

Caracterización conductual y neuroinmune de la resiliencia al estrés social: Efectos reforzantes de la cocaína

Behavioral and neuroimmune characterization of resilience to social stress: Rewarding effects of cocaine

FRANCISCO RÓDENAS-GONZÁLEZ*, MARÍA DEL CARMEN BLANCO-GANDÍA**, JOSÉ MIÑARRO LÓPEZ*, MARTA RODRÍGUEZ-ARIAS*.

* Universidad de Valencia. Departamento de Psicobiología. Facultad de Psicología. Avenida Blasco Ibáñez, 21. 46010. Valencia.

** Universidad de Zaragoza. Departamento de Psicología y Sociología. Facultad de Ciencias Sociales y Humanas. C/ Ciudad Escolar s/n, 44003 Teruel.

Resumen

Numerosos estudios preclínicos han demostrado que el estrés social incrementa la vulnerabilidad a los efectos reforzantes de la cocaína. Sin embargo, los resultados obtenidos no son homogéneos, observándose siempre una subpoblación que no muestra dicho incremento. Utilizando el modelo de derrota social (DS) repetida en ratones, en este trabajo hemos querido caracterizar conductualmente a los ratones resilientes al incremento de los efectos reforzantes de la cocaína inducido por el estrés social. Utilizamos ratones adultos macho de la cepa C57/BL6 a los que sometimos al protocolo de DS repetida y tres semanas más tarde, realizamos el Condicionamiento de Preferencia de Lugar (CPL) inducido por una dosis no efectiva de cocaína (1mg/kg). Una vez finalizado este procedimiento se midieron los niveles estriatales de interleucina 6, ya que el estrés social produce una respuesta de neuroinflamación. No se observó CPL en los ratones controles, pero los animales derrotados tomados en conjunto desarrollaron preferencia. Sin embargo, esta muestra se pudo dividir en ratones resilientes (no desarrollaron preferencia) y susceptibles (presentaron CPL). Durante las derrotas sociales, los animales resilientes pasaron menos tiempo en las conductas de huida y sumisión que los catalogados como susceptible y presentaron conductas de ataque hacia el ratón residente, manifestando por tanto resistencia a ser derrotados. No se observaron diferencias en la respuesta de neuroinflamación, probablemente debido al largo periodo de tiempo transcurrido desde la última derrota social. Nuestros resultados sugieren que un estilo de afrontamiento activo al estrés social va a ser determinante en la protección del sujeto a desarrollar un trastorno por uso de drogas.

Palabras clave: Resiliencia; cocaína; estrés social; afrontamiento; interleucina 6.

Abstract

Preclinical studies have shown that social stress increases vulnerability to the reinforcing effects of cocaine. However, the results are not always homogeneous, revealing a subpopulation that does not show a preference for cocaine. Thus, the main aim of the present study was to characterize the behavioral profile of resilient mice to the stress-induced rewarding effects of cocaine using an animal model of repeated social defeat stress (SD). To this end, male adult mice of the C57/BL6 strain were exposed to SD and, three weeks later, assessed using the Conditioned Place Preference paradigm induced by an ineffective dose of cocaine (1mg/kg). Afterwards, the striatal levels of interleukin 6 were measured, as social stress usually induces a neuroinflammatory response. Control mice did not develop CPP, while defeated mice did overall develop a preference for the drug-paired compartment. Based on the conditioning score that they exhibited, the SD sample was subdivided into resilient (did not develop preference) and susceptible mice (developed preference). During the SD sessions, resilient animals showed less flight and submission behaviors than susceptible mice and they presented attack behaviors towards the residents, thereby showing their resistance to being defeated. There were no differences in the neuroinflammatory response, probably due to the long time elapsed after the last SD session. These results suggest that an active coping style to social stress may be decisive in protecting the individual from developing an addiction.

Keywords: Resilience; cocaine; social stress; coping; interleukin 6.

Recibido: Mayo 2019; Aceptado: Octubre 2019.

Enviar correspondencia a: Dra. Marta Rodríguez-Arias.

Dpto. de Psicobiología, Fac. de Psicología, Univ. de València, Av. Blasco Ibáñez, 21, 46010 Valencia-Spain. Tel. + 34 963864637; Fax + 34 963864668.

E-mail: marta.rodriguez@uv.es

La exposición al estrés es un factor ambiental que se ha relacionado de forma muy directa con la aparición de trastornos psiquiátricos, como la depresión, la ansiedad o los trastornos por abuso de sustancias. Sin embargo, no todos los sujetos son igual de vulnerables a las consecuencias del estrés (Krishnan et al., 2007; Lutter et al., 2008). En los últimos años se ha producido un gran incremento en el estudio del fenómeno de la resiliencia al estrés. Se define como resiliencia la capacidad que presentan los individuos de mantener un funcionamiento psicológico y físico adaptativo, y evitar la aparición de enfermedades mentales cuando se exponen a un estrés crónico o de elevada intensidad (Charney, 2004). Los mecanismos responsables de la resiliencia van a promover una respuesta apropiada y no patológica al estrés (Chmitorz et al., 2018). En los últimos años se han comenzado a identificar las características psicológicas y biológicas de los individuos resilientes al estrés social (Pfafu y Russo, 2015). Por ejemplo, existen una serie de conductas y rasgos psicológicos, como la flexibilidad cognitiva, el afrontamiento activo, el optimismo o la sensación de pertenencia a un grupo, que pueden favorecer una respuesta de resiliencia en seres humanos (Wood y Bhatnagar, 2015; Laird, Krause, Funes y Lavretsky, 2019). Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han centrado en la resiliencia al desarrollo de depresión, ansiedad o trastorno de estrés postraumático (Russo, Murrough, Han, Charney y Nestler, 2012; Krishnan, 2014; Finnell y Wood, 2016), siendo muy escasos los estudios que evalúan la resiliencia al incremento en el consumo de drogas.

La mayoría de los estudios preclínicos sobre resiliencia al estrés utilizan el modelo de derrota social (DS) repetida o crónica. Este modelo presenta una gran relevancia etológica y traslacional, ya que la forma más común de estrés experimentada por los seres humanos proviene de su ambiente social. Este modelo está basado en el paradigma intruso/residente, que consiste en introducir a un animal macho (intruso) en el territorio de otro (residente), que confrontará y dominará al primero (Miczek, Yap y Covington, 2008; Chaouloff, 2013). Numerosos estudios han demostrado que la DS repetida incrementa el consumo de cocaína y de alcohol (Miczek et al., 2008; Burke y Miczek, 2014; Rodríguez-Arias et al., 2016, 2017; Montagud-Romero et al., 2016a; Ferrer-Pérez et al., 2018a). Este incremento se ha asociado a una respuesta de neuroinflamación, ya que en los animales derrotados se ha constatado un incremento de marcadores de inflamación como las citoquinas o las quemoquinas, un incremento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica así como una activación de la microglía (Rodríguez-Arias et al., 2017, 2018; Ferrer-Pérez et al., 2018a).

Al igual que ocurre en los estudios realizados en seres humanos, en la mayoría de los estudios preclínicos se ha evaluado el desarrollo de resiliencia al desarrollo de de-

presión o ansiedad en ratones expuestos a DS repetida. En estos estudios, a las 24h de finalizar la última DS se categoriza a los animales en resilientes o susceptibles en función de su conducta en una prueba de interacción social. Serán resilientes aquellos que presentan un elevado tiempo de contacto social, mientras que los susceptibles mostraran evitación social (Krishnan et al., 2007; Russo et al., 2012; Golden, Covington, Berton y Russo, 2011; Henriques-Alves y Queiroz, 2015; Zhan et al., 2018). Algunos estudios han confirmado que entre los factores que median la resiliencia se encuentra una menor respuesta neuroinflamatoria en los animales resilientes (Wang et al., 2018).

Los resultados anteriormente mencionados nos han llevado a plantear como objetivo principal del presente trabajo la caracterización de los ratones expuestos a DS repetida que sean resilientes al incremento a largo plazo de los efectos reforzantes de la cocaína. Para ello, tres semanas después de la última DS, realizamos un condicionamiento de la preferencia de lugar (CPL) con una dosis subumbral de cocaína que no es efectiva en animales controles pero que sí induce preferencia en aquellos derrotados socialmente (Montagud-Romero et al., 2016a, 2016b). La caracterización conductual se realizará evaluando el comportamiento que presentaron aquellos animales resilientes durante las DS. Finalmente, una vez finalizado el procedimiento conductual, estudiaremos la respuesta neuroinflamatoria midiendo los niveles estriatales de interleucina 6 (IL6).

