



FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS

“DR. IGNACIO CHÁVEZ”

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TESIS

“EFECTO DEL ESTRÉS POSNATAL EN RATAS NEONATAS CON UN RETO INMUNE SOBRE LA VARIACIÓN DE CITOCINAS CIRCULANTES Y LA ACTIVACIÓN DE LA MICROGLIA”

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

P R E S E N T A:

MÉDICO CIRUJANO Y PARTERO.

LUIS MIGUEL SAAVEDRA PIMENTEL.

DIRECTORAS DE TESIS

D en C. BERTHA FENTON NAVARRO.

D en C. MARÍA DE LA LUZ TORNER AGUILAR.

MORELIA MICHOACÁN, MÉXICO

JUNIO 2016.



Este trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Glicobiología de la División de Estudios de Posgrado en la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la UMSNH. Y en el Centro de Investigación Biomédica de Michoacán (CIBIMI) IMSS, bajo la asesoría de la D en C. Bertha Fenton Navarro y la D en C María de la Luz Torner Aguilar.

Apoyado por:

CONACyT

IMSS:

CIC-UMSNH. 2014-2015.

COMITÉ TUTORAL.

D en C. José Miguel Cervantes Alfaro.

D en C. Sergio Gutiérrez Castellanos.

D en C. Marcia Yvette Gauthereau Torres.

DEDICATORIA.

Con todo mi cariño y respeto para las personas que nunca dejaron de creer en mi, siempre me impulsaron a seguir adelante a pesar de un mar de adversidades, no tengo con que agradecerles todo su apoyo y comprensión en los momentos difíciles, gracias a dios por permitirme pasar mas momentos con ustedes.

Papá y Mamá

AGRADECIMIENTOS.

A mis hermanos por todo el apoyo que siempre me han brindado a lo largo de mi vida, son el motor que me motiva a superarme día con día.

A las Doctoras María de la Luz Torner Aguilar y Bertha Fenton Navarro por que siempre tuvieron tiempo para resolver mis dudas, por la paciencia que tuvieron en mi formación, pero sobre todo por permitir que este sueño se hiciera realidad.

A mi comité tutotal D en C. José Miguel Cervantes Alfaro, D en C. Sergio Gutiérrez Castellanos, D en C. Marcia Yvette Gauthereau Torres. Por sus observaciones y aportaciones fueron parte fundamental en mi formación y en la realización del proyecto.

A mis amigos y compañeros de generación Armando, Manuel, Andrés, Mimi, Liz y Christian por esas mañanas de receso que hacían ameno el día.

A mis compañeros de laboratorio Manuel, Meche, Flor, Quique, Marion, Roberto, Aldo, Edel, Andrea, Ana y muchos más que hacían esas tardes en el laboratorio divertidas.

Finalmente a ti Lupita por compartir la vida a mi lado, por tu paciencia en mis malos ratos, sí es verdad que solo existe una vida, ha sido un placer vivirla contigo. Gracias por todo tu cariño y comprensión.

ÍNDICE GENERAL.

Índice de tablas.....	viii
Índice de Figuras.....	ix
Abreviaturas.....	xi
Resumen.....	xiv
Abstract.....	xv
I.- Introducción.....	1
1.- Estrés.....	1
1.1.- Teoría fisiológica del estrés.....	3
1.2.- Estrés y activación del sistema Nervioso Autónomo.....	5
1.2.- Estrés y activación del sistema neuroendocrino.....	6
2.- Hipocampo.....	8
2.1.- Circuito de procesamiento de la información.....	9
3.- Estrés, activación del sistema inmune y enfermedades.....	10
3.1 Respuesta inmune cerebral, células de la glia (microglia).....	12
3.2.- Astrocitos.....	14
4.- Citocinas proinflamatorias.....	15
4.1.- Interleucina 1.....	16

4.2.- Interleucina 6.....	17
4.3.- Factor de Necrosis Tumoral.....	17
4.4.- Citocinas, respuesta innata y función.....	18
5.- Estrés en etapas tempranas de la vida.....	21
6.- Reto inmune en etapas tempranas de la vida.....	22
II.- Justificación.....	26
III.- Hipótesis.....	27
IV.- Objetivos.....	27
V.- Material y métodos.....	28
1.- Animales.....	28
2.- Modelo de Separación Materna (SM).....	28
3.- Administración de Lipopolisácarido (LPS).....	29
4.- Grupos de animales.....	29
5.- Estrategia experimental Inmunohistoquímica.....	31
6.- Estrategia experimental ELISA.....	32
7.- Prueba de campo abierto.....	33
8.-Evaluacion de cambios en el peso corporal.....	33
9.- Recolección de tejidos.....	33
10.- Homogenados de IL 1β.....	34
11.- Perfusión cardiaca.....	34

12- Inmunohistoquímica.....	34
13.- Análisis morfológico de la microglia.....	35
14.- Análisis morfológico de los astrocitos.....	36
15.- Análisis estadístico.....	37
VI.- Resultados.....	38
VII.- Discusión.....	54
VIII.- Conclusiones.....	62
IX.- Perspectivas.....	63
X.- Referencias bibliográficas.....	64

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1.- Células productoras y principales funciones biológicas de las citocinas inflamatorias.....18

Tabla 2.- Funciones de las citocinas en el SNC.....20

Tabla 3.- Prueba de campo abierto.....40

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.- Estrés agudo, episódico y crónico.....	3
Figura 2.- Fases clásicas del estrés.....	5
Figura 3.- Esquema del Sistema Nervioso Simpático y su activación por estrés...6	
Figura 4.- Activación del eje (HPA) por estrés.....	8
Figura 5.- Esquema de los circuitos en el hipocampo adulto.....	10
Figura 6.- Gráfico de la respuesta inmune en función de la duración del estresor.11	
Figura 7.- Estadios de activación de la microglia.....	14
Figura 8.- El LPS y sus tres regiones.....	23
Figura 9.- El LPS (insulto sistémico) puede activar el eje (HPA).....	25
Figura 10.- Grupos de animales.....	30
Figura 11.- Esquema experimental para la inmunohistoquímica.....	31
Figura 12.- Esquema experimental para la determinación de citocinas por el método de ELISA.....	32
Figura 13.- Cambios en el peso corporal.....	39
Figura 14.- Número de cruces entre cuadrantes.....	40
Figura 15.- Concentraciones de corticosterona plasmática.....	41
Figura 16.- Concentraciones de IL-1 β en plasma.....	43
Figura 17.- Concentraciones plasmáticas de TNF α	44
Figura 18.- Concentraciones de IL-6 plasmática.....	45

Figura 19.- Concentraciones de IL-1 β en homogenados de hipocampo.....	46
Figura 20.- Densidad microglial de células microgliales/mm ³ en zona CA3 hipocampal.....	48
Figura 21.- Densidad microglial de células microgliales/mm ³ en Hilus hipocampal.....	49
Figura 22.- Micrografía de células microgliales en CA3 del hipocampo.....	50
Figura 23.- Densidad celular de astrocitos en mm ³ en la región CA3 hipocampal.....	51
Figura 24.- Densidad celular de astrocitos en mm ³ en la región del Hilus hipocampal.....	51
Figura 25.- Micrografía de astrocitos en el Hilus del hipocampo.....	52

ABREVIATURAS.

ACTH. Hormona adenocorticotropina.

AMPA. Receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico.

ANOVA. Análisis de varianza.

Anti-GFAP. Anticuerpo contra proteína ácida glial fibrilar.

BDNF. Factor neurotrófico derivado de cerebro

CA. Cuerno de Amón

CE. Corteza entorrinal.

CORE. Centro estructural.

CRH. Hormona liberadora de corticotropina.

DAB. Diaminobencidina.

EDTA. Ácido etilendiaminotetraácetico.

ELISA. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas.

GABA. Ácido gamma-aminobutírico.

GC. Glucocorticoide.

GD. Giro dentado

GFAP. Proteína ácida glial fibrilar.

GRs. Receptor a glucocorticoide.

HPA. Eje Hipotálamo, Hipófisis, Pituitaria.

Iba 1. Molécula adaptadora de calcio ionizado.

IgE. Inmunoglobulina E.

IgG. Inmunoglobulina G.

INF γ . Interferón gamma.

IL-1 β . Interleucina 1 beta.

IL1Ra. Antagonista del receptor de interleucina 1.

IL1RI. Receptor tipo I para interleucina 1

IL1RII. Receptor tipo II para interleucina 1.

IL-2. Interleucina 2.

IL-6. Interleucina 6.

IL-6R. Receptor de alta afinidad para interleucina 6.

IL-8. Interleucina 8.

IMSS. Instituto Mexicano del Seguro Social.

LPS. Lipopolisacárido.

MC. Mineralocorticoides.

MHC. Complejo mayor de histocompatibilidad.

MRs. Receptor a mineralocorticoides.

NIH. Institutos de salud Norteamericanos.

NMDA. Ácido N-metil-D-aspártico.

NOM. Norma Oficial Mexicana.

NK. Natural killer. (Células asesinas).

PB. Buffer de fosfatos.

PBT. Buffer de fosfatos y Tritón.

PFA. Paraformaldehído.

PGE2. Prostaglandina E2.

PN0. Día posnatal 0

PN1. Día posnatal 1

PN4. Día posnatal 4

PN14. Día posnatal 14

PN15. Día posnatal 15.

SGA. Síndrome general de adaptación.

SM. Separación materna.

SNC. Sistema nervioso central.

“EFECTO DEL ESTRÉS POSNATAL EN RATAS NEONATAS CON UN RETO INMUNE SOBRE LA VARIACIÓN DE CITOCINAS CIRCULANTES Y LA ACTIVACIÓN DE LA MICROGLIA”

RESUMEN.

Introducción. El estrés en etapas tempranas de la vida afecta de manera permanente el desarrollo del sistema nervioso central. Pacientes que tuvieron estrés en la infancia llegan a desarrollar desórdenes psicológicos como ansiedad y depresión en la etapa adulta. Estas enfermedades se acompañan de procesos inflamatorios a nivel cerebral. El sistema nervioso central tiene su propio sistema inmune, a él pertenecen un grupo de células especializadas comprendido por células gliales a las cuales pertenecen las células microgliales, estas se encuentran distribuidas en todo el cerebro y pueden ser activadas por infecciones, inflamación, factores estresantes y son capaces de secretar mensajeros químicos o citocinas. El estrés en etapas tempranas de la vida incrementa la secreción de citocinas proinflamatorias, sin embargo, es poco lo que se conoce con un segundo desafío. **Objetivo.** Demostrar que el estrés, en etapas tempranas de la vida induce de forma inmediata una mayor activación de las células microgliales y citocinas proinflamatorias circulantes en respuesta a un reto inmune con LPS. **Material y métodos.** Se utilizaron 4 grupos de ratas neonatas macho de la cepa Sprague Dawley con una (n = 8 para cada grupo) con los siguientes tratamientos: 1) grupo control + solución salina, 2) grupo control + LPS, 3) grupo separación materna 3 horas al día desde posnatal 1 al 14 (PN1-PN14) + solución salina, 4) grupo separación materna + LPS. Se administró lipopolisacárido (LPS) (1mg/kg/peso corporal) a los animales sólo al día 14, 1 hora después se realizó la prueba de campo abierto para evaluar la conducta de locomoción, y se sacrificaron al día (PN 15). Se obtuvieron los cerebros y se colectaron muestras de sangre de los animales. Se realizaron técnicas de inmunohistoquímica con anticuerpos específicos para analizar la microglia, y se determinaron las concentraciones de citocinas proinflamatorias (IL-6-IL-1 β , TNF α) así como la corticosterona plasmática, utilizando kits comerciales de ELISA. **Resultados.** Los animales tratados con LPS presentaron una disminución en la locomoción en la prueba de campo abierto. Nosotros observamos una mayor activación, pero una disminución en el número total de células microgliales en ambos grupos SM y LPS en áreas CA3 e Hilus del hipocampo. La mayor activación y disminución en el número de células microgliales fue observada en el grupo SM+ LPS. Por otro lado, el LPS produjo un aumento en la secreción plasmática de IL-1 β , TNF α , IL-6 y corticosterona, por su parte la separación maternal (SM), sólo incrementa la secreción de TNF α en ausencia de LPS, pero de manera interesante la SM atenúa la secreción de citocinas en respuesta al LPS. Además la (SM) y (LPS) ocasionan una disminución en la densidad total celular, tanto en CA3 como en el Hilus. **Conclusión.** El estrés en etapas tempranas de la vida “sensibiliza” a las células microgliales, induciendo una mayor activación en respuesta a un segundo reto con LPS, pero también los astrocitos tienen una disminución en la densidad celular total. De manera interesante la respuesta de las citocinas periféricas e hipocámpales se ven atenuadas en los grupos SM-LPS.

Palabras clave: citocinas, separación maternal, LPS, hipocampo, astrocitos, microglia.

ABSTRACT.

Introduction: Early life stress permanently affects the development of the central nervous system. Patients who experienced stress during childhood may develop psychological disorders as anxiety and depression in adulthood. These diseases are accompanied by inflammatory processes in the brain. Microglial cells are brain's counterpart to macrophages, they are the primary cells of the central nervous system's innate immune response. These are distributed throughout the brain and can be activated by infection, inflammation or stress and are capable of secreting chemical messengers or cytokines. Early life stress increases the secretion of proinflammatory cytokines, however the response against a second challenge is not known. **Objective:** To demonstrate that early life stress leads to an immediate activation increase of microglial cells in the hippocampus and to a high circulating cytokine release in response to an immune challenge with LPS. **Material and methods:** Four groups of Male Sprague Dawley rat pups (n = 8 for each group) were used with the following treatments: 1) saline control group, 2) control + LPS group, 3) maternal separation (MS), 3h/day from postnatal day (PD) 1 to 14. 4) saline group and MS + LPS group. Lipopolysaccharide (LPS) was administered (1mg/kg body weight) to animals only on PD14. One hour later the open field test was carried out to evaluate locomotion, and the animals were sacrificed on PD15. Brains and blood samples were collected from animals. Immunohistochemistry was used with antibodies specific for microglial cells, and concentrations of proinflammatory cytokines (IL-6-IL-1 β , TNF- α) and plasma corticosterone were determined using ELISA commercial kits. **Results.** LPS -treated animals presented a reduced locomotion in the open field. We observed a higher activation, but a decrease in the total number of microglial cells in both SM and LPS groups in CA3 and the hilus areas from the hippocampus. The highest activation and lowest number of microglial cells was observed in the SM + LPS group. On the other hand, LPS produces an increased secretion of plasmatic IL-1 β , TNF α , IL-6 and corticosterone. SM only increases the secretion of TNF α in absence of the LPS, but interestingly SM attenuates the secretion of the cytokines in response to LPS. Besides, the (SM) and (LPS) causes a decrease in total cell density both in CA3, as in the hilus. **Conclusion.** Early life stress sensitizes microglial cells, inducing a higher activation in response to a second challenge with LPS, but also the total cell density of astrocytes is reduced. Interestingly the response of peripheral and hippocampal cytokines are attenuated in the SM-LPS groups.

Keywords. Citokynes, maternal separation, LPS, Hippocampus, astrocytes, microglia.

I.- INTRODUCCIÓN

1.- Estrés.

El término de estrés fue tomado del latín (*stringere*: tensar o estirar) y utilizado por el idioma inglés (*strain*: tensión) en el siglo XIV, con el objetivo de describir la opresión, la adversidad y la dificultad (Moscoso, 1998). También se define como la reacción que tiene el organismo ante cualquier demanda, siendo un estado de fuerte tensión fisiológica o psicológica que prepara para el ataque o huida. En 1936 Hans Selye introdujo el término estrés al campo de las ciencias biológicas para demostrar un síndrome producido por diversos agentes nocivos, cuya finalidad era promover la adaptación del organismo a su medio cambiante (Selye, 1936). El estrés ha sido un tema de interés y preocupación para diversos científicos de la conducta humana, por cuanto sus efectos inciden tanto en la salud física y mental, como en el rendimiento laboral y académico de la persona. Todo lo que está a nuestro alrededor puede ser percibido como un estresor, desde el hablar en público, esperar el resultado de algún examen, ruido de coches, cambio de clima y situaciones de violencia o abandono en etapas tempranas de la vida. Tanto los seres humanos como los animales tienen la capacidad de responder a éstos y otros factores que son considerados como una amenaza a su bienestar. Esta respuesta se manifiesta mediante una reacción del organismo que llega a desencadenar una cascada de señales fisiológicas para movilizar fuentes de energía que le permiten desplegar una respuesta particular de conducta ante el estímulo estresante. (Blecha, 2000). El estrés provoca preocupación, angustia y puede conducir a trastornos personales, desórdenes familiares e incluso sociales. Al respecto señalan Martínez y Díaz (2007) que el problema que subyace radica en los requerimientos de la modernidad, concentrada en la obtención de resultados al margen de sus consecuencias sobre la calidad de vida, y por ende en la salud física y mental de las personas afectadas. El estrés no se considera en,

principio como una enfermedad sino como la respuesta, tanto física como mental, a las adaptaciones y ajustes del ser humano a los diversos acontecimientos vitales. Cualquier suceso que genere una respuesta emocional, puede causar estrés; esto incluye tanto situaciones positivas como negativas. A todos los seres humanos les afectan los procesos relacionados con el desgaste físico, el cual produce enfermedades, que se hacen visibles con el paso del tiempo y éstos aumentarán la predisposición al estrés ya que disminuyen la capacidad de adaptación y exigen mayor esfuerzo al organismo para realizar cualquier tarea. Todo lo anterior repercute en un alto uso de los servicios de salud (Kalia, 2002). Por su parte, el estrés psicológico se relaciona con la consulta médica frecuente (Jyvaesjaervi y cols., 1999).

Por otra parte el estrés puede clasificarse en agudo y crónico. El estrés agudo puede ser definido como un proceso que lleva a interpretar y evaluar la amenaza, el daño o la demanda en general, mientras que, los estresores permanentes son referidos a situaciones negativas de una gran cronicidad en el tiempo, tales como vivir en la pobreza, en un vecindario violento, o dificultades económicas (McLoyd y Wilson, 1991), sufrir maltrato o abusos continuos (Manly y cols., 1994), psicopatología parental y enfermedad crónica (Kliewer, 1997), (Compas y cols., 1997), exposición a racismo y sexismo . (Trad y Greenblatt, 1990). Si un organismo no es capaz de desplegar una respuesta adecuada en contra del estrés, éste puede ser un factor determinante en la patogénesis de diversas enfermedades que incluyen alteraciones de la condición mental o psiquiátrica (depresión o anorexia nerviosa), del sistema cardiovascular (hipertensión), gastrointestinal (úlceras duodenales o gástricas), e inmune (susceptibilidad a infecciones). El estrés crónico es aquel que se vuelve peligroso (distrés) dado el tiempo prolongado que permanece, causando un problema de salud. Este estrés puede durar desde unas semanas hasta meses e incluso años (Fig. 1). Cuando la respuesta natural al estrés se da en exceso se produce una sobrecarga de tensión que repercute en el organismo humano y provoca la aparición de enfermedades y anomalías

patológicas que impiden el normal desarrollo y funcionamiento del cuerpo humano. El estrés crónico genera, en fase de agotamiento, una hipercortisolemia crónica. En el animal se ha demostrado que la hipercortisolemia podía ser neurotóxica para las estructuras cerebrales vulnerables como el hipocampo (McEwen 2002).

