



Universidad
Zaragoza

TRABAJO FIN DE MÁSTER
MÁSTER UNIVERSITARIO EN PSICOLOGÍA GENERAL SANITARIA

**La inoculación de estrés revierte las consecuencias
a largo plazo de la derrota social sobre los efectos
reforzantes de la cocaína en ratones macho**

Autora

Laura Tárraga Martínez

Directora

María Pilar García Pardo

2019

Índice

Introducción.....	4
Material y método.....	9
Animales	9
Fármaco utilizado	9
Aparatos	10
Procedimientos.....	10
1. Inoculación de estrés	10
2. Derrota social repetida.....	10
3. Condicionamiento de preferencia del lugar.....	11
Diseño experimental	12
Análisis estadísticos	14
Resultados.....	14
Discusión	15
Referencias	18

Resumen

Introducción: Estudios científicos han demostrado que el estrés por derrota social modifica el efecto reforzante de diferentes drogas. Además, se ha observado que la inoculación de estrés en etapas tempranas de la vida podría fomentar la resiliencia a eventos estresantes futuros, promoviendo el aprendizaje y las habilidades de afrontamiento. **Objetivo:** comprobar si la inoculación de estrés revierte el efecto que la derrota social induce sobre el efecto reforzante de la cocaína. **Material y método:** 30 ratones macho sufrieron una derrota social puntual en la adolescencia (día postnatal 27) como método de inducción de estrés. En la vida adulta, la mitad de ellos (grupo IN+DSR) fueron expuestos a cuatro episodios de derrota social repetida (días postnatales 47-56) mientras que la otra mitad de animales se utilizaron como grupo control (grupo IN+EXPL). Tres semanas después todos los animales fueron condicionados con cocaína 1mg/kg utilizando el paradigma de condicionamiento de preferencia de lugar. **Resultados:** ningún animal mostró condicionamiento de preferencia de lugar. **Conclusiones:** la inoculación de estrés revierte las consecuencias a largo plazo de la derrota social sobre los efectos reforzantes de la cocaína. Posibles implicaciones prácticas podrían derivarse de estos resultados indagando en nuevas estrategias preventivas o tratamientos terapéuticos para trastornos desencadenados o exacerbados por eventos estresantes.

Palabras clave: inoculación de estrés, derrota social, cocaína, adolescencia y condicionamiento de preferencia de lugar.

Abstract

Introduction: Scientific studies have shown that stress due to social defeat modifies the reinforcing effect of different drugs. In addition, it has been observed that the inoculation of stress in the early stages of life could promote resilience to future stressful events, promoting learning and coping skills. **Objective:** to verify if the inoculation of stress reverses the effect that social defeat induces on the reinforcing effect of cocaine. **Material and method:** 30 male mice suffered a punctual social defeat in adolescence (postnatal day 27) as a method of stress induction. In adult life, half of them (group IN + DSR) were exposed to four episodes of repeated social defeat (postnatal days 47-56) while the other half of animals were used as a control group (group IN + EXPL). Three weeks later all the animals were conditioned with 1mg / kg cocaine using the place preference paradigm. **Results:** no animal showed conditioning of place preference. **Conclusions:** the inoculation of stress reverses the long-term consequences of social defeat on the reinforcing effects of cocaine. Possible practical implications could be derived from these results by investigating new preventive strategies or therapeutic treatments for disorders triggered or exacerbated by stressful events.

Keywords: inoculation of stress, social defeat, cocaine, adolescence and conditioning of preference of place.

Introducción

La adicción a las drogas o trastornos adictivos según el manual diagnóstico DSM-V, se ha convertido en un problema grave en nuestra sociedad y se caracteriza como una enfermedad cuyas características más relevantes son la pérdida de control general sobre el consumo de una sustancia, una compulsión en su búsqueda, la aparición de diversas emociones negativas cuando no se tiene acceso a la sustancia y recaída tras largos periodos de abstinencia (Koob, 2010; Koob, 2013; Koob y Volkow, 2010).

Existen muchas drogas diferentes al alcance de la población, algunas legales, como son el alcohol y el tabaco, y otras ilegales como el cannabis, la cocaína, drogas de síntesis, etc (Garciga, Surí y Rodríguez, 2015) y se encuentran diferentes motivos, maneras y distintos contextos para consumirlas (Everitt, 2014). En concreto, la cocaína es la segunda droga ilegal más consumida en occidente (Alquezar et al., 2015) y según el informe “*European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*” (EMCDDA, 2018) es la droga estimulante ilegal más consumida; 3,1 millones de europeos entre 15 y 64 años consumieron dicha droga en el último año y 2,3 millones de ellos fueron jóvenes entre 15 y 34 años. Además, España es el segundo país europeo con mayor prevalencia de consumo tras Reino Unido, con una prevalencia en el consumo de cocaína a lo largo de la vida en personas entre 15 y 64 años de 9,1% y entre jóvenes entre 15 y 34 años de un 3% en el consumo durante el último año (EMCDDA, 2018). Si atendemos a la Encuesta Domiciliaria sobre Alcohol y Drogas en España (EDADES, 2017-2018), la prevalencia del consumo de cocaína en España en personas entre 15-64 años alguna vez en la vida se eleva al 10,3% y si atendemos al consumo en el último año es del 2,2%. Respecto al sexo biológico, este consumo es mayor para los hombres que para las mujeres.

Los principales efectos que provoca la cocaína son euforia, labilidad emocional, grandiosidad, hiperalerta, agitación psicomotriz, insomnio, supresión del apetito, hipersexualidad, tendencia a la violencia, deterioro de la capacidad de juicio, aumento de la presión arterial y dilatación pupilar (Becoña y Cortés, 2010), además de ser una droga con un potencial adictivo muy alto (Becoña y Cortés, 2010; Manzanedo et al., 2012). Al mismo tiempo, es la droga que más asistencias sanitarias genera en los distintos dispositivos de urgencias, siendo la responsable de más del 60% de las

urgencias relacionadas con el consumo de drogas y la droga por la que muchas personas demandan tratamientos de deshabituación (Alquezar et al., 2015).

