



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS EN BIOTECNOLOGÍA

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAestrÍA EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

**EL ESTRÉS DURANTE LAS PRIMERAS ETAPAS DE LA  
VIDA ACTIVA LA RESPUESTA PRO-INFLAMATORIA EN  
EL HIPOCAMPO Y EN LA CIRCULACIÓN PERIFÉRICA  
EN CRÍAS DE RATAS MACHO**

**TESIS QUE PRESENTA:**

BIOL. MA. ANGÉLICA ROQUE GALICIA

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

*MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS*

**AREA TEMÁTICA:** BIOTECNOLOGÍA PECUARIA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA EN CIENCIAS ALEJANDRA OCHOA ZARZOSA

CO-ASESORA:

DRA. EN CIENCIAS MARÍA DE LA LUZ TORNER AGUILAR

MORELIA, MICHOACÁN, ABRIL DE 2015



El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH, bajo la asesoría de la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa y la coasesoría de la Dra. María de la Luz Torner Aguilar. Para su realización se contó con el apoyo parcial de CONACyT (CB2014-No. 243419 y beca 286252) y del IMSS: FIS/IMSS/PROT/G14/1299.

### **AGRADECIMIENTOS:**

Agradezco a mi familia que siempre me ha impulsado a seguir adelante y me apoyado de todas las formas posibles en las decisiones que he tomado, a mi madre y hermana que son la fuente de motivación.

A Sebastián por su comprensión y tolerancia.

También quiero agradecer a las Dra. Torner y Dra. Ochoa por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y contar con su asesoría en este trabajo y en este camino de la investigación, así también quiero agradecer al Dr. Joel, la Dra. Esperanza y Dra. Naima, por hacer espacio en sus agendas para fortalecer y enriquecer el desarrollo de mi formación, con sus comentarios que siempre fueron críticos y objetivos.

Por último pero no menos importante, quiero agradecer a mis compañeros de trabajo, de recreo y estudio: Yoana, Violeta, Jaqui, Lolita, Erick, Marisol, Nayeli, y muchos.



3.7.2.1. Los astrocitos durante el desarrollo	29
3.7.2.2. Astroglia y enfermedad	30
<b>IV. Antecedentes</b>	31
<b>V. Justificación</b>	31
<b>VI. Hipótesis</b>	32
<b>VII. Objetivos</b>	32
7.1. General	32
7.2. Particulares	32
<b>VIII. Materiales y métodos</b>	33
8.1. Estrategia experimental	33
8.2. Inmunohistoquímica	34
8.3. Inmunohistoquímica fluorescente	36
8.4. Análisis morfológico de las células microgliales	36
8.5. Análisis morfológico de los astrocitos	37
8.6. Colección de tejido para la extracción del RNA y muestras de sangre	37
8.7. Síntesis del cDNA	38
8.8. PCR punto final	38
8.9. PCR tiempo real	39
8.10. Determinación de corticosterona y citocinas	39
8.11. Análisis de resultados	40
<b>IX. Resultados</b>	41
9.1. Parámetros corporales	41
9.2. Concentraciones de corticosterona	41
9.3. Análisis de las células gliales en el GD del hipocampo	42

9.4. Expresión de citocinas en el hipocampo al PN15	46
9.5. Determinación de la concentración de citocinas circulantes	48
<b>X. Discusión</b>	51
<b>XI. Conclusión</b>	62
<b>XII. Referencias</b>	62

## Índice de figuras

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenales (HPA) en el adulto.	15
<b>Figura. 2</b> Estructura del hipocampo en rata.	17
<b>Figura 3.</b> Diseño experimental.	33
<b>Figura 4.</b> Concentración de corticosterona de las crías de rata macho al PN15.	41
<b>Figura 5.</b> Cuantificación del número de células microgliales en el hilus del giro dentado (GD) del hipocampo de rata macho al PN15.	42
<b>Figura 6.</b> Densidad total de células astrogiales de las crías de rata macho al PN15.	43
<b>Figura 7.</b> Análisis morfológico de las ramificaciones de los astrocitos y su soma.	44
<b>Figura 8.</b> Inmunohistoquímica fluorescente triple en el hilus del GD del hipocampo de rata macho al PN15.	45
<b>Figura 9.</b> Expresión relativa del mRNA de las citocinas en homogenados de hipocampo de crías de rata macho, sacrificadas en condiciones basales o después de un evento de estrés al PN15.	46
<b>Figura 10.</b> Expresión de las citocinas en el hipocampo de las crías de rata después de un evento de estrés al PN15.	47
<b>Figura 11.</b> Concentración de citocinas en la circulación periférica de las crías de rata macho al PN15, bajo condiciones basales y después de un evento de estrés.	48

<b>Figura 12.</b> Porcentaje en la concentración de citocinas en la circulación periférica de las crías de rata macho al PN15, después de un evento de estrés.	48
<b>Figura 13.</b> La SM altera las poblaciones gliales en el hilus del hipocampo en las crías de rata al PN15.	53
<b>Figura 14.</b> Diferencias en la expresión de citocinas en el hipocampo, y en la secreción de citocinas a la circulación, debidas a la separación maternal.	58

### **Índice de tablas**

<b>Tabla 1.</b> Funciones de las citocinas en el desarrollo del SNC y su relación con el eje HPA.	22
<b>Tabla 2.</b> Peso corporal y peso relativo del bazo, adrenales y timo al PN15.	38
<b>Tabla 3.</b> Secuencias de oligonucleótidos.	40

## I. Resumen

El estrés durante las primeras etapas de la vida afecta el desarrollo del sistema nervioso central y el sistema inmunológico, produciendo alteraciones fisiológicas y conductuales que perduran hasta la edad adulta. En el SNC las células microgliales y neurogliales combaten infecciones y daños mediante la secreción de citocinas pro- y anti-inflamatorias. Estas proteínas actúan como factores tróficos durante el desarrollo y maduración de las neuronas. El objetivo de este trabajo fue analizar el papel del estrés postnatal con el modelo de la Separación Materna (SM), sobre la activación de las células gliales y la expresión de citocinas pro-inflamatorias en el hipocampo y la secreción de citocinas periféricas circulantes en crías de rata al día postnatal 15 (PN15). La SM indujo de manera significativa (60%) un estado pre-activado de las células microgliales en el hilus del giro dentado (GD) del hipocampo. Mientras que la densidad celular de los astrocitos en el GD del hipocampo disminuyó significativamente en el grupo SM (20%) al PN15. Se presentó un aumento significativo de la expresión basal (2.3 veces) e inducida por un evento de estrés del gen de la citocina pro-inflamatoria IL-1 $\beta$  (20.5 veces) en el hipocampo de animales SM; mientras que el gen del TNF- $\alpha$  incrementó en los niveles basales (1.2 veces) en el grupo SM y aumentó después del evento de estrés en el grupo control (2.5 veces). Con respecto a la IL-6 no se encontraron diferencias significativas. En las citocinas periféricas circulantes de los mismos animales se encontró una concentración basal de IL-6 baja (3.8 pg/ml) y un aumento significativo después del evento de estrés (7.1 pg/ml) en el grupo SM; mientras que para el TNF- $\alpha$  no se observaron diferencias significativas. En el caso de la IL-1 $\beta$  se observó una disminución significativa de la concentración en condiciones basales (6.3 pg/ml) y después del evento de estrés (5.5 pg/ml) en comparación con el grupo control. En conclusión, el estrés postnatal durante las etapas tempranas de la vida provoca una activación del sistema inmune en el hipocampo, y una respuesta diferencial en la concentración de las citocinas pro-inflamatorias en la circulación sistémica al PN15.

**Palabras clave:** SNC, células gliales, sistema inmune

## **Abstract**

Early life stress impacts the development of the central nervous system (CNS) and the immune system and increases the vulnerability to suffer a wide spectrum of diseases in adulthood. Glial cells (microglia and astrocytes) are the CNS immune cells and secrete pro- and anti- inflammatory cytokines. During development these cytokines are trophic factors that contribute to the maturation of neurons. The aim of this work was to analyze the immediate effects of early life stress using Maternal Separation model (MS), on the activation and cellular density of astrocytes and microglia, as well as to examine the expression of cytokines in the hippocampus and their presence in the circulation of male rat pups at postnatal day (PD) 15. MS induces in the hippocampal hilus a pre-activated state (60%) in the microglial cells. The number of astrocytic cells was decreased (20%) in the MS group compared to control group. It was found an increased expression of IL-1 $\beta$  mRNA (~2 fold) in the hippocampus of the MS group compared to control under basal conditions. Stress-induced expression of IL-1 $\beta$  was significantly higher in MS than in control basal group and MS control (~20 fold). The expression of IL-6 mRNA was unchanged in both groups under basal and stress-induced conditions and the expression of TNF- $\alpha$  mRNA was significantly increased in basal conditions (~1.2 fold) and control group augment level expression after an event to stress (~2.5 fold). Circulating IL-6 decreased in basal conditions in the MS group (3.8 pg/ml) and increased after stress in the MS group (7.1 pg/ml). No changes were found in the circulating concentrations of TNF- $\alpha$  in basal or stress-induced conditions in both groups. IL-1 $\beta$  decreased in basal conditions (6.3 pg/ml) in the MS group and after one stress event (5.5 pg/ml) in relation to control group. In conclusion, early life stress induces an activation of immune system in the hippocampus and a differential response to releasing the pro-inflammatory cytokines in the circulation at PN15.

**Keywords:** CNS, glial cells, immune system

## II. Introducción

A lo largo de la vida los seres vivos están expuestos a diversas situaciones de estrés, las cuales en la mayoría de las ocasiones no pueden ser controladas. El estrés es definido como un estímulo que amenaza la sobrevivencia del organismo (Tsigos & Chrousos, 2002). Cuando el estrés es repetido y prolongado de manera incontrolable e impredecible causa alteraciones en la morfología de las células del sistema nervioso central (SNC), así como en su arborización dendrítica, lo cual puede suprimir o disminuir la generación de neuronas nuevas (neurogénesis) (Zunszain, Anacker, Cattaneo, Carvalho, & Pariante, 2011). El estrés durante las primeras etapas de la vida afecta a estructuras: como el hipocampo, las cortezas cerebrales, el cerebelo, por mencionar algunas, debido a que impacta sobre el desarrollo y la maduración en su citoarquitectura (Arborelius, Owens, Plotsky, & Nemeroff, 1999; Pavlik & Buresova, 1984; Sudarov & Joyner, 2007).

Los glucocorticoides, considerados como las hormonas anti-inflamatorias potentes en el cuerpo, son liberados de la glándula adrenal en respuesta al estrés. Estas hormonas regulan el metabolismo y la inmunidad, así como la sobrevivencia neuronal y la neurogénesis (Vinson, 2009; Zunszain et al., 2011). Por otra parte, el sistema inmune está caracterizado por su papel crítico en la defensa del organismo. Las citocinas son mensajeros químicos liberados al torrente sanguíneo por diversas células accesorias del sistema inmune (Goujon, Laye, Parnet, & Dantzer, 1997), como las células B que migran a la periferia de los órganos linfoides, donde maduran y pueden secretar citocinas durante la respuesta inmune innata (Janeway, Travers, Walpot, & Shlomchik, 2005). Las citocinas como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), la Interleucina 1 beta e Interleucina 6 (IL-1 $\beta$  e IL-6), son producidas y liberadas por las células gliales bajo ciertas condiciones de estrés o cualquier amenaza que ponga en riesgo la integridad del SNC.

La microglía y los astrocitos son células inmunocompetentes del SNC que se encuentran involucradas en una amplia gama de tareas durante el desarrollo y funcionamiento del cerebro, como son: la sinaptogénesis, la apoptosis y la angiogénesis. Actualmente varios estudios en animales y humanos han implicado al sistema inmune en varios desórdenes psiquiátricos, como la esquizofrenia, la ansiedad, la depresión y la disfunción cognitiva (Bilbo

& Schwarz, 2009; McNally, Bhagwagar, & Hannestad, 2008; Rajkowska & Miguel-Hidalgo, 2007).

El objetivo de este trabajo fue analizar los efectos inducidos por la exposición al estrés durante las etapas tempranas de la vida en el sistema neuroinmune. Se utilizó un modelo animal murino y se empleó la separación materna (SM) como factor de estrés. Se cuantificó el número de células gliales, y se realizó un análisis de la expresión de citocinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) en el hipocampo. Como un parámetro adicional de los efectos del estrés, se midieron las concentraciones de citocinas circulantes.

### **III. Marco Teórico**

#### **3.1. Estrés**

Los primeros estudios sobre el estrés fueron hechos por Walter Cannon y Hans Selye en la década de 1930. Cannon fue el primero en utilizar el término “pelea o **huída**” (fight or flight) como una respuesta fisiológica ante estresores agudos. El término estrés fue acuñado por Hans Selye, quién examinó el efecto del estrés crónico sobre la fisiología de los organismos. Sus estudios lo llevaron a definirlo como una respuesta inespecífica del cuerpo ante el estresor continuo que conduce a un estado patológico e incluso puede llevar a la muerte del individuo (Handa & Weiser, 2013).

En la actualidad hay diversas definiciones de estrés lo que dificulta tratar de englobarlas en una sola. Para este estudio se ha tomado la definición de Tsigos y Chrousos (2002), que definen al estrés como una respuesta del organismo ante un estímulo que amenace su homeostasis; esta respuesta es de tipo conductual (ira, huida, pelea, etc.) y de tipo fisiológico (activación del sistema simpático adrenal medular [SAM], del eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenales [HPA]), esto se ha observado en distintos organismos, desde ratas hasta humanos. Dependiendo de la duración del estresor, este puede ser clasificado como agudo o crónico.

#### **3.2 El sistema nervioso autónomo y los ejes del estrés**

El sistema nervioso autónomo, o sistema motor visceral, consiste de varios circuitos neurales que controlan la fisiología del cuerpo. Trabaja en conjunto con los mecanismos neuroendocrinos para mantener la homeostasis

(Purves et al., 2004; Squire et al., 2003). El sistema nervioso autónomo inerva los órganos de músculo liso y los tejidos. Las proyecciones de este sistema, forman plexos con órganos y vísceras, como el corazón y los pulmones en el tórax, tracto gastrointestinal, genital y urinario en el abdomen, también proyecta hacia los vasos sanguíneos, glándulas y otros tejidos. Por lo cual el sistema nervioso autónomo ajusta la química sanguínea, la respiración, la circulación, digestión, el estatus reproductivo y las respuestas inmunes, que protegen la integridad del balance interno, así también la función y coordinación de los **músculos** esqueléticos. Por lo tanto, alteraciones en el sistema autónomo provocan la pérdida o ineficiencia de respuestas fisiológicas y de adaptaciones para restaurar la homeostasis (Squire et al., 2003). El sistema nervioso autónomo está dividido en sistema nervioso simpático y sistema nervioso parasimpático, cada uno está organizado de manera jerárquica a niveles pre- y post-ganglionares, del tallo cerebral y espina dorsal. El sistema nervioso simpático se encarga del ajuste fisiológico, vascular, glandular y metabólico, para una adecuada respuesta conductual, particularmente en situaciones de emergencia que las requieran. Mientras que el sistema nervioso parasimpático está organizado para la digestión, asimilación y la conservación de la energía, así como también el descanso (Squire et al., 2003).

### 3.2.1 *Eje simpático adrenal*

Los mecanismos psicofisiológicos de la respuesta al estrés juegan un papel esencial en el proceso de adaptación y supervivencia. El incremento de cortisol o corticosterona, adrenalina, noradrenalina y otras hormonas generadas durante la situación de estrés cumplen una función eminentemente protectora y de supervivencia, siendo la función primordial el mantener el equilibrio homeostático (Moscoso, 2009).

El estrés en el organismo activa diversos sistemas como, el sistema simpático del sistema nervioso autónomo, que prepara al individuo para huir o pelear tal como Cannon lo propuso (Purves et al., 2004). Esto quiere decir que, en circunstancias extremas, la actividad neuronal simpática aumenta, lo que hace que el cuerpo alcance el uso máximo de las reservas de energía para incrementar la oportunidad de supervivencia en situaciones adversas (Purves et al., 2004). Durante la actividad simpática las pupilas se dilatan, los párpados

se retraen, el ritmo cardíaco aumenta, la respiración se incrementa, mientras que los sistemas digestivo y reproductivo disminuyen su actividad. De igual manera, el eje simpático-adrenal medular (SAM), estimula a la médula adrenal que genera la secreción de catecolaminas como la adrenalina y noradrenalina hacia el torrente sanguíneo y median la liberación de glucagón e insulina del páncreas, para aumentar la movilización de energía (Purves et al., 2004; Squire et al., 2003). Estas catecolaminas permiten un aumento en la concentración de glucosa en la sangre facilitando un mayor nivel de energía, oxígeno, alerta, poder muscular y resistencia al dolor (Moscoso, 2009).

La actividad simpática prepara al organismo para una respuesta de huida o pelea, por lo que la división simpática del sistema motor visceral está tónicamente activado para cualquier circunstancia (Purves et al., 2004).

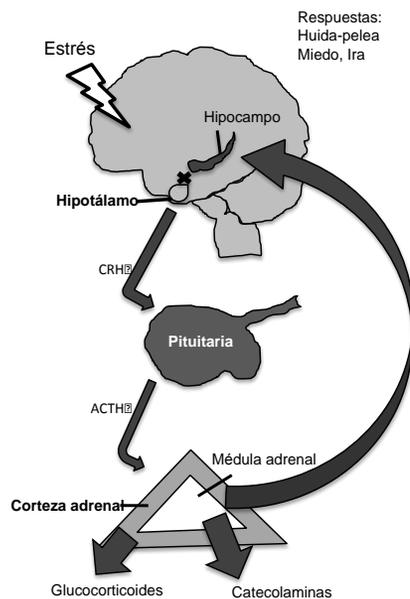
### *3.2.2 Eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenales (HPA)*

El eje hipotálamo-pituitaria-adrenales (eje HPA por sus siglas en inglés), es el sistema neuroendócrino que responde al estrés, tanto en animales como en humanos, el cual tiene como objetivo mantener los parámetros de esfuerzo y atención (Chrousos, 2009).

