162, 195-207.
- Giedd J. N. (2004). Structural magnetic resonance imaging of the adolescent brain. *Ann N Y Acad Sci*, 1021, 77-85.
- Giedd J., Rapoport J. (2010). Structural MRI of pediatric brain development: what have we learned and where are we going? *Neuron*, 67, 728-734.
- Glazer H., Weiss J., Pohorecky L., Miller N. (1975). Monoamines as mediators of avoidance-escape behavior. *Psychosom Med*, 37, 535-543.
- Goble K.H., Bain Z.A., Padow V.A., Lui P., Klein Z.A., Romeo R.D. (2011). Pubertal-related changes in hypothalamic-pituitary-adrenal axis reactivity and cytokine secretion in response to an immunological stressor. *J Neuroendocrinol*, 23, 129-135.
- Goddings A. L., Mills K. L., Clasen L. S., Giedd J. N., Viner R. M., Blakemore S. J. (2014). The influence of puberty on subcortical brain development. *NeuroImage*, 88, 242-251.
- Gogtay N., Giedd J. N., Lusk L., Hayashi K. M., Greenstein D., Vaituzis A.C., ... Thompson, P. M. (2004). Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *PNAS*, 101, 8174-8179.
- Goldman L., Winget C., Hollingshead G., Levine S. (1973). Postweaning development of negative feedback in the pituitary-adrenal system of the rat. *Neuroendocrinology*, 12, 199-211.
- Goldstein D. S., Kopin I. J. (2007). Evolution of concepts of stress. *Stress*, 10, 109-120.
- Gomes F. V., Grace A. A. (2017). Prefrontal cortex dysfunction increases susceptibility to schizophrenia-like changes induced by adolescent stress exposure. *Schizophr Bull*, 43, 592-600.
- Gómez F., Houshyar H., Dallman M. F. (2002). Marked regulatory shifts in gonadal, adrenal, and metabolic system responses to repeated restraint stress occur within a 3-week period in pubertal male rats. *Endocrinology*, 143, 2852-2862.
- Gräff, J., Joseph N. F., Horn M. E., Samiei A., Seo J., Rei D., ... Tsai L. (2014). Epigenetic priming of memory updating during reconsolidation to attenuate remote fear memories. *Cell*, 156, 261-276.
- Grahn R. E., Kalman B. A., Brennan F. X., Watkins L. R., Maier S. F. (1995). The elevated plus-maze is not sensitive to the effect of stressor controllability in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 52, 565-570.
- Grahn R. E., Will M. J., Hammack S. E., Maswood S., McQueen M. B., Watkins L. R., Maier S. F. (1999). Activation of serotonin-immunoreactive cells in the dorsal raphe nucleus in rats exposed to an uncontrollable stressor. *Brain Res*, 826, 35-43.
- Granon S., Passetti F., Thomas K. L., Dalley J. W., Everitt B. J., Robbins T. W. (2000). Enhanced and impaired attentional performance after infusion of D1 dopaminergic receptor agents into rat prefrontal cortex. *J Neurosci*, 20, 1208-1215.
- Green M. R., McCormick C. M. (2013). Effects of social instability stress in adolescence on long-term, not short-term, spatial memory performance. *Behav Brain Res*, 256, 165-171.
- Greenwood B., Strong P., Fleshner M. (2010). Lesions of the basolateral amygdala reverse the long-lasting interference with shuttle box escape produced by uncontrollable stress. *Behav Brain Res*, 211, 71-76.

- Gronli J., Murison R., Fiske E., Bjorvatn B., Sorensen E., Portas C. M., Ursin, R. (2005). Effects of chronic mild stress on sexual behavior, locomotor activity and consumption of sucrose and saccharine solutions. *Physiol Behav*, 84, 571–577.
- Gruss M., Abraham A., Schäble S., Becker S., Braun K. (2010). Cognitive training during infancy and adolescence accelerates adult associative learning: critical impact of age, stimulus contingency and training intensity. *Neurob Learn Mem*, 94, 329–340.
- Gur R. E., Gur R. C. (2016). Sex differences in brain and behavior in adolescence: findings from the Philadelphia neurodevelopmental cohort. *Neurosci Biobehav Rev*, 70, 159–170.
- Guyer A. E., Silk J. S., Nelson E. E. (2016). The neurobiology of the emotional adolescent: from the inside out. *Neurosci and Biobehav Rev*, 70, 74–85.
- Hadad-Ophir O., Brande-Eilat N., Richter-Levin G. (2016). Differential effects of controllable stress exposure on subsequent extinction learning in adult rats. *Front Behav Neurosci*, 9, 1-13.
- Hadad-Ophir O., Ardi Z., Brande-Eilat N., Kehat O., Anunu R., Richter-Levin G. (2017). Exposure to prolonged controllable or uncontrollable stress affects GABAergic function in subregions of the hippocampus and the amygdala. *Neurob Learn Mem*, 138, 271–280.
- Hamilton K. R., Mitchell M. R., Wing V. C., Balodis I. M., Bickel W. K., Fillmore M., ... Moeller F. G. (2015). Choice impulsivity: definitions, measurement issues, and clinical implications. *Personal Disord*, 6, 182–198.
- Hardin J., Hilbe J.M. (2003) *Generalized Estimating Equations*, 2nd ed. Chapman and Hall/CRC, 1-277.
- Hare T. A., Tottenham N., Galvan A., Voss H. U., Glover G. H., Casey B. J. (2008). Biological substrates of emotional reactivity and regulation in adolescence during an emotional Go-NoGo task. *Biol Psychiatry*, 63, 927–934.
- Harris R. B., Zhou J., Youngblood B. D., Smagin G. N., Ryan D. H. (1997). Failure to change exploration or saccharin preference in rats exposed to chronic mild stress. *Physiol Behav*, 63, 91-100.
- Harrison A. A., Everitt B. J., Robbins T. W. (1997). Central 5-HT depletion enhances impulsive responding without affecting the accuracy of attentional performance: interactions with dopaminergic mechanisms. *Psychopharmacology*, 133, 329–342.
- Hartley C. A., Gorun A., Reddan M. C., Ramirez F., Phelps E. A. (2013). Stressor controllability modulates fear extinction in humans. *Neurob Learn Mem*, 113, 149–156.
- Hefner K., Holmes A. (2007). Ontogeny of fear-, anxiety- and depression-related behavior across adolescence in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res*, 176, 210–215.
- Helmreich D., Watkins L., Deak T., Maier S., Akil H., Watson S. (1999). The effect of stressor controllability on stress-induced neuropeptide mRNA expression within the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neuroendocrinol*, 11, 121–128.
- Helmreich D. L., Parfitt D. B., Walton J. R., Richards L. M. (2008). Dexamethasone and stressor-magnitude regulation of stress-induced transcription of HPA axis secretagogues in the rat. *Stress*, 11, 302–311.
- Henderson R. K., Snyder H. R., Gupta T., Banich M. T. (2012). When does stress help or harm? The effects of stress controllability and subjective stress response on Stroop performance. *Front Psychol*, 3, 1–15.
- Herman J. P., Figueiredo H., Mueller N. K., Ulrich-Lai Y., Ostrander M. M., Choi D. C., Cullinan W. E. (2003). Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol*, 24, 151–180.

- Hetzel A., Rosenkranz J. A. (2014). Distinct effects of repeated restraint stress on basolateral amygdala neuronal membrane properties in resilient adolescent and adult rats. *Neuropsychopharmacology*, 39, 2114–2130.
- Higgins G. A., Ouagazzal A. M., Grottick A. J. (2001). Influence of the 5-HT_{2C} receptor antagonist SB242,084 on behavior produced by the 5-HT₂ agonist Ro60-0175 and the indirect 5-HT agonist dexfenfluramine. *Br J Pharmacol*, 133, 459–66.
- Hodges T. E., Baumbach J. L., Marcolin M. L., Bredewold R., Veenema A. H., McCormick C. M. (2017). Social instability stress in adolescent male rats reduces social interaction and social recognition performance and increases oxytocin receptor binding. *Neuroscience*, 359, 172–182.
- Holmes F. (1986). Claude Bernard, The “Milieu Intérieur”, and Regulatory Physiology. *Hist Phil Life Sci*, 8, 3–25.
- Hooper C. J., Luciana M., Conklin H. M., Yarger R. S. (2004). Adolescents’ performance on the Iowa Gambling Task: implications for the development of decision making and ventromedial prefrontal cortex. *Dev Psychol*, 40, 1148–1158.
- Horovitz O., Tsoory M. M. M., Yovell Y., Richter-Levin G. (2014). A rat model of pre-puberty (juvenile) stress-induced predisposition to stress-related disorders: sex similarities and sex differences in effects and symptoms. *World J Biol Psychiatry*, 15, 36–48.
- Horovitz O., Richter-Levin A., Xu L., Jing L., Richter-Levin G. (2017). Periaqueductal grey differential modulation of nucleus accumbens and basolateral amygdala plasticity under controllable and uncontrollable stress. *Sci Rep*, 7, 1–12.
- Huerta P. T., Sun L. D., Wilson M. A., Tonegawa S. (2000). Formation of temporal memory requires NMDA receptors within cal pyramidal neurons. *Neuron*, 25, 473–480.
- Ilin Y., Richter-Levin G. (2009). Enriched environment experience overcomes learning deficits and depressive-like behavior induced by juvenile stress. *PLoS ONE*, 4, 1–12.
- Isgor C., Kabbaj M., Akil H., Watson S. J. (2004). Delayed effects of chronic variable stress during peripubertal-juvenile period on hippocampal morphology and on cognitive and stress axis functions in rats. *Hippocampus*, 14, 636–648.
- Ito W., Pan B. X., Yang C., Thakur S., Morozov A. (2009). Enhanced generalization of auditory conditioned fear in juvenile mice. *Learn Mem*, 16, 187–192.
- Izquierdo A., Wellman C. L., Holmes A. (2006). Brief uncontrollable stress causes dendritic retraction in infralimbic cortex and resistance to fear extinction in mice. *J Neurosci*, 26, 5733–5738.
- Jacobson-Pick S., Elkobi A., Vander S., Rosenblum K., Richter-Levin G. (2008). Juvenile stress-induced alteration of maturation of the GABA-A receptor alpha subunit in the rat. *Int J Neuropsychopharmacol*, 11, 891–903.
- Jacobson-Pick, S., Richter-Levin, G. (2010). Differential impact of juvenile stress and corticosterone in juvenility and in adulthood, in male and female rats. *Behav Brain Res*, 214, 268–276.
- Jacobson-Pick S., Richter-Levin G. (2012). Short-and long-term effects of juvenile stressor exposure on the expression of GABA-A receptor subunits in rats. *Stress*, 15, 416–424.
- Jankord R., Solomon M. B., Albertz J., Flak J. N., Zhang R., Herman J. P. (2011). Stress vulnerability during adolescent development in rats. *Endocrinology*, 152, 629–638.
- Jentsch J. D., Taylor J. R. (1999). Impulsivity resulting from front striatal dysfunction in drug abuse: implications for the control of behavior by reward-related stimuli. *Psychopharmacology*, 146, 373–390.