Material y Método

Animales

En el presente estudio se utilizaron 43 ratones adultos macho de la cepa C57/BL6. 28 de ellos se emplearon como sujetos experimentales (derrota social) y 15 se utilizaron como grupo control (expuestos solo a exploración). También se emplearon otros 10 ratones albinos macho de la cepa OF1 como ratones residentes en la DS repetida. Todos los ratones fueron adquiridos en los Laboratorios Charles River (Barcelona, Spain.). Los ratones experimentales llegaron en el día postnatal (DPN) 21 y fueron estabulados en grupos de 4 en cajas de plástico de 26x20x13cm. Los 10 ratones de la cepa OF1 fueron alojados de forma aislada para su uso como residentes durante la DS repetida. Las condiciones ambientales fueron de una temperatura de 21±2°C y una humedad relativa del 55%. Los ratones fueron mantenidos durante todo el procedimiento en un ciclo de luz/oscuridad de 12h/12h (8:00h – 20:00h) y con agua y pellets *ad libitum*, excepto durante las pruebas comportamentales. Todos los procedimientos de tratamiento y cuidado de los ratones obedecieron a las leyes y regulaciones nacionales, regionales y locales de acuerdo con las directrices marcadas por la comunidad internacional recogidas en *European Community Council Directives* (86/609/EEC,

24 *November* 1986). Este estudio se realizó en la Unidad de Investigación de Psicobiología de las Drogodependencias del departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universitat de València. Fue aprobado por el Comité Ético de experimentación y bienestar animal de la Universidad de Valencia 2017/VSC/PEA/00224-A1507028485045.

Tratamiento farmacológico

Los animales recibieron tratamiento farmacológico únicamente durante el procedimiento de CPL. Tanto a los ratones del grupo control como a los del grupo experimental se les inyectó por vía intraperitoneal 1mg/kg de cocaína disuelta en una solución de NaCl 0,9%. Esta dosis es considerada una dosis subumbral, no mostrando preferencia de lugar en la prueba CPL en ratones estándar (Maldonado, Rodríguez-Arias, Castillo, Aguilar y Miñarro, 2006; Vidal-Infer, Aguilar, Miñarro y Rodríguez-Arias, 2012), mientras que sí desarrollan preferencia los ratones expuestos a DS repetida (Rodríguez-Arias et al., 2017).

Recogida de muestras

Para la obtención de muestras seguimos el procedimiento realizado en estudios previos (Ferrer-Pérez et al., 2018b). Se sacrificaron ratones por dislocación cervical y posteriormente se decapitaron. Los cerebros se extrajeron rápidamente y el estriado se diseccionó siguiendo el procedimiento descrito por Heffner et al. (Heffner, Hartman y Seiden, 1980), manteniéndose en hielo seco hasta que se almacenaron a -80 ° C.

Antes de realizar la determinación de IL-6, los cerebros se homogeneizaron y se prepararon siguiendo el procedimiento descrito por Alfonso-Loeches et al. (2010). Los estriados se homogeneizaron en 250 mg de tejido / 0,5ml de tampón de lisis frío (NP-40 al 1%, Tris-HCl 20mM, pH 8, NaCl 130mM, NaF 10mM, 10µg/ml de aprotinina, 10µg/ml leupeptina, DTT 40mM, Na₃VO₄ 1mM y PMSF 10mM). Los homogeneizados de cerebro se mantuvieron en hielo durante 30 minutos y se centrifugaron a la velocidad de 11.519 x g durante 15 minutos, después se recogió el sobrenadante y se determinaron los niveles de proteína mediante el ensayo de Bradford de ThermoFisher (Ref: 23227).

Diseño experimental

En la tabla 1 se puede encontrar en detalle el diseño experimental del presente estudio. Todos los ratones llegaron con 21 días de edad al laboratorio. Después de 3 sema-

nas de adaptación en el animalario, en el DPN 47, comenzaron las 4 sesiones de DS. Posteriormente, a las 3 semanas de la última DS realizamos el CPL (3 días de pre-condicionamiento, 4 días de condicionamiento y 1 día de post-condicionamiento). Por último, tras la finalización de todo el procedimiento experimental, procedimos al sacrificio de los animales para la recogida de muestras biológicas.

Aparatos y procedimiento

Derrota Social

El protocolo de DS realizado en este estudio se ha validado y descrito en detalle en trabajos previos (Montagud-Romero et al., 2016a; Rodríguez-Arias et al., 2017; Ferrer-Pérez et al., 2019). La DS repetida consta de 4 sesiones de 25 minutos a intervalos de 72h, realizándose en los días postnatales 47, 50, 53 y 56. La sesión de DS repetida está compuesta por 3 fases. En la primera fase se introduce al intruso en la jaula del residente durante 10 minutos, en los que está protegido de los ataques, pero no de las amenazas del residente por medio de una rejilla. En la segunda fase se retira la rejilla y se permite la confrontación durante 5 minutos. En la tercera y última fase se coloca nuevamente la rejilla durante 10 minutos más.

Las sesiones de DS repetida fueron registradas con una videocámara y durante el procedimiento se evaluaron en los animales intrusos las conductas de huida, sumisión y ataque, mientras que en los animales residentes se midieron las conductas de amenaza y ataque. En la DS repetida realizada con los 15 ratones controles se empleó un procedimiento similar al descrito anteriormente, pero sin la presencia del ratón residente. Una vez finalizado el paradigma, se procedió al análisis de los encuentros mediante el programa informático que permite registrar el tiempo dedicado a realizar diferentes conductas (Martínez, Miñarro y Simón, 1991).

Condicionamiento de la Preferencia de Lugar

El CPL es un modelo basado en el aprendizaje clásico o pavloviano, para evaluar la recompensa condicionada inducida por diferentes estímulos (Bardo y Bevin, 2000; Tzschentke, 2007). Ha sido ampliamente utilizado para estudiar los efectos de recompensa de las drogas adictivas condicionadas (Aguilar, Rodríguez-Arias y Miñarro, 2009; Yap et al., 2015; Rodríguez-Arias et al., 2016; Blanco-Gandía et al. 2017), ya que los estímulos contextuales pueden

Tabla 1. *Diseño Experimental.*

	Derrota social /Exploración				3 semanas	CPL (1mg/kg cocaína)			Recogida de muestras
	1. ^a	2. ^a	3. ^a	4. ^a		Pre-C test	Condicionamiento	Post-C test	
DPN	47	50	53	56		76 - 78	79 - 82	83	84

adquirir propiedades apetitivas secundarias cuando se combinan con un reforzador primario (Tzschentke, 2007).

Para el CPL se emplearon 12 cajas idénticas de plexiglas con dos compartimentos de igual tamaño (30,7 cm de largo X 31,5 cm de ancho X 34,5 cm de alto), separadas por un área central de color gris (13,8 cm de largo X 31,5 cm de ancho X 34,5 cm de alto). Los compartimentos tienen paredes de diferente color (blancas vs negras) y distinta textura de suelo (liso en el compartimento negro y rugoso para el blanco). Los animales son entrenados para asociar un ambiente específico con el efecto de la droga administrada, y en el otro compartimento diferente con solución salina (García-Pardo, Rodríguez-Arias, Miñarro y Aguilar, 2017). Ambos compartimentos presentan una puerta tipo guillotina, que los separa del compartimento central. Cada uno de los compartimentos de condicionamiento cuenta con 4 células fotoeléctricas, mientras que la zona central tiene 6, lo que permite el registro de la posición del animal y los cruces de un compartimento al otro. El equipo es controlado por dos computadoras IBM PC mediante el uso de un software MONPRE 2z (CIBERTEC, SA, España).

El CPL consiste en 3 fases, las cuales se llevaron a cabo durante el ciclo de oscuridad y siguiendo un procedimiento “no sesgado” en términos de la preferencia inicial espontánea (Manzanedo, Aguilar, Rodríguez-Arias y Miñarro, 2001). Durante la primera fase o pre-condicionamiento (Pre-C), los ratones tuvieron libre acceso a ambos compartimentos del aparato durante 15 minutos (900s) cada día durante 3 días. Al tercer día, el tiempo que cada animal pasa en cada compartimento fue registrado durante 900s. Los animales que muestran una fuerte aversión (menos del 33% del tiempo de la sesión) o una fuerte preferencia (más del 67%) por alguno de los compartimentos son descartados del procedimiento. De acuerdo con lo anterior, en el presente experimento se descartaron un total de 2 animales que no cumplían con los criterios establecidos. La asignación de los compartimentos se realiza con un contrabalanceado. Uno de los compartimentos se elige para ser asociado con la cocaína de tal manera que, dentro de cada grupo, la mitad de los animales reciben la cocaína en el lugar menos preferido y la otra mitad en el más preferido, balanceándose también el color del compartimento. No deben existir diferencias significativas en el tiempo que los animales han pasado en el compartimento asociado al fármaco o al vehículo en la fase de pre-condicionamiento. Esta medida es de gran importancia para el procedimiento experimental, ya que ayuda a evitar que exista algún tipo de sesgo en la preferencia antes de comenzar el experimento.

En la segunda fase (condicionamiento), los animales fueron condicionados con 1mg/kg de cocaína mediante 4 asociaciones con el compartimento asignado tras el Pre-C. Se ha observado que 1mg/kg es una dosis subumbral, es decir, una dosis que no conlleva a la adquisición del CPL,

a menos que se manipulen otras variables como el estrés o rasgos del comportamiento (Vidal-Infer et al., 2012; Arenas et al., 2014; Montagud-Romero et al., 2014; Rodríguez-Arias et al., 2016; Blanco-Gandía, Montagud-Romero, Aguilar, Rodríguez-Arias y Miñarro, 2018). Los animales recibieron 2 inyecciones (cocaína y vehículo) cada día: una administración de solución salina antes de ser confinados al compartimento no asociado durante 30 minutos, y después de un intervalo de 4 horas, recibieron cocaína antes de ser confinados al compartimento asociado con la droga durante 30 min. El área central no fue utilizada durante el condicionamiento y su acceso fue bloqueado mediante puertas tipo guillotina.

