



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUIMICOFARMACOBIOLOGÍA

TESIS

**“ALTERACIONES DE CONDUCTA Y RESPUESTA
NEUROINMUNE EN CÉLULAS MICROGLIALES
EN RATAS HEMBRA ADULTAS EXPUESTAS
NEONATALMENTE A UN DOBLE RETO ESTRÉS –
INMUNE”**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
LICENCIADA EN QUIMICOFARMACOBIOLOGÍA**

**PRESENTA:
MARTHA GUADALUPE HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ**

**ASESOR DE TESIS
Doctor en ciencias: LUIS MIGUEL SAAVEDRA PIMENTEL**

MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO.

FEBRERO-2022



Agradecimientos

Al Dr. Luis Miguel Saavedra Pimentel cuya dedicación en este trabajo y apoyo fueron fundamentales para la realización de esta tesis en todo momento, gracias por aceptar ser mi asesor.

A mi comité revisor de tesis, agradezco su valioso tiempo e importantes observaciones y sugerencias en este trabajo de tesis.

Igualmente agradezco a mis compañeros del CIBIMI, gracias por todos esos consejos y enseñanzas en el laboratorio.

A mi familia y amigos en Morelia por su amor, por aguantar mis días difíciles, gracias por su calidez y apoyo.

Esta tesis es gracias a ustedes.

DEDICATORIA

A mi mamá y hermanos, porque a pesar de la distancia siempre son mi más grande apoyo en todo momento. Gracias madre por confiar y creer en mí, por los consejos, valores y principios que me has inculcado; por enseñarme a hacerle frente a la vida, con ese amor que sólo tu inspiras.

Son “mi motor de sueños”, motivándome a seguir y seguir. Son ustedes mi más grande orgullo e inspiración.

ÍNDICE GENERAL

I.- INTRODUCCIÓN	1
II.- MARCO TEÓRICO	2
2.1.- Respuesta general al estrés	2
2.2.- Activación del eje HPA	2
2.3.- Diferencias en la activación del eje HPA debidas al sexo	3
2.4.- El estrés en la infancia.	4
2.5.- Diferencias en la respuesta al estrés de acuerdo al sexo.	5
2.6.- Modelo de separación materna temprana en ratas	6
2.7.- Infecciones en etapas tempranas	6
2.8.- Relación estrés- sistema inmune	7
2.9.- Respuesta neuroinmune	8
2.10.- Células gliales	9
2.11.- Respuesta microglial al estrés y otros insultos	10
III.- ANTECEDENTES DIRECTOS	12
IV. JUSTIFICACIÓN	13
V.- HIPÓTESIS	14
VI. OBJETIVO GENERAL	14
6.1.- Objetivos específicos	14
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	14
7.1.- Animales	14
7.2.- Separación materna.	15
7.3.- Inyección de LPS	15
7.4.- Frotis vaginales	15
7.5.- Diseño experimental	15
7.6.- Prueba de laberinto elevado en forma de cruz	17
7.7.- Prueba de nado forzado.	19
7.8.- Procesamiento del tejido cerebral.	20
7.9.- Inmunohistoquímica	20
7.10.- Cuantificación celular	21
VIII.- RESULTADOS	21
8.1.- Evaluación de la conducta de ansiedad	21
8.1.1.- Prueba de laberinto elevado en cruz.	21
8.1.2.- Prueba de campo abierto	23
8.2.- Evaluación de la conducta tipo depresiva	24

8.2.1.- Prueba de nado forzado	24
8.3.- Análisis morfológico y densidad de la microglía	26
IX. DISCUSIÓN.....	31
X. CONCLUSIÓN	37
XI. REFERENCIAS.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema experimental.....	16
Figura 2. Esquema del laberinto elevado en forma de cruz.....	17
Figura 3. Esquema del campo abierto.....	18
Figura 4. Esquema de la prueba de nado forzado.....	19
Figura 5. Porcentaje de tiempo en el brazo abierto.....	22
Figura 6. Porcentaje de entradas al brazo abierto	22
Figura 7. Número de cruces al centro.....	23
Figura 8. Número de cruces totales.....	24
Figura 10. Tiempo de flotación.....	25
Figura 11. Latencia de flotación.....	25
Figura 12. Análisis de la densidad total y % de activación de las células microgliales en la zona <i>Hilus</i> del hipocampo.....	27
Figura 13. Análisis de la densidad total y % de activación de las células microgliales en la zona CA3 del hipocampo.....	28
Figura 14. Fotomicrografías de las células microgliales en la zona del del <i>Hilus</i> hipocampo.....	29
Figura 15. Fotomicrografías de las células microgliales en la zona CA3 del hipocampo.....	30

RESUMEN

La separación materna y la exposición a infecciones en etapas tempranas, son factores estresantes que predisponen al individuo a presentar alteraciones en la conducta, tales como la ansiedad y la depresión. Sin embargo, se sabe poco acerca de cómo el estrés inducido por dos factores como la separación materna y el simulador de una infección, a través de lipopolisacáridos (LPS), pueden alterar el desarrollo normal cerebral durante las etapas tempranas de la vida e inducir una mayor vulnerabilidad a psicopatologías. En los humanos un predictor importante de la susceptibilidad de un individuo es su sexo, las mujeres muestran tasas más altas de ansiedad y depresión.

Analizamos si las ratas hembra adultas expuestas a un doble reto estrés - inmune en la etapa neonatal presentan alteraciones en las conductas tipo ansiosa y depresiva, así como en la respuesta neuroinmune de las células microgliales en las zonas *Hilus* y CA3 del hipocampo. Se utilizaron cuatro grupos de ratas hembra Sprague Dawley adultas: un grupo control formado por crías sin molestar (CONT-VEH), un grupo sometido a separación materna (SM, 3 h/ día, 1-14 días posnatales), un grupo al cual se le inyectó lipopolisacárido (LPS, 0.5 mg/kg) en el día posnatal (PN)14 y un grupo sometido al doble reto SM-LPS. Todos los grupos fueron destetados al día posnatal 21 y permanecieron en el bioterio hasta llevar a cabo las pruebas de conducta. A los 5 meses de edad, las ratas fueron sometidas a las pruebas de campo abierto (OFT), laberinto elevado en cruz (EPM) y nado forzado (FST). Después de las pruebas de conducta las ratas fueron sacrificadas y los cerebros fueron recolectados para su posterior tratamiento. Finalmente se realizaron inmunohistoquímicas con el anticuerpo anti-Iba1, específico para microglía. Posteriormente se realizó un conteo de la densidad y la activación de las células microgliales en el hipocampo en las áreas de *Hilus* y CA3, mediante un análisis morfológico de estas células.

La separación materna provocó un incremento en las conductas de ansiedad y tipo depresiva en las ratas adultas. Las ratas expuestas sólo al LPS presentaron una mayor conducta de ansiedad; sin embargo, en el grupo SM-LPS, la conducta de ansiedad mostró una atenuación por el efecto de la SM. El LPS no causó una conducta tipo depresiva en las ratas; pero, sí propició una mayor activación y una menor densidad de microglía en ambas zonas analizadas, *Hilus* y CA3; por su parte, la SM, sólo indujo una mayor activación en la zona del *Hilus*.

Palabras clave: Depresión, ansiedad, separación materna, LPS, hipocampo.

Abstract

Materna separation and exposure to early-stage infections are stressors that predispose the individual to behavioral disturbances, such as anxiety and depression. However, little is known about how stress induced by two factors such as maternal separation and the simulator of an infection, through lipopolysaccharides (LPS), can alter normal brain development during early life and induce greater vulnerability to psychopathologies. In humans an important predictor of an individual's susceptibility is their sex, women show higher rates of anxiety and depression.

We analyzed whether adult female rats exposed to a double stress-immune challenge in the neonatal stage show alterations in anxious and depressive behaviors, as well as in the neuroimmune response of microglial cells in the Hilus and CA3 areas of the hippocampus. Four groups of adult female Sprague Dawley rats were used: a control group consisting of undisturbed pups (CONT-VEH), a group subjected to maternal separation (SM, 3 h / day, 1-14 days postnatal), a group in which Lipopolysaccharide (LPS, 0.5 mg / kg) was injected on postnatal day (PN) 14 and a group subjected to the double SM-LPS challenge. All groups were weaned on postnatal day 21 and remained in the animal house until conducting behavioral tests. At 5 months of age, the rats were subjected to the open field tests (OFT), elevated plus maze (EPM) and forced swim (FST). After the behavioral tests, the rats were sacrificed and the brains were collected for further treatment. Finally, immunohistochemistry was performed with the anti-Iba1 antibody, specific for microglia. Subsequently, a count was made of the density and activation of microglial cells in the hippocampus in the areas of *Hilus* and CA3, by means of a morphological analysis of these cells.

Materna separation caused an increase in anxiety-type and depressive-type behaviors in adult rats. Rats exposed only to LPS showed greater anxiety-type behavior; however, in the SM-LPS group, anxiety-like behavior was attenuated by the effect of SM. LPS did not cause depressive-like behavior in rats; but, if it propitiated a greater activation and a lower density of microglia in both areas analyzed, Hilus and CA3; SM, for its part, only induced greater activation in the *Hilus* area.

I.- INTRODUCCIÓN

El estrés es el conjunto de procesos y respuestas neuroendocrinas, inmunológicas, emocionales y conductuales ante situaciones que significan una demanda de adaptación mayor que lo habitual para el organismo y son percibidas por el individuo como amenaza o peligro, ya sea para su integridad biológica o psicológica (Seyle, 1950). El estrés en la infancia se asocia a un mayor riesgo para desarrollar trastornos mentales, como ansiedad y depresión (Turner y Lloyd, 2004). La edad temprana es una etapa importante en el desarrollo del sistema inmune (Ofer Levy, 2007); de la misma manera, las estructuras implicadas en la respuesta al estrés como el hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal, se sabe que son muy sensibles en la infancia (Reynolds et al., 2013).

En respuesta al estrés, las células microgliales del SNC constituyen la primera línea de defensa contra cualquier insulto dentro del cerebro, proliferan hacia la zona del insulto, se activan y liberan citocinas proinflamatorias (Rakic y Zecevic, 2000). Estudios realizados anteriormente en nuestro laboratorio han mostrado que el LPS aumenta la activación de las células microgliales en ratas neonatas macho (Saavedra et al., 2017), igualmente observaron este aumento en las ratas expuestas a SM (Roque et al, 2016).

Existe escasa investigación sobre ansiedad y depresión en hembras; por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del estrés por SM y por la exposición a LPS en las conductas de ansiedad y tipo depresiva; así como en la respuesta neuroinmune de las células microgliales de ratas hembra en la etapa adulta y de esta forma aclarar algunos de los paradigmas de estrés existentes en este género.

II.- MARCO TEÓRICO

2.1.- Respuesta general al estrés

Seyle, fue un investigador pionero en el estrés, definió al mismo como una perturbación de la homeostasis. La homeostasis es un proceso continuo de auto-regulación o recuperación del cuerpo con el fin de que prevalezcan los valores fisiológicos ideales, a pesar de los cambios en el medio interno o externo (Walter B. Cannon, 1932). Diariamente un organismo se somete a estímulos nocivos o estresantes, que pueden ser factores ambientales como la temperatura, la urbanización, el ruido, incluso un reto inmunológico (Irwin MR, 2008). Estos estímulos activan el sistema límbico, enfrentando al organismo a una respuesta de “lucha o huida” de forma inmediata; sin embargo, cuando el estímulo persiste o se intensifica y el equilibrio no es restablecido de inmediato, se produce una reacción de alarma denominada respuesta al estrés (Charmandari et al., 2005). La respuesta al estrés es una respuesta automática del organismo para hacer frente a las consecuencias de cualquier cambio ambiental externo o interno (Salposky, 1994); el organismo busca sobreponerse al estímulo estresante y lograr recuperar su homeostasis, en un proceso llamado alostasis (McEwen, 1998).

La respuesta al estrés está controlada por el sistema nervioso central (SNC) y la coordinación que éste ejerce sobre el sistema nervioso autónomo, el sistema endocrino y el sistema inmune (Gómez y Escobar, 2006); en conjunto se encargan de regresar la homeostasis al organismo (Elenkov IJ et al., 2000). Ante una situación de estrés, el organismo tiene una serie de reacciones fisiológicas que comienzan con la activación del sistema nervioso central (SNC) y periférico, liberando hormonas y respuestas quimio-celulares (Lightman et al; 2001); así como la activación del eje hipotálamo-hipófisis-glándula suprarrenal (HPA), principal efector de la respuesta al estrés, aumentando los niveles de las hormonas del estrés. La activación del SNC y periférico provocan secreción de catecolaminas (noradrenalina, adrenalina). Al elevarse los niveles de catecolaminas en el torrente sanguíneo provocan reacciones en el organismo para enfrentar al estresor (Gómez y Escobar, 2006). La respuesta al estrés dependerá de la duración y/o de la frecuencia del estímulo estresante (Sapolsky, 1994). Finalmente, cabe destacar que cuando esta respuesta es inadecuada, excesiva o prolongada, altera la fisiología y el comportamiento normal, dejando el organismo vulnerable a enfermedades (Pacák y Palvotis, 2001).

2.2.- Activación del eje HPA

El eje HPA es un eje neuroendocrino encargado de la respuesta al estrés. El eje HPA consta del núcleo paraventricular del hipotálamo

(PVN), la glándula pituitaria anterior y la glándula suprarrenal. El PVN controla el nivel de activación del eje HPA; al activarse, secreta la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y vasopresina (AVP), hacia el sistema porta hipofisario; el cual, permite el intercambio de hormonas entre el hipotálamo y la glándula pituitaria anterior (Ferguson et al., 2008). La glándula pituitaria tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis durante y después del estrés. En esta glándula, la CRH, se une al receptor CRHR1 de los corticotropos (Bale y Vale, 2004), estimulando la síntesis y liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) en la circulación general (Rivier y Vale, 1985). Las glándulas suprarrenales secretan hormonas durante el periodo de estrés, en la médula suprarrenal se secreta epinefrina y norepinefrina (Mitani, 2014) y en la zona fascicular, la ACTH estimula la síntesis de glucocorticoides; principalmente cortisol en humanos y corticosterona en ratas (Rivier y Vale, 1985). Además, las glándulas suprarrenales tienen acceso estratégico al sistema vascular que les permite regular los niveles de hormonas reactivas y basales (Rosol et al; 2001). Por otra parte, los axones de las neuronas oxitocinérgicas y vasopresinérgicas en la división magnocelular del PVN se proyectan a la hipófisis posterior, donde liberan OT y AVP a la circulación general para regular la respuesta fisiológica a los factores estresantes (Ferguson et al., 2008).

El eje HPA es inhibido por los glucocorticoides en un proceso de retroalimentación negativa que restablece el estado homeostático inicial, actuando en regiones cerebrales que incluyen el PVN, la hipófisis, el hipocampo y otras áreas límbicas (McEwen y Gianaros, 2010). En la hipófisis anterior se activan los corticotropos que liberan ACTH en el torrente sanguíneo, causando un aumento en el calcio intracelular impulsado por la vía de cAMP-proteína quinasa A (Majzoub, 2006). El mal funcionamiento de este proceso genera niveles anormales de cortisol y puede provocar una desregulación del eje HPA (Kovacs y Makara, 1988). Este proceso parece ser adaptativo (McEwen y Gianaros, 2010). La desregulación en este eje muestra relación con trastornos neuropsiquiátricos y puede resultar en otras patologías como inmunodeficiencia, deterioro de la memoria, obesidad y trastornos cardiometabólicos (Levine et al., 2014).

2.3.- Diferencias en la activación del eje HPA debidas al sexo

Existen diferencias biológicas y fisiológicas en los mecanismos de respuesta al estrés entre sexos (Bale y Epperson, 2015). Las diferencias sexuales en las respuestas al estrés se pueden encontrar en todas las etapas de la vida y están relacionadas con la activación de las hormonas gonadales (McCormick y Mathews, 2007). Los niveles fluctuantes de esteroides gonadales en mujeres a lo largo del ciclo menstrual son un

factor importante que contribuye a las diferencias de sexo en el incremento de la actividad del eje HPA en mujeres en comparación con los hombres (Oyola et al., 2017). Los niveles de progesterona y estrógeno a lo largo del ciclo estral también muestran un vínculo directo con la respuesta al estrés de las ratas hembra (Viau y Meaney, 1991).

Los cambios en los niveles de las hormonas gonadales, que ocurren durante los períodos de desarrollo y maduración, influyen a lo largo del eje HPA, incluidas las conexiones aferentes al PVN, la neuromodulación de las neuronas de CRH, el tamaño y la actividad esteroidogénica de la corteza de la glándula suprarrenales, la regulación de los sistemas de neurotransmisores como 5-HT, norepinefrina y expresión del receptor de CRH. La interacción hormonal recíproca entre la regulación del eje HPA y el eje hipotálamo-pituitaria-gónadas (HPG) viene dada por la participación de los estrógenos en la regulación de la retroalimentación negativa del eje HPA en múltiples sitios (Weiser y Handa, 2009). También cabe señalar que los receptores de estrógenos se encuentran en diferentes proporciones en las neuronas del PVN, encargado de la activación del eje HPA (Hrabovszky et al., 2004). La interferencia en la regulación entre estos ejes podría llevar a anomalías en las respuestas al estrés (Oyola et al., 2017).

Los niveles hormonales también pueden ayudar a explicar por qué ciertas hormonas tienen efectos específicos en la respuesta al estrés según el sexo. Por ejemplo, se sabe que durante la respuesta al estrés en las ratas hembra se encuentran incrementados, en un mayor porcentaje que los machos, los niveles de vasopresina, ACTH y cortisol; la cual, se mantiene elevada durante más tiempo (Figueiredo et al., 2002). Además de estas discrepancias existen otras diferencias anatómicas, por ejemplo, las mujeres cuentan con una mayor cantidad de neuronas parvocelulares vasopresinérgicas en el PVN que los hombres (Ishunina y Swaab, 1999) y su activación es mayor (Larkin et al; 2010).

2.4.- El estrés en la infancia

Durante la infancia existe la probabilidad de exponerse a condiciones estresantes como el maltrato, la mala maternidad o la pérdida de los padres, los trastornos psiquiátricos de los padres, entre otros (Quiao et al., 2016). Por tener un dato, en una encuesta en EUA se encontró que aproximadamente 15.5 millones de niños son víctimas del abuso físico o emocional por parte de uno de los padres cada año en ese país (McDonald et al. 2006).

El estrés en la infancia se asocia a un mayor riesgo para desarrollar trastornos mentales, como trastornos de ansiedad y depresión (Turner y Lloyd, 2004); al igual que, incrementa el riesgo del desarrollo de

enfermedades crónicas y el abuso de sustancias en edades posteriores de la vida (Jurueña, 2014). Como ejemplo de los eventos estresantes durante la infancia que contribuyen el aumento a la probabilidad de padecer trastornos psicológicos en la edad adulta, están los siguientes: la mala calidad de la relación padre-hijo (Lacey et al., 2013) e igualmente el divorcio de los padres durante la infancia puede provocar la angustia psicológica del adulto (Morgan et al., 2012).

Se cree que los efectos a largo plazo de la adversidad infantil son debidos a la exposición a estrés en periodos de cambios fisiológicos en el desarrollo. Durante el desarrollo posnatal existe un período de regulación de la plasticidad epigenética, la cual es parte de la formación de sinapsis específicas durante los períodos críticos de desarrollo sexual y psicológico (Bale y Epperson, 2015). También se ha demostrado que estos mecanismos epigenéticos son causantes de transmitir los cambios neuronales y conductuales producidos frente a la adversidad temprana a las siguientes generaciones (Gröger et al., 2016). Las estructuras implicadas en la respuesta al estrés como el hipocampo la amígdala y la corteza prefrontal, se sabe que son sensibles a la adversidad de la infancia (Reynolds et al., 2013); igualmente, la adversidad temprana se encuentra ligada a la desregulación del HPA (Chiang et al., 2015), así como a niveles altos de mediadores proinflamatorios (Ehrlich et al., 2016). Por mencionar un ejemplo, los resultados en un estudio de personas adultas con antecedentes de maltrato en su infancia mostraron volúmenes reducidos de la corteza prefrontal o el hipocampo, aumento del nivel de activación del eje HPA en respuesta al estrés en comparación con personas no maltratadas (Danese et al., 2012).