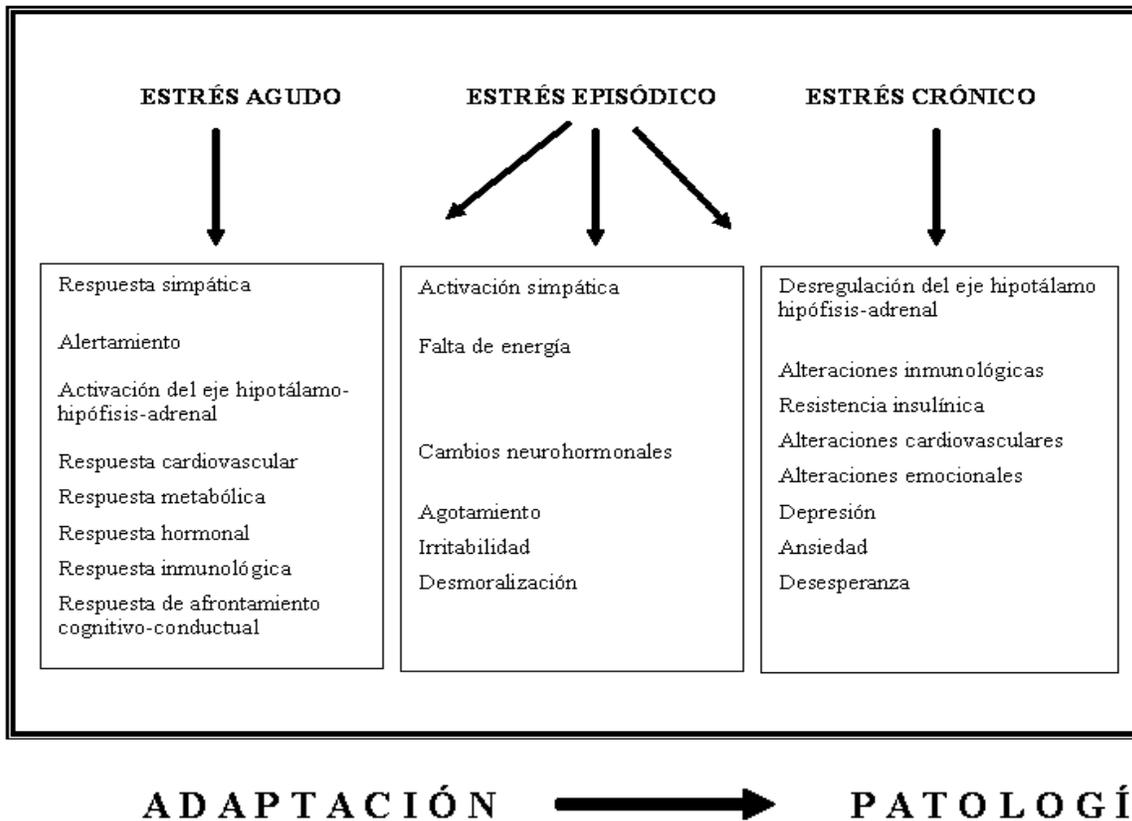


Figura 1, Estrés agudo y crónico. El estrés agudo desencadena respuestas adaptativas, mientras que el estrés crónico da lugar a carga alostática que induce el desarrollo de patologías (Adaptado de Kop, 1999; McEwen, 2005).

1.1.- Teoría fisiológica del estrés.

Introducida por Hans Selye, establece que el estrés es una respuesta fisiológica generalizada y no una respuesta específica. De igual manera introdujo el concepto de Síndrome General de Adaptación (SGA), como un conjunto de procesos fisiológicos en respuesta a los distintos estresores.

Describe tres fases:

- **a)** Alarma
- **b)** Resistencia
- **c)** Agotamiento.

a) Fase de alarma

El organismo reacciona ante un estresor activando el sistema nervioso simpático, con síntomas como: midriasis pupilar, sequedad de boca, aumento de la frecuencia cardíaca y respiratoria, sudoración, hipertensión arterial secreción de adrenalina y noradrenalina y aumento de la capacidad de atención y concentración, facilitando los recursos ante una actuación.

Esta reacción de alarma dura poco tiempo, pero el organismo necesita un tiempo determinado para recuperarse. Si esta recuperación no se produce entramos en la fase de resistencia, (Melgosa, 1999).

b) Fase de resistencia

Nuestro organismo mantiene una activación fisiológica máxima tratando de superar la amenaza o adaptarse a ella, de esta forma el organismo *sobrevive*. Esta fase puede durar semanas, meses y años; si es muy larga se le considera como estrés crónico. Sin embargo, si el estrés acaba en esta fase, el organismo puede retornar a un estado normal. (Melgosa, 1999). (Fig.2).

c) Fase de agotamiento

Se produce sólo si el estímulo estresante es continuo o se repite frecuentemente . El organismo agota sus recursos y pierde su capacidad de activación o adaptación. Sobrevienen entonces las enfermedades relacionadas con el estrés como son: insomnio, falta de concentración, abatimiento, fatiga, extenuación, patologías

inmunológicas, patologías cardiovasculares, patologías metabólicas y endocrinas, depresión, problemas gastrointestinales, infartos cardiacos, infartos cerebrales , etc. (Melgosa,1999).

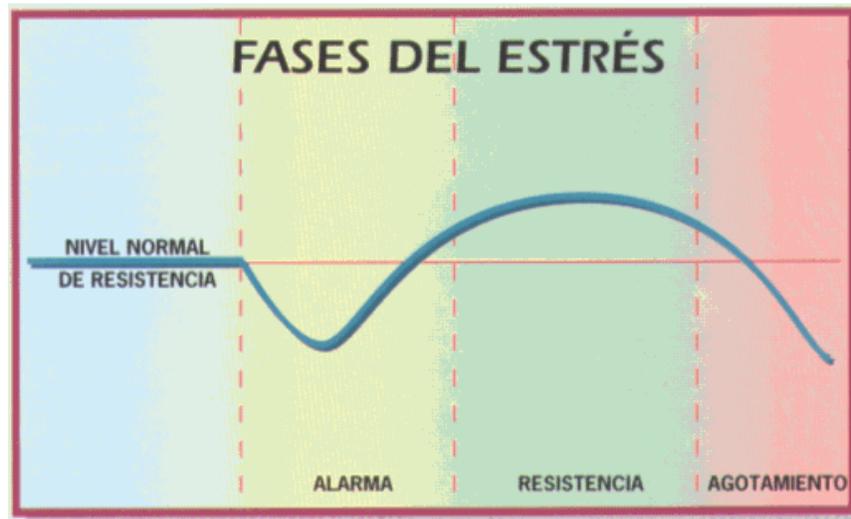


Figura 2. Fases clásicas del estrés: Alarma, Resistencia, agotamiento o colapso (Melgosa,1999).

1.2 - Estrés y activación del Sistema Nervioso Autónomo

El sistema nervioso autónomo en su división simpática es el efector de la respuesta rápida al estrés. Este sistema se activa durante lo que nuestro cerebro considera una emergencia. Su activación aumenta la vigilancia, la motivación y la activación general. La exposición del organismo a condiciones adversas genera la activación de las neuronas preganglionares simpáticas, con la liberación concomitante de noradrenalina por las neuronas posganglionares simpáticas. Asimismo la activación simpática estimula a las células cromafines de la médula de las glándulas suprarrenales para secretar adrenalina al torrente sanguíneo; esta forma la adrenalina aumenta las tasas cardíaca y respiratoria y el flujo sanguíneo a los músculos, con lo que prepara al organismo para emitir una de dos respuestas: pelear o huir (Cannon Wb y cols., 1929). Ambos tipos hormonales, glucocorticoides y catecolaminas, liberados durante la exposición del organismo al

estrés, ejercen funciones inmunomoduladoras, con lo que contribuyen a regular el funcionamiento del tercer efector de la respuesta al estrés, el sistema inmune. (Fig.3).

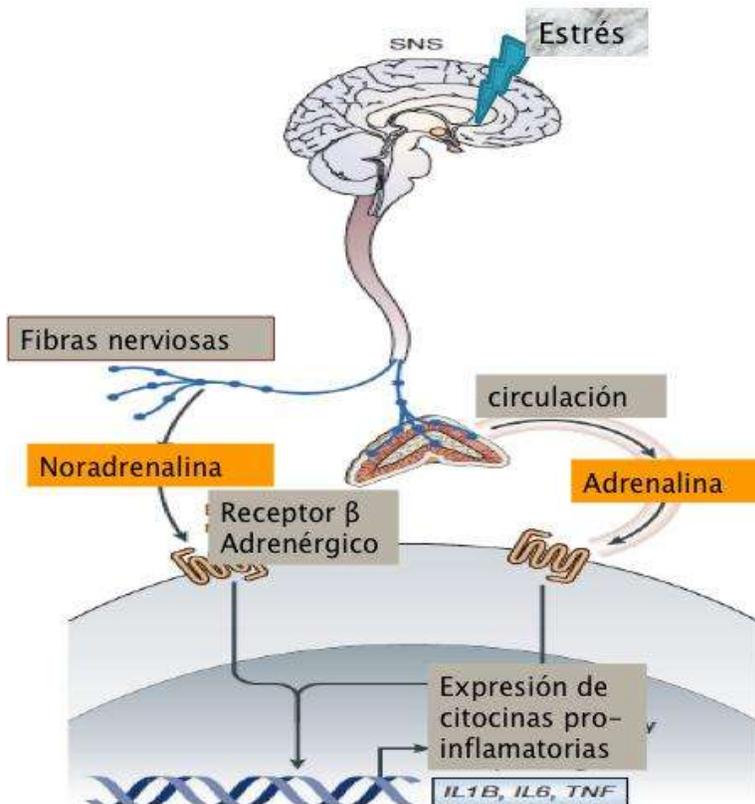


Figura 3. Esquema del Sistema Nervioso Simpático y su activación por estrés. (Melgosa,2006).

1.3.- Estrés y activación del sistema neuroendocrino.

El hipotálamo es la vía común final por la cual el sistema nervioso ejerce control sobre el sistema endocrino, el eje hipotálamo – pituitaria, suprarrenales (o eje HPA por sus siglas en ingles), constituye una unidad anatómica y funcional que regula procesos vitales como el balance hídrico, el control de la alimentación y el metabolismo. El efector inicial de la respuesta del eje (HPA) es el núcleo paraventricular. Ahí, las neuronas de la región parvocelular del núcleo paraventricular del hipotálamo poseen axones que se proyectan a la capa externa

de la eminencia media donde secretan la hormona liberadora de corticotropina, (CRH). La (CRH), viaja por la circulación portal hipofisiaria para estimular a las células corticotropas de la adenohipófisis a que secreten la hormona adrenocorticotropina (ACTH), ésta tiene como órgano blanco la corteza de las glándulas suprarrenales, específicamente las porciones fasciculada y reticular que en respuesta a la estimulación de ACTH, secretan glucocorticoides, los cuales ejercen una autorregulación negativa sobre el eje actuando sobre estructuras como hipotálamo e hipófisis, e hipocampo, (Daban y cols., 2005) para que el eje HPA y por ende el organismo vuelva a su estado basal. En el hipocampo existen dos tipos de receptores para corticosteroides, los de mineralocorticoides (MRs) y los de glucocorticoides (GRs). (Kiecolt y cols., 2002). Los receptores de glucocorticoides están extendidos en una gran variedad de tejidos: hígado, páncreas, tejido adiposo visceral, tejido esquelético y en el cerebro en regiones como el hipocampo y la amígdala, regulando la conducta cognitiva y la memoria. Así los (GRs), están muy extendidos, especialmente en el hipocampo, mientras que los (MRs) son más escasos, pero de nuevo el hipocampo es la zona más rica en los mismos. Es curioso que los (MRs) presenten alta afinidad tanto por mineralocorticoides (MC) como por glucocorticoides (GC), mientras que los GRs tienen una afinidad 10 veces menor por mineralocorticoides; otra curiosidad es que una vez ligados al receptor, ambos, MC y GC, se translocan al núcleo y se dimerizan uniéndose a la misma secuencia consenso de ADN, el llamado elemento de respuesta al receptor de glucocorticoide. Si los GC disminuyen en hipocampo, el bloqueo del funcionamiento de HPA se realiza muy mal y, entonces, es un eje que funciona desmedidamente, lo que produce niveles altos de glucocorticoides circulantes, como sucede en el estrés crónico. (Herbert, et al.,2006). Como comentamos previamente el estrés crónico origina un exceso de glucocorticoides manifestado a nivel del hipocampo por una atrofia de las neuronas piramidales del cuerno de Amón (CA) en la región CA3 y por una disminución del volumen y del número de neuronas del *gyrus* dentado. Esta atrofia hipocampal secundaria al estrés (Sapolsky 2000) implicaría de manera más amplia:

“ EFECTO DEL ESTRÉS POSNATAL EN RATAS NEONATAS CON UN RETO INMUNE SOBRE LA VARIACIÓN DE CITOCINAS CIRCULANTES Y LA ACTIVACIÓN DE LA MICROGLIA”

- 1.- Una disminución en la neurogénesis.
- 2.- Una disminución en la síntesis de factores neurotróficos como el “factor neurotrófico derivado de cerebro” (BDNF) que inhibe la apoptosis celular.
- 3.- Un aumento de la excitotoxicidad (glutamato) debido a una pérdida glial.
- 4.- Una neurotoxicidad debido a la hipercortisolemia (disminución de la neuroplasticidad, inicialmente reversible y posteriormente permanente).

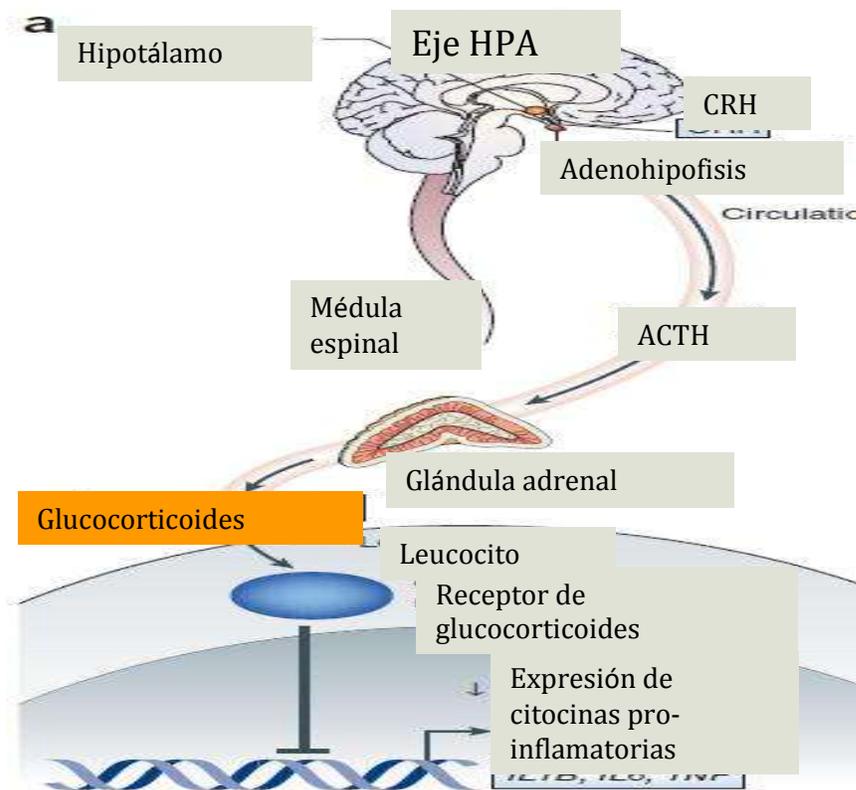


Figura 4: Activación del eje (HPA) por estrés. (Melgosa, 2006).

2.- Hipocampo. Es la estructura fundamental para el almacenamiento de la memoria explícita, lo cual se fundamenta en las características de plasticidad que presentan sus neuronas. En el ser humano y roedores el sistema hipocampal se asocia a la llamada memoria episódica y a la memoria espacial.

Al hipocampo lo podemos dividir en 3 zonas histológicas:

- Estrato polimorfo, constituido por neuronas intrínsecas, cuyos axones se arborizan alrededor de las células piramidales.
- Estrato piramidal: Constituido por células piramidales grandes y pequeñas, solamente las neuronas de este estrato envían sus prolongaciones fuera del hipocampo.
- Estrato molecular: Tiene principalmente células de tipo granular. (Moser 1998).

Áreas del Hipocampo:

- CA1: Es la de mayor tamaño, es una área particularmente sensible a la hipoxia.
- CA2: Presenta 2 capas celulares (una es menos marcada).
- CA3: Presentan un claro árbol dendrítico dirigido hacia el giro dentado, en estas dendritas se encuentran numerosas espinas: es importante recordar que la mayor presencia de espinas dendríticas es sinónimo de aprendizaje
- CA4 (Hilus). No presenta organización celular.
- Giro dentado: Corresponde a Sustancia Gris. Giro formado por Arquicorteza que se extiende hacia atrás, formando la Fasciola Cinerea (Giro Fasciolar) y luego el Inducio Gris sobre el cuerpo caloso. (Moser 1998).

2.1- Circuito de procesamiento de la información.

El circuito del procesamiento de la información de la memoria declarativa es el llamado circuito trisináptico. Este circuito inicia en la vía perforante de la corteza entorrinal. Primeramente, las neuronas de la corteza entorrinal envían sus proyecciones hacia las células granulares del giro dentado. En seguida, estas células proyectan sus axones hacia las neuronas piramidales de la región CA3, las cuales finalmente envían sus axones hasta las neuronas piramidales de la región CA1 mediante los colaterales de Schaffer. La información procesada mediante este circuito trisináptico permite relacionar diferentes aferencias sensoriales pertenecientes a diversos estímulos gracias a que las células piramidales del

hipocampo tienen un alto grado de interconexión, facilitando las relaciones entre las diferentes entradas de información (Zhang SJ y cols., 2013). (Fig 5).

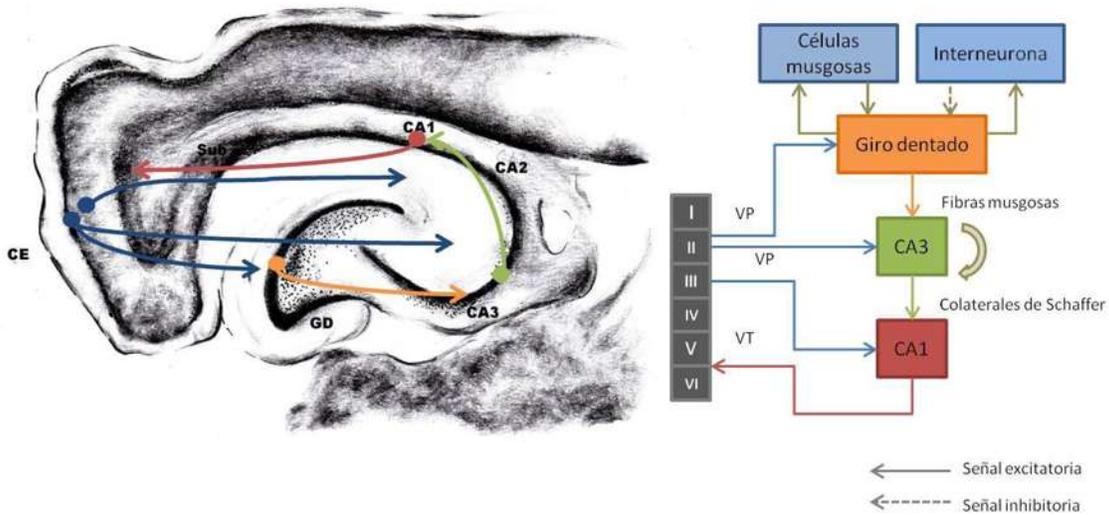


Figura 5. Esquema de los circuitos en el hipocampo adulto. La tradicional vía excitatoria trisináptica (corteza entorrinal (CE)-giro dentado (GD)-CA3-CA1-CE) es descrita por las flechas de colores (flecha azul: vía perforante; flecha naranja: vía de fibras musgosas; flecha verde: colaterales de Schaffer; flecha roja; proyecciones de CA1 a la CE). Tomado de (Zhang SJ y cols., 2013).