Durante la tercera fase o post-condicionamiento (Post-C), en el 8º día del procedimiento, las guillotinas que separaban ambos compartimentos fueron retiradas y el tiempo que los ratones, sin ningún tipo de tratamiento, pasaban en cada compartimento fue registrado durante 900s. La diferencia en segundos entre el tiempo que los animales permanecen en el compartimento asociado con la droga durante la prueba de Post-C, y el tiempo que pasan durante la prueba de Pre-C es una medida del grado de condicionamiento inducido por la droga (*Conditioning Score*). Si esta diferencia es positiva, entonces la droga ha inducido una preferencia por el compartimento asociado con la misma, mientras que lo opuesto indica la inducción de una aversión. Una vez finalizado el CPL, se dividió a los animales derrotados en resilientes o susceptibles. Se consideraron resilientes aquellos que no presentaron incremento en la preferencia por el compartimento asociado a la cocaína y susceptibles a los que si incrementaron la preferencia.

Ensayo ELISA de IL-6

Para determinar la concentración de IL-6 en el estriado, utilizamos un kit ELISA de IL-6 de ratón de la casa comercial Abcam (Ref: ab100712) y seguimos las instrucciones del fabricante. Para determinar la absorbancia, empleamos un lector de microplacas iMark (Bio-RAD) controlado por el software Microplate Manager 6.2. La densidad óptica se leyó a 450 nm y los resultados finales se calcularon utilizando una curva estándar, expresando como pg/mg para muestras de tejido. La sensibilidad del test es de <2 pg/mg. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

Análisis de los datos

Para confirmar el efecto de la DS repetida en el CPL se realizó un ANOVA univariante con los datos del *Conditioning Score* con una variable entre-sujetos “Estrés” con dos niveles: Exploración y Derrota Social. Se realizó un análisis de conglomerados de K-medias para distribuir a los animales en Resilientes y Susceptibles, empleando el valor obtenido con el *Conditioning Score*. Una vez hecha la división entre Resilientes y Susceptibles, realizamos un

nuevo análisis univariante con la variable entre-sujetos "Grupo" con tres niveles: Exploración, DS Susceptibles y DS Resilientes. Este mismo análisis se aplicó a los datos de los niveles estriatales de IL6. Los resultados obtenidos en el análisis etológico de la DS se analizaron utilizando un ANOVA de dos vías con una variable entre-sujetos "Grupo" con dos niveles: Resilientes y Susceptibles y una variable intra-sujetos "Derrota" de 2 niveles: DS1 (primera sesión de derrota social) y DS4 (cuarta sesión de derrota social). Los análisis post-hoc se realizaron utilizando la prueba de ajuste de Bonferroni, considerando los intervalos de significación de $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$. También se realizó el coeficiente de correlación de Pearson para determinar si existe relación entre la variable Huida y *Conditioning Score* de todos los animales que realizaron DS repetida.

Resultados

Solo los animales susceptibles desarrollan CPL

Respecto al *Conditioning Score* del CPL (Figura 1a), el ANOVA mostró un efecto significativo en la variable Estrés [$F(1,36)=7,147$; $p < 0,05$], indicando que los animales

derrotados pasaron significativamente más tiempo en el compartimento asociado a la droga que los animales no estresados ($p < 0,05$).

Se clasificaron animales como Resilientes y Susceptibles utilizando el análisis cluster de K-medias [$F(1,24) = 37,748$; $p < 0,001$]. Cuando se dividió al grupo de animales derrotados en Resilientes y Susceptibles (Figura 1b), el ANOVA mostró un efecto significativo en la variable Grupo [$F(2,38)=23,289$; $p < 0,001$]. Los animales susceptibles pasaron significativamente más tiempo en el compartimento asociado a la droga comparados con los otros dos grupos ($p < 0,001$ en ambos casos). La Figura 1c muestra las puntuaciones individuales de los tres grupos experimentales realizada mediante una distribución simple de los datos del *Conditioning Score*.

Los ratones resilientes muestran una respuesta de afrontamiento al estrés durante las DS

En la Tabla 2 se muestran los datos relativos a la conducta de los ratones derrotados durante la primera y la cuarta DS. Respecto a la conducta de Huida, el ANOVA mostró un efecto significativo en la variable Grupo [$F(1,24) = 16,578$; $p < 0,001$], ya que los animales del grupo DS-resilientes mos-

Condicionamiento de la preferencia de lugar inducido por 1 mg/kg de cocaína

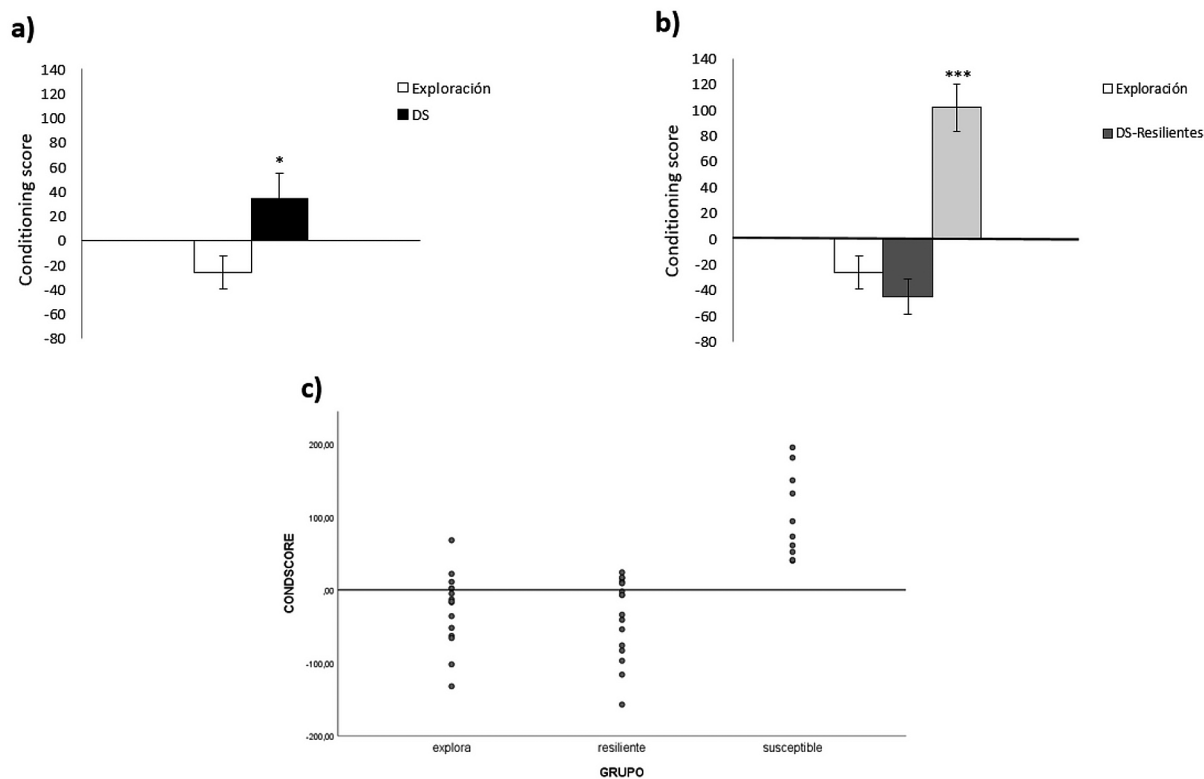


Figura 1. Efecto de la DS repetida en la adquisición del CPL inducido por 1 mg/kg de cocaína en ratones macho C57/BL6. Las barras representan la diferencia del tiempo (s) pasado en el compartimento asociado a la droga antes y después de las sesiones de condicionamiento (*conditioning score*). (a) Grupos de tratamiento: Exploración y DS repetida. (b) Tras el Post-C, los animales derrotados se dividieron en Resilientes y Susceptibles en función de su nivel de condicionamiento. * $p < 0,05$, diferencia significativa respecto al grupo Exploración. *** $p < 0,001$, diferencia significativa respecto al grupo exploración y DS-resilientes. (c) Valores individuales del *Conditioning Score* de los grupos Exploración, Resilientes y Susceptibles.

Tabla 2. Resultados de DS repetida en intrusos.