2.5.- Diferencias en la respuesta al estrés de acuerdo al sexo

La prevalencia de los trastornos de depresión y ansiedad en mujeres contrario a los hombres surge solo después de la pubertad (Angold y Costello, 2006). Se sugiere que la progesterona y estrógenos, en la adolescencia, tienen relación con los trastornos afectivos (Hayward y Sanborn, 2002). Mandakh Bekhbat y Gretchen N. Neigh (2018) dieron a conocer que las mujeres parecen ser más susceptibles a los efectos genéticos causantes de la conducta tipo depresiva que los hombres.

Existe poca investigación en modelos animales hembras, cuando un predictor importante de la susceptibilidad de un individuo a la enfermedad mental es su sexo (Astbury, 2001; Eaton, 2012). La susceptibilidad de las hembras a trastornos mentales es dada por respuestas neuro-inmunes sexo-específicas seguidas por la exposición a un estímulo estresante concreto (Bekker y van, 2007). Así mismo otra

evidencia sugiere que el estrés crónico puede llevar a inmunosupresión exagerada en hembras comparadas con los machos (Eaton et al., 2012).

2.6.- Modelo de separación materna temprana en ratas

La interacción entre madre y cría tiene por objeto brindar seguridad a los recién nacidos y modular la actividad de sus sistemas neuroendocrinos y fisiológicos que son básicos para el sostenimiento de la vida y que a largo plazo les permitirán desarrollar mecanismos para afrontar las futuras demandas ambientales (Macri et al., 2008). Para investigar el estrés en las etapas tempranas de la vida y sus efectos psico - fisiológicos a lo largo del desarrollo son usados los modelos con roedores. Los modelos con roedores son ajustados tratando de lograr una similitud entre el comportamiento natural de los roedores con la conducta del humano (Cruz-Morales et al., 2003).

El modelo de separación materna temprana se ha utilizado para investigar el estrés temprano en ratas y sus efectos a largo plazo, consiste en alterar el tiempo de las crías de rata junto a su madre y se evalúa esta separación a través de pruebas de comportamiento. Existen algunas variantes en este modelo, como el tiempo en que pasan separadas las crías de su madre y el número de días del procedimiento (Liu et al; 2017). La duración más común es de 3 a 4 horas al día entre los días 2 a 14 posnatales (P2-P14) o (P2-P20) (Leussis et al; 2012). Con respecto a los estudios de ansiedad y depresión, existe el uso de un protocolo de 3 horas diarias de separación por 14 días (Kalinichev et al., 2002, Lee et al., 2007, Lippmann et al., 2007).

2.7.- Infecciones en etapas tempranas

Los niños recién nacidos son más susceptibles a las infecciones, especialmente cuando nacen prematuros (Kollmann et al., 2017); la susceptibilidad a la infección es mayor en las primeras etapas de la vida principalmente debido a un sistema inmune inmaduro, en esta edad es menor la capacidad inmunológica frente a la eliminación de patógenos y a la respuesta a las vacunas (Zhang X et al., 2017). Lo que conlleva, a que las infecciones neonatales sean las principales causas de muerte en el primer mes de vida (Osrin et al., 2004).

El sistema inmune es un sistema sensorial para factores ambientales y depende de los estímulos sensoriales durante su desarrollo, esto sugiere que la vulnerabilidad neonatal a la infección no se debe simplemente a la inmadurez del sistema inmunológico, sino a la forma en que se regula la homeostasis inmunitaria (Ghazal PI et al., 2013). Es decir, la vida temprana es una etapa importante en el desarrollo del sistema inmune humano, ya que el sistema inmune del recién nacido se

enfrenta al reto de equilibrar la transición de un entorno intrauterino a un mundo rico en antígenos externos (Ofer Levy, 2007).

En la etapa neonatal existen deficiencias en la inmunidad innata como una producción disminuida de interferones, interleucina-12 (IL-12), interleucina-23 (IL-23), e interleucina-18 (IL-18), y otras citocinas proinflamatorias. La producción disminuida del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-12p70 (IL-12p70) en relación con los adultos está presente durante varias semanas después del nacimiento y es probable que contribuya a una mayor susceptibilidad a la infección (Kollmann et al., 2012). Otras deficiencias son las respuestas alteradas de monocitos y macrófagos neonatales a múltiples ligandos de receptores tipo Toll (TLR) (Maródi L, 2006). Los TLR son elementos clave en la capacidad del sistema inmunitario innato para reconocer y responder a los patógenos y son de importancia crítica para las respuestas inmunitarias en la vida temprana (Kollmann et al., 2012).

En el humano, durante los 3 primeros meses, el sistema inmune entra en un período crítico de desarrollo de las células B, las células asesinas naturales (NK) y las células dendríticas (DC), estas células alcanzan fenotipos similares a los adultos durante este período, por lo cual las exposiciones ambientales son mayormente percibidas durante este tiempo y pueden llegar a tener consecuencias a largo plazo en enfermedades inmunomediadas (Arrieta et al., 2015). Diversas investigaciones han sugerido que la exposición en edades tempranas de la vida a infecciones puede llevar eventualmente al desarrollo de la enfermedad en la edad adulta (Rogers y Velten M, 2011) incluida la vulnerabilidad a trastornos cognitivos y/o neuropsiquiátricos (Shi et al., 2009).

2.8.- Relación estrés- sistema inmune

Durante la respuesta al estrés ocurre un hipo-funcionamiento del sistema inmune, aumentando la susceptibilidad a padecer una enfermedad (Cannon WB, 1929). Por otra parte, factores estresantes no infecciosos también intervienen en la respuesta inmune innata, conduciendo a respuestas celulares, inmunológicas y fisiológicas desequilibradas (Le Grand y Day, 2016). Además, dependiendo del estímulo, algunos provocan una respuesta inflamatoria del sistema inmune (Chrousos, 1995). Las alteraciones causadas por el estrés, en el sistema inmune, se encuentran mediadas por los moduladores proinflamatorios liberados por las catecolaminas y los glucocorticoides, al acoplarse a receptores específicos de las células del sistema inmune (Glaser R et al., 2005). En respuesta al estrés las catecolaminas liberadas estimulan la producción de mediadores proinflamatorios

(citocinas) e intervienen en la regulación del eje HPA y a su vez la activación del eje HPA también influye en la expresión de las citocinas. Las citocinas con las principales mediadoras de la actividad del sistema inmunitario (Coutinho y Chapman, 2011); su producción, así como su actividad y la dirección de su respuesta inflamatoria se cree que se encuentran mediados por GC (Wiegers et al., 1995). Las citocinas son producidas por células cerebrales o por células inmunes; entre las funciones de las citocinas están las siguientes: La IL-6 se encuentra relacionada con la hematopoyesis, la diferenciación de las células B y la activación de las células T, la IL-1 β se considera como un regulador de la respuesta al estrés, la IL-10 tiene un papel inmunosupresor de la respuesta inmune contra patógenos invasores (Uchoa et al., 2014).

El eje HPA se encuentra involucrado de igual manera con el aumento o supresión de las respuestas inflamatorias a través de la secreción de CRH y ACTH, alterando los niveles de GC (Cooper y Stewart, 2003). Los GC liberados por la corteza adrenal son inmunosupresores del sistema inmune, ya que también atenúan la producción y la liberación de citocinas; del mismo modo, intervienen en los procesos de diferenciación, activación, maduración, movilización de células inmunes (linfocitos T, linfocitos B) (Tian et al., 2009). Además, los linfocitos, monocitos y líneas celulares linfoides de sangre periférica humana expresan receptores tipo II-glucocorticoide para las hormonas corticoesteroides (Ader R y Cohen N, 1993). Pero, a pesar de las investigaciones, las vías de comunicación entre el cerebro y el sistema inmunológico aún no están del todo claro (Elenkov IJ et al., 2009).

2.9.- Respuesta neuroinmune

Durante la enfermedad y/o un insulto inflamatorio la relación entre el sistema inmune y el SNC, a través de la comunicación neurona-microglía, es esencial para mantener la homeostasis y generar una adecuada respuesta inmunológica, fisiológica y conductual (Jurgens y Johnson, 2010). También existe evidencia de que el sistema inmune, incluidos los astrocitos y las células T, interactúan con la microglía y las neuronas en estados normales y patológicos (Tian et al., 2009).

La respuesta neuroinmune constituye como línea de defensa a la inmunidad innata, en donde macrófagos y células microgliales, reconocen y responden a elementos infecciosos a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a la lesión/daño (DAMPs) (Akira et al., 2006). Posteriormente el sistema inmune sintetiza y libera citocinas periféricas como la interleucina (IL) -1 β , IL-6 y TNF- α (Kelley et al., 2003). En respuesta a la estimulación de estas citocinas periféricas, la señal se transmite al SNC donde se da nuevamente la expresión de citocinas y ocurre el comportamiento de enfermedad o postración (Luheshi GN, 2000).

2.10.- Células gliales

Las células gliales del SNC se clasifican de acuerdo a su morfología en células microgliales y en células macrogliales, en esta sub-clasificación están comprendidos los astrocitos, los oligodendrocitos y las células endoteliales. Los oligodendrocitos forman la envoltura y la mielina de los axones del SNC. Por su parte, las células endoteliales controlan el paso de sustancias desde el líquido cefalorraquídeo hasta el tejido nervioso (Kettenmann y Verkharatsky, 2008). Los astrocitos son las células gliales más numerosas y las células más abundantes en el sistema nervioso central, sobrepasando a las neuronas en una proporción de 10:1; están encargados de proporcionar soporte físico a las neuronas aledañas, regulan la función neuronal mediante la liberación de factores neurotróficos, guían el desarrollo neuronal, expresan receptores para neurotransmisores como: AMPA, GABA, NMDA y glutamato, entre otros y contribuyen a su metabolismo (Guillamón et al., 2015). Además, los astrocitos se encargan de regular el pH extracelular y la concentración de iones de potasio, participando en la integridad funcional y estructural de la barrera hematoencefálica (Nayak et al., 2014) de igual forma, también modulan la actividad sináptica y participan en la respuesta glial ante un insulto a lo que se conoce como astrocitosis o astrocitos reactivos, que se caracteriza por un incremento en el tamaño y número de células que expresan GFAP (León Chávez et al., 2001).

Las células microgliales fueron descritas por Pio-del Río Horteiga, las describió como células en reposo ramificadas (Del Río-Hortega, 1932). La microglía comprende aproximadamente entre el 10-12% de las células en el cerebro y constituye entre el 15- 20% de la glía en el sistema nervioso central; predominan en la materia gris con concentraciones especialmente altas en el hipocampo, el hipotálamo, los ganglios basales y la sustancia negra (Block et al., 2007). Se cree que las células microgliales se originan de monocitos sanguíneos circulantes provenientes de la médula ósea, los cuales migraron en etapas tempranas del desarrollo hacia el sistema nervioso central (Palmer, 2010); pero también, existe la teoría de que provienen de células progenitoras mieloides primitivas del saco vitelino (Ginhoux et al., 2010).

La microglía y los astrocitos son las dos poblaciones principales de células gliales reactivas (Streit et al., 1999); se les nombra “glía reactiva o glía activada” porque responden ante estímulos o daño, experimentando cambios morfológicos y funcionales de manera gradual y estereotípica, y su respuesta va acompañada por la producción de citocinas proinflamatorias (Neumann yTakahashi, 2007). Las células microgliales son responsables de mantener la homeostasis dentro del cerebro, ya que son los macrófagos residentes del SNC y son células fagocíticas inmunocompetentes, constituyen la primera línea de

defensa contra cualquier enfermedad o insulto; al igual, exhiben plasticidad estructural y funcional (Rakic y Zecevic, 2000). Además, las células microgliales participan en funciones conductuales, en la neurogénesis y la gliogénesis; de igual manera son esenciales en procesos de cognición ayudando a mantener la plasticidad sináptica y se encargan de la poda sináptica durante el desarrollo (Thored et al., 2009).

2.11.- Respuesta microglial al estrés y otros insultos

En el cerebro, la microglía se caracteriza por una morfología con un soma pequeño y con procesos delgados ramificados; a lo que se conoce como “microglía en reposo”. Cuando se activa su morfología celular cambia a una hiper-ramificada y finalmente a una morfología ameboidea con procesos gruesos y retraídos, considerándose “microglia activada”, facilitando su migración a través del parénquima hacia el sitio de la lesión (Hanisch y Kettenmann, 2007). La microglía en estado de “reposo” escanea continuamente el microambiente del SNC investigando patógenos, controlando el estado de las sinapsis locales y regulando la maduración sináptica o la eliminación a través de la guía axonal (Szcucinski y Losy, 2007). En condiciones de enfermedad o daño la microglía recibe señales a través de varios receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) y migran a la zona de lesión, induciendo su activación y aumentando su proliferación (Brown y Neher, 2010). La magnitud de la activación dependerá del tipo y la duración del estímulo, el estado actual del SNC y la exposición a más estímulos (Ransohoff y Perry, 2009); contribuyendo a la disfunción neuronal y la muerte celular o brindando apoyo en el proceso de curación (Gomes-Leal, 2012).

Durante la activación de la respuesta al estrés, la microglia libera numerosas moléculas inflamatorias, factores de crecimiento, proteínas matriciales, quimiocinas, prostanoides y radicales libres reactivos; como TNF- α , IL-1 β , NF- κ B y NO (Gomes-Leal, 2012); participando en la exacerbación de varios aspectos de la neuroinflamación (Sorrells y Sapolsky, 2007). Específicamente, ante estímulos inmunológicos, la microglía libera moléculas antiinflamatorias y factores de crecimiento como el factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), factor de crecimiento de fibroblastos, promoviendo la neuroprotección y con la finalidad de amplificar la respuesta inflamatoria y eliminar al patógeno (Hanisch y Kettenmann, 2007); pero también, se puede inducir una sobreactivación microglial y del mismo modo contribuir a la muerte neuronal (Yang et al., 2010).

La sobreactivación microglial aumenta la permeabilidad en la barrera hematoencefálica (BBB) favoreciendo la infiltración de macrófagos, los cuales aumentan el nivel de citocinas inflamatorias, agravando el estado neuroinflamatorio ya existente en el SNC (Zipser et al., 2007). La sobreactivación microglial en conjunto con la constante liberación de factores citotóxicos y citocinas proinflamatorias originan la neuroinflamación (Boche et al., 2013). Por su parte, la neuroinflamación es importante en la homeostasis del SNC, en el cerebro sano participa en la inducción de varios procesos de reparación de tejido (Goldszmid y Trinchieri, 2012); pero también afectan el neurodesarrollo y la plasticidad sináptica. Los mediadores anti- y proinflamatorios, liberados en la sobreactivación microglial, se cree que tienen un papel perjudicial en enfermedades neuroinmunes o un daño leve, al conducir a deficiencias en la remodelación y el mantenimiento sináptico (Kéri et al., 2017). Se ha observado que niveles altos en los mediadores anti- y proinflamatorios conducen a la alteración de la estructura y función del hipocampo (Medawar, 1948); además de propiciar enfermedades como depresión, trastorno de ansiedad, deficiencias conductuales y disfunción cognitiva (McAfoose y Baune, 2009). En resumen, el papel perjudicial o beneficioso de la microglía en la respuesta a cualquier lesión o insulto dependerá del tipo y la intensidad de la agresión, al igual que del nivel de activación de la microglía asociada (Block et al., 2007); una respuesta adecuada favorecerá una regeneración del tejido mientras que una falla en esta respuesta incrementará la muerte neuronal (Czirr y Wyss-Coray, 2012).

III.- ANTECEDENTES DIRECTOS

En estudios previos se ha observado que ratas sometidas a SM 3 h/ día durante las primeras 2 semanas de vida, mostraron una mayor conducta de ansiedad y tipo depresiva en la edad adulta (Lee et al; 2007). La SM ,3 h/ día, en los días PN3-10 originó un comportamiento ansioso en animales adultos (4-5 meses de edad) de ambos sexos; aunque no se mostraron alteraciones en la conducta tipo depresiva en ninguno de los sexos (Wigger y Neumann,1999). En otras investigaciones se observó un comportamiento depresivo en ratas con SM después de un estrés crónico adicional durante la edad adulta (Matthews et al; 1996 ; Aisa et al., 2008; Ruedi-Bettschen et al; 2006; Marais et al; 2008). Por otro lado, investigaciones de nuestro laboratorio no mostraron cambios en la conducta ansiosa, aunque si se observó un aumento de la conducta tipo depresiva en las ratas adultas macho al someterlas a la SM 3 h/ día (Lajud et al; 2012). Las crías de rata macho expuestas a SM 3 h/ día (PD1-PD14) presentaron un mayor número de microglía activada; también, encontraron que disminuyó la densidad de los astrocitos y el número de procesos en el *Hilus* (Roque et al, 2016).

Las repercusiones del LPS observables en la etapa adulta pueden venir desde la etapa prenatal; por ejemplo, la exposición prenatal al LPS en el día 9 de gestación originó conductas relacionadas con la ansiedad y la depresión en la progenie (Depino AM, 2016). Varios estudios han informado que el LPS aumenta la activación de las células gliales, lo que lleva a la neuroinflamación seguida de la neurodegeneración (Johansson et al; 2005; Qin et al; 2007; Khan et al; 2017). Finalmente, un estudio realizado anteriormente en nuestro equipo de trabajo, investigó sobre el doble reto SM-LPS, observaron un incremento en la activación microglial en la región CA3 y el *Hilus* en ratas macho expuestas al doble reto SM-LPS (Saavedra et al., 2017).

IV. JUSTIFICACIÓN

Entre 1990 y 2013, el número de personas con depresión o ansiedad ha aumentado cerca de un 50%, de 416 millones a 615 millones. Cerca de un 10% de la población mundial está afectada. En promedio es más recurrente en mujeres, una de cada cuatro mujeres y uno de cada seis hombres sufren depresión durante su vida, y hasta el 65% de las personas afectadas tienen episodios recurrentes de este trastorno.

La separación materna en etapas tempranas de la vida provoca un estrés acumulativo en la etapa adulta que puede incrementar la incidencia de la conducta de ansiedad y depresión. De igual forma un simulador de infección (reto inmune), puede programar al individuo a sufrir un trastorno mental, como la ansiedad y depresión. Por otra parte, existe evidencia de que el estrés puede interferir en los procesos del neurodesarrollo temprano y tardío, así como en la regulación de la neurotransmisión y la plasticidad sináptica. Además, existen investigaciones donde se prueba que estos estresores, SM y LPS, pueden ocasionar repercusiones en las células microgliales, ocasionando atrofias en zonas de hipocampo como *Hilus* y CA3 en ratas machos. Sin embargo, la mayoría de estas investigaciones fueron realizadas en ratas macho. Por lo cual, se desconoce si la SM y el LPS administrado en etapa neonatal incrementan la vulnerabilidad a presentar conductas de ansiedad y tipo depresiva en la vida adulta de las ratas hembra; de igual manera se desconoce si existen cambios en cuanto a la densidad y morfología de las células microgliales en el hipocampo.

V.- HIPÓTESIS

Ambos retos por separado la SM y el LPS en etapas tempranas de la vida aumentarán las conductas de ansiedad y tipo depresiva en la edad adulta; por su parte, la suma de los dos estresores SM-LPS incrementará la conducta de ansiedad y tipo depresiva. Además, existirá una mayor activación de la microglía en las regiones CA3 e *Hilus* del hipocampo de las ratas hembra sometidas al doble reto SM-LPS.

VI. OBJETIVO GENERAL

Analizar si las ratas hembra adultas presentan alteraciones en las conductas de ansiedad y tipo depresiva; así como, detectar si hay una respuesta neuroinmune observable en células microgliales al ser expuestas a un doble reto estrés - inmune en la etapa neonatal.

6.1.- Objetivos específicos

- Evaluar las consecuencias funcionales de dos retos estrés-inmune neonatales a largo plazo mediante el análisis de las conductas tipo depresiva y de ansiedad en ratas hembra adultas.
- Analizar los cambios morfológicos y la densidad celular de las células microgliales en CA3 e *Hilus* en ratas hembra adultas sometidas a dos retos estrés-inmune en etapa neonatal.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1.- Animales

Ratas hembra Sprague Dawley adultas de 5 meses de edad, que se mantuvieron bajo condiciones controladas a una temperatura constante de 22°C, con ciclos de luz-oscuridad 12/12, con libre acceso a agua y comida (alimento *ad libitum*). El manejo de los animales y el trabajo experimental fue realizado bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, las normas internacionales para el manejo y uso de animales de laboratorio y aprobado por el Comité Nacional de Ética del Instituto Mexicano del Seguro Social (R-2015-785-103).