La activación del eje HPA inicia con la percepción de una amenaza física o psicológica, que llega por diversas vías aferentes al hipotálamo y desemboca en la liberación de una cascada de hormonas (Lupien, Buss, Schramek, Maheu, & Pruessner, 2005). Los núcleos paraventriculares del hipotálamo se activan respondiendo mediante la liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) o factor liberador de corticotropina (CRF), el cual se vierte en los vasos portales de la hipófisis y estimula la secreción de la hormona adrenocorticotropina (ACTH), la cual se secreta a la circulación y llega a las suprarrenales estimulando a su vez la secreción al torrente sanguíneo de los glucocorticoides (GCs, cortisol en humanos y corticosterona en roedores, Figura 1), los cuales juegan un papel crítico para la adaptación al estrés (Torner, 2000). Los corticosteroides actúan en varios tejidos para movilizar la energía almacenada, inducir lipólisis y proteólisis y potenciar la vasoconstricción dirigida por el sistema nervioso autónomo en los individuos adultos (Herman, Flak, & Jankord, 2008); además de tener una amplia gama de funciones durante el desarrollo y para contender con el estrés, son requeridos

para la maduración normal de tejidos periféricos así como para la regulación de la diferenciación celular del tejido neural (Galeeva, Pelto-Huikko, Pivina, & Ordyan, 2010).

Los GCs interaccionan con sus receptores presentes en el SNC, en particular en la hipófisis, el hipotálamo y el hipocampo, conformando un asa de retroalimentación negativa para desactivar la respuesta hormonal y restaurar la homeóstasis (Figura 1).



**Figura 1. Activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenales (HPA) en el adulto.** El estrés estimula la secreción de hormona liberadora de corticotropina (CRH) del hipotálamo hacia la glándula pituitaria para que esta secrete la hormona adenocorticotrófica (ACTH) hacia los vasos portales sanguíneos y llegue a las glándulas adrenales y culmine con la secreción de glucocorticoides (GC) y catecolaminas. Los GC viajan hasta el hipocampo para regular de manera negativa el eje HPA y restaurar la homeóstasis.

En estados basales cuando las concentraciones de GCs son bajas, los receptores a mineralocorticoides (MR) son los que se encuentran ocupados, mientras que los receptores a glucocorticoides (GR) están relativamente desocupados. Cuando las concentraciones de GC aumentan, como en los estados de estrés crónico, los GR son activados, sugiriendo que los efectos adversos de los GC son mediados principalmente por GR más que por MR

(Rothman & Mattson, 2010). Estos receptores son expresados en varias estructuras cerebrales como: la adeno **hipófisis**, el hipotálamo, el hipocampo, que controlan los procesos relacionados con el estrés. Los MR están implicados en el inicio de la respuesta al estrés, mientras que los GR en la terminación de esta respuesta, induciendo la movilización de fuentes de energía requeridas para ello y la restauración del estado basal (Galeeva et al., 2010).

El sistema nervioso simpático y el eje HPA son sistemas que responden directamente al estrés, su principal función es mantener la homeostasis del organismo, como es el caso de las catecolaminas que son los reguladores del metabolismo, el ritmo cardíaco y la termogénesis. Cuando este equilibrio se rompe por cambios internos o externos se activan ambos sistemas, dando como resultado incrementos en los niveles de catecolaminas y glucocorticoides para regresar al organismo a un estado basal (Elenkov, Wilder, Chrousos, & Vizi, 2000).

Esta regulación rápida del eje neuroendócrino es muy importante, sobre todo en etapas tempranas, ya que se postula que cuando la exposición a los GCs es continua se puede alterar el crecimiento y la maduración de diferentes órganos, incluido el cerebro (Avishai-Eliner, Brunson, Sandman, & Baram, 2002).

### *3.3 Organización del Hipocampo y su importancia durante la respuesta al estrés en rata*

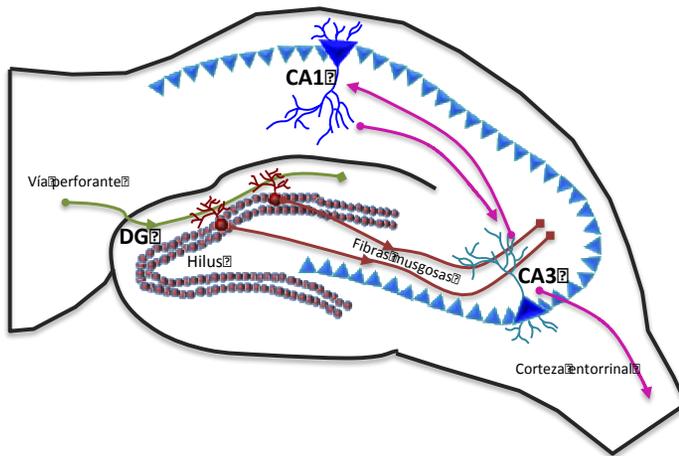
El hipocampo es una estructura plástica importante en la formación de la memoria y el aprendizaje; es susceptible a los efectos de las hormonas del estrés, las cuales provocan atrofia y alteración en la comunicación neuronal, causando efectos sobre las conexiones anatómicas y funcionales entre el giro dentado y la amígdala. El hipocampo tiene un nicho neurogénico que se ha visto disminuido en la tasa de generación de neuronas nuevas (neurogénesis) en la capa granular del hipocampo durante un evento de estrés (McEwen, 2002). Además, la exposición al estrés en la vida temprana en modelos animales ha sido asociada con atrofia hipocampal y problemas de aprendizaje y memoria en la edad adulta (Huot, Plotsky, Lenox, & McNamara, 2002), ésto

se relaciona con estudios en humanos y la imposibilidad de formar nuevos recuerdos (Ivy et al., 2010).

La formación hipocampal comprende tres citoarquitecturas distintas: el giro dentado, el hipocampo el cual es subdividido en tres campos (CA3, CA2 y CA1) y el subiculum. Estas tres regiones forman una apariencia trilaminar; su conectividad es unidireccional. Las letras "CA" se refieren a *cornu Ammón*, del latín cuerno de Ammón. Las dendritas de las células piramidales en la región de CA1 forman una delgada banda (el stratum radiatum) donde recibe sinapsis de las colaterales de Schaffer, es decir de los axones de las células piramidales en la región de CA3 (Figura 1). Las células granulares dentadas proyectan sus fibras musgosas a la región CA3 del hipocampo, mientras que los axones de las células colaterales de CA3 se proyectan a la capa polimórfica del giro dentado (GD), estos axones no inervan a las células granulares. Se ha observado un patrón preferencial unidireccional de las mayores conexiones intrínsecas (CA3-CA1; CA1-subiculum) de la formación hipocampal (Paxinos, 2004).

La corteza entorrinal inerva al GD utilizando como mayor entrada la vía perforante. La proyección entorrinal al GD no es recíproca, ya que ninguna de las células del GD se proyectan a la corteza entorrinal, mientras que las proyecciones entre CA1 y el subiculum son recíprocas (Paxinos, 2004) (Figura 2).

Los estudios en roedores sometidos a estrés durante la vida temprana, han demostrado un aumento de receptores a factor liberador de corticotropina (CRF), en CA3 y CA1 del hipocampo causando incremento en la concentración de corticosterona, además de la alteración en el desempeño en pruebas de aprendizaje y memoria (Ivy et al., 2010; Rothman & Mattson, 2010).



**Figura 2. Estructura del hipocampo en rata.** Las células piramidales conforman esta capa de células y se dividen en las regiones CA1, CA2, CA3. Las células CA1 se comunican con las células CA3 y viceversa, mientras que CA3 envía información a la corteza entorrinal; las fibras musgosas del DG reciben inervación de la vía perforante y estas envían sus proyecciones a CA3 para comunicarse con la corteza entorrinal (Paxinos, 2004).

### 3.3.1 Giro dentado (GD)

El GD comprende tres capas celulares: la capa molecular, la capa de células granulares y la capa de células polimórfica. La capa molecular se encuentra cercana a la fisura hipocámpal; la capa principal o capa de células granulares se encuentra después de la capa molecular y está hecha de columnas de células granulares. Las células granulares y la capa molecular forman una estructura en forma de “V” o “U” (dependiendo de la posición septo-temporal) que encierra a una región celular. El término hilus es usado como sinónimo de capa polimórfica (Paxinos, 2004). El número de células en el GD varía debido a que la proliferación de las células granulares continúa de manera más lenta a lo largo de la vida. Las nuevas células parecen integrarse a la red hipocámpal ayudando a la formación del aprendizaje y la memoria (Purves et al., 2004).

### 3.4. Estrés y el desarrollo del sistema nervioso central (SNC)

Se ha documentado que las experiencias adversas durante las etapas tempranas de la vida le confieren cierta vulnerabilidad al individuo ante

estresores posteriores y lo predisponen a sufrir alguna psicopatología en la edad adulta (Heim & Nemeroff, 2001). Durante estas etapas, varias estructuras importantes del SNC se encuentran en desarrollo y maduración como lo es el cerebelo, el bulbo olfatorio y el hipocampo (Sudarov & Joyner, 2007; Tanapat, Galea, & Gould, 1998).

En humanos, eventos tales como el rechazo emocional o episodios de violencia física o psicológica, se relacionan directamente con la aparición de desórdenes psiquiátricos en la etapa adulta (Heim *et al.*, 2001). También se ha reportado una relación entre el incremento de la depresión y la psicosis en pacientes que han sufrido la pérdida de los padres en etapas tempranas (Jahng, 2010; Kaufman, Plotsky, Nemeroff, & Charney, 2000; Tsigos & Chrousos, 2002).

Las consecuencias conductuales y neuroendócrinas de la exposición temprana al estrés han sido ampliamente estudiadas en los últimos años en modelos animales. Este tipo de estudios han demostrado la importancia de las experiencias tempranas sobre el desarrollo del cerebro y los sistemas de neurotransmisores. En estos modelos se han encontrado incrementadas las concentraciones basales de ACTH, y un aumento del mRNA de CRH en los núcleos centrales de la amígdala en la etapa adulta (Plotsky & Meaney, 1993).

En roedores se ha descrito al período hipo-responsivo como una etapa que se caracteriza porque el eje HPA reacciona poco al estrés, y se ha postulado que éste permite el correcto desarrollo del SNC. Este período abarca desde el día posnatal (PN) 4 al 14 en la rata (Chautard, Boudouresque, Guillaume, & Oliver, 1993; Kent, Tom, & Levine, 1997). Se ha observado que eventos de estrés crónico (separación maternal periódica, separación maternal de 24 h) pueden activar o evocar una respuesta al estrés, tales como la secreción de GC al torrente sanguíneo, los cuales tienen efecto en el SNC (Plotsky, Thirivikraman, & Meaney, 1993), ya que pueden provocar la muerte neuronal de diferentes estructuras y por lo tanto alteran el funcionamiento y comunicación celular.

La separación maternal en crías de rata se ha utilizado como un modelo para inducir una respuesta estresante en etapas tempranas de la vida, caracterizado por un incremento en la expresión de CRF en los núcleos paraventriculares hipotalámicos y alteraciones en la densidad de las fibras

musgosas en el hipocampo, causando una alteración en el aprendizaje en la edad adulta (Huot et al., 2002). Los efectos del estrés durante el desarrollo del hipocampo afectan la plasticidad estructural causando atrofia neuronal, neurotoxicidad y alteran la neurogénesis (Kaufman et al., 2000; Tanapat et al., 1998). La relevancia del hipocampo en la retroalimentación negativa extrahipotalámica en adultos está bien definida, pero aún no es claro si el hipocampo toma parte en la regulación de la hipo-responsividad del eje HPA durante el desarrollo del neonato (Galeeva et al., 2010).

### *3.5 Sistema inmune*

La principal meta del sistema inmune es proteger al organismo del daño causado por la invasión de microorganismos patógenos, virus o sustancias extrañas, por lo cual se requiere que sea capaz de distinguir las sustancias extrañas de las células y tejidos sanos, y para ello utiliza los anticuerpos, linfocitos, leucocitos y células microgliales (Gemma, 2010). Este sistema opera en el organismo como un mecanismo de soporte vital que es regido por el sistema neuroendócrino y el sistema nervioso autónomo (Janeway et al., 2005; A. H. Miller, Maletic, & Raison, 2009).

La respuesta inmune puede dividirse en respuesta adaptativa e innata. La respuesta adaptativa está dada por la producción de anticuerpos para combatir agentes patógenos específicos y es llevada a cabo principalmente por los linfocitos T y B. Esta respuesta requiere del reconocimiento del antígeno en presencia del receptor de la célula inmune específica (complejo de histocompatibilidad) y de mensajeros químicos (citocinas). Los anticuerpos son producidos solo después de la exposición previa a algún daño, bacteria y virus, estos quedan registrados en la memoria de las células del individuo (Janeway et al., 2005). Las unidades móviles, o inmunocitos, circulan por el organismo, residen estacionariamente en tejidos linfoides y en células localizadas en regiones especializadas como el sistema nervioso, y son activados cuando se detecta algún daño. Estas células comprenden a los granulocitos (eosinófilos, neutrófilos y basófilos), mastocitos y monocitos o macrófagos.

La respuesta innata se distingue de la adaptativa en que no requiere de la exposición previa de antígenos, por lo cual puede combatir un amplio rango de ellos (Janeway et al., 2005). El sistema inmune innato puede favorecer

respuestas del tipo Th1 o tipo Th2. Durante la respuesta Th1 los macrófagos activados secretan mediadores pro-inflamatorios, tales como el TNF, las IL y el interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). La respuesta Th2 se caracteriza por la producción de anticuerpos y de mediadores anti-inflamatorios, tales como IL-4, IL-5 e IL-10, los cuales inhiben la respuesta Th1. Este balance Th1–Th2 es esencial para prevenir un exceso de inflamación que podría tener consecuencias negativas (Janeway et al., 2005).

La respuesta inmune puede ser activada por algún daño en el organismo; el tejido dañado manda señales moleculares como quimiocinas que son quimioatrayentes al sitio de daño, y que las células circulantes como monocitos, leucocitos, puedan captar por los receptores DAMP (patrones moleculares asociados a daño) o por PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos), estos receptores desencadenan la activación de vías de señalización para combatir el daño al organismo (Janeway et al., 2005).

### *3.6. Interacción del sistema inmune, el sistema endocrino y el SNC*

Existe una comunicación tridireccional entre el sistema inmune, endocrino y el SNC, la cual se establece en un organismo para responder de manera apropiada a los estímulos dañinos que amenazan su homeóstasis (Bateman, Singh, Kral, & Solomon, 1989; Jurgens & Johnson, 2012). El SNC es un órgano complejo que posee varios tipos celulares que actúan para mantener la integridad y las funciones cerebrales, estas células están agrupadas en tres grandes divisiones: neuronas, células gliales y células endoteliales (Lampron, Elali, & Rivest, 2013). Por mucho tiempo se consideró al SNC como un órgano privilegiado, ya que está rodeado por la barrera hematoencefálica formada de células endoteliales, como una primer línea de defensa impenetrable a elementos celulares periféricos y microorganismos, además de que carece de estructuras linfoides formales (Jauregui-Huerta et al., 2010). Sin embargo, se ha demostrado que el SNC es accesible a la migración de macrófagos y linfocitos activados. Esto es debido a las vénulas de la base endotelial del SNC que expresan moléculas de adhesión y son receptivas al tráfico periférico celular (Bulloch, 2001).

Además de la presencia de la barrera hematoencefálica, se encuentran las células gliales: los astrocitos y la microglia, la cuales conforman el sistema

de defensa, que tienen una función relevante durante la respuesta inmune innata. Cuando estas células son estimuladas sintetizan mensajeros químicos como las citocinas, las cuales estimulan la respuesta inflamatoria de manera local (Bulloch, 2001). Sin embargo, las citocinas provenientes de la periferia, pueden viajar en el fluido cerebroespinal y modular funciones de otras células (Das, 2011), éstas pueden entrar de forma limitada a través de regiones que carecen de la barrera hematoencefálica, como el lóbulo neural de la pituitaria, la glándula pineal, la eminencia media, el área postrema, el órgano subcomisural, el órgano subfornical o la lámina terminalis (Bulloch, 2001; Petty & Lo, 2002).

Al presentarse la activación del sistema de defensa del SNC, como puede ser durante un daño mecánico, se conduce a la movilización sistémica de factores endocrinos, nerviosos e inmunes para contender, eliminar y/o suprimir la invasión del patógeno (en el caso de que este sea el detonante) o en respuesta a eventos emocionales que pueden ser traumáticos, como un shock. Estos eventos fisiológicos pueden incluir:

- ✚ Efectos sobre PNV del hipotálamo.
- ✚ Un incremento de granulocitos en sangre y en el sitio del daño.
- ✚ Cambios endócrinos, liberación de corticotropina, cortisol, catecolaminas adrenales, hormonas de crecimiento, tirotropina, tiroxina, aldosterona, vasopresina.
- ✚ Cambios cardiovasculares.

El sistema inmune tiene receptores que reconocen a agentes dañinos, éstos inducen señales para la activación de las células del sistema inmune innato como primera defensa, las cuales sintetizan y liberan citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ . Estas citocinas pueden actuar sobre el cerebro y también se les ha relacionado como los principales biomarcadores en pacientes con depresión mayor (Jurgens & Johnson, 2012; A. H. Miller et al., 2009).

**Tabla 1. Funciones de las citocinas en el desarrollo del SNC y su relación con el eje HPA**

CITOCINAS	FUNCIÓN EN EL SNC Y EL ESTRÉS
<p><b>IL-1<math>\beta</math></b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Su síntesis es inducida por shocks eléctricos y se expresa en varias estructuras cerebrales como: PVN, hipocampo, corteza, cerebelo entre otras (Hueston et al., 2011; Nguyen et al., 1998)</li> <li>• Mediador de cambios en la excitabilidad, alterando el balance del glutamato en las uniones sinápticas (Hueston et al., 2011).</li> <li>• Proliferación glial durante el desarrollo (Pousset, 1994).</li> <li>• Varios de sus efectos centrales son mediados por IL-6 (Pousset, 1994).</li> <li>• Induce la secreción de corticosterona (Song, Phillips, &amp; Leonard, 2003).</li> <li>• Relacionada en el aprendizaje y memoria a largo plazo (Bilbo, Levkoff, et al., 2005).</li> </ul>
<p><b>IL-6</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activa el eje HPA e incrementa el metabolismo del triptófano y serotonina (Berczi &amp; Szentivanyi, 2003).</li> <li>• Sus receptores han sido detectados en varias regiones del cerebro (corteza, hipocampo, hipotálamo) (Pousset, 1994).</li> <li>• IL-6 induce la síntesis del NGF y su liberación por astrocitos (Pousset, 1994).</li> <li>• Proliferación de células cerebrales durante los estadios embrionarios (Pousset, 1994).</li> <li>• Mantenimiento de la homeostasis en la edad adulta (Sierra <i>et al.</i>, 2014).</li> </ul>
<p><b>TNF-<math>\alpha</math></b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diferenciación celular, neurogénesis y muerte celular programada durante el desarrollo del SNC (Babri, Doosti, &amp; Salari, 2014).</li> <li>• Interactúa con los receptores AMPA en neuronas hipocampales (Velasco-Ramirez, Rosales-Rivera, Ramirez-Anguiano, &amp; Bitzer-Quintero, 2013).</li> <li>• Induce la liberación de glutamato (Tolosa, Caraballo-Miralles, Olmos, &amp; Lladó, 2011).</li> <li>• Reduce la expresión del transportador de glutamato (Tolosa et al., 2011).</li> </ul>

### 3.6.1. Las citocinas durante el desarrollo del SNC

El establecimiento del sistema inmune en la mayoría de los organismos, entre ellos los humanos, se presenta desde que el organismo se encuentra en el útero, y mediante la interacción con el ambiente en el que se encuentra y su genética se da una programación, que más tarde puede ser modificada por factores externos o ambientales, es decir factores epigenéticos, durante las primeras etapas de la vida. Diversos estudios han demostrado que esta programación fetal-neonatal aumenta los riesgos de desarrollar enfermedades cardiovasculares, o resistencia a la insulina, debido a que este sistema de

defensa es muy plástico durante estas etapas del desarrollo (Frank, Thompson, Watkins, & Maier, 2012).