- Jentsch J.D., Ashenhurst J.R., Cervantes M.C., James A.S., Groman S.M., Pennington Z.T. (2014). Dissecting impulsivity and its relationships to drug addictions. *Ann N Y Acad Sci*, 1327, 1-26.
- Johnson J. D., O'Connor K. A., Deak T., Stark M., Watkins L. R., Maier S. F. (2002). Prior stressor exposure sensitizes LPS-induced cytokine production. *Brain Behav Immunity*, 16, 461-476.
- Joutsa J., Voon V., Johansson J., Niemelä S., Bergman J., Kaasinen V. (2015). Dopaminergic function and intertemporal choice. *Transl Psychiatry*, 5, 1–7.
- Jupp B., Caprioli D., Dalley J. W. (2013). Highly impulsive rats: modelling an endophenotype to determine the neurobiological, genetic and environmental mechanisms of addiction. *Dis Model Mech*, 6, 302–311.
- Kabbaj M., Isgor C., Watson S. J., Akil H. (2002). Stress during adolescence alters behavioral sensitization to amphetamine. *Neuroscience*, 113, 395–400.
- Kant G. J., Leu J. R., Anderson S. M., Mougey E. H. (1987). Effects of chronic stress on plasma corticosterone, ACTH and prolactin. *Physiol Behav*, 40, 775–779.
- Katz R. J. (1982). Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. *Pharmacol Biochem Behav*, 16, 965–968.
- Kern S., Oakes T. R., Stone C. K., McAuliff E. M., Kirschbaum C., Davidson R. J. (2008). Glucose metabolic changes in the prefrontal cortex are associated with HPA axis response to a social stressor. *Psychoneuroendocrinology*, 33, 517–529.
- Kerr D. L., McLaren D. G., Mathy R. M., Nitschke J. B. (2012). Controllability modulates the anticipatory response in the human ventromedial prefrontal cortex. *Front Psychol*, 3, 1–11.
- Kilford E. J., Garrett E., Blakemore S.J. (2016). The development of social cognition in adolescence: an integrated perspective. *Neurosci Biobehav Rev*, 70, 106–120.
- Kim J. H., Li S., Richardson R. (2011). Immunohistochemical analyses of long-term extinction of conditioned fear in adolescent rats. *Cereb Cortex*, 21, 530-538.
- Kim D. J., Anderson B. J. (2015). Repeated threat (without harm) in a living environment potentiates defensive behavior. *Behav Brain Res*, 279, 31-40.
- King E. C., Pattwell S. S., Glatt C. E., Lee F. S. (2014). Sensitive periods in fear learning and memory. *Stress*, 17, 13–21.
- Knott R., Singec I., Ditter M., Pantazis G., Capetian P., Meyer R. P., ... Kempermann G. (2010). Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PLoS One*, 5, e8809.
- Koba T., Kodama Y., Shimizu K., Nomura S., Sugawara M., Kobayashi Y., ... Ogasawara T. (2001). Persistent behavioral changes in rats following inescapable shock stress: A potential model of posttraumatic stress disorder. *World J Biol Psychiatry*, 2, 34-37.
- Koolhaas J. M., Schuurman T., Wiepkema P. R. (1980). The organization of intraspecific agonistic behaviour in the rat. *Prog Neurobiol*, 15, 247–268.
- Koot S., Zoratto F., Cassano T., Colangeli R., Laviola G., Van Den Bos R., Adriani W. (2012). Compromised decision-making and increased gambling proneness following dietary serotonin depletion in rats. *Neuropharmacology*, 62, 1640–1650.
- Koskinen T., Ruotsalainen S., Puumala T., Lappalainen R., Koivisto E., Männistö P. T., Sirviö J. (2000). Activation of 5-HT_{2A} receptors impairs response control of rats in a five-choice serial reaction time task. *Neuropharmacology*, 39, 471–481.

- Kryptos A. M., Effting M., Kindt M., Beckers T. (2015). Avoidance learning: a review of theoretical models and recent developments. *Front Behav Neurosci*, 9, 1–16.
- Kubala K. H., Christianson J. P., Kaufman R. D., Watkins L. R., Maier S. F. (2012). Short- and long-term consequences of stressor controllability in adolescent rats. *Behav Brain Res*, 234, 278–284.
- Kushner M. G., Riggs D. S., Foa E. B., Miller S. M. (1993). Perceived controllability and the development of posttraumatic stress disorder (PTSD) in crime victims. *Behav Res Ther*, 31, 105–110.
- Lalanza J. F., Sánchez-Roige S., Gagliano H., Fuentes S., Bayod S., Camins A., ... Escorihuela R. M. (2012). Physiological and behavioral consequences of long-term moderate treadmill exercise. *Psychoneuroendocrinology*, 37, 1745-1754.
- Land C., Spear L. P. (2004). Fear conditioning is impaired in adult rats by ethanol doses that do not affect periadolescents. *Int J Dev Neuroscience*, 22, 355–362.
- Landeira-Fernández J., DeCola J. P., Kim J. J., Fanselow M. S. (2006). Immediate shock deficit in fear conditioning: effects of shock manipulations. *Behav Neurosci*, 120, 873–879.
- Larsen B., Luna B. (2015). In vivo evidence of neurophysiological maturation of the human adolescent striatum. *Dev Cogn Neurosci*, 12, 74-85.
- Lau J. Y., Britton J. C., Nelson E. E., Angold A., Ernst M., Goldwin M., ... Smith E. E. (2011). Distinct neural signatures of threat learning in adolescents and adults. *PNAS*, 108, 4500–4505.
- Laviola G., Macrì S., Morley-Fletcher S., Adriani W. (2003). Risk-taking behavior in adolescent mice: Psychobiological determinants and early epigenetic influence. *Neurosci Biobehav Rev*, 27, 19–31.
- Laxmi T. R. R., Stork O., Pape H.C. C. (2003). Generalization of conditioned fear and its behavioral expression in mice. *Behav Brain Res*, 145, 89–98.
- Le L., Morina N., Schnyder U., Schick M., Bryant R. A., Nickerson A. (2018). The effects of perceived torture controllability on symptom severity of posttraumatic stress, depression and anger in refugees and asylum seekers: A path analysis. *Psychiatry Res*, 264, 143–150.
- LeDoux J. E. (1995). Emotion: clues from the brain. *Annu Rev Psychol*, 46, 209–235.
- LeDoux J. E. (2014). Coming to terms with fear. *PNAS*, 111(8), 2871–2878.
- Lee B., London E. D., Poldrack R. A., Farahi J., Nacca A., Monterosso J. R., ... Mandelkern M. A. (2009). Striatal dopamine d2/d3 receptor availability is reduced in methamphetamine dependence and is linked to impulsivity. *J Neurosci*, 29, 14734-14740.
- Lee T. T., Hill M. N. (2013). Age of stress exposure modulates the immediate and sustained effects of repeated stress on corticolimbic cannabinoid CB-1 receptor binding in male rats. *Neuroscience*, 249, 106-114.
- Lenroot R. K., Gogtay N., Greenstein D. K., Wells E. M., Wallace G. L., Clasen L. S., ... Giedd J. N. (2007). Sexual dimorphism of brain developmental trajectories during childhood and adolescence. *NeuroImage*, 36, 1065–1073.
- Letica-Crepulja M., Salcioglu E., Frančišković T., Bašoğlu M. (2011). Factors associated with posttraumatic stress disorder and depression in war-survivors displaced in Croatia. *Croat Med J*, 52, 709–717.
- Leussis M. P., Freund N., Brenhouse H. C., Thompson B. S., Andersen S. L. (2012). Depressive-like behavior in adolescents after maternal separation: sex differences, controllability, and GABA. *Dev Neurosci*, 34, 2010-2017.

- Li C., Liu Y., Yin S., Lu C., Liu D., Jiang H., ... Pan F. (2015). Long-term effects of early adolescent stress: Dysregulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis and central corticotropin releasing factor receptor 1 expression in adult male rats. *Behav Brain Res*, 288, 39-49.
- Liberzon I., Krstov M., Young E. A. (1997). Stress-restress: effects on ACTH and fast feedback. *Psychoneuroendocrinology*, 22, 443-453.
- Lieberman M. A., Fisher L. (1999). The effects of family conflict resolution and decision making on the provision of help for an elder with alzheimer's disease. *Gerontologist*, 39, 159-166.
- Liston C., Miller M. M., Goldwater D. S., Radley J. J., Rocher A. B., Hof P. R., ... McEwen B. S. (2006). Stress-induced alterations in prefrontal cortical dendritic morphology predict selective impairments in perceptual attentional set-shifting. *J Neurosci*, 26, 7870-7874.
- Liu X., Tang X., Sanford L. (2009). Stressor controllability and fos expression in stress regulatory regions in mice. *Physiol Behav*, 97, 321-326.
- Liu H., Atrooz F., Salvi A., Salim S. (2017). Behavioral and cognitive impact of early life stress: insights from an animal model. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 78, 88-95.
- Louvar H., Maccari S., Ducrocq F., Thomas P., Darnaudéry M. (2005). Long-term behavioral alterations in female rats after a single intense foot-shock followed by situational reminders. *Psychoneuroendocrinology*, 30, 316-324.
- Lu L. H., Dapretto M., O' Hare E. D., Kan E., McCourt S. T., Thompson P. M., ... Sowell E. R. (2009). Relationships between brain activation and brain structure in normally developing children. *Cereb Cortex*, 19, 2595-2604.
- Lucas M., Ilin, Y., Anunu R., Kehat O., Xu L., Desmedt A., Richter-Levin G. (2014). Long-term effects of controllability or the lack of it on coping abilities and stress resilience in the rat. *Stress*, 17, 423-430.
- Luciana M. (2013). Adolescent brain development in normality and psychopathology. *Dev Psychopath*, 25, 1325-1345.
- Lui P., Padow V. A., Franco D., Hall B. S., Park B., Klein Z. A., Romeo R. D. (2012). Divergent stress-induced neuroendocrine and behavioral responses prior to puberty. *Physiol Behav*, 107, 104-111.
- Luine V., Villegas M., Martínez C., McEwen B. S. (1994). Stress-dependent impairments of spatial memory. Role of 5-HT. *Ann N Y Acad Sci*, 746, 403-404.
- Lukkes J. L., Watt M. J., Lowry C. A., Forster G. L. (2009). Consequences of post-weaning social isolation on anxiety behavior and related neural circuits in rodents. *Front Behav Neurosci*, 3, 18.
- Luo X. M., Yuan S. N., Guan X. T., Xie X., Shao F., Wang W. W. (2014). Juvenile stress affects anxiety-like behavior and limbic monoamines in adult rats. *Physiol Behav*, 135, 7-16.
- Lyttle K., Ohmura Y., Konno K., Yoshida T., Izumi T., Watanabe M., Yoshioka M. (2015). Repeated fluvoxamine treatment recovers juvenile stress-induced morphological changes and depressive-like behavior in rats. *Brain Res*, 1616, 88-100.
- MacKillop Weafer J., Gray J., Oshri A., Palmer A., de Wit, H. (2016). The latent structure of impulsivity: impulsive choice, impulsive action, and impulsive personality traits. *Psychopharmacology*, 233, 3361-3370.
- Magariños A. M., McEwen B. S. (1995a). Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal ca3c neurons: Comparison of stressors. *Neuroscience*, 69, 83-88.