7.2.- Separación materna

Las ratas fueron sometidas a separación materna y fraternal 3h al día en los días posnatales del 1 al 14, en un horario de 9:00 am a 12:00 pm. Primero las ratas sometidas a SM se ubicaron en otra caja plástica con 8 separaciones y que contenía una cama de aserrín. Las cajas con ratas separadas fueron llevadas a otra habitación en la que se mantuvieron las condiciones de temperatura y control de ruidos. Pasados los 180 minutos de separación, se regresaron las ratas separadas a la habitación original; fueron devueltas a la caja nido junto a las crías no separadas y a la madre. A partir del día 15 se suspendió el procedimiento de separación y se anidaron las ratas en sus cajas, hasta el día PN 21 en que fueron destetadas.

7.3.- Inyección de LPS

En el día PN14 las crías se inyectaron por vía intraperitoneal con LPS en una dosis de 0.5 mg /Kg de peso corporal disuelta en solución salina al 0.9 %.

7.4.- Frotis vaginales

Se les tomaron frotis vaginales a las ratas de todos los grupos, para determinar la etapa del ciclo estral al observarlos en microscopio a 20 X. Para el frotis, se impregno un hisopo con agua destilada, se sacó a la rata de la caja y se sujetó con una mano; con la otra mano se introdujo suavemente la punta del hisopo en la vagina de la rata, se devolvió a la rata a su caja y se extendió la muestra sobre un portaobjetos. Los frotis se tomaron una semana antes de iniciar las pruebas de conducta y se realizaron diariamente, incluso en los días de las pruebas de conducta, efectuándose una hora antes. Este procedimiento se llevó a cabo para asegurarnos que todas las pruebas se realizaron con ratas en etapa diestro.

7.5.- Diseño experimental

La mitad de las ratas de cada camada fueron sometidas a SM 3h al día, en los días PN 1-14; tomando el día pos-natal (PN) 0 el día que nacieron. La otra mitad de las ratas no se les perturbó de ninguna manera, considerándolas crías sin molestar (CSM). En el día PN14 se inyectaron por vía intraperitoneal a todas las ratas con 100µl de solución salina fisiológica (0.9%) o LPS 0.5 mg/Kg. Este procedimiento generó 4 grupos experimentales (CONT-VEH, SM-VEH, CONT-LPS, SM-LPS), con una n=10 en cada grupo:

1) CONT-VEH: grupo control (CSM) + inyección de 100µl de solución salina fisiológica al 0.9%.

2) **SM-VEH**: grupo sometido a separación materna (3h/día, días posnatales 1-14) + inyección de 100µl de solución salina fisiológica al 0.9%.

3) **CONT-LPS**: grupo control (CSM) + inyección de 0.5 mg /Kg de LPS.

4) **SM-LPS**: grupo sometido a separación materna (3h/día, días posnatales 1-14) + inyección de 0.5 mg /Kg de LPS.

Todos los grupos fueron destetados al PN21. Las ratas fueron sometidas a las pruebas de conducta al cumplir los 5 meses de edad. Con las pruebas de conducta, fueron evaluadas las conductas de ansiedad (laberinto elevado en forma de cruz y campo abierto) y tipo depresiva (nado forzado); dejando un periodo de separación entre la prueba de campo abierto y nado forzado. También se consideró el ciclo estral de las ratas, realizando frotis vaginales una semana antes y durante los días de pruebas; con el fin de realizar las pruebas cuando la rata se encontraba en diestro. Al finalizar la prueba de nado forzado, las ratas fueron anestesiadas con una dosis de pentobarbital sódico y sacrificadas mediante perfusión cardíaca; los cerebros fueron recolectados para posteriormente ser inmunoteñidos. Se realizó finalmente un conteo de la activación de las células microgliales en el hipocampo en las áreas de *Hilus* y CA3 mediante un análisis morfológico.

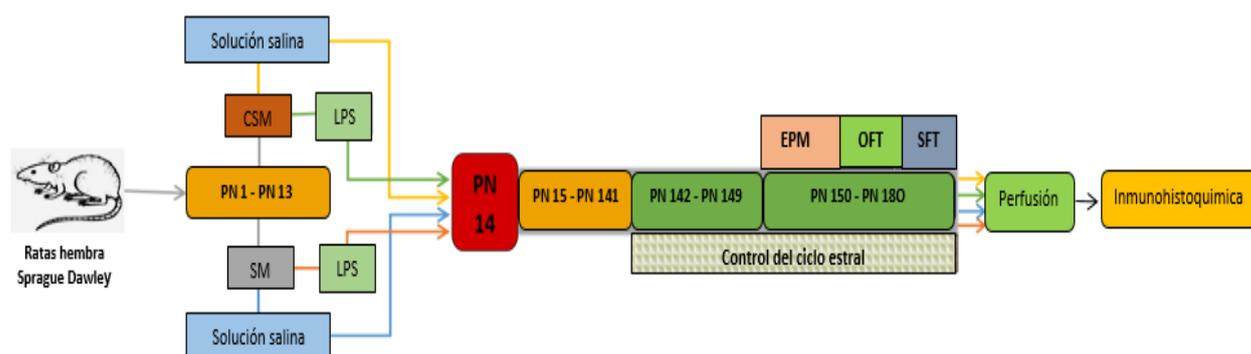


Figura 1. Esquema experimental. Se muestran los tratamientos a los que las ratas fueron sometidas: separación materna (**SM**), crías que no fueron sometidas a SM (**CSM**), inyección intraperitoneal de 100µl de **solución salina** fisiológica (0.9%) y la inyección de 0.5 mg /Kg de lipopolisacárido (**LPS**). En los días PN 1 - PN 14 las ratas fueron sometidas a SM o no fueron sometidas (CSM). Las ratas fueron inyectadas con solución salina o LPS en el día PN14, lo que dio origen a la formación de los 4 grupos experimentales (CONT-VEH, SM-VEH, CONT-LPS, SM-LPS); posteriormente, durante los días PN 15 - PN 141 no se les proporcionó ningún tratamiento. Se mantuvo un control del ciclo estral de las ratas una semana antes (PN 142 - PN 149) y durante los días de pruebas de conducta (PN 150 - PN 180). Las ratas fueron sometidas a las pruebas de conducta de laberinto elevado en forma de cruz (**EPM**), campo abierto (**OFT**) y nado forzado (**FST**) al cumplir los 5 meses de edad (PN 150 - PN 180). Al finalizar todas las pruebas, las ratas fueron sacrificadas y perfundidas; se recolectaron los cerebros y posteriormente, se realizaron las inmunohistoquímicas.

7.6.- Prueba de laberinto elevado en forma de cruz

La prueba de laberinto elevado en forma de cruz (EPM) es uno de los métodos más utilizados en la investigación de conductas similares a la ansiedad en roedores. Para la prueba, se utilizó un laberinto en forma de cruz, el cual consistía en dos brazos abiertos iluminados (50 cm de largo × 10 cm de ancho) y dos brazos cerrados oscuros (50 cm de largo × 10 cm de ancho × 40 cm de alto) que se extendían desde una zona central común (10 × 10 cm), elevada a una altura de 50 cm del nivel del piso. La prueba se realizó bajo luz tenue indirecta (48 Lux), que apuntaba hacia los brazos abiertos del EPM.

La rata se colocó en la plataforma central, frente a un brazo abierto y se le permitió explorar el laberinto durante 5 minutos. Durante la exploración el animal se encontró en conflicto, tuvo que decidir entre haber explorado los brazos abiertos o haberse quedado resguardado en los brazos cerrados. Después de cada prueba, la rata fue regresada a su caja por el experimentador y el laberinto se limpió con etanol al 70% y después con agua, dejando secar.

Las sesiones fueron grabadas con una cámara de video sobre el laberinto. Posteriormente se evaluaron las entradas y la duración en los brazos abiertos, así como en los cerrados, con el programa Plusmaze. Para evaluar la conducta tipo ansiosa de las ratas, se utilizaron como parámetros el porcentaje de tiempo y entradas en los brazos abiertos. Una entrada completa en un brazo abierto se definió como las cuatro patas que cruzan dentro del área de este brazo y se estipuló como intento del cruce a dos patas de la rata dentro del área. Todas las sesiones se realizaron por la mañana de 9:00 am a 12:00 pm.

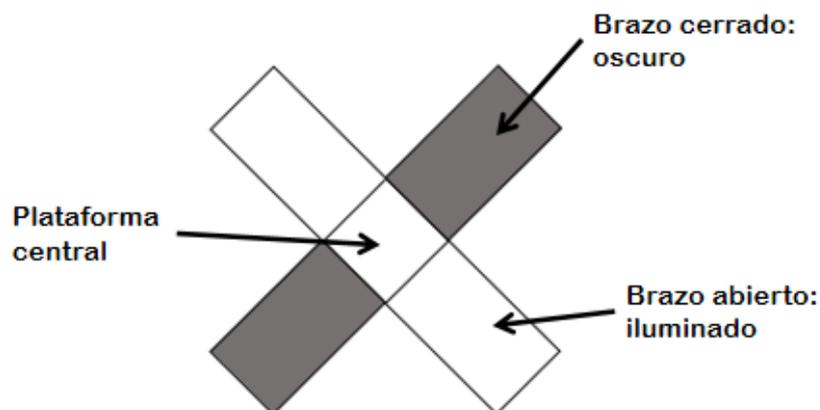


Figura 2. Esquema del laberinto elevado en forma de cruz. Se muestra un boceto del laberinto, se señalan los brazos cerrados oscuros, los brazos abiertos iluminados y la zona central.

7.7.- Prueba de campo abierto

El campo abierto (OFT) consistió en una plataforma rectangular de 80 x 60 x 30 cm (Largo x Ancho x Altura), hecha en acrílico en color negro, con un piso blanco dividido en 9 cuadrantes por líneas negras. Se colocó una cámara para el registro de la locomoción; además, se aseguró que la iluminación del cuadrante central estuviera bajo la luz de 48 Lux.

Se colocó a las ratas en el cuadrante medio inferior y dejamos que explorara por los cuadrantes durante un lapso de 10 minutos. Al final de la prueba, se regresó a las ratas a su caja y se limpió el OFT con etanol al 70%, posteriormente con agua y se dejó secar. Se evaluó el tiempo que las ratas pasaron en el cuadrante central y el porcentaje de cruces al centro; si la rata, presentó menos cruces y menor tiempo invertido en el cuadrante central, se valoró como una conducta de ansiedad. Igualmente se midió la distancia total recorrida; la cual, se utilizó como una medida de la locomoción horizontal. Las sesiones fueron grabadas en video y fueron analizadas en el programa event-long, registrando los cruces y el tiempo en cada uno de los cuadrantes. Se indicó como cruce a un cuadrante cuando la rata entraba con todas las patas al área del cuadrante.

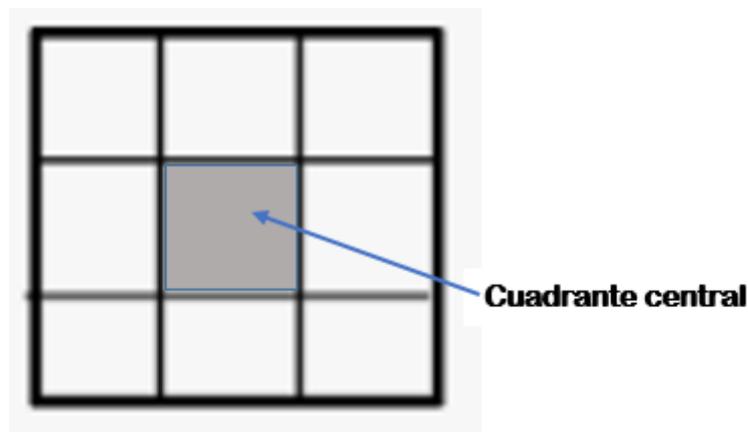


Figura 3. Esquema del campo abierto. Se muestra un boceto del campo abierto visto desde arriba, se observan los nueve cuadrantes que lo conforman y se señala el cuadrante central que es iluminado.

7.8.- Prueba de nado forzado

La prueba de nado forzado (FST) es usada de manera general para evaluar la conducta tipo depresiva en roedores. Esta prueba evalúa la conducta activa e inactiva o de desesperanza en la rata sometida a nadar sin posibilidad de escapar, puede nadar intensamente en su lucha por sobrevivir o sólo mantenerse flotando, dependiendo de su fuerza y voluntad de sobrevivir (Porsolt et al., 1991).

Para la FST se utilizó un cilindro de plástico (50 cm de alto x 35 cm de diámetro); se llenó con agua a una profundidad de 30 cm, la temperatura del agua se ajustó a 21 °C. Cada rata se colocó en el cilindro y se dejó que nadara durante 10 minutos. El agua en el cilindro se cambió para cada rata y las sesiones fueron grabadas en video. Los videos fueron analizados en el programa Event-long bajo simple ciego. Se evaluaron tres parámetros: el tiempo de flotación, evaluado como un periodo de inmovilidad (las extremidades anteriores de la rata, así como las patas traseras están inmóviles y dirigidas hacia adelante, la cola se dirige hacia afuera, con su cabeza por encima de la superficie), el tiempo de natación (movimientos de natación activa y buceo), y el tiempo de escalamiento (movimientos intensos con sus patas delanteras dirigidas contra las paredes del cilindro, dentro y fuera del agua).



Figura 4. Esquema de la prueba de nado forzado. Se muestra un boceto del cilindro lleno con agua y la rata nadando.

7.9.- Procesamiento del tejido cerebral

Antes de realizar la inmunohistoquímica, se llevó a cabo el sacrificio de las ratas y el procesamiento del tejido cerebral. Cada rata fue inyectada de forma intraperitoneal con una dosis de 100 mg/Kg de pentobarbital sódico. Después, fue perfundida por vía cardiaca, a través del ventrículo izquierdo, con solución salina (NaCl 0.9 %) y el tejido se fijó utilizando 100-200 ml de PFA (paraformaldehído al 4% en una solución tampón de fosfatos [PB, 0.1 M, pH 7.4]). Al final de la perfusión, la rata se sacrificó y se extrajo su cerebro. Los cerebros se mantuvieron a 4°C en PFA. Al día siguiente, se infiltraron en solución de sacarosa al 20% por 24h y después en solución de sacarosa al 30 % en PBS 0.1 M para la crioprotección hasta su procesamiento. Después se realizaron cortes coronales a 40 µm de grosor cada corte, utilizando un criostato y a temperatura de -21 °C. Se colectaron 12 series de hipocampo por cada cerebro, los cortes fueron almacenados en solución crioprotectora (25% glicerol, 25% etilenglicol y 50 % PB).

7.10.- Inmunohistoquímica

Las secciones de tejido se lavaron inicialmente dos veces durante 5 min en solución tampón PB 0.1 M (pH 7,4). Se realizó incubación de los tejidos en solución de peróxido de hidrógeno al 10 % en etanol durante 45 min; posteriormente se hizo un lavado con solución de peróxido de hidrógeno al 10 % en PBT (Triton en PB 0.1 M, al 4%) con el objetivo de bloquear las peroxidasas endógenas; se realizaron cuatro lavados adicionales con PB 0.1 M y se incubó en solución de bloqueo al 5% (suero de caballo en PBT) durante 30 min a temperatura ambiente y en agitación. Las secciones de cerebro se incubaron por 3 días a 4 °C con el anticuerpo policlonal primario anti-Iba1 (Millipore; dilución 1:5000 en solución de bloqueo), que se expresa en microglía. Al finalizar la incubación se realizaron 3 lavados de 10 min en PB 0.1 M y se incubaron las secciones a 4 °C durante 2 h con el anticuerpo secundario anti-mouse biotinilado durante dos horas en agitación a 4 °C. Se lavaron las secciones con PB 0.1 M (3 repeticiones de 10 min); posteriormente, se incubaron con el complejo avidina-biotina (Elite ABC kit, Vector Laboratories) (0.5 µl/ ml PBT). Se lavaron las secciones de tejido nuevamente 4 veces de 10 min con PB 0.1 M y para el revelado, se tiñó con el kit de revelado DAB (diaminobenzidina, peróxido de hidrogeno, agua bidestilada, níquel) durante 15 min; la solución DAB se retiró con lavados de PB 0.1 M. Finalmente, las secciones se montaron en portaobjetos gelatinizados al 1% y se dejaron secar, posteriormente fueron cubiertos con medio de montaje y cubreobjetos.

7.11.- Cuantificación celular

Para el conteo de células microgliales se escogieron al azar 5 cortes. Se utilizó un microscopio acoplado a una cámara (AxioCam MRC, Karl Zeiss) para tomar fotografías de las áreas CA3 y el *Hilus* del giro dentado en el hipocampo, con el objetivo de 20 X. Primero se delimitó y registró la superficie del área contada en μm^2 . Posteriormente se realizó un conteo celular de la activación microglial (células con soma ameboides, procesos gruesos y cortos) en ambos hemisferios del corte cerebral; de igual forma, se hizo un conteo de todas las células microgliales. La cuantificación de las células microgliales inmunoreactivas a IBA1 y el área contada se realizó con el programa Axiovision Real 4.0 (Carl Zeiss). Para el análisis estadístico, se realizaron ANOVA de dos vías, así como Newman Keuls.

VIII.- RESULTADOS

8.1.- Evaluación de la conducta de ansiedad

Se investigó si las ratas, expuestas a los diferentes tratamientos (SM, LPS, SM-LPS), desarrollaban una conducta similar a la ansiedad. Con este fin, los animales se enfrentaron a dos pruebas que evalúan la conducta de ansiedad (EPM y OF), a partir del PN150.

8.1.1.- Prueba de laberinto elevado en cruz.

El reto inmune LPS y la SM causaron una alteración en la conducta de ansiedad en las ratas, se observó que los grupos SM-VEH, CONT-LPS y SM-LPS tuvieron un menor porcentaje de tiempo empleado en los brazos abiertos del laberinto en comparación con el grupo CONT-VEH, lo que se interpretó como una conducta de ansiedad (Fig.5 y 6).

Por otra parte, a los grupos que se les administró LPS, CONT-LPS y SM-LPS presentaron una conducta de ansiedad aún mayor que el grupo SM-VEH, al pasar menos tiempo en los brazos abiertos que este grupo; de igual forma, se vio reflejado en el porcentaje de entradas al brazo abierto, en donde los grupos expuestos al LPS evitaron más veces los brazos abiertos que el grupo sólo expuesto a SM. Lo que mostró, que ambos factores estresantes SM y LPS, y en conjunto, aumentaron la conducta de ansiedad; pero el LPS indujo en un mayor grado, en comparación del reto SM, la significancia.