Resilientes	Huida	Lat. Huida	Sumisión	Lat. sumisión	Ataque	Lat. ataque
DS1	32 ± 3***	15 ± 10	22 ± 6*	56 ± 6	3 ± 2	228 ± 33
DS4	32 ± 3***	3 ± 3	26 ± 7	89 ± 7	0 ± 0	300 ± 0
Susceptibles	Huida	Lat. Huida	Sumisión	Lat. sumisión	Ataque	Lat. ataque
DS1	47 ± 7	6 ± 3	34 ± 8+	51 ± 8	1 ± 1	271 ± 30
DS4	51 ± 8	4 ± 8	12 ± 4	99 ± 4	0 ± 0	300 ± 0

Nota. Conductas evaluadas durante la DS. Datos presentados como valores medios en segundos ± SEM. *p<0,05, ***p<0,001 diferencias con respecto a Susceptibles. + p<0,05 diferencias con respecto a DS4 (efecto grupo-derrota).

traron significativamente menos tiempo realizando conductas de este tipo ($p < 0,001$). Con respecto a la conducta de Sumisión, el ANOVA mostró un efecto significativo en la interacción de las variables Derrota x Estrés [$F(1,24) = 4,163$; $p < 0,05$], ya que los animales resilientes pasaron menos tiempo realizando conductas de sumisión durante la primera sesión de DS repetida con respecto a los animales susceptibles ($p < 0,05$).

También se evaluó la presencia de conducta de ataque por parte de los animales intrusos frente a los residentes. Solo observamos una tendencia en la variable Derrota [$F(1,24) = 3,023$; $p = 0,095$] que nos indica que los animales intrusos atacaron más en la primera sesión de DS. Observamos que un 25% de los animales catalogados como Resilientes, frente a un 10% de los Susceptibles, atacó a su

residente en la primera DS repetida. Ningún animal intruso atacó en la cuarta DS repetida.

Finalmente se evaluó la relación entre la conducta de Huida mostrada por los todos los intrusos sumando el primer y cuarto encuentro de la DS repetida y su *Conditioning Score* en el CPL, para comprobar si el tiempo pasado de alguna de estas conductas podría ser un indicador de condicionamiento que se produciría posteriormente (Figura 2). Solo se obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson significativo entre el tiempo pasado en Huida y el *Conditioning Score* ($r = 0,241$, $p < 0,05$). Es decir, a mayor tiempo en la conducta de huida durante los encuentros de DS, mayor es la preferencia por la droga en el CPL.

Respecto a la conducta de amenaza por parte de los residentes (Tabla 3) el ANOVA muestra un efecto en la

Correlación de Pearson

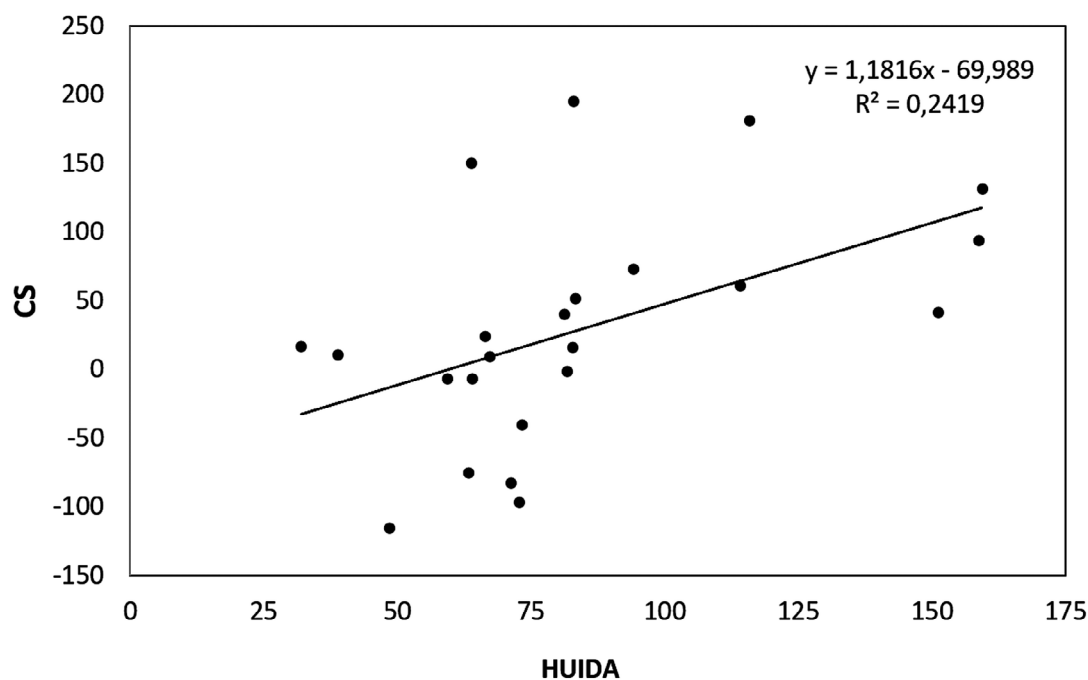


Figura 2. Gráfica de regresión para la Correlación de Pearson entre la conducta de Huida en la DS repetida y el *Conditioning Score* (CS). La línea de tendencia representa la regresión lineal de datos ($y = 1,1816x - 58,989$; $r^2 = 0,2419$).

variable derrota [$F(1,24) = 6,535$; $p < 0,05$] indicando que los residentes amenazaron más en la DS1 que en la DS4 ($p < 0,05$). Sin embargo, no hay diferencias significativas en la variable grupo, indicando que tanto Resilientes como Susceptibles han sido expuestos al mismo estrés.

Niveles estriatales de IL6

El ANOVA de los niveles estriatales de IL-6 (Figura 3) no mostró diferencias significativas.

Discusión

Los resultados del presente trabajo confirman que la DS repetida incrementa los efectos reforzantes de la cocaína en el CPL, pero además hemos demostrado por primera vez que los resultados obtenidos en los animales estresados no son homogéneos. Podemos distinguir entre los animales derrotados una población susceptible que ha desarrollado CPL con una dosis no efectiva de cocaína. Pero

también hay una parte de los animales derrotados que se comportan como los no estresados, es decir, son resilientes no desarrollando CPL. Pero quizá el resultado más interesante es que el afrontamiento de la DS es diferente en ambos tipos de animales. Los resilientes muestran una menor conducta de huida y de sumisión frente al agresor durante la DS. La conducta de huida correlaciona positivamente con los resultados analizados de CPL, es decir, a más conducta de huida, más preferencia desarrollará el animal por la cocaína. Por lo tanto, una respuesta de afrontamiento activo, mostrando menos huida y sumisión durante un estresor social, reduce la sensibilización a los efectos reforzantes de la cocaína. Estos ratones resilientes, también presentan conductas de ataque al residente, manifestando resistencia a la derrota, algo que no se observa en ninguno de los animales susceptibles. Los cambios en los niveles de IL6 no difieren entre animales estresados o controles, no observándose tampoco diferencia entre aquellos resi-

Tabla 3. Resultados de DS repetida en residentes.

Residentes de los animales Resilientes	Amenaza	Lat. Amenaza	Ataque	Lat. ataque
DS1	36 ± 5#	10 ± 4	26 ± 5	4 ± 15
DS4	28 ± 5	4 ± 1	22 ± 3	4 ± 1
Residentes de los animales Susceptibles	Amenaza	Lat. Amenaza	Ataque	Lat. ataque
DS1	36 ± 7#	6 ± 2	29 ± 9	37 ± 29
DS4	21 ± 4	8 ± 3	33 ± 4	3 ± 1

Nota. Interacción social de Residentes durante el paradigma intruso-residente para inducir la DS. Datos presentados como valores medios en segundos ± SEM. Diferenciamos entre los residentes que han atacado a aquellos posteriormente catalogados como resilientes y susceptibles. # $p < 0,05$ respecto a DS4 (efecto derrota).

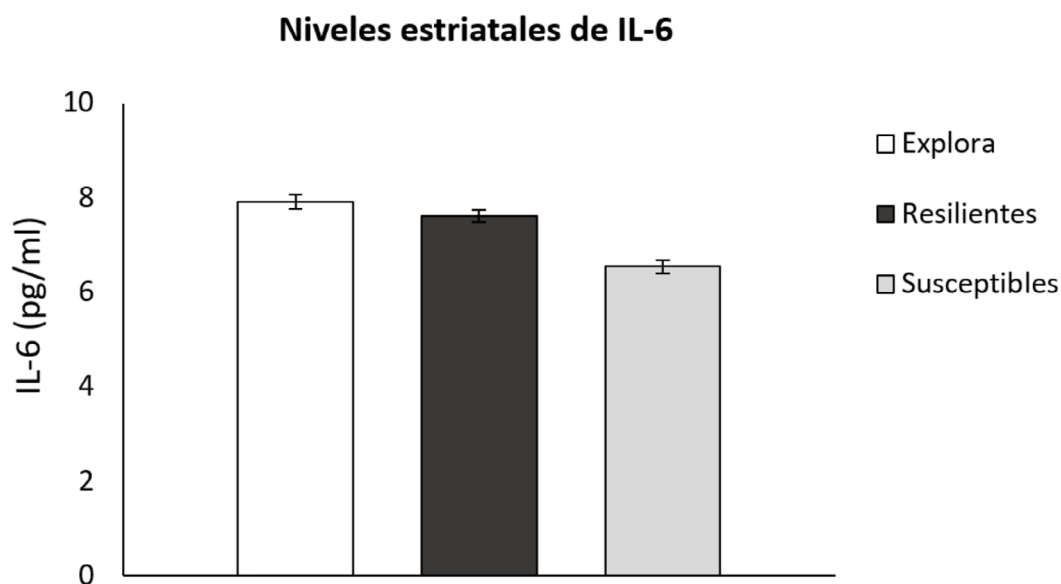


Figura 3. Niveles estriatales de IL-6. Efecto de la DS repetida en los niveles de IL-6 en ratones macho C57/BL6, teniendo en cuenta la subdivisión entre resilientes y susceptibles. Los datos se presentan como Media ± S.E.M. (pg/ml).

lientes o susceptibles. Esto puede ser debido a que nuestro estudio se realiza tres semanas después de la última DS.