- Magariños A. M., McEwen B. S. (1995b). Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal ca3c neurons: Involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience*, 69, 89-98.
- Maier S. F. (1984). Learned helplessness and animal models of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 8, 435-446.
- Maier S. F., Grahn R. E., Kalman B. A., Lorraine C. S., Wiertelak E. P., Watkins L. R. (1993). The role of the amygdala and dorsal raphe nucleus in mediating the behavioral consequences of inescapable shock. *Behav Neurosci*, 107, 377-388.
- Maier S. F., Kalman B. A., Grahn R. E. (1994). Chlordiazepoxide microinjected into the region of the dorsal raphe nucleus eliminates the interference with escape responding produced by inescapable shock whether administered before inescapable shock or escape testing. *Behav Neurosci*, 108, 121-130.
- Maier S. F., Ryan S. M., Barksdale C. M., Kalin N. H. (1986). Stressor controllability and the pituitary-adrenal system. *Behav Neurosci*, 100, 669-674.
- Maier S. F. (2001). Exposure to the stressor environment prevents the temporal dissipation of behavioral depression/learned helplessness. *Biol Psychiatry*, 49, 763-773.
- Maier S. F., Amat J., Baratta M. V., Paul E., Watkins L. R. (2006). Behavioral control, the medial prefrontal cortex, and resilience. *Dialogues Clin Neurosci*, 8, 397-406.
- Maier S. F. (2015). Behavioral control blunts reactions to contemporaneous and future adverse events: Medial prefrontal cortex plasticity and a corticostriatal network. *Neurobiology Stress*, 1, 12-22.
- Maier S. F., Seligman M. E. P. (2016). Learned helplessness at fifty: insights from neuroscience. *Psychol Rev*, 123, 349-367.
- Maier S. F., Watkins L. R. (2005). Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. *Neurosci Biobehav Rev*, 29, 829-841.
- Manes F., Sahakian B., Clark L., Rogers R., Antoun N., Aitken M., Robbins T. W. (2002). Decision-making processes following damage to the prefrontal cortex. *Brain*, 125, 624-639.
- Mar A. C., Walker A. L. J., Theobald D. E., Eagle D. M., Robbins T. W. (2011). Dissociable effects of lesions to orbitofrontal cortex subregions on impulsive choice in the rat. *J Neurosci*, 31, 6398-6404.
- Markus R., Panhuysen G., Tuiten A., Koppeschaar H. (2000). Effects of food on cortisol and mood in vulnerable subjects under controllable and uncontrollable stress. *Physiol Behav*, 70, 333-342.
- Márquez C., Belda X., Armario A. (2002). Post-stress recovery of pituitary-adrenal hormones and glucose, but not the response during exposure to the stressor, is a marker of stress intensity in highly stressful situations. *Brain Res*, 926, 181-185.
- Márquez C., Nadal R., Armario A. (2004). The hypothalamic-pituitary-adrenal and glucose responses to daily repeated immobilization stress in rats: individual differences. *Neuroscience*, 123, 601-612.
- Márquez C., Poirier G. L., Cordero M. I., Larsen M. H., Groner A., Marquis J., ... Sandi C. (2013). Peripuberty stress leads to abnormal aggression, altered amygdala and orbitofrontal reactivity and increased prefrontal MAOA gene expression. *Transl Psychiatry*, 3, 1-12.
- Martí J., Armario A. (1993). Effects of diazepam and desipramine in the forced swimming test: influence of previous experience with the situation. *Eur J Pharmacol*, 236, 295-299.

- Martí O., Martí J., Armario A., (1994). Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiol Behav*, 55, 747–753.
- Marti O., Armario A. (1998). Anterior pituitary response to stress: Time-related changes and adaptation. *Int J Dev Neurosci*, 16, 241-260.
- Martin P., Soubrie P., Simon P. (1986). Shuttle-box deficits induced by inescapable shocks in rats: reversal by the beta-adrenoreceptor stimulants clenbuterol and salbutamol. *Pharmacol Biochem Behav*, 24, 177-181.
- Maslova L. N., Bulygina V. V., Markel A. L. (2002a). Chronic stress during prepubertal development: Immediate and long-lasting effects on arterial blood pressure and anxiety-related behavior. *Psychoneuroendocrinology*, 27, 549–561.
- Maslova L. N., Bulygina V. V., Popova N.K. (2002b). Immediate and long-lasting effects of chronic stress in the prepubertal age on the startle reflex, *Physiol Behav*, 75, 217-225.
- Maswood S., Barter J. E., Watkins L. R., Maier S. F. (1998). Exposure to inescapable shock increases extracellular levels of 5-HT in the dorsal raphe nucleus of the rat. *Brain Res*, 783, 115–120.
- Mathews I. Z., Wilton A., Styles A., McCormick C. M. (2008). Increased depressive behavior in females and heightened corticosterone release in males to swim stress after adolescent social stress in rats. *Behav Brain Res*, 190, 33–40.
- McCallum J., Kim J. H., Richardson R. (2010). Impaired extinction retention in adolescent rats: effects of d-cycloserine. *Neuropsychopharmacology*, 35, 2134–2142.
- McCormick C. M., Robarts D., Gleason E., Kelsey J. E. (2004). Stress during adolescence enhances locomotor sensitization to nicotine in adulthood in female, but not male, rats. *Horm Behav*, 46, 458–66.
- McCormick C. M., Robarts D., Kopeikina K., Kelsey J. E. (2005). Long-lasting, sex- and age-specific effects of social stressors on corticosterone responses to restraint and on locomotor responses to psychostimulants in rats. *Horm Behav*, 48, 64–74.
- McCormick C. M., Smith C., Mathews I. (2008). Effects of chronic social stress in adolescence on anxiety and neuroendocrine response to mild stress in male and female rats. *Behav Brain Res*, 187, 228–238.
- McCormick C. M., Nixon F., Thomas C., Lowie B., Dyck J. (2010). Hippocampal cell proliferation and spatial memory performance after social instability stress in adolescence in female rats. *Behav Brain Res*, 208, 23–29.
- McCormick C. M., Thomas C. M., Sheridan C. S., Nixon F., Flynn J. A., Mathews I. Z. (2012). Social instability stress in adolescent male rats alters hippocampal neurogenesis and produces deficits in spatial location memory in adulthood. *Hippocampus*, 22, 1300–1312.
- McCormick C. M., Green M. R., Cameron N. M., Nixon F., Levy M. J., Clark R. A. (2013a). deficits in male sexual behavior in adulthood after social instability stress in adolescence in rats. *Horm Behav*, 63, 5–12.
- McCormick C. M., Mongillo D. L., Simone J. J. (2013b). Age and adolescent social stress effects on fear extinction in female rats. *Stress*, 16, 678–688.
- McCulloch C.E., Searle S.R., Neuhaus J.M. (2001). *Generalized, Linear, and Mixed Models*, 2nd ed. Wiley-Interscience, 1–424.
- McEchron M. D., Bouwmeester H., Tseng W., Weiss C., Disterhoft J. F. (1998). Hippocampectomy disrupts auditory trace fear conditioning and contextual fear conditioning in the rat. *Hippocampus*, 8, 638-646.