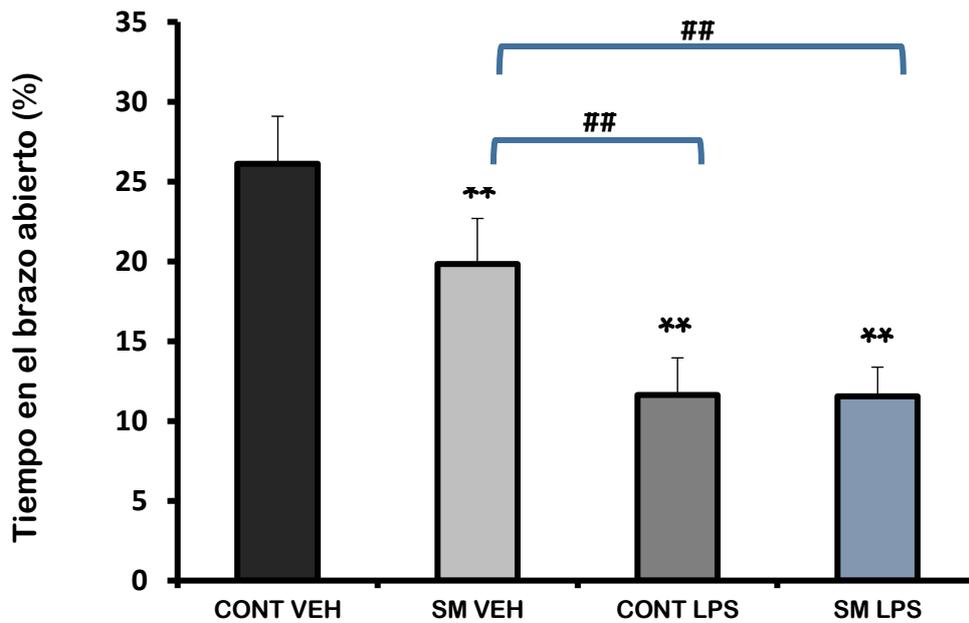


Figura 5. Porcentaje de tiempo en el brazo abierto. Se muestran los porcentajes de tiempo en el brazo abierto que pasaron las ratas de cada grupo respectivamente; se comparan los grupos CONT-VEH, SM-VEH, CONT-LPS y SM-LPS. Observamos diferencias significativas en los grupos SM-VEH $p < 0.01^{**}$, CONT-LPS $p < 0.01^{**}$ y SM-LPS $p < 0.01^{**}$ al ser comparados con el grupo CONT-VEH. Igualmente se muestran diferencias significativas de los grupos CONT-LPS $p < 0.01^{##}$ y SM-LPS $p < 0.01^{##}$ respecto al grupo SM-VEH. N=10. ANOVA

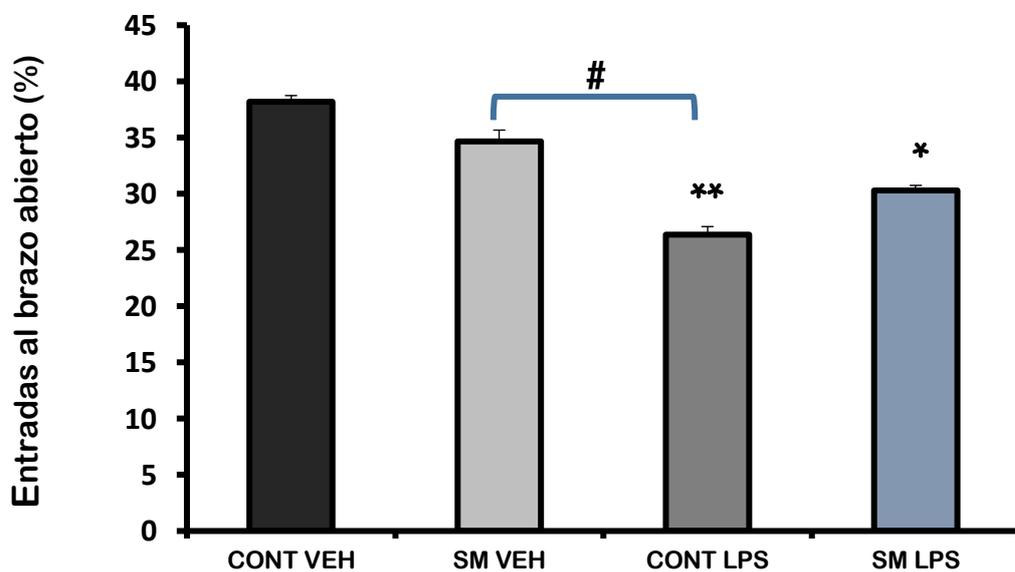


Figura 6. Porcentaje de entradas al brazo abierto. Se muestran los porcentajes de entradas al brazo abierto que tuvieron las ratas de cada grupo respectivamente; se comparan los grupos CONT-VEH, SM-VEH, CONT-LPS y SM-LPS. Se muestran diferencias significativas en los grupos CONT-LPS $p < 0.01^{**}$ y SM-LPS $p < 0.01^{*}$ al ser comparados con el grupo CONT-VEH; también se observó una diferencia significativa en el grupo SM-VEH $p < 0.05^{#}$ respecto al grupo CONT-LPS. N=10. ANOVA

8.1.2.- Prueba de campo abierto

Los datos obtenidos en la prueba de campo abierto demostraron que las ratas tratadas con SM y LPS se exponen en menor grado a un ambiente de riesgo, al cruzar significativamente menos veces por el cuadrante central, SM-VEH ($p<0.01$), CONT-LPS ($p<0.01$), SM-LPS ($p<0.01$). Se puede observar que el grupo CONT-VEH atraviesa con una frecuencia mayor que los demás grupos el cuadrante central del campo abierto (Fig.7). En la prueba no hubo diferencias significativas entre grupos en el número de cuadrantes visitados (Fig.8). Podemos concluir a partir de esto que los grupos tratados con los retos de estrés SM y LPS exhiben mayor comportamiento de ansiedad.

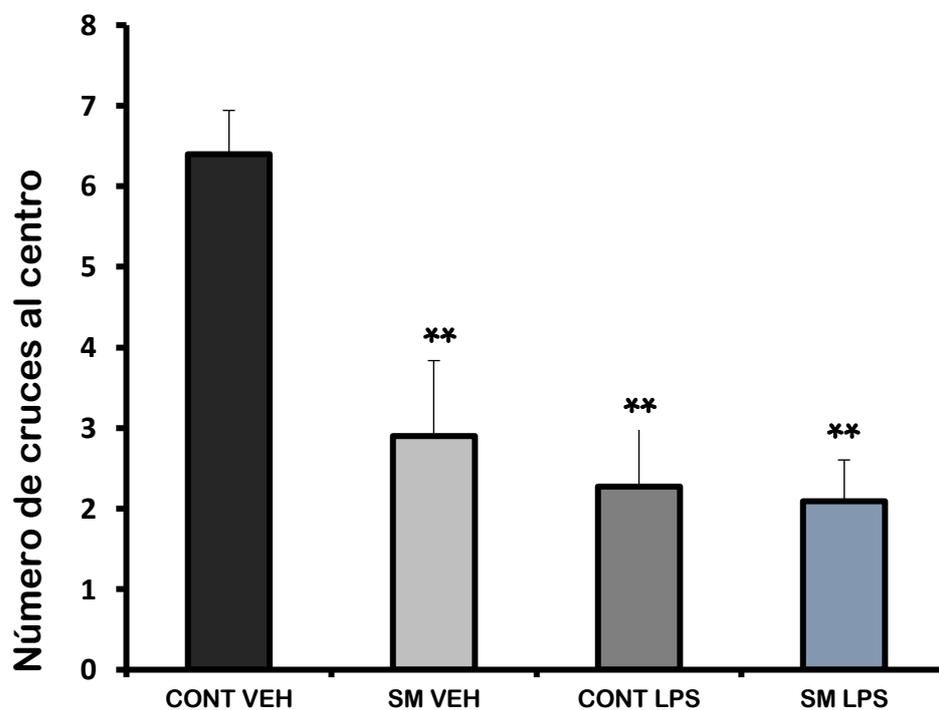


Figura 7. Número de cruces al centro. Se muestran los números de cruces al cuadrante central del OF que tuvieron las ratas de cada grupo respectivamente; se comparan los grupos CONT-VEH, SM-VEH, CONT-LPS y SM-LPS. Se muestran diferencias significativas en los grupos SM-VEH $p<0.01^{**}$, CONT-LPS $p<0.01^{**}$ y SM-LPS $p<0.01^{**}$ comparándolos con el grupo CONT-VEH. N=10. ANOVA

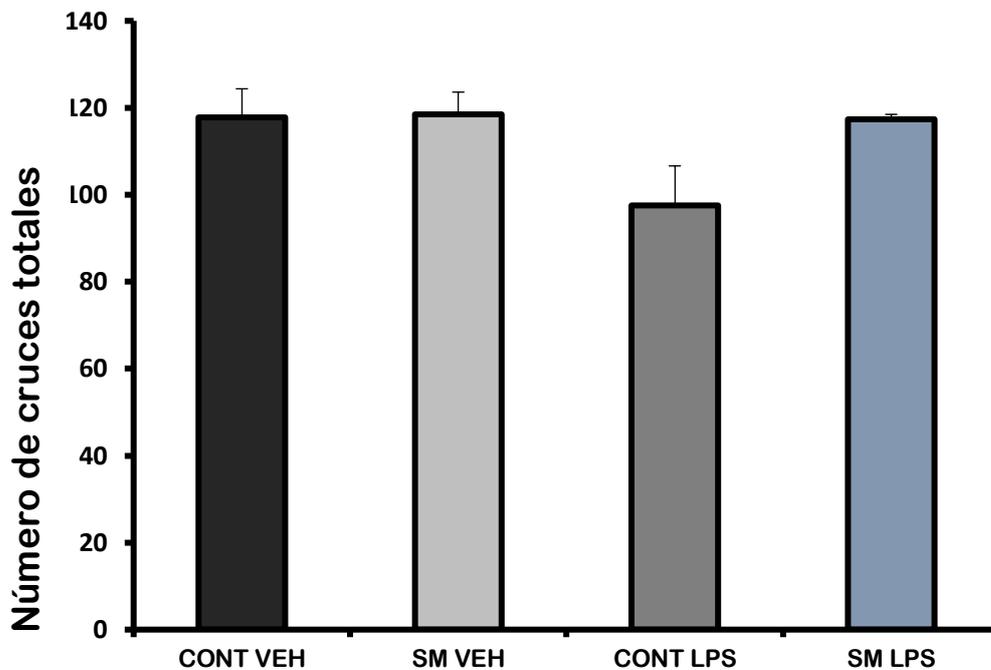


Figura 8. Número de cruces totales. Se muestran los números de cruces totales en todos los cuadrantes del OF que tuvieron las ratas de cada grupo respectivamente; se comparan los grupos CONT-VEH, SM-VEH, CONT-LPS y SM-LPS. No se observaron diferencias significativas entre los grupos. N=10.

8.2.- Evaluación de la conducta tipo depresiva

Investigamos si las ratas, expuestas a los diferentes tratamientos (SM, LPS, SM-LPS), desarrollaban una conducta similar a la depresión. Con este fin, los animales se enfrentaron a la prueba de nado forzado que evalúa la conducta tipo depresiva.

8.2.1.- Prueba de nado forzado

La SM aumentó la conducta tipo depresiva; las ratas que conforman los grupos SM-VEH ($p < 0.01$), SM-LPS ($p < 0.01$) pasaron un mayor tiempo flotando comparado con el grupo CONT-VEH (Fig.9). El LPS no propició una conducta tipo depresiva en las ratas. Los grupos tratados con SM presentaron primero una conducta de desesperanza, tuvieron una menor latencia a flotar SM-VEH ($p < 0.01$), SM-LPS ($p < 0.01$) en comparación con el grupo CONT- LPS; igualmente el grupo SM-VEH mostró una menor latencia comparándolo con el grupo CONT-VEH.

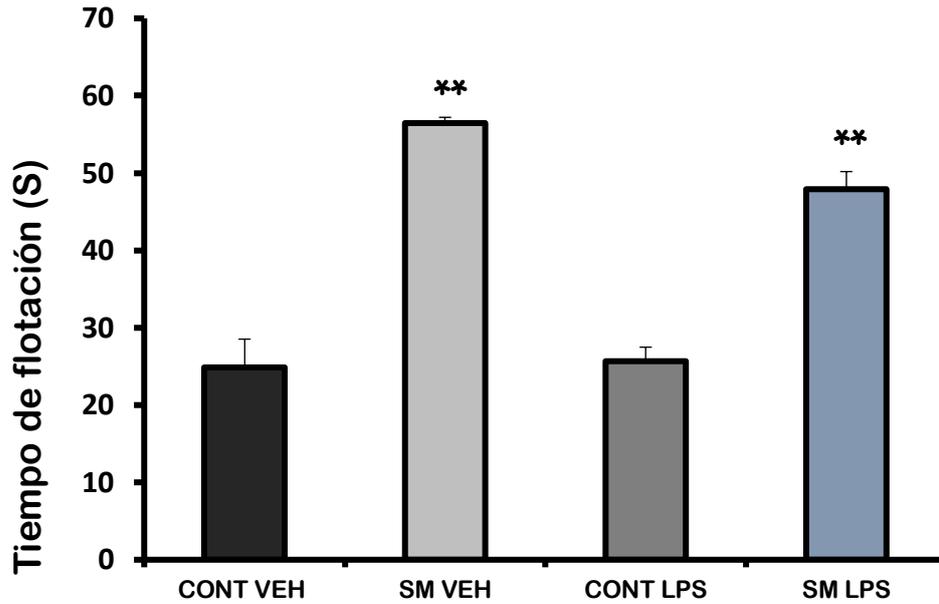


Figura 10. Tiempo de flotación. Se muestra el tiempo total en segundos que las ratas flotaron dentro del tanque, de cada grupo respectivamente. Se comparan los grupos CONT-VEH, SM-VEH, CONT-LPS y SM-LPS. Se muestra una diferencia significativa de los grupos SM-VEH $p < 0.01^{**}$. y SM-LPS $p < 0.01^{**}$ comparándolos con el grupo CONT-VEH $N=10$. ANOVA.

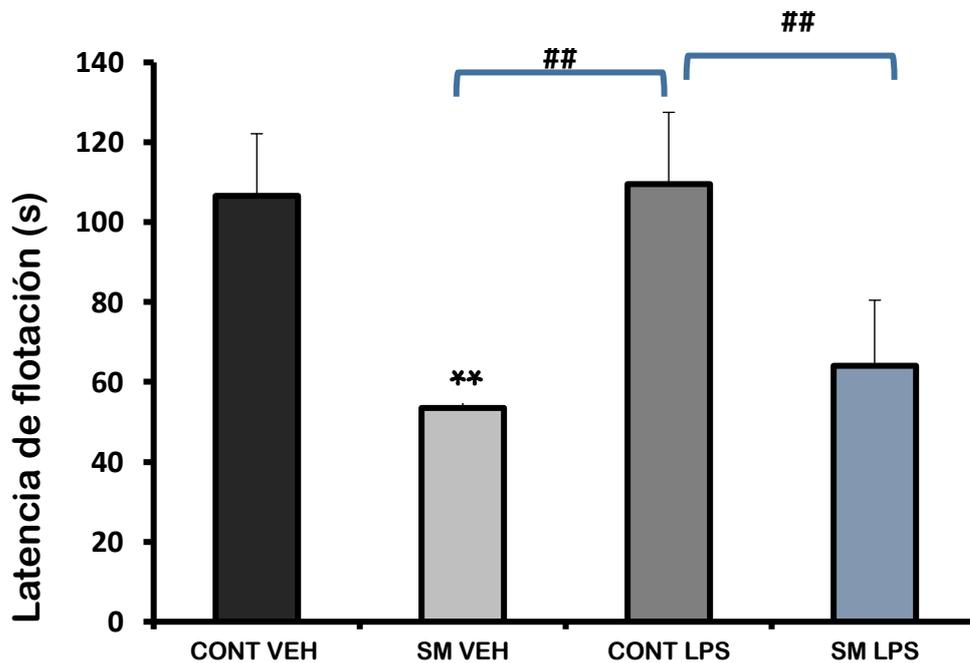


Figura 11. Latencia de flotación. Se muestra la latencia a flotar de los grupos CONT-VEH, SM-VEH, CONT-LPS Y SM-LPS. Se muestra una diferencia significativa del grupo SM-VEH $p < 0.01^{**}$. comparándolo con el grupo CONT-VEH. Se observa una diferencia significativa en los grupos SM-VEH $p < 0.01^{##}$ y SM-LPS $p < 0.01^{##}$ comparándolos con el grupo CONT-LPS. $N=10$. ANOVA.

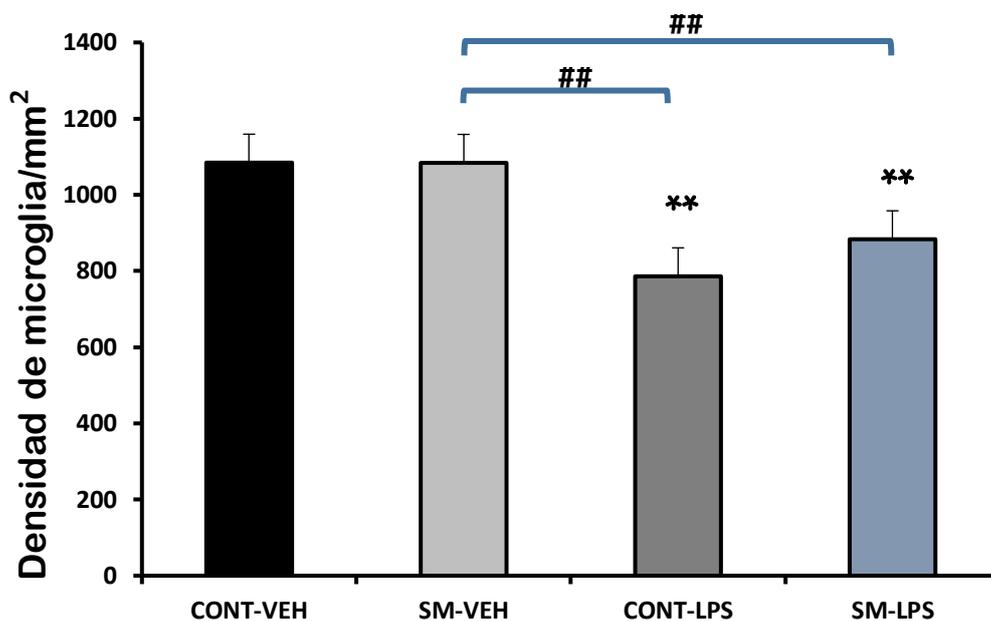
8.3.- Análisis morfológico y densidad de la microglía

Investigamos si los diferentes tratamientos (SM, LPS, SM-LPS) tenían algún efecto en la respuesta microglial. Con este fin, evaluamos la densidad y morfología de las células microgliales en el hipocampo, en las zonas CA3 e *Hilus* del giro dentado de las ratas adultas en condiciones basales y después de ser expuestas a cada uno de los factores estresantes. Mediante inmunotinciones con el anticuerpo policlonal primario anti-Iba1 detectamos el total de las células microgliales y posteriormente realizamos un conteo celular con base en la morfología de la microglía, contando las células activadas (células con soma ameboides, procesos gruesos y cortos) en ambos hemisferios del corte cerebral.

Observamos una menor densidad de células microgliales en los grupos tratados con LPS (CONT-LPS, SM-LPS), sin embargo, no se apreció un cambio en la densidad en el grupo tratado sólo con separación materna (SM-VEH); estos resultados los obtuvimos en ambas zonas analizadas *Hilus* y CA3, del hipocampo (Fig. 12 a, 13 a). La exposición a ambos estresores, LPS y SM, influyeron en el incremento en el porcentaje de activación de las células microgliales en la zona del *Hilus*, en todos los tratamientos se obtuvo un incremento significativo en el porcentaje de activación de las células microgliales SM ($p < 0.01$), LPS ($p < 0.01$), SM-LPS ($p < 0.01$) (Fig. 12 b). Por otra parte, en la zona CA3 del hipocampo no se observó un incremento significativo en la activación microglial en el grupo SM- VEH, pero si en los grupos tratados con LPS, CONT-LPS ($p < 0.01$) y SM-LPS ($p < 0.01$), (Fig. 13 b).