Resiliencia y susceptibilidad al incremento de los efectos reforzantes de la cocaína

Nuestros resultados confirman que la experiencia de la DS repetida durante la edad adulta induce un incremento a largo plazo de los efectos reforzantes condicionados de una dosis subumbral de cocaína (1mg/kg), ya que lo hemos evaluado tres semanas después de la última DS repetida. El paradigma de CPL es ampliamente utilizado para evaluar los efectos condicionados de las drogas (Aguilar et al., 2009) y refleja las propiedades motivacionales secundarias de las drogas, así como su potencial del abuso (Tzschentke, 2007). Por lo tanto la exposición a una DS repetida induciría un incremento prolongado en el tiempo del valor motivacional de la cocaína incrementándose por tanto su potencial de abuso en los sujetos estresados. Nuestros resultados confirman numerosos estudios que han demostrado que la DS en ratones adolescentes y adultos, aumenta los efectos reforzantes de la cocaína utilizando el CPL (Arenas et al., 2016; Montagud-Romero et al., 2016a; Rodríguez-Arias et al., 2015, 2017; Ferrer-Pérez et al., 2018a), o la autoadministración de cocaína (Boyson, Miguel, Quadros, DeBold y Miczek, 2011; Holly et al., 2016; Newman, Leonard, Arena, Almeida y Miczek, 2018; Arena, Covington, Herbert, DeBold y Miczek, 2019).

Pero este estudio va más allá y demuestra que en nuestra población de ratones derrotados, aunque en conjunto todos desarrollan preferencia con una dosis subumbral de cocaína, podemos diferenciar dos tipos de sujetos. Los ratones resilientes a pesar de haber sido estresados no presentan una respuesta a los efectos reforzantes condicionados de la cocaína (CPL). Por el contrario, los animales susceptibles sí que desarrollan un incremento por el compartimento asociado a la cocaína. Aunque numerosas evidencias relacionan el estrés con el desarrollo de conductas adictivas (Lüthi y Lüscher, 2014; Polter y Kauer, 2014; Gold, Machado-Vieira y Pavlatou, 2015), también se ha demostrado que hay sujetos que desarrollan una buena competencia psicosocial en condiciones de elevado riesgo como el maltrato infantil o un estatus socioeconómico adverso (McGloin y Widom, 2001; Hjemdal, Friborg y Stiles, 2012; Brody et al., 2013). No existen prácticamente estudios en modelos animales que evalúen el fenómeno de la resiliencia al desarrollo de vulnerabilidad al consumo de drogas tras la exposición a un estresor social. Un reciente estudio utilizando como modelo de estrés la exposición al olor de un depredador, clasificó a sus ratones en resilientes y susceptibles basándose en la presencia de ansiedad en el laberinto elevado en cruz y en la evitación del contexto asociado al olor (Brodnik, Double, España y Jaskiw, 2017). En este estudio, observaron que los ratones susceptibles presentaban un incremento a los efectos motores y dopa-

minérgicos de la cocaína así como una mayor motivación para autoadministrarse esta droga. Estos efectos no se observaron en los animales resilientes, aunque en ambos tipos de ratones se observó un incremento en la liberación de DA inducida por la cocaína.

Diferente afrontamiento del estrés social en animales resilientes y susceptibles

La DS repetida es un modelo naturalista de estrés social que imita las situaciones de la vida real y por lo tanto presenta una gran validez ecológica y etológica (Tornatzky y Miczek, 1993). Algunas investigaciones recientes, empleando modelos animales de estrés social, han observado que las estrategias de afrontamiento se asocian con la resiliencia o vulnerabilidad al estrés (Wood et al., 2015; Chen et al., 2015, Finnell et al., 2017; Pearson-Leary et al., 2017). Sin embargo, estos estudios clasifican a los animales en resilientes o susceptibles basándose en la conducta social y la ansiedad mostrada por los animales al día siguiente de la última DS (Russo et al., 2012; Krishnan, 2014; Finnell y Wood, 2016). En estos estudios, los ratones resilientes no presentan anhedonia (Delgado et al., 2011), evitación social (Krishnan et al., 2007; Golden et al., 2011; Henriques-Alves y Queiroz, 2015) o evitación ante el olor de un depredador (Brodnik et al., 2017). Hasta la fecha ningún estudio ha caracterizado a los animales resilientes al incremento de los efectos reforzantes de las drogas de abuso y, por lo tanto, se desconoce si las diferentes estrategias de afrontamiento al estrés influyen en la sensibilidad a dichos efectos reforzantes. Lo que sí sabemos es que los ratones que no mostraron conductas de ansiedad ni evitación al olor de un depredador presentan adaptaciones neuroquímicas que afectan específicamente a la función del sistema DA y por lo tanto podrían modificar la eficacia reforzadora de la cocaína (Brodnik et al., 2017).

El estudio etológico de la conducta durante el desarrollo de las derrotas sociales demostró en primer lugar que no había diferencias en la conducta que los animales residentes mostraron a los intrusos, ya fueran resilientes o susceptibles. Es decir, todos fueron expuestos a un mismo nivel de estrés. Sin embargo, sí que observamos que los ratones que posteriormente se clasificarían como resilientes mostraron una menor conducta de huida en comparación con los susceptibles. Además, hemos observado una correlación positiva entre conducta de huida y el incremento de los efectos reforzantes condicionados de la cocaína en el CPL. Cuanto menos huyen los animales, menor es el efecto reforzante que les produce la cocaína. Igualmente, los animales resilientes también mostraron durante la primera DS una menor conducta de sumisión, aunque ya no observamos diferencias entre resilientes y susceptibles en la cuarta DS. Los ratones resilientes, al experimentar que sus conductas de afrontamiento no reducen la intensidad del ataque, presentan una adaptación conductual. La flexibili-

dad de las estrategias de afrontamiento se ha asociado con indicadores de resiliencia emocional, como una menor reactividad del eje HHA y un aumento de la neuroplasticidad (Hawley et al., 2010, Lambert et al., 2014). Por lo tanto, nuestros resultados indican que un afrontamiento activo y una adecuada adaptación del mismo reducen los efectos reforzantes de la cocaína. En apoyo a nuestros resultados, otros estudios también han confirmado que los ratones que no presentan estrategias de afrontamiento pasivo como la huida, muestran menor anhedonia (Wood et al., 2015), menor ansiedad y mayor interacción social (Duclot, Hollis, Darcy y Kabbaj, 2011; Hollis, Duclot, Gunjan y Kabbaj, 2011; Kumar et al., 2014). Los animales resilientes también presentaron conductas de ataque contra los residentes durante el primer enfrentamiento, habiéndose asociado esta estrategia de afrontamiento activo con la resistencia a la derrota (Finnell y Wood, 2016).

En resumen, los animales resilientes desarrollan una estrategia de afrontamiento del estrés activa, ya que atacan al residente y tardan más en asumir que han sido derrotados. Esta resistencia puede hacer que los resilientes no experimenten con tanta intensidad la DS como sí lo hacen los animales susceptibles. Se ha observado que los ratones que emplean conductas de afrontamiento activo durante la DS muestran niveles de corticosterona plasmática más baja, mayor capacidad de respuesta noradrenérgica durante el estrés y una mayor actividad simpática en respuesta a la derrota (Wood, Walker, Valentino y Bhatnagar, 2010; Gómez-Lázaro et al., 2011; Pérez-Tejada et al., 2013). Este tipo de respuesta es muy adaptativa, ya que permite limitar la respuesta al estrés (Koolhaas et al., 2011). Otro factor que puede explicar el desarrollo de resiliencia es la sensación de control durante la DS, ya que los ratones resilientes no huyen del agresor e incluso muestran conductas de ataque. Curiosamente, el consumo de cocaína solo se observa incrementado en los ratones intrusos, pero no en los residentes que inician el ataque, aunque en ambos tipos de animales se produce una respuesta hormonal al estrés (Covington y Miczek, 2001, 2005; Covington et al., 2005; Boyson et al., 2014). El ratón residente mantiene el control del encuentro, lo que puede estar ejerciendo un papel protector sobre la respuesta al estrés del eje hipotálamo hipofiso adrenal (Boyson et al., 2014). Por lo tanto, nuestros animales resilientes pueden experimentar un cierto control de la situación de estrés.

Contrariamente, los animales susceptibles mostraron un afrontamiento pasivo, aceptando la derrota con mayor tiempo en huida y sumisión, sin presentar ninguna conducta agresiva hacia el residente. Este afrontamiento pasivo durante la DS se ha asociado previamente con la aparición de ansiedad y depresión (Wood et al., 2010, Chen et al., 2015, Pearson-Leary et al., 2017).