- McEwen B. S. (1998). Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci*, 840, 33–44.
- McEwen B. S. (2000). Allostasis and allostatic load: implications for neuropsychopharmacology. *Neuropsychopharmacology*, 22, 108–124.
- McKlveen J. M., Myers B., Flak J. N., Bundzikova J., Solomon M. B., Seroogy K. B., Herman J. P. (2013). Role of prefrontal cortex glucocorticoid receptors in stress and emotion. *Biol Psychiatry*, 74, 672–679.
- Mobini S., Body S., Ho M.Y., Bradshaw C. M., Szabadi E., Deakin J. F. W., Anderson I. M. (2002). Effects of lesions of the orbitofrontal cortex on sensitivity to delayed and probabilistic reinforcement. *Psychopharmacology*, 160, 290–298.
- Monahan K. C., Guyer A. E., Silk J., Fitzwater T. (2016). Chapter 19-Integration of developmental neuroscience and contextual approaches to the study of adolescent psychopathology. In *Developmental Psychopathology*, 3rd ed. pp.1-46.
- Monk C. S., McClure E. B., Nelson E. E., Zarahn E., Bilder R. M., Leibenluft E., ... Pine D. S. (2003). Adolescent immaturity in attention-related brain engagement to emotional facial expressions. *NeuroImage*, 20, 420–428.
- Morein-Zamir S., Simon Jones P., Bullmore E. T., Robbins T. W., Ersche K. D. (2013). Prefrontal hypoactivity associated with impaired inhibition in stimulant-dependent individuals but evidence for hyperactivation in their unaffected siblings. *Neuropsychopharmacology*, 38, 1945–1953.
- Mormede P., Dantzer R., Michaud B., Kelley K. W., Le Moal M. (1988). Influence of stressor predictability and behavioral control on lymphocyte reactivity, antibody responses and neuroendocrine activation in rats. *Physiol Behav*, 43, 577–583.
- Morrissey M.D., Mathews I.Z., McComrie C.M. (2011). Enduring deficits in contextual and auditory fear conditioning after adolescent, not adult, social instability stress in male rats. *Neurobiol Learn Mem*, 95, 46-56.
- Moscarello J. M., Hartley C. A. (2017). Agency and the calibration of motivated behavior. *Trends Cogn Sci*, 21, 725–735.
- Muir J. L., Everitt B. J., Robbins T. W. (1996). The cerebral cortex of the rat and visual attentional function: dissociable effects of mediofrontal, cingulate, anterior dorsolateral, and parietal cortex lesions on a five-choice serial reaction time task. *Cereb Cortex*, 6, 470–481.
- Müller M. J. (2011). Helplessness and perceived pain intensity: relations to cortisol concentrations after electrocutaneous stimulation in healthy young men. *BioPsychoSocial Med*, 5, 8.
- Muñoz-Abellán C., Daviu N., Rabasa C., Nadal R., Armario A. (2009). Cat odor causes long-lasting contextual fear conditioning and increased pituitary-adrenal activation, without modifying anxiety. *Horm Behav*, 56, 465–471.
- Murua V. S., Gómez R. A., Andrea M. E., Molina V. A. (1991a). Shuttle-box deficits induced by chronic variable stress: reversal by imipramine administration. *Pharmacol Biochem Behav*, 38, 125–130.
- Murua V. S., Molina V. A. (1991b). Antidepressants reduce inactivity during both inescapable shock administration and shuttle-box testing. *Eur J Pharmacol*, 204, 187–192.
- Myslivecek J., Hassmannová J. (1979). Ontogeny of active avoidance in the rat: learning and memory. *Dev Psychobiol*, 12, 169–186.

- Naert G., Ixart G., Maurice T., Tapia-Arancibia L., Givalois L. (2011). Brain-derived neurotrophic factor and hypothalamic-pituitary-adrenal axis adaptation processes in a depressive-like state induced by chronic restraint stress. *Mol Cell Neurosci*, 46, 55–66.
- Navarra R., Graf R., Huang Y., Logue S., Comery T., Hughes Z., Day M. (2008). Effects of atomoxetine and methylphenidate on attention and impulsivity in the 5-choice serial reaction time test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 32, 34–41.
- Negrón-Oyarzo I., Pérez M. Á., Terreros G., Muñoz P., Dagnino-Subiabre A. (2014). Effects of chronic stress in adolescence on learned fear, anxiety, and synaptic transmission in the rat prelimbic cortex. *Behav Brain Res*, 259, 342–353.
- Negrón-Oyarzo I., Dagnino-Subiabre A., Muñoz Carvajal P. (2015). Synaptic impairment in layer I of the prefrontal cortex induced by repeated stress during adolescence is reversed in adulthood. *Front Cell Neurosci*, 9, 1–11.
- Nigg J. T. (2001). Is ADHD a disinhibitory disorder? *Psychol Bull*, 127, 571–598.
- Novick A. M., Miiller L. C., Forster G. L., Watt M. J. (2013). Adolescent social defeat decreases spatial working memory performance in adulthood. *Behav Brain Funct*, 9, 2–11.
- Novick A. M., Forster G. L., Hassell J. E., Davies D. R., Jamie L., Renner K. J., Watt M. J. (2016). Increased dopamine transporter function as a mechanism for dopamine hypoactivity in the adult infralimbic medial prefrontal cortex following adolescent social stress. *Neuropharmacology*, 97, 194–200.
- O'Connor K. A., Johnson J. D., Hammack S. E., Brooks L. M., Spencer R. L., Watkins L. R., Maier S. F. (2003). Inescapable shock induces resistance to the effects of dexamethasone. *Psychoneuroendocrinology*, 28, 481–500.
- O'Connor K. A., Ginsberg A. B., Maksimova E., Wieseler Frank, J. L., Johnson J. D., Spencer R. L., ... Maier S. F. (2004). Stress-induced sensitization of the hypothalamic-pituitary adrenal axis is associated with alterations of hypothalamic and pituitary gene expression. *Neuroendocrinology*, 80, 252–263.
- Oberlin B. G., Albrecht D. S., Herring C. M., Walters J. W., Hile K. L., Kareken D. A., Yoder K. K. (2015). Monetary discounting and ventral striatal dopamine receptor availability in nontreatment-seeking alcoholics and social drinkers. *Psychopharmacology*, 232, 2207–2216.
- Olson E. A., Hooper C. J., Collins P., Luciana M. (2007). Adolescents' performance on delay and probability discounting tasks: contributions of age, intelligence, executive functioning, and self-reported externalizing behavior. *Pers Individ Dif*, 43, 1886–1897.
- Olson E. A., Collins P. F., Hooper C. J., Muetzel R., Lim K. O., Luciana M. (2009). White matter integrity predicts delay discounting behavior in 9 to 23-year-olds: a diffusion tensor imaging study. *J Cogn Neurosci*, 21, 1406–1421.
- Orsini C. A., Mitchell M. R., Heshmati S. C., Shimp K. G., Spurrell M., Bizon J. L., ... Haven N. (2017). Effects of nucleus accumbens amphetamine administration on performance in a delay discounting task. *Behav Brain Res*, 321, 130–136.
- Ouerchefani R., Ouerchefani N., Allain P., Ben Rejeb M. R., Le Gall D. (2017). Contribution of different regions of the prefrontal cortex and lesion laterality to deficit of decision-making on the Iowa Gambling Task. *Brain Cogn*, 111, 73–85.
- Overmier J. B., Seligman M. E. (1967). Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance responding. *J Comp Physiol Psychol*, 63, 28–33.

- Oztan O., Aydin C., Isgor C. (2011). Chronic variable physical stress during the peripubertal-juvenile period causes differential depressive and anxiogenic effects in the novelty-seeking phenotype: functional implications for hippocampal and amygdalar BDNF and the mossy fibre plasticity. *Neuroscience*, 192, 334–344.
- Pacak K., Palkovits M. (2001). Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev*, 22, 502–548.
- Page C., Alexander J., Shepard R., Coutellier L. (2018). Npas4 deficiency interacts with adolescent stress to disrupt prefrontal GABAergic maturation and adult cognitive flexibility. *Genes Brain Behav*, 17, 1–23.
- Paine T. A., Asinof S. K., Diehl G. W., Frackman A., Leffler J. (2013). Medial prefrontal cortex lesions impair decision-making on a rodent gambling task: reversal by D1 receptor antagonist administration. *Behav Brain Res*, 243, 247–254.
- Pais-Vieira M., Lima D., Galhardo V. (2007). Orbitofrontal cortex lesions disrupt risk assessment in a novel serial decision-making task for rats. *Neuroscience*, 145, 225–231.
- Papp M., Willner P., Muscat R. (1991). An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. *Psychopharmacology*, 104, 255–259.
- Parent A. S., Teilmann G., Juul A., Skakkebaek N. E., Toppari J., Bourguignon J. P. (2003). The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocrine Rev*, 24, 668–693.
- Parent A. J., Beaudet N., Beaudry H., Bergeron J., Berube P., Drolet G., ... Gendron L. (2012). Increased anxiety-like behaviors in rats experiencing chronic inflammatory pain. *Behav Brain Res*, 229, 160-167.
- Parihar V. K., Hattiangady B., Kuruba R., Shuai B., Shetty A. K. (2011). Predictable chronic mild stress improves mood, hippocampal neurogenesis and memory. *Mol Psychiatry*, 16, 171–183.
- Passetti F., Chudasama Y., Robbins T. W. (2002). The frontal cortex of the rat and visual attentional performance: dissociable functions of distinct medial prefrontal subregions. *Cereb Cortex*, 12, 1254–1268.
- Pastor-Ciurana J., Rabasa C., Ortega-Sánchez J. A., Sanchís-Ollé M., Gabriel-Salazar M., Ginesta M., ... Armario A. (2014). Prior exposure to repeated immobilization or chronic unpredictable stress protects from some negative sequels of an acute immobilization. *Behav Brain Res*, 265, 155–162.
- Paterson N. E., Wetzler C., Hackett A., Hanania T. (2012). Impulsive action and impulsive choice are mediated by distinct neuropharmacological substrates in rat. *Int J Neuropsychopharmacology*, 15, 1473–1487.
- Patki G., Salvi A., Liu H., Salim S. (2015). Witnessing traumatic events and post-traumatic stress disorder: insights from an animal model. *Neurosci Lett*, 600, 28–32.
- Pattij T., Janssen M. C. W., Vanderschuren L. J. M. J., Schoffelmeer A. N. M., van Gaalen M. M. (2007). Involvement of dopamine D1 and D2 receptors in the nucleus accumbens core and shell in inhibitory response control. *Psychopharmacology*, 191, 587–598.
- Pattij T., Schetters D., Schoffelmeer A. N. M., Van Gaalen M. M. (2012). On the improvement of inhibitory response control and visuospatial attention by indirect and direct adrenoceptor agonists. *Psychopharmacology*, 219, 327–340.
- Patton J. H., Stanford M. S., Barratt E. S. (1995). Factor structure of the Barratt impulsiveness scale. *J Clin Psychol*, 51, 768–774.