HILUS

a)



b)

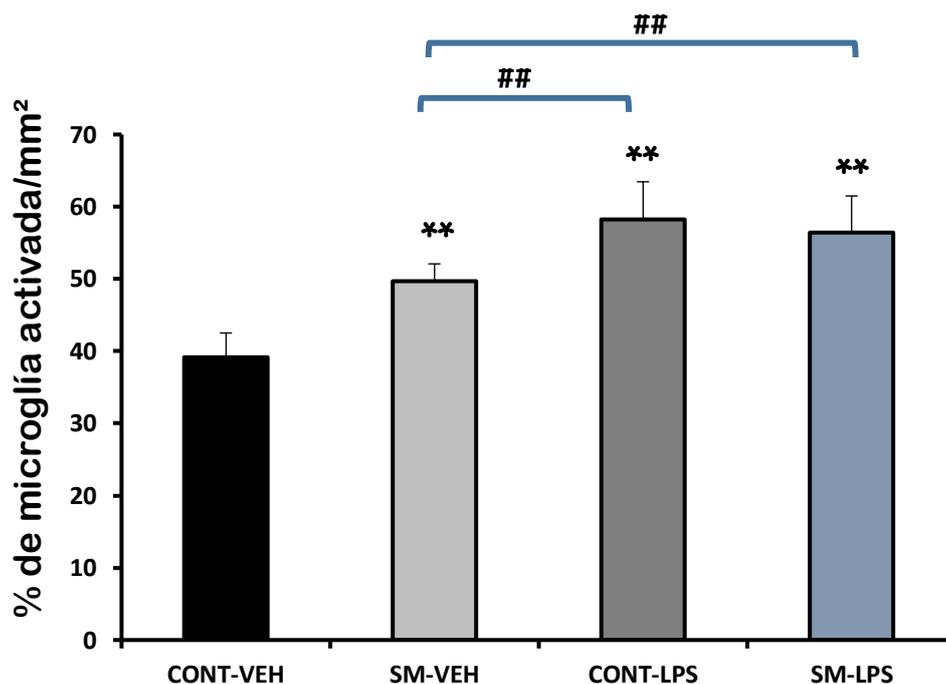


Figura 12. Análisis de la densidad total y porcentaje de activación de las células microgliales en la zona Hilus del hipocampo. Se comparan los grupos CONT-VEH, SM-VEH, CONT -LPS y SM-LPS. En el panel a) se muestra la densidad total de células microgliales. Se muestran diferencias significativas en los grupos CONT-LPS $p < 0.01^{**}$ Y SM-LPS $p < 0.01^{**}$ respecto al grupo CONT-VEH; igualmente, se observan diferencias significativas en los grupos CONT-LPS $p < 0.01^{##}$ y SM-LPS $p < 0.01^{##}$ comparándolos con el grupo SM-VEH. En el panel b) se muestra el porcentaje de activación de las células microgliales. Se observan diferencias significativas en los grupos SM-VEH $p < 0.01^{**}$, CONT-LPS $p < 0.01^{**}$ Y SM-LPS $p < 0.01^{**}$ respecto al grupo CONT-VEH; también, se observan diferencias significativas en los grupos CONT-LPS $p < 0.01^{##}$ y SM-LPS $p < 0.01^{##}$ al compararlo con el grupo SM-VEH. N=8 ANOVA.

CA3

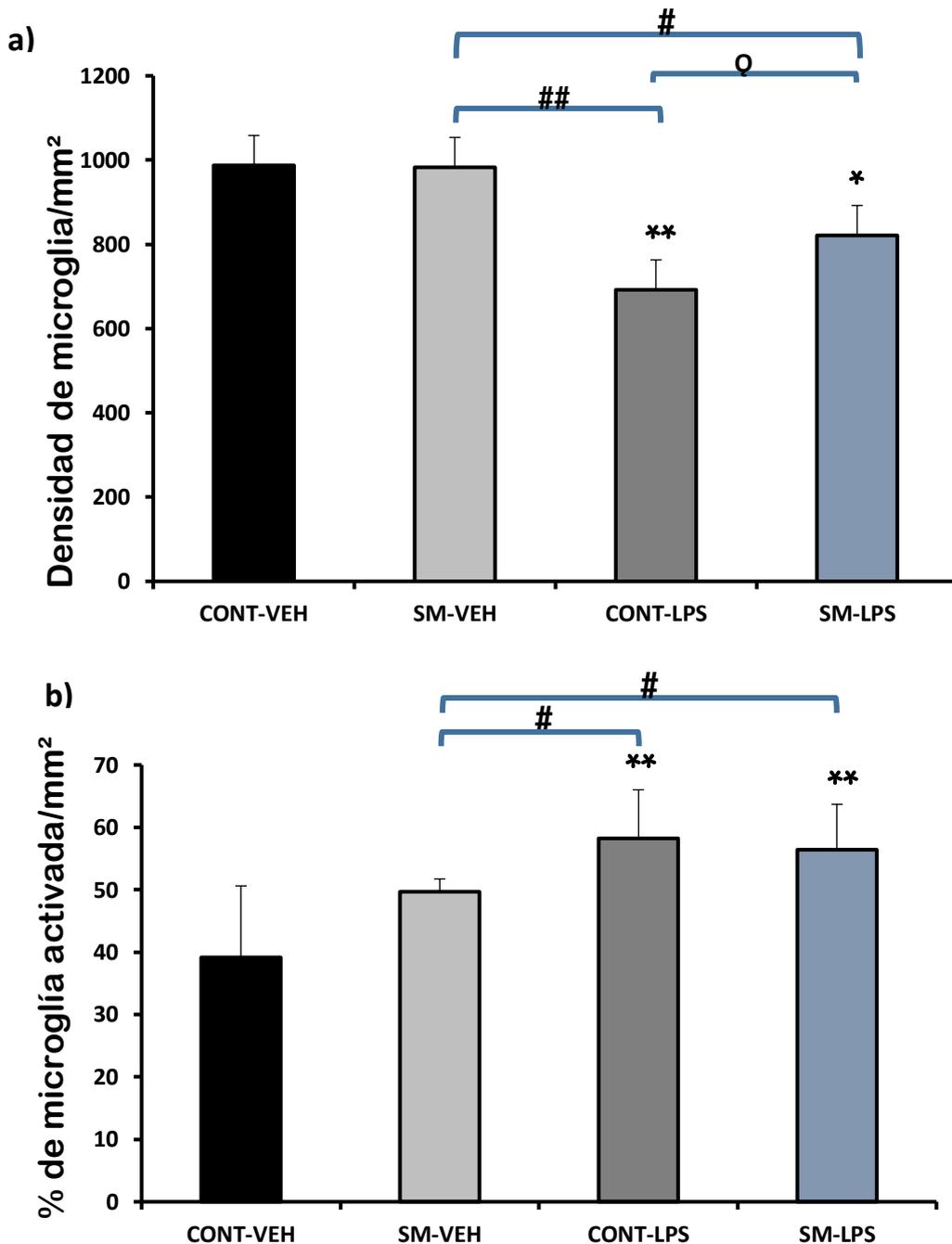


Figura 13. Análisis de la densidad total y porcentaje de activación de las células microgliales en la zona CA3 del hipocampo. Se comparan los grupos CONT-VEH, SM-VEH, CONT -LPS y SM-LPS. En el panel a) se muestra la densidad total de células microgliales. Se muestran diferencias significativas en los grupos CONT-LPS $p < 0.01^{**}$ Y SM-LPS $p < 0.05^{*}$ respecto al grupo CONT-VEH, se observan diferencias significativas en los grupos CONT-LPS $p < 0.01^{##}$ y SM-LPS $p < 0.05^{#}$ comparándolos con el grupo SM-VEH; igualmente, se muestra una diferencia significativa entre el grupo SM-LPS $p < 0.05^{Q}$ respecto al grupo CONT-LPS. En el panel b) se muestra el porcentaje de activación de las células microgliales. Se muestran diferencias significativas en los grupos CONT-LPS $p < 0.01^{**}$ Y SM-LPS $p < 0.01^{**}$ respecto al grupo CONT-VEH; también, se observan diferencias significativas en los grupos CONT-LPS $p < 0.05^{#}$ y SM-LPS $p < 0.05^{#}$ comparándolos con el grupo SM-VEH. N=8 ANOVA

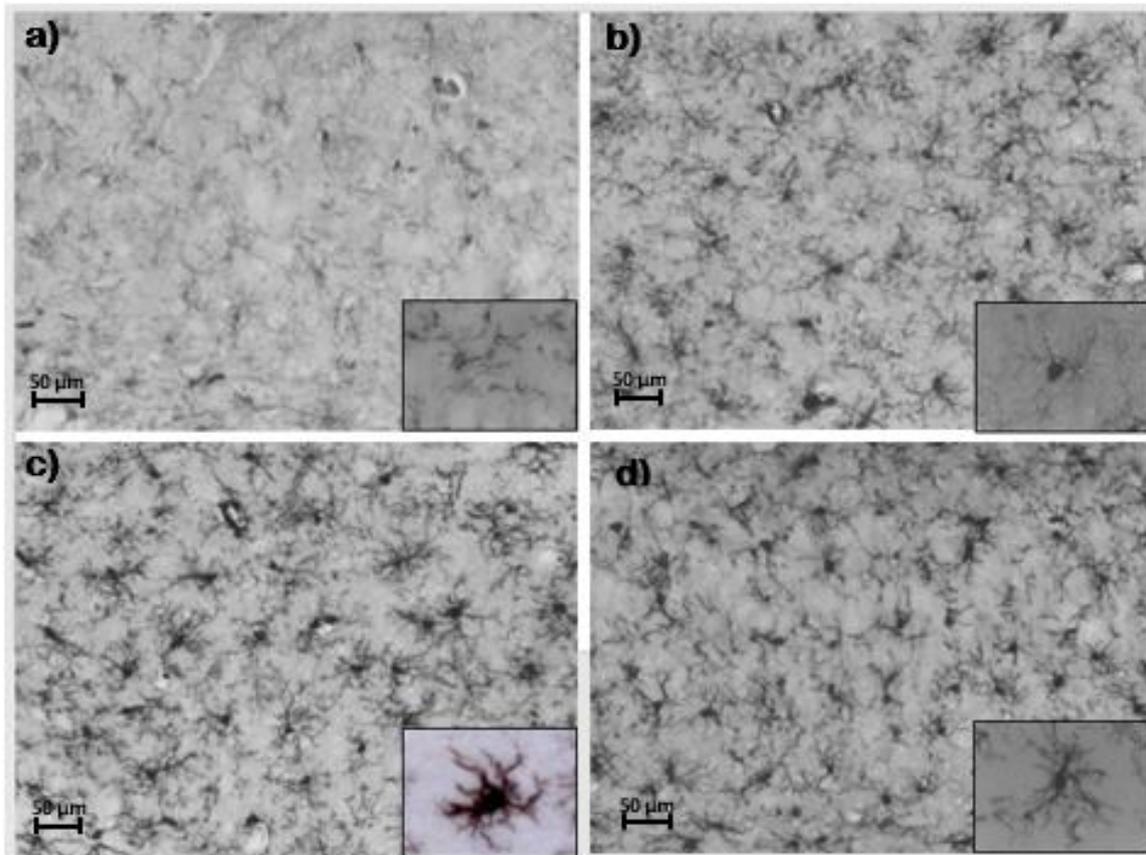


Figura 14. Fotomicrografías de las células microgliales en la zona del *Hilus* del hipocampo. Se muestra la morfología de las células microgliales (observadas a 20X, inserto a 100X) de las ratas no tratadas (CONT-VEH). Panel a). Se observan las células con un soma pequeño y más ramificado. Se muestran las células microgliales después de la exposición a los diferentes tratamientos: SM en el panel b), LPS en el panel c) y SM-LPS en el panel d), la morfología celular cambia a un soma amebioide con procesos gruesos y cortos.

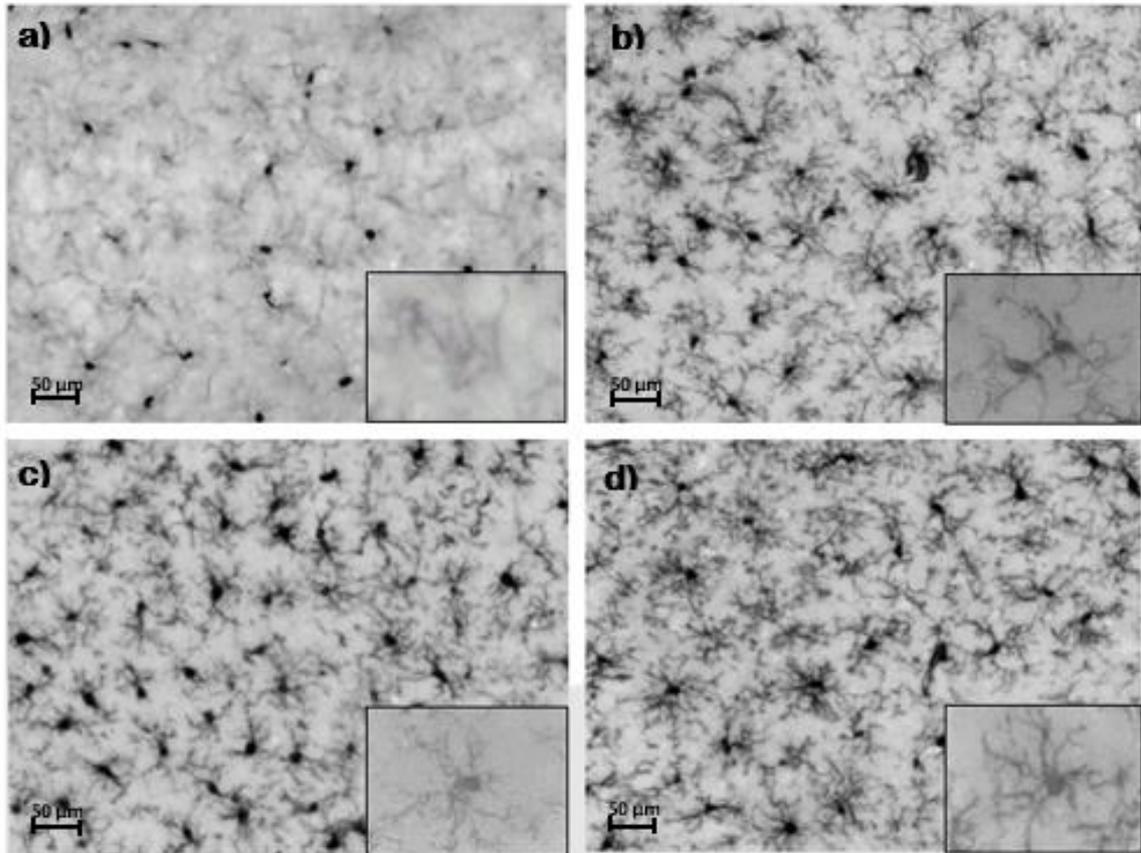


Figura 15. Fotomicrografías de las células microgliales en la zona CA3 del hipocampo. Se muestra la morfología de las células microgliales (observadas a 20X, inserto a 100X) en las ratas no tratadas (CONT-VEH) en el panel a) y después de la exposición a los diferentes tratamientos: SM en el panel b), LPS en el panel c) SM-LPS en el panel d). En el panel a) se observan con un soma pequeño con procesos delgados, largos y ramificados; en los siguientes paneles muestran un soma crecido, ameboides, con procesos gruesos y retraído

IX. DISCUSIÓN

Investigaciones en ratas demuestran que la SM y la exposición a infecciones en etapas tempranas de la vida son factores estresantes que predisponen al individuo a presentar en la etapa adulta alteraciones en la conducta, tales como la ansiedad y la depresión (Lippmann et al., 2007; Wang et al., 2013). Se ha hipotetizado que la suma de dos o más eventos adversos aumenta la carga alostática o de estrés acumulativo, lo que predispone a padecer alguna psicopatología (McEwen, 1999); sin embargo, se sabe poco acerca de cómo el estrés inducido por la suma de dos estresores, la SM y el LPS, pueden alterar el desarrollo normal cerebral durante las etapas tempranas de la vida e inducir una mayor vulnerabilidad a padecer ansiedad y/o depresión. Además, en los humanos un predictor importante de la susceptibilidad de un individuo es su sexo, las mujeres muestran tasas más altas de ansiedad y depresión (Astbury, 2001; Eaton, 2012). Por ello, el objetivo de esta investigación fue observar el impacto sobre las conductas de ansiedad y depresión, así como la evaluación de la respuesta microglial observable en el hipocampo en ratas hembras adultas, al ser expuestas en la etapa neonatal a dos retos y la suma de ellos, el reto de estrés SM y el reto inmune LPS.

Desde el trabajo de Spitz, ya se reconocía el comportamiento depresivo en los niños cuando eran separados de su madre (Spitz, 1946); más adelante, se conoció que la exposición a factores estresantes durante la etapa temprana, que involucran la relación de apego a la madre, aumentaba el riesgo de enfermedades, como depresión en la vida adulta (Agid et al., 1999; Gilman et al., 2003). Para determinar si el reto SM puede influir en la probabilidad de presentar una conducta de ansiedad o una conducta tipo depresiva en la etapa adulta, las ratas fueron expuestas a SM 3h al día, en los días posnatales 1 al 14; la conducta de ansiedad fue evaluada en las pruebas de campo abierto y laberinto elevado en cruz, la conducta tipo depresiva se evaluó en la prueba de nado forzado; las pruebas se realizaron a partir de los 5 meses de edad. Determinamos que la SM puede provocar conductas de ansiedad y tipo depresiva en las ratas, observamos menos entradas al brazo abierto en el laberinto elevado en cruz (EPM) y entraron menos al cuadrante central en el campo abierto (OFT). La SM mostró una conducta tipo depresiva al compararla con los demás grupos.

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos en investigaciones siguiendo el mismo modelo. La SM 3 h diarias durante los primeros 14 días de vida, han mostrado alteraciones en la conducta de ansiedad (Lippman et al., 2007). Las ratas machos Long-Evans presentaron una conducta de ansiedad evaluadas en la edad adulta en el EPM (Kalinichev et al., 2002). Así mismo, siguiendo el mismo modelo de SM, otros estudios que evaluaron el comportamiento relacionado con la ansiedad y la depresión observaron una conducta de ansiedad y una conducta

tipo depresiva en las ratas adultas (Vetulani, 2013; Lee et al., 2007; Díaz Lujan et al., 2008; Liu et al., 2017).

Sin embargo, existen algunos estudios controversiales donde ratas sometidas a SM no mostraron una conducta de ansiedad; por ejemplo, hembras expuestas a SM (6 h al día durante 21 días) exhiben una menor conducta de ansiedad (Moreno et al., 2009). Es probable que estas diferencias en los resultados provengan de la duración y el período de exposición a la SM (Auth et al., 2018), al igual que del género y la cepa de ratas que se utilizó (Lehmann y Feldon, 2000). Haciendo hincapié en la discrepancia que podría deberse al sexo, se ha demostrado que los cambios en los niveles de progesterona y estrógeno tienen un impacto directo en la forma en que las hembras responden al estrés y esta respuesta es dependiente de la etapa del ciclo estral (Viau y Meaney, 1991). Aunque las ratas hembra tratadas en nuestro estudio fueron evaluadas solamente cuando se encontraban en la fase de diestro de su ciclo estral, debido a la evidencia de que en este periodo los comportamientos de las hembras son más homogéneos con los machos (Gouveia et al., 2004).

Las ratas hembras Long-Evans sometidas a SM en los días PN 3-15, además de mostrar una conducta de ansiedad, tenían niveles más altos de corticosterona (CORT) y ACTH que los machos (Slotten et al., 2006). Otros estudios, igualmente, obtuvieron los mismos resultados; la SM condujo al aumento de las hormonas ACTH y CORT (Lippmann et al., 2007; Tractenberg et al., 2016). El aumento de estas hormonas, ACTH Y CORT, pueden provocar una respuesta exagerada del eje HPA al estrés (Plotsky et al., 1993); además, podría ser adaptativa e influir en futuras respuestas (McEwen y Gianaros, 2010). También, la SM, puede afectar la regulación neuroendocrina, incluida la regulación positiva del receptor de glucocorticoides (GR) y el factor liberador de corticotropina (CRF), este último sugerido como un factor crucial que determina el efecto de los estresores tempranos en la depresión y los trastornos de ansiedad (Bradley et al., 2008). Siguiendo esto, el mecanismo a padecer ansiedad y depresión en la edad adulta tras la adversidad temprana quizás subyace en los cambios neuroendocrinos inducidos por la SM en la etapa posnatal.

El LPS es una molécula glicolípida anclada a la membrana externa de las bacterias Gram negativas y es considerada como su antígeno de superficie más importante (Raetz y Whitfield, 2002). La estimulación del sistema inmune en etapas tempranas, utilizando el LPS, activa el sistema neuroendocrino del estrés y puede programar las respuestas del individuo en la etapa adulta (Sominsky et al., 2013). La "programación perinatal" es un proceso que describe cómo las condiciones ambientales tempranas de la vida pueden producir alteraciones fisiológicas a largo plazo que mejoran o inhiben el funcionamiento adaptativo (Walker et al., 2010). La exposición a LPS en etapas tempranas es un modelo animal que se utiliza para examinar el impacto en las funciones fisiológicas y en la conducta de la "programación perinatal" en la etapa adulta (Sominsky et al., 2013).