3.- Estrés, activación del sistema inmune y enfermedades.

Ambos tipos hormonales, glucocorticoides y catecolaminas, liberados durante la exposición del organismo al estrés, ejercen funciones inmunomoduladoras, con lo que contribuyen a regular el funcionamiento del tercer efector de la respuesta al estrés, el sistema inmune. Tanto las catecolaminas así como los glucocorticoides actúan de una forma directa sobre el funcionamiento de las células inmunes al acoplarse a los receptores de membrana y alterar la producción de citocinas, las cuales actúan como mediadores de los procesos inflamatorios. (Gomez y Escobar

2006). Las citocinas sistémicas pueden ingresar al tejido nervioso, a través de mecanismos de transporte saturables en sitios donde la barrera hemato-encefálica es relativamente permeable como son los órganos circunventriculares, eminencia media entre otros, alterando la función del eje HPA (Jara L. 2011). La principal vía de acción del estrés sobre la inmunidad es causar inmunosupresión a través de los glucocorticoides. Los glucocorticoides causan atrofia del timo, impidiendo la formación de nuevos linfocitos T (responsables de coordinar la respuesta inmune celular). Los glucocorticoides también inhiben la liberación de mensajeros como citocinas (proteínas que regulan el funcionamiento de las células del sistema inmune) e interferones (proteínas producidas por el sistema inmune como respuesta a agentes externos, tales como virus) haciendo que los linfocitos en circulación respondan menos a las señales de alarma infecciosa. Sorprendentemente, durante los primeros minutos de exposición al estresor nuestra inmunidad se ve aumentada (fig.6 fase A). Se detecta mayor nivel de células inmunes en circulación y, en caso de lesión, se registra un mayor número de células de respuesta inflamatoria en los tejidos afectados. Se registran mayores niveles de anticuerpos, por ejemplo en la saliva. Esta respuesta ocurre no sólo ante un estresor infeccioso, sino también ante la presentación de un estresor psicológico. (Sapolsky, 2004).



Figura 6. Respuesta inmune en función de la duración del estresor. El estrés resulta ser un estimulante de la respuesta inmune en un primer momento, aunque si se convierte en un factor crónico termina debilitándola (Sapolsky, 2004).

Si el estresor ya se ha retirado esta segunda fase (fase B) tiene como objetivo volver al sistema inmune a su estado basal. En el caso de estresores mayores de larga duración, la gran exposición a glucocorticoides hace que el sistema entre en inmunosupresión (fase C). De esta manera, el individuo se hace más vulnerable y aumenta su probabilidad de contraer enfermedades infecciosas.

Adicionalmente, el sistema inmune ejerce sus efectos sobre el SNC a través de la acción de las citocinas liberadas en el cerebro por los astrocitos y microglia como respuesta a los estresores.

3.1- Respuesta inmune cerebral, Células de la glía (microglia).

La acumulación de la microglia activada es una característica común en las enfermedades neurodegenerativas e inflamatorias, las microglías pueden tener una función neurotóxica o neuroprotectora, cuyos efectos son mediados principalmente a través de citocinas y que pueden participar de manera sinérgica en la degeneración neuronal pero también favorecen la regeneración al inducir la secreción de factores neurotróficos y factores de crecimiento (Suzumura A y cols.,2006).

Actualmente se acepta que la microglia en el cerebro adulto procede de la diferenciación del mesodermo en el periodo embrionario y en el periodo posnatal migra hacia el tejido cerebral presentándose como células ameboides. Se cree que origina de macrófagos sanguíneos, pericitos y macrófagos ventriculares. (Town y cols., 2005). Ahora bien las células microgliales son las células encargadas en gran parte de la respuesta inmune a nivel cerebral, éstas se encuentran en todo el sistema nervioso central y destacan por sus núcleos pequeños y alargados y por la extraña forma de su cuerpo celular, del citoplasma próximo a los polos del núcleo arrancan prolongaciones alargadas, que a su vez se ramifican y son portadoras en toda su superficie de prolongaciones muy finas y de aspecto espinoso y

acompañan a los capilares sanguíneos formando largas series. Una característica funcional de las células microgliales es su capacidad para el movimiento ameboide y la propiedad de almacenar lípidos, hierro, pigmentos y otras sustancias. (Streit y cols., 1999). Las células microgliales se han denominado células de arrastre o limpieza. La sospecha de que la microglia podría contribuir a alteraciones neurológicas surgió tras el descubrimiento de que liberaba productos que coincidían con los emitidos por macrófagos fuera del sistema nervioso central. Algunas de estas sustancias son peligrosas para las células y si se producen en cantidades excesivas, matan neuronas (Streit y Colton, 1996). La microglia es importante para el desarrollo del sistema nervioso central gracias a que secreta factores de crecimiento necesarios para tal efecto. Otra función muy importante es el rol que juega en la eliminación de los productos de desecho ocasionados por la muerte neuronal y glial espontánea que ocurre durante el desarrollo, para lo cual sintetiza enzimas llamadas proteasas, así como citocinas. Al terminar el desarrollo del sistema nervioso central desaparece la necesidad de degradar grandes números de células, llevando a la microglia a su estado definitivo de reposo y ramificación para evitar los espacios entre las células vecinas, también libera bajos niveles de factores de crecimiento para la maduración de la neurona y para la sobrevivencia de la glía.

La microglia en reposo responde en minutos a disturbios en el microambiente y se prepara para rodear a las neuronas dañadas y otras células. La microglia tiene cinco estadios de activación, los signos de que se encuentra activada es la retracción de sus ramificaciones, los cambios en la morfología de su soma, así como la producción de proteínas y citocinas que no produce en su estado de reposo (Streit, 1996). (Fig 7). La activación de la microglía conlleva en particular a la liberación de diversas citocinas, la interleucina-1 (IL-1) α y β , la IL-2, la IL-6, la IL-8 (Munck y cols., 1984). Esta situación la lleva a que exista excitotoxicidad neuronal con la posterior liberación de agentes tales como radicales libres y concentraciones elevadas de glutamato y óxido nítrico.

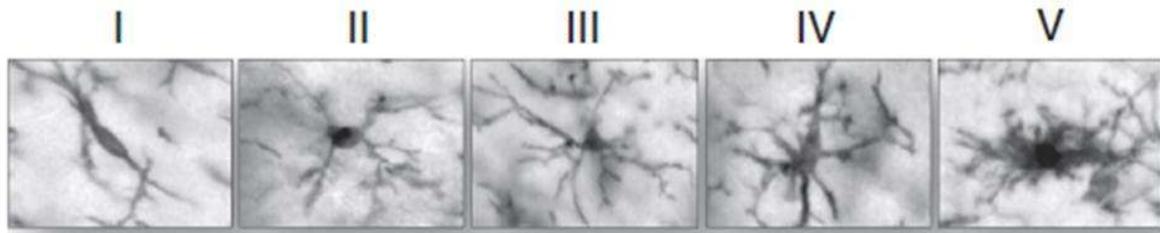


Figura 7. Estadios de activación de la microglia los estadios I,II,III se relacionan con microglia inactiva, los estadios IV y V se relacionan con microglia activada. (Diz-Chávez y cols., 2012).

3.2.- Astrocitos.

Los astrocitos son las células más abundantes en el sistema nervioso central, sobrepasando a las neuronas en una proporción de 10:1. Este tipo de células gliales están implicadas en la homeostasis del sistema nervioso central, regulan la función neuronal mediante la liberación de factores neurotróficos, guían el desarrollo neuronal, expresan receptores para neurotransmisores como: AMPA, GABA, NMDA y glutamato, entre otros, y contribuyen a su metabolismo, regulan el pH extracelular y la concentración de iones de potasio, además participan en la integridad funcional y estructural de la barrera hematoencefálica. (Clarke y cols.,2013). Los astrocitos responden intensamente a las infecciones del sistema nervioso central y a las patologías inflamatorias desmielinizantes inducidas por células inmunológicas autorreactivas, a lo que se conoce como astrocitosis o astrocitos reactivos, que se caracteriza por un incremento en el tamaño y número de células que expresan proteína ácida glial fibrilar, (GFAP), lo cual refleja de manera predominante un cambio fenotípico en los astrocitos e involucra la expresión de nuevas moléculas que no son detectables en la astrogía en reposo. (Mucke,L y cols.,1993).

De igual manera, el estrés crónico puede ocasionar cambios en la morfología, de los astrocitos, se ha observado que se produce una importante atrofia de sus procesos y una disminución en el volumen de su soma (Tynan y cols., 2013). También se sabe que disminuye la densidad celular cuando el estrés se sufre en

etapas tempranas de la vida de una manera inmediata (Roque y cols., 2015). La astrocitosis es una característica común en muchas de las patologías neurodegenerativas y dependiendo de su contexto, puede favorecer la sobrevivencia neuronal o la formación de una cicatriz glial que evita el proceso neurodegenerativo; así, los astrocitos son los iniciadores, reguladores y amplificadores de los mecanismos inmunológicos involucrados en la fisiopatología de diferentes enfermedades humanas (Mucke y cols., 1993), los astrocitos reactivos producen óxido nítrico como un mediador autócrino de apoptosis dependiente de caspasa, lo cual constituye un mecanismo para la autorregulación de su activación. De manera adicional, los astrocitos se consideran como células inmunocompetentes debido a su capacidad de expresar el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II, así como moléculas co-estimuladoras (B7 y CD40) que son críticas para la presentación de antígenos y la activación de las células T, promueven la respuesta inmunológica de tipo Th2 y producen una amplia cantidad de citocinas, lo cual favorece su papel como células involucradas en la respuesta inmunológica en el cerebro participando en la desmielinización (Aschner 1998).

4.- Citocinas proinflamatorias.

Las citocinas son moléculas pleiotrópicas que coordinan la respuesta innata y adaptativa, pueden ser proteínas secretadas o glicoproteínas, aunque también se presentan como proteínas integrales transmembranales sobre la superficie celular. Son producidas principalmente por linfocitos, macrófagos y leucocitos. Las citocinas son secretadas en respuesta a un estímulo, y actúan sobre las células diana que expresan en su membrana receptores específicos para una citocina dada. La unión de una citocina a su receptor de membrana transmite una señal hacia el interior celular que conduce a cambios en la activación y expresión de genes. Además, en el suero se han detectado receptores solubles para las distintas citocinas cuya acción es contribuir a la regulación de la actividad de las mismas (Abbas y cols., 1997).

Las funciones de las citocinas se traslapan, siendo pocas las que tienen una única función. Las citocinas suelen actuar de forma local, ya sea autócrina o parácrina, pero alguna, como la IL-6, tiene funciones endocrinas. La producción de citocinas, incluyendo las proinflamatorias, es una respuesta fisiológica a la lesión tisular. Su principal función es la coordinación de la eliminación de microorganismos invasores y la eliminación de tejidos lesionados. De esta forma se evita la estimulación excesiva del sistema inmune, que podría inducir reacciones de hipersensibilidad. Las citocinas que inician la respuesta inflamatoria son la IL-1, la IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). Estas moléculas suelen actuar en compañía de otras citocinas como las IL-8, 10, 11, 12, 18 y el Interferón gamma (IFN γ) (Corts y cols., 1997).

4.1.- Interleucina 1.

Es sintetizada por leucocitos, células endoteliales e incluso por células del estroma del timo y médula ósea Sin embargo, los principales productores de IL-1 en la inflamación son los macrófagos. La IL-1 β se une a dos tipos diferentes de receptores, el IL1RI (que se une mejor con IL-1 que con IL-1 β) y el IL1RII (mejor con IL-1 β) (Dinarello CA, 1993). El receptor I de IL-1 se encuentra en linfocitos T, fibroblastos, células endoteliales y hepatocitos. Por su parte, el receptor II se encuentra en linfocitos B, neutrófilos y células de la médula ósea. Sin embargo, es probable que algunas células expresen ambos tipos de receptores. El antagonista natural de la IL-1 es el antagonista del receptor de IL-1 (IL1Ra) (Dinarello 1991), que compite con la IL-1 en la unión con los receptores de la superficie celular sin que desencadene las respuestas celulares típicas de la IL-1, no induce ningún cambio bioquímico ni endocrinológico cuando se inyecta por vía intravenosa en sujetos sanos. Los efectos de IL-1 son variados: Tiene un papel principal en la cascada inflamatoria.(Gauldie y cols., 1987). La IL-1 también tiene un papel central en el inicio de las reacciones inflamatorias,

ya que recluta respuestas inmunes específicas al regular al alza las células inmunitarias. Además, actúa directamente en el hipotálamo (es el principal inductor de fiebre y el vínculo más importante entre el sistema inmunitario y el sistema neuroendocrino).

4.2.- Interleucina 6

La IL-6 se produce en multitud de tejidos diferentes. Los principales productores son los monocitos estimulados, fibroblastos y células endoteliales (Sironi y cols., 1989). Los principales estímulos fisiológicos para la producción de la IL-6 en los monocitos son la IL-1 y las endotoxinas bacterianas. La IL-6 actúa enlazándose con un receptor específico de alta afinidad (IL6R), que está ampliamente distribuido en las células linfoides y no linfoides. El IL6R está formado por dos glicoproteínas de membrana: gp80, que se liga a IL-6 con baja afinidad, y gp130, que se liga al complejo IL-6-gp80 y traduce la señal a través de la membrana plasmática (Hibi y cols., 1990). Los monocitos, hepatocitos, linfocitos B activados y linfocitos T CD4 y CD8 expresan gp80 de IL6R. La IL-6 induce la diferenciación terminal de los linfocitos B, el crecimiento y la diferenciación citotóxica de linfocitos T, y estimula la producción normal de células sanguíneas. La IL-6 es otro regulador importante de la síntesis hepática de proteínas de fase aguda (Gauldie y cols., 1989).

4.3.- Factor de necrosis Tumoral

El factor de necrosis tumoral (TNF) se sintetiza en células de la estirpe monocito/macrofágica y en los linfocitos. Su producción se induce mediante endotoxinas bacterianas, antígenos de hongos o virus, y también por otras citocinas como IL-1. Las acciones del TNF están favorecidas por IFN γ a través del aumento de la expresión del receptor. La rotura proteolítica de los receptores de TNF produce formas solubles que se liberan de las superficies celulares, regulando a la baja los receptores de TNF. El TNF se descubrió a raíz de sus acciones en la necrosis hemorrágica y la regresión de algunos tumores. Además, el

TNF es un potente inductor de los efectos sistémicos de la inflamación como fiebre, hipotensión, taquicardia y respuesta de hormonas relacionadas con el estrés. (Tracey KJ y cols., 1987).

4.4.- Citocinas y función.

Las citocinas juegan un papel fundamental en la respuesta inmune innata mediante mecanismos de acción directa frente al agente invasor el interferón (IFN) sobre la replicación viral o mediante la movilización de mecanismos inmunorreguladores (iniciadores de la inflamación, elevando la temperatura corporal y activando las células NK y los macrófagos). Las citocinas que actúan en esta fase están producidas fundamentalmente por los macrófagos, las células NK, y por otras células no inmunes como fibroblastos y células endoteliales. Las principales citocinas que intervienen en la respuesta innata son: IL-1, IL- 6, IL-12, IL-16, Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α) e interferones (IFN α e IFN- γ). (García y cols.,1999). (Tabla 1 y 2).

Tabla 1. Células productoras y principales funciones biológicas de las citocinas inflamatorias. (García X, y cols.,1999).

Citocinas	Células productoras	Principales funciones biológicas.
IL-1	Monocitos, macrófagos, neutrófilos, linfocitos T y B, fibroblastos y células endoteliales.	Estimulan la producción de linfocitos T y B. Aumentan la expresión del receptor de IL-2. Activa las células NK. Activa células endoteliales. Induce respuestas de fase aguda. Actúa como pirógeno endógeno.
IL-4	Linfocitos Th2, eosinófilos y basófilos.	Modulan la función de los macrófagos. Diferenciación de las células T. Inducción en la producción de IgE. Regulación en la

“ EFECTO DEL ESTRÉS POSNATAL EN RATAS NEONATAS CON UN RETO INMUNE SOBRE LA VARIACIÓN DE CITOCINAS CIRCULANTES Y LA ACTIVACIÓN DE LA MICROGLIA”

		adhesión endotelial.
IL-6	Monocitos, neutrófilos, eosinófilos, linfocitos T y B, células endoteliales	Estimula la maduración de megacariocitos y producción de plaquetas. Actúa como pirógeno endógeno. Estimula la producción hepática de proteínas de fase aguda.
TNF α	Macrófagos y monocitos, linfocitos T y B, neutrófilos, células endoteliales.	Modula la expresión génica de varios factores de crecimiento, citocinas, factores de transcripción y receptores de superficie celular. Modula las defensas del huésped. Modula el crecimiento tumoral. Actúa como un pirógeno endógeno.
INF γ	Células T CD8+ y CD4+	Tiene propiedades antivirales. Tiene propiedades antiinflamatorias en muchas líneas celulares. Estimulador potente de células NK y citocinas. Activa y regula la actividad funcional de monocitos y macrófagos. Regulación en la producción de varios componentes del complemento y algunas proteínas de fase aguda.

Tabla 2. Funciones de las citocinas en el SNC.

Citocinas	Funciones en el SNC.
TNF α	<p>Activa en astrocitos la expresión de factores neurotróficos protectores para neuronas, pero en altas concentraciones daña oligodendrocitos con lo que contribuye a la desmielinización (Gadient y cols.,1990).</p> <p>Diferenciación celular, neurogénesis y muerte celular programada durante el desarrollo del SNC (Babri y cols.,2014).</p>
IL- 1 β	<p>Aunado al Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) actúa protegiendo las células neurales, en altas concentraciones resulta neurotóxica (Strijbos y cols.,1995).</p> <p>Proliferación glial durante el desarrollo (Pousset 1994).</p> <p>Varios de sus efectos centrales son mediados por IL-6 (Pousset 1994).</p>
IL- 6	<p>Puede ocasionar astrocitosis reactiva y daño neuronal (Campbell y cols., 1993).</p> <p>Altas concentraciones se relacionan con déficit de aprendizaje (Heyser y cols.,1997)</p> <p>Sus receptores han sido detectados en varias regiones del cerebro (corteza, hipocampo e hipotálamo) (Pousset 1994).</p> <p>Proliferación de células cerebrales durante los estadios embrionarios (Pousset 1994).</p>

5.- Estrés en etapas tempranas de la vida.