El desarrollo del SNC es regulado en parte por factores neurotróficos que interactúan en procesos como la diferenciación neural, la sobrevivencia, el desarrollo de los oligodendrocitos y la gliogénesis. Estos incluyen al factor de crecimiento nervioso (NGF), al factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) entre otros. En adición a esto, las células gliales producen citocinas para regular varias funciones cerebrales (Tabla 1). Por ejemplo, la IL-1 $\beta$  participa en la proliferación glial y muchos de sus efectos son mediados por la IL-6 que induce la síntesis de NGF; la IL-2 influencia la proliferación y maduración de oligodendrocitos y aumenta la viabilidad de neuronas neocorticales en cultivos primarios de rata; mientras que el factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSF) está involucrado en la regulación de las funciones de células microgliales. La expresión de algunas citocinas como la IL-1 $\beta$  o la IL-6 se ha observado en varias regiones cerebrales (corteza, hipocampo, hipotálamo) por hibridación *in situ* en ratas intactas (Pousset, 1994).

También se conoce que las citocinas tienen efectos sobre el desarrollo y función del cerebro, como en la remielinización, y se incrementa en caso de daño neuronal. En astrocitos primarios, TNF- $\alpha$  induce la proliferación y síntesis del factor de crecimiento neural, mientras que en neuronas parece estar involucrado en el proceso de crecimiento de neuritas (proyecciones o prolongaciones de las neuronas) (Schmitz & Chew, 2008).

### 3.6.2. Citocinas y psicopatologías

Diversos trabajos han reportado la relación de las citocinas y el desarrollo de alteraciones conductuales. En pacientes con depresión se presentan niveles plasmáticos elevados de los mediadores pro-inflamatorios IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  y proteína C-reactiva (Bremmer et al., 2008; Irwin & Miller, 2007; Tuglu, Kara, Caliyurt, Vardar, & Abay, 2003). Además, las concentraciones de citocinas pueden ser afectadas por el uso de antidepresivos (Penninx et al., 2003; Tuglu et al., 2003).

En modelos animales, se ha observado que al exponer a los individuos a estrés, ya sea shocks eléctricos, inmovilización, estrés psicosocial, exposición

a lipopolisacárido, etc., aumentan los niveles de expresión de citocinas en estructuras hipotalámicas (Avitsur, Kavelaars, Heijnen, & Sheridan, 2005; Nguyen et al., 1998; van der Meer, Sweep, Pesman, Tilders, & Hermus, 1996), y pueden conducir al desarrollo de conductas tipo depresivas, a una reducción de la interacción social, o a un incremento de la ingesta de alimentos y líquidos y de la actividad locomotora (Avitsur et al., 2005; van der Meer et al., 1996). La expresión de las citocinas en el SNC puede ser estimulada de manera diferencial por el estrés (de Pablos et al., 2006; Hueston et al., 2011; Nguyen et al., 1998). Por otro lado, también se ha observado que al administrar IL-1 $\beta$  se induce un aumento en la secreción de la ACTH en el plasma en ratas, lo cual puede inducir la secreción de GC y la activación del eje HPA (van der Meer et al., 1996). Otros estudios han mostrado que sujetos con desorden de depresión mayor (MDD) tienen una respuesta elevada de citocinas evocada por el estrés psicosocial agudo (G. E. Miller, Rohleder, & Cole, 2009); una de ellas es la citocina IL-6, que es parte integral de la respuesta inmune innata a estresores físicos (infección, inflamación). El mecanismo por el cual el estrés psicosocial inicia la respuesta de citocinas aún es objeto de estudio (Carpenter et al., 2010).

La liberación de TNF- $\alpha$  por células gliales en el SNC se ha observado en trauma cerebral agudo, isquemia, infecciones o en enfermedades neurodegenerativas. Se ha descrito un aumento de TNF- $\alpha$  en condiciones de estrés agudo por inmovilización, en el cual se incrementa de forma temprana, aunque también se ha observado la participación del aminoácido excitador glutamato en esta liberación de TNF- $\alpha$ . La liberación de esta citocina regula la activación de otros mediadores en la neuroinflamación por el estrés como el factor transcripcional NF- $\kappa$ B y la isoforma inducible de NOS (García-Bueno, 2008; Tolosa et al., 2011). Estos estudios muestran una clara relación de las citocinas y su efecto sobre el SNC y como pueden influir en la conducta de los individuos.

### *3.7. Las células gliales como protectores del SNC*

Durante períodos de inflamación cerebral (infección, enfermedades neurodegenerativas, daño traumático), los macrófagos circulantes y otras

células sanguíneas son reclutadas en el cerebro por señales endoteliales para remover el tejido necrótico y defenderse de alguna infección microbiana (Squire et al., 2003). Sin embargo, dentro de los tipos celulares que constituyen al SNC, las células gliales (astroglia y microglia) son de gran importancia en la inmunidad, aunque comúnmente se describen como células de mantenimiento y soporte para las neuronas, ya que les brindan factores tróficos necesarios para su sobrevivencia, la nueva evidencia las involucra en importantes procesos como: en la comunicación entre el sistema periférico y el SNC, la comunicación sináptica (Rajkowska & Miguel-Hidalgo, 2007), la sinaptogénesis, o el balance del microambiente (Bessis, Bechade, Bernard, & Roumier, 2007).

### 3.7.1. *Microglia*

El sistema nervioso tiene una capacidad inmunológica que difiere de la mayoría de los tejidos periféricos, este tejido puede reaccionar de forma inmune dependiendo de las células innatas especializadas, incluyendo la microglia, macrófagos y células dendríticas. Los únicos nichos anatómicos del SNC como las meninges, los plexos coroides y los espacios perivasculares son ocupados por células dendríticas y macrófagos que funcionan como centinelas del sistema inmune innato capaces de orquestar la respuesta inflamatoria. El parénquima del cerebro esta poblado de células microgliales. La microglia comprende del 10-15% del total de las células gliales y también se refiere a ellas como macrófagos residentes del tejido nervioso. A diferencia de los macrófagos de los plexos coroides, meninges y perivasculares, la microglía se origina del saco vitelino y se distribuye al SNC durante la vasculogénesis. La microglía residente en el cerebro adulto tiene un cuerpo celular pequeño y altamente ramificado, esta morfología la distingue de los macrófagos y células dendríticas. Estas células participan en el desarrollo del SNC, la homeostasis y los desbalances en el cerebro. Como parte de sus funciones homeostáticas, los cuerpos microgliales permanecen estacionarios, pero sus procesos están constantemente examinando el espacio extracelular y comunicándose con neuronas, astrocitos y vasos sanguíneos. Se propone que el estado residente o perpetuo de movimiento le permite responder de manera rápida al daño o infección cambiando a un fenotipo activado que desempeñe funciones inflamatorias (Nayak, Roth, & McGavern, 2014).

La activación de la microglia se ha asociado con enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer, Huntington y esclerosis múltiple. Además ha propuesto que la pérdida del balance neuroprotector y citotóxico de las células microgliales en el SNC puede favorecer el desarrollo de desórdenes conductuales como la depresión (McNally et al., 2008).

En modelos animales adultos se ha demostrado que la exposición al estrés agudo induce la activación de la microglia, así como la liberación de los marcadores de la inflamación: IL-1 $\beta$ , IL-6 e iNOS (sintasa inducible de óxido nítrico). También se ha observado un aumento en el número de células microgliales en respuesta al estrés, dependiente de la duración y tiempo de exposición al mismo, y la activación en áreas cercanas a los ventrículos, el tálamo y el hipotálamo que tienen contacto con el tercer ventrículo (Sugama, Fujita, Hashimoto, & Conti, 2007). La microglia representa el nexo entre la actividad neurológica e inmunológica en el SNC.

#### *3.7.1.1. Origen de la microglia*

La microglia comprende células de soporte abundantes. Se deriva de la médula ósea, al igual que otras células hematopoyéticas y migra al SNC durante la embriogénesis (Bulloch, 2001).

Las células microgliales fueron descubiertas por Río Hortega (1937), distintos estudios han concluido que la microglia es de origen mielóide y deriva del sistema hematopoyético, aunque inicialmente se pensaba que derivaba de monocitos circulantes, debido a estudios con radiación y la ruptura de la barrera hematoencefálica y la entrada de los monocitos que poseían una morfología similar a la microglia (Nayak et al., 2014). Se originan del saco vitelino, sugerido por Cuadros en 1990, quien trabajó con embriones de pollo para observar las células mieloides primitivas que invaden el cerebro durante el desarrollo (Nayak et al., 2014), esto fue apoyado por Alliot y col., quienes mostraron la presencia de los precursores de la microglia en el saco vitelino en el día embrionario 8 (Alliot, Godin, & Pessac, 1999). Nueva evidencia fue aportada por Ginhoux y col. (2010) demostrando que la microglia deriva de macrófagos primitivos que derivan del saco vitelino durante la embriogénesis. Durante el desarrollo neonatal los precursores mieloides se diferencian a microglia, esto es controlado por varias moléculas como factores de

transcripción, factores de crecimiento, quimiocinas, MMP (metaloproteinasas de matriz) y micro RNA (Nayak et al., 2014).

### *3.7.1.2. Las células microgliales y el desarrollo del SNC*

La microgliogénesis y la neurogénesis ocurren concomitantemente, lo cual ha propuesto que la microglia interactúa con las neuronas desde las etapas del desarrollo hasta la edad adulta (Nayak et al., 2014). La microglia contribuye con el balance del ambiente celular mediante la liberación de factores tróficos que promueven la proliferación celular; así se puede decir que las células microgliales son facilitadoras del bienestar y la salud del SNC (Ginhoux, Lim, Hoeffel, Low, & Huber, 2013).

Durante el desarrollo temprano hay una gran proliferación neuronal, pero la mitad de las células inmaduras mueren durante esta etapa a través de la muerte celular programada. Esta muerte neuronal puede ser iniciada por factores intrínsecos o por células accesorias como las células microgliales que las inducen a la muerte y posteriormente limpian los restos celulares (fagocitosis, sin iniciar respuesta inflamatoria). Esta inducción puede ser llevada a cabo mediante la liberación de especies reactivas de oxígeno, lo que activa una serie de factores que conduce a la muerte de las neuronas (Bessis et al., 2007). La poda axonal programada y la eliminación selectiva de las sinapsis defectuosas por la microglia son eventos críticos para el establecimiento funcional y la maduración de los circuitos durante el desarrollo, (Ginhoux et al., 2013; Zusso et al., 2012).

### *3.7.1.3. Microglia en la enfermedad*

Las células microgliales se encuentran presentes en el desarrollo y progresión de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple, entre otras, por lo cual se ha propuesto a estas células como parte de las responsables del deterioro en la salud del SNC (Bilbo, Smith, & Schwarz, 2012; Streit, Conde, Fendrick, Flanary, & Mariani, 2005). El estrés durante la infancia puede predisponer a los individuos al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas en la edad adulta (Hueston & Deak, 2014), se propone que es una consecuencia de la alteración de la homeostasis neural y glial (Bilbo & Schwarz, 2009). Se ha planteado que las células microgliales

durante las etapas tempranas de la vida pueden programarse ante estímulos como las infecciones y el estrés, y así inducir un estado pre-activado de la microglia y por lo tanto influir en el desarrollo del SNC y la conducta (Bilbo & Schwarz, 2009; Hueston & Deak, 2014; Ziko et al., 2014).

### 3.7.2. *Astroglia*

Los astrocitos tienen una gran variedad de papeles en el SNC, como lo son el soporte, mantenimiento del balance de agua y la distribución de iones, la formación de la barrera hematoencefálica, la regulación sináptica y su participación en la reparación y el proceso de cicatrización después de un daño traumático. Varios trabajos indican que los astrocitos están involucrados de forma activa en enfermedades neuronales agudas y crónicas, como en isquemia, daño y choque. Los astrocitos tienen contactos con los vasos sanguíneos cerebrales y las sinapsis, controlando el incremento del flujo sanguíneo evocado por la actividad sináptica, median el incremento del flujo sanguíneo que es fundamental para la señal dependiente del nivel de oxígeno.

Se ha estimado que un astrocito puede envolver 140,000 sinapsis y de 4 a 6 somas neuronales, y puede conectar con 300 a 600 dendritas neuronales en roedores. Este marco hace posible que los astrocitos regulen y detecten el medio químico externo durante la transmisión sináptica (Ji, Berta, & Nedergaard, 2013).

#### 3.7.2.1. *Los astrocitos durante el desarrollo*

La generación de los astrocitos comienza después de la neurogénesis (Winkelmann-Duarte et al., 2011). En la corteza cerebral los astrocitos son producidos por células gliales radiales (RGC) en la zona subventricular cortical, donde después del nacimiento son generados localmente en la corteza. Se ha descubierto recientemente que la generación de los astrocitos corticales después del nacimiento se mantiene debido a la división local de los astrocitos maduros. Los astrocitos nacidos en la zona subventricular migran a la corteza y generan la mayoría de los astrocitos por mitosis, dando lugar a dos células hijas funcionales y diferenciadas. Se desconocen los factores que están involucrados durante este proceso. A diferencia de las neuronas y los oligodendrocitos, los astrocitos son capaces de dividirse constantemente hasta

la etapa adulta. Este proceso se incrementa después del daño para formar la cicatriz glial en el cerebro y la espina dorsal. Cabe notar que las células madre de la zona subventricular y las células ependimales, también pueden contribuir a la astrogénesis inducida por daño, sugiriendo orígenes potenciales múltiples de los astrocitos en la edad adulta (Guerout, Li, & Barnabe-Heider, 2014).

#### *3.7.2.2. Astroglia y enfermedad*

La astroglia juega un papel importante en la neuroplasticidad a través de la secreción de factores neurotróficos y la remoción del exceso de glutamato protegiendo a las neuronas de sus efectos tóxicos. Una alteración del número de astroglia podría alterar la capacidad del cerebro de reciclar a los aminoácidos excitatorios y disminuir la disponibilidad de factores neurotróficos (McNally et al., 2008). Además se ha observado una reducción del número de células astrogiales en pacientes diagnosticados con depresión, lo cual relaciona a estas células en el desarrollo de esta psicopatología (Rajkowska & Miguel-Hidalgo, 2007).

#### **IV. ANTECEDENTES**

Se ha demostrado que un estresor en edad temprana, como la SM, induce cambios en el número de astrocitos en algunas zonas del SNC en la edad adulta. Esto podría ser debido a que el estresor genera una alteración del microambiente celular afectando la sobrevivencia y función de las células astrogliales (Bautista & Dueñas, 2012). Las células microgliales también pueden responder ante estímulos estresantes y secretar moléculas que pueden ser dañinas a los otros estirpes celulares e impactar en las funciones cognitivas (Diz-Chaves, Pernia, Carrero, & Garcia-Segura, 2012; Sugama et al., 2007).

Por otro lado, también se ha observado que al exponer al organismo a un evento estresante durante etapas tempranas y enfrentarlo a un segundo reto (inmune) en la edad adulta, se encuentra una reactividad aumentada de la respuesta inmune, que se ha asociado a la carencia de un control en el asa de retroalimentación de los GC (Avitsur, Hunzeker, & Sheridan, 2006).

Si bien se han descrito en el adulto cambios en la astroglia y un aumento en las citocinas pro-inflamatorias circulantes a consecuencia de un estado depresivo (Dantzer, O'Connor, Freund, Johnson, & Kelley, 2008), poco se ha descrito sobre los efectos del estrés durante el desarrollo postnatal y su impacto sobre los mecanismos pro-inflamatorios cerebrales que podrían subyacer durante esta etapa.

#### **V. JUSTIFICACIÓN**

La mayoría de los trabajos se han enfocado en la investigación de los efectos que ejerce el estrés presentado durante las etapas tempranas de la vida sobre la edad adulta; sin embargo, hay poca información relacionada con sus consecuencias durante el desarrollo inmediato del SNC del neonato, y tampoco se conoce su interacción con el sistema inmune durante esta etapa.

Por lo anterior, en este trabajo se estudió el efecto del estrés en las primeras etapas de la vida sobre la respuesta inflamatoria y las células gliales, además de la expresión de citocinas pro-inflamatorias en el hipocampo y en el sistema circulatorio de ratas macho.

## **VI. HIPÓTESIS**

La separación maternal (SM) induce una activación de la respuesta pro-inflamatoria en el hipocampo y en las citocinas circulantes periféricas del neonato de ratas macho.

## **VII. OBJETIVOS**

### *7.1. General*

Analizar el efecto de la SM sobre la respuesta pro-inflamatoria en el hipocampo y en las citocinas circulantes periféricas del neonato de ratas macho.