Un dato alarmante es que la mayor incidencia y prevalencia se da en un rango de edad que comprende la adolescencia, dado que es un periodo donde se muestran comportamientos como la búsqueda de la novedad, una mayor impulsividad y mayor conductas de riesgo (Doremus-Fitzwater et al., 2010; Eaton et al., 2012; Fernández-Arias y Marín-Sanabria, 2018; Spear, 2011a, 2011b; Sturman and Moghaddam, 2011; Rodríguez-Arias y Aguilar, 2012), además de ser un periodo de desarrollo donde se lleva a cabo el proceso de búsqueda de la identidad (Erickson, 1977), asociado a una sucesiva independencia del núcleo familiar y una notable influencia del grupo de pares (Andrews, Tildesley y Fuzhong, 2002; Hay y Ashman, 2003), manifestándose cambios en actitudes, hábitos y comportamientos (Fernández-Arias y Marín-Sanabria, 2018; Portela, Garcia y Goldim, 2015; Sturman y Moghaddam, 2011). Unido a esto, se debe tener en cuenta que los cerebros adolescentes están en proceso de maduración, estando incompletas regiones cerebrales que controlan la toma de decisiones y el control de impulsos (Bessa, Boarati, Scivoletto, 2011; Casey, Jones y Hare, 2008; Lydon, Wilson, Child y Geier, 2014). Por otra parte, esta etapa va acompañada de un aumento de estrés vital, puesto que están expuestos a retos y nuevas obligaciones, que coinciden con los cambios biopsicosociales de la pubertad, sufriendo fluctuaciones en el funcionamiento emocional, cognitivo y social (Calvete y Estevez, 2009; Enriquez, Garzón, Acosta y Pantoja, 2016; Fernández-Arias y Marín-Sanabria, 2018). Fuentes potenciales de estrés son las presiones académicas, la imagen corporal, el desarrollo de la identidad, la sexualidad, el logro de una autonomía en relación a los padres y madres, y la aceptación por parte de los iguales (Calvete y Estevez, 2009; Fernández-Arias y Marín-Sanabria, 2018). Como consecuencia de todos estos motivos la adolescencia es un periodo de desarrollo altamente vulnerable a la exposición de drogas de abuso (Schneider, 2008) - entendiendo por vulnerabilidad fragilidad o susceptibilidad (Protas, Cidade y Fernandes, 2006), puesto que se ha demostrado que la exposición a eventos estresantes se relaciona con la conducta adictiva, siendo esta capaz de modificar las posibilidades de consumo y el efecto reforzante que provocan las drogas (García-Pardo et al., 2014; Montagud-Romero et al., 2015; Nadal, 2008; Sinha, 2008).

Seyle (1975), considerado el “padre del estrés”, lo definió como la respuesta no específica del organismo a toda demanda que se le haga, donde se inician acciones

neurobiológicas, químicas y de comportamiento. A nivel social, existe la creencia de que el estrés interfiere siempre de manera negativa en la vida de las personas, pero no siempre es así (Moscoso y Reheiser, 2010), dado que muchas veces es el motor que nos impulsa para hacer frente al evento estresor (Naranjo, 2009; Rodríguez-Arias et al., 2013). Sin embargo, se dan muchas ocasiones donde el estrés desborda al individuo, debido a que este es excesivo, prolongado o demasiado intenso (Seyle, 1975; Moscoso y Reheiser, 2010), convirtiéndose en perjudicial o negativo (Moscoso y Reheiser, 2010; Rodríguez-Arias et al., 2013; Seyle, 1975). Existen muchos tipos de estrés que se pueden clasificar en diferentes categorías en función de diferentes criterios. Por ejemplo, en función de su intensidad y duración podemos hablar de estrés agudo (García-Pardo et al., 2014) o crónico/repetido (Montagud-Romero et al., 2015; Rodríguez-Arias et al., 2013). El primero hace referencia a un evento puntual, es decir, un evento breve en el tiempo, pero de gran intensidad movilizándonos para enfrentarnos a una circunstancia potencialmente peligrosa. Haría referencia a lo conocido como un estrés a corto plazo. En cambio, el estrés crónico/repetido se sufre durante un periodo de tiempo más largo; semanas, meses o incluso años. Este tipo de estrés desgasta a la persona tanto físicamente como psicológicamente, teniendo consecuencias negativas para el metabolismo, como por ejemplo aumento de la frecuencia cardíaca, alteraciones del sueño, dolores de cabeza, depresión, cambios de humor, problemas de memoria, debilitamiento del sistema inmune, ataques de pánico, dificultades para respirar (Ahmed, Hershberger y Lemkau, 2016).

Estudios de laboratorio con animales han demostrado una asociación positiva y significativa entre el estrés agudo y el crónico respecto al aumento en la conducta de inicio, mantenimiento y escalada en el consumo de sustancias adictivas y periodos de desintoxicación (Koob y Kreek, 2007; Miczek, Yap, y Covington, 2008; Sinha, 2001; Sinha et al., 2006). Para ello, se provocan distintos tipos de eventos estresantes en animales de diferente naturaleza (Aguilar et al., 2009; Lu, Shepard, Hall, y Shaham, 2003;). Así, podemos hablar de otra categoría de factores estresantes como farmacológicos (Bale y Vale, 2004; Buffalari y See, 2011; Rodríguez et al., 2013), físicos (Lu et al., 2003; Ribeiro Do Couto et al., 2006; Shalev, Erb y Shaham., 2010), emocionales (Aguilar et al., 2009; Lu et al., 2003) y sociales (Logrip, Zorrilla y Koob, 2012; Lu et al., 2003; Miczet, Yap y Covington, 2008; Ribeiro Do Couto et al., 2006). Entre estos últimos, se encuentra la derrota social cuya validez etológica y ecológica es

muy alta (Neisewander et al., 2012; Tornatzky y Miczek, 1993) y diferentes estudios han demostrado que el estrés social (principal fuente de estrés en nuestra sociedad) induce modificaciones en el efecto reforzante de algunas drogas (Garcia-Pardo et al., 2014; Montagud-Romero et al., 2015; Newman et al., 2018).

El estrés provoca la activación de mecanismos fisiológicos y estrategias conductuales para restablecer la alteración homeostática (Pacak y Palkovits, 2001), activando diferentes sistemas, como el sistema nervioso simpático y liberando hormonas como la adrenalina y la noradrenalina. Sin embargo, el principal sistema implicado en la respuesta de estrés es el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (HPA) que se activa por la secreción de corticotropina (CRF) en el hipotálamo y transcurre hasta la hipófisis anterior donde se sintetiza la hormona adrenocorticotropina (ACTH) y pasa al torrente sanguíneo (liberando cortisol en humanos y cortisona en roedores). La función general del eje HPA es controlada por varios bucles de retroalimentación negativa (Herman et al., 2012), regulando los receptores mineralocorticoides y glucocorticoides (Harris y Saltzman, 2013) y estos últimos actúan en retroalimentación negativa al disminuir tanto la producción como liberación de CRF y de proopiomelanocortina (POMC) así como de sus neuropéptidos en la hipófisis anterior (Rodríguez-Arias et al., 2013). Sin embargo, ante periodos prolongados de estrés el control de retroalimentación de este eje puede verse mermada (Rodríguez-Arias et al., 2013).