En los mamíferos, incluyendo los seres humanos, las experiencias tempranas son de gran importancia para el desarrollo de circuitos cerebrales y patrones de comportamiento. Dentro de las experiencias más importantes se encuentra la interacción madre-hijo; esta relación se presenta en la forma de vínculo afectivo (Daniels y cols., 2004), el cual es propiciado por la actividad de sistemas neurodinámicos presentes en el hijo y en la madre y es regulado a través de comportamientos maternos como las posturas de amamantamiento y señales provenientes de la madre, como olores, vocalizaciones y calor. Esta compleja interacción entre madre e hijo podría tener por objeto brindar seguridad a los recién nacidos y modular la actividad de sus sistemas neuroendocrinos y fisiológicos, que son básicos para el sostenimiento de la vida y que a largo plazo les permitirán desarrollar mecanismos de afrontamiento para sortear las futuras demandas ambientales (Macrì y cols., 2008).

Durante el desarrollo, uno o más eventos estresantes pueden tener efectos importantes sobre las estructuras cerebrales en formación, y éstos pueden perdurar hasta la etapa adulta. Hay mucha evidencia de que el estrés en etapas tempranas de la vida eleva los riesgos de morbimortalidad de diferentes enfermedades (Miller y cols., 2011). También está implicado en procesos inflamatorios, además la inflamación es un factor de riesgo para desarrollar enfermedad cardiovascular, diabetes tipo II y artritis reumatoide (Libby, 2007). Significativamente el estrés en etapas tempranas representa un riesgo mayor para el desarrollo de depresión mayor, esquizofrenia, autismo (Kendler y cols., 2002). Se ha documentado que las experiencias adversas durante las etapas tempranas de la vida confieren cierta vulnerabilidad al individuo a estresores posteriores y lo predisponen a sufrir alguna psicopatología en la edad adulta (Heim y Nemeroff, 2001).

De igual manera, el estrés que se sufre en etapas tempranas de la vida por restricción aunado a un reto en la vida adulta con LPS las células microgliales parecen mostrar una “sensibilización”, ya que reaccionan de una manera

exacerbada frente al segundo estímulo con LPS, lo que sugiere que el estrés puede ser un factor importante en los procesos neurodegenerativos. (De pablos y cols., 2014).

Se ha documentado que animales estresados prenatalmente muestran un estado proinflamatorio a nivel del hipocampo, así como una respuesta inflamatoria exagerada al exponerse a un reto inmune, en comparación con animales que no fueron sometidos a estrés, lo anterior puede conllevar a desordenes afectivos, disfunción cognitiva y enfermedades neurodegenerativas. (Diz-Chávez y cols., 2012).

El estrés por SM se asocia a un incremento en el número de microglia activada, una disminución de astrocitos y un aumento en la expresión de citocinas proinflamatorias en el hipocampo de crías de ratas al PN15 (Roque y cols., 2015).

6.- Reto inmune en etapas tempranas de la vida.

La endotoxina bacteriana o LPS, es el mayor componente de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, entre otras, es utilizado como un simulador de infección en muchos estudios por que inicia una rápida respuesta inmune; además se le ha relacionado con un gran número de cambios en la conducta cognitiva y de la memoria en la etapa adulta. (Wang y cols., 2006.)

Desde que se confirmó el papel del LPS como causante de violentas reacciones patofisiológicas, en las que se evidenció un incremento en la respuesta inflamatoria, un estado séptico y otro tipo de respuestas celulares para contrarrestar la presencia de este inmunogénico, se han realizado muchos estudios para intentar establecer los mecanismos de transducción celular generados en la respuesta del organismo. Esta endotoxina consiste en un fosfoglicolípido anclado a la membrana bacteriana (lípid A) unido covalentemente a un heteropolisacárido hidrofílico, región que le confiere la actividad biológica. El heteropolisacárido comprende dos regiones: la cadena O-específica también

llamada antígeno O, formada por unidades repetitivas de oligosacárido y el núcleo (Centro estructural). Éste a su vez se subdivide en núcleo externo formado por hexosas, mediante el cual se une al antígeno O; y el núcleo interno formado por heptosas. El lípido A se une a esta porción mediante un residuo (ácido 2-ceto-3-deoxioctanoico). (Maeshima y Fernandez 2013). (Fig. 8).

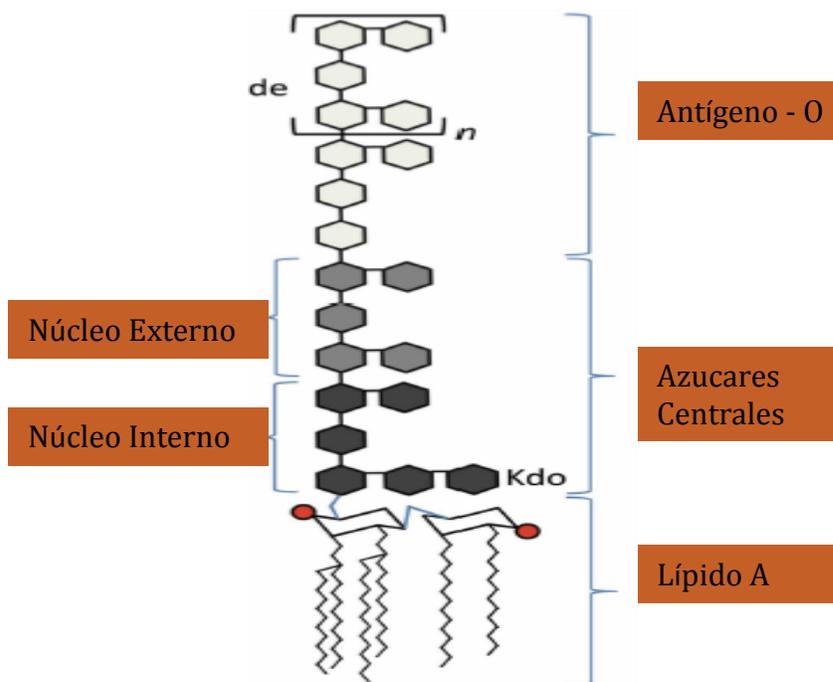


Figura 8: El LPS y sus tres regiones: la parte inferior, lípido A (con estructura de silla se indican los grupos di-glucosamina, los círculos rojos indican grupos fosfato, las líneas onduladas indican cadenas de acilo), azúcares centrales y el antígeno O, que se compone de unidades repetitivas de oligosacáridos (indicado entre paréntesis, con una "n"), (Maeshima y Fernandez, 2013).

Los experimentos en los animales y los seres humanos mostraron que la administración de citocinas y lipopolisacárido (LPS) de manera periférica o intracerebroventricular, provoca problemas cognitivos y alteraciones de comportamiento (Cai y cols., 2000). Por otra parte, pacientes con demencia, enfermedades inflamatorias como Alzheimer, depresión, Parkinson o

enfermedades autoinmunes exhiben concentraciones elevadas de IL 1 β . Datos en la literatura nos indican que la infección simulada con la inyección de LPS en el día 4 (PN4) a crías de ratas, produce un incremento en la activación microglial así como también en los niveles circulantes de diversas citocinas entre las que encontramos principalmente IL-6, IL 1 β y TNF α . (Bilbo y cols., 2005). De manera interesante cuando existen concentraciones elevadas de IL 1 β en la circulación en etapas tempranas de la vida, que es cuando el cerebro se encuentra en pleno desarrollo, hay coincidencia en la vida adulta de activación microglial en su clásica forma ameboidea (Giulian y cols., 1988). De igual manera una inyección con LPS (1mg/kg) durante 4 días consecutivos incrementa la activación microglial en ratones adultos. (Chen Z y cols., 2012).

El LPS puede evocar una respuesta de activación del eje HPA. Un insulto sistémico ocasiona una activación de monocitos circulantes, los cuales a su vez pueden secretar una mayor cantidad de citocinas proinflamatorias a la circulación, las que pueden activar a las células perivasculares para que secreten PGE2, ésta activa las neuronas del núcleo paraventricular para que secreten CRH, viaje por el sistema porta-hipofisario estimulando la adenohipófisis, se secrete ACTH y actúe sobre la glándula suprarrenal para que exista una mayor secreción de glucocorticoides a la circulación. (Figura 9) (Turrin 2010).

LAS INFECCIONES ACTIVAN EL EJE HPA

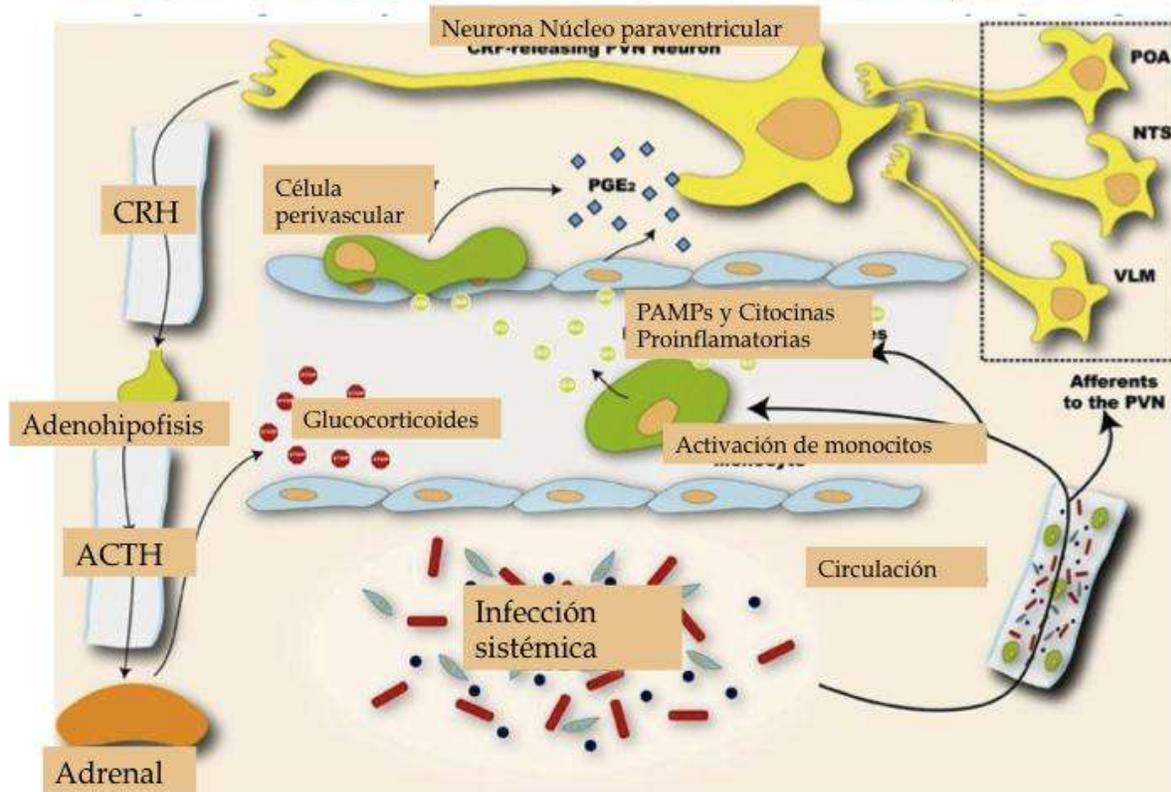


Figura 9. El LPS (insulto sistémico) puede activar el eje HPA. Tomado de (Turrin 2010).

II.- Justificación.

El estrés en edades tempranas de la vida está relacionado con el incremento de enfermedades mentales, tales como la depresión mayor, ansiedad, esquizofrenia etc. (Danese y cols., 2007).

Además, el estrés por SM se asocia a un incremento en el número de microglia activada, una disminución de astrocitos y un aumento en la expresión de citocinas proinflamatorias en el hipocampo de crías de ratas al día postnatal 15 (PN15) (Roque y cols., 2015).

Por otra parte, una infección simulada con la inyección de LPS en el día 4 (PN4) a crías de ratas produce un incremento en la activación microglial así como también en los niveles circulantes de diversas citocinas entre las que encontramos principalmente IL-6, IL 1 β y TNF α (Bilbo y cols.,2005).

En etapas tempranas de la vida, la exposición a un reto inmune promueve la activación microglial, programando de forma permanente su respuesta. (Billiards y cols., 2006).

Si bien cada reto (SM, LPS) por separado es capaz de causar alteraciones morfológicas y funcionales en el hipocampo, se desconoce el impacto de ambos retos simultáneos a largo plazo. No se han descrito los efectos del estrés aunado a un reto inmunológico en etapas tempranas de la vida en relación a posibles mecanismos inflamatorios a nivel cerebral y sistémico.

III.- Hipótesis.

El estrés en etapas tempranas de la vida induce la activación de las células microgliales e incrementa la secreción de citocinas proinflamatorias en respuesta a un reto inmune en el neonato.

Objetivos.

IV.- Objetivo general.

Analizar si el estrés en etapas tempranas de la vida induce de forma inmediata la activación de las células microgliales cerebrales e incrementa la secreción de citocinas proinflamatorias circulantes en respuesta a un reto inmune con LPS.

Objetivos particulares.

- 1.- Corroborar el efecto de la administración de LPS evaluando la conducta de postración mediante el análisis de la locomoción y de la variación del peso corporal.
- 2.- Evaluar el número de células microgliales y densidad celular en las regiones del hilus y CA3 del hipocampo.
- 3.- Clasificar a las células microgliales con base en su morfología en células activadas y no activadas.
- 4.- Evaluar el número de astrocitos en las regiones del hilus y CA3 del hipocampo.
- 5.- Cuantificar citocinas proinflamatorias en plasma (IL -1 β , TNF α , IL-6) y en homogenados de hipocampo (IL -1 β) el día 14, 90 minutos posterior al reto inmune.

V.- MATERIAL Y MÉTODOS

Los procedimientos se realizaron tomando las medidas adecuadas para reducir al mínimo el dolor o sufrimiento de los animales. Las manipulaciones experimentales y procedimientos de estrés se apegaron estrictamente a las convenciones internacionales para el manejo de animales de laboratorio, tales como las publicadas por los Institutos de Salud Norteamericanos (NIH). Asimismo nos apegamos a las normas y reglamentos del IMSS, así como a los de la Ley General de Salud de México y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

1.- Animales

Los animales que se emplearon en el presente estudio fueron crías de ratas macho durante los primeros 15 días posnatales (PN 15), de la cepa Sprague Dawley, mantenidas bajo ciclo de luz - oscuridad (12:12), temperatura (22- 26 °C), humedad 50 – 60%, agua y alimento *ad libitum*. Cada camada se ajustó a 8 crías, constituidas de 4 machos y 4 hembras. Se utilizaron sólo las crías de ratas machos. El día del nacimiento se tomó en cuenta como el día 0, contándose a partir de éste los días posnatales.

2.- Modelo de separación maternal (SM).

La relación materna y sus efectos sobre el desarrollo ha sido estudiada extensamente mediante el uso de protocolos animales de manipulación postnatal. En dichos procedimientos se altera el tiempo de permanencia de las crías con sus madres y se evalúa cómo esta separación afecta los desempeños en pruebas de comportamiento y funcionamiento neuroendocrino.

En los roedores un modelo que ha resultado muy efectivo es el de la SM, este modelo ocasiona un estrés lo suficientemente fuerte para alterar la maduración estructural del SNC y la conducta de los organismos en etapas posteriores (Esquivel y cols., 2009). Éste consiste en separar a las crías de su madre por 3 horas al día, durante los primeros 14 días postnatales.

En nuestro estudio, un grupo de crías de rata fue expuesto al modelo de separación maternal (SM); el cual consistió en separar a las crías de forma individual del nido materno durante 3 horas al día, desde el PN 1 hasta el PN 14 en un lugar aislado de la colonia bajo condiciones de temperatura controladas (30-35) °C.

3.- Administración de lipopolisacárido.

Se administró lipopolisacárido serotipo O55:B5, por vía intraperitoneal, a una dosis única de 1 mg/kg/peso corporal.

4.- Grupos de animales.

Las camadas se dividieron en los siguientes grupos de acuerdo a las condiciones (control, separación materna), y sus respectivos tratamientos (LPS, vehículo).

- 1.- Grupo Control – Vehículo (n = 8 para inmunocitoquímica, n = 8 para citocinas circulantes)
- 2.- Grupo Control – LPS
- 3.- Grupo SM – Vehículo
- 4.- Grupo SM –LPS (fig 10).

“ EFECTO DEL ESTRÉS POSNATAL EN RATAS NEONATAS CON UN RETO INMUNE SOBRE LA VARIACIÓN DE CITOCINAS CIRCULANTES Y LA ACTIVACIÓN DE LA MICROGLIA”

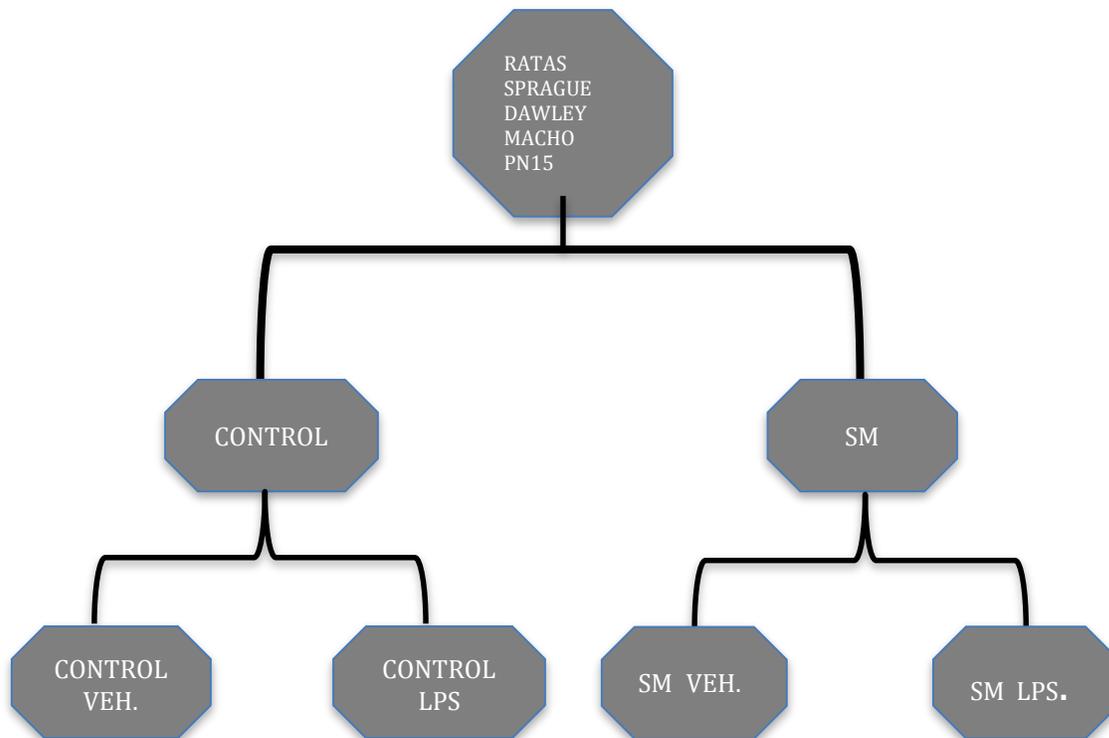


Figura 10.- Grupos de animales. Se utilizaron ratas Sprague Dawley macho PN15 que fueron divididas en , un grupo control y uno separación materna (SM), a su vez subdivididos en Control-Veh, Control-LPS, SM-Veh, SM-LPS.

5.- Estrategia experimental.