Respuesta de neuroinflamación tras las DS repetida

En los años 90 se esbozó la llamada teoría neuroinflamatoria de la depresión (por ejemplo, Maes et al., 2009), basándose en el incremento de mediadores inflamatorios en pacientes con depresión. En la actualidad existen numerosos estudios que demuestran el papel del sistema inmune en la vulnerabilidad al desarrollo de enfermedad mental (Réus et al., 2015; Menard, Pfau, Hodes y Russo, 2017). Igualmente se cree que el trastorno por uso de drogas se relaciona con cambios en la actividad del sistema inmunitario (Clark, Wiley y Bradberry, 2013; Cui, Shurtleff y Harris, 2014). Estudios tanto clínicos como preclínicos han demostrado que los psicoestimulantes como la cocaína activan componentes centrales y periféricos del sistema inmune (Clark et al., 2013; Araos et al., 2015; Moreira et al., 2016). Más recientemente también se ha demostrado que el estrés social induce una activación del sistema inmune, incrementando los niveles periféricos de citoquinas, activando la microglía o incluso incrementando la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Pfau y Russo, 2016; Rodríguez-Arias et al., 2017, 2018; Ferrer-Pérez et al., 2018a).

Se ha descrito que tras la DS, los ratones susceptibles que desarrollan aislamiento social y ansiedad muestran niveles más altos de IL-6 que aquellos animales resilientes (Hodes, Ménard y Russo, 2016). Sin embargo, nuestros resultados no confirman esta menor respuesta inflamatoria en animales resilientes. Los niveles de IL-6 no fueron más altos en los animales derrotados comparados con los controles, y tampoco se observaron diferencias entre resilientes y susceptibles. La discrepancia en los resultados puede deberse fundamentalmente a que en el estudio de Hodes et al. (2016), la medición de la IL-6 se realizó 24h después de la última DS, sin embargo, en nuestro estudio se realizó al final de todo el procedimiento, cuando ya había pasado más de un mes desde la última DS repetida. En esta misma línea ya habíamos demostrado previamente que tras el CPL ya no se observaban incrementos en los niveles estriales de IL-6 en los animales derrotados (Ferrer-Pérez et al., 2018a). Dado que la caracterización de los animales en resilientes o susceptibles requiere del desarrollo del CPL, nuestro diseño experimental implica que las mediciones se realicen al menos 4 semanas tras la última DS. Por lo tanto, nuestros resultados indican que un mes después de la última DS no existen diferencias en la respuesta neuroinflamatoria.

Los modelos animales son una herramienta muy potente, pero debemos ser prudentes a la hora de trasladar los resultados obtenidos a la conducta humana. El modelo de DS puede extrapolarse como situaciones de estrés psicológico o social, a las que estamos expuestos durante gran parte de nuestra vida. Nuestros resultados permiten la identificación de algunas características conductuales que aparecen en animales resilientes a esta DS, que pueden actuar como factor de protección frente al desarrollo de

adicción a drogas. Un afrontamiento activo, pero al mismo tiempo flexible se destaca como la característica conductual más relevante de los sujetos resilientes. El estudio de las estrategias conductuales o farmacológicas que subyacen a la resiliencia nos permitirá disminuir la vulnerabilidad al TUS inducido por el estrés social.

Reconocimientos

Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (MICINN), PSI2017-83023.

Instituto de Salud Carlos III, Red de Trastornos Adictivos (RD16/0017/0007) y Unión Europea, Fondos FEDER “una manera de hacer Europa”.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias

- Aguilar, M. A., Rodríguez-Arias, M. y Miñarro, J. (2009). Neurobiological mechanisms of the reinstatement of drug-conditioned place preference. *Brain Research Reviews*, 59, 253-277. doi:10.1016/j.brainresrev.2008.08.002.
- Alfonso-Loeches, S., Pascual-Lucas, M., Blanco, A. M., Sanchez-Vera, I. y Guerri, C. (2010). Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. *Journal of Neuroscience*, 30, 8285-8295. doi:10.1523/JNEUROSCI.0976-10.2010.
- Araos, P., Pedraz, M., Serrano, A., Lucena, M., Barrios, V., García-Marchena, N.,... Rodríguez de Fonseca, F. (2015). Plasma profile of pro-inflammatory cytokines and chemokines in cocaine users under outpatient treatment: Influence of cocaine symptom severity and psychiatric co-morbidity. *Addiction Biology*, 20, 756-772. doi:10.1111/adb.12156.
- Arena, D. T., Covington, 3., Herbert, E., DeBold, J. F. y Miczek, K. A. (2019). Persistent increase of I.V. cocaine self-administration in a subgroup of C57BL/6J male mice after social defeat stress. *Psychopharmacology*, 236, 1-11. doi:10.1007/s00213-019-05191-6.
- Arenas, M. C., Aguilar, M. A., Montagud-Romero, S., Mateos-García, A., Navarro-Francés, C. I., Miñarro, J. y Rodríguez-Arias, M. (2016). Influence of the novelty-seeking endophenotype on the rewarding effects of psychostimulant drugs in animal models. *Current Neuropharmacology*, 14, 87-100. doi:10.2174/1570159X13666150921112841.
- Arenas, M. C., Daza-Losada, M., Vidal-Infer, A., Aguilar, M. A., Miñarro, J. y Rodríguez-Arias, M. (2014). Capacity of novelty-induced locomotor activity and the hole-board test to predict sensitivity to the conditioned rewarding effects of cocaine. *Physiology & Behavior*, 133, 152-160. doi:10.1016/j.physbeh.2014.05.028.
- Bardo, M. T. y Bevins, R. A. (2000). Conditioned place preference: What does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology*, 153, 31-43. doi:10.1007/s002130000569.
- Blanco-Gandía, M. C., Cantacorps, L., Aracil-Fernández, A., Montagud-Romero, S., Aguilar, M. A., Manzanares, J.,... Rodríguez-Arias, M. (2017). Effects of bingeing on fat during adolescence on the reinforcing effects of cocaine in adult male mice. *Neuropharmacology*, 113, 31-44. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.09.020.
- Blanco-Gandía, M. C., Montagud-Romero, S., Aguilar, M. A., Miñarro, J. y Rodríguez-Arias, M. (2018). Housing conditions modulate the reinforcing properties of cocaine in adolescent mice that binge on fat. *Physiology & Behavior*, 183, 18-26. doi:10.1016/j.physbeh.2017.10.014.
- Boyson, C. O., Holly, E. N., Shimamoto, A., Albrechet-Souza, L., Weiner, L. A., DeBold, J. F. y Miczek, K. A. (2014). Social stress and CRF-dopamine interactions in the VTA: Role in long-term escalation of cocaine self-administration. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34, 6659-6667. doi:10.1523/JNEUROSCI.3942-13.2014.
- Boyson, C., Miguel, T., Quadros, I., DeBold, J. y Miczek, K. (2011). Prevention of social stress-escalated cocaine self-administration by CRF-R1 antagonist in the rat VTA. *Psychopharmacology*, 218, 257-269. doi:10.1007/s00213-011-2266-8.
- Brodnik, Z. D., Double, M., España, R. A. y Jaskiw, G. E. (2017). L-tyrosine availability affects basal and stimulated catecholamine indices in prefrontal cortex and striatum of the rat. *Neuropharmacology*, 123, 159-174. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.05.030.
- Brody, G. H., Yu, T., Chen, Y., Kogan, S. M., Evans, G. W., Windle, M.,... Philibert, R. A. (2013). Supportive family environments, genes that confer sensitivity, and allostatic load among rural african american emerging adults: A prospective analysis. *Journal of Family Psychology*, 27, 22-29. doi:10.1037/a0027829.
- Burke, A. y Miczek, K. (2014). Stress in adolescence and drugs of abuse in rodent models: Role of dopamine, CRF, and HPA axis. *Psychopharmacology*, 231, 1557-1580. doi:10.1007/s00213-013-3369-1.
- Chaouloff, F. (2013). Social stress models in depression research: What do they tell us? *Cell and Tissue Research*, 354, 179-190. doi:10.1007/s00441-013-1606-x.
- Charney, D. S. (2004). Psychobiological mechanisms of resilience and vulnerability: Implications for successful adaptation to extreme stress. *American Journal of Psychiatry*, 161, 195-216. doi:10.1176/appi.ajp.161.2.195.
- Chen, R., Kelly, G., Sengupta, A., Heydendael, W., Nicholas, B., Beltrami, S.,... Bhatnagar, S. (2015). MicroR-