Investigamos si el LPS puede influir en la probabilidad de presentar una conducta de ansiedad o tipo depresiva en la edad adulta, para ello las ratas fueron inyectadas con LPS (0.5 mg/kg) el día PN 14; la conducta tipo de ansiedad fue evaluada en las pruebas de OFT y EPM, la conducta tipo depresiva se evaluó en la prueba de nado forzado y las pruebas se realizaron a partir de los 5 meses de edad. Encontramos que las ratas expuestas a LPS muestran comportamientos relacionados con la ansiedad; así mismo, mostraron una conducta de ansiedad comparado con el grupo expuesto a SM. El LPS no propició el aumento de la conducta tipo depresiva. Nuestros resultados se suman a los obtenidos de otras investigaciones en respuesta a la exposición neonatal del LPS. Por ejemplo, en un estudio observaron una conducta de ansiedad en ratas hembra inyectadas con LPS (Benmhammed et al., 2019). También, se ha encontrado que los efectos de la exposición a LPS en las etapas tempranas de la vida puede transmitirse a la descendencia y, en la edad adulta, también presentan un comportamiento similar a la ansiedad (Walker et al., 2004). Además, el efecto del LPS en las conductas de ansiedad y depresión puede agravarse si se presenta nuevamente un factor de estrés. Por ejemplo, las ratas tratadas con LPS los días posnatales 3 y 5, expuestas a situaciones de estrés en la edad adulta, exhibieron un incremento de la conducta tipo ansiosa (Walker et al., 2009).

La exposición al LPS, en la etapa prenatal, incrementó los niveles fetales de citoquinas afectando el desarrollo cerebral, así como el comportamiento de ansiedad a largo plazo (Izvolkskaia, et al 2018). Además, la inyección única de LPS en el día 9 de gestación resultó en una mayor conducta de ansiedad (Depino, 2015). Estudios demuestran que la exposición neonatal al LPS interviene en el aumento del funcionamiento del eje HPA, un aumento en la fosforilación y actividad de TH, así como niveles elevados de corticosterona circulante (Sominsky et al., 2013). También, el LPS aumentó la expresión alterada de la subunidad $\alpha 2$ del receptor GABA-A, el receptor de CRH tipo 1, la proteína de unión a CRH y los niveles de ARNm del receptor de glucocorticoides en la corteza prefrontal, el hipocampo y el hipotálamo (Shanks et al., 1995). Por ello nuestro trabajo de tesis, con base a estas investigaciones, reitera la importancia de considerar a la exposición en el período postnatal a un desafío inmunológico, LPS, como un factor de riesgo para presentar los trastornos de ansiedad y depresión en la vida adulta.

Se ha hipotetizado que la suma de dos o más eventos adversos aumenta la carga alostática o de estrés acumulativo, lo que predispone a padecer alguna psicopatología (McEwen, 1999). La carga alostática es el resultado a largo plazo de una adaptación fallida a los desafíos ambientales y psicosociales expuestos en la vida (Logan et al., 2008) y si se toma en cuenta la transición de cambios fisiológicos y conductuales de la infancia a la edad adulta, la experiencia frente a nuevos factores de estrés podría aumentar la reactividad al estrés, incrementando la predisposición a la ansiedad y la depresión en la edad adulta (Holder, & Blaustein, 2014). Existen estudios sobre el efecto de la

SM y el LPS sobre las conductas de ansiedad y depresión en la edad adulta; pero la investigación de las consecuencias en la respuesta neuroinmune y la conducta en modelos utilizando la combinación de un desafío estrés-inmune (SM y LPS) durante la vida temprana recién comienza.

Para estudiar el impacto sobre las conductas de ansiedad y depresión en ratas hembra adultas expuestas a un doble reto, sometimos a las ratas a SM (3h al día, en los días posnatales 1 al 14) y las expusimos a un reto inmune con LPS (0.5 mg/kg, intraperitoneal, el día posnatal 14), la conducta tipo ansiosa fue evaluada en las pruebas de OFT y EPM, la conducta tipo depresiva se evaluó en la prueba de nado forzado. Observamos que las ratas tratadas con el doble reto SM-LPS exhibieron una conducta de ansiedad y tipo depresiva en la edad adulta. Nuestros resultados concuerdan con otros grupos donde se evaluaron las conductas de ansiedad y tipo depresiva en ratas Wistar macho y hembra sometidas a los retos LPS, deprivación materna (DM) y la combinación de ambos; observaron en las ratas tratadas con SM-LPS una conducta de ansiedad y una conducta tipo depresiva, pero la combinación de ambos retos condujo a una menor ansiedad por el doble reto, en ambos sexos (Benmhammed et al., 2019). Por otra parte, en nuestros resultados obtuvimos que el doble reto SM-LPS predispone a padecer una conducta tipo depresiva en la edad adulta, pero el LPS atenúa la respuesta del primer evento adverso SM; hipotetizamos que la experiencia de un factor de estrés en la vida temprana puede promover una adaptación predictiva para ciertos individuos a un nuevo evento adverso, teoría del “emparejamiento / desajuste”, creando una resistencia a un nuevo desafío en la edad adulta; pero también cuando se produce un desajuste entre la experiencia temprana y la posterior la vulnerabilidad aumenta (Sangenstedt et al., 2018).

En nuestro laboratorio se investigó previamente la respuesta neuroinmune al doble reto SM-LPS en ratas macho. Se encontró que el LPS aumentó la interleucina plasmática (IL) -1β , el factor de necrosis tumoral α e IL-6, y la proteína IL- 1β ; también en la exposición al doble reto SM-LPS, la SM atenuó la respuesta neuroinmune inducida por la administración de LPS (Saavedra et al., 2017). Otros autores administrando LPS (100 μ g / kg, PN14), observaron una conducta de ansiedad y tipo depresiva en la etapa adulta, también demostraron que el LPS indujo un aumento en los niveles plasmáticos de IL-6, TNF- α , IL- 1β e IL-10 (Dinel et al., 2016). Lo que nos sugiere que la atenuación en la respuesta del doble reto involucra a los mediadores del sistema inmunológico, al sistema nervioso autónomo y al eje HPA, (Maras y Baram, 2012). Por ejemplo, en el período sensible de hipo-respuesta al estrés (SHRP) que abarca desde el posnatal 3-14 en ratas, período en el cual aplicamos nuestros retos, podría ocurrir una adaptación o una respuesta profunda en la edad adulta dependiente del aumento de corticosterona (Levine, 2001; de Kloet et al, 2005). Así mismo, la experiencia adversa en la vida temprana podría inducir cambios epigenéticos subyacentes a las respuestas adaptativas predictivas, lo

que podría llevar a cambios individuales en el comportamiento, la cognición y la fisiología (Gluckman et al., 2009). Por lo tanto, los individuos con cambios epigenéticos, en un ambiente estresante por un lado aumentarán la predisposición a la psicopatología (vulnerabilidad), pero por otro lado también aumentarán la sensibilidad a los efectos beneficiosos del ambiente estresante (resiliencia) (Belsky et al., 2009). Incluso, investigaciones han revelado que los mediadores y sus receptores del eje HPA son los principales objetivos de la modificación epigenética (Murgatroyd y Spengler, 2012). Pero por ahora ninguna de las teorías ha sido demostrada completamente, aún no se ha descubierto como ocurre la modulación epigenética precisamente (Franklin et al., 2012) y son necesarios más estudios que nos ayuden a comprender la incógnita de la atenuación de la respuesta del doble reto SM-LPS en la conducta.

El estrés en la etapa temprana puede causar cambios conductuales y morfológicos de larga duración en las regiones del cerebro que son centros de regulación emocional, como el hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal (Wang y Schmidt 2016). Las células microgliales son consideradas el sistema inmunológico del sistema nervioso central (SNC), responden rápidamente a los insultos como infecciones, estrés y lesiones, lo que las convierte en importantes moduladores de las respuestas de neuroinflamación. Cuando se activan se someten a cambios morfológicos en respuesta al estrés y a enfermedades agudas y crónicas (Suzuki, 2005).

En nuestros resultados, al ser expuestas las ratas a SM encontramos que la respuesta microglial varía de acuerdo con el área hipocampal analizada; en *Hilus*, la SM influyó en una mayor activación de microglía y no se mostraron cambios en la densidad, en cambio, en CA3 no se mostró un aumento significativo en el porcentaje de activación y tampoco hubo cambios en la densidad. Estos datos sustentan parcialmente los resultados previos en nuestro laboratorio, los cuales observaron que la SM (3 h / día, PD1-PD14) aumenta el porcentaje de microglía activada en el *Hilus* y la región CA3 (Saavedra et al., 2017). Por su parte, con el estresor LPS, se observó una menor densidad y una mayor activación de células microgliales en ambas zonas analizadas; coincide con lo demostrado anteriormente por nuestro equipo de trabajo, donde se sostiene que el LPS estimuló una mayor activación de células microgliales, aunque se observó disminuida su densidad en el hipocampo (Saavedra et al., 2017). De igual manera también concuerdan con varios estudios donde se ha demostrado que la administración de LPS activa la microglía (Qin et al 2007; Badshah et al., 2016) induciendo el aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias, como TNF- α , COX-2, NOS-2 e IL-1 β (Badshah et al., 2016). Esta evidencia indica que la exposición neonatal a LPS da como resultado una respuesta inmediata y sostenida del SNC (Sominsky et al., 2012); lo que podría llevar a la neurodegeneración mediada por la neuroinflamación (Qin et al., 2007)

El doble reto SM-LPS, indujo una mayor activación microglial, y la SM atenuó la liberación inducida por LPS de citoquinas proinflamatorias en el hipocampo (Saavedra et al., 2017). Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos anteriormente en este estudio, debido a que se observa un incremento de la microglía activada, aunque se esperaba un aumento debido a la suma de los estresores; por lo tanto, la SM podría sensibilizar a las células microgliales a un segundo desafío, induciendo una respuesta diferente (Gadek-Michalska et al., 2015). Nuestros resultados también coinciden con observaciones previas, donde se afirma que la exposición a un segundo desafío con LPS en la etapa adulta indujo una mayor activación de las células microgliales (Bilbo et al., 2012); al igual, Sominsky creía que el aumento del estado inflamatorio del cerebro en una edad temprana, causado por cada estímulo continuaba hasta la edad adulta (Sominsky et al., 2012). Por otra parte, observamos en ambas zonas analizadas el cambio morfológico de la microglía activada, en los grupos SM-VEH, CONT-LPS y SM-LPS, la microglía posee un cuerpo amebosoide y ramificaciones gruesas y retraídas; los cambios morfológicos observados en esta respuesta microglial fueron también descritos en ratas macho (Saavedra et al., 2021).

El estrés en etapas tempranas de la vida como la separación materna y el LPS pueden conducir a conductas de ansiedad y depresión en la edad adulta, que subyacen probablemente de una respuesta neuroinmune exagerada, donde se ve implicada la sobreactivación microglial. En respuesta, al activarse la microglía, puede causar una neuroinflamación crónica debido a una sobreactivación y/o a una proliferación sostenida, así la microglía activada puede generar una condición neurodegenerativa (Badshah et al., 2016); de tal forma que conduce a la expresión exagerada de mediadores proinflamatorios como las citocinas y las especies reactivas de oxígeno y por lo tanto, el estrés en etapas tempranas de la vida puede potencialmente afectar la respuesta inmune cambiando permanentemente la estructura y función del cerebro (Mayo L et al; 2012). Al igual se debe considerar las diferencias de sexo que pueden influir en la respuesta inflamatoria a los insultos agudos, por ejemplo, las hembras tienen niveles más altos de citoquinas antiinflamatorias y Th2 (Kadioglu et al., 2011; Marriott & Huet-Hudson, 2006) y la función del hipocampo es relativamente menos sensible a la adversidad en la vida temprana en las hembras (Loi et al., 2015).

X. CONCLUSIÓN

Durante la etapa temprana de la vida, la separación materna y la exposición a un desafío de estrés inmunológico LPS, derivan en una conducta de ansiedad y tipo depresiva en la etapa adulta; induciendo cambios morfológicos en las células microgliales en las áreas del *Hilus* y CA3 del hipocampo, activándolas, con formas ameboides y procesos gruesos. Los resultados de atenuación al doble insulto, donde se preveía una respuesta conductual exacerbada y una mayor activación microglial, podrían deberse a una respuesta inmune adaptativa.

XI. REFERENCIAS

1. Ader, R., & Cohen, N. (1993). Psychoneuroimmunology: conditioning and stress. *Annual review of psychology*, 44, 53–85. DOI: [10.1146/annurev.ps.44.020193.000413](https://doi.org/10.1146/annurev.ps.44.020193.000413)
2. Agid, O., Shapira, B., Zislin, J., Ritsner, M., Hanin, B., Murad, H., Troudart, T., Bloch, M., Heresco-Levy, U., & Lerer, B. (1999). Environment and vulnerability to major psychiatric illness: a case control study of early parental loss in major depression, bipolar disorder and schizophrenia. *Molecular psychiatry*, 4(2), 163–172. DOI: [10.1038/sj.mp.4000473](https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000473)
3. Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Río, J., & Ramírez, M. J. (2008). Effects of maternal separation on hypothalamic-pituitary-adrenal responses, cognition and vulnerability to stress in adult female rats. *Neuroscience*, 154(4), 1218–1226. DOI: [10.1016/j.neurociencia.2008.05.011](https://doi.org/10.1016/j.neurociencia.2008.05.011)
4. Angold, A., & Costello, E. J. (2006). Puberty and depression. *Child and adolescent psychiatric clinics of North America*, 15(4), 919–ix. DOI: [10.1016/j.chc.2006.05.013](https://doi.org/10.1016/j.chc.2006.05.013)
5. Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783–801. DOI: [10.1016/j.cell.2006.02.015](https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015)
6. Arrieta, M. C., Stiemsma, L. T., Dimitriu, P. A., Thorson, L., Russell, S., Yurist-Doutsch, S., Kuzeljevic, B., Gold, M. J., Britton, H. M., Lefebvre, D. L., Subbarao, P., Mandhane, P., Becker, A., McNagny, K. M., Sears, M. R., Kollmann, T., CHILD Study Investigators, Mohn, W. W., Turvey, S. E., & Finlay, B. B. (2015). Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. *Science translational medicine*, 7(307), 307ra152. DOI: [10.1126/scitranslmed.aab2271](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aab2271)
7. Astbury J. Mesa. (2001). Ensamble Mundial de la Salud. QUIEN; Ginebra, Suiza. Disparidades de género en la salud mental. *Salud mental*; pp. 73-92
8. Auth, C. S., Weidner, M. T., Popp, S., Strekalova, T., Schmitt-Böhrer, A. G., van den Hove, D., Lesch, K. P., & Waider, J. (2018). Differential anxiety-related behaviours and brain activation in Tph2-deficient female mice exposed to adverse early environment. *European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 28(11). Doi: [10.1016/j.eurpsy.2019.112086](https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2019.112086)
9. Badshah, H., Ali, T., Shafiq-ur Rehman, Faiz-ul Amin, Ullah, F., Kim, T. H., & Kim, M. O. (2016). Protective Effect of Lupeol Against Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation via the p38/c-Jun N-Terminal Kinase Pathway in the Adult Mouse Brain. *Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on*

NeuroImmune Pharmacology, 11(1), 48–60. DOI: [10.1007 / s11481-015-9623-z](https://doi.org/10.1007/s11481-015-9623-z)

10. Bale, T. L., & Vale, W. W. (2004). CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 44, 525–557. DOI: [10.1146 / annurev.pharmtox.44.101802.121410](https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121410)
11. Bale, T. L., & Epperson, C. N. (2015). Sex differences and stress across the lifespan. *Nature neuroscience*, 18(10), 1413–1420. DOI: [10.1038 / nn.4112](https://doi.org/10.1038/nn.4112)
12. Bekhbat, M., & Neigh, G. N. (2018). Sex differences in the neuro-immune consequences of stress: Focus on depression and anxiety. *Brain, behavior, and immunity*, 67, 1–12. DOI: [10.1016 / j.bbi.2017.02.006](https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.02.006)
13. Bekker, M. H., & van Mens-Verhulst, J. (2007). Anxiety disorders: sex differences in prevalence, degree, and background, but gender-neutral treatment. *Gender medicine*, 4 Suppl B, S178–S193. DOI: [10.1016 / s1550-8579 \(07\) 80057-x](https://doi.org/10.1016/s1550-8579(07)80057-x)
14. Belsky, J., Jonassaint, C., Pluess, M., Stanton, M., Brummett, B., & Williams, R. (2009). Vulnerability genes or plasticity genes. *Molecular psychiatry*, 14(8), 746–754. DOI: [10.1038 / mp.2009.44](https://doi.org/10.1038/mp.2009.44)
15. Benmhammed, H., El Hayek, S., Nassiri, A., Bousalham, R., Mesfioui, A., Ouichou, A., & El Hessni, A. (2019). Effects of lipopolysaccharide administration and maternal deprivation on anxiety and depressive symptoms in male and female Wistar rats: Neurobehavioral and biochemical assessments. *Behavioural brain research*, 362, 46–55. DOI: [10.1016 / j.bbr.2019.01.005](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.01.005)
16. Bilbo, S. D., Smith, S. H., & Schwarz, J. M. (2012). A lifespan approach to neuroinflammatory and cognitive disorders: a critical role for glia. *Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 7(1), 24–41. DOI: [10.1007 / s11481-011-9299-y](https://doi.org/10.1007/s11481-011-9299-y)
17. Boche D, Perry VH, Nicoll JA (2013) Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 39:3–18. DOI: [10.1111 / nan.12011](https://doi.org/10.1111/nan.12011)
18. Block ML, Zecca L, Hong JS. (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8(1):57–69. DOI: [10.1038 / nrn2038](https://doi.org/10.1038/nrn2038)
19. Bradley, R. G., Binder, E. B., Epstein, M. P., Tang, Y., Nair, H. P., Liu, W., Gillespie, C. F., Berg, T., Evces, M., Newport, D. J., Stowe, Z. N., Heim, C. M., Nemeroff, C. B., Schwartz, A., Cubells, J. F., & Ressler, K. J. (2008). Influence of child abuse on adult depression: moderation

- by the corticotropin-releasing hormone receptor gene. *Archives of general psychiatry*, 65(2), 190–200.
20. Brown GC, Neher JJ. (2010) Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. *Mol Neurobiol* 41(2–3):242–247. DOI: [10.1007 / s12035-010-8105-9](https://doi.org/10.1007/s12035-010-8105-9)
 21. Cannon WB. (1929) The sympathetic division of the autonomic system in relation to homeostasis. *Arch Neurol Psychiatry* 22: 282-294.
 22. Cannon WB. (1932). *The wisdom of the body*. Nueva York: WW Norton.
 23. Charmandari, E., Tsigos, C., & Chrousos, G. (2005). Endocrinology of the stress response. *Annual review of physiology*, 67, 259–284. DOI: [10.1146 / annurev.physiol.67.040403.120816](https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.040403.120816)
 24. Chiang, J. J., Taylor, S. E., & Bower, J. E. (2015). Early adversity, neural development, and inflammation. *Developmental psychobiology*, 57(8), 887–907. DOI: [10.1002 / dev.21329](https://doi.org/10.1002/dev.21329)
 25. Chrousos G. P. (1995). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *The New England journal of medicine*, 332(20), 1351–1362. DOI: [10.1056 / NEJM199505183322008](https://doi.org/10.1056/NEJM199505183322008)
 26. Cooper, M. S., & Stewart, P. M. (2003). Corticosteroid insufficiency in acutely ill patients. *The New England journal of medicine*, 348(8), 727–734. DOI: [10.1056 / NEJMra020529](https://doi.org/10.1056/NEJMra020529)
 27. Coutinho, A. E., & Chapman, K. E. (2011). The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Molecular and cellular endocrinology*, 335(1), 2–13. DOI: [10.1016 / j.mce.2010.04.005](https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.04.005)
 28. Cruz-Morales, S. E.; González-Reyes, M. R.; Gómez-Romero, J. & Arriaga, J. C. (2003). Modelos de Ansiedad. *Revista Mexicana de Análisis de la conducta*, 28(1), 93-105. <http://rmac-mx.org/modelos-de-ansiedad/>
 29. Czirr, E., & Wyss-Coray, T. (2012). The immunology of neurodegeneration. *The Journal of clinical investigation*, 122(4), 1156–1163. DOI: [10.1172 / JCI58656](https://doi.org/10.1172/JCI58656)
 30. Danese, A., & McEwen, B. S. (2012). Adverse childhood experiences, allostasis, allostatic load, and age-related disease. *Physiology & behavior*, 106(1), 29–39. DOI: [10.1016 / j.physbeh.2011.08.019](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.08.019)
 31. Del Rio-Hortega P. (1932). Microglia. In: Penfield W (ed) *Cytology and cellular pathology of the nervous system*. Paul B Hoeber, New York, pp 482–534