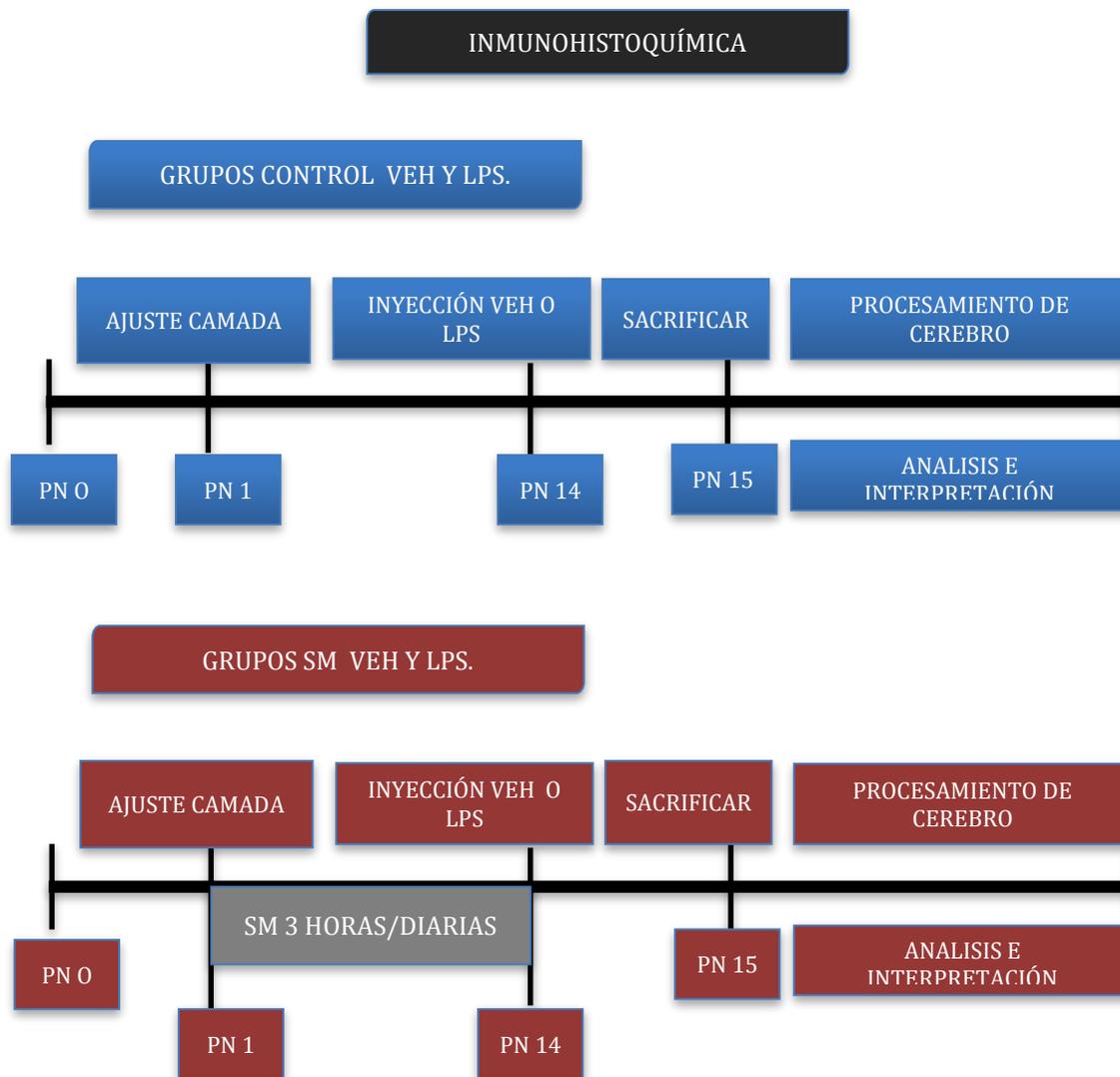


Figura 11.- Esquema experimental para la inmunohistoquímica. El (PN 0) fue considerado el día del nacimiento, al (PN 1) se ajustaron las camadas a 8 crías: (4 hembras y 4 machos), posteriormente se inició la SM periódica 3 horas diarias por 14 días y al grupo control no se le manipuló, posteriormente llegado el PN14 se realizó la inyección con LPS y finalmente el día PN15 se sacrificaron, se extrajo el cerebro y se procesó.

6.- Estrategia experimental para ELISA.

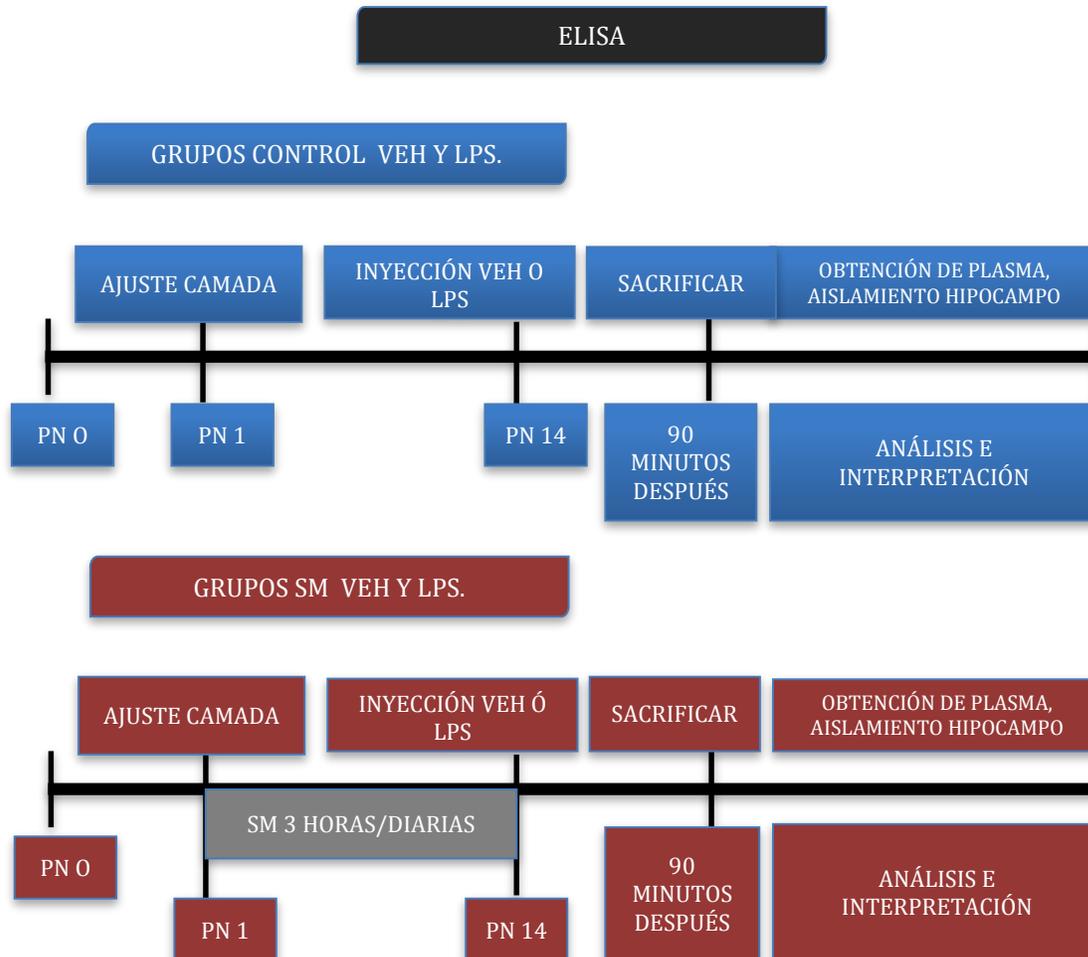


Figura 12.- Esquema experimental para la determinación de citocinas por el método de ELISA. El (PN 0) fue considerado el día del nacimiento, al (PN 1) se ajustaron las camadas a 8 crías: (4 hembras y 4 machos), posteriormente se inició la SM periódica 3 horas diarias por 14 días y el grupo control no se les manipuló, posteriormente llegado el (PN 14) se realizó la inyección con LPS y finalmente a los 90 minutos posteriores se extrajo el suero y se congeló hasta su utilización, para la posterior medición de citocinas mediante ELISA tipo sándwich.

7.- Prueba de campo abierto.

60 minutos posteriores a la administración de LPS o solución vehículo, se colocaron las crías, en una caja cuadrada, de 30 x 30 cm aproximadamente; esta caja contiene un piso cuadrículado simétricamente, que la divide en un total de 9 cuadrantes.

Se evaluaron factores tales como el número de cruces entre los diversos cuadrantes, el cual se tomó como índice de locomoción, así como el tiempo que pasaron en los cuadrantes principales (centro, esquina, lateral). Para ello, se colocó a cada cría en un cuadrante lateral por un lapso de 10 minutos individualmente; entre una y otra cría se realizó limpieza de la caja para evitar olores de la cría previa.

8.- Evaluación de cambios en el peso corporal.

Antes de administrar el LPS o solución vehículo el día PN 14, se registró el peso corporal de cada animal, y se comparó con el peso obtenido a las 24 horas posteriores al día PN 15.

9.- Recolección de tejido sanguíneo para la determinación de secreción de citocinas y corticosterona plasmática.

Llegado el PN 14 se instauró el tratamiento ya sea con LPS, (1mg/kg peso corporal disuelto en 100 μ L), o solución vehículo 100 μ L (solución salina al 0.9%), a los 90 minutos posteriores se anestesiaron los animales con, una dosis letal, de pentobarbital sódico (0.18g/ kg peso corporal). Se realizó una incisión a nivel abdominal con abordaje torácico dejando al descubierto el corazón, el cual se encontró latiendo y se tomó la muestra sanguínea cardíaca con aguja hipodérmica estéril aproximadamente 600 μ L, y se les colocó Inhibidor de proteasas

(aprotinina) 5 μ L, y EDTA (solución quelante de iones de calcio al 10%). Las muestras se centrifugaron, y se refrigeraron a 4 °C en alícuotas hasta su utilización, lo anterior para la cuantificación de citocinas proinflamatorias circulantes, así como de corticosterona plasmática. Para la determinación de la expresión de IL 1 β en el hipocampo, los animales se decapitaron inmediatamente después de la extracción de sangre, se extrajo el cerebro y se disecó el hipocampo, se colocó en tubos de eppendorf y se congeló a -20 °C hasta su utilización.

10.- Homogenados para medición de IL-1 β .

Se descongelaron las muestras, posteriormente se realizaron homogenados de los hipocampos aislados con un sonicador. Se realizó la determinación de proteínas de los homogenados mediante el método de Bradford. Finalmente, se utilizaron 10 μ g/ μ L de proteína total de cada muestra para la determinación de IL-1 β utilizando kits comerciales de ELISA (R&D systems).

11.- Perfusión cardiaca

En el análisis morfológico celular se utilizó una “n” de 8 individuos por grupo. Al día PN 15 las camadas se sacrificaron con una dosis letal, de pentobarbital sódico (0.18g/ kg peso corporal). Posteriormente fueron perfundidos por vía intracardiaca con solución salina al 0.9 %, y paraformaldehído (PFA) al 4% en PB (buffer de fosfatos 0.1M). Se extrajeron los cerebros y fueron fijados durante 24 horas con PFA, posteriormente se colocaron en soluciones de sacarosa al 20 % y 24 horas después en sacarosa al 30% hasta su posterior procesamiento.

12.- Inmunohistoquímica.

Los cerebros se congelaron en metil butano a -20 °C y fueron posteriormente procesados para obtener cortes coronales seriados de 40 μ m de grosor, con una

distancia de 240 μm cada uno; los cortes se realizaron en un crióstato (Triangle biomedical sciences, TBS) a $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los cortes fueron inmunoteñidos con anticuerpos específicos para identificar la microglia (anti-iba1, Millipore), y para identificar astrocitos (anti-GFAP, Millipore), los cortes para identificar microglia fueron tratados con una solución de peróxido de hidrógeno en metanol seguido de una solución de peróxido de hidrógeno al 10%, en PB con tritón X-100 (PBT 0.1M, tritón X-100 5%) para bloquear las peroxidasas endógenas. Se realizó un lavado con PB, se incubaron en una solución bloqueadora (suero de caballo 5%, PBT 0.1M) por un lapso de 30 minutos; se incubaron por 48 horas en el anticuerpo primario (Mouse anti-iba1/iaf1 1:3000 Millipore). Se realizaron lavados e incubaron en el anticuerpo secundario acoplado a biotina (anti-mouse IgG 1:750, Vector laboratories) por un lapso de 2 horas más, posteriormente se sometió a 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 fueron montados en laminillas gelatinizadas (grenetina 1%) dejándose secar a temperatura ambiente. Finalmente se les colocó un medio de montaje (cytoseal 60), se cubrió con un cubreobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente. Para identificar a los astrocitos los cortes fueron pre-tratados con una solución de peróxido de hidrógeno al 10% en PBT para bloquear las peroxidasas endógenas. Posteriormente se lavaron en PB y se incubaron en una solución bloqueadora por 30 minutos. A continuación fueron incubados en el anticuerpo primario (Rabbit anti-GFAP 1:3000, Millipore), por 48 horas. Se lavó el tejido con PB y se incubó con un anticuerpo secundario acoplado a biotina (anti-rabbit IgG 1:750, Sigma) por 2 horas. Después se incubó en el complejo avidina – biotina y se revelaron con el kit DAB, se dejaron secar a temperatura ambiente, se les agregó el medio de montaje y finalmente se les colocó el cubreobjetos.

13.- Análisis morfológico de la microglia. Se realizó un muestreo sistemático aleatorio a lo largo del plano rostro- caudal del cerebro. Para llevarlo a cabo, se seleccionó uno de cada 6 cortes de 40 μm de grosor con 240 μm de distancia

entre cada uno. Para el conteo se consideraron las células positivas para IBA I en el Hilus y CA3 desde la porción dorsal (-2.80mm hasta -4.16mm) de Bregma se analizaron 4 campos por corte de manera bilateral, con un total de 8 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 (μm^2) de cada campo analizado se realizó por medio del programa analizador de imágenes Axiovisión Rel 4.0 (Carl Zeiss). El área se delimitó a 15,000 (μm^2) y se contaron las células dentro de la misma. Se cuantificó la microglia total en el Hilus y CA3 del hipocampo de acuerdo a la descripción de Diz-Chaves y cols., (2012), ya sea en microglia en reposo (soma pequeño y prolongaciones largas y delgadas) y activada (Soma de gran tamaño, ameboides y con prolongaciones cortas y gruesas). Posteriormente se realizó el registro en células totales por (mm^3).

14.- Análisis morfológico de los astrocitos. Se realizó un muestreo sistemático aleatorizado a lo largo del plano rostro-caudal, se seleccionaron al azar uno de cada 6 cortes de 40 μm de grosor con 240 μm de distancia entre cada uno. Para el conteo se consideraron las células positivas para GFAP en el Hilus y CA3 desde la porción dorsal (-2.80mm hasta -4.16mm) de Bregma. Se analizaron 4 campos por corte de manera bilateral, con un total de 8 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 (μm^2) de cada campo analizado se realizó por medio del programa analizador de imágenes Axiovisión Rel 4.0 (Carl Zeiss). El marco de referencia del área se delimitó a 15,000 μm^2 y se contaron las células dentro de la misma. Se cuantificaron los astrocitos totales en el Hilus y CA3 del hipocampo y se registró la densidad celular en mm^3 .

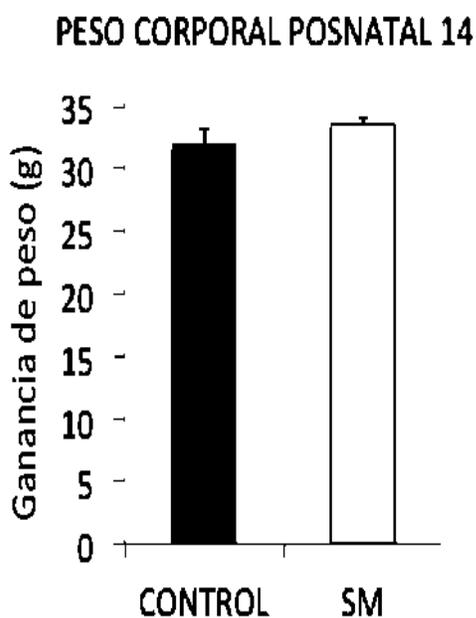
15.- Análisis estadístico.

Se realizaron comparaciones entre la diferencia y ganancia de pesos, prueba de campo abierto, número y densidad celular tanto de microglía como de astrocitos, concentraciones de citocinas proinflamatorias plasmáticas $TNF\alpha$, IL-6, IL-1 β e IL-1 β hipocampal, las cuales se realizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, y pruebas post – hoc de Newman- Keuls, los resultados se consideraron significativos con una $p < 0.05$ * y una $p < 0.01$ **.

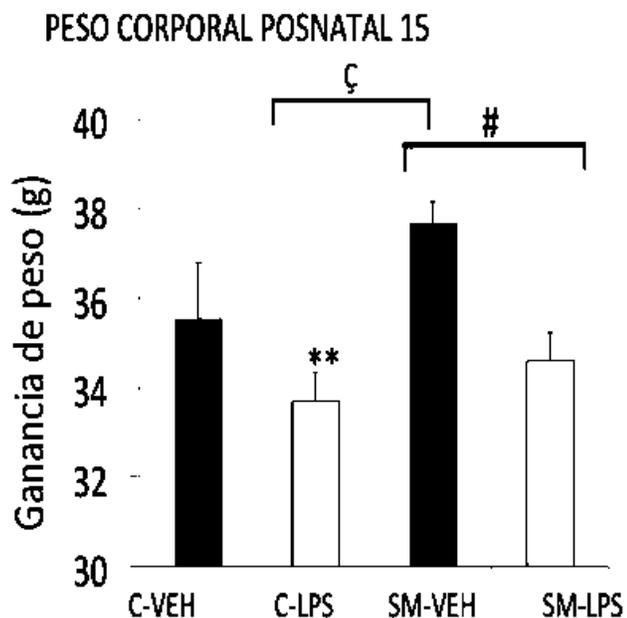
VI.- Resultados.

Al día PN14 se registró el peso corporal de las ratas de ambos grupos, control y separación maternal (SM), donde no se observaron cambios significativos. Al PN15, posterior a la administración de vehículo o LPS, se puede observar que la SM aumenta el peso corporal de las crías, comparado con el grupo C-Veh. También se observó que la administración de LPS disminuye el peso corporal en los grupos C-LPS y SM-LPS. Sin embargo, al comparar la ganancia neta de peso del PN14 al PN15, se observó que ésta es mucho menor en el grupo C-LPS que en el grupo SM-LPS (ver figura 13).

a)



b)



c)

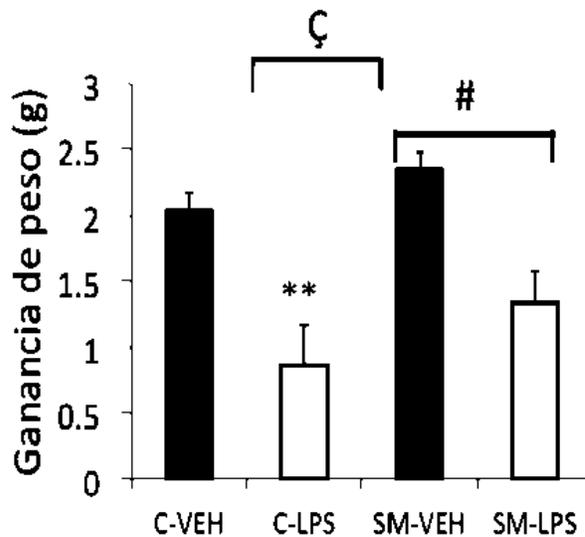


Figura 13.- Cambios en el peso corporal. La SM no logra disminuir el peso corporal de una manera significativa (a), El LPS logra una disminución en el peso corporal post-tratamiento, a las 24 horas y una disminución en la ganancia de peso corporal, (b) y (c). $p < 0.05$ * $p < 0.01$ ** vs vehículo, SM-VEH vs SM-LPS $p < 0.05$ #. C-LPS vs SM-VEH $p < 0.05$ Ç. $n = 8$.