La literatura evidencia que existe una relación estrecha entre el sistema neurobiológico del estrés y el de la adicción, siendo el nexo común la amígdala extendida que va desde el núcleo accumbens (NAcc) hasta el núcleo basal de la estría terminal (BNST) y el núcleo central de la amígdala (CeA), donde ciertos neurotransmisores interactúan: corticotropina (CRF), noradrenalina (NA) y dopamina (DA) (Koob, 2009; Rodríguez-Arias et al., 2013). La amígdala extendida esta inervada por la vía noradrenergica tanto ventral como dorsal originada en el locus coeruleus (LC). El CeA y BNST también están inervados por neuronas DA procedentes de regiones del cerebro medio, incluyendo el área tegmental ventral (ATV). Tanto neuronas NA como DA hacen sinapsis con neuronas de CRF del CeA y BNST. Las neuronas de CRF en el CeA proyectan hacia el BNST y las neuronas de CRF en el BNST también se proyectan al ATV. El CRF en el ATV tiene un efecto excitatorio en la transmisión dopaminérgica y glutamatérgica en la región (Wang et al., 2005). Además de la vía que contiene CRF de la CeA al BNST, el glutamato del ATV juega un papel

importante en la reinstauración inducida por estrés en la búsqueda de cocaína en ratas (Rodríguez-Arias et al., 2013; Wise, 2009).

Por otro lado, investigadores sostienen que la exposición al estrés en etapas tempranas de la vida podría fomentar la resiliencia a eventos estresantes posteriores, siempre y cuando dicho estrés sea leve y controlable por el individuo y se den respuestas positivas y adaptativas (Ashokan, Sivasubramain y Mitra, 2016; Brockhurst et al., 2015; Dienstbier, 1989; Fox, Merali y Harrison, 2006; Khoshaba y Maddi, 1999; Meichenbaum, 2007; Lyons et al., 2009; Parker et al., 2004; Parker y Maestripieri, 2011; Rutter, 2006). Este fenómeno se conoce como inoculación de estrés, que sería análogo a una vacuna ante un patógeno generado por el propio patógeno atenuado (Lyons et al., 2009; Rutter, 2006). Por lo que en este sentido se considera que el estrés cuenta con propiedades adaptativas, dado que promueve el aprendizaje y habilidades de afrontamiento (Serino et al., 2014). Así pues, eventos estresantes capaces de provocar instigación emocional y cognitivo, pero no devastadores, podrían fomentar el manejo de factores estresantes más adelante (Ashokan, Sivasubramain y Mitra, 2016). Por tanto, la comparación es que un estrés incontrolable agudo o crónico induce un deterioro cognitivo a largo plazo, mientras que la exposición a eventos estresantes moderados y controlables con una respuesta adaptativa, parece actuar aumentando la eficacia de la respuesta a un estrés futuro (Meichenbaum y Cameron, 1989; Meichenbaum, 2007), como si de una respuesta inmunitaria se tratara. Pero a diferencia de una vacuna, el estrés inocuo no solo protege ante una sola enfermedad, sino que actúa fortaleciendo a nivel general al individuo, preparándolo para superar eventos adversos en el futuro, lo que conduce a la resiliencia (Crofton, Zhang y Green, 2016). Por ejemplo, adolescentes que han vivido momentos estresantes en sus vidas y han superado con éxito dichas adversidades cuentan con una mejor salud mental y son más capaces de enfrentarse a distintos eventos estresante en la vida adulta, como una enfermedad grave, la muerte de un familiar o un accidente (Khoshaba and Maddi, 1999; Lyons et al., 2009; Seery et al., 2013). Este proceso llamado como “inoculación de estrés” se ha descrito principalmente en estudios con primates y roedores (Ashokan, Sivasubramain y Mitra, 2016), pero desafortunadamente esta hipótesis está poco estudiada en la actualidad.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo será comprobar si la inoculación de estrés mediante derrota social puntual en la adolescencia, provoca un efecto sobre derrota

social repetida en la vida adulta, revirtiendo el efecto que este tipo de estrés repetido y a largo plazo induce sobre el efecto reforzante de la cocaína.

Material y método

Animales

En este estudio fueron utilizados un total de 45 ratones machos, 30 animales experimentales de la cepa C57BL/6 con un peso de aproximadamente 25 gr (rango 20-30) y 15 animales no experimentales de la cepa OF1 con un peso de 40 gr aproximadamente. La edad de los animales experimentales a su llegada al laboratorio fue día postnatal 21 días y se alojaron en grupos de 4 en jaulas de plástico (25cm x 25cm x 14.5cm), mientras que los ratones utilizados como residentes agresivos (no experimentales) se alojaron de forma individual en jaulas más grandes (21 x 32 x 20) para inducir mayores niveles de territorialidad. Las condiciones para todos los animales fueron: temperatura constante ($21^{\circ} \pm 2^{\circ}$), un horario de luz invertida (luces blancas encendidas de 19:30h a 7:30h) y alimentos y agua ad libitum, salvo durante el desarrollo de las pruebas conductuales.

Para reducir sus niveles de estrés debida a las manipulaciones experimentales, los ratones se sometieron a la técnica del manoseo o handling durante 5 minutos al día tres días previos de las pruebas.

La investigación fue aprobada por el Comité de cuidado y uso de animales de la Universidad de Valencia y se llevó a cabo bajo las leyes de regulación nacional, regionales y locales que cumplen con la Directiva 2010/63 UE.

Fármaco utilizado

Se utilizó cocaína (1mg/kg) y suero fisiológico (NaCl al 0,9%) para llevar a cabo el condicionamiento utilizando el paradigma de condicionamiento de preferencia de lugar inyectándose por vía intraperitoneal a los cuatro grupos experimentales utilizados ambas sustancias. La cocaína (1mg/kg) fue disuelta también en suero fisiológico (NaCl al 0,9%).

Aparatos

Para realizar el *condicionamiento de preferencia de lugar (CPL)* se utilizaron 16 cajas idénticas con dos compartimentos de igual tamaño (30,7 cm de largo x 31,5 cm de ancho x 34,5 cm de alto) separados por un área central de color gris (13,8 cm x 31,5 cm de ancho x 34,5 cm de alto). Cada compartimento tenía un color diferente (uno blanco y otro negro), al mismo tiempo que tenían distintas texturas (suelo fino en el compartimento negro y suelo rugoso en el compartimento blanco). Estas cajas registraban la posición de los animales en cada uno de los compartimentos y el tiempo que pasaban en ellos, así como los cruces de un compartimento a otro, gracias a 4 ordenadores PC IBM cuyo software es MONPRE 2Z (CIBERTEC, SA, España). Cada ordenador registraba la actividad de 4 cajas.

Para realizar *la inoculación de estrés y la derrota social repetida* se utilizaron las mismas jaulas en la que residían los ratones agresivos (21 x 32 x 20). Además, en la *derrota social repetida* se utilizaron unas rejillas de alambre que se acoplaban a las esquinas de las jaulas para separar a los ratones (intruso/experimental vs residente/no experimental) pero permitiendo los contactos agresivos. Por último, se utilizó una cámara para grabar todos los encuentros.

Procedimientos

1. Inoculación de estrés

Para inducir inoculación de estrés todos los animales fueron sometidos en el día postnatal 27 (adolescencia) a un encuentro agonístico con un animal agresivo/oponente durante 10 minutos en la misma jaula del residente. Todos ellos mostraron comportamientos de evitación, huida y sumisión después de sufrir las agresiones del residente agresivo según los criterios que definen estas conductas como se observa en estudios previos (García-Pardo et al., 2014, 2015; Ribeiro Do Couto et al., 2006, 2009; Rodríguez-Arias et al., 1998).