- NAs as biomarkers of resilience or vulnerability to stress. *Neuroscience*, 305, 36-48. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.07.045.
- Chmitorz, A., Kunzler, A., Helmreich, I., Tüscher, O., Kalisch, R., Kubiak, T.,... Lieb, K. (2018). Intervention studies to foster resilience – A systematic review and proposal for a resilience framework in future intervention studies. *Clinical Psychology Review*, 59, 78-100. doi:10.1016/j.cpr.2017.11.002.
- Clark, K., Wiley, C. y Bradberry, C. (2013). Psychostimulant abuse and neuroinflammation: Emerging evidence of their interconnection. *Neurotoxicity Research*, 23, 174-188. doi:10.1007/s12640-012-9334-7.
- Covington III, H., Kikusui, T., Goodhue, J., Nikulina, E. M., Hammer, R. P. y Miczek, K. A. (2005). Brief social defeat stress: Long lasting effects on cocaine taking during a binge and Zif268 mRNA expression in the amygdala and prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*, 30, 310-321. doi:10.1038/sj.npp.1300587.
- Covington III, H. y Miczek, K. (2001). Repeated social-defeat stress, cocaine or morphine. Effects on behavioral sensitization and intravenous cocaine self-administration “binges”. *Psychopharmacology*, 158, 388-398. doi:10.1007/s002130100858.
- Covington III, H. y Miczek, K. (2005). Intense cocaine self-administration after episodic social defeat stress, but not after aggressive behavior: Dissociation from corticosterone activation. *Psychopharmacology*, 183, 331-340. doi:10.1007/s00213-005-0190-5.
- Cui, C., Shurtleff, D. y Harris, R. A. (2014). Neuroimmune mechanisms of alcohol and drug addiction. *International Review of Neurobiology*, 118, 1-12. doi:10.1016/B978-0-12-801284-0.00001-4.
- Delgado-Palacios, R., Campo, A., Henningsen, K., Verhoye, M., Poot, D., Dijkstra, J.,... Van Der Linden, A. (2011). Magnetic resonance imaging and spectroscopy reveal differential hippocampal changes in anhedonic and resilient subtypes of the chronic mild stress rat model. *Biological Psychiatry*, 70, 449-457. doi:10.1016/j.biopsych.2011.05.014.
- Duclot, F., Hollis, F., Darcy, M. J. y Kabbaj, M. (2011). Individual differences in novelty-seeking behavior in rats as a model for psychosocial stress-related mood disorders. *Physiology & Behavior*, 104, 296-305. doi:10.1016/j.physbeh.2010.12.014.
- Ferrer-Pérez, C., Castro-Zavala, A., Luján, M. Á., Filarowska, J., Ballestín, R., Miñarro, J.,... Rodríguez-Arias, M. (2019). Oxytocin prevents the increase of cocaine-related responses produced by social defeat. *Neuropharmacology*, 146, 50-64. doi:10.1016/j.neuropharm.2018.11.011.
- Ferrer-Pérez, C., Martínez, T., Montagud-Romero, S., Ballestín, R., Reguilón, M. D., Miñarro, J. y Rodríguez-Arias, M. (2018a). Indomethacin blocks the increased conditioned rewarding effects of cocaine induced by repeated social defeat. *PLoS One*, 13, e0209291. doi:10.1371/journal.pone.0209291.
- Ferrer-Pérez, C., Reguilón, M. D., Manzanedo, C., Aguilar, M. A., Miñarro, J. y Rodríguez-Arias, M. (2018b). Antagonism of corticotropin-releasing factor CRF 1 receptors blocks the enhanced response to cocaine after social stress. *European Journal of Pharmacology*, 823, 87-95. doi:10.1016/j.ejphar.2018.01.052.
- Finnell, J. E., Lombard, C. M., Padi, A. R., Moffitt, C. M., Wilson, L. B., Wood, C. S. y Wood, S. K. (2017). Physical versus psychological social stress in male rats reveals distinct cardiovascular, inflammatory and behavioral consequences. *PLoS One*, 12, e0172868. doi:10.1371/journal.pone.0172868.
- Finnell, J. E. y Wood, S. K. (2016). Neuroinflammation at the interface of depression and cardiovascular disease: Evidence from rodent models of social stress. *Neurobiology of Stress*, 4, 1-14. doi:10.1016/j.ynstr.2016.04.001.
- García-Pardo, M. P., Rodríguez-Arias, M., Miñarro, J. y Aguilar, M. A. (2016). Effects of social stress on ethanol responsiveness in adult mice. *Neuropsychiatry*, 6. doi:10.4172/Neuropsychiatry.1000146.
- Gold, P. W., Machado-Vieira, R. y Pavlatou, M. G. (2015). Clinical and biochemical manifestations of depression: Relation to the neurobiology of stress. *Neural Plasticity*, 2015, 581976-11. doi:10.1155/2015/581976.
- Golden, S. A., Covington, H. E., Berton, O. y Russo, S. J. (2011). A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nature Protocols*, 6, 1183-1191. doi:10.1038/nprot.2011.361.
- Gómez-Lázaro, E., Arregi, A., Beitia, G., Vegas, O., Azpiroz, A. y Garmendia, L. (2011). Individual differences in chronically defeated male mice: Behavioral, endocrine, immune, and neurotrophic changes as markers of vulnerability to the effects of stress. *Stress*, 14, 537-548. doi:10.3109/10253890.2011.562939.
- Hawley, D. F., Bardi, M., Everette, A. M., Higgins, T. J., Tu, K. M., Kinsley, C. H. y Lambert, K. G. (2010). Neurobiological constituents of active, passive, and variable coping strategies in rats: Integration of regional brain neuropeptide Y levels and cardiovascular responses. *Stress*, 13, 172-183. doi:10.3109/10253890903144621.
- Heffner, T. G., Hartman, J. A. y Seiden, L. S. (1980). A rapid method for the regional dissection of the rat brain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 13, 453-456. doi:10.1016/0091-3057(80)90254-3.
- Henriques-Alves, A. M. y Queiroz, C. M. (2015). Ethological evaluation of the effects of social defeat stress in mice: Beyond the social interaction ratio. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9, 364. doi:10.3389/fnbeh.2015.00364.
- Hjemdal, O., Friborg, O. y Stiles, T.C. (2012). Resilience is a good predictor of hopelessness even after accounting for stressful life events, mood and personality (NEO-

- PI-R). *Scandinavian Journal of Psychology*, 53, 174-180. doi:10.1111/j.1467-9450.2011.00928.x.
- Hodes, G. E., Ménard, C. y Russo, S. J. (2016). Integrating interleukin-6 into depression diagnosis and treatment. *Neurobiology of Stress*, 4, 15-22. doi:10.1016/j.ynstr.2016.03.003.
- Hollis, F., Duclot, F., Gunjan, A. y Kabbaj, M. (2011). Individual differences in the effect of social defeat on anhedonia and histone acetylation in the rat hippocampus. *Hormones and Behavior*, 59, 331-337. doi:10.1016/j.yhbeh.2010.09.005.
- Holly, E. N., Boyson, C. O., Montagud-Romero, S., Stein, D. J., Gobrogge, K. L., DeBold, J. F. y Miczek, K. A. (2016). Episodic social stress-escalated cocaine self-administration: Role of phasic and tonic corticotropin releasing factor in the anterior and posterior ventral tegmental area. *The Journal of Neuroscience*, 36, 4093-4105. doi:10.1523/JNEUROSCI.2232-15.2016.
- Koolhaas, J., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, F., Flugge, G., Korte, M. y Fuchs, E. (2011). Neuroendocrinology of coping styles: Towards understanding the biology of individual variation. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 31, 307-321. doi:10.1016/j.yfrne.2010.04.001.
- Krishnan, V. (2014). Defeating the fear: New insights into the neurobiology of stress susceptibility. *Experimental Neurology*, 261, 412-416. doi:10.1016/j.expneurol.2014.05.012.
- Krishnan, V., Han, M., Graham, A., Graham, D. L., Berton, O., Renthal, W.,... Nestler, E. J. (2007). Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell*, 131, 391-404. doi:10.1016/j.cell.2007.09.018.
- Kumar, S., Hultman, R., Hughes, D., Michel, N., Katz, B. M. y Dzirasa, K. (2014). Prefrontal cortex reactivity underlies trait vulnerability to chronic social defeat stress. *Nature Communications*, 5, 4537. doi:10.1038/ncomms5537.
- Laird, K. T., Krause, B., Funes, C. y Lavretsky, H. (2019). Psychobiological factors of resilience and depression in late life. *Translational Psychiatry*, 9, 88-18. doi:10.1038/s41398-019-0424-7.
- Lambert, K. G., Hyer, M. M., Rzucidlo, A. A., Bergeron, T., Landis, T. y Bardi, M. (2014). Contingency-based emotional resilience: Effort-based reward training and flexible coping lead to adaptive responses to uncertainty in male rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 124. doi:10.3389/fnbeh.2014.00124.
- Lüthi, A. y Lüscher, C. (2014). Pathological circuit function underlying addiction and anxiety disorders. *Nature Neuroscience*, 17, 1635-1643. doi:10.1038/nn.3849.
- Lutter, M., Krishnan, V., Russo, S. J., Jung, S., McClung, C. A. y Nestler, E. J. (2008). Orexin signaling mediates the antidepressant-like effect of calorie restriction. *Journal of Neuroscience*, 28, 3071-3075. doi:10.1523/JNEUROSCI.5584-07.2008.
- Maes, M., Yirmiya, R., Noraberg, J., Brene, S., Hibbeln, J., Perini, G.,... Maj, M. (2009). The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: Leads for future research and new drug developments in depression. *Metabolic Brain Disease*, 24, 27-53. doi:10.1007/s11011-008-9118-1.
- Maldonado, C., Rodríguez-Arias, M., Castillo, A., Aguilar, M. y Miñarro, J. (2006). Gamma-hydroxybutyric acid affects the acquisition and reinstatement of cocaine-induced conditioned place preference in mice. *Behavioural Pharmacology*, 17, 119-131. doi:10.1097/01.fbp.0000190685.84984.ec.
- Manzanedo, C., Aguilar, M. A., Rodríguez-Arias, M. y Miñarro, J. (2001). Effects of dopamine antagonists with different receptor blockade profiles on morphine-induced place preference in male mice. *Behavioural Brain Research*, 121, 189-197. doi:10.1016/S0166-4328(01)00164-4.
- Martínez, M., Miñarro, J. y Simón, V. M. (1991). Análisis etoexperimental de la conducta agonística en ratones. *Psicológica*, 12, 1-22.
- McGloin, J. y Widom, C.S. (2001). Resilience among abused and neglected children grown up. *Development and Psychopathology*, 13, 1021-1038. doi:10.1017/S095457940100414X.
- Menard, C., Pfau, M. L., Hodes, G. E. y Russo, S. J. (2017). Immune and neuroendocrine mechanisms of stress vulnerability and resilience. *Neuropsychopharmacology*, 42, 62-80. doi:10.1038/npp.2016.90.
- Miczek, K. A., Yap, J. J. y Covington, H. E. (2008). Social stress, therapeutics and drug abuse: Preclinical models of escalated and depressed intake. *Pharmacology and Therapeutics*, 120, 102-128. doi:10.1016/j.pharmthera.2008.07.006.
- Montagud-Romero, S., Daza-Losada, M., Vidal-Infer, A., Maldonado, C., Aguilar, M. A. y Miñarro, J. (2014). The novelty-seeking phenotype modulates the long-lasting effects of intermittent ethanol administration during adolescence. *PLoS One*, 9, e92576. doi:10.1371/journal.pone.0092576.
- Montagud-Romero, S., Reguilón, M. D., Roger-Sanchez, C., Pascual, M., Aguilar, M. A., Guerri, C.,... Rodríguez-Arias, M. (2016a). Role of dopamine neurotransmission in the long-term effects of repeated social defeat on the conditioned rewarding effects of cocaine. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, 71, 144-154. doi:10.1016/j.pnpbp.2016.07.008.
- Montagud-Romero, S., Montesinos, J., Pascual, M., Aguilar, M. A., Roger-Sanchez, C., Guerri, C.,... Rodríguez-Arias, M. (2016b). Up-regulation of histone acetylation induced by social defeat mediates the conditioned rewarding effects of cocaine. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, 70, 39-48. doi:10.1016/j.pnpbp.2016.04.016.