En la prueba de campo abierto los resultados obtenidos revelaron que la SM no influye en la actividad locomotora de las ratas, ya que no hubo diferencias en el número de cruces ni tampoco en el tiempo que permanecieron en las esquinas entre los grupos C-Veh y SM-Veh. En cambio, el LPS por si solo disminuye la actividad locomotora comparado con el grupo C-Veh; de igual manera esta disminución se presenta en los animales SM – LPS. $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ ** Vs C-VEH. (Figura 14).

“ EFECTO DEL ESTRÉS POSNATAL EN RATAS NEONATAS CON UN RETO INMUNE SOBRE LA VARIACIÓN DE CITOCINAS CIRCULANTES Y LA ACTIVACIÓN DE LA MICROGLIA”

Tabla 3. Prueba de campo abierto. Muestra el tiempo que pasaron los animales en los cuadrantes, esquina, lateral, centro, 60 minutos posteriores a la administración de Vehículo ó LPS. $p < 0.05$ *,vs vehículo. (n=8).

GRUPOS	C-VEH.	C-LPS	SM-VEH	SM-LPS
Tiempo esquina (S).	409.08±32	492±18.3*	461.46±14.7	492±7.5*
Tiempo lateral (S)	181.9±29.5	106±17.8	133.7± 14.2	104.3±7.6
Tiempo centro (S)	8.94± 3.2	1.11±0.66	4.76±1.3	3±1.16

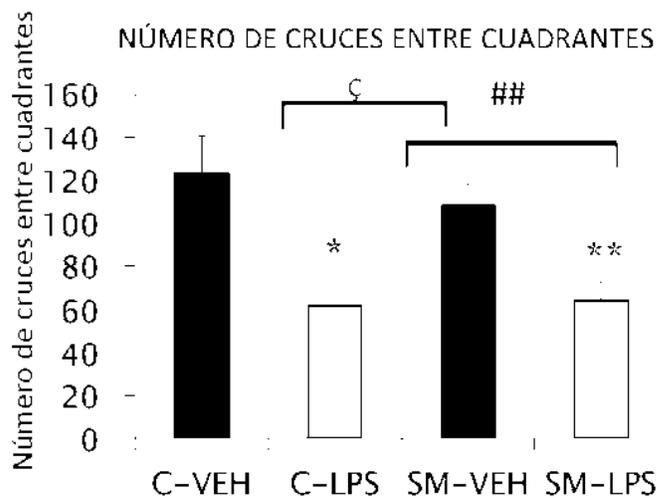


Figura 14.- Número de cruces entre cuadrantes. El LPS disminuye el número de cruces entre cuadrantes lo que nos sigue una disminución en la locomoción de la rata. $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **vs vehículo. SM-VEH vs SM-LPS $p < 0.01$ ##, C-LPS vs SM-VEH $p < 0.05$ Ç (n=8).

Concentración de corticosterona.

No se observaron diferencias significativas en la concentración de corticosterona en las ratas C-VEH y SM-VEH. Por otra parte, las ratas a las que se les administró LPS tuvieron un aumento exponencial en la secreción de corticosterona plasmática sin importar su condición (C-LPS o SM-LPS) a los 90 min posteriores a la administración de LPS. $p < 0.01^{**}$ vs vehículo y $p < 0.01^{##}$ SM-Veh vs SM LPS (fig. 15).

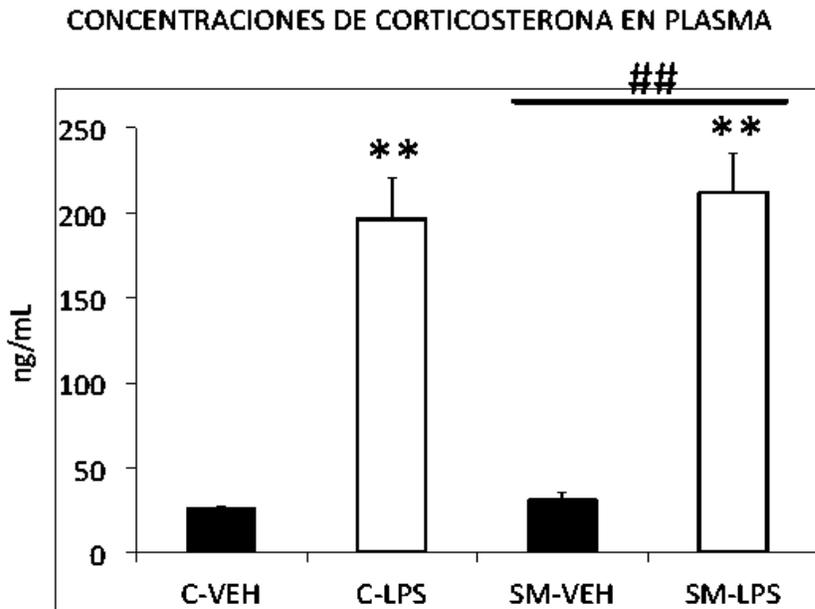


Figura 15.- Concentraciones de corticosterona plasmática. Se observa una secreción importante de corticosterona plasmática en ng/mL, en los animales que se les administra LPS a los 90 minutos posteriores. $p < 0.01^{**}$ vs vehículo y $p < 0.01^{##}$ SM-VEH vs SM-LPS. (n = 8).

Concentraciones de citocinas circulantes.

Se determinaron las concentraciones de tres de las citocinas de tipo proinflamatorio a nivel plasmático $TNF\alpha$, $IL\ 1\beta$, $IL-6$ y estos fueron los resultados. El LPS incrementa la secreción de $IL\ 1\beta$ plasmática de una manera importante en los grupos C-LPS y SM-LPS, comparada con el grupo C-Veh ($p<0.01$), mientras que la SM por si sola no incrementa la concentración basal de $IL\ 1\beta$. Por otra parte la concentración de $IL\ 1\beta$ en respuesta al doble reto LPS y SM es menor comparada con el grupo C-LPS ($p<0.05$). (Figura 16).

La secreción de $TNF\alpha$ se incrementa de una manera importante por el LPS en los grupos C-LPS y SM-LPS ($p<0.01^{**}$ vs C-VEH). Esta respuesta también se ve atenuada en el grupo con ambos retos (SM-LPS), ($p<0.05$, C-LPS vs SM-LPS). (Figura 17).

De igual manera analizamos la secreción de $IL-6$ plasmática, donde pudimos observar que la SM no ocasiona un aumento significativo en la secreción de $IL-6$ comparado con el grupo C-VEH, mientras que el LPS sí ocasiona un marcado incremento ($p<0.01$ vs C-VEH) en la secreción de $IL-6$ (grupos C-LPS y SM-LPS), y de igual forma, cuando ambos retos se encuentran juntos la respuesta en la secreción de esta citocina proinflamatoria se ve atenuada (C-LPS vs SM-LPS $p<0.05$) (Figura 18).

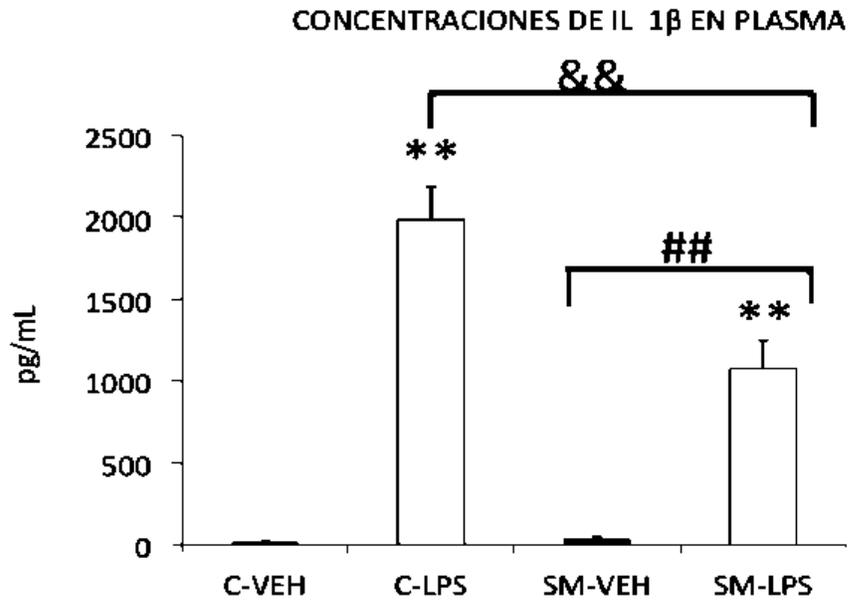


Figura 16.- Concentraciones de IL-1 β en plasma. Se observa un incremento en la secreción en los grupos que se les administró LPS, mientras que la SM no tuvo efecto sobre la concentración basal, y ambos retos SM-LPS mostraron una atenuación de la respuesta. $p < 0.01$ **vs C-VEH, $p < 0.01$ ## SM-VEH vs SM-LPS, $p < 0.05$ & C-LPS vs SM-LPS. (n = 8).

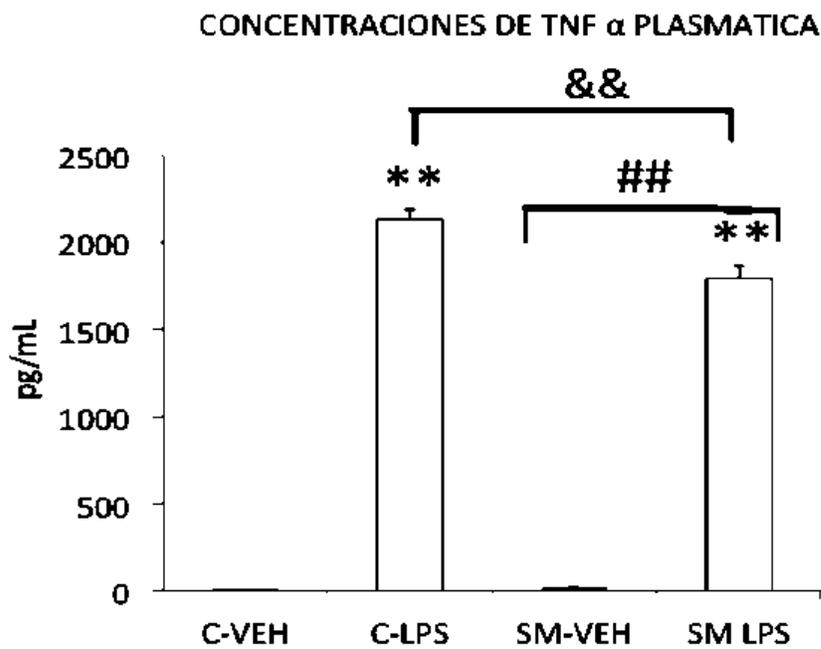


Figura 17.- Concentraciones plasmáticas de TNF α . La SM por si sola no incrementa la secreción basal de TNF α ; el LPS por su lado incrementa de una manera importante la secreción de TNF α y ambos retos de manera conjunta originan una atenuación de la respuesta. $p < 0.01$ **vs C-VEH $p < 0.01$ ## SM-VEH vs SM-LPS, $p < 0.01$ && C-LPS vs SM-LPS. (n = 8).

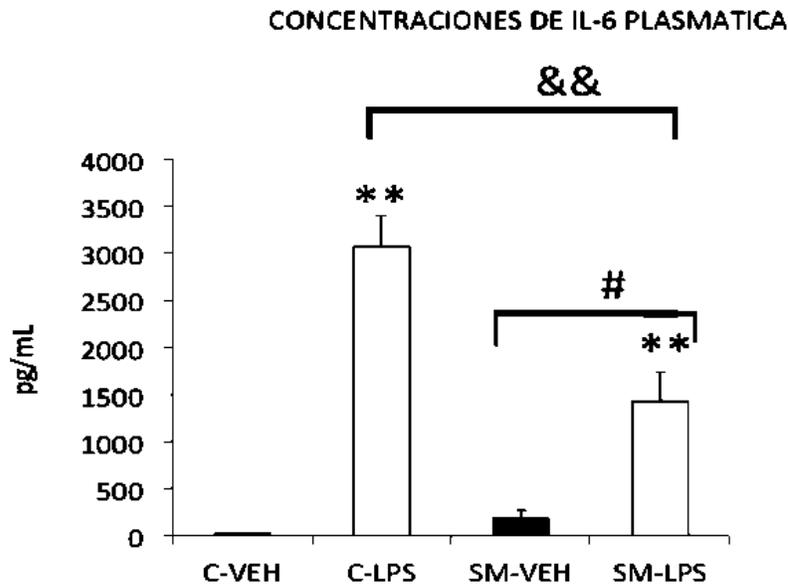


Figura 18.- Concentraciones de IL-6 plasmática. Se observa que el LPS incrementa la secreción de IL-6 de una manera exponencial ($p < 0.01$) y ambos retos SM-LPS juntos atenúan esta respuesta. $p < 0.01$ **vs C-VEH, $p < 0.05$ # SM-VEH vs SM-LPS y $p < 0.01$ && C-LPS vs SM-LPS. (n = 8).

Incluimos en el estudio la determinación de la concentración de IL1 β en homogenados de hipocampo de todos los grupos. Se puede observar que la concentración de IL1 β no se incrementa por la SM pero sí aumenta marcadamente ($p < 0.01$) en respuesta al reto con el LPS en los grupos C-LPS y SM-LPS. Cuando se examina el efecto de ambos retos juntos observamos que la cantidad de IL-1 β es menor comparada con el grupo C-LPS ($p < 0.05$), por lo que la respuesta de IL-1 β , al reto con LPS se atenúa en los animales que sufrieron la SM (Figura 19).

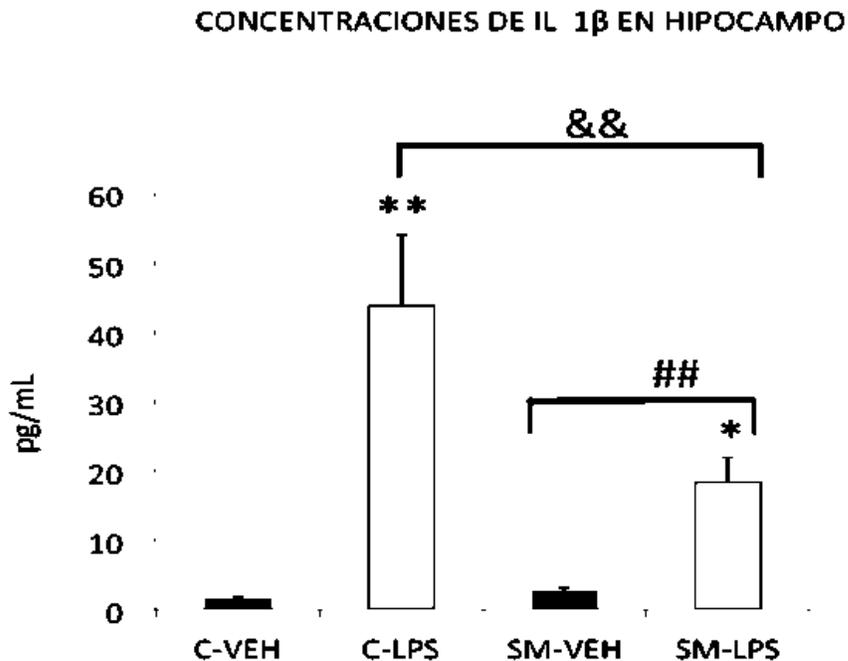


Figura 19. Concentración de IL-1 β en homogenados de hipocampo. En respuesta a la administración aguda de LPS se incrementa la secreción de IL-1 β , sin embargo ambos retos en conjunto originan una atenuación en la secreción. $p < 0.01$ **vs vehículo, SM-VEH vs SM-LPS $p < 0.05$ #, C-LPS vs SM-LPS $p < 0.01$ &&. (n = 6).

Análisis histológico

Se analizaron dos áreas del hipocampo: CA3 e hilus, para evaluar los cambios morfológicos de células microgliales y astrocitos. Encontramos que la SM disminuye el número total de células microgliales/mm³ en la zona CA3 del hipocampo por otro lado el LPS disminuye más la densidad de las células microgliales y ambos retos logran una disminución similar. Analizamos el

porcentaje de activación de las células microgliales y observamos que la SM aumenta el porcentaje de microglia activada ($p < 0.01$) y que el LPS logra una activación microglial mayor ($p < 0.01$), comparados con el grupo C-VEH. El reto conjunto SM-LPS logra un mayor porcentaje de activación de la microglia ($p < 0.01$) vs C-VEH (fig. 20).

El número total de células microgliales/ mm^3 en el hilus del hipocampo disminuye por la exposición a la SM. Por otro lado el LPS disminuye más la densidad de las células microgliales y ambos retos logran una disminución similar. Analizamos el porcentaje de activación de las células microgliales, donde se observa que la SM aumenta el porcentaje de microglia activada ($p < 0.01$), el LPS logra una activación microglial mayor ($p < 0.01$) y ambos retos SM-LPS logran un mayor porcentaje de activación de la microglia ($p < 0.01$) vs C-VEH (fig. 21).