- Pattwell S. S., Bath K. G., Casey B. J., Ninan I., Lee F. S., McEwen B. S. (2011). Selective early-acquired fear memories undergo temporary suppression during adolescence. *PNAS*, 108, 1182–1187.
- Pattwell S. S., Duhoux S., Hartley C. A., Johnson D. C., Jing D., Elliott M. D., ... Lee F. S. (2012). Altered fear learning across development in both mouse and human. *PNAS*, 109, 16318–16323.
- Pattwell S. S., Bath K. G. (2017). Emotional learning, stress, and development: An ever-changing landscape shaped by early-life experience. *Neurobiol Learn Mem*, 143, 36–48.
- Paus T., Keshavan M., Giedd J. N. (2008). Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? *Nat Rev Neurosci*, 9, 947–957.
- Pautassi R. M., Myers M., Spear L. P., Molina J. C., Spear N. E. (2008). Adolescent but not adult rats exhibit ethanol-mediated appetitive second-order conditioning. *Alcohol Clin Exp Res*, 32, 2016–2027.
- Pellow S., File S. E. (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 24, 525–529.
- Perry J. L., Carroll M. E. (2008). The role of impulsive behavior in drug abuse. *Psychopharmacology*, 200, 1–26.
- Pignatelli D., Xiao F., Gouveia A. M., Ferreira J. G., Vinson G. P. (2006). Adrenarche in the rat. *J Endocrinology*, 191, 301–308.
- Pine A., Shiner T., Seymour B., Dolan R. J. (2010). Dopamine, time and impulsivity in humans. *J Neurosci*, 30, 8888–8896.
- Pohl J., Olmstead M. C., Wynne-Edwards K. E., Harkness K., Menard J. L. (2007). Repeated exposure to stress across the childhood-adolescent period alters rats' anxiety- and depression-like behaviors in adulthood: The importance of stressor type and gender. *Behav Neurosci*, 121, 462–474.
- Poirier G. L., Imamura N., Zanoletti O., Sandi C. (2014). Social deficits induced by peripubertal stress in rats are reversed by resveratrol. *J Psychiatric Res*, 57, 157–164.
- Pol O., Campmany L., Gil M., Armario A. (1992). Behavioral and neurochemical changes in response to acute stressors: influence of previous chronic exposure to immobilization. *Pharmacol Biochem Behav*, 42, 407–412.
- Porsolt R. D., Le Pichon M., Jalfre M. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266, 730–732.
- Pothuizen H. H. J., Jongen-Relo A. L., Feldon J., Yee B. K. (2005). Double dissociation of the effects of selective nucleus accumbens core and shell lesions on impulsive-choice behavior and salience learning in rats. *Eur J Neurosci*, 22, 2605–2616.
- Poulos C. X., Parker J. L., Le A. D. (1996). Dexfenfluramine and 8-OH-DPAT modulate impulsivity in a delay-of-reward paradigm: implications for a correspondence with alcohol consumption. *Behav Pharmacol*, 7, 395–399.
- Prencipe A., Kesek A., Cohen J., Lamm C., Lewis M. D., Zelazo P. D. (2011). Development of hot and cool executive function during the transition to adolescence. *J Exp Child Psychol*, 108, 621–637.
- Prince C. R., Anisman H. (1990). Situation specific effects of stressor controllability on plasma corticosterone changes in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 37, 613–621.

- Pryce C. R., Azzinnari D., Sigrist H., Gschwind T., Lesch K. P., Seifritz E. (2012). Establishing a learned-helplessness effect paradigm in C57BL/6 mice: behavioral evidence for emotional, motivational and cognitive effects of aversive uncontrollability per se. *Neuropharmacology*, 62, 358–372.
- Quan M. N., Tian Y. T., Xu K. H., Zhang T., Yang Z. (2010). Post weaning social isolation influences spatial cognition, prefrontal cortical synaptic plasticity and hippocampal potassium ion channels in Wistar rats. *Neuroscience*, 169, 214–222.
- Rabasa C., Muñoz-Abellán C., Daviu N., Nadal R., Armario A. (2011). Repeated exposure to immobilization or two different foot-shock intensities reveals differential adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Physiol Behav*, 103, 125–133.
- Rabasa C., Gagliano H., Pastor-Ciurama J. Fuentes S., Belda X., Nadal N., Armario A. (2015). Adaptation of the hypothalamus–pituitary–adrenal axis to daily repeated stress does not follow the rules of habituation: A new perspective. *Neurosci Biobehav Rev*, 56, 35-49.
- Radley J. J., Sisti H. M., Hao J., Rocher A. B., McCall T., Hof P. R., ... Morrison, J. H. (2004). Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. *Neuroscience*, 125, 1-6.
- Radley J. J., Rocher A. B., Janssen W. G. M., Hof P. R., McEwen B. S., Morrison J. H. (2005). Reversibility of apical dendritic retraction in the rat medial prefrontal cortex following repeated stress. *Exp Neurol*, 196, 199–203.
- Radley J. J., Rocher A. B., Rodriguez A., Ehlenberger D. B., Dammann M., McEwen B. S., ... Hof, P. R. (2008). Repeated stress alters dendritic spine morphology in the rat medial prefrontal cortex. *J Comp Neurol*, 507, 1141-1150.
- 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.
- Raineki C., Chew L., Mok P., Ellis L., Weinberg J. (2016). Short- and long-term effects of stress during adolescence on emotionality and HPA function of animals exposed to alcohol prenatally. *Psychoneuroendocrinology*, 74, 13-23.
- Rapaport P. M., Maier S. F. (1978). Inescapable shock and food-competition dominance in rats. *Animal Learning and Behavior*, 6, 160-165.
- Reich C. G., Mihalik G. R., Iskander A. N., Seckler J. C., Weiss M. S. (2013). Adolescent chronic mild stress alters hippocampal CB1 receptor-mediated excitatory neurotransmission and plasticity. *Neuroscience*, 253, 444–454.
- Rescorla R. A. (1968). Pavlovian conditioned fear in Sidman avoidance learning. *J Comp Physiol Psychol*, 65, 55–60.
- Rescorla R. A. (1988). Behavioral studies of Pavlovian conditioning. *Ann Rev Neurosci*, 11, 329-352.
- Restivo L., Vetere G., Bontempi B., Ammassari-Teule M. (2009). The formation of recent and remote memory is associated with time-dependent formation of dendritic spines in the hippocampus and anterior cingulate cortex. *J Neurosci*, 29, 8206–8214.
- Reul J. M. H. M., de Kloet E. R. (1985). Two receptor systems for corticosterone in rat brain: Microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, 117, 2505-2511.
- Rex A., Voigt J.P., Gustedt C., Beckett S., Fink H. (2004). Anxiolytic-like profile in Wistar, but not Sprague-Dawley rats in the social interaction test. *Psychopharmacology*, 177, 23–34.

- Rivalan M., Ahmed S. H., Dellu-Hagedorn F. (2009). Risk-prone individuals prefer the wrong options on a rat version of the Iowa Gambling Task. *Biol Psychiatry*, 66, 743–749.
- Rivalan M., Coutureau E., Fitoussi A., Dellu-Hagedorn F. (2011). Inter-individual decision-making differences in the effects of cingulate, orbitofrontal, and prelimbic cortex lesions in a rat gambling task. *Front Behav Neurosci*, 5, 1–10.
- Rivalan M., Valton V., Seriès P., Marchand A. R., Dellu-Hagedorn F. (2013). Elucidating poor decision-making in a rat gambling task. *PLoS ONE*, 8, 1–15.
- Robbins T. W., Jones G. H., Wilkinson L. S. (1996). Behavioral and neurochemical effects of early social deprivation in the rat. *J Psychopharmacol*, 10, 39–47.
- Robbins T. W. (2002). The 5-choice serial reaction time task: behavioral pharmacology and functional neurochemistry. *Psychopharmacology*, 163, 362–380.
- Robinson E. S. J., Dalley J. W., Theobald D. E., Glennon J. C., Pezze M. A., Murphy E. R., Robbins T. W. (2008a). Opposing roles for 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors in the nucleus accumbens on inhibitory response control in the 5-choice serial reaction time task. *Neuropsychopharmacology*, 33, 2398–2406.
- Robinson E. S. J., Eagle D. M., Mar A. C., Bari A., Banerjee G., Jiang X., ... Robbins T. W. (2008b). Similar effects of the selective noradrenaline reuptake inhibitor atomoxetine on three distinct forms of impulsivity in the rat. *Neuropsychopharmacology*, 33, 1028–1037.
- Robinson E. S. J. (2012). Blockade of noradrenaline re-uptake sites improves accuracy and impulse control in rats performing a five-choice serial reaction time tasks. *Psychopharmacology*, 219, 303–312.
- Rock E. M., Limebeer C. L., Petrie G. N., Williams L. A., Mechoulam R., Parker, L. A. (2017). Effect of prior foot shock stress and Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiolic acid, and cannabidiol on anxiety-like responding in the light-dark emergence test in rats. *Psychopharmacology*, 1–11.
- Rogers R., Baunez C., Everitt B. J., Robbins T.W. (2001). Lesions of the medial and lateral striatum in the rat produce differential deficits in attentional performance. *Behav Neurosci*, 115, 799–811.
- Romeo R. D., Lee S. J., Chhua N., McPherson C. R., McEwen B. S. (2004a). Testosterone cannot activate an adult-like stress response in prepubertal male rats. *Neuroendocrinology*, 79, 125–132.
- Romeo R. D., Lee S. J., McEwen B. S. (2004b). Differential stress reactivity in intact and ovariectomized prepubertal and adult female rats. *Neuroendocrinology*, 80, 387–393.
- Romeo R. D., Bellani R., Karatsoreos I. N., Chhua N., Vernov M., Conrad C. D., McEwen B. S. (2006a). Stress history and pubertal development interact to shape hypothalamic-pituitary-adrenal axis plasticity. *Endocrinology*, 147, 1664–1674.
- Romeo R. D., Karatsoreos I. N., McEwen B. S. (2006b). Pubertal maturation and time of day differentially affect behavioral and neuroendocrine responses following an acute stressor. *Horm Behav*, 50, 463–468.
- Romeo R. D., Karatsoreos I. N., Jasnow A. M., McEwen B. S. (2007). Age- and stress-induced changes in corticotropin-releasing hormone mRNA expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuroendocrinology*, 85, 199–206.
- Romeo R.D., Minhas S., Svirsky S.E., Hall B.S., Savenkova M., Karatsoreos I.L. (2014). Pubertal shifts in adrenal responsiveness to stress and adrenocorticotrophic hormone in male rats. *Psychoneuroendocrinology*, 42, 146–152.
- Romeo R. D. (2018). The metamorphosis of adolescent hormonal stress reactivity: A focus on animal models. *Front Neuroendocrinol*, 49, 43–51.