2. Derrota social repetida

Los animales experimentales fueron expuestos a un protocolo de derrota social repetida intermitente (en adelante DSR) en los días postnatales 47, 50, 53 y 56 (adulthood) durante cuatro episodios de 25 minutos cada uno y separados por intervalos de 72 horas (Tornatzky y Miczek, 1993, García-Pardo et al., 2015). Estos episodios están divididos

en 3 fases diferenciadas. La primera de ellas, consiste en introducir al animal experimental durante 10 minutos en la jaula del residente (el oponente agresivo) estando protegido por una malla de alambre de los ataques. Dicha malla permite las interacciones sociales y las amenazas típicas del animal, pero no el contacto físico. En la segunda fase, se retira la malla de alambre durante 5 minutos, comenzando la confrontación directa. Por último, en la tercera y última fase se vuelve a colocar la malla de alambre durante 10 minutos separando a los animales de nuevo, pero permitiendo las amenazas sociales por parte del residente y llevando a cabo el mismo procedimiento que en la primera fase. Cabe decir que los ratones experimentales fueron expuestos a un residente agresivo distinto en cada derrota social para evitar efectos idiosincrásicos. Respecto al grupo control, exploraron una jaula neutra durante 25 minutos, estableciendo tres fases diferenciadas al igual que en el grupo experimental, pero sin la presencia de un oponente agresivo.

En todos los casos el criterio que se utiliza para denominar a un animal como derrotado es la adopción de una posición sumisa vertical, patas delanteras flácidas, cabeza inclinada hacia arriba y orejas retraídas (Miczek et al., 1982; Rodríguez-Arias et al., 1998).

Todos los encuentros agonísticos fueron grabados en video con el propósito de confirmar la presencia de la derrota social. Después del protocolo de derrota social repetida los animales permanecieron estabulados en sus jaulas durante 3 semanas sin realizar ningún test para su posterior exposición al procedimiento de condicionamiento de preferencia de lugar.

3. Condicionamiento de preferencia del lugar

El condicionamiento de preferencia de lugar o CPL es un paradigma no sesgado en términos de preferencia inicial, siendo capaz de evaluar las propiedades gratificantes del sistema de recompensa (Moser et al., 2011; García-Pardo et al., 2015). Para llevarlo a cabo, los estímulos ambientales adquieren propiedades reforzantes (recompensa condicionada) cuando se combina con un reforzador primario (Aguilar et al., 2009; Tzschentke, 1998, 2007).

3.1.- Adquisición.

La adquisición del CPL se llevó a cabo en tres fases. En la primera fase, llamada Pre-Condicionamiento (Pre-C), se introduce a los animales por el área central de la caja de CPL y permanecen durante 900 segundos moviéndose libremente por ambos compartimentos (blanco/negro). Un ordenador registra el tiempo que permanecen en cada uno de ellos. Esta fase se lleva a cabo durante 3 días para que los animales se habitúen a las cajas del CPL y eliminar posibles sesgos de preferencia, tomándose como válidos los datos del tercer y último día. Cuando se analizan los datos, animales que pasan menos de 250s o más de 500s en el mismo compartimento se descartan por atribuirse una preferencia innata hacia un compartimento. En este estudio 5 animales fueron descartados y uno murió durante el experimento por factores desconocidos.

La segunda fase se corresponde con el Condicionamiento (C). En esta fase se colocan las barreras que separan ambos compartimentos para que el animal no pueda cruzar entre ellos. Los animales son condicionados con cocaína inmediatamente antes de ser introducidos en el compartimento asociado con la droga durante 30 min por 4 días consecutivos y reciben salino en el compartimento no asociado a la droga durante los mismos días, pero tras un intervalo de 4 horas contrabalanceando cada día si la primera sustancia administrada era vehículo o cocaína.

Por último, la tercera fase del CPL es el Post-Condicionamiento (Post-C). Esta fase se realizó a las 24 horas del último día del condicionamiento siguiendo la misma metodología que el Pre-C y evaluando el tiempo pasado en cada compartimento de nuevo.

Diseño experimental

Para evaluar el efecto de la inoculación de estrés sobre el efecto reforzante de la cocaína tras sufrir derrota social en la vida adulta 2 grupos de animales fueron utilizados en función del tratamiento recibido (Tabla 1). En primer lugar, todos los animales recibieron en el día postnatal 27 la inoculación de estrés durante 10 minutos. A las 3 semanas, al grupo 1 (IN+DSR) se les provocó la DSR en los días postnatales 47, 50, 53 y 56, mientras que el grupo 2 (IN+EXPL) exploraron las jaulas sin oponente agresivo. Por último, otras 3 semanas después, todos los animales iniciaron el condicionamiento de preferencia de lugar con una dosis de 1mg/kg de cocaína en los días postnatales 77-86. A continuación, en la Tabla 2 y Tabla 3 se observa el diseño experimental.

Análisis estadísticos

El tiempo pasado en el compartimento asociado a la droga durante el Pre-C y Post-C fue analizado utilizando ANOVA mixto con una variable entre: “tratamiento”, con dos niveles (DSR y EXPL) y una variable intra “Días”, con dos niveles (Pre-C y Post-C). El análisis de los datos obtenidos se llevó a cabo mediante el programa estadístico SPSS versión 23.

Resultados

Experimento 1: Efecto de la inoculación de estrés sobre el efecto reforzante de la cocaína tras sufrir derrota social en la vida adulta

Se observó un efecto no significativo tanto para la variable “Días” [F (1,22)=0,023, p=0,881] como para la variable “Tratamiento” [F (1,22)=0,208, p=0.653]. Respecto la interacción entre los Días y el Tratamiento los datos mostraron que dicha interacción tampoco fue significativa [F(1,22)=0,572, p=0,458] (Figura 1).

Figura 1. Efectos de la inoculación de estrés y la DRS sobre el CPL inducido por cocaína.