“ EFECTO DEL ESTRÉS POSNATAL EN RATAS NEONATAS CON UN RETO INMUNE SOBRE LA VARIACIÓN DE CITOCINAS CIRCULANTES Y LA ACTIVACIÓN DE LA MICROGLIA”

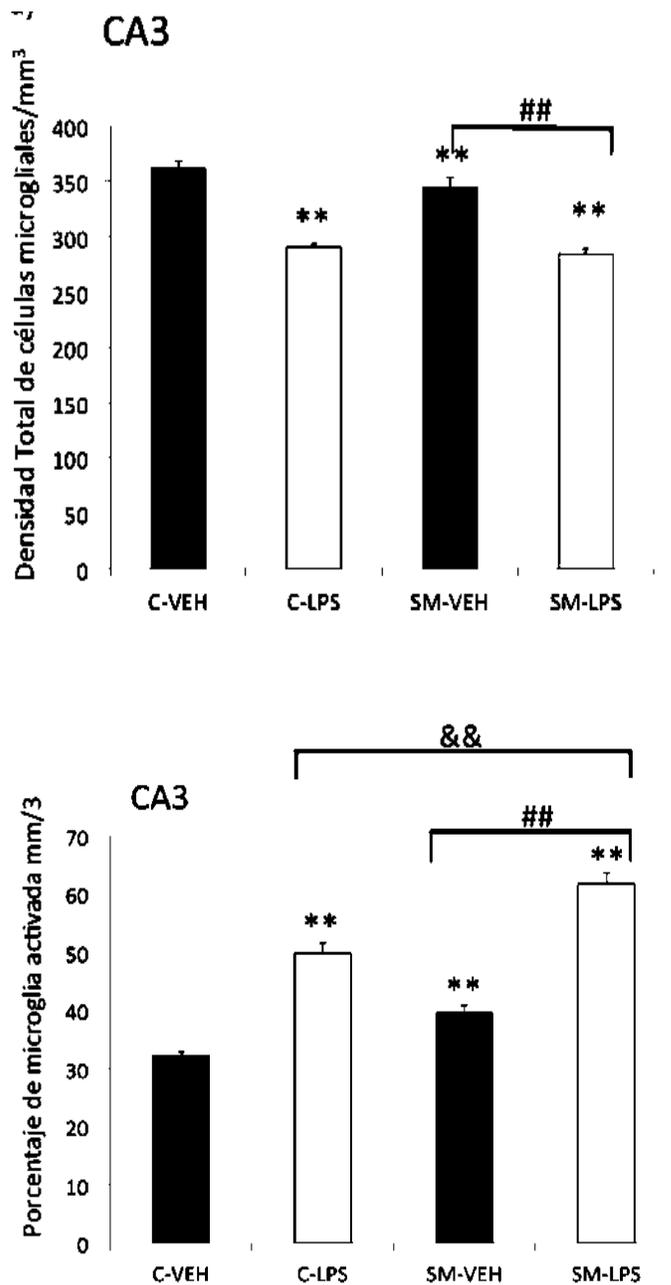


Figura 20.- a) Densidad total de células microgliales/mm³ en la zona CA3 hipocampal, en los grupos control o con SM, tratados con solución vehículo o con LPS. b) Porcentaje de activación de

las células microgliales en la zona CA3 del hipocampo en los mismos grupos. p<0.01**vs vehículo, SM-VEH vs SM-LPS p<0.01 ##, C-LPS vs SM-LPS p<0.01 && (n = 8).

“ EFECTO DEL ESTRÉS POSNATAL EN RATAS NEONATAS CON UN RETO INMUNE SOBRE LA VARIACIÓN DE CITOCINAS CIRCULANTES Y LA ACTIVACIÓN DE LA MICROGLIA”

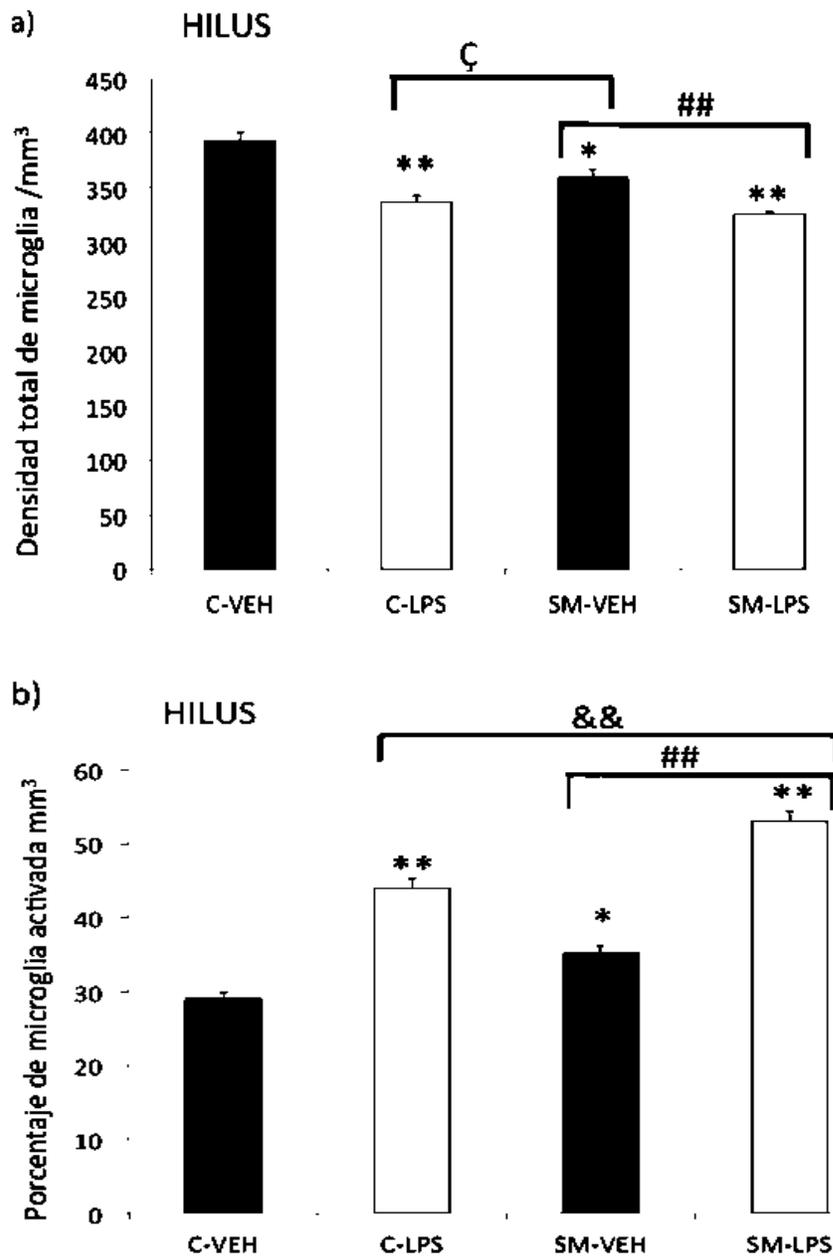


Figura 21. a) Densidad total de células microgliales/mm³ en hilus hipocampal en los grupos control o con SM, tratados con solución vehículo o con LPS. b) Porcentaje de activación de las

células microgliales en los mismos grupos. p<0.05* p<0.01**vs vehículo, SM-VEH vs SM-LPS p<0.01 ##. C-LPS vs SM-LPS p<0.01 &&, C-LPSvs SM-VEH p<0.05 Ç. (n = 8).

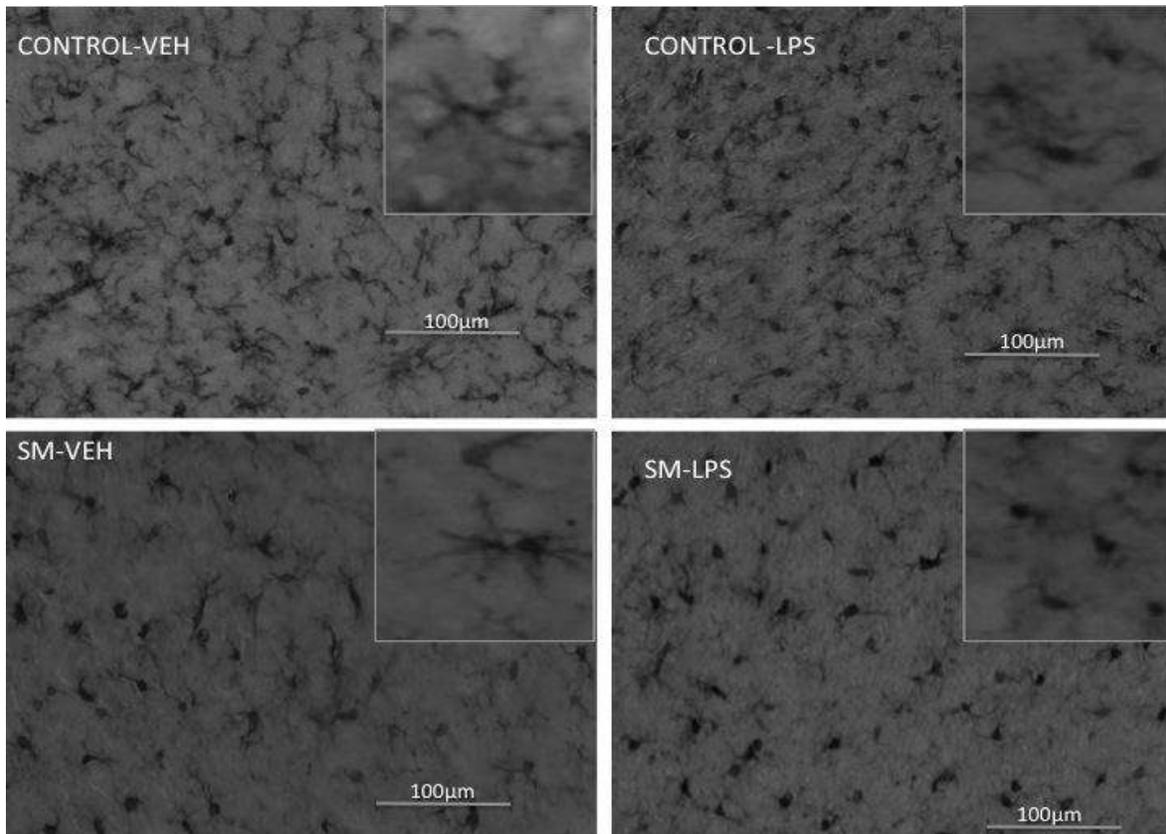


Figura 22.- Micrografía de células microgliales en CA3 del hipocampo. Cambios morfológicos de la microglia en respuesta a los tratamientos a los que fue sometido cada grupo experimental. En el grupo Control-Vehículo observamos una mayor cantidad de microglia en estado de reposo mientras que en el grupo SM-LPS se observa la microglia en su mayor estadio de activación. (magnificadas a 20X, inserto a 40X).

Los análisis del número de los astrocitos por mm³ en la región CA3 y en el hilus del hipocampo mostraron que la SM disminuye ($p < 0.05$) su densidad celular en ambas zonas; por su parte el LPS disminuye de una manera más marcada la densidad celular ($p < 0.01$), y ambos retos (SM-LPS) reducen de una manera similar la densidad de astrocitos tanto en CA3 como en el hilus ($p < 0.01$ vs C-VEH). (Figs. 23 y 24).

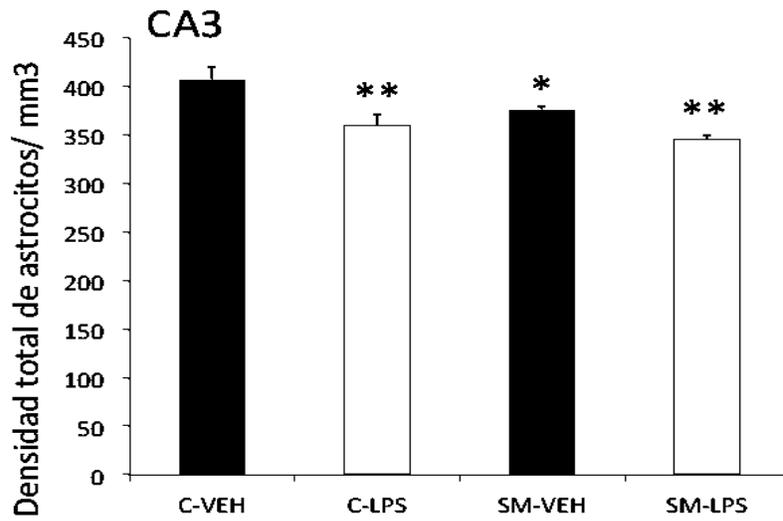


Figura 23.- Densidad celular de astrocitos en mm³ en la región CA3 hipocampal en los grupos control o con SM, tratados con solución vehículo o con LPS. $p < 0.05$ * $p < 0.01$ **vs vehículo, (n = 8).

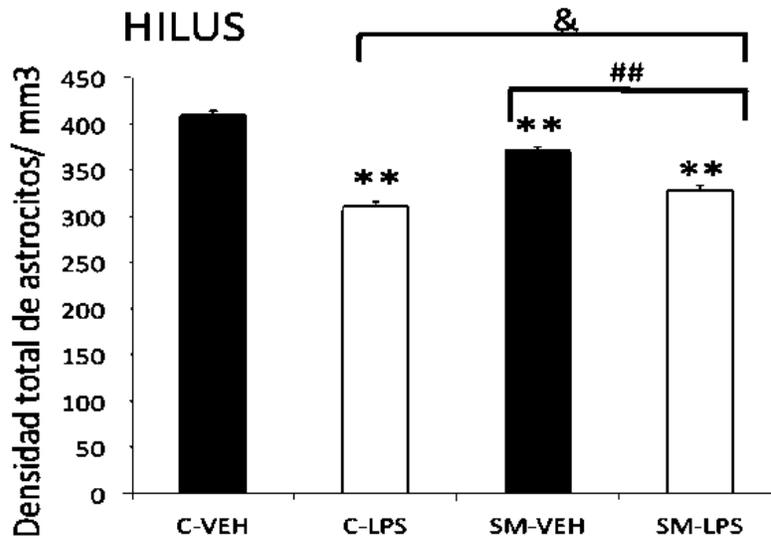


Figura 24- Densidad celular de astrocitos en mm³ en la región del hilus hipocampal en los grupos control o con SM, tratados con solución vehículo o con LPS. p<0.01**vs vehículo, SM VEH vs SM- LPS. p<0.01 ##, C-LPS vs SM-LPS . p<0.05 & (n = 8).

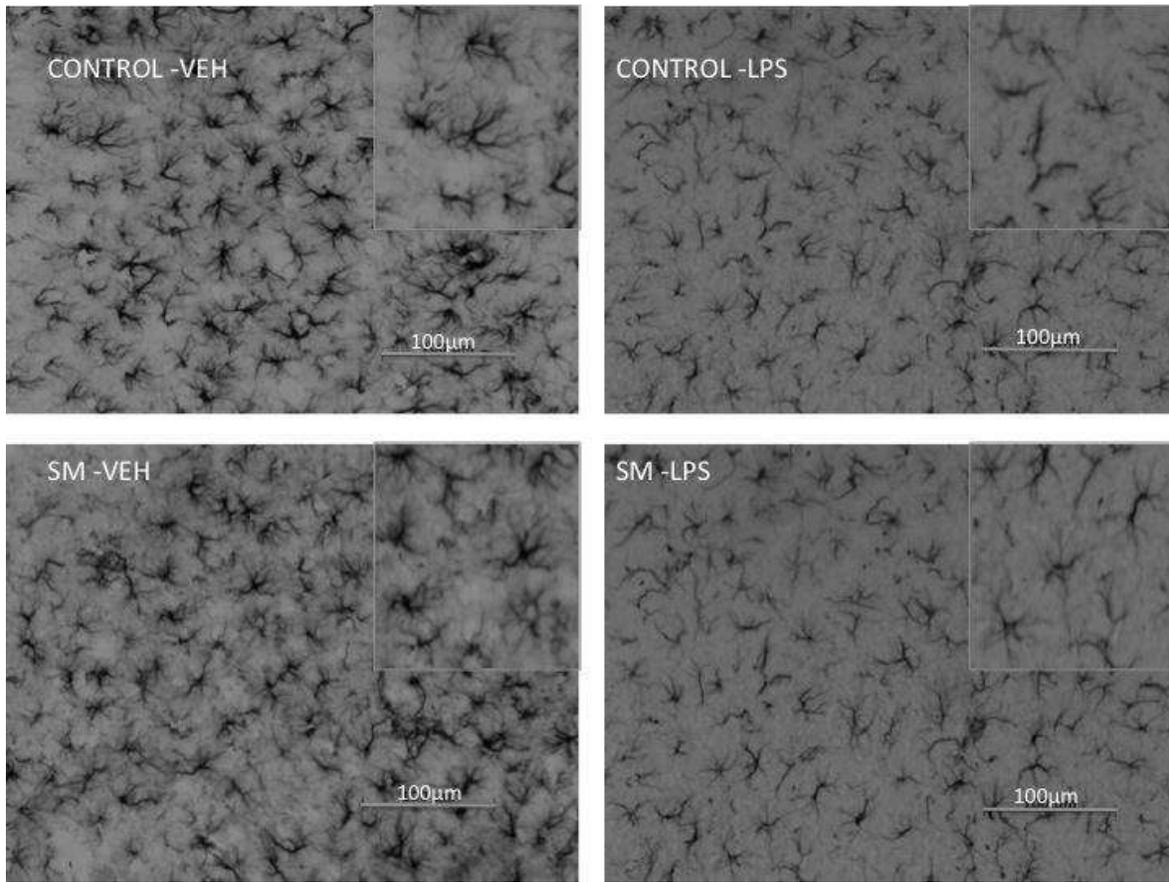


Figura 25.- Micrografía de astrocitos del hilus del hipocampo. Se observa la morfología y densidad de los astrocitos en los grupos Control-veh, Control -LPS, SM-Veh, SM-LPS. (magnificadas a 20X, inserto a 40X).

VII. DISCUSIÓN.

El objetivo de nuestro estudio fue evaluar la densidad y activación de las células microgliales, densidad de los astrocitos, y analizar las concentraciones de citocinas proinflamatorias TNF-a, IL-1b e IL-6 en plasma, en una etapa temprana de la vida, ya que no se han realizado estudios que conjunten ambos retos; estrés – reto inmunológico y valoren las células gliales.

Nuestros resultados indican que la administración conjunta del doble reto SM-LPS induce la secreción de las citocinas proinflamatorias TNF-a, IL-1b e IL-6, pero de manera atenuada frente al grupo Control LPS, esto se observa también en el hipocampo donde se incrementa la expresión de IL-1 β de una manera importante, sin embargo el reto SM-LPS en conjunto atenúa la respuesta presentada por el grupo control LPS. Por otro lado, el número total de células microgliales se ve disminuido en CA3 e hilus tanto por la SM, como por el LPS, sin embargo, la SM aumenta su activación de igual manera que el LPS y ambos retos activan aun más a las células microgliales. La SM y el LPS reducen la densidad de astrocitos al igual que el doble reto SM – LPS. Estos resultados sugieren que el estrés en etapas tempranas de la vida aunado a infecciones son retos lo suficientemente fuertes para alterar la morfología y maduración del hipocampo, y conduce a un estado proinflamatorio generalizado tanto a nivel sistémico como a nivel cerebral.

En estudios previos utilizando ratas sometidas al estrés repetido por restricción se han observado los signos del estrés crónico sobre las suprarrenales, se ha observado un incremento en las concentraciones de corticosterona basal (Zelena y cols., 2003). En contraste, la SM no evoca cambios apreciables sobre las suprarrenales en las crías de rata expuestas a este procedimiento, quizás debido a la etapa de vida (periodo hiporesponsivo) en que se encuentran (Lajud y cols.,2012).

En cambio observamos que la secreción de corticosterona sí se incrementa de manera significativa en el grupo C-LPS, lo cual ya se había observado en reportes

previos utilizando animales adultos (Mohn 2011). El doble reto SM-LPS también logra inducir un incremento de corticosterona de magnitud similar al evocado por el LPS solo. Esta respuesta es importante, pues el LPS es un estímulo muy robusto que logra inducir una respuesta inmediata de las glándulas suprarrenales, a pesar de la etapa de vida tan temprana.

La conducta de postración se define como un estado corporal con síntomas de letargo, fiebre, disminución de la ingesta de alimento, además de poco movimiento. Harvey y cols., (2006) entre otros, observaron una disminución del peso corporal, así como del consumo de alimento, posterior a una inyección única de LPS en ratas de 6-8 semanas. Nuestros resultados están de acuerdo con estas observaciones, pues muestran que las ratas inyectadas con una sola dosis de LPS presentan una disminución de la ganancia de peso corporal a las 24h posteriores a la inyección. La diferencia de peso entre los grupos tratados con LPS vs los grupos inyectados con solución vehículo sugiere que estos grupos disminuyen su ingesta de leche materna posteriormente a la inyección. Por otra parte, observamos una disminución de la actividad locomotora en dichos grupos, 1 h después de la administración única de LPS; esto está en concordancia con los estudios de Engeland y cols., (2001). De acuerdo a nuestros resultados, confirmamos que el LPS indujo de manera efectiva una conducta de postración en las crías de rata de forma inmediata posterior a su administración.