- Rutter M. (2013). Annual research review: resilience - clinical implications. *J Child Psychol Psychiatry*, 54, 474–487.
- Rygula R., Abumaria N., Havemann-Reinecke U., Ruther E., Hiemke C., Zernig G., ... Flugge G. (2008). Pharmacological validation of a chronic social stress model of depression in rats: Effects of reboxetine, haloperidol and diazepam. *Behav Pharmacol*, 19, 183-196.
- Sabol K. E., Richards J. B., Layton K., Seiden L. S. (1995). Amphetamine analogs have differential effects on DRL 36-s schedule performance. *Psychopharmacology*, 121, 57–65.
- Saddoris M., Sugam J., Stuber G., Witten I., Deisseroth K., Carelli R. (2015). Mesolimbic dopamine dynamically tracks, and is causally linked to, discrete aspects of value-based decision making. *Biol Psychiatry*, 77, 903–911.
- Sadler A. M., Bailey S. J. (2016). Repeated daily restraint stress induces adaptive behavioral changes in both adult and juvenile mice. *Physiol Behav*, 167, 313–323.
- Salcioglu E., Urhan S., Pirinccioglu T., Aydin S. (2017). Anticipatory fear and helplessness predict PTSD and depression in domestic violence survivors. *Psychol Trauma*, 9, 117–125.
- Salomons T. V., Johnstone T., Backonja M.M., Shackman A. J., Davidson R. J. (2007). Individual differences in the effects of perceived controllability on pain perception: critical role of the prefrontal cortex. *J Cogn Neurosci*, 19, 993–1003.
- Sandi C., Merino J. J., Cordero M. I., Touyarot K., Venero C. (2001). Effects of chronic stress on contextual fear conditioning and the hippocampal expression of the neural cell adhesion molecule, its polysialylation, and L1. *Neuroscience*, 102, 329–339.
- Sandi C. (2007). Chapter 12- Memory impairments associated with stress and aging. In *Neural plasticity and memory: from genes to brain imaging*, 1st ed. CRC press, pp. 1–31.
- Santarelli S., Lesuis S. L., Wang X.D., Wagner K. V, Hartmann J., Labermaier C., ... Schmidt, M. V. (2014). Evidence supporting the match/mismatch hypothesis of psychiatric disorders. *Eur Neuropsychopharmacology*, 24, 907–918.
- Sapolsky R. M., Krey L. C., McEwen B. S. (1986). The adrenocortical axis in the aged rat: impaired sensitivity to both fast and delayed feedback inhibition. *Neurobiol Aging*, 7, 331–335.
- Sapolsky R. M., Meaney M. J. (1986). Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res Rev*, 11, 65–76.
- Sawchenko P. E., Li H. Y., Ericsson A. (2000). Chapter 6- Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress: a tale of two paradigms. In *Progress Brain Research*, 122, pp. 61-78.
- Sawyer S. M., Azzopardi P. S., Wickremarathne D., Patton G. C. (2018). The age of adolescence. *Lancet Child Adolesc Health*, 2, 223-228.
- Scheres A., Dijkstra M., Ainslie E., Balkan J., Reynolds B., Sonuga-Barke E., Castellanos F. X. (2006). Temporal and probabilistic discounting of rewards in children and adolescents: effects of age and ADHD symptoms. *Neuropsychologia*, 44, 2092–2103.
- Schmidt M. V. (2011). Animal models for depression and the mismatch hypothesis of disease. *Psychoneuroendocrinology*, 36, 330–338.
- Schneider M. (2008). Puberty as a highly vulnerable developmental period for the consequences of cannabis exposure. *Addic Biol*, 13, 253–263.
- Schneider M. (2013). Adolescence as a vulnerable period to alter rodent behavior. *Cell Tissue Res*, 354, 99–106.

- Schwabe L., Wolf O. T. (2011). Stress-induced modulation of instrumental behavior: From goal-directed to habitual control of action. *Behav Brain Res*, 219, 321-328.
- Séguin J. R., Arseneault L., Tremblay R. E. (2007). The contribution of “cool” and “hot” components of decision-making in adolescence: implications for developmental psychopathology. *Cogn Dev*, 22, 530–543.
- Seib L. M., Wellman C. L. (2003). Daily injections alter spine density in rat medial prefrontal cortex. *Neurosci Lett*, 337, 29-32.
- Seiglie M. P., Smith K. L., Blasio A., Cottone P., Sabino V. (2015). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces a depressive-like phenotype in rats. *Psychopharmacology* 232, 3821-3831.
- Seillier A., Giuffrida A. (2018). The cannabinoid transporter inhibitor omdm-2 reduces social interaction: Further evidence for transporter-mediated endocannabinoid release. *Neuropharmacology*, 130, 1-9.
- Seligman M. E., Maier S. F. (1967). Failure to escape traumatic shock. *Journal of Exp Psychol*, 47, 1–9.
- Seligman M. E., Maier S. F., Geer J. H. (1968). Alleviation of learned helplessness in the dog. *J Abnormal Psychol*, 73, 256–262.
- Selye H. (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 10, 230–231.
- Selye H. (1950). Stress and the general adaptation syndrome. *Br Med J*, 3, 1383–1392.
- Shanmugasundaram B., Korz V., Fendt M., Braun K., Lubec G. (2015). Differential effects of wake promoting drug modafinil in aversive learning paradigms. *Front Behav Neurosci*, 9, 220.
- Shaw P., Gilliam M., Liverpool M., Weddle C., Malek M., Sharp W., ... Giedd J. (2011). Cortical development in typically developing children with symptoms of hyperactivity and impulsivity: support for a dimensional view of attention deficit hyperactivity disorder. *Amy J Psychiatry*, 168, 143–151.
- Shimamoto A., DeBold J. F., Holly E. N., Miczek K. A. (2011). Blunted accumbal dopamine response to cocaine following chronic social stress in female rats: Exploring a link between depression and drug abuse. *Psychopharmacology*, 218, 271–279.
- Short K. R., Maier S. F. (1993). Stressor controllability, social interaction, and benzodiazepine systems. *Pharmacol Biochem Behav*, 45, 827–835.
- Silveira M. M., Malcolm E., Shoaib M., Winstanley C. A. (2015). Scopolamine and amphetamine produce similar decision-making deficits on a rat gambling task via independent pathways. *Behav Brain Res*, 281, 86-95.
- Simon N. W., Montgomery K. S., Beas B. S., Mitchell M. R., LaSarge C. L., Mendez I. A., ... Setlow, B. (2011). Dopaminergic modulation of risky decision-making. *J Neurosci*, 31, 17460-17470.
- Simon N. W., Beas B. S., Montgomery K. S., Haberman R. P., Bizon J. L., Setlow B. (2013a). Prefrontal cortical-striatal dopamine receptor mRNA expression predicts distinct forms of impulsivity. *Eur J Neurosci*, 37, 1779-1788.
- Simon N.W., Gregory T.A., Wood J., Moghaddam B. (2013b). Differences in response initiation and behavioral flexibility between adolescent and adult rats. *Behav Neurosci*, 127, 23-32.
- Sisk C. L., Foster D. L. (2004). The neural basis of puberty and adolescence. *Nat Neurosci*, 7, 1040–1047.

- Smith D. G., Xiao L., Bechara A. (2012). Decision making in children and adolescents: impaired Iowa Gambling Task performance in early adolescence. *Dev Psychol*, 48, 1180–1187.
- Snyder K., Barry M., Plona Z., Ho A., Zhang X. Y., Valentino R. J. (2015a). The impact of social stress during adolescence or adulthood and coping strategy on cognitive function of female rats. *Behav Brain Res*, 286, 175-183.
- Snyder K. P., Barry M., Valentino R. J. (2015b). Cognitive impact of social stress and coping strategy throughout development. *Psychopharmacology*, 232, 185–195.
- Spalding K. L., Bergmann O., Alkass K., Bernard S., Salehpour M., Huttner H. B., ... Frisen J. (2013). Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*, 153, 1219-1227.
- Spear L. P. (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev*, 24, 417-463.
- Spear L. P. (2013). Adolescent neurodevelopment. *J Adolesc Health*, 52, S7–S13.
- Spear L. P. (2016). Consequences of adolescent use of alcohol and other drugs: studies using rodent models. *Neurosci Biobehav Rev*, 70, 228–243.
- Spinelli S., Müller T., Friedel M., Sigrist H., Lesch K.P., Henkelman M., ... Pryce C. R. (2013). Effects of repeated adolescent stress and serotonin transporter gene partial knockout in mice on behaviors and brain structures relevant to major depression. *Front Behav Neurosci*, 7, 1–15.
- Spröwitz A., Bock J., Braun K. (2013). Sex-specific positive and negative consequences of avoidance training during childhood on adult active avoidance learning in mice. *Front Behav Neurosci*, 7, 1-11.
- St Onge J. R., Floresco S. B. (2009). Dopaminergic modulation of risk-based decision making. *Neuropsychopharmacology*, 34, 681–697.
- Stansfield K. H., Philpot R. M., Kirstein C. L. (2004). An animal model of sensation seeking: the adolescent rat. *Ann N Y Acad Sci*, 1021, 453–458.
- Stansfield K. H., Kirstein C. L. (2006). Effects of novelty on behavior in the adolescent and adult rat. *Dev Psychobiol*, 48, 10–15.
- Steimer T., Driscoll P. (2003). Divergent stress responses and coping styles in psychogenetically selected roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: behavioral, neuroendocrine and developmental aspects. *Stress*, 6, 87–100.
- Stein M. B., Koverola C., Hanna C., Torchia M. G., McClarty B. (1997). Hippocampal volume in women victimized by childhood sexual abuse. *Psychol Med*, 27, 951–959.
- Steinberg L., Graham S., O'Brien L., Woolard J., Cauffman E., Banich M. (2009). Age differences in future orientation and delay discounting. *Child Dev*, 80, 28–44.
- Steinberg L., Morris A. S. (2001). Adolescent development. *Ann Rev Psychol*, 52, 83–110.
- Stopper C. M., Green E. B., Floresco S. B. (2014). Selective involvement by the medial orbitofrontal cortex in biasing risky, but not impulsive, choice. *Cereb Cortex*, 24, 154-162.
- Sturman D. A., Moghaddam B. (2012). Striatum processes reward differently in adolescents versus adults. *Proc Natl Acad Sci* 109, 1719-1724.
- Stuss D. T., Benson D. F. (1984). Neuropsychological studies of the frontal lobes. *Psychol Bull*, 95, 3–28.
- Sugaya N., Izawa S., Kimura K., Ogawa N., Yamada K. C., Shirotaki K., ... Shimada H. (2012). Adrenal hormone response and psychophysiological correlates under psychosocial stress in individuals with irritable bowel syndrome. *Int J Psychophysiology*, 84, 39–44.