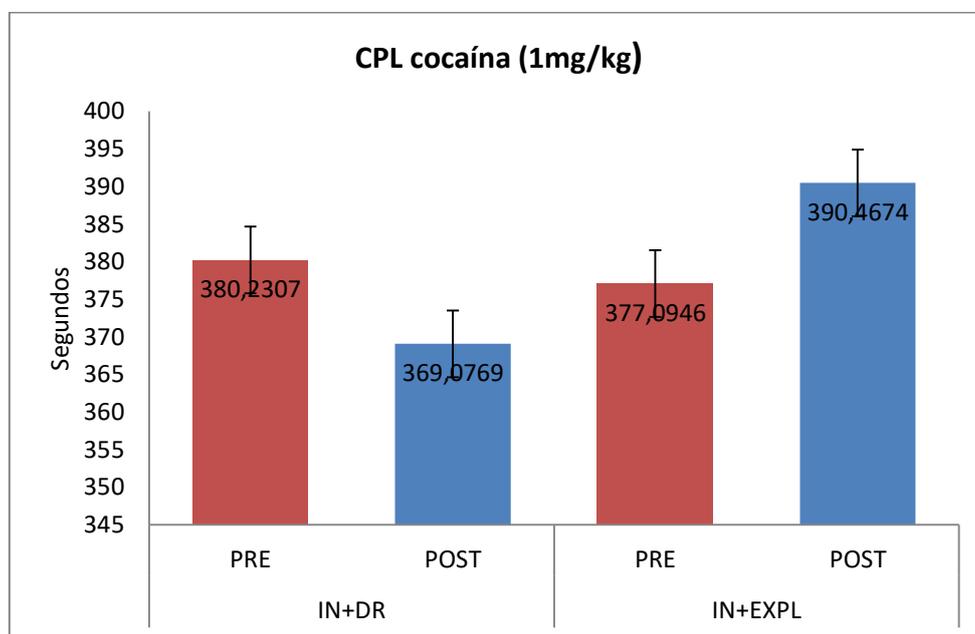


Figura 1. Efectos de la inoculación de estrés sobre el efecto reforzante de la cocaína tras sufrir derrota social en la adultez. Los animales fueron divididos en dos grupos de la siguiente manera: grupo 1 (IN+DSR) y grupo 2 (IN+EXPL), estando condicionados con 1mg/kg de cocaína en el CPL. Las barras representan el tiempo (en segundos) que

se pasa en el compartimento emparejado con la droga en la sesión del Pre-C (barras rojas) y Post-C (barras azules).

Discusión

En este estudio se ha demostrado por primera vez que la inoculación de estrés en la adolescencia revierte los efectos de la derrota social sobre los efectos reforzantes de la cocaína utilizando el paradigma de CPL en ratones macho. En consonancia con estos resultados, otros estudios han utilizado multitud de tipos de eventos estresantes para probar la inoculación de estrés. Por ejemplo, en una investigación se utilizó el footshock (estrés físico) en ratas infantiles para confirmar que la inoculación de estrés mejora el funcionamiento adaptativo en la adultez (Cameron et al., 2005) y Lyons et al., (2009, 2010) afirman que monos ardilla y roedores expuestos a un estrés controlable en la etapa temprana de la vida son menos reactivos al estrés en el futuro. Parker, Buckmaster y Lyons (2004) utilizaron la separación materna intermitente (estresor social) en la primera infancia para afirmar que los monos ardilla mejoraron su funcionamiento adaptativo al estrés en aspectos cognitivos, motivacionales y socioemocionales. En otra investigación, Denenberg (1999) concluyó que la separación materna en roedores infantiles promueve características resilientes en la adultez. Y más recientemente, Brockhusrt et al., (2015) demostraron que una derrota social leve en ratones macho desencadenó en la edad adulta respuestas emocionales más estables y menor síntomas depresivos, con un aumento en el comportamiento exploratorio. Sin embargo, el efecto de la inoculación de estrés para revertir el efecto reforzante que provocan las drogas tras la derrota social repetida es todavía desconocido.

Estudios previos en nuestro laboratorio confirman que la derrota social repetida modifica los efectos reforzantes de las drogas (García-Pardo et al., 2015) y en concreto que este tipo de situación estresante aumenta los efectos reforzantes de la cocaína a largo plazo utilizando el paradigma de CPL (Montagud-Romero et al., 2015). Así, el resultado más importante de este experimento ha sido demostrar por primera vez que la inoculación de estrés revierte los efectos del estrés social repetido utilizando el paradigma intruso/residente en la posterior respuesta desadaptativa a la cocaína, dado que los animales de este estudio no mostraron adquisición de CPL tras la administración de 1mg/kg – dosis que provoca CPL en animales adultos previamente expuestos a DSR (Montagud-Romero et al., 2015).

Una posible explicación para estos resultados podría basarse en los estudios de Brockhurst et al., (2015) donde explican que exponerse a situaciones estresantes en etapas tempranas de la vida es una oportunidad para aprender a gestionar adversidades, como si de un entrenamiento se tratara ya que la participación en situaciones desafiantes estimularía la adaptación en aspectos cognitivos, motivacionales y socioemocionales - sosteniéndose que las etapas tempranas de la vida contribuyen a desarrollar la resiliencia en la vida posterior. Por otro lado, atendiendo a una visión reduccionista, estudios previos sobre inoculación de estrés muestran una terminación más temprana de la secreción de la hormona del estrés, mientras que con el estrés crónico sería lo contrario (Ashokan, Sivasubramain y Mitra, 2016). Por ejemplo, en el estudio de Joels, Sarabdjitsingh y Karst (2012) demostraron que la separación materna repetida (estresor social) en las crías de rata produce una menor expresión de los receptores de glucocorticoides (GR) en el hipocampo cuando estas crías alcanzan la edad adulta. Los receptores de glucocorticoides del hipocampo se unen a la corticosterona circulante (CORT) (hormona secretada por las glándulas suprarrenales) y envían retroalimentación negativa al eje HPA (Ashokan, Sivasubramain y Mitra, 2016). Esta mejor respuesta al estrés posiblemente actuaría en el sistema de adicción, ya que sabemos que muestran una estrecha relación (Rodríguez-Arias et al., 2013) y, quizá por eso observamos en nuestro trabajo que el efecto reforzante de la cocaína es menor. Sin embargo, no hay investigaciones en la literatura que relacionen los cambios neurobiológicos de la inoculación de estrés con el menor efecto reforzante de la cocaína en el sistema de refuerzo y en este estudio tampoco se han tenido en cuenta los posibles cambios a nivel cerebral que pudieran explicar nuestros resultados. Se espera que investigaciones futuras proporcionen nuevos conocimientos sobre esta línea y esclarezcan dichos mecanismos biológicos.

A pesar de los óptimos resultados obtenidos y de la novedad de este estudio, existen algunas limitaciones. Por ejemplo, en el estudio de Montagud-Romero et al., (2015) mencionado con el que comparamos nuestros resultados ya que se basa en los mismos paradigmas, utilizaron la cepa de ratones OF1, mientras que en este estudio se utilizó la cepa C57BL/6 por lo que los resultados no pueden ser comparados con totalidad para afirmar que la inoculación de estrés revierte el efecto de la derrota social sobre el poder reforzante de la cocaína. Sin embargo, se está trabajando actualmente en nuestro laboratorio en esta misma línea con animales C57BL/6 tratados sin inoculación

de estrés y con DSR en la vida adulta y los resultados preliminares muestran una tendencia similar observándose un condicionamiento de los animales que han sido expuestos a DSR sin inoculación de estrés apoyando nuestra hipótesis. También apoya nuestra hipótesis el hecho de que los grupos controles – sin inoculación de estrés ni DSR- pero condicionados con cocaína no se condicionaron (Aguilar et al., 2013). Otra limitación en esta investigación es que los resultados dados pueden ser comparados en mujeres, dado que existen diferencias en la respuesta hormonal de las mismas que podrían interferir con la variable estrés (Ashokan, Sivasubramain y Mitra, 2016) y la variable sexo no es considerada en el estudio.