Estudios previos de nuestro laboratorio evaluaron la concentración de citocinas en ratas macho de PN15 y demostraron que la SM disminuye la secreción plasmática de IL-6 en condiciones basales, pero ésta aumenta al someter a las crías de SM a un evento agudo de estrés (Roque y cols.,2015). Además, Roque y cols., 2015 observaron que la secreción de IL-1 β es menor en el grupo SM que en el grupo control tanto bajo condiciones basales como después del estímulo de estrés agudo (de tipo homotípico). En este estudio no se observó ningún efecto de la SM sobre la secreción de TNF α . En nuestro estudio observamos que las concentraciones de IL-6, de IL-1 β y de TNF α en el grupo SM-VEH no tuvieron diferencias significativas

con respecto al grupo C-VEH. Posiblemente las diferencias en los resultados con los descritos por Roque y cols., se deban a que en nuestro estudio la administración de la solución vehículo a los grupos control y SM pudo ser un estresor agudo heterotípico que influyó en que los resultados de IL-6, IL-1 β y TNF α no fueran significativos.

Por otro lado, reportes previos mostraron que la inyección intraperitoneal de 100 μ g/kg de LPS a ratas al PN14 provocó un gran incremento en la secreción plasmática de IL-6, IL- 1 β , y TNF α a las 3 horas posteriores a la inyección (Dinel y cols., 2014). Nuestros resultados obtenidos fueron similares al reporte anterior para las tres citocinas, incluso al haber realizado las mediciones sólo a los 90 minutos después de aplicar una dosis de LPS de 1 mg/kg. Nosotros pudimos observar en el grupo C-LPS un incremento importante de IL-6, IL- 1 β , y TNF α en respuesta al LPS comparado con el grupo C-VEH. Finalmente, en nuestro estudio, el doble reto SM - LPS generó una mayor secreción de citocinas proinflamatorias (IL-6, IL- 1 β , y TNF α), pero de manera interesante la concentración de cada citocina fue menor a las del grupo control con LPS. Estos resultados indican que la exposición al estrés por SM induce una respuesta atenuada al reto con LPS lo que coincide con el estudio de Barnum y cols.,(2012), quienes utilizando modelos de estrés crónico impredecible y estrés psicosocial en ratones adultos estresados en la adolescencia observaron también una secreción de citocinas atenuadas en respuesta a un reto posterior con LPS. También se ha descrito que la SM puede alterar las interacciones gen-ambiente y se han elucidado las vías que programan a un animal en respuesta a las experiencias tempranas en la vida.

Los mecanismos epigenéticos involucrados en la metilación del DNA, modificaciones post-traduccionales de histonas y RNAs no codificantes (micro-RNA) son los principales candidatos para regular la expresión de genes y la integración de señales intrínsecas y ambientales en el genoma (Nishi y cols., 2014).

De tal forma el estrés inducido por la separación materna genera una modificación en receptores de membrana, lo que genera una reducción en la señalización hacia la célula. El estrés citotóxico bloquea una cascada de fosforilaciones que puede estar afectando ya sea a la familia de las cinasas de los inhibidores de NF- κ B (IKKs) que está constituida por IKK α , IKK β e IKK γ o al modulador esencial de NF- κ B (NEMO), de esta manera van a estar bloqueados homodímeros o heterodímeros de IKK α β . Como consecuencia no se van a ubiquitinar a las proteínas I κ B α , I κ B β e I κ B γ , afectando la liberación NF- κ B disminuyendo la síntesis de citocinas pro-inflamatorias. En nuestro caso, nosotros aplicamos el estresor desde la etapa neonatal, donde se ha hipotetizado que el animal es poco responsivo a estímulos nocivos. Concluimos que esta respuesta es independiente de la edad o del tipo de estresor; sin embargo la experiencia crónica de estrés es capaz de alterar la capacidad de respuesta inmune del individuo.

En cuanto a la presencia de IL-1 β en el hipocampo se observó previamente que la SM incrementa la expresión bajo condiciones basales así como en respuesta a un solo reto de estrés. (Roque y cols.,2015). De igual manera la expresión de IL 1 β se ve incrementada en el hipocampo después de la inyección con LPS comparada con su control (Dinel y cols.,2014). En nuestro estudio analizamos la concentración de la IL-1 β en homogenados de hipocampo y observamos que el grupo SM-VEH tuvo una concentración ligeramente mayor al del grupo C-VEH si bien no fue significativa, únicamente se observó una tendencia ($p=0.09$). Esto puede deberse a que nosotros medimos la concentración de proteína de IL-1 β presente en los homogenados, mientras el reporte anterior analizó el mRNA de IL-1 β encontrando una inducción dos veces mayor al control.

Por otra parte, nosotros observamos que la concentración de IL 1 β en el hipocampo también se ve incrementada en respuesta a la inyección de LPS comparada con su control, y que ésta es menor cuando se aplica el doble reto SM-LPS que en respuesta al LPS solo. Una observación similar se realizó por Barnum y cols., (2012) quienes reportaron una respuesta atenuada en la expresión de IL-1 β

en el hipocampo de ratones adultos sometidos a estrés crónico durante la adolescencia. Por ende, existe una respuesta de atenuación en el hipocampo, similar a la que ocurre a nivel periférico, como se mencionó anteriormente. Nosotros hipotetizamos que posiblemente se deba a un incremento en la concentración de citocinas anti-inflamatorias como es el caso de IL-10, en los grupos con SM-LPS o quizás a que el estrés induce una disminución en los receptores de glucocorticoides a nivel hipocámpal al actuar como un estresor crónico, lo que podría conducir a una disminución en la concentración de citocinas, tanto periférica como a nivel hipocámpal, en respuesta a un segundo reto. Otra alternativa es que el estrés promueva una supresión del factor NFκB alterando la vía de señalización intracelular y por ende la producción de citocinas tipo proinflamatorio. Sin embargo se necesitan más estudios para dilucidar estas hipótesis.

Diversos estudios han demostrado los efectos de la exposición crónica al estrés sobre la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo, tanto en el adulto como en etapas tempranas de la vida. (Lajud y cols., 2012). Estos eventos se relacionan con el aumento en la expresión de citocinas proinflamatorias. Por otra parte otros efectos del estrés incluyen alteración en el aprendizaje y en la memoria, ya que se ha observado de igual manera que una de las zonas más susceptibles al estrés es CA3 del hipocampo (Walker y cols., 2013).

Existen muy pocos reportes sobre los efectos inmediatos del estrés en etapas tempranas de la vida, en estudios previos de nuestro laboratorio se reportó que la SM no ocasiona una disminución en cuanto a la densidad celular por mm^3 de las células microgliales en el hilus de ratas macho de PN15, pero si incrementa de forma significativa el porcentaje de células microgliales activadas (Roque y cols., 2015). En nuestro estudio sí observamos una disminución en la densidad de células microgliales en las regiones del hilus y CA3 del hipocampo en el grupo SM-VEH, lo que contrasta con el estudio anterior. Una diferencia con nuestro estudio

fue la aplicación de una inyección con solución vehículo en los grupos que se compararon, lo cual pudiera evocar una respuesta de estrés. En concordancia con el estudio de Roque y cols (2015) nosotros también observamos un incremento en el porcentaje de células microgliales activadas tanto en el hilus como en la región de CA3 del hipocampo al PN15.

Por otro lado, ya se han reportado los efectos de infecciones en etapas tempranas sobre las células microgliales. Como ejemplo, ratas que fueron inyectadas al PN4 con *E.Coli* mostraron una activación microglial de manera inmediata, dejando a la microglía activada de forma permanente. Posteriormente al aplicar un segundo reto inmunológico como lo es el LPS, en la etapa adulta se observó una respuesta de “sobreactivación” microglia, con un número mayor de microglia activada en el adulto y su morfología presentó su máximo estadio de activación asemejándose a un macrófago (Bilbo y cols., 2009). Nuestros resultados muestran que el LPS induce una mayor activación microglial a las 24 h posteriores a su administración en las zonas del hilus y CA3 del hipocampo, de forma similar a lo reportado anteriormente, y además ocasiona una disminución en la densidad de células microgliales. La exposición al doble reto SM-LPS provoca un incremento en la activación microglial en CA3 e hilus del hipocampo mayor al obtenido por cada reto de manera individual, así como también se observa una disminución en la densidad celular superior a la mostrada por cada reto de manera individual. El estrés en etapas tempranas de la vida “sensibiliza” a la microglia a un segundo reto inmediato, provocando un aumento marcado en el porcentaje de microglia activada así como un estadio mayor de activación (figura 22), probablemente ambos retos en etapa adulta podrían favorecer la génesis de diversas psicopatologías.

Los astrocitos también son afectados por la exposición al estrés de forma importante. Por ejemplo, en animales adultos sometidos a estrés crónico (Czéh y cols., 2006) se ha reportado una disminución de la densidad celular de astrocitos y un soma de menor tamaño en el giro dentado del hipocampo. Asimismo, recientemente se reportó que la SM periódica induce cambios morfológicos en los

astrocitos ya que se observó una disminución en la densidad celular y diferencias significativas en la longitud de sus proyecciones en el hilus del hipocampo de ratas macho al PN15 (Roque y cols.,2015). En nuestro estudio observamos también una disminución por la exposición a la SM en cuanto a la densidad celular de los astrocitos en el hilus y CA3 del hipocampo, confirmando el estudio anterior.

Otros autores reportaron que el LPS inyectado al PN 9 disminuye la densidad celular de astrocitos observados en la etapa adulta (PN 60) (Järlestedt et al 2013). Nosotros pudimos observar que el LPS disminuye significativamente la densidad celular de astrocitos de una manera inmediata posterior. Ambos retos (SM-LPS) de manera conjunta disminuyen la densidad celular de astrocitos, pero ésta es más pronunciada en la región del hilus (aprox. 25%) comparado con CA3 (aprox. 12%). Como sabemos, los astrocitos promueven la formación sináptica y están involucrados en la remodelación de conexiones sinápticas. Los astrocitos modulan la duración de la corriente sináptica a través de la recaptación del glutamato, son los responsables de la transformación de glutamato en glutamina y del mantenimiento de la reserva de neurotransmisores. El déficit de neurotransmisión se ha relacionado con enfermedades tales como la esquizofrenia en humanos, donde este déficit es debido a una disminución en la densidad de astrocitos entre otras causas (Benes 2000). De igual manera se ha relacionado una disminución de astrocitos en pacientes con depresión mayor y depresión bipolar entre otras (Hostenbach y cols., 2014). Por otra parte al existir una disminución de la densidad de astrocitos se ve reducido el soporte metabólico hacia las neuronas, disminuyendo la cantidad de nutrientes obtenidos y ocasionando un estado de excitotoxicidad, todo lo anterior conduce a una comunicación neuronal deficiente. En nuestro caso, utilizando el modelo del doble reto SM-LPS muestran una disminución en la densidad de astrocitos, lo cual podría predecir alteraciones conductuales a largo plazo similares a las observadas en los padecimientos psiquiátricos en humanos.

No se ha estudiado si este modelo del doble reto SM-LPS produce alteraciones en varios tipos de conducta (tipo depresiva, de aprendizaje) en etapas posteriores. Sabemos que tanto la separación maternal, como la inyección de LPS, por separado, pueden ocasionar un aumento de la conducta tipo depresiva y/o una disminución de aprendizaje y memoria. Además; cada uno de estos modelos incrementa el estado inflamatorio a nivel cerebral desde etapas tempranas y se ha observado (en el caso del LPS) que persiste hasta etapas adultas, lo cual juega un papel importante en la génesis de diversas psicopatologías, tales como la depresión mayor, trastornos de ansiedad, autismo entre otras. Otros autores realizaron un estudio que involucra ambos retos (estrés – inmune) pero éstos fueron administrados durante la adolescencia y sus consecuencias se observaron en la etapa adulta (Barnum y cols., 2012); en este trabajo se documentó un incremento de citocinas proinflamatorias en el hipocampo, hipotálamo, cerebro medio y corteza prefrontal, así como en la circulación periférica y una atenuación de la respuesta debida al estrés. Por otra parte nuestro estudio incluyó el análisis detallado de la morfología de las células gliales, a diferencia del estudio de Barnum y cols. Ellos justificaron su modelo mediante el argumento de que el padecer infecciones y estrés en etapas como la adolescencia se elevan los riesgos de morbimortalidad para padecer diversas psicopatologías en la etapa adulta. Nosotros administramos ambos retos en una etapa de la vida más temprana en la cual existen cambios profundos en estructuras cerebrales ya que éstas se encuentran en pleno desarrollo y por ende hipotetizamos que las alteraciones evocadas por ambos retos pueden perdurar hasta la etapa adulta, sensibilizando de forma permanente al sistema neuroinmune a retos posteriores. Además, es relativamente común la convergencia en la clínica de ambas situaciones (estrés e infecciones) en etapas tempranas de la vida. Sin embargo, se necesitan más estudios utilizando este modelo del doble reto para saber si los cambios a nivel neuroinmune que observamos de manera inmediata son permanentes y si resultan en alteraciones conductuales (aumento de la conducta tipo depresiva, deficiencia de aprendizaje).

VIII.- CONCLUSIONES.

El estrés en etapas tempranas de la vida aunado a infecciones son retos lo suficientemente fuertes para alterar estructuras que se encuentran en pleno desarrollo como el hipocampo, a través de la liberación de mensajeros químicos de la familia de las citocinas y de la activación de células del sistema inmune.

Nuestros resultados en conjunto indican que el doble reto estrés- inmune provoca un proceso inflamatorio tanto a nivel cerebral como periférico. El cambio de activación de las células microgliales sugiere que el sistema neuroinmune está reaccionando frente a estos retos y queda en un estado de “sensibilización” frente a estímulos posteriores. Todo lo anterior conlleva a pensar que la coexistencia de ambos retos estrés- inmune evoca cambios profundos en los sistemas nervioso autónomo división simpática, neuroendocrino e inmune, que conduce a un estado proinflamatorio generalizado tanto a nivel sistémico como a nivel cerebral, lo que aumenta el riesgo de padecer alguna psicopatología en etapas posteriores.

IX.- PERSPECTIVAS.

- Evaluar la morfología y densidad microglial en etapa adulta posterior a un doble reto estrés – inmunológico en etapas tempranas de la vida.
- Evaluar citocinas anti-inflamatorias IL-10 posterior al doble reto estrés - inmunológico.

X REFERENCIAS.

1. Aschner M. (1998). Immune and inflammatory responses in the CNS: modulation by astrocytes. *Toxicol.* 102; 283-287.
2. Abbas AK, Lichtman. Pillal. (1997). Cellular and Molecular immunology. Review Series. 494.
3. Babri S, Doosti MH, Salari AA. (2014). Strain – dependent effects of prenatal maternal immune activation on anxiety- and depression- like behaviors in offspring. *Brain Behavior Immun* 37; 164-176.
4. Bartrop RW, Luckhurst E, Lazarus L. (1977). Depressed lymphocyte function after bereavement”. *Lancet* 1: 834-837.
5. Benati R, Gehrmann J, Schubert P, Kreutzberg GW. (1993). Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7:111–118.
6. Benes FM, Todtenkopf MS, Williams M. (2000). Glutamate decarboxylase (65) –immunoreactive terminals in cingulate and prefrontal cortices of schizophrenic and bipolar brain. 20; 259-269.
7. Blecha F. (2000). Immune system Response to stress. *The biology of animal stress.* 25: 111-122.
8. Bremner J, Narayan, M, Anderson E, Staib L.H, Miller H.L, Charney, D. (2000). Hippocampal volume reduction in major depression. *American Journal Psychiatry.* 157: 115–118.
9. Bilbo, S. D., Biedenkapp, J. C., Der- Avakian, A., Watkins, L. R., Rudy, J. W., and Maier, S. F. (2005). Neonatal infection-induced memory impairment after lipopolysaccharide in adulthood is prevented via caspase- 1 inhibition. *Journal. Neuroscience.* 25; 8000–8009.
10. Bilbo and Jaclyn M. Schwarz. (2009). Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system. *Frontiers in behavioral neuroscience.* 3; 1-14.

11. Buckingham, Julia C, Glenda E, Gillies, Anne-Marie. (1997). Stress Hormones and the Immune System. *American Journal Psychiatry*. 156; 110-116.
12. Cai, Z., Pan, Z. L., Pang, Y., Evans, O. B., and Rhodes, P. G. (2000). Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. *Pediatric. Respuent*. 47; 64–72.
13. Calfa G, Bussolino D, Molina Va, (2007). Involvement of the lateral septum and the ventral Hippocampus in the emotional sequelae induced by social defeat: role of glucocorticoid receptors. *Behavior Brain Response*. 181; 23-24.
14. Campbell, Abraham C.B, Misliah e. Kemper R, Oldstone MB, Mucke L. (1993) Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci* 90; 1006.
15. Chuchon L, (1999). Factores Institucionales y Nivel de Estrés en las Enfermeras que laboran en las Unidades de Cuidados Intensivos del hospital Cayetano Heredia y Edgardo Rebagliatti, *Revista de la asociación mexicana de medicina crítica y terapia intensiva*. 12 (3); 122- 127.
16. Clarke, L.E. & Barres, B.A. (2013). Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nat. Rev. Neurosci*. 14; 311-321.
17. Compas, y Grant K, (1993). Stress and adolescent depressive symptoms: Underlying mechanisms and processes. *Society for Research in Child Development*. 15; 63-69.
18. Corts JH, Meis F, Hoogkam. (1997). Primer on cytokines, sources receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol. Rev*. 10; 742-780.
19. Danese A, Pariante CM, Caspi A, Taylor A, Poulton R. (2007). Childhood maltreatment predicts adult inflammation in a life-course study. *National Academy Science USA* 104; 1319–1324.
20. Daniels WM, Pietersen CY, Cartens ME, Stein DJ. (2004) Maternal separation in rats leads to anxiety-like behavior and a blunted ACTH response and altered neurotransmitter levels in response to a subsequent stressor. *Met Brain Dis*. 19; 3-14.

21. Daban, Vieta, Mackin, Young, ChB, MPhil. (2005). Eje hipotalámico- pituitario-adrenal y trastorno bipolar. *Psiquiatr Clin. N. Am.* 28; 469-480.
22. Dinarello CA, Wolff SM (1993). The role of interleukin-1 in disease. *N Engl J Med.* 328: 106-113.
23. Dinarello CA, Thompson RC (1991). Blocking IL-1: interleukin 1 receptor antagonist in vivo and in vitro. *Immunol Today*; 12; 404-410.
24. Dinel A. Joffre C. Trifilieff P. Aubert A. Foury A. Ruyet P. & Laye S. (2014). Inflammation early in life is a vulnerability factor for emotional behavior at adolescence and for lipopolisaccharide- induced spatial memory and neurogenesis alteration at adulthood. *Journal of neuroinflammation* 11; 155-168.
25. Diz-Chaves, Pernia, Carrero, Garcia Segura, LM (2012). Prenatal stress causes alterations in the morphology of microglia and the inflammatory response of the