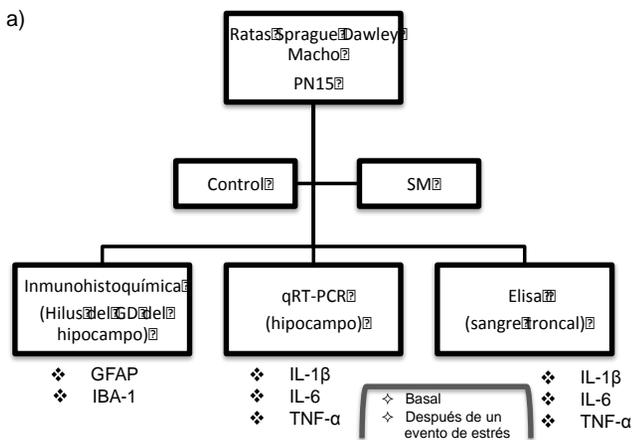
### *7.2. Particulares*

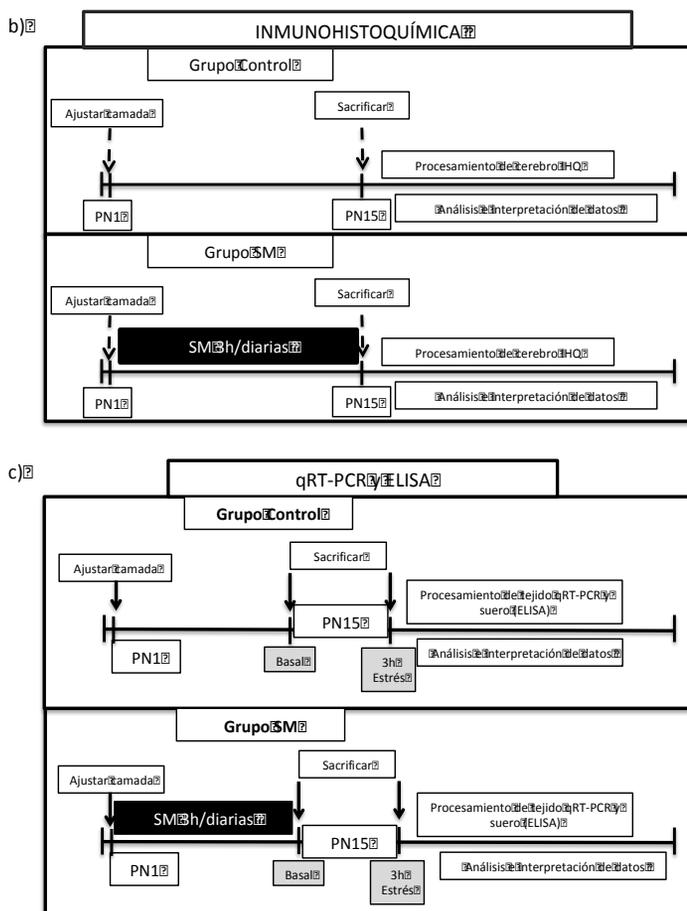
- 1) Evaluar los efectos de la SM en ratas macho sobre el peso corporal y el peso relativo de los tejidos relacionados al sistema inmune y estrés.
- 2) Determinar las concentraciones de corticosterona circulantes en las ratas macho sometidas a SM al PN15.
- 3) Analizar la morfología y el número de las células gliales (astrocitos y microglia) en el hilus del GD del hipocampo al PN15 en ratas macho sometidas a SM.
- 4) Determinar la expresión del RNAm de las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en el hipocampo al PN15 de ratas macho sometidas a SM.
- 5) Determinar las concentraciones circulantes de las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  al PN15 en ratas macho sometidas a SM.

## VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1. Estrategia experimental

Se utilizaron crías de ratas Sprague Dawley que fueron divididas en dos grupos: control (CONT) y grupo sometido a estrés por separación maternal (SM). Las camadas fueron ajustadas a 8 individuos el día PN1 (Figura 3a). El grupo SM fue expuesto al modelo de estrés de Separación Maternal, consistió en separar la camada completa de su madre durante 3 h diarias en un lugar aislado de la colonia a una temperatura constante (30-35°C). Cada cría fue mantenida aislada de sus hermanos durante las 3 h de SM, del día PN1 al PN14, y al PN15 (Plotsky & Meaney, 1993), estas camadas fueron destinadas para realizar el análisis morfológico de las células gliales (Fig. 3b). Para el análisis





**Figura 3. Diseño experimental.** a) Metodología experimental, b) Grupos control y grupo separación maternal (SM) para el análisis histológico; c) grupos destinados para la expresión de citocinas en el hipocampo y la cuantificación de citocinas periféricas.

de la expresión de citocinas en el hipocampo y la secreción en la circulación sanguínea se utilizaron otros grupos de animales sometidos a las mismas condiciones de SM y se subdividieron en dos grupos. En el grupo Basal los animales se sacrificaron inmediatamente después de sacarlos del nido, para evitar una respuesta al estrés. En el grupo de Estrés las crías se separaron de su madre durante 3 h y se sacrificaron inmediatamente, ésto con la finalidad de analizar el efecto de un solo episodio de estrés en las crías al PN15 (Fig. 3c).

## 8.2. Inmunohistoquímica

Para los análisis morfológicos se utilizó una “n” biológica de 8 individuos por grupo. Los animales fueron sacrificados al PN15 con una sobredosis del anestésico pentobarbital y fueron perfundidos por vía intracardiaca con solución salina y solución fijadora de paraformaldehído (PFA) al 4% en PB (Buffer de fosfatos 0.1M). Los cerebros fueron extraídos y se post fijaron durante 24 h con PFA, pasado este tiempo se colocaron en sacarosa al 10%, 20% y finalmente al 30%, hasta ser procesados. Los cerebros fueron procesados para obtener cortes coronales seriados de 40  $\mu\text{m}$  de grosor, con una distancia de 240  $\mu\text{m}$  cada uno, en un crióstato a  $-22^{\circ}\text{C}$  (Triangle biomedical sciences, TBS). Los cortes fueron inmunoteñidos con anticuerpos específicos para identificar glía (anti-Iba1, Millipore) y la astrogliia (anti-GFAP, Millipore). Para la tinción de los astrocitos los cortes fueron pre-tratados con una solución de peróxido de hidrógeno al 10% en PB con tritón X-100 (PBT 0.1M, tritón X-100 3%) para bloquear las peroxidases endógenas. Posteriormente se lavaron con PB y se incubaron en solución bloqueadora (suero de caballo 5%, PBT 0.1M) por 30 min; luego se incubaron por 48 h con un anticuerpo primario (Rabbit anti-GFAP 1:3000, Millipore). Se lavó el tejido con PB y se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a biotina (anti-rabbit IgG 1:750, Sigma) por 2 h, seguido de una incubación con el complejo avidina-biotina (Elite ABC kit, Vector Laboratories). Para el revelado se utilizó un kit de diaminobencidina (DAB, Vector Laboratories). Se detuvo la reacción con PB y los cortes se montaron en laminillas gelatinizadas (gernetina a 1%) y se dejaron secar. Se les colocó medio de montaje Cytoseal y se cubrieron con un cubre objetos y se dejaron secar. Para la tinción de la microglia los cortes fueron pretratados con una solución de peróxido de hidrógeno al 10% en metanol, seguido de otra solución de peróxido de hidrógeno al 10% en PBT, para bloquear las peroxidases endógenas. Posteriormente se lavaron con PB y se incubaron en solución bloqueadora por 30 min. A continuación fueron incubados con el anticuerpo primario (mouse anti-Iba1/IAF1 1:3000, Millipore) por 48 h, posteriormente se lavaron y se dejaron incubar por 2 h con el anticuerpo secundario (anti-mouse IgG 1:750, Vector laboratories). Después se incubaron con un conjugado Avidina-biotina y se revelaron con el kit de revelado de DAB. Por último se dejaron secar y se les agregó el medio de montaje y se colocó con el cubreobjetos.

### 8.3. *Inmunohistoquímica fluorescente*

Para la inmunohistoquímica fluorescente se realizó el mismo procedimiento para las inmunotinciones anteriormente descritas; se utilizó el anticuerpo primario (anti-IBA, 1:200, Millipore) y (anti-GFAP 1:300, Millipore), y se dejaron incubando por 24 h a 4°C. Al siguiente día los cortes se lavaron con PB y posteriormente se incubaron con anticuerpos secundarios anti-mouse (Alexa Fluor 643 1:250, Sigma) y anti-rabbit biotinilado (1:250, Sigma), se incubaron por 2 h (a partir de esta etapa se manipuló e incubó todo en oscuridad). Enseguida se lavaron e incubaron con avidina (1:200, Vector laboratories) en buffer de bicarbonatos 2x (bicarbonato de sodio 84 g/l, cloruro de sodio 58 g/l, pH 8.5) por 90 min, se lavaron en PB y se bloquearon las avidinas y las biotinas con el kit correspondiente (Vector laboratories) por 15 min y se incubaron con anti-mouse NeuN (1:300, Millipore) por 24 h a 4°C en agitación constante. Posteriormente se lavó con PB y se incubó 2 h con el anticuerpo 2º anti-mouse biotinilado a 4°C, se lavó con PB-T y se incubó con Amca (1:100, Vector) por 90 min. Finalmente se lavó y se montaron las muestras en los portaobjetos y se cubrieron con medio de montaje para inmunohistoquímica fluorescentes (Fluoromount/plus, Diagnostic BioSystems). Posteriormente se visualizaron en un microscopio confocal

### 8.4 *Análisis morfológico de las células microgliales*

Se realizó un muestreo sistemático aleatorio a lo largo del plano rostro-caudal del cerebro. Para llevar a cabo esto, se seleccionaron al azar uno de cada seis cortes de 40 µm de grosor con 240 µm de distancia entre cada uno. Las células microgliales fueron detectadas con el anticuerpo anti Iba-1 (molécula adaptadora de unión a calcio ionizado). Esta molécula funciona para llevar a cabo el remodelamiento de la membrana y participa en la ondulación de la membrana (ruffling) y fagocitosis en la microglia activada (Ohsawa, Imai, Sasaki, & Kohsaka, 2004).

Para el conteo se consideraron las células positivas para IBA en el hilus del GD del hipocampo. Se analizaron tres campos por corte. Se analizaron ocho cortes.

Se tomaron registros fotográficos de los cortes con un microscopio de campo claro acoplado a una cámara de video digital (AxioCam MRC, Carl Zeiss). La evaluación del área ( $\mu\text{m}^2$ ) de cada campo analizado se realizó por medio del programa analizador de imágenes Axiovision Rel 4.0 (Carl Zeiss). El área se delimitó y se contaron las células dentro de la misma; con estos datos se calculó la densidad de las células marcadas contra IBA en el área examinada.

Se cuantificó la microglia total en el hilus, de acuerdo a la descripción de (Diz-Chaves et al., 2012), como microglia en reposo (soma pequeño y ramificaciones largas y delgadas) y la microglia activada (soma de gran tamaño casi amebosoide y con ramificaciones cortas y gruesas).

#### *8.5. Análisis morfológico de los astrocitos*

Para el análisis de los astrocitos se realizó un muestreo sistemático aleatorio a lo largo del plano rostro-caudal del cerebro. Para llevar a cabo esto, se seleccionaron al azar uno de cada seis cortes de 40  $\mu\text{m}$  de grosor con 240  $\mu\text{m}$  de distancia entre cada uno, como se describió anteriormente. Para el conteo se consideraron las células positivas para GFAP (proteína ácida fibrilar glial, es una proteína del citoesqueleto que expresada en esta estirpe celular) en el hilus del GD del hipocampo.

Se cuantificaron los astrocitos totales en el hilus del hipocampo. Posteriormente se analizó su morfología por medio de una cámara neurolucida, se tomaron 10 células al azar de cada individuo (5 animales por grupo) que se dibujaron en papel y posteriormente se transformaron a formato digital, para llevar a cabo el análisis de Sholl en el programa ImageJ, que consiste en trazar círculos concéntricos de 5  $\mu\text{m}$  de distancia entre ellos y cuantificar las proyecciones de las ramificaciones; además con este programa se estimó el tamaño del soma.

#### *8.6. Colección de tejido para la extracción del RNA y muestras de sangre*

Las crías fueron sacrificadas por decapitación inmediatamente después de sacarlas del nido para la extracción de RNA y cuantificación de citocinas. Se extrajeron los siguientes tejidos: el bazo, el timo y las adrenales para obtener

su peso; también se colectó la sangre para la determinación de corticosterona y citocinas en tubos Eppendorf limpios con aprotinina y EDTA, estas muestras fueron centrifugadas para separar el plasma, y se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento. Se extrajo el cerebro y se diseccionó el hipocampo, se colocó en tubos Eppendorf con Trizol (Invitrogen) y se guardaron a -30°C hasta ser procesados. La extracción del RNA se llevó a cabo con Trizol (Invitrogen) de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante. Posteriormente el producto obtenido se analizó en un espectrofotómetro (260/280nm, Eppendorf) para analizar la pureza e integridad del mismo.

#### *8.7. Síntesis del cDNA*

Para la síntesis de cDNA se utilizó 1 µg de la muestra de RNA, con 1 µl de buffer de DNAsa I 10x (Invitrogen), 1 µl de DNAsa I (1 U/µl, Invitrogen), con agua tratada con Dietilpirocarbonato (DEPC, 0.1%) en un tubo libre de RNAsas. Se incubó por 15 min a temperatura ambiente, posteriormente se inactivó la DNAsa I agregando 1 µl de solución de EDTA 25 mM (Invitrogen). Se cuantificó el mRNA en un espectrofotómetro (Biophometer, Eppendorf). En un tubo nuevo se agregó 1 µg de mRNA, 1 µl de oligo dT<sub>12-18</sub> (500 µg/ml, Invitrogen), 1 µg de dNTP mix 10 mM (Invitrogen) y agua de libre de RNAsa para un volumen final de 20 µl, posteriormente se agregó 4 µl de First-strand buffer 5x (Invitrogen), 2 µl de DTT (0.1 M, Invitrogen) y 1 µl de RNase OUT (40 U/µl, Invitrogen), se agregó 1 µl de M-MLV RT (200 U, Invitrogen) y se incubó por 50 min a 37°C, se inactivó por calor a 70°C por 15 min. Por último se cuantificó en un espectrofotómetro el cDNA para determinar la cantidad y pureza del mismo.

#### *8.8. PCR punto final*

Se diseñaron las secuencias de oligonucleótidos para la determinación de la expresión de las citocinas pro-inflamatorias en cerebro de rata (Tabla 2), con el programa DNASTAR (Primer design). Para ello se utilizaron las secuencias del RNAm de la base de datos del Genbank del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Las secuencias de oligonucleótidos se validaron por medio de la técnica de PCR punto final, para lo cual se utilizó lo siguiente: 2 µl de buffer PCR 10x, 2 µl de dNTPs 2 mM, 0.6 µl de cloruro de

magnesio al 50 mM (Invitrogen), 1  $\mu$ l del oligo directo, 1  $\mu$ l del oligo reverso, 1  $\mu$ l de Taq polimerasa (1 U/ $\mu$ l, Invitrogen), 1  $\mu$ l de cDNA. Las mezclas de los diferentes oligos se colocaron en un termociclador de gradiente de temperaturas Veriti (Applied Biosystems), en donde la temperatura de desnaturalización fue de 95°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos con 15 s de desnaturalización a 94°C; 30 s de alineamiento a 59°C para IL-6, y 62°C para IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y  $\beta$  actina como gen endógeno, y 30 s de extensión a 72°C. Después de un paso final de extensión de 7 minutos a 72°C, se mantuvo a 4°C. Posteriormente se verificó que el producto de amplificación correspondiera con el tamaño esperado, en un gel de agarosa al 2%.

### 8.9. PCR tiempo real

El número de animales utilizados para este procedimiento fueron 5 individuos por condición (Basal/estrés) por grupo. En esta técnica se utilizaron 3  $\mu$ l (500  $\mu$ g) de cDNA, 5  $\mu$ l de Veriquest Fast Sybr Green Master Mix (USB Affymetrix Inc.), 0.9  $\mu$ l de oligo directo (10 pM/ $\mu$ l, Elim), 0.9  $\mu$ l de oligo inverso (10 pM/ $\mu$ l, Elim) y 0.2  $\mu$ l de agua grado biología molecular, para obtener un volumen final de 10  $\mu$ l por reacción. Se utilizó un termociclador para tiempo real (StepOne Plus, Applied biosystems). La temperatura inicial de desnaturalización fue de 95°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos con 15 s de desnaturalización a 94°C; 30 s de alineamiento a 59°C para IL-6, 62°C para IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y  $\beta$ -actina; y 30 s de extensión a 72°C. Se normalizaron los datos y se analizaron por el método delta-delta CT. Se realizaron triplicados de cada muestra.

**Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos.**

Gen	Secuencia 5'-3'	Tm	Producto de amplificación
TNF- $\alpha$	Directo TGGCGTGTTTCATCCGTTCTCTACC	62°C	215 pb
	Reverso CCCGCAATCCAGGCCACTACTT		
IL-1 $\beta$	Directo TGAGGCTGACAGACCCCAAAAGAT	60°C	181 pb
	Reverso GCTCCACGGGCAAGACATAGGTAG		
IL-6	Directo AGCCACTGCCTTCCCTACTTCA	59°C	154 pb
	Reverso GCCATTGCACAACCTTTTCTCA		
$\beta$ Actina	Directo GTCCACCCGCGAGTACAACCTTCT	62°C	219 pb
	Reverso TCCTTCTGACCCATACCCACCATC		

### 8.10. Determinación de corticosterona y citocinas

Se destinaron 6 individuos por condición para la determinación de corticosterona en cada grupo. En el caso de la determinación de la concentración de las citocinas, debido que se encuentran en pequeñas concentraciones, algunas muestras fueron descartadas y se obtuvo una n biológica de 4-5 individuos por condición de cada grupo. Se determinó la concentración de corticosterona y de las citocinas en plasma bajo condiciones basales y después de un evento de estrés, se utilizaron estuches comerciales de ELISA para corticosterona (Enzo Life Sciences), con un rango de detección mínimo de 26.99 pg/ml; para IL-6 (Invitrogen) su rango de detección fue de 5 pg/ml; de TNF-  $\alpha$  (Invitrogen) su rango de detección fue de 4 pg/ml; e IL-1  $\beta$  (R&D Systems) con un rango de detección de 5 pg/ml. Se realizó un ajuste de cuatro parámetros (curve fit) con una curva estándar para cada ensayo (R de 0.99-1.00). Las muestras se analizaron por duplicado.

#### *8.11. Análisis de resultados*

Para el análisis de las inmunohistoquímicas se realizó una prueba t-Student para comparar el grupo control y el grupo SM; para el análisis a lo largo del eje dorso-ventral se utilizó ANOVA de dos vías (tratamiento, corte), se tomó como significativo una  $p \leq 0.05$ . Se realizó el análisis de Sholl en el programa ImageJ para evaluar el número de ramificaciones de los astrocitos en ambos grupos.

Para los análisis de la expresión de las citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ) en el hipocampo, y la comparación de la concentración de la corticosterona y las citocinas periféricas se realizó un ANOVA de dos vías (tratamiento, condición). Así también se realizó un análisis comparativo pos-hoc de Neuman-Keuls.

## IX. RESULTADOS

El estrés durante las etapas tempranas de la vida tiene efectos permanentes sobre varias estructuras, por lo cual se evaluaron los efectos de la SM sobre el peso corporal y el peso relativo del timo, bazo y las adrenales.