Por otra parte, como líneas de investigación futuras, en nuestro laboratorio se está trabajando sí la inoculación de estrés provocado por otro tipo de estresor diferente (por ejemplo, un estrés físico como la inmovilización) modifica de igual modo el efecto reforzante de la cocaína tras derrota social, con el objetivo de conocer si la respuesta del sistema de estrés es igual para diferentes estresores y sus efectos sobre el poder reforzante de las drogas se modifica. Además, sería interesante utilizar otras drogas de abuso (por ejemplo, 3,4- metilendioximetanfetamina – MDMA) para comprobar si la inoculación de estrés revierte el efecto de la derrota social sobre el efecto reforzante solo de la cocaína o también de otras sustancias. Así, otros trabajos han mostrado que la derrota social modifica también el efecto reforzante del éxtasis (García-Pardo et al., 2014; 2015).

Por último, los resultados de esta investigación podrían trasladarse a la práctica clínica con nuevas estrategias preventivas o tratamientos terapéuticos para trastornos en seres humanos desencadenados o exacerbados por eventos estresantes. El entrenamiento de inoculación de estrés refleja un proceso similar a la experiencia de aprendizaje que se asemeja a las intervenciones diseñadas para desarrollar la resiliencia en los seres humanos (Brockhurst et al., 2015), por lo que estaría ideado para generar y desarrollar habilidades de afrontamiento; consiguiéndose a través de la exposición a eventos estresantes.

En conclusión, el presente estudio demuestra por primera vez que la inoculación de estrés revierte el efecto reforzante de la cocaína en la vida adulta tras un estresor social (derrota social repetida). A pesar de que es necesaria mucha más investigación en este campo, tal vez la inoculación de estrés podría servir como entrenamiento para desarrollar la resiliencia. Los resultados de nuestro experimento confirman la hipótesis

planteada al inicio de este estudio. Por último, este conocimiento podría servir para plantear estrategias de prevención e instaurarlas en los colegios e institutos.

Referencias

- Ahmed, SM., Hershberger, PJ. y Lemkau, JP. (2016). Psychosocial influences on health. *Textbook of Family Medicine*. 9th ed. Philadelphia, PA: Elsevier
- Alquezar, A., Mateo, M., De Diego, E. y Agra, I. (2015). Consideraciones sobre las asistencias urgentes a consumidores de cocaína en España. *Medicina Clínica*, 145, 228
- American Psychiatric Association (2013). *DSM-5. Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales*. Barcelona: Masson
- Andrews, J., Tildesley, E., Hops, H. y Fuzhong, L. (2002). The influence of peers on young adult substance use. *Health Psychology*, 21, 349-357.
- Aguilar, M. A., Rodríguez-Arias, M., y Miñarro, J. (2009). Neurobiological mechanisms of the reinstatement of drug-conditioned place preference. *Brain Research Review*, 59 (2), 253-277.
- Aguilar, M.A., García-Pardo, MP., Montagud-Romero, S., Miñarro, J., Do Couto, BR. (2013). Impact of social stress in addiction to psychostimulants: what we know from animal models. *Current Pharmaceutical Design*, 19, 7009-25.
- Ashokan, A., Sivasubramanian, M. y Mitra, R. (2016). Seeding Stress Resiliencie through Inoculacion. *Neural Plasticity*, Article ID 4928081
- Bale, T. L., y Vale, W. W. (2004). CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annuals Reviews Pharmacology Toxicology*, 44, 525-557.
- Becoña, I. y Cortés, T. (Eds.) (2010). *Manual de adicciones para psicólogos especialistas en psicología clínica en formación*. Barcelona, España: Editorial Socidrogalcohol
- Bessa, M.A., Boarati, MA, Scivoletto, S. (2011). Crianças e adolescentes. In: Diehl AE, Cordeiro DC, Laranjeira R, organizadores. *Dependência química: prevenção, tratamento e políticas públicas*. Porto Alegre: Artmed, 359-75.
- Brady, K. T., y Sinha, R. (2005). Co-occurring mental and substance use disorders: the neurobiological effects of chronic stress. *American Journal Psychiatry*, 162 (8), 1483-1493.

- Brady, K. T., Dansky, B. S., Sonne, S. C., y Saladin, M. E. (1998). Posttraumatic stress disorder and cocaine dependence. Order of onset. *American Journal on Addiction*, 7 (2), 128-135.
- Brockhurst, J., Cheleuitte-Nieves, C., Buckmaster, C. L., Schatzberg, A. F., y Lyons, D. M. (2015). "Stress inoculation modeled in mice," *Translational Psychiatry*, 5, 3-2.
- Buffalari, D. M. y See, R. E. (2011). Inactivation of the bed nucleus of the stria terminalis in an animal model of relapse: effects on conditioned cue-induced reinstatement and its enhancement by yohimbine. *Psychopharmacology*, 213 (1), 19-27.
- Burke, AR. y Miczek, KA. (2014). Stress in adolescence and drugs of abuse in rodent models: Role of dopamine, CRF, and HPA axis. *Psychopharmacology*, 231, 1557–1580.
- Calvete, E. y Estévez, A. (2009). Consumo de drogas en adolescents: El papel del estrés, la impulsividad y los esquemas relacionados con la falta de límites. *Adicciones*, 21(1), 49-56.
- Denenberg, V. H. (1999). "Commentary: is maternal stimulation the mediator of the handling effect in infancy?" *Developmental Psychobiology*, 34 (1), 1–3,
- Dienstbier, R.A. (1989). Arousal and physiological toughness: implications for mental and physical health. *Psychology Review*, 96, 84–100.
- Doremus-Fitzwater T.L., Varlinskaya, E.I., Spear, L.P. (2010). Motivational systems in adolescence: possible implications for age differences in substance abuse and other risk-taking behaviors. *Brain and Cognition*. 72, 114–123.
- Cameron, N. M., Champagne, F. A., Parent, C., Fish, E. W., Ozaki-Kuroda, K. y Meaney, M. J. (2005). "The programming of individual differences in defensive responses and reproductive strategies in the rat through variations in maternal care," *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29 (4), 843–865.
- Casey, BJ., Jones, RM. y Hare, TA (2008). The adolescent brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1124, 111-26.
- Crofton, EJ., Zhang, Y. y Green, TA. (2016). Inoculation Stress Hypothesis of Environmental Enrichment, *Neuroscience Biobehaviour*, 0, 19-31.
- Covington, H. E., y Miczek, K. A. (2001). Repeated social-defeat stress, cocaine or morphine. Effects on behavioral sensitization and intravenous cocaine self-administration "binges". *Psychopharmacology*, 158 (4), 388-398.