- Sun H., Cocker P. J., Zeeb F. D., Winstanley C. A. (2012). Chronic atomoxetine treatment during adolescence decreases impulsive choice, but not impulsive action, in adult rats and alters markers of synaptic plasticity in the orbitofrontal cortex. *Psychopharmacology*, 219, 285–301.
- Sunanda, Rao M. S., Raju T. R. (1995). Effect of chronic restraint stress on dendritic spines and excrescences of hippocampal ca3 pyramidal neurons--a quantitative study. *Brain Res*, 694, 312-317.
- Suo L., Zhao L., Si J., Liu J., Zhu W., Chai B., ... Lu L. (2013). Predictable chronic mild stress in adolescence increases resilience in adulthood. *Neuropsychopharmacology*, 38, 1387–1400.
- Swanson L. W. (2003). The amygdala and its place in the cerebral hemisphere. *Ann N Y Acad Sci*, 985, 174–184.
- Swenson R. M., Vogel W. H. (1983). Plasma catecholamine and corticosterone as well as brain catecholamine changes during coping in rats exposed to stressful foot-shock. *Pharmacol Biochem Behav*, 18, 689–693.
- Takeda H., Tsuji M., Matsumiya T. (1998). Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *Eur J Pharmacol*, 350, 21-29.
- Talbot L., Doyere V., Sullivan R. M. (2016). Developmental emergence of fear/threat learning: Neurobiology, associations and timing. *Genes Brain Behav*, 15, 144-154.
- Talpos J. C., Wilkinson L. S., Robbins T. W. (2006). A comparison of multiple 5-HT receptors in two tasks measuring impulsivity. *J Psychopharmacology*, 20, 47–58.
- Tamm L., Menon V., Ringel J., Reiss A. L. (2004). Event-related fMRI evidence of frontotemporal involvement in aberrant response inhibition and task switching in attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 43, 1430–1440.
- Tamnes C. K., Bos M. G. N., Van De Kamp F. C., Peters S., Crone E. A. (2017). Longitudinal development of hippocampal subregions from childhood to adulthood. *Dev Cogn Neurosci*, 30, 2012-222.
- Tanno T., Maguire D. R., Henson C., France C. P. (2014). Effects of amphetamine and methylphenidate on delay discounting in rats: Interactions with order of delay presentation. *Psychopharmacology*, 231, 85-95.
- Tao C. S., Dhamija P., Booij L., Menard J. L. (2017). Adversity in early adolescence promotes an enduring anxious phenotype and increases serotonergic innervation of the infralimbic medial prefrontal cortex. *Neuroscience*, 364, 15–27.
- Tau G. Z., Peterson B. S. (2010). Normal development of brain circuits. *Neuropsychopharmacology*, 35, 147–168.
- Taylor K. K., Tanaka K. Z., Reijmers L. G., Wiltgen B. J. (2013). Reactivation of neural ensembles during the retrieval of recent and remote memory. *Curr Biol*, 23, 99–106.
- Taylor J. J., Neitzke D. J., Khouri G., Borckardt J. J., Acierno R., Tuerk P. W., ... George M. S. (2014). A pilot study to investigate the induction and manipulation of learned helplessness in healthy adults. *Psychiatry Res*, 219, 631–637.
- Tedford S. E., Persons A. L., Napier T. C. (2015). Dopaminergic lesions of the dorsolateral striatum in rats increase delay discounting in an impulsive choice task. *PLoS One*, 10, e0122063.
- Tirelli E., Laviola G., Adriani W. (2003). Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. *Neurosci Biobehav Rev*, 27, 163–178.

- Toledo-Rodríguez M., Sandi C. (2007). Stress before puberty exerts a sex- and age-related impact on auditory and contextual fear conditioning in the rat. *Neural Plast*, 2007, 1–12.
- Toledo-Rodríguez M., Sandi C. (2011). Stress during adolescence increases novelty seeking and risk-taking behavior in male and female rats. *Front Behav Neurosci*, 5, 1-10.
- Toledo-Rodríguez M., Pitiot A., Paus T., Sandi C. (2012). Stress during puberty boosts metabolic activation associated with fear-extinction learning in hippocampus, basal amygdala and cingulate cortex. *Neurob Learn Mem*, 98, 93–101.
- Torres C., Cándido A., Escarabajal M., de la Torre L., Maldonado A., Tobeña A., Fernández-Teruel A. (2005). Successive negative contrast in one-way avoidance learning in female roman rats. *Physiology and Behavior*, 85, 377–382.
- Toth E., Avital A., Leshem M., Richter-Levin G., Braun K. (2008). Neonatal and juvenile stress induces changes in adult social behavior without affecting cognitive function. *Behav Brain Res*, 190, 135-139.
- Tremblay M., Winstanley C. A. (2016). Anticonvulsant medications attenuate amphetamine-induced deficits in behavioral inhibition but not decision making under risk on a rat gambling task. *Behav Brain Res*, 314, 143-151.
- Tsoory M. M., Richter-Levin G. (2006). Learning under stress in the adult rat is differentially affected by “juvenile” or “adolescent” stress. *Int J Neurosychopharmacology*, 9, 713–728.
- Tsoory M., Guterman A., Richter-Levin G. (2008). Exposure to stressors during juvenility disrupts development-related alterations in the PSA-NCAM to NCAM expression ratio: potential relevance for mood and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology*, 33, 378–393.
- Tsuda A., Tanaka M. (1985). Differential changes in noradrenaline turnover in specific regions of rat brain produced by controllable and uncontrollable shocks. *Behav Neurosci*, 99, 802–817.
- Tyborowska A., Volman I., Niermann H.C.M., Pouwels J.L., Smeekens S., Cillessen A.H.N., Toni I., Roelofs K. (2018). Early-life and pubertal stress differentially modulate grey matter development in human adolescents. *Sci Rep*, 8, 1-11.
- Tzanoulinou S., Riccio O., de Boer M. W., Sandi C. (2014a). Peripubertal stress-induced behavioral changes are associated with altered expression of genes involved in excitation and inhibition in the amygdala. *Transl Psychiatry*, 4, 1–9.
- Tzanoulinou S., García-Momó C., Castillo-Gómez E., Veenit V. (2014b). Long-term behavioral programming induced by peripuberty stress in rats is accompanied by GABAergic-related alterations in the amygdala. *PLoS ONE*, 9, 1–10.
- Uematsu A., Matsui M., Tanaka C., Takahashi T., Noguchi K., Suzuki M., Nishijo H. (2012). Developmental trajectories of amygdala and hippocampus from infancy to early adulthood in healthy individuals. *PLoS ONE*, 7, 1–10.
- Ulrich-Lai Y. M., Figueiredo H. F., Ostrander M. M., Choi D. C., Engeland W. C., Herman J. P. (2006). Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291, 965-973.
- Urban K. R., Valentino R. J. (2017). Age- and sex-dependent impact of repeated social stress on intrinsic and synaptic excitability of the rat prefrontal cortex. *Cereb Cortex*, 27, 244-253.
- Uslaner J. M., Robinson T. E. (2006). Subthalamic nucleus lesions increase impulsive action and decrease impulsive choice - mediation by enhanced incentive motivation? *Eur J Neurosci*, 24, 2345–2354.

- Vahl T. P., Ulrich-Lai Y. M., Ostrander M. M., Dolgas C. M., Elfers E. E., Seeley R. J., ... Herman J. P. (2005). Comparative analysis of ACTH and corticosterone sampling methods in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 289, E823–E828.
- Valentine G., Dow A., Banasr M., Pittman B., Duman R. (2008). Differential effects of chronic antidepressant treatment on shuttle box escape deficits induced by uncontrollable stress. *Psychopharmacology*, 200, 585-596.
- van den Bergh F. S., Bloemarts E., Groenink L., Olivier B., Oosting R. S. (2006). Delay aversion: effects of 7-OH-DPAT, 5-HT1A/1B-receptor stimulation and d-cycloserine. *Pharmacol Biochem Behav*, 85, 736–743.
- van den Bos R., Koot S., De Visser L. (2014). A rodent version of the Iowa Gambling Task: 7 years of progress. *Front Psychol*, 5, 1–6.
- van Dijken H. H., Mos J., van der Heyden J. A., Tilders F. J. (1992). Characterization of stress-induced long-term behavioural changes in rats: evidence in favor of anxiety. *Physiol Behav*, 52, 945-951.
- van Gaalen M. M., van Koten R., Schoffelmeer A. N. M., Vanderschuren L. J. M. J. (2006). Critical involvement of dopaminergic neurotransmission in impulsive decision making. *Biol Psychiatry*, 60, 66–73.
- Vanderschuren L. J. M. J., Achterberg E. J. M., Trezza V. (2016). The neurobiology of social play and its rewarding value in rats. *Neurosci Biobehav Rev*, 70, 86–105.
- Veenit V., Cordero M. I., Tzanoulinou S., Sandi C. (2013). Increased corticosterone in peripubertal rats leads to long-lasting alterations in social exploration and aggression. *Front Behav Neurosci*, 7, 1–10.
- Veenit V., Riccio O., Sandi C. (2014). CRHR1 links peri puberty stress with deficits in social and stress-coping behaviors. *J Psychiatric Res*, 53, 1–7.
- Ventura M. A. (1982). Age-related adrenocortical response to short-term starvation in young rats. *Experientia*, 38, 1118-1120.
- Ver Hoeve E. S., Kelly G., Luz S., Ghanshani S., Bhatnagar S. (2013). Short-term and long-term effects of repeated social defeat during adolescence or adulthood in female rats. *Neuroscience*, 249, 63-73.
- Vetter-O'Hagen C. S., Spear L. P. (2012). Hormonal and physical markers of puberty and their relationship to adolescent-typical novelty-directed behavior. *Dev Psychobiol*, 54, 523–535.
- Viau V., Bingham B., Davis J., Lee P., Wong M. (2004). Gender and puberty interact on the stress-induced activation of parvocellular neurosecretory neurons and corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid expression in the rat. *Endocrinology*, 146, 137–146.
- Vicens-Costa E., Martínez-Membrives E., López-Aumatell R., Guitart-Masip M., Cañete T., Blázquez G., ... Fernández-Teruel A. (2011). Two-way avoidance acquisition is negatively related to conditioned freezing and positively associated with startle reactions: a dissection of anxiety and fear in genetically heterogeneous rats. *Physiol Behav*, 103, 148–156.
- Vigas (1984) Problems of definition of stress stimulus and specificity of stress response. Gordon Breach Sci. New York.
- Volkow N. D., Tomasi D., Wang G., Telang F., Fowler J. S., Wang R. L., ... Swanson J. M. (2009). Hyperstimulation of striatal D2 receptors with sleep deprivation: implications for cognitive impairment. *NeuroImage*, 45, 1232–1240.