### 9.1 Parámetros corporales

La exposición crónica al estrés induce cambios en el peso corporal y suele afectar la morfología de algunos órganos; por ejemplo, el timo disminuye su tamaño, mientras que se ha reportado que las adrenales de los animales sometidos a estrés crónico presentan hiperplasia (Slotten, Kalinichev, Hagan, Marsden, & Fone, 2006). Por ello, se tomaron como parámetros control el peso corporal de los individuos de cada grupo antes de sacrificar y los pesos relativos del timo y las adrenales, para valorar si se alteran por la exposición periódica al estrés por SM. También se consideró analizar el peso relativo del bazo por las implicaciones inmunes que este órgano tiene. Se comparó el peso corporal y el calculó el peso relativo del bazo, adrenales y timo de las crías al PN15. Los resultados del peso corporal y de los órganos de animales sometidos a SM se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Peso corporal y peso relativo del bazo, adrenales y timo al PN15.

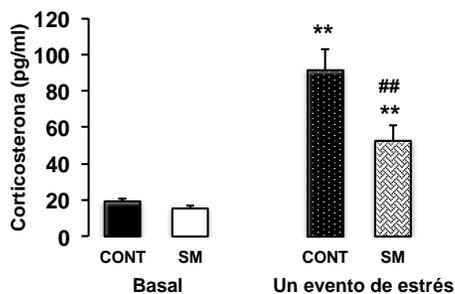
TRATAMIENTO	PESO CORPORAL (g)	PESO RELATIVO BAZO (g/peso corporal)	PESO RELATIVO ADRENALES (g/peso corporal)	PESO RELATIVO TIMO (g/peso corporal)
CONTROL	36.25 ± 0.67	5.98 ± 0.28	0.47 ± 0.01	5.30 ± 0.34
SM	38.82 ± 0.41**	6.06 ± 0.37	0.42 ± 0.01	4.77 ± 0.18

(\*\*P ≤ 0.001, N=32,39 peso; N= 18,24, bazo, adrenales y timo).

En la tabla se puede observar que el peso corporal de los animales SM aumentó de manera significativa con respecto al grupo control. Los pesos relativos de los tejidos (bazo, adrenales y timo) no presentaron diferencias significativas entre los grupos al PN15.

### 9.2 Concentraciones de corticosterona

La corticosterona es la hormona del estrés, por lo cual es importante determinar su concentración en la circulación periférica de los animales sometidos a SM periódica al PN15. Se cuantificó la concentración de la hormona corticosterona en la circulación de ambos grupos SM y CONT bajo condiciones basales (antes del evento de estrés) y en respuesta a un evento de estrés.



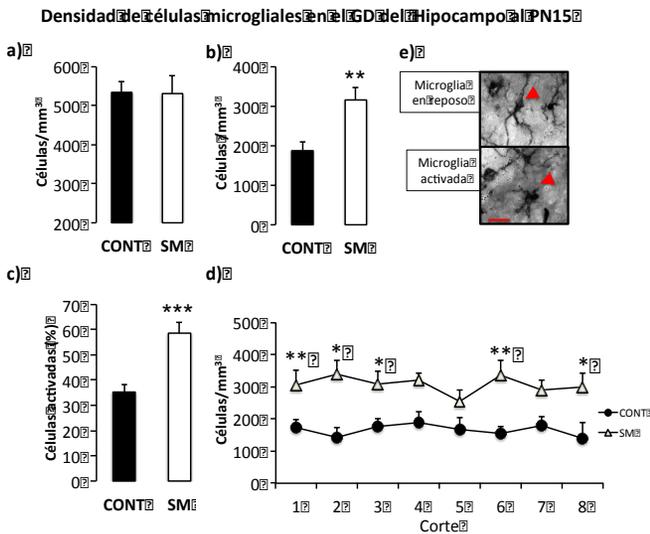
**Figura 4. Concentración de corticosterona de las crías de rata macho al PN15.** Se muestran los resultados de condiciones basales y después de un evento de estrés de 3 h de separación materna, de ambos grupos control (CONT) y separación materna (SM). ANOVA de dos vías, \*\* $P < 0.001$  con respecto al control basal, ## con respecto al control un evento de estrés,  $N = 6$ .

En la figura 4 se puede apreciar que no se observaron diferencias significativas en las concentraciones basales de corticosterona de ambos grupos (CONT y SM). En contraste, la secreción de corticosterona sí aumentó de manera significativa en respuesta al estímulo agudo de estrés en ambos grupos. Sin embargo, en el grupo SM se observó una concentración significativamente menor de corticosterona, comparada con el grupo control. Lo anterior sugiere que el estrés periódico provoca una respuesta atenuada de la secreción de corticosterona a esta edad.

### 9.3 Análisis de las células gliales en el GD del hipocampo

Las células gliales como los astrocitos y la microglia, desempeñan un papel importante de proteger al SNC. Para este trabajo se propuso exponer a los animales bajo un esquema de estrés por SM, y analizar los efectos sobre las poblaciones de células gliales en su morfología y el número de estas células en el hilus del GD del hipocampo al PN15. Para ello se realizaron las

inmunotinciones para la detección y cuantificación de las células gliales en el hilus del GD del hipocampo en los animales sometidos a SM al PN15.

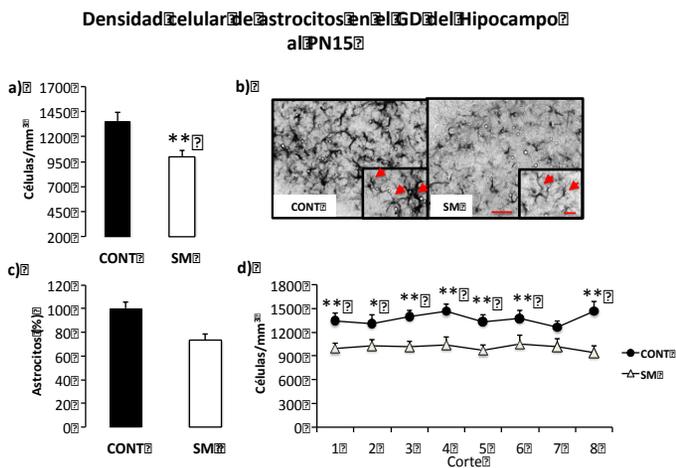


**Figura 5. Cuantificación del número de células microgliales en el hilus del giro dentado (GD) del hipocampo de rata macho al PN15.** a) Se muestra el promedio total de las células microgliales Iba+, en el GD de los grupos control (CONT) y separación materna (SM). b) Se observa el promedio de las células microgliales activadas de acuerdo a su morfología, tal como se ilustra en e). c) Se muestra el porcentaje de microglia activada (t-Student  $**P \leq 0.01$ ,  $***P \leq 0.001$ ). d) Se realizó un análisis aleatorio a lo largo del eje rostro-caudal de las células microgliales activas en ambos grupos CONT y SM. (N=8, ANOVA  $*P \leq 0.05$ ,  $**P \leq 0.01$ ).

Las células microgliales fueron detectadas con el anticuerpo anti Iba-1. En la figura 5 se muestra el análisis de las células microgliales. Se analizó el promedio total de las células microgliales Iba+ en ambos grupos y no se encontraron diferencias en la densidad celular (Fig. 5a). Posterior a los conteos totales se analizó la morfología de la microglia y se cuantificó la microglia en reposo (soma pequeño y ramificaciones largas y delgadas) y la microglia activada (soma de gran tamaño casi ameboide y con ramificaciones cortas y gruesas) (Fig. 5e). Se observó un aumento significativo del número de las células microgliales con morfología ameboide (activada) en el grupo SM comparado con el grupo control (Fig. 5b). Este resultado se cuantificó como el porcentaje de células microgliales activadas en cada grupo (Fig. 5c), y se encontró un aumento del 60% aproximadamente de células microgliales en el grupo SM comparado con el grupo CONT de 30%. Además se realizó un

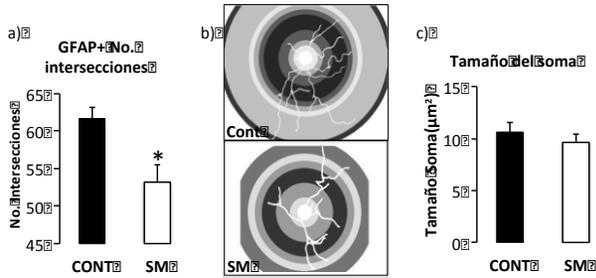
análisis de la microglia activada a lo largo del eje rostro-caudal del hilus del GD del hipocampo de la microglia activada (Fig. 5d) y se encontró que esta se distribuyó de manera homogénea y que aumentó de manera significativa a lo largo del eje en el grupo SM comparado con el grupo CONT.

Para la detección de los astrocitos se utilizó el anticuerpo contra GFAP (proteína ácida fibrilar glial), esta es una proteína del citoesqueleto que se expresa en esta estirpe celular, cuyo análisis se muestra en la Figura 6.



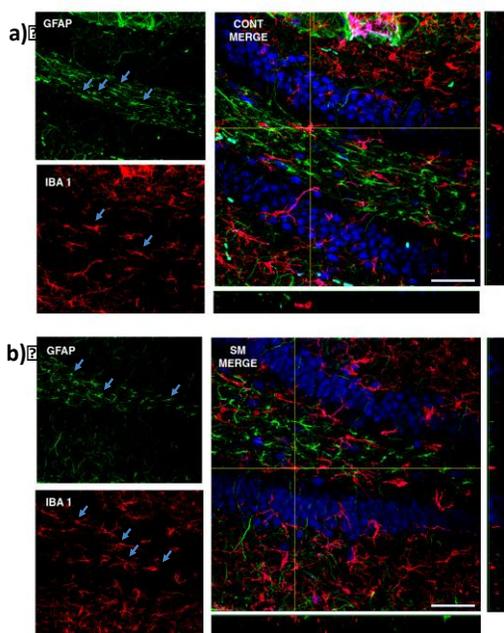
**Figura 6. Densidad total de células astrogiales de las crías de rata macho al PN15.** En el panel a) se muestra la densidad celular total de las células astrogiales GFAP+ en el hilus del hipocampo del grupo control (CONT) y separación materna (SM) (t-Student  $**P \leq 0.01$ ); en el panel b) se muestra una fotografía representativa de las células GFAP+ de ambos grupos; en la gráfica c) se muestra el porcentaje de astrocitos de cada grupo; en el panel d) se muestra la densidad de las células astrogiales (células/mm<sup>3</sup>), a lo largo del eje rostro-caudal en el hilus del hipocampo de las crías Cont y SM al PN15. (N=9,11; ANOVA  $**P \leq 0.01$ ,  $*P \leq 0.05$ ).

En la figura 6a y c se presentan los resultados del análisis de la densidad (num. de células / mm<sup>3</sup>) de las células GFAP+ en ambos grupos. Se observó una disminución significativa de los astrocitos en el grupo SM comparado con el grupo control. En las fotografías del inciso 6b se muestra un plano de las células astrogiales de un animal CONT y un animal SM al PN15. En la figura 6d se muestra la densidad de los astrocitos a lo largo del eje rostro-caudal en el hilus del GD del hipocampo, se observó un aumento significativo de éstos a lo largo del eje en el grupo SM.



**Figura 7. Análisis morfológico de las ramificaciones de los astrocitos y su soma.** a) Número de ramificaciones de los astrocitos de ambos grupos control (CONT) y separación materna (SM); b) imagen representativa de los círculos concéntricos utilizados para el análisis; c) comparación del tamaño del soma de los astrocitos de ambos grupos (N=5, t-Student \*P  $\leq$ 0.05).

En la figura 7a se muestra el análisis morfológico del número de ramificaciones de los astrocitos. Se detectó una disminución significativa del número de ramificaciones en el grupo SM (N=5,  $p \leq 0.05$ ) comparado con el grupo Control. En el panel 7b se muestra una figura representativa del análisis de Sholl en el programa ImageJ, de acuerdo a esta estrategia se observó que la SM afecta a las ramificaciones de los astrocitos. Posteriormente se estimó el tamaño del soma (Fig. 7c) de los astrocitos y no se encontraron diferencias significativas (N=5,  $p=0.46$ ) entre los grupos.



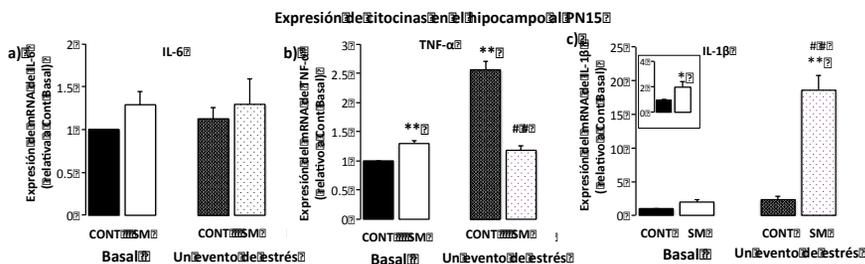
**Figura 8. Inmunohistoquímica fluorescente triple en el hilus del GD del hipocampo de rata macho al PN15.** En el panel a) se muestra un corte de cerebro conteniendo el hilus del GD del hipocampo de un animal CONT y en el inciso b) se muestra el hilus de un animal SM. En verde se observa anti-GFAP+ (astrocitos), en rojo anti-IBA+ (microglia), y como contraste se observa NeuN en azul (neuronas maduras) y en el Merge de ambos estirpes celulares. La barra representa 50 $\mu$ m.

En la figura 8 se muestra una inmunohistoquímica triple representativa para identificar astrocitos (GFAP, verde), microglia (IBA, rojo) y neuronas (NeuN, azul), de un animal CONT (8a) y un animal SM (8b). Los tipos celulares no colocalizaron (merge), y su distribución en el hilus correspondió con los resultados obtenidos en los conteos celulares de astrocitos y microglia. En los animales sometidos a SM se encontró una disminución de células astrogiales y un aumento de la microglia activada comparados con el grupo CONT.

#### 9.4. Expresión de citocinas en el hipocampo al PN15

Con el objeto de evaluar si la SM induce cambios en la expresión de citocinas pro-inflamatorias, se analizaron los niveles de expresión de las citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , por medio de qRT-PCR en homogenados de hipocampo de animales sacrificados en condiciones basales (sin molestar o

antes de el evento de estrés) o después de un evento de estrés, provenientes de ambos grupos al PN15.



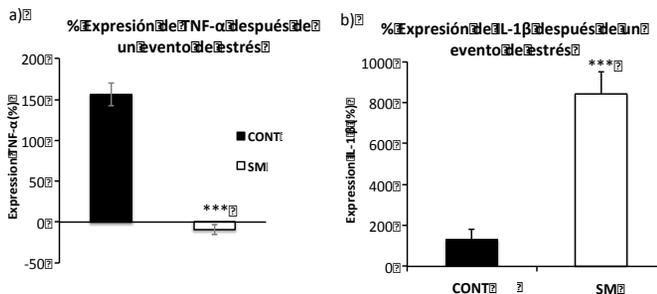
**Figura 9. Expresión relativa del mRNA de las citocinas en homogenados de hipocampo de crías de rata macho, sacrificadas en condiciones basales o después de un evento de estrés al PN15.** En a) se muestra IL-6, en b) TNF- $\alpha$  y en c) IL-1 $\beta$ . En el inserto de la gráfica c) se muestra el análisis por separado de los niveles de expresión basal de ambos grupos (t-student, N=5,  $P \leq 0.05$ ) control (CONT) y separación maternal (SM). Se realizaron triplicados de cada muestra de cada individuo (N=5, ANOVA\*\* $P \leq 0.01$  con respecto al Cont Basal, ##  $P \leq 0.01$  con respecto al Cont un evento de estrés).

En la gráfica de la Figura 9a se muestran los resultados de los niveles de expresión de IL-6 en homogenados de hipocampo de ambos grupos al PN15. Como se observa, no se obtuvieron diferencias significativas en los niveles de expresión de IL-6 entre ambos grupos en condiciones basales ni después de un evento de estrés.

En la gráfica de la Figura 9b se muestran los resultados de la expresión del gen de TNF- $\alpha$  en el hipocampo. Se observó un aumento significativo en la expresión del gen del TNF- $\alpha$  en el grupo SM con respecto al control en condiciones basales. Después del evento de estrés los niveles de expresión de esta citocina se incrementaron de manera significativa en los animales del grupo control estrés, pero no en el grupo SM estrés, el cual presenta un nivel de expresión relativamente similar al observado en condiciones basales.

En la figura 9c se muestra el análisis de los niveles de expresión del gen de la citocina IL-1 $\beta$ . No se encontraron diferencias significativas en la expresión basal en el hipocampo de los animales SM comparada con el grupo control al analizarlos en conjunto. Sin embargo, se realizó un análisis por separado por t-Student a los grupos de condiciones basales donde se observó una expresión basal significativamente mayor en el grupo SM con respecto al control, como se muestra en la gráfica superior de la figura 9c. Por otra parte, después de

exponer a los animales a un evento de estrés se observó un aumento significativo de los niveles de expresión de IL-1 $\beta$  comparados con el grupo control estrés.



**Figura 10. Expresión de las citocinas en el hipocampo de las crías de rata después de un evento de estrés al PN15.** Porcentaje de cambio en la expresión de a) TNF- $\alpha$  y b) IL-1 $\beta$  en el hipocampo después de un evento de estrés al PN15 de el grupo control (CONT) y separación materna (SM). (t-Student, \*\*\*P<0.001, N=5).

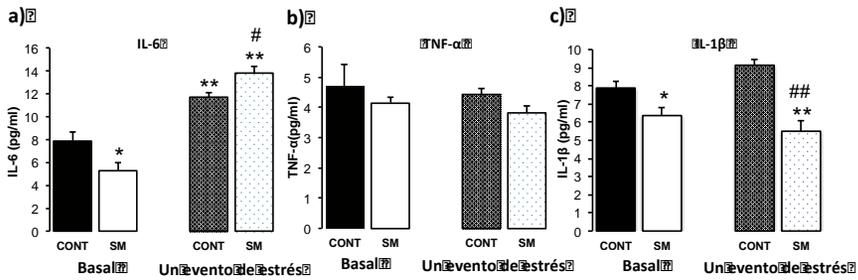
Al analizar el porcentaje de cambio de la expresión de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  después de un evento de estrés, se encontró una disminución en los niveles del mRNA de TNF- $\alpha$  de más del 150% en el grupo SM con respecto al grupo control (CONT) (Fig. 10a, P<0.001); mientras que la IL-1 $\beta$  aumentó su expresión un 600% en los animales sometido a SM respecto al grupo control (CONT) (10b, P<0.001). La SM durante esta etapa de la vida afectó la expresión de las citocinas pro-inflamatorias de manera diferencial en el hipocampo.