32. De Kloet, E. R., Sibug, R. M., Helmerhorst, F. M., & Schmidt, M. V. (2005). Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 29(2), 271–281. DOI: [10.1016 / j.neubiorev.2004.10.008](https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.10.008)
33. Depino A. M. (2015). Early prenatal exposure to LPS results in anxiety- and depression-related behaviors in adulthood. *Neuroscience*, 299,56-65. DOI: [10.1016/j.neurociencia.2015.04.065](https://doi.org/10.1016/j.neurociencia.2015.04.065)
34. Díaz Luján, V. E., Castellanos, M. M., Levin, G., & Suárez, M. M. (2008). Amitriptyline: sex-dependent effect on sympathetic response and anxiety in rats submitted to early maternal separation and variable chronic stress in adulthood. *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 26(5), 415–422. DOI: [10.1016 / j.ijdevneu.2008.03.004](https://doi.org/10.1016 / j.ijdevneu.2008.03.004)
35. Dinel, A. L., Joffre, C., Trifilieff, P., Aubert, A., Foury, A., Le Ruyet, P., & Layé, S. (2014). Inflammation early in life is a vulnerability factor for emotional behavior at adolescence and for lipopolysaccharide-induced spatial memory and neurogenesis alteration at adulthood. *Journal of neuroinflammation*, 11, 155. DOI: [10.1186 / s12974-014-0155-x](https://doi.org/10.1186 / s12974-014-0155-x)
36. Eaton, N. R., Keyes, K. M., Krueger, R. F., Balsis, S., Skodol, A. E., Markon, K. E., Grant, B. F., & Hasin, D. S. (2012). An invariant dimensional liability model of gender differences in mental disorder prevalence: evidence from a national sample. *Journal of abnormal psychology*, 121(1), 282–288. DOI: [10.1037 / a0024780](https://doi.org/10.1037 / a0024780)
37. Elenkov, I. J., Wilder, R. L., Chrousos, G. P., & Vizi, E. S. (2000). The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacological reviews*, 52(4), 595–638.
38. Ehrlich, K. B., Ross, K. M., Chen, E., & Miller, G. E. (2016). Testing the biological embedding hypothesis: Is early life adversity associated with a later proinflammatory phenotype?. *Development and psychopathology*, 28(4pt2), 1273–1283. DOI: [10.1017 / S0954579416000845](https://doi.org/10.1017 / S0954579416000845)
39. Ferguson, A. V., Latchford, K. J., & Samson, W. K. (2008). The paraventricular nucleus of the hypothalamus - a potential target for integrative treatment of autonomic dysfunction. *Expert opinion on therapeutic targets*, 12(6), 717–727. DOI: [10.1517 / 14728222.12.6.717](https://doi.org/10.1517 / 14728222.12.6.717)
40. Figueiredo, H. F., Dolgas, C. M., & Herman, J. P. (2002). Stress activation of cortex and hippocampus is modulated by sex and stage

- of estrus. *Endocrinology*, 143(7), 2534–2540. DOI: [10.1210 / endo.143.7.8888](https://doi.org/10.1210/endo.143.7.8888)
41. Franklin, T. B., Saab, B. J., & Mansuy, I. M. (2012). Neural mechanisms of stress resilience and vulnerability. *Neuron*, 75(5), 747–761. DOI: [10.1016 / j.neuron.2012.08.016](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.016)
42. Frenois, F., Moreau, M., O'Connor, J., Lawson, M., Micon, C., Lestage, J., Kelley, K. W., Dantzer, R., & Castanon, N. (2007). Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. *Psychoneuroendocrinology*, 32(5), 516–531. DOI: [10.1016 / j.psyneuen.2007.03.005](https://doi.org/10.1016 / j.psyneuen.2007.03.005)
43. Fu, X., Zunich, S. M., O'Connor, J. C., Kavelaars, A., Dantzer, R., & Kelley, K. W. (2010). Central administration of lipopolysaccharide induces depressive-like behavior in vivo and activates brain indoleamine 2,3 dioxygenase in murine organotypic hippocampal slice cultures. *Journal of neuroinflammation*, 7, 43. DOI: [10.1186 / 1742-2094-7-43](https://doi.org/10.1186 / 1742-2094-7-43)
44. Gadek-Michalska A, Tadeusz J, Rachwalska P, Bugajski J. (2015). Chronic stress adaptation of the nitric oxide synthases and IL-1 β levels in brain structures and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity induced by homotypic stress. *J Physiol Pharmacol* 2015; 66: 427–440.
45. García-Bueno, B., & Leza, J. C. (2008). Mecanismos inflamatorios/antiinflamatorios en el cerebro tras la exposición a estrés [Inflammatory/anti-inflammatory mechanisms in the brain following exposure to stress]. *Revista de neurologia*, 46(11), 675–683.
46. Ghazal, P., Dickinson, P., & Smith, C. L. (2013). Early life response to infection. *Current opinion in infectious diseases*, 26(3), 213–218. DOI: [10.1097 / QCO.0b013e32835fb8bf](https://doi.org/10.1097 / QCO.0b013e32835fb8bf)
47. Gilman, S. E., Kawachi, I., Fitzmaurice, G. M., & Buka, S. L. (2003). Family disruption in childhood and risk of adult depression. *The American journal of psychiatry*, 160(5), 939–946. DOI: [10.1176 / appi.ajp.160.5.939](https://doi.org/10.1176 / appi.ajp.160.5.939)
48. Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M., & Merad, M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6005), 841–845. DOI: [10.1126 / science.1194637](https://doi.org/10.1126 / science.1194637)

49. Glaser, R., & Kiecolt-Glaser, J. K. (2005). Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nature reviews. Immunology*, 5(3), 243–251. DOI: [10.1038/nri1571](https://doi.org/10.1038/nri1571)
50. Gluckman, P. D., Hanson, M. A., Buklijas, T., Low, F. M., & Beedle, A. S. (2009). Epigenetic mechanisms that underpin metabolic and cardiovascular diseases. *Nature reviews. Endocrinology*, 5(7), 401–408. DOI: [10.1038/nrendo.2009.102](https://doi.org/10.1038/nrendo.2009.102)
51. Goldszmid RS, Trinchieri G. (2012) The price of immunity. *Nat Immunol* 13(10):932–938. DOI: [10.1038/ni.2422](https://doi.org/10.1038/ni.2422)
52. Gomes-Leal W. (2012). Microglial physiopathology: how to explain the dual role of microglia after acute neural disorders? *Brain Behav* 2(3):345–356. DOI: [10.1002/brb3.51](https://doi.org/10.1002/brb3.51)
53. Gómez, G. B. y Escobar, A. (2006). Estrés y sistema inmune. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 7 (1), p. 30-38.
54. Gouveia, A., Jr, dos Santos, U. D., Felisbino, F. E., de Afonseca, T. L., Antunes, G., & Morato, S. (2004). Influence of the estrous cycle on the behavior of rats in the elevated T-maze. *Behavioural processes*, 67(2), 167–171. DOI: [10.1016/j.beproc.2004.03.018](https://doi.org/10.1016/j.beproc.2004.03.018)
55. Gröger, N., Matas, E., Gos, T., Lesse, A., Poeggel, G., Braun, K., & Bock, J. (2016). The transgenerational transmission of childhood adversity: behavioral, cellular, and epigenetic correlates. *Journal of neural transmission* (Vienna, Austria: 1996), 123(9), 1037–1052. DOI: [10.1007/s00702-016-1570-1](https://doi.org/10.1007/s00702-016-1570-1)
56. Guillamón-Vivancos, T., Gómez-Pinedo, U., & Matías-Guiu, J. (2015). Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): function and molecular description. *Neurologia* (Barcelona, Spain), 30(2), 119–129. DOI: [10.1016/j.nrl.2012.12.007](https://doi.org/10.1016/j.nrl.2012.12.007)
57. Hanisch UK, Kettenmann H. (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10(11):1387–1394. DOI: [10.1038/nn1997](https://doi.org/10.1038/nn1997)
58. Hayward, C., & Sanborn, K. (2002). Puberty and the emergence of gender differences in psychopathology. *The Journal of adolescent health: official publication of the Society for Adolescent Medicine*, 30(4 Suppl), 49–58. DOI: [10.1016/s1054-139x\(02\)00336-1](https://doi.org/10.1016/s1054-139x(02)00336-1)
59. Holder, M. K., & Blaustein, J. D. (2014). Puberty and adolescence as a time of vulnerability to stressors that alter neurobehavioral processes. *Frontiers in neuroendocrinology*, 35(1), 89–110. DOI: [10.1016/j.yfrne.2013.10.004](https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2013.10.004)

60. Hrabovszky, E., Kalló, I., Steinhauser, A., Merchenthaler, I., Coen, C. W., Petersen, S. L., & Liposits, Z. (2004). Estrogen receptor-beta in oxytocin and vasopressin neurons of the rat and human hypothalamus: Immunocytochemical and in situ hybridization studies. *The Journal of comparative neurology*, 473(3), 315–333. DOI: [10.1002 / cne.20127](https://doi.org/10.1002/cne.20127)
61. Irwin M. R. (2008). Human psychoneuroimmunology: 20 years of discovery. *Brain, behavior, and immunity*, 22(2), 129–139. DOI: [10.1016 / j.bbi.2007.07.013](https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.07.013)
62. Ishunina, T. A., & Swaab, D. F (1999). Vasopressin and oxytocin neurons of the human supraoptic and paraventricular nucleus: size changes in relation to age and sex. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 84(12), 4637–4644. DOI: [10.1210 / jcem.84.12.6187](https://doi.org/10.1210/jcem.84.12.6187)
63. Izvolskaia, M., Sharova, V., & Zakharova, L. (2018). Prenatal Programming of Neuroendocrine System Development by Lipopolysaccharide: Long-Term Effects. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3695. DOI: [10.3390 / ijms19113695](https://doi.org/10.3390/ijms19113695)
64. Johansson, S., Bohman, S., Radesäter, A. C., Oberg, C., & Luthman, J. (2005). Salmonella lipopolysaccharide (LPS) mediated neurodegeneration in hippocampal slice cultures. *Neurotoxicity research*, 8(3-4), 207–220. DOI: [10.1007 / BF03033974](https://doi.org/10.1007/BF03033974)
65. Jurgens, H. A., & Johnson, R. W. (2012). Dysregulated neuronal-microglial cross-talk during aging, stress and inflammation. *Experimental neurology*, 233(1), 40–48. DOI: [10.1016 / j.expneurol.2010.11.014](https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.11.014)
66. Juruena M. F (2014). Early-life stress and HPA axis trigger recurrent adulthood depression. *Epilepsy & behavior: E&B*, 38, 148–159. DOI: [10.1016 / j.yebeh.2013.10.020](https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2013.10.020)
67. Kadioglu, A., Cuppone, A. M., Trappetti, C., List, T., Spreafico, A., Pozzi, G., Andrew, P. W., & Oggioni, M. R (2011). Sex-based differences in susceptibility to respiratory and systemic pneumococcal disease in mice. *The Journal of infectious diseases*, 204(12), 1971–1979. DOI: [10.1093 / infdis / jir657](https://doi.org/10.1093/infdis/jir657)
68. Kalinichev, M., Easterling, K. W., Plotsky, P. M., & Holtzman, S. G. (2002). Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 73(1), 131–140. DOI: [10.1016 / s0091-3057 \(02\) 00781-5](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(02)00781-5)

69. Kelley, K. W., Bluthé, R. M., Dantzer, R., Zhou, J. H., Shen, W. H., Johnson, R. W., & Broussard, S. R. (2003). Cytokine-induced sickness behavior. *Brain, behavior, and immunity*, 17 Suppl 1, S112–S118. DOI: [10.1016 / s0889-1591 \(02\) 00077-6](https://doi.org/10.1016/S0889-1591(02)00077-6)
70. Kéri, S., Szabó, C., & Kelemen, O. (2017). Uniting the neurodevelopmental and immunological hypotheses: Neuregulin 1 receptor ErbB and Toll-like receptor activation in first-episode schizophrenia. *Scientific reports*, 7(1), 4147. DOI: [10.1038 / s41598-017-03736-3](https://doi.org/10.1038/s41598-017-03736-3)
71. Kettenmann, H., & Verkhratsky, A. (2008). Neuroglia: the 150 years after. *Trends in neurosciences*, 31(12), 653–659. DOI: [10.1016 / j.tins.2008.09.003](https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.09.003)
72. Khan, M. S., Ali, T., Abid, M. N., Jo, M. H., Khan, A., Kim, M. W., Yoon, G. H., Cheon, E. W., Rehman, S. U., & Kim, M. O. (2017). Lithium ameliorates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the cortex and hippocampus of the adult rat brain. *Neurochemistry international*, 108, 343–354. DOI: [10.1016 / j.neuint.2017.05.008](https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.05.008)
73. Kollmann, T. R., Kampmann, B., Mazmanian, S. K., Marchant, A., & Levy, O. (2017). Protecting the Newborn and Young Infant from Infectious Diseases: Lessons from Immune Ontogeny. *Immunity*, 46(3), 350–363. DOI: [10.1016 / j.immuni.2017.03.009](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.03.009)
74. Kollmann, T. R., Levy, O., Montgomery, R. R., & Goriely, S. (2012). Innate immune function by Toll-like receptors: distinct responses in newborns and the elderly. *Immunity*, 37(5), 771–783. DOI: [10.1016 / j.immuni.2012.10.014](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.10.014)
75. Kovács, K. J., & Makara, G. B. (1988). Corticosterone and dexamethasone act at different brain sites to inhibit adrenalectomy-induced adrenocorticotropin hypersecretion. *Brain research*, 474(2), 205–210. DOI: [10.1016 / 0006-8993 \(88\) 90435-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90435-0)
76. Lacey, R. E., Kumari, M., & McMunn, A. (2013). Parental separation in childhood and adult inflammation: the importance of material and psychosocial pathways. *Psychoneuroendocrinology*, 38(11), 2476–2484. DOI: [10.1016 / j.psyneuen.2013.05.007](https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.05.007)
77. Lajud, N., Roque, A., Cajero, M., Gutiérrez-Ospina, G., & Torner, L. (2012). Periodic maternal separation decreases hippocampal neurogenesis without affecting basal corticosterone during the stress hyporesponsive period, but alters HPA axis and coping behavior in adulthood. *Psychoneuroendocrinology*, 37(3), 410–420. DOI: [10.1016 / j.psyneuen.2011.07.011](https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.07.011)

78. Larkin, J. W., Binks, S. L., Li, Y., & Selvage, D. (2010). The role of oestradiol in sexually dimorphic hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to intracerebroventricular ethanol administration in the rat. *Journal of neuroendocrinology*, 22(1), 24–32. DOI: [10.1111 / j.1365-2826.2009.01934.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2009.01934.x)
79. Lee, JH, Kim, HJ, Kim, JG, Ryu, V., Kim, BT, Kang, DW. (2007). Comportamientos depresivos y disminución de la expresión del transportador de la recaptación de serotonina en ratas que experimentaron separación materna neonatal. *Neurosci. Res.* 58, 32–39. doi: 10.1016 / j.neures.2007.01.008. DOI: [10.1016 / j.neures.2007.01.008](https://doi.org/10.1016/j.neures.2007.01.008)
80. LeGrand, E. K., & Day, J. D. (2016). Self-harm to preferentially harm the pathogens within: non-specific stressors in innate immunity. *Proceedings. Biological sciences*, 283(1828), 20160266. DOI: [10.1098 / rspb.2016.0266](https://doi.org/10.1098/rspb.2016.0266)
81. Lehmann, J., & Feldon, J. (2000). Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing? *Reviews in the neurosciences*, 11(4), 383–408. DOI: [10.1515 / revneuro.2000.11.4.383](https://doi.org/10.1515 / revneuro.2000.11.4.383)
82. Leon Chavez, B. A., Guevara, J., Galindo, S., Luna, J., Ugarte, A., Villegas, O., Mena, R., Eguibar, J. R., & Martinez-Fong, D. (2001). Regional and temporal progression of reactive astrocytosis in the brain of the myelin mutant taiep rat. *Brain research*, 900(1), 152–155. DOI: [10.1016 / s0006-8993 \(01\) 02284-3](https://doi.org/10.1016 / s0006-8993 (01) 02284-3)
83. Leussis, M. P., Freund, N., Brenhouse, H. C., Thompson, B. S., & Andersen, S. L. (2012). Depressive-like behavior in adolescents after maternal separation: sex differences, controllability, and GABA. *Developmental neuroscience*, 34(2-3), 210–217. DOI: [10.1159 / 000339162](https://doi.org/10.1159 / 000339162)
84. Levine, A. B., Levine, L. M., & Levine, T. B. (2014). Posttraumatic stress disorder and cardiometabolic disease. *Cardiology*, 127(1), 1–19. DOI: [10.1159 / 000354910](https://doi.org/10.1159 / 000354910)
85. Levine S. (2001). Primary social relationships influence the development of the hypothalamic--pituitary--adrenal axis in the rat. *Physiology & behavior*, 73(3), 255–260. DOI: [10.1016 / s0031-9384 \(01\) 00496-6](https://doi.org/10.1016 / s0031-9384 (01) 00496-6)
86. Levy O. (2007). Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nature reviews. Immunology*, 7(5), 379–390. DOI: [10.1038 / nri2075](https://doi.org/10.1038 / nri2075)
87. Lightman, S. L., Windle, R. J., Wood, S. A., Kershaw, Y. M., Shanks, N., & Ingram, C. D. (2001). Peripartum plasticity within the

hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Progress in brain research*, 133, 111–129. DOI: [10.1016 / s0079-6123 \(01\) 33009-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(01)33009-1)

88. Lippmann, M., Bress, A., Nemeroff, C. B., Plotsky, P. M., & Monteggia, L. M. (2007). Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. *The European journal of neuroscience*, 25(10), 3091–3098. DOI: [10.1111 /j.1460-9568.2007.05522.x](https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05522.x)
89. Liu, H., Atrooz, F., Salvi, A., & Salim, S. (2017). Behavioral and cognitive impact of early life stress: Insights from an animal model. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 78, 88–95. DOI: [10.1016 /j.pnpbp.2017.05.015](https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.05.015)
90. Logan, J. G., & Barksdale, D. J. (2008). Allostasis and allostatic load: expanding the discourse on stress and cardiovascular disease. *Journal of clinical nursing*, 17(7B), 201–208. DOI: [10.1111 /j.1365-2702.2008.02347.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2702.2008.02347.x)
91. Loi M., Mossink J.C., Meerhoff G.F., Den Blaauwen J.L., Lucassen P.J., Joëls M. (2015). Effects of early-life stress on cognitive function and hippocampal structure in female rodents. *Neuroscience*. 2015:756–763. pii:S0306-4522(15) 00756-00763. DOI: [10.1016 /j.neurociencia.2015.08.024](https://doi.org/10.1016/j.neurociencia.2015.08.024)
92. Luheshi, G. N., Bluthé, R. M., Rushforth, D., Mulcahy, N., Konsman, J. P., Goldbach, M., & Dantzer, R. (2000). Vagotomy attenuates the behavioural but not the pyrogenic effects of interleukin-1 in rats. *Autonomic neuroscience: basic & clinical*, 85(1-3), 127–132. DOI: [10.1016 / S1566-0702 \(00\) 00231-9](https://doi.org/10.1016/S1566-0702(00)00231-9)
93. Majzoub JA. (2006). Corticotropin-releasing hormone physiology. *European Journal of Endocrinology*. 155: S71–S76. DOI: [DOI:org/10.1530/eje.1.02247](https://doi.org/10.1530/eje.1.02247)
94. Marais, L., van Rensburg, S. J., van Zyl, J. M., Stein, D. J., & Daniels, W. M. (2008). Maternal separation of rat pups increases the risk of developing depressive-like behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus. *Neuroscience research*, 61(1), 106–112. DOI: [10.1016 /j.neures.2008.01.011](https://doi.org/10.1016/j.neures.2008.01.011)
95. Maras, P. M., & Baram, T. Z. (2012). Sculpting the hippocampus from within: stress, spines, and CRH. *Trends in neurosciences*, 35(5), 315–324. DOI: [10.1016 /j.tins.2012.01.005](https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.01.005)
96. Marriott, I., & Huet-Hudson, Y. M. (2006). Sexual dimorphism in innate immune responses to infectious organisms. *Immunologic research*, 34(3), 177–192. DOI: [10.1385 / IR: 34: 3: 177](https://doi.org/10.1385/IR:34:3:177)