- Vyas A., Mitra R., Shankaranarayana Rao B. S., Chattarji S. (2002). Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci*, 22, 6810-6818.
- Vyas A., Pillai A. G., Chattarji S. (2004). Recovery after chronic stress fails to reverse amygdaloid neuronal hypertrophy and enhanced anxiety-like behavior. *Neuroscience*, 128, 667–673.
- Vythilingam M., Luckenbaugh D. A., Lam T., Morgan III C. A., Lipschitz D., Charney D. S., ... Southwick S. M. (2005). Smaller head of the hippocampus in Gulf War-related posttraumatic stress disorder. *Psychiatry Res - Neuroimaging*, 139, 89–99.
- Walhovd K. B., Fjell A. M., Giedd J., Dale A. M., Brown T. T. (2017). Through thick and thin: a need to reconcile contradictory results on trajectories in human cortical development. *Cereb Cortex*, 27, 1472–1481.
- Walker S. E., Sandi C. (2018). Long-term programming of psychopathology-like behaviors in male rats by peripubertal stress depends on individual's glucocorticoid responsiveness to stress. *Stress*, 7, 1–10.
- Watanabe Y., Gould E., McEwen B. S. (1992). Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal ca3 pyramidal neurons. *Brain Res*, 588, 341-345.
- Watt M. J., Weber M. A., Davies S. R., Forster G. L. (2017). Impact of juvenile chronic stress on adult cortico-accumbal function: implications for cognition and addiction. *Prog Neuropsychopharmacology Biol Psychiatry*, 79, 136-154.
- Weathington J. M., Arnold A. R., Cooke B. M. (2012). Juvenile social subjugation induces a sex-specific pattern of anxiety and depression-like behaviors in adult rats. *Horm Behav*, 61, 91–99.
- Weinstein S. M., Mermelstein R. (2007). Relations between daily activities and adolescent mood: the role of autonomy. *J Clin Child Adolesc Psychol*, 36, 182–194.
- Weisfield G. (1979). An ethological view of human adolescence. *J Nervous Mental Dis*, 167, 38–55.
- Weiss J. M. (1968). Effects of coping responses on stress. *J Comp Physiol Psychol*, 65, 251–260.
- Weiss J. M., Glazer H. I., Pohorecky L. A., Brick J., Miller N. E. (1975). Effects of chronic exposure to stressors on avoidance escape behavior and on brain norepinephrine. *Psychosom Med*, 37, 522–534.
- Weiss J.M. (1997). Does decreased sucrose intake indicate loss of preference in CMS model? *Psychopharmacology*, 134, 368-370.
- Weintraub D., Siderowf A.D., Potenza M.N., Goveas J., Morales K.H., Duda J.E., Moberg P.J., Stern M.B. (2006). Dopamine agonist use is associated with impulse control disorders in Parkinson's disease. *Arch Neurol* 63, 969-973.
- Wellman C. L. (2001). Dendritic reorganization in pyramidal neurons in medial prefrontal cortex after chronic corticosterone administration. *J Neurobiol*, 49, 245-253
- Welsh M. C., Pennington B. F., Groisser D. B. (1991). A normative-developmental study of executive function: a window on prefrontal function in children. *Dev Neuropsychol*, 7, 131–149.
- Wilcock J., Fulker W. (1973). Avoidance learning in rats: genetic evidence for two distinct behavioral processes in the shuttle-box. *J Comp Physiol Psychol*, 82, 247–253.
- Wilkin M. M., Waters P., McCormick C. M., Menard J. L. (2012). Intermittent physical stress during early- and mid-adolescence differentially alters rats' anxiety- and depression-like behaviors in adulthood. *Behav Neurosci*, 126, 344–360.

- Willcutt E. G., Doyle A. E., Nigg J. T., Faraone S., Pennington B. F. (2005). Validity of the executive function theory of attention-deficit/hyperactivity disorder: a meta-analytic review. *Biol Psychiatry*, 57, 1336–1346.
- Williams J. L., Maier S. F. (1977). Transituational immunization and therapy of learned helplessness in the rat. *J Exp Psychol*, 3, 240–252.
- Williams J. L. (1982). Influence of shock controllability by dominant rats on subsequent attack and defensive behaviors toward colony intruders. *Animal Learning and Behavior*, 10, 305–313.
- Willner P. (2017). The chronic mild stress (CMS) model of depression: history, evaluation and usage. *Neurobiology Stress*, 6, 78–93.
- Willner P., Towell A., Sampson D., Sophokleous S., Muscat R. (1987). Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology*, 93, 358–364.
- Winstanley C. A., Chudasama Y., Dalley J. W., Theobald D. E. H., Glennon J. C., Robbins T. W. (2003a). Intra-prefrontal 8-OH-DPAT and M100907 improve visuospatial attention and decrease impulsivity on the five-choice serial reaction time task in rats. *Psychopharmacology*, 167, 304–314.
- Winstanley C. A., Dalley J. W., Theobald D. E. H., Robbins T. W. (2003b). Global 5-HT depletion attenuates the ability of amphetamine to decrease impulsive choice on a delay-discounting task in rats. *Psychopharmacology*, 170, 320–31.
- Winstanley C. A., Dalley J. W., Theobald D. E. H., Robbins T. W. (2004a). Fractionating impulsivity: contrasting effects of central 5-HT depletion on different measures of impulsive behavior. *Neuropsychopharmacology*, 29, 1331–43.
- Winstanley C. A., Theobald D. E. H., Cardinal R. N., Robbins T. W. (2004b). Contrasting roles of basolateral amygdala and orbitofrontal cortex in impulsive choice. *J Neurosci*, 24, 4718–4722.
- Winstanley C. A., Baunez C., Theobald D. E. H., Robbins T. W. (2005a). Lesions to the subthalamic nucleus decrease impulsive choice but impair autoshaping in rats: the importance of the basal ganglia in Pavlovian conditioning and impulse control. *Eur J Neurosci*, 21, 3107–16.
- Winstanley C. A., Theobald D. E. H., Dalley J. W., Robbins T. W. (2005b). Interactions between serotonin and dopamine in the control of impulsive choice in rats: therapeutic implications for impulse control disorders. *Neuropsychopharmacology*, 30, 669–682.
- Winstanley C. A., Olausson P., Taylor J. R., Jentsch J. D. (2010). Insight into the relationship between impulsivity and substance abuse from studies using animal models. *Alcohol Clin Exp Res*, 34, 1306–1318.
- Winstanley C. A. (2011). The utility of rat models of impulsivity in developing pharmacotherapies for impulse control disorders. *Br J Pharmacol*, 164, 1301–1321.
- Wood K. H., Wheelock M. D., Shumen J. R., Bowen K. H., Ver Hoef L. W., Knight D. C. (2015). Controllability modulates the neural response to predictable but not unpredictable threat in humans. *NeuroImage*, 119, 371–381.
- Woolley C. S., Gould E., Frankfurt M., McEwen B. S. (1990). Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci*, 10, 4035–4039.
- Worbe Y., Savulich G., Voon V., Fernández-Egea E., Robbins T. W. (2014). Serotonin depletion induces ‘waiting impulsivity’ on the human four-choice serial reaction time task: cross-species translational significance. *Neuropsychopharmacology*, 39, 1519–1526.

- Wulsin A. C., Wick-Carlson D., Packard B. A., Morano R., Herman J. P. (2016). Adolescent chronic stress causes hypothalamo-pituitary-adrenocortical hypo-responsiveness and depression-like behavior in adult female rats. *Psychoneuroendocrinology*, 65, 109–117.
- Xu W., Morishita W., Buckmaster P. S., Pang Z. P., Malenka R. C., Sudhof T. C. (2012). Distinct neuronal coding schemes in memory revealed by selective erasure of fast synchronous synaptic transmission. *Neuron*, 73, 990–1001.
- Xu H., Zhang Y., Zhang F., Yuan S., Shao F., Wang W. (2016). Effects of duloxetine treatment on cognitive flexibility and BDNF expression in the mPFC of adult male mice exposed to social stress during adolescence. *Front Mol Neurosci*, 9, 1–12.
- Xu H., Wang J., Zhang K., Zhao M., Ellenbroek B., Shao F., Wang W. (2018). Effects of adolescent social stress and antidepressant treatment on cognitive inflexibility and BDNF epigenetic modifications in the mPFC of adult mice. *Psychoneuroendocrinology*, 88, 92–101.
- 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.
- Yuen E. Y., Wei J., Liu W., Zhong P., Li X., Yan Z. (2012). Repeated stress causes cognitive impairment by suppressing glutamate receptor expression and function in prefrontal cortex. *Neuron*, 73, 962–977.
- Zeeb F. D., Robbins T. W., Winstanley C. A. (2009). Serotonergic and dopaminergic modulation of gambling behavior as assessed using a novel rat gambling task. *Neuropsychopharmacology*, 34, 2329–2343.
- Zeeb F. D., Winstanley C. A. (2011). Lesions of the basolateral amygdala and orbitofrontal cortex differentially affect acquisition and performance of a rodent gambling task. *J Neurosci*, 31, 2197–2204.
- Zeeb F. D., Baarendse P. J. J., Vanderschuren L. J. M. J., Winstanley C. A. (2015). Inactivation of the prelimbic or infralimbic cortex impairs decision-making in the rat gambling task. *Psychopharmacology*, 232, 4481–4491.
- Zeeb F. D., Li Z., Fisher D. C., Zack M. H., Fletcher P. J. (2017). Uncertainty exposure causes behavioural sensitization and increases risky decision-making in male rats: toward modelling gambling disorder. *J Psychiatry Neurosci*, 42, 404–413.
- Zhang Y., Shao F., Wang Q., Xie X., Wang W. (2017). Neuroplastic correlates in the mPFC underlying the impairment of stress-coping ability and cognitive flexibility in adult rats exposed to chronic mild stress during adolescence. *Neural Plast*, 2017, 1–10.
- Zoratto F., Laviola G., Adriani W. (2013). Gambling proneness in rats during the transition from adolescence to young adulthood: a home-cage method. *Neuropharmacology*, 67, 444–454.