#### 9.5. Determinación de la concentración de citocinas en la circulación

Para evaluar la respuesta inmune periférica al estrés provocado por la SM se determinaron las concentraciones circulantes de IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en ambos grupos bajo las condiciones: basal y después de la evocación de un evento de estrés en las crías al PN15. En la Figura 11a se muestran los resultados de las concentraciones de IL-6 en el suero de las crías de rata al PN15. Se encontró una disminución significativa de la concentración de IL-6 en condiciones basales en el grupo SM (P<0.05) con respecto al grupo control. Al determinar la concentración de IL-6 después de un evento de estrés, se observó un aumento significativo en ambos grupos (P<0.01) con respecto al

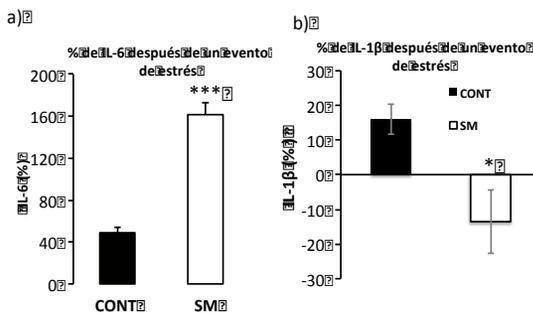
control basal. Por otra parte, el grupo SM con estrés presentó una concentración mayor con respecto al grupo control estrés.

**Secreción de Citocinas en la Circulación Periférica al PN15**



**Figura 11. Concentración de citocinas en la circulación periférica de las crías de rata macho al PN15, bajo condiciones basales y después de un evento de estrés.** En a), b) y c) se muestran los concentraciones de IL-6, TNF-α e IL-1β respectivamente, de ambos grupos control (CONT) y separación materna (SM) (N=5-6, ANOVA \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , con respecto al Cont Basal; # $P \leq 0.05$ , con respecto al Cont un evento de estrés).

Los resultados que se presentan en la figura 11b indican que no hay diferencias en la concentración de TNF-α entre los grupos de SM y CONT bajo condiciones basales y tampoco aumentó la secreción de TNF-α ante un evento de estrés. En la gráfica 11c se muestra la concentración sistémica de IL-1β al PN15 en estado basal y después de un evento de estrés; en este caso se observó una disminución significativa de la concentración de esta citocina en ambas condiciones en el grupo sometido a SM *periodicaperiódica* durante las dos semanas después del nacimiento.



**Figura 12. Concentración de citocinas en la circulación periférica de las crías de rata macho al PN15, después de un evento de estrés.** En a) aumento de IL-6 y b) disminución de

IL-1 $\beta$ , de los grupos control (CONT) y separación materna (SM) (t-Student \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , N=5-6).

Posteriormente se analizó el incremento de la concentración de IL-6 e IL-1 $\beta$  después del evento de estrés en porcentaje (fig. 12a). El grupo SM presentó una secreción 4 veces mayor de IL-6, comparado con el grupo control (t-Student,  $P \leq 0.001$ ) después del evento de estrés. También se comparó la concentración de IL-1 $\beta$  después de un evento de estrés (Fig. 12b) del grupo SM con respecto al grupo Control (CONT) ( $P \leq 0.05$ ), siendo esta 2 veces menor.

## **X. DISCUSIÓN**

El presente trabajo muestra que el estrés periódico durante las etapas tempranas de la vida tiene diferentes efectos sobre las poblaciones de las células gliales en el hilus del hipocampo, alterando su morfología y activando su respuesta, lo que se traduce en cambios en la expresión de las citocinas pro-inflamatorias en esta estructura, y además, evoca una respuesta inmune sistémica, independiente a la observada en el SNC.

Para evaluar los efectos de la SM se evaluaron los siguientes parámetros, el peso corporal y el peso relativo de las adrenales, timo y bazo. Se encontró que los animales sometidos a estrés periódico aumentan de peso comparados con el grupo control. Estos datos están en desacuerdo con los resultados de nuestro grupo de trabajo, ya que previamente se reportó que el estrés periódico induce una pérdida de peso en las crías (Lajud, Roque, Cajero, Gutierrez-Ospina, & Torner, 2012). Esta discrepancia puede ser debida a que el modelo de estrés empleado en este trabajo es más robusto ya que las crías deben permanecer aisladas durante el periodo de SM, y pueden tratar de compensarlo con una sobrealimentación. Por otra parte, en los pesos relativos de las adrenales, timo y bazo no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, por lo que estos parámetros hasta el momento del análisis (PN15) no afectaron por el efecto del estrés, lo cual va de acuerdo a lo reportado previamente por nuestro grupo (Lajud et al., 2012). Otros trabajos con modelos similares de estrés, reportan la presencia de hiperplasia en las adrenales y una disminución del timo (Sloten et al., 2006).

Por otro lado, se ha reportado que el estrés por SM induce un aumento en la secreción de corticosterona en el estado basal en animales adultos, mientras que en crías la SM no provoca un aumento de la concentración basal (antes del evento de estrés), pero si lo hace tras cada evento de estrés (Lajud et al., 2012). Esto coincide con lo observado en el presente estudio. El hecho de que no se observe un aumento en la corticosterona sugiere que los mecanismos responsables de producir cambios permanentes en la comunicación neuronal debidos a la exposición temprana al estrés podrían subyacer en la expresión y acción de otros mensajeros químicos, como el CRH, o algunas citocinas.

En años recientes se ha iniciado la investigación sobre la interacción del sistema inmune y el estrés, debido a que varias moléculas del sistema inmune pueden estimular a los núcleos paraventriculares del eje HPA activando su respuesta. En humanos se ha propuesto que la exposición a eventos adversos durante la infancia puede programar el circuito neuro-inmune a un estado pro-inflamatorio, afectando la maduración de estructuras importantes como el hipocampo, corteza, amígdala, entre otras, que se encuentran íntimamente ligadas al control del eje HPA, lo que puede conducir a desarrollar alteraciones conductuales y cognitivas, y enfermedades neurodegenerativas (Ganguly & Brenhouse, 2014). De acuerdo con los resultados de este trabajo se observa que el número de células microgliales totales no se ven afectadas por efecto del estrés; sin embargo, al clasificarlas de acuerdo con su morfología (Diz-Chaves et al., 2012), se observó un aumento importante en el número de células microgliales activadas en el grupo estresado (Fig. 13), lo que sugiere que el estrés por SM induce su activación. Estos hallazgos concuerdan con trabajos previos del grupo de Diz-Chavez et al. (2012), ya que en la progenie de ratonas sometidas a estrés por inmovilización durante el embarazo, se observó una respuesta microglial exacerbada ante el reto inmune con LPS en el hipocampo. Al analizar la morfología de las células microgliales encontraron un aumento en el número de células microgliales con morfología activada en la región de CA3, en el hilus del hipocampo y en la corteza; además de un aumento en la expresión de la citocina IL-1 $\beta$  en machos y hembras adultas (Diz-Chaves, Astiz, Bellini, & Garcia-Segura, 2013; Diz-Chaves et al., 2012). Por lo anterior, se ha propuesto que el estrés durante el desarrollo tiene efectos sobre las células microgliales y la expresión de citocinas en áreas que controlan el eje la retroalimentación negativa. Otros trabajos como los de Gómez-Gonzalez y Escobar (2010) evalúan la maduración morfológica de las células microgliales al PN1 y PN10, en la progenie de ratas embarazadas y sometidas a estrés prenatal. Ellos muestran que la microglia con fenotipo residente está presente en mayor cantidad al PN1 en áreas como la corteza y límbicas, lo cual los lleva a proponer que el estrés prenatal afecta la maduración de la microglia en estas estructuras (Gomez-Gonzalez & Escobar, 2010). Otros trabajos han visto efecto de la sobrealimentación sobre las células microgliales, lo que contribuye a la sensibilización inmune en el

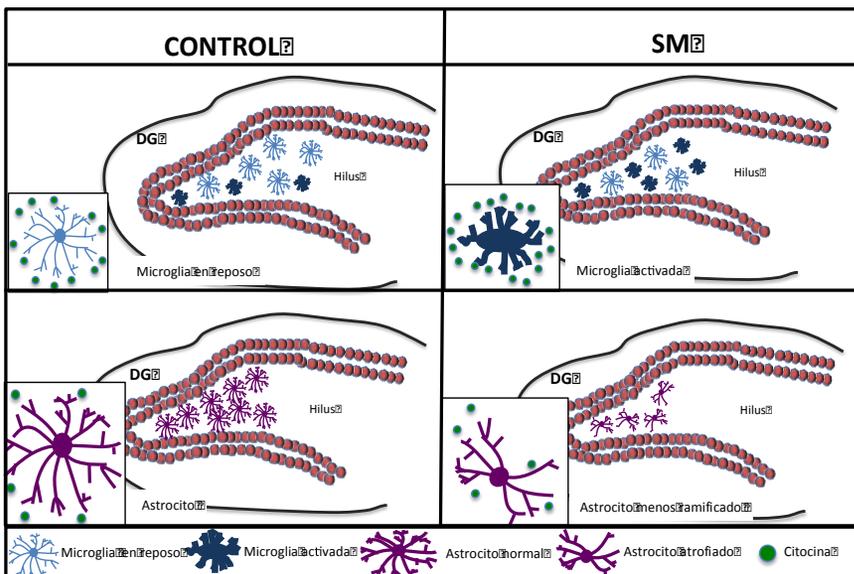
SNC y a una respuesta exacerbada ante retos inmunes como el LPS en la edad adulta (Ziko et al., 2014). Estos trabajos y otros proponen que estímulos durante las etapas tempranas del desarrollo (prenatal o postnatal) pueden programar a las células microgliales y su actividad en la edad adulta (Deak et al., 2005; Viviani et al., 2013); lo cual contribuiría al desarrollo de psicopatologías y enfermedades neurodegenerativas. Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen a apoyar esta teoría.

En el presente estudio los animales sometidos a SM mostraron una disminución en el número de las células astrogliales en el hilus del GD del hipocampo y también una disminución en el número de ramificaciones, pero no se observaron cambios en el tamaño del soma de estas células (Fig. 13), lo que concuerda con otros trabajos. Leventopoulos y col. (2007) encontraron en ratas adultas sometidas a estrés por SM (4 h/día PN1-14) una disminución de células GFAP+ en varias zonas del cerebro, entre ellas el hipocampo. Pero contrario a los resultados de este trabajo, ellos no encontraron diferencias debidas al estrés en las proyecciones primarias de los astrocitos (Leventopoulos et al., 2007). Bautista y col. (2012) utilizaron animales adultos machos, previamente sometidos al protocolo de SM de 6 h/día durante las tres primeras semanas de vida. Ellos observaron una disminución del número de células GFAP+ en varias estructuras como el hipocampo, lo cual se puede relacionar con una alteración en la conectividad sináptica en esta estructura que regula al eje neuroendocrino del estrés (Bautista & Dueñas, 2012). Mientras que en animales juveniles sometidos a estrés social materno se observaron efectos contrarios, ya que éste provocó un aumento del número de células GFAP+ en la corteza prefrontal, que es una estructura importante para el control negativo del eje HPA; además los animales presentaron una conducta hiperactiva (Kwak et al., 2009). En otro trabajo, se reportó que la estimulación táctil por un minuto del día 1-10 postnatal a crías de rata hembras, indujo el aumento de astrocitos en las áreas de CA1, CA2, CA3 del hipocampo a los 90 días de edad (Winkelman-Duarte et al., 2011). Estos trabajos y el presente demuestran que los eventos durante el período neonatal afectan a las poblaciones de astrocitos en el SNC, lo cual puede conllevar a un efecto sobre la conectividad sináptica y el mantenimiento de las redes neurales. Estos hallazgos en conjunto demuestran que los astrocitos son

células que responden ante el estrés durante las etapas tempranas de la vida, y estos efectos perduran hasta la edad adulta.

Así también, en otro trabajo hecho en musarañas adultas sometidas a estrés psicosocial, los autores observaron una disminución en la población astrogliar y una disminución en el tamaño del soma en el hipocampo (Czeh, M., B., Hiemke, & Fuchs, 2006). En otros trabajos exponiendo a los animales a ejercicio extenuante, después de 24 h se observó un aumento de células astrogliales y apoptosis, en las áreas del hipocampo CA1, CA3 y GD, lo cual puede favorecer el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, entre otras (Ding, Chang, Xie, Chen, & Ai, 2014). Estos hallazgos demuestran que los astrocitos son células plásticas, sensibles a estímulos en la edad adulta tales como el estrés, y por lo tanto pueden ser afectados en su morfología y actividad.

Los resultados del presente trabajo demuestran que el estrés periódico durante las primeras semanas de vida provoca alteraciones en la expresión de citocinas en el hipocampo (Fig. 13).



**Figura 13. La SM altera las poblaciones gliales en el hilus del hipocampo en las crías de rata al PN15.** Se ilustran las diferencias en el estado de activación de la microglia y de los astrocitos en el hilus del giro dentado (GD) del hipocampo en animales control y animales sometidos a separación materna (SM).

Las citocinas durante las etapas tempranas de la vida pueden actuar como factores tróficos en el cerebro; sin embargo, las experiencias adversas durante este período pueden afectar su papel e inducir efectos dañinos sobre el SNC (Avitsur et al., 2006). En cuanto a la IL-6 es una citocina pro-inflamatoria que puede regular a otras citocinas (IL-1 $\beta$ ), no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en sus niveles de expresión en el hipocampo bajo condiciones basales y tampoco después de un evento de estrés. Esto va de acuerdo a otros trabajos, donde han sometido a estrés prenatal a ratones, y encuentran que en la edad adulta no presentan alteración en la expresión de esta citocina en el hipocampo (Diz-Chaves et al., 2012). En contraste, al someter a los animales a un estresor mucho más agresivo, como son los electrochoques a ratas adultas, se logró evocar su expresión en el hipocampo y corteza de estos animales (Blandino et al., 2009); así también el exponer a los animales ante un estresor como un ambiente novedoso, se puede inducir la expresión de IL-6 en áreas como el núcleo paraventricular (Fuchs, Damm, Gerstberger, Roth, & Rummel, 2013). Estos trabajos demuestran que los estresores físicos o psicológicos pueden provocar la expresión de la citocina IL-6 en varias zonas que controlan el eje HPA, mientras que los estresores durante las etapas tempranas de la vida no afectan la expresión de IL-6 en el hipocampo. Además, durante estas etapas tempranas del desarrollo, algunas citocinas pueden tener un papel distinto como el ayudar en la conectividad sináptica y la maduración y sobrevivencia de las neuronas (Pousset, 1994). Sin embargo, la función de las citocinas depende de su concentración, pues concentraciones muy bajas o muy altas suelen tener efectos opuestos al obtenido con concentraciones intermedias.

En varios trabajos se ha observado que la expresión de TNF- $\alpha$  puede ser afectada por LPS, choques eléctricos u hormonas del estrés, en distintas zonas cerebrales utilizando animales en la etapa adulta (Babri et al., 2014; Blandino et al., 2009; Deak et al., 2005). Sin embargo, poco se sabe sobre los efectos del estrés durante las etapas tempranas de la vida y su interacción con el sistema inmune, en particular de TNF- $\alpha$  de manera inmediata. Uno de los modelos más utilizados para determinar la expresión de citocinas en el SNC es

el reto inmune con LPS. Al administrarlo al PN14, se observa 3 h después la inducción de la expresión de su mensajero en áreas relacionadas con el control y activación del eje HPA, como: el hipocampo, la corteza prefrontal, la amígdala y el hipotálamo, además de que durante la edad adulta un segundo reto inmune provoca alteraciones conductuales y alteraciones en la memoria, por lo que se propone que la activación del sistema inmune contribuye a la desregulación del eje HPA (Dinel et al., 2014). En otro trabajo, trataron a los animales con TNF- $\alpha$  durante la etapa neonatal, y encontraron que esta citocina induce una pérdida de peso corporal en ambos sexos, además ésto provocó un aumento de la concentración de corticosterona y condujo a conductas tipo depresiva y ansiosas en los ratones macho adultos (Babri et al., 2014). En un modelo de estrés prenatal, el grupo de trabajo de Diz-Chaves (2013) reportó un aumento de la expresión de TNF- $\alpha$  en el estado basal en el hipocampo en ratones adultos (Diz-Chaves et al., 2013). De acuerdo con los resultados de este trabajo, la expresión del TNF- $\alpha$  en condiciones basales se encuentra elevada de manera significativa en el hipocampo del grupo SM (Fig. 8b), lo que concuerda con otros estudios expuestos a un reto inmune y estrés; sin embargo, al evaluar la expresión de esta citocina ante un evento de estrés el grupo control aumentó de manera significativa la expresión del TNF- $\alpha$  pero no así en el grupo SM, por lo cual se propone que esta citocina responde ante estímulos novedosos como es el caso de los animales control, mientras que los animales SM se encuentran sometidos a un estresor homotípico lo cual puede causar habituación en la expresión de esta citocina.

La citocina IL-1 $\beta$  es la molécula con actividad pro-inflamatoria que se expresa en varias áreas del cerebro, y principalmente en corteza prefrontal e hipocampo, por lo cual algunos investigadores han observado el efecto del estrés sobre la expresión de esta citocina y las moléculas pertenecientes a esta familia, encontrando una respuesta ante los distintos estímulos psicológicos (estrés psicosocial, ambientes novedosos), físicos (choques eléctricos) e inmunes (LPS, IL-1 $\beta$ ), en las áreas antes mencionadas y en el núcleo paraventricular (Avitsur et al., 2006; Gadek-Michalska & Bugajski, 2010; Sugama et al., 2007). También se ha correlacionado con el déficit en el desempeño de tareas de memoria y aprendizaje en la etapa adulta. Sin

embargo, poco se sabe sobre el efecto inmediato de la exposición a eventos de estrés en el neonato sobre la expresión de IL-1 $\beta$  en el hipocampo, como se discutirá a continuación. Al analizar la expresión del gen de IL-1 $\beta$  en el hipocampo se encontró un aumento en los niveles de expresión bajo condiciones basales en el grupo SM comparado con el grupo control, lo cual concuerda con otros estudios en un modelo de estrés prenatal en ratones adultos (Diz-Chaves et al., 2013). En este trabajo se propone que el estrés durante estadios tempranos impacta sobre la respuesta inmune que perdura hasta la edad adulta. En el presente trabajo se observó que al exponer a las crías a un solo evento de estrés, los niveles de expresión de IL-1 $\beta$  se elevaron de manera significativa en ambos grupos, pero la expresión de IL-1 $\beta$  en el grupo SM fue mucho mayor, comparada con la del grupo control (Fig. 9c y 10b). Estos resultados sugieren que la exposición al estrés en etapas tempranas induce una respuesta exacerbada en el hipocampo ante cada evento de estrés, lo cual puede contribuir a la programación y alteración en la regulación del eje HPA, expuesto a un estado pro-inflamatorio. Kent y col. (1997) propusieron que la IL-1 $\beta$  induce una alteración del eje HPA, principalmente del hipotálamo, utilizando un modelo de estrés por privación materna de 24 h y la administración de IL-1 $\beta$  en tres edades distintas. Ellos mostraron que la interacción del estrés y la administración de esta citocina modifican la respuesta del eje HPA dependiendo de la edad; mientras que al PN6 y PN12 se observa un aumento en ACTH y corticosterona, al PN18 se encuentra una supresión de estas moléculas. Las diferencias encontradas en este trabajo pueden ser debidas al modelo que utilizan, el cual también tiene impacto sobre el factor nutricional (Kent et al., 1997).