- Moreira, F. P., Medeiros, J. R. C., Lhullier, A. C., de Matos Souza, L. D., Jansen, K., Portela, L. V.,... Oses, J. P. (2016). Cocaine abuse and effects in the serum levels of cytokines IL-6 and IL-10. *Drug and Alcohol Dependence*, 158, 181-185. doi:10.1016/j.drugalcdep.2015.11.024.
- Newman, E. L., Leonard, M. Z., Arena, D. T., de Almeida, R. M. M. y Miczek, K. A. (2018). Social defeat stress and escalation of cocaine and alcohol consumption: Focus on CRF. *Neurobiology of Stress*, 9, 151-165. doi:10.1016/j.ynstr.2018.09.007.
- Pearson-Leary, J., Eacret, D., Chen, R., Takano, H., Nicholas, B. y Bhatnagar, S. (2017). Inflammation and vascular remodeling in the ventral hippocampus contributes to vulnerability to stress. *Translational Psychiatry*, 7, e1160. doi:10.1038/tp.2017.122.
- Pérez-Tejada, J., Arregi, A., Gómez-Lázaro, E., Vegas, O., Azpiroz, A. y Garmendia, L. (2013). Coping with chronic social stress in mice: Hypothalamic-pituitary-adrenal/sympathetic-adrenal-medullary axis activity, behavioral changes and effects of antalarmin treatment: Implications for the study of stress-related psychopathologies. *Neuroendocrinology*, 98, 73-88. doi:10.1159/000353620.
- Pfau, M. L. y Russo, S. J. (2015). Peripheral and central mechanisms of stress resilience. *Neurobiology of Stress*, 1, 66-79. doi:10.1016/j.ynstr.2014.09.004.
- Pfau, M. L. y Russo, S. J. (2016). Neuroinflammation regulates cognitive impairment in socially defeated mice. *Trends in Neurosciences*, 39, 353-355. doi:10.1016/j.tins.2016.04.004.
- Polter, A. M. y Kauer, J. A. (2014). Stress and VTA synapses: Implications for addiction and depression. *European Journal of Neuroscience*, 39, 1179-1188. doi:10.1111/ejn.12490.
- Réus, G. Z., Fries, G. R., Stertz, L., Badawy, M., Passos, I. C., Barichello, T.,... Quevedo, J. (2015). The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders. *Neuroscience*, 300, 141-154. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.05.018.
- Rodríguez-Arias, M., Montagud-Romero, S., Carrión, A. M. G., Ferrer-Pérez, C., Pérez-Villalba, A., Marco, E.,... Miñarro, J. (2018). Social stress during adolescence activates long-term microglia inflammation insult in reward processing nuclei. *PLoS One*, 13, e0206421. doi:10.1371/journal.pone.0206421.
- Rodríguez-Arias, M., Montagud-Romero, S., Rubio-Araiz, A., Aguilar, M. A., Martín-García, E., Cabrera, R.,... Miñarro, J. (2017). Effects of repeated social defeat on adolescent mice on cocaine-induced CPP and self-administration in adulthood: Integrity of the blood-brain barrier. *Addiction Biology*, 22, 129-141. doi:10.1111/adb.12301.
- Rodríguez-Arias, M., Navarrete, F., Blanco-Gandía, M. C., Arenas, M. C., Bartoll-Andrés, A., Aguilar, M. A.,... Manzanares, J. (2016). Social defeat in adolescent mice increases vulnerability to alcohol consumption. *Addiction Biology*, 21, 87-97. doi:10.1111/adb.12184.
- Rodríguez-Arias, M., Vaccaro, S., Arenas, M. C., Aguilar, M. A. y Miñarro, J. (2015). The novelty-seeking phenotype modulates the long-lasting effects of adolescent MDMA exposure. *Physiology & Behavior*, 141, 190-198. doi:10.1016/j.physbeh.2015.01.023.
- Russo, S. J., Murrough, J. W., Han, M., Charney, D. S. y Nestler, E. J. (2012). Neurobiology of resilience. *Nature Neuroscience*, 15, 1475-1484. doi:10.1038/nn.3234.
- Tornatzky, W. y Miczek, K. A. (1993). Long-term impairment of autonomic circadian rhythms after brief intermittent social stress. *Physiology & Behavior*, 53, 983-993. doi:10.1016/0031-9384(93)90278-N.
- Tzschentke, T. M. (2007). Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: Update of the last decade. *Addiction Biology*, 12, 227-462. doi:10.1111/j.1369-1600.2007.00070.x.
- Vidal-Infer, A., Aguilar, M. A., Miñarro, J. y Rodríguez-Arias, M. (2012). Effect of intermittent exposure to ethanol and MDMA during adolescence on learning and memory in adult mice. *Behavioral and Brain Functions*, 8, 32. doi:10.1186/1744-9081-8-32.
- Wang, J., Hodes, G. E., Zhang, H., Zhang, S., Zhao, W., Golden, S. A.,... Pasinetti, G. M. (2018). Epigenetic modulation of inflammation and synaptic plasticity promotes resilience against stress in mice. *Nature Communications*, 9, 477. doi:10.1038/s41467-017-02794-5.
- Wood, S. K. y Bhatnagar, S. (2015). Resilience to the effects of social stress: Evidence from clinical and preclinical studies on the role of coping strategies. *Neurobiology of Stress*, 1, 164-173. doi:10.1016/j.ynstr.2014.11.002.
- Wood, S. K., Walker, H. E., Valentino, R. J. y Bhatnagar, S. (2010). Individual differences in reactivity to social stress predict susceptibility and resilience to a depressive phenotype: Role of corticotropin-releasing factor. *Endocrinology*, 151, 1795-1805. doi:10.1210/en.2009-1026.
- Wood, S. K., Wood, C. S., Lombard, C. M., Lee, C. S., Zhang, X., Finnell, J. E. y Valentino, R. J. (2015). Inflammatory factors mediate vulnerability to a social stress-induced depressive-like phenotype in passive coping rats. *Biological Psychiatry*, 78, 38-48. doi:10.1016/j.biopsych.2014.10.026.
- Yap, J., Chartoff, E., Holly, E., Potter, D., Carlezon Jr, W. y Miczek, K. (2015). Social defeat stress-induced sensitization and escalated cocaine self-administration: The role of ERK signaling in the rat ventral tegmental area. *Psychopharmacology*, 232, 1555-1569. doi:10.1007/s00213-014-3796-7.
- Zhan, G., Huang, N., Li, S., Hua, D., Zhang, J., Fang, X., ... Yang, C. (2018). PGC-1 α -FNDC5-BDNF signaling pathway in skeletal muscle confers resilience to stress in mice subjected to chronic social defeat. *Psychopharmacology*, 235, 3351-3358. doi:10.1007/s00213-018-5041-2.