97. Maródi L. (2006). Neonatal innate immunity to infectious agents. *Infection and immunity*, 74(4), 1999–2006. DOI: [10.1128 / IAI.74.4.1999-2006.2006](https://doi.org/10.1128/IAI.74.4.1999-2006.2006)
98. Matthews, K., Wilkinson, L. S., & Robbins, T. W. (1996). Repeated maternal separation of preweanling rats attenuates behavioral responses to primary and conditioned incentives in adulthood. *Physiology & behavior*, 59(1), 99–107. DOI: [10.1016 / 0031-9384 \(95\) 02069-1](https://doi.org/10.1016/0031-9384(95)02069-1)
99. Mayo, L., Quintana, F. J., & Weiner, H. L. (2012). The innate immune system in demyelinating disease. *Immunological reviews*, 248(1), 170–187. DOI: [10.1111 /j.1600-065X.2012.01135.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01135.x)
100. McAfoose J, Baune BT. (2009) Evidence for a cytokine model of cognitive function. *Neurosci Biobehav Rev* 33(3):355–366. DOI: [10.1016 /j.neubiorev.2008.10.005](https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.10.005)
101. McDonald, R., Jouriles, E. N., Ramisetty-Mikler, S., Caetano, R., & Green, C. E. (2006). Estimating the number of American children living in partner-violent families. *Journal of family psychology: JFP: journal of the Division of Family Psychology of the American Psychological Association (Division 43)*, 20(1), 137–142. DOI: [10.1037 / 0893-3200.20.1.137](https://doi.org/10.1037/0893-3200.20.1.137)
102. McEwen BS. (1998). Allostasis and allostatic load. *Ann NY Acad Sci*; 840: 33–44. DOI: [10.1111 /j.1749-6632.1998.tb09546.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09546.x)
103. McEwen B. S. (1999). Stress and hippocampal plasticity. *Annual review of neuroscience*, 22, 105–122. DOI: [10.1146 / annurev.neuro.22.1.105](https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.22.1.105)
104. McEwen, B. S., & Gianaros, P. J. (2010). Central role of the brain in stress and adaptation: links to socioeconomic status, health, and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1186, 190–222. DOI: [10.1111 /j.1749-6632.2009.05331.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05331.x)
105. McCormick, C. M., & Mathews, I. Z. (2007). HPA function in adolescence: role of sex hormones in its regulation and the enduring consequences of exposure to stressors. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 86(2), 220–233. DOI: [10.1016 / j.pbb.2006.07.012](https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.07.012)
106. MEDAWAR P. B. (1948). Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *British journal of experimental pathology*, 29(1), 58–69.
107. Mitani F. (2014). Functional zonation of the rat adrenal cortex: the development and maintenance. *Proceedings of the Japan Academy*.

Series B, Physical and biological sciences, 90(5), 163–183.
DOI: [10.2183 / pjab.90.163](https://doi.org/10.2183/pjab.90.163)

108. Morgan, Z., Brugha, T., Fryers, T., & Stewart-Brown, S. (2012). The effects of parent-child relationships on later life mental health status in two national birth cohorts. *Social psychiatry and psychiatric epidemiology*, 47(11), 1707–1715. DOI: [10.1007 / s00127-012-0481-1](https://doi.org/10.1007/s00127-012-0481-1)
109. Murgatroyd, C., & Spengler, D. (2012). Genetic variation in the epigenetic machinery and mental health. *Current psychiatry reports*, 14(2), 138–149. DOI: [10.1007 / s11920-012-0255-1](https://doi.org/10.1007/s11920-012-0255-1)
110. Nayak D, Roth TL, McGavern DB. (2014) Microglia development and function. *Annu Rev Immunol* 32:367–402. DOI: [10.1146 / annurev-immunol-032713-120240](https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120240)
111. Neumann H, Takahashi K. (2007) Essential role of microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2 (TREM-2) for central nervous tissue immune homeostasis. *J Neuroimmunol* 184:92–99. DOI: [10.1016 / j.jneuroim.2006.11.032](https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.11.032)
112. Olin, A., Henckel, E., Chen, Y., Lakshmikanth, T., Pou, C., Mikes, J., Gustafsson, A., Bernhardsson, A. K., Zhang, C., Bohlin, K., & Brodin, P. (2018). Stereotypic Immune System Development in Newborn Children. *Cell*, 174(5), 1277–1292.e14. DOI: [10.1016 / j.cell.2018.06.045](https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.045)
113. Osrin, D., Vergnano, S., & Costello, A. (2004). Serious bacterial infections in newborn infants in developing countries. *Current opinion in infectious diseases*, 17(3), 217–224. DOI: [10.1097 / 00001432-200406000-00008](https://doi.org/10.1097/00001432-200406000-00008)
114. Oyola, M. G., Thompson, M. K., Handa, A. Z., & Handa, R. J. (2017). Distribution and chemical composition of estrogen receptor β neurons in the paraventricular nucleus of the female and male mouse hypothalamus. *The Journal of comparative neurology*, 525(17), 3666–3682. DOI: [10.1002 / cne.24295](https://doi.org/10.1002/cne.24295)
115. Pacák, K., & Palkovits, M. (2001). Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocrine reviews*, 22(4), 502–548. DOI: [10.1210 / edrv.22.4.0436](https://doi.org/10.1210/edrv.22.4.0436)
116. Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (1993). Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain research. Molecular brain research*, 18(3), 195–200. DOI: [10.1016 / 0169-328x \(93\) 90189-v](https://doi.org/10.1016/0169-328x(93)90189-v)
117. Porsolt, R. D., A. Lenégre y R. A. McArthur. (1991), “Pharmacological models of depression”, en B. Oliver, J. Mos, J. L.

- Slangen (eds.) *Animal models in Psychopharmacology, Advances in Pharmacological Sciences*, Basel, Alemania, Birkhäuser, 137-159.
118. Qiao, Y., Yang, X., & Jing, N. (2016). Epigenetic regulation of early neural fate commitment. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 73(7), 1399–1411. DOI: [10.1007/s00018-015-2125-6](https://doi.org/10.1007/s00018-015-2125-6)
 119. Qin, L., Wu, X., Block, M. L., Liu, Y., Breese, G. R., Hong, J. S., Knapp, D. J., & Crews, F. T. (2007). Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*, 55(5), 453–462. DOI: [10.1002/glia.20467](https://doi.org/10.1002/glia.20467)
 120. Raetz, C. R., & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual review of biochemistry*, 71, 635–700. DOI: [10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414)
 121. Rakic, S., & Zecevic, N. (2000). Programmed cell death in the developing human telencephalon. *The European journal of neuroscience*, 12(8), 2721–2734. DOI: [10.1046/j.1460-9568.2000.00153.x](https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00153.x)
 122. Ransohoff, R. M., & Perry, V. H. (2009). Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annual review of immunology*, 27, 119–145. DOI: [10.1146/annurev.immunol.021908.132528](https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132528)
 123. Reynolds, R. M., Labad, J., Buss, C., Ghaemmaghami, P., & Räikkönen, K. (2013). Transmitting biological effects of stress in utero: implications for mother and offspring. *Psychoneuroendocrinology*, 38(9), 1843–1849. DOI: [10.1016/j.psyneuen.2013.05.018](https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.05.018)
 124. Rivier, C., & Vale, W. (1985). Effects of corticotropin-releasing factor, neurohypophyseal peptides, and catecholamines on pituitary function. *Federation proceedings*, 44(1 Pt 2), 189–195.
 125. Rogers, L. K., & Velten, M. (2011). Maternal inflammation, growth retardation, and preterm birth: insights into adult cardiovascular disease. *Life sciences*, 89(13-14), 417–421. DOI: [10.1016/j.lfs.2011.07.017](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.07.017)
 126. Roque, A., Ochoa-Zarzosa, A., & Torner, L. (2016). Maternal separation activates microglial cells and induces an inflammatory response in the hippocampus of male rat pups, independently of hypothalamic and peripheral cytokine levels. *Brain, behavior, and immunity*, 55, 39–48. DOI: [10.1016/j.bbi.2015.09.017](https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.09.017)
 127. Rosol, T. J., Yarrington, J. T., Latendresse, J., & Capen, C. C. (2001). Adrenal gland: structure, function, and mechanisms of toxicity. *Toxicologic pathology*, 29(1), 41–48. DOI: [10.1080/019262301301418847](https://doi.org/10.1080/019262301301418847)

128. Rosenfeld, P., Suchecki, D., & Levine, S. (1992). Multifactorial regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during development. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 16(4), 553–568. DOI: [10.1016 / s0149-7634 \(05\) 80196-4](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(05)80196-4)
129. Rüedi-Bettschen, D., Zhang, W., Russig, H., Ferger, B., Weston, A., Pedersen, E. M., Feldon, J., & Pryce, C. (2006). Early deprivation leads to altered behavioural, autonomic and endocrine responses to environmental challenge in adult Fischer rats. *The European journal of neuroscience*, 24(10), 2879–2893. DOI: [10.1111 / j.1460-9568.2006.05158.x](https://doi.org/10.1111 / j.1460-9568.2006.05158.x)
130. Sangenstedt, S., Szardenings, C., Sachser, N., & Kaiser, S. (2018). Does the early social environment prepare individuals for the future? A match-mismatch experiment in female wild cavies. *Frontiers in zoology*, 15, 13. DOI: [10.1186 / s12983-018-0261-1](https://doi.org/10.1186 / s12983-018-0261-1)
131. Sapolsky R. M. (1994). The physiological relevance of glucocorticoid endangerment of the hippocampus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 746, 294–307. DOI: [10.1111 / j.1749-6632.1994.tb39247.x](https://doi.org/10.1111 / j.1749-6632.1994.tb39247.x)
132. Saavedra, L. M., Fenton Navarro, B., & Torner, L. (2017). Early Life Stress Activates Glial Cells in the Hippocampus but Attenuates Cytokine Secretion in Response to an Immune Challenge in Rat Pups. *Neuroimmunomodulation*, 24(4-5), 242–255. DOI: [10.1159 / 000485383](https://doi.org/10.1159 / 000485383)
133. Shanks, N., Larocque, S., & Meaney, M. J. (1995). Neonatal endotoxin exposure alters the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: early illness and later responsivity to stress. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 15(1 Pt 1), 376–384. DOI: [10.1523 / JNEUROSCI.15-01-00376.1995](https://doi.org/10.1523 / JNEUROSCI.15-01-00376.1995)
134. SELYE H. (1950). Interactions between gluco-corticoid and mineralo-corticoid hormones. *The Journal of clinical investigation*, 29(6), 844–845. DOI: [10.1172 / JCI102317](https://doi.org/10.1172 / JCI102317)
135. Shi, Z. R., Yan, L. N., Li, B., & Wen, T. F. (2009). Evaluation of standard liver volume formulae for Chinese adults. *World journal of gastroenterology*, 15(32), 4062–4066. Shi, Z. R., Yan, L. N., Li, B., & Wen, T. F. (2009). Evaluation of standard liver volume formulae for Chinese adults. *World journal of gastroenterology*, 15(32), 4062–4066. DOI: [10.3748 / wjg.15.4062](https://doi.org/10.3748 / wjg.15.4062)
136. Slotten, H. A., Kalinichev, M., Hagan, J. J., Marsden, C. A., & Fone, K. C. (2006). Long-lasting changes in behavioural and neuroendocrine indices in the rat following neonatal maternal

- separation: gender-dependent effects. *Brain research*, 1097(1), 123–132. DOI: [10.1016/j.brainres.2006.04.066](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.04.066)
137. Sominisky, L., Fuller, E. A., Bondarenko, E., Ong, L. K., Averell, L., Nalivaiko, E., Dunkley, P. R., Dickson, P. W., & Hodgson, D. M. (2013). Functional programming of the autonomic nervous system by early life immune exposure: implications for anxiety. *PloS one*, 8(3), e57700. DOI: [10.1371/journal.pone.0057700](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057700)
138. Sominisky, L., Walker, A. K., Ong, L. K., Tynan, R. J., Walker, F. R., & Hodgson, D. M. (2012). Increased microglial activation in the rat brain following neonatal exposure to a bacterial mimetic. *Behavioural brain research*, 226(1), 351–356. DOI: [10.1016/j.bbr.2011.08.038](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.08.038)
139. Sorrells, S. F., & Sapolsky, R. M. (2007). An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain, behavior, and immunity*, 21(3), 259–272. DOI: [10.1016/j.bbi.2006.11.006](https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.11.006)
140. Sousa, V. C., Vital, J., Costenla, A. R., Batalha, V. L., Sebastião, A. M., Ribeiro, J. A., & Lopes, L. V. (2014). Maternal separation impairs long term-potential in CA1-CA3 synapses and hippocampal-dependent memory in old rats. *Neurobiology of aging*, 35(7), 1680–1685. DOI: [10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.024](https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.024)
141. SPITZ R. A. (1946). Anaclitic depression; an inquiry into the genesis of psychiatric conditions in early childhood. *The Psychoanalytic study of the child*, 2, 313–342.
142. Streit, W. J., Walter, S. A., & Pennell, N. A. (1999). Reactive microgliosis. *Progress in neurobiology*, 57(6), 563–581. DOI: [10.1016/s0301-0082\(98\)00069-0](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(98)00069-0)
143. Suri, D., & Vaidya, V. A. (2013). Glucocorticoid regulation of brain-derived neurotrophic factor: relevance to hippocampal structural and functional plasticity. *Neuroscience*, 239, 196–213. DOI: [10.1016/j.neurociencia.2012.08.065](https://doi.org/10.1016/j.neurociencia.2012.08.065)
144. Suzuki, Y., Claflin, J., Wang, X., Lengi, A., & Kikuchi, T. (2005). Microglia and macrophages as innate producers of interferon-gamma in the brain following infection with *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology*, 35(1), 83–90. DOI: [10.1016/j.ijpara.2004.10.020](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.10.020)
145. Szczuciński, A., & Losy. (2007). Chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis. Potential targets for new therapies. *Acta neurologica Scandinavica*, 115(3), 137–146. DOI: [10.1111/j.1600-0404.2006.00749.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2006.00749.x)

146. Thored P, Heldmann U, Gomes-Leal W, Gisler R, Darsalia V, Taneera J. (2009) Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. *Glia* 57(8):835–849. DOI: [10.1002 / glia.20810](https://doi.org/10.1002/glia.20810)
147. Tian, L., Rauvala, H., & Gahmberg, C. G. (2009). Neuronal regulation of immune responses in the central nervous system. *Trends in immunology*, 30(2), 91–99. DOI: [10.1016 / j.it.2008.11.002](https://doi.org/10.1016/j.it.2008.11.002)
148. Tractenberg, S. G., Levandowski, M. L., de Azeredo, L. A., Orso, R., Roithmann, L. G., Hoffmann, E. S., Brenhouse, H., & Grassi-Oliveira, R. (2016). An overview of maternal separation effects on behavioural outcomes in mice: Evidence from a four-stage methodological systematic review. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 68, 489–503. DOI: [10.1016 / j.neubiorev.2016.06.021](https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.06.021)
149. Turner, R. J., & Lloyd, D. A. (2004). Stress burden and the lifetime incidence of psychiatric disorder in young adults: racial and ethnic contrasts. *Archives of general psychiatry*, 61(5), 481–488. DOI: [10.1001 / archpsyc.61.5.481](https://doi.org/10.1001/archpsyc.61.5.481)
150. Uchoa, E. T., Aguilera, G., Herman, J. P., Fiedler, J. L., Deak, T., & de Sousa, M. B. (2014). Novel aspects of glucocorticoid actions. *Journal of neuroendocrinology*, 26(9), 557–572. DOI: [10.1111 / jne.12157](https://doi.org/10.1111/jne.12157)
151. Vetulani J. (2013). Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition. *Pharmacological reports: PR*, 65(6), 1451–1461. DOI: [10.1016 / s1734-1140 \(13\) 71505-6](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(13)71505-6)
152. Viau, V., & Meaney, M. J. (1991). Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. *Endocrinology*, 129(5), 2503–2511. DOI: [10.1210 / endo-129-5-2503](https://doi.org/10.1210 / endo-129-5-2503)
153. Walker, A. K., Nakamura, T., Byrne, R. J., Naicker, S., Tynan, R. J., Hunter, M., & Hodgson, D. M. (2009). Neonatal lipopolysaccharide and adult stress exposure predisposes rats to anxiety-like behaviour and blunted corticosterone responses: implications for the double-hit hypothesis. *Psychoneuroendocrinology*, 34(10), 1515–1525. DOI: [10.1016 / j.psyneuen.2009.05.010](https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.05.010)
154. Walker, A. K., Nakamura, T., & Hodgson, D. M. (2010). Neonatal lipopolysaccharide exposure alters central cytokine responses to stress in adulthood in Wistar rats. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 13(6), 506–515. DOI: [10.3109 / 10253890.2010.489977](https://doi.org/10.3109 / 10253890.2010.489977)

155. Wang, X. D., & Schmidt, M. V. (2016). Editorial: Molecular Mechanisms for Reprogramming Hippocampal Development and Function by Early-Life Stress. *Frontiers in molecular neuroscience*, 9, 6. DOI: [10.3389 / fnmol.2016.00006](https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00006)
156. Wang, K. C., Fan, L. W., Kaizaki, A., Pang, Y., Cai, Z., & Tien, L. T. (2013). Neonatal lipopolysaccharide exposure induces long-lasting learning impairment, less anxiety-like response and hippocampal injury in adult rats. *Neuroscience*, 234, 146–157. DOI: [10.1016 / j.neurociencia.2012.12.049](https://doi.org/10.1016/j.neurociencia.2012.12.049)
157. Weiser, M. J., & Handa, R. J. (2009). Estrogen impairs glucocorticoid dependent negative feedback on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis via estrogen receptor alpha within the hypothalamus. *Neuroscience*, 159(2), 883–895. DOI: [10.1016 / j.neurociencia.2008.12.058](https://doi.org/10.1016/j.neurociencia.2008.12.058)
158. Wieggers, G. J., Labeur, M. S., Stec, I. E., Klinkert, W. E., Holsboer, F., & Reul, J. M. (1995). Glucocorticoids accelerate anti-T cell receptor-induced T cell growth. *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)*, 155(4), 1893–1902.
159. Wigger, A., & Neumann, I. D. (1999). Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. *Physiology & behavior*, 66(2), 293–302. DOI: [10.1016 / s0031-9384 \(98\) 00300-x](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(98)00300-x)
160. Yang, I., Han, S. J., Kaur, G., Crane, C., & Parsa, A. T. (2010). The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology. *Journal of clinical neuroscience: official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 17(1), 6–10. DOI: [10.1016 / j.jocn.2009.05.006](https://doi.org/10.1016/j.jocn.2009.05.006)
161. Zhang, X., Zhivaki, D., & Lo-Man, R. (2017). Unique aspects of the perinatal immune system. *Nature reviews. Immunology*, 17(8), 495–507. DOI: [10.1038 / nri.2017.54](https://doi.org/10.1038/nri.2017.54)
162. Zipser, B. D., Johanson, C. E., Gonzalez, L., Berzin, T. M., Tavares, R., Hulette, C. M., Vitek, M. P., Hovanesian, V., & Stopa, E. G. (2007). Microvascular injury and blood-brain barrier leakage in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 28(7), 977–986. DOI: [10.1016 / j.neurobiolaging.2006.05.016](https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.05.016)