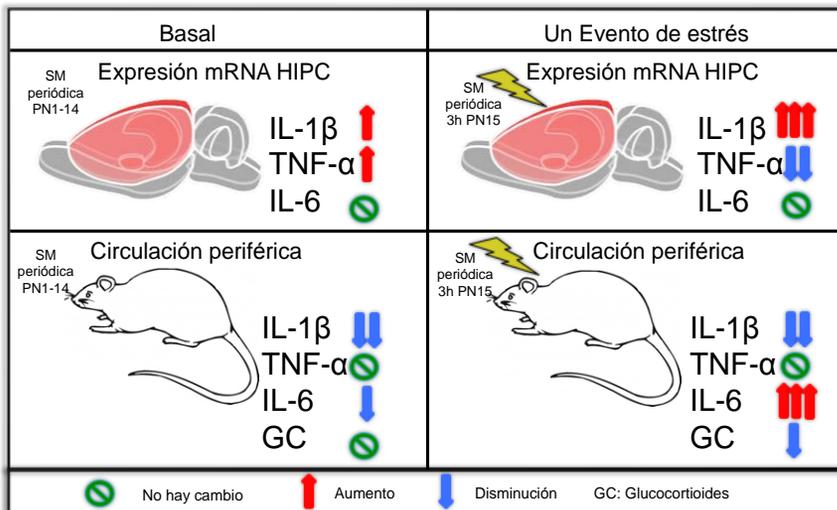
Por otra parte, hay contradicciones en el uso de los estresores como la privación materna (24 h, un día), los choques eléctricos, inmovilización, nado forzado, y el efecto que tienen sobre la liberación y expresión de la IL-1 $\beta$  en el cerebro (Deak et al., 2005; Nguyen et al., 1998), ya que se ha propuesto que este responde de manera selectiva al tipo de estresor; por ejemplo, otros autores observaron que al exponer a ratas a SM no se induce un efecto sobre la expresión de IL-1 $\beta$  en el cerebro (Deak et al., 2005); mientras que otros

trabajos apoyan al modelo de estrés empleado en este trabajo y su interacción con las citocinas en el SNC (Dimatelis et al., 2012).

También se ha propuesto que eventos adversos durante etapas tempranas de la vida producen un remodelaje de los receptores a IL-1 $\beta$ , y éstos podrían por lo tanto producir el “priming” o activación del sistema inmune en la edad adulta (Viviani et al., 2013). En algunos trabajos se ha propuesto que la IL-1 $\beta$ , en concentraciones moderadas, promueve la consolidación de la memoria a largo plazo y el aprendizaje en el hipocampo, pero a concentraciones altas tiene efectos contradictorios y dañinos (Bilbo, Biedenkapp, et al., 2005; Williamson, Sholar, Mistry, Smith, & Bilbo, 2011). Las células microgliales son las principales productoras de IL-1 $\beta$  en el cerebro (Bilbo et al., 2012), lo cual puede provocar cambios en el entorno neuronal del hipocampo, además esta citocina puede activar el eje HPA, en particular el PVN y el hipocampo (Hueston & Deak, 2014; Song et al., 2003), ya que posee receptores en estas áreas, y se ha observado que al administrar un antagonista del receptor a IL-1 (IL-1ra) se revierten los efectos causados por IL-1 $\beta$  relacionados con la memoria y el aprendizaje en la edad adulta (Ben Menachem-Zidon et al., 2008). De acuerdo con los resultados del presente trabajo, se propone que el aumento de la expresión de IL-1 $\beta$  es debida a la activación de la microglia en el hipocampo, lo cual puede causar un estado inmunoreactivo que contribuye a la alteración del asa de retroalimentación negativa del eje del estrés.

Todos estos resultados en conjunto apoyan la hipótesis de que los eventos de estrés durante las etapas tempranas de la vida afectan la respuesta neuroinmune lo cual conduce a la desregulación del eje HPA y por lo tanto aumentan la vulnerabilidad a desarrollar psicopatologías, ya que los cambios en la expresión de las citocinas inducidos por el estrés pueden tener un efecto sobre estructuras que regulan las emociones y el eje del estrés. Otros autores proponen que el estrés crónico induce una sensibilización o “priming” de la respuesta inmune de las células microgliales y la expresión de citocinas pro-inflamatorias, mediada por los GC en animales adultos (Frank et al., 2012). Esta hipótesis difiere de los resultados del presente trabajo, ya que aquí no se encontraron diferencias en las concentraciones basales de GC, debido a que

se analiza una ventana diferente de desarrollo. Por otra parte, los datos de este trabajo sugieren que el aumento marcado en la expresión de IL-1 $\beta$  en el hipocampo en respuesta al estrés en los animales con SM pudiera constituir otro mecanismo que programe la actividad del eje HPA a largo plazo, junto con la desregulación del CRH hipotalámico.



**Figura 14. Diferencias en la expresión de citocinas en el hipocampo y en la secreción de citocinas a la circulación, debidas a la separación maternal.** En estado basal (sin molestar, antes del episodio de estrés), la separación maternal periódica altera la expresión de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) en el hipocampo y disminuye la secreción a nivel sistémico (IL-1 $\beta$  e IL-6), aunque no induce aumento de glucocorticoides (GC). Después de un episodio de estrés se altera de manera significativa la expresión de las citocinas en el hipocampo (aumenta IL-1 $\beta$  y disminuye TNF- $\alpha$ ). A nivel sistémico un episodio de estrés también afecta la concentración de estas citocinas, además de aumentar la secreción de GC en respuesta al estresor.

Los efectos del estrés durante las etapas tempranas de la vida provocan alteraciones en distintos sistemas. En humanos que han experimentado eventos adversos durante su infancia (negligencia, maltrato físico o psicológico, bajo estatus socioeconómico, etc.), presentan concentraciones de citocinas pro-inflamatorias (IL-6, TNF- $\alpha$  y IL-1 $\beta$ ) elevadas en plasma en su edad adulta (Carpenter et al., 2010; G. E. Miller, E. Chen, et al., 2009; Penninx et al., 2003).

Lo anterior ha llevado a plantear que las citocinas pueden provocar alteraciones conductuales y ha abierto la investigación sobre la interacción de

los sistemas psico-neuro-inmune. Se han utilizado varios modelos animales para evocar la respuesta inmune, desde la infección durante la gestación, el reto inmune neonatal y los modelos de estrés prenatal, privación materna y separación materna, en las diferentes ventanas del desarrollo (Diz-Chaves et al., 2012; Meyer, 2013; Nguyen et al., 1998; Roque, Mesquita, Palha, Sousa, & Correia-Neves, 2014). Varios autores, utilizando algún modelo de estrés en sus investigaciones, han encontrado alteraciones en las concentraciones de citocinas pro-inflamatorias en la circulación periférica, en las poblaciones de células CD4+ y CD8+ en bazo y timo (Roque et al., 2014), además de encontrar diferencias por sexo en la vulnerabilidad para resolver una infección viral (Avitsur et al., 2006; Avitsur et al., 2005).

De acuerdo con los resultados de este trabajo sobre las citocinas circulantes (Fig. 14), se encontró que el estrés no tiene efectos sobre la concentración de TNF- $\alpha$  bajo condiciones basales ni después de un evento de estrés al PN15. Bajo condiciones basales se encontró que la IL-6 está disminuida de manera significativa en el grupo SM con respecto al control. Mientras que al exponer a los animales a un evento de estrés las concentraciones de IL-6 aumentaron de manera significativa en el grupo SM con respecto a su control. Las concentraciones de IL-1 $\beta$  disminuyeron tanto bajo condiciones basales y después de la exposición al estrés en el grupo SM comparado con el grupo control. Por lo cual se observó un efecto diferencial del estrés periódico por SM, en la concentración de citocinas periféricas.

Varios trabajos proponen a la inflamación como una causa de la depresión en pacientes con estrés. Se ha observado que la "sick behavior" (conducta de postración) es una conducta compleja desplegada a partir de infecciones y traumas inmunes y por citocinas pro-inflamatorias. La "sick behavior" tiene similitudes fenomenológicas (anorexia, melancolía, fatiga, hiperalgesia, ansiedad) a la depresión (Michael Maes et al., 2012), por lo tanto se ha planteado a la depresión como un estado pro-inflamatorio en el cual se encuentran alteradas varias moléculas del sistema inmune, como IL-6, TNF-  $\alpha$ , proteína reactiva C, haptoglobina, entre otras. En pacientes diagnosticados con depresión y expuestas a eventos de estrés se han visto alteradas las concentraciones de proteína C reactiva e IL-6 (Carpenter et al., 2010; Michael Maes et al., 2012), en otros trabajos se ha descrito que personas jóvenes

sometidas a estrés crónico presentan cambios en genes involucrados en la transducción de señales inflamatorias como el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), su inhibidor  $\kappa$ B, así también en el receptor a GC, o en leucocitos (G. E. Miller, N. Rohleder, et al., 2009). Por otra parte, también se han realizado trabajos sobre individuos con experiencias adversas durante su infancia (como el maltrato infantil, bajo estrato socioeconómico, etc.), y aunque alcancen una calidad de vida mejor en la edad adulta, presentan alteraciones en la concentraciones de GC, IL-6, proteína C reactiva, así también tienen un factor de riesgo alto de padecer enfermedades cardiovasculares, tener adicciones, y presentar alteraciones cognitivas y conductuales (Danese et al., 2009; Danese et al., 2008; G. E. Miller, E. Chen, et al., 2009). Lo cual se propone como factores que alteran el balance del sistema inmune que podría disparar a la activación del eje HPA, y conducir al desarrollo de alteraciones conductuales como la depresión en la edad adulta. Por lo cual, permite inferir que estos cambios a nivel del sistema periférico son a largo plazo y además que convergen con otras moléculas (adrenalina, noradrenalina) que pueden estar estimulando al sistema inmune, y no como consecuencia inmediata de la exposición temprana al estrés.

## XI. CONCLUSIÓN

La exposición al estrés periódico durante las etapas tempranas de la vida induce un estado activado del sistema inmune en el hipocampo. Por otra parte, la respuesta inmunológica en la circulación periférica, se comporta de forma diferente ante los eventos de estrés. Estos resultados sugieren que la respuesta inmune cerebral es independiente a la que ocurre en la circulación, y que probablemente tiene mecanismos distintos de regulación ante el reto del estrés durante este período del desarrollo inmediato.

## XII. Referencias

- Alliot, F., Godin, I., & Pessac, B. (1999). Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res Dev Brain Res*, 117(2), 145-152.
- Arborelius, L., Owens, M. J., Plotsky, P. M., & Nemeroff, C. B. (1999). The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol*, 160(1), 1-12.
- Avishai-Eliner, S., Brunson, K. L., Sandman, C. A., & Baram, T. Z. (2002). Stressed-out, or in (utero)? *Trends Neurosci*, 25(10), 518-524. doi: S0166223602022415 [pii]
- Avitsur, R., Hunzeker, J., & Sheridan, J. F. (2006). Role of early stress in the individual differences in host response to viral infection. *Brain Behav Immun*, 20(4), 339-348. doi: 10.1016/j.bbi.2005.09.006
- Avitsur, R., Kavelaars, A., Heijnen, C., & Sheridan, J. F. (2005). Social stress and the regulation of tumor necrosis factor-alpha secretion. *Brain Behav Immun*, 19(4), 311-317. doi: 10.1016/j.bbi.2004.09.005
- Babri, S., Doosti, M. H., & Salari, A. A. (2014). Tumor necrosis factor-alpha during neonatal brain development affects anxiety- and depression-related behaviors in adult male and female mice. *Behav Brain Res*, 261, 305-314. doi: 10.1016/j.bbr.2013.12.037
- Bateman, A., Singh, A., Kral, T., & Solomon, S. (1989). The immune-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocr Rev*, 10(1), 92-112.

- Bautista, E., & Dueñas, Z. (2012). Maternal separation during breastfeeding induces changes in the number of cells immunolabeled to GFAP. *Psychology & Neuroscience*, *5*, 207-213.
- Ben Menachem-Zidon, O., Goshen, I., Kreisel, T., Ben Menahem, Y., Reinhartz, E., Ben Hur, T., & Yirmiya, R. (2008). Intrahippocampal transplantation of transgenic neural precursor cells overexpressing interleukin-1 receptor antagonist blocks chronic isolation-induced impairment in memory and neurogenesis. *Neuropsychopharmacology*, *33*(9), 2251-2262. doi: 10.1038/sj.npp.1301606
- Berczi, Istvan, & Szentivanyi, Andor. (2003). The Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis and Opioid Peptides. In E. Science (Ed.), *The Immune-Neuroendocrine Circuitry History and Progress*. Amsterdam, The Netherlands.
- Bessis, A., Bechade, C., Bernard, D., & Roumier, A. (2007). Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia*, *55*(3), 233-238. doi: 10.1002/glia.20459
- Bilbo, S. D., Biedenkapp, J. C., Der-Avakian, A., Watkins, L. R., Rudy, J. W., & Maier, S. F. (2005). Neonatal infection-induced memory impairment after lipopolysaccharide in adulthood is prevented via caspase-1 inhibition. *J Neurosci*, *25*(35), 8000-8009. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1748-05.2005
- Bilbo, S. D., Levkoff, L. H., Mahoney, J. H., Watkins, L. R., Rudy, J. W., & Maier, S. F. (2005). Neonatal infection induces memory impairments following an immune challenge in adulthood. *Behav Neurosci*, *119*(1), 293-301. doi: 10.1037/0735-7044.119.1.293
- Bilbo, S. D., & Schwarz, J. M. (2009). Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system. *Front Behav Neurosci*, *3*, 14. doi: 10.3389/neuro.08.014.2009
- Bilbo, S. D., Smith, S. H., & Schwarz, J. M. (2012). A lifespan approach to neuroinflammatory and cognitive disorders: a critical role for glia. *J Neuroimmune Pharmacol*, *7*(1), 24-41. doi: 10.1007/s11481-011-9299-y
- Blandino, P., Jr., Barnum, C. J., Solomon, L. G., Larish, Y., Lankow, B. S., & Deak, T. (2009). Gene expression changes in the hypothalamus provide evidence for regionally-selective changes in IL-1 and microglial markers

- after acute stress. *Brain Behav Immun*, 23(7), 958-968. doi:  
10.1016/j.bbi.2009.04.013
- Bremner, M. A., Beekman, A. T., Deeg, D. J., Penninx, B. W., Dik, M. G., Hack,  
C. E., & Hoogendijk, W. J. (2008). Inflammatory markers in late-life  
depression: results from a population-based study. *J Affect Disord*,  
106(3), 249-255. doi: S0165-0327(07)00254-6 [pii]  
10.1016/j.jad.2007.07.002
- Bulloch, K. (2001). Regional Neural Regulation of Immunity: Anatomy and  
Function In P. a. D. o. t. L. o. N. Bruce S. McEwen, The Rockefeller  
University. (Ed.), *Handbook of Physiology, Section 7: The Endocrine  
System Vol. IV: Coping with the Environment: Neural & Endocrine Mech*  
(Vol. IV, pp. 592): Oxford University Press, USA; 1 edition (January 15,  
2001).
- Carpenter, L. L., Gawuga, C. E., Tyrka, A. R., Lee, J. K., Anderson, G. M., &  
Price, L. H. (2010). Association between plasma IL-6 response to acute  
stress and early-life adversity in healthy adults.  
*Neuropsychopharmacology*, 35(13), 2617-2623. doi:  
10.1038/npp.2010.159  
npp2010159 [pii]
- Chautard, T., Boudouresque, F., Guillaume, V., & Oliver, C. (1993). Effect of  
excitatory amino acid on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat  
during the stress-hyporesponsive period. *Neuroendocrinology*, 57(1), 70-  
78.
- Chrousos, G. P. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev  
Endocrinol*, 5(7), 374-381. doi: nrendo.2009.106 [pii]  
10.1038/nrendo.2009.106
- Czeh, B., M., Simon, B., Schmelting, Hiemke, C., & Fuchs, E. (2006). Astroglial  
plasticity in the hippocampus is affected by chronic psychosocial stress  
and concomitant fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology*(31),  
1616-1626. doi: 10.1038/sj.npp.1300982
- Danese, A., Moffitt, T. E., Harrington, H., Milne, B. J., Polanczyk, G., Pariante,  
C. M., . . . Caspi, A. (2009). Adverse childhood experiences and adult  
risk factors for age-related disease: depression, inflammation, and

- clustering of metabolic risk markers. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 163(12), 1135-1143. doi: 10.1001/archpediatrics.2009.214  
163/12/1135 [pii]
- Danese, A., Moffitt, T. E., Pariante, C. M., Ambler, A., Poulton, R., & Caspi, A. (2008). Elevated inflammation levels in depressed adults with a history of childhood maltreatment. *Arch Gen Psychiatry*, 65(4), 409-415. doi: 10.1001/archpsyc.65.4.409  
65/4/409 [pii]
- Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., & Kelley, K. W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*, 9(1), 46-56. doi: 10.1038/nrn2297 [pii]  
10.1038/nrn2297
- Das, Undurti N. (2011). *Molecular basis of health and disease*. Dordrecht ; New York: Springer.
- de Pablos, R. M., Villaran, R. F., Arguelles, S., Herrera, A. J., Venero, J. L., Ayala, A., . . . Machado, A. (2006). Stress increases vulnerability to inflammation in the rat prefrontal cortex. *J Neurosci*, 26(21), 5709-5719. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0802-06.2006 [pii]  
10.1523/JNEUROSCI.0802-06.2006
- Deak, T., Bordner, K. A., McElderry, N. K., Barnum, C. J., Blandino, P., Jr., Deak, M. M., & Tammariello, S. P. (2005). Stress-induced increases in hypothalamic IL-1: a systematic analysis of multiple stressor paradigms. *Brain Res Bull*, 64(6), 541-556. doi: 10.1016/j.brainresbull.2004.11.003
- Dimatelis, J. J., Pillay, N. S., Mutyaba, A. K., Russell, V. A., Daniels, W. M., & Stein, D. J. (2012). Early maternal separation leads to down-regulation of cytokine gene expression. *Metab Brain Dis*, 27(3), 393-397. doi: 10.1007/s11011-012-9304-z
- Dinel, A. L., Joffre, C., Trifilieff, P., Aubert, A., Foury, A., Le Ruyet, P., & Laye, 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. *J Neuroinflammation*, 11(1), 155. doi: 10.1186/s12974-014-0155-x