- Eaton, D.K., Kann, L., Kinchen, S., Shanklin, S, Flint, K.H. y Hawkins, J. (2012). Youth risk behavior surveillance – United States. *MMWR Surveillance Summ* 61, 1–162.
- Enriquez-Villota, M. F., Garzón-Velásquez, F., Acosta, A. L., y Pantoja-Parreño, E. I. (2016). Estrés y ciclo vital. *Revista de Psicología GEPU*, 7 (2), 91-114.
- Erikson, E. (1977). *Identidad, juventud y crisis*. Buenos Aires. Paidós
- Everitt, B.J. (2014). Neural and psychological mechanisms underlying compulsive drug seeking habits and drug memories—indications for novel treatments of addiction. *European Journal Neuroscience*, 40, 2163–82.
- Fernández-Arias, M.J. y Marín-Sanabria, V. (2018). La educación para la salud en la adolescencia temprana para afrontar los cambios físicos y emocionales. *Revista de Enfermería*, 1
- Fox, C., Merali, Z. y Harrison, C. (2006). Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. *Behavioural Brain Research*, 175, 1–8.
- Garciga, O., Surí, T. y Rodríguez, J. (2015). Consumo de drogas legales y estilo de vida en estudiantes de medicina. *Revista Cubana de Salud Pública*, 41(1), 4-17.
- García-Pardo, M.P., Escobar-Valero, C., Rodríguez-Arias, M., Miñarro, J. y Aguilar, M.A. (2015). Involvement of NMDA glutamate receptors in the acquisition and reinstatement of the conditioned place preference induced by MDMA. *Behavioural Pharmacology*, 26, 411-417.
- García-Pardo, MP., Rodríguez-Arias, M., Maldonado, C., Manzanedo, C., Miñarro, J. y Aguilar, MA. (2014). Effects of acute social stress on the conditioned place preference induced by MDMA in adolescent and adult mice. *Behavioural Pharmacology*, 25, 532-46.
- González, L., Tumuluru, S., González-Torres, M. y Gaviria, M. (2015). Cocaína: una revisión de la adicción y el tratamiento. *Revista de la Asociación Española de Neuropsiquiatría*, 35 (127), 555-571
- Harris, BN. y Saltzman. W. (2013). Effect of reproductive status on hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) activity and reactivity in male California mice (*Peromyscus californicus*). *Physiology Behavior*, 112-113, 70-6
- Hay, I. y Ashman, A.F. (2003). The development of adolescents emotional stability and general self-concept: The interplay of parent, peers, and gender. *International Journal of Disability, Development and Education*, 50, 77-91

- Herman, JP., McKlveen, JM., Solomon, MB, Carvalho-Netto, E., Myers, B. Braz J. (2012). Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanisms. *Medical and Biological Research*, 45, 292-8
- Informe de encuesta. Ministerio de Sanidad y consumo, editor. Encuesta Domiciliaria sobre Alcohol y Drogas en España (EDADES); 2018; España.
- Joels, M., Sarabdijitsingh, RA. y Karst, H. (2012). Unraveling the time domains of corticosteroid hormone influences on brain activity: rapid, slow and chronic modes. *Pharmacological Reviews*, 64, 901-938.
- Khoshaba, D.M. y Maddi, S.R. (1999). Early Experiences in Hardiness Development. *Consulting Psychology Journal, Practice and Research*, 51, 106–116.
- Koob, GF. (2009). Brain stress systems in the amygdala and addiction. *Brain Research*, 1293, 61-75.
- Koob, G. F. (2010). The role of CRF and CRF-related peptides in the dark side of addiction. *Brain Research*, 1314, 3-14.
- Koob, G.F. (2013). Negative reinforcement in drug addiction: the darkness within. *Current Opinion Neurobiology*, 23, 559–63.
- Koob, G., y Kreek, M. J. (2007). Stress, dysregulation of drug reward pathways, and the transition to drug dependence, *American Journal of Psychiatry*, 164 (8), 1149-1159.
- Koob, G. F., y Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*, 35 (1), 217-238.
- Logrip, M. L., Zorrilla, E. P., y Koob, G. F. (2012). Stress modulation of drug self-administration: implications for addiction comorbidity with post-traumatic stress disorder. *Neuropharmacology*, 62 (2), 552-564.
- Lu, L., Shepard, J. D., Hall, F. S., y Shaham, Y. (2003). Effect of environmental stressors on opiate and psychostimulant reinforcement, reinstatement and discrimination in rats: a review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27 (5), 457-491.
- Lydon, D.M., Wilson, S.J., Child, A. y Geier, C.F. (2014). Adolescent brain maturation and smoking: what we know and where we're headed. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 45, 323-42
- Lyons, D.M., Parker, K..J., Katz, M. y Schatzberg, A.F. (2009). Developmental cascades linking stress inoculation, arousal regulation, and resilience. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 3, 32.

- Lyons, D.M., Parker, KJ y Schatzberg, A.F. (2010). Animal models of early life stress: Implications for understanding resilience. *Developmental psychobiology*, 52, 402-410.
- 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. *Behavioral Brain Research*, 121 (1-2), 189-197.
- Manzanedo, C., García-Pardo., M, Rodríguez-Arías, M., Miñarro, J. y Aguilar, MA. (2012). Pre-treatment with high doses of cocaine decreases the reinforcing effects of cocaine in the conditioned place preference paradigm. *Elsevier*, 516 (1), 29-33.
- McLaughlin, J. P., Marton-Popovici, M., y Chavkin, C. (2003). Kappa opioid receptor antagonism and prodynorphin gene disruption block stress-induced behavioral responses. *Journal of Neuroscience*, 23 (13), 5674-5683.
- Meichenbaum, D. (2007). Stress Inoculation Training: A Preventative and Treatment Approach. In: Lehrer, PM.; Woolfolk, RL.; Sime, WS., editors. Principles and Practice of Stress Management. 3. Guilford Press
- Meichenbaum. D. y Cameron, R. (1989). "Stress inoculation training," in Stress Reduction and Prevention, D. Meichenbaum and M. Jaremko, Eds., 115–154, Springer, New York, NY, USA
- Miczek, K. A., Thompson, M. L., y Shuster, L. (1982). Opioid-like analgesia in defeated mice. *Science*, 215 (4539), 1520-1522.
- 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 (2), 102-128.
- Montagud, R., Aguilar, MA., Maldonado, C., Manzanedo, C., Miñarro, M y Rodríguez-Arias. (2015). Acute social defeat stress increases the conditioned rewarding effects of cocaine in adult but not in adolescent mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 135, 1-12.
- Moscoso, M. S. y Reheiser, E. C (2010). Construct validity of the Emotional Distress Inventory in patients with cancer. *Ansiedad y Estrés*, 16 (1), 83-94.
- Moser, P., Wolinsky, T., Duxon, M., y Porsolt, R. D. (2011). How good are current approaches to nonclinical evaluation of abuse and dependence? *Journal Pharmacology Experimental Therapeutics*, 336 (3), 588-595.

- Nadal, R. (2008). La búsqueda de sensaciones y su relación con la vulnerabilidad a la adicción y al estrés. *Adicciones*, 20, 59-72.
- Naranjo, P. (2009). Una revisión teórica sobre el estrés y algunos aspectos relevantes de este ámbito educativo. *Revista Educación*, 33 (2), 171-190.
- Neisewander, J.L., Peartree, N.A. y Pentkowski, N.S. (2012). Emotional valence and context of social influences on drug abuse-related behavior in animal models of social stress and prosocial interaction. *Psychopharmacology*, 224, 33–56.
- Newman, E. L., Leonard, M. Z., Arena, D. T., de Almeida, R., y Miczek, K. A. (2018). Social defeat stress and escalation of cocaine and alcohol consumption: Focus on CRF. *Neurobiology of stress*, 9, 151–165.
- Pacak, K, y Palkovits, M. (2001). Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocrine Reviews*, 22, 502-48.
- Parker, K..J., Buckmaster, C. L., Schatzberg, A. F., y Lyons, D. M. (2004). “Prospective investigation of stress inoculation in young monkeys,” *Archives of General Psychiatry*, 61 (9), 933–941.
- Parker, KJ. Y Maestripieri, D. (2011). Identifying key features of early stressful experiences that produce stress vulnerability and resilience in primates. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35, 1466–1483.
- Portela, A.L., Franca, L. y Goldim, J.R. (2015). Vulnerable adolescence: biopsychosocial factors related to the use of drugs in adolescence. *Revista bioética*, 23, 308-16.
- Protas, J., Cidade, C. y Fernandes, M. (2006). Vulnerabilidade e consentimento informado em pesquisa. Porto Alegre: UFRGS. Disponible en: <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/68466>
- Ribeiro Do Couto, B., Aguilar, M. A., Manzanedo, C., Rodríguez-Arias, M., Armario, A., y Miñarro, J. (2006). Social stress is as effective as physical stress in reinstating morphine-induced place preference in mice. *Psychopharmacology*, 185 (4), 459-470.
- Ribeiro Do Couto, B., Aguilar, M. A., Lluch, J., Rodríguez-Arias, M., y Miñarro, J. (2009). Social experiences affect reinstatement of cocaine-induced place preference in mice. *Psychopharmacology*, 207 (3), 485-498.

- Robbins, T. W. (1978). The acquisition of responding with conditioned reinforcement: effects of pipradrol, methylphenidate, d-amphetamine, and nomifensine. *Psychopharmacology*, 58 (1), 79-87.
- Rodríguez-Arias, M., García-Pardo, MP., Montagud-Romero, S., Miñarro, J. y Aguilar, MA. (2013). The role of stress in psychostimulant addiction: Treatment approaches based on animal models. *Drug Use and Abuse: Signs/Symptoms, Physical and Psychological Effects and Intervention Approaches*, 153-220.
- Rodríguez-Arias, M. y Aguilar, M.A. (2012). Polydrug use in adolescence. In: Belin D, editor. Addictions – from pathophysiology to treatment. *InTechOpen*, 227–258.
- Rodríguez-Arias, M., Miñarro, J., Aguilar, M. A., Pinazo, J., y Simón, V. M. (1998). Effects of risperidone and SCH 23390 on isolation-induced aggression in male mice. *European Neuropsychopharmacology*, 8 (2), 95-103.
- Rodríguez-Arias, M., Valverde, O., Daza-Losada, M., Blanco-Gandía, MC., Aguilar, MA. y Miñarro, J. (2013). Assessment of the abuse potential of MDMA in the conditioned place preference paradigm: role of CB1 receptors. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*. 47, 77-84.
- Rutter, M. (2006). Implications of resilience concepts for scientific understanding. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1094, 1–12.
- Schneider, M. (2008). Puberty as a highly vulnerable developmental period for the consequences of cannabis exposure. *Addiction Biology* 13, 253–263.
- Seery, M.D., Leo, R.J., Lupien, .S.P., Kondrak CL. y Almonte JL. (2013). An upside to adversity?: moderate cumulative lifetime adversity is associated with resilient responses in the face of controlled stressors. *Psychological science*, 24, 1181–1189.
- Serino, S., Triberti, S., Villani, D., Cipresso, P., Gaggioli, A. y Riva, G. (2014). Toward a validation of cyber-interventions for stress disorders based on stress inoculation training: a systematic review. *Virtual Reality* 18, 73–87.
- Selye, H. (1975). *Stress Without Distress*. Penguin Group. Canada.
- Shalev, U., Erb, S., y Shaham, Y. (2010). Y. Role of CRF and other neuropeptides in stress-induced reinstatement of drug seeking. *Brain Research*, 1314, 15-28.
- Shaham, Y., Erb, S., y Stewart, J. (2000). Stress-induced relapse to heroin and cocaine seeking in rats. *Brain Research Reviews*, 33 (1), 13-33.

- Sinha, R. (2001). How does stress increase risk of drug abuse and relapse? *Psychopharmacology*, 158 (4), 343-359.
- Sinha, R. (2008). Chronic stress, drug use, and vulnerability to addiction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1141, 105-130.
- Sinha, R., Garcia, M., Paliwal, P., Kreek, M. J., y Rounsaville, B. J. (2006). Stress-induced cocaine craving and hypothalamic-pituitary-adrenal responses are predictive of cocaine relapse outcomes. *Archives of General Psychiatry*, 63 (3), 324-331.
- Spear, L.P. (2011a). Rewards, aversions and affect in adolescence: emerging convergences across laboratory animal and human data. *Developmental Cognitive Neuroscience*, 1, 390-403.
- Spear, L.P. (2011b). Adolescent neurobehavioral characteristics, alcohol sensitivities, and intake: setting the stage for alcohol use disorders? *Child Development Perspectives*, 5, 231-238.
- Sturman, D.A. y Moghaddam, B. (2011). The neurobiology of adolescence: changes in brain architecture, functional dynamics, and behavioral tendencies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 55, 1704-1712.
- Tornatzky, W., y Miczek, K. A. (1993). Long-term impairment of autonomic circadian rhythms after brief intermittent social stress. *Physiology and Behavior*, 53 (5), 983-993.
- Tzschentke, T. M. (1998). Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Programme Neurobiology*, 56 (6), 613-672.
- Tzschentke, T. M. (2007). Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addiction Biology*, 12 (3-4), 227-462.
- Wang, B., Shaham, Y., Zitzman, D., Azari, S., Wise, RA. y You, ZB. (2005). Cocaine experience establishes control of midbrain glutamate and dopamine by corticotropin-releasing factor: a role in stress-induced relapse to drug seeking. *Journal Neuroscience*. 25, 5389-96.
- Wise, RA. (2009). Ventral tegmental glutamate: a role in stress-, cue-, and cocaine-induced reinstatement of cocaine-seeking. *Neuropharmacology*. 56, 174-6.