- Ding, Y., Chang, C., Xie, L., Chen, Z., & Ai, H. (2014). Intense exercise can cause excessive apoptosis and synapse plasticity damage in rat hippocampus through Ca(2+) overload and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis pathway. *Chin Med J (Engl)*, *127*(18), 3265-3271.
- Diz-Chaves, Y., Astiz, M., Bellini, M. J., & Garcia-Segura, L. M. (2013). Prenatal stress increases the expression of proinflammatory cytokines and exacerbates the inflammatory response to LPS in the hippocampal formation of adult male mice. *Brain Behav Immun*, *28*, 196-206. doi: 10.1016/j.bbi.2012.11.013
- Diz-Chaves, Y., Pernia, O., Carrero, P., & Garcia-Segura, L. M. (2012). Prenatal stress causes alterations in the morphology of microglia and the inflammatory response of the hippocampus of adult female mice. *J Neuroinflammation*, *9*, 71. doi: 10.1186/1742-2094-9-71
- 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. *Pharmacol Rev*, *52*(4), 595-638.
- Frank, M. G., Thompson, B. M., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (2012). Glucocorticoids mediate stress-induced priming of microglial pro-inflammatory responses. *Brain Behav Immun*, *26*(2), 337-345. doi: 10.1016/j.bbi.2011.10.005
- Fuchs, F., Damm, J., Gerstberger, R., Roth, J., & Rummel, C. (2013). Activation of the inflammatory transcription factor nuclear factor interleukin-6 during inflammatory and psychological stress in the brain. *J Neuroinflammation*, *10*, 140. doi: 10.1186/1742-2094-10-140
- Gadek-Michalska, A., & Bugajski, J. (2010). Interleukin-1 (IL-1) in stress-induced activation of limbic-hypothalamic-pituitary adrenal axis. *Pharmacol Rep*, *62*(6), 969-982.
- Galeeva, A., Pelto-Huikko, M., Pivina, S., & Ordyan, N. (2010). Postnatal ontogeny of the glucocorticoid receptor in the hippocampus. *Vitam Horm*, *82*, 367-389. doi: 10.1016/S0083-6729(10)82019-9
- Ganguly, P., & Brenhouse, H. C. (2014). Broken or maladaptive? Altered trajectories in neuroinflammation and behavior after early life adversity. *Dev Cogn Neurosci*. doi: 10.1016/j.dcn.2014.07.001

- Garcia-Bueno, B. Leza J. C. (2008). Mecanismos inflamatorios/antiinflamatorios en el cerebro tras la exposicion a estrés. *rev neurol*, 46(11), 675-683.
- Gemma, C. (2010). Neuroimmunomodulation and Aging. *Aging Dis*, 1(3), 169-172.
- Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., & Huber, T. (2013). Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci*, 7, 45. doi: 10.3389/fncel.2013.00045
- Gomez-Gonzalez, B., & Escobar, A. (2010). Prenatal stress alters microglial development and distribution in postnatal rat brain. *Acta Neuropathol*, 119(3), 303-315. doi: 10.1007/s00401-009-0590-4
- Goujon, E., Laye, S., Parnet, P., & Dantzer, R. (1997). Regulation of cytokine gene expression in the central nervous system by glucocorticoids: mechanisms and functional consequences. *Psychoneuroendocrinology*, 22 Suppl 1, S75-80.
- Guerout, N., Li, X., & Barnabe-Heider, F. (2014). Cell fate control in the developing central nervous system. *Exp Cell Res*, 321(1), 77-83. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.10.003
- Handa, R. J., & Weiser, M. J. (2013). Gonadal steroid hormones and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Front Neuroendocrinol*. doi: 10.1016/j.yfrne.2013.11.001
- Heim, C., & Nemeroff, C. B. (2001). The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry*, 49(12), 1023-1039. doi: S000632230101157X [pii]
- Herman, J. P., Flak, J., & Jankord, R. (2008). Chronic stress plasticity in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Prog Brain Res*, 170, 353-364. doi: 10.1016/S0079-6123(08)00429-9
- Hueston, C. M., Barnum, C. J., Eberle, J. A., Ferraioli, F. J., Buck, H. M., & Deak, T. (2011). Stress-dependent changes in neuroinflammatory markers observed after common laboratory stressors are not seen following acute social defeat of the Sprague Dawley rat. *Physiology & Behavior*, 104, 187-198. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.03.013

- Hueston, C. M., & Deak, T. (2014). The inflamed axis: the interaction between stress, hormones, and the expression of inflammatory-related genes within key structures comprising the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Physiol Behav*, *124*, 77-91. doi: 10.1016/j.physbeh.2013.10.035
- Huot, R. L., Plotsky, P. M., Lenox, R. H., & McNamara, R. K. (2002). Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Res*, *950*(1-2), 52-63. doi: S0006899302029852 [pii]
- Irwin, M. R., & Miller, A. H. (2007). Depressive disorders and immunity: 20 years of progress and discovery. *Brain Behav Immun*, *21*(4), 374-383. doi: 10.1016/j.bbi.2007.01.010
- Ivy, A. S., Rex, C. S., Chen, Y., Dube, C., Maras, P. M., Grigoriadis, D. E., . . . Baram, T. Z. (2010). Hippocampal dysfunction and cognitive impairments provoked by chronic early-life stress involve excessive activation of CRH receptors. *J Neurosci*, *30*(39), 13005-13015. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1784-10.2010
- Jahng, J. W. (2010). An animal model of eating disorders associated with stressful experience in early life. *Horm Behav*. doi: S0018-506X(10)00291-6 [pii]  
10.1016/j.yhbeh.2010.11.010
- Janeway, Charles A. Jr., Travers, Paul., Walpot, Mark., & Shlomchik, Mark. J. (2005). *immunobiology* (6th Edition ed.). New York and London: Churhill livingstone.
- Jauregui-Huerta, F., Ruvalcaba-Delgadillo, Y., Gonzalez-Castaneda, R., Garcia-Estrada, J., Gonzalez-Perez, O., & Luquin, S. (2010). Responses of glial cells to stress and glucocorticoids. *Curr Immunol Rev*, *6*(3), 195-204. doi: 10.2174/157339510791823790
- Ji, R. R., Berta, T., & Nedergaard, M. (2013). Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain*, *154 Suppl 1*, S10-28. doi: 10.1016/j.pain.2013.06.022
- Jurgens, H. A., & Johnson, R. W. (2012). Dysregulated neuronal-microglial cross-talk during aging, stress and inflammation. *Exp Neurol*, *233*(1), 40-48. doi: 10.1016/j.expneurol.2010.11.014
- Kaufman, J., Plotsky, P. M., Nemeroff, C. B., & Charney, D. S. (2000). Effects of early adverse experiences on brain structure and function: clinical

- implications. *Biol Psychiatry*, 48(8), 778-790. doi: S0006-3223(00)00998-7 [pii]
- Kent, S., Tom, C., & Levine, S. (1997). Effect of Interleukin-1beta on Pituitary-Adrenal Responses and Body Weight in Neonatal Rats: Interaction with Maternal Deprivation. *Stress*, 1(4), 213-230. doi: I405N970028 [pii]
- Kwak, H. R., Lee, J. W., Kwon, K. J., Kang, C. D., Cheong, I. Y., Chun, W., . . . Lee, H. J. (2009). Maternal social separation of adolescent rats induces hyperactivity and anxiolytic behavior. *Korean J Physiol Pharmacol*, 13(2), 79-83. doi: 10.4196/kjpp.2009.13.2.79
- Lajud, N., Roque, A., Cajero, M., Gutierrez-Ospina, G., & Torner, L. (2012). Periodic maternal separation decreases hippocampal neurogenesis without affecting basal corticosterone during the stress hypo-responsive period, but alters HPA axis and coping behavior in adulthood. *Psychoneuroendocrinology*, 37(3), 410-420. doi: 10.1016/j.psyneuen.2011.07.011
- Lampron, A., Elali, A., & Rivest, S. (2013). Innate immunity in the CNS: redefining the relationship between the CNS and its environment. *Neuron*, 78(2), 214-232. doi: 10.1016/j.neuron.2013.04.005
- Leventopoulos, M., Ruedi-Bettschen, D., Knuesel, I., Feldon, J., Pryce, C. R., & Opacka-Juffry, J. (2007). Long-term effects of early life deprivation on brain glia in Fischer rats. *Brain Res*, 1142, 119-126. doi: 10.1016/j.brainres.2007.01.039
- Lupien, S. J., Buss, C., Schramek, T. E., Maheu, F., & Pruessner, J. (2005). Hormetic influence of glucocorticoids on human memory. *Nonlinearity Biol Toxicol Med*, 3(1), 23-56. doi: 10.2201/nonlin.003.01.003
- McEwen, B. S. (2002). Sex, stress and the hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process. *Neurobiol Aging*, 23(5), 921-939.
- McNally, L., Bhagwagar, Z., & Hannestad, J. (2008). Inflammation, glutamate, and glia in depression: a literature review. *CNS Spectr*, 13(6), 501-510.
- Meyer, U. (2013). Developmental neuroinflammation and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 42, 20-34. doi: 10.1016/j.pnpbp.2011.11.003
- Michael Maes, Michael Berk, Lisa Goehler, Cai Song, George Anderson, & Piotr Gałeczki, Brian Leonard. (2012). Depression and sickness behavior are

- Janus-faced responses to shared inflammatory pathways. *BMC Med*, 10(66), 19. doi: 10.1186/1741-7015-10-66
- Miller, A. H., Maletic, V., & Raison, C. L. (2009). Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry*, 65(9), 732-741. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.11.029
- Miller, G. E., Chen, E., Fok, A. K., Walker, H., Lim, A., Nicholls, E. F., . . . Kober, M. S. (2009). Low early-life social class leaves a biological residue manifested by decreased glucocorticoid and increased proinflammatory signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(34), 14716-14721. doi: 10.1073/pnas.0902971106  
0902971106 [pii]
- Miller, G. E., Rohleder, N., & Cole, S. W. (2009). Chronic interpersonal stress predicts activation of pro- and anti-inflammatory signaling pathways 6 months later. *Psychosom Med*, 71(1), 57-62. doi: 10.1097/PSY.0b013e318190d7de  
PSY.0b013e318190d7de [pii]
- Moscoso, M. S. (2009). De la mente a la célula: Impacto del estrés en psiconeuroendocrinología. *Liberabit*, 15(2), 143-152.
- Nayak, D., Roth, T. L., & McGavern, D. B. (2014). Microglia development and function. *Annu Rev Immunol*, 32, 367-402. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120240
- Nguyen, K. T., Deak, T., Owens, S. M., Kohno, T., Fleshner, M., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (1998). Exposure to acute stress induces brain interleukin-1beta protein in the rat. *J Neurosci*, 18(6), 2239-2246.
- Ohsawa, K., Imai, Y., Sasaki, Y., & Kohsaka, S. (2004). Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem*, 88(4), 844-856. doi: 2213 [pii]
- Pavlik, A., & Buresova, M. (1984). The neonatal cerebellum: the highest level of glucocorticoid receptors in the brain. *Brain Res*, 314(1), 13-20.
- Paxinos, G. (2004). *The rat nervous system* G. Paxinos (Ed.) (pp. 1329).
- Penninx, B. W., Kritchinsky, S. B., Yaffe, K., Newman, A. B., Simonsick, E. M., Rubin, S., . . . Pahor, M. (2003). Inflammatory markers and depressed mood in older persons: results from the Health, Aging and Body

- Composition study. *Biol Psychiatry*, 54(5), 566-572. doi: S0006322302018115 [pii]
- Petty, M. A., & Lo, E. H. (2002). Junctional complexes of the blood-brain barrier: permeability changes in neuroinflammation. *Prog Neurobiol*, 68(5), 311-323.
- 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 Res Mol Brain Res*, 18(3), 195-200.
- Plotsky, P. M., Thiruvikraman, K. V., & Meaney, M. J. (1993). Central and feedback regulation of hypothalamic corticotropin-releasing factor secretion. *Ciba Found Symp*, 172, 59-75; discussion 75-84.
- Pousset, F. (1994). Developmental expression of cytokine genes in the cortex and hippocampus of the rat central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res*, 81(1), 143-146.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A. S., McNamara, J. O., & Williams, S. M. (2004). *Neuroscience* (3ra. ed.). Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Inc. .
- Rajkowska, G., & Miguel-Hidalgo, J. J. (2007). Gliogenesis and glial pathology in depression. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 6(3), 219-233.
- Roque, S., Mesquita, A. R., Palha, J. A., Sousa, N., & Correia-Neves, M. (2014). The behavioral and immunological impact of maternal separation: a matter of timing. *Front Behav Neurosci*, 8, 192. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00192
- Rothman, S. M., & Mattson, M. P. (2010). Adverse stress, hippocampal networks, and Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med*, 12(1), 56-70. doi: 10.1007/s12017-009-8107-9
- Schmitz, T., & Chew, L. J. (2008). Cytokines and myelination in the central nervous system. *ScientificWorldJournal*, 8, 1119-1147. doi: 10.1100/tsw.2008.140
- 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 Res*, 1097(1), 123-132. doi: S0006-8993(06)01161-9 [pii]

10.1016/j.brainres.2006.04.066

Song, C., Phillips, A. G., & Leonard, B. (2003). Interleukin 1 beta enhances conditioned fear memory in rats: possible involvement of glucocorticoids. *Eur J Neurosci*, *18*(7), 1739-1743.

Squire, L. R., Bloom, F. E., McConnell, S. K., Roberts, J. L., Spitzer, N. C., & Zigmond, M. J. (2003). *Fundamental neuroscience* (2nd. ed.). USA: Elsevier science.

Streit, W. J., Conde, J. R., Fendrick, S. E., Flanary, B. E., & Mariani, C. L. (2005). Role of microglia in the central nervous system's immune response. *Neurol Res*, *27*(7), 685-691. doi: 10.1179/016164105X49463

Sudarov, A., & Joyner, A. L. (2007). Cerebellum morphogenesis: the foliation pattern is orchestrated by multi-cellular anchoring centers. *Neural Dev*, *2*, 26. doi: 1749-8104-2-26 [pii]

10.1186/1749-8104-2-26

Sugama, S., Fujita, M., Hashimoto, M., & Conti, B. (2007). Stress induced morphological microglial activation in the rodent brain: involvement of interleukin-18. *Neuroscience*, *146*, 1388-1399. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.02.043

Tanapat, P., Galea, L. A., & Gould, E. (1998). Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus. *Int J Dev Neurosci*, *16*(3-4), 235-239. doi: S0736-5748(98)00029-X [pii]

Tolosa, L., Caraballo-Miralles, V., Olmos, G., & Lladó, J. (2011). TNF- $\alpha$  potentiates glutamate-induced spinal cord motoneuron death via NF- $\kappa$ B. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *46*, 176-186. doi: 10.1016/j.mcn.2010.09.001

Torner, Luz. (2000). El papel de la prolactina como modulador de respuestas emocionales y neuroendocrinas al estrés. In C. Torner Aguilar & J. Velázquez Moctezuma (Eds.), *Tópicos en psiquiatría biológica* (Primera Edición ed., pp. 353-380). México: Universidad Autónoma Metropolitana Sociedad Mexicana de Psiquiatría Biológica.

Tsigos, C., & Chrousos, G. P. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res*, *53*(4), 865-871. doi: S0022399902004294 [pii]

- Tuglu, C., Kara, S. H., Caliyurt, O., Vardar, E., & Abay, E. (2003). Increased serum tumor necrosis factor-alpha levels and treatment response in major depressive disorder. *Psychopharmacology (Berl)*, *170*(4), 429-433. doi: 10.1007/s00213-003-1566-z
- van der Meer, M. J., Sweep, C. G., Pesman, G. J., Tilders, F. J., & Hermus, A. R. (1996). Chronic stimulation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in rats by interleukin 1beta: central and peripheral mechanisms. *Cytokine*, *8*(12), 910-919. doi: 10.1006/cyto.1996.0122
- Velasco-Ramirez, S. F., Rosales-Rivera, L. Y., Ramirez-Anguiano, A. C., & Bitzer-Quintero, O. K. (2013). [Cytokines and the nervous system: the relationship between seizures and epilepsy]. *rev neurol*, *57*(4), 171-177.
- Vinson, G. P. (2009). The adrenal cortex and life. *Mol Cell Endocrinol*, *300*(1-2), 2-6. doi: 10.1016/j.mce.2008.09.008
- Viviani, B., Boraso, M., Valero, M., Gardoni, F., Marco, E. M., Llorente, R., . . . Viveros, M. P. (2013). Early maternal deprivation immunologically primes hippocampal synapses by redistributing interleukin-1 receptor type I in a sex dependent manner. *Brain Behav Immun*. doi: 10.1016/j.bbi.2013.09.008
- Williamson, L. L., Sholar, P. W., Mistry, R. S., Smith, S. H., & Bilbo, S. D. (2011). Microglia and memory: modulation by early-life infection. *J Neurosci*, *31*(43), 15511-15521. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3688-11.2011
- Winkelmann-Duarte, E. C., Padilha-Hoffmann, C. B., Martins, D. F., Schuh, A. F., Fernandes, M. C., Santin, R., . . . Lucion, A. B. (2011). Early-life environmental intervention may increase the number of neurons, astrocytes, and cellular proliferation in the hippocampus of rats. *Exp Brain Res*, *215*(2), 163-172. doi: 10.1007/s00221-011-2881-y
- Ziko, I., De Luca, S., Dinan, T., Barwood, J. M., Sominsky, L., Cai, G., . . . Spencer, S. J. (2014). Neonatal overfeeding alters hypothalamic microglial profiles and central responses to immune challenge long-term. *Brain Behav Immun*, *41*, 32-43. doi: 10.1016/j.bbi.2014.06.014
- Zunzain, P. A., Anacker, C., Cattaneo, A., Carvalho, L. A., & Pariante, C. M. (2011). Glucocorticoids, cytokines and brain abnormalities in depression.

*Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 35(3), 722-729. doi:  
10.1016/j.pnpbp.2010.04.011

Zusso, M., Methot, L., Lo, R., Greenhalgh, A. D., David, S., & Stifani, S. (2012). Regulation of postnatal forebrain amoeboid microglial cell proliferation and development by the transcription factor Runx1. *J Neurosci*, 32(33), 11285-11298. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6182-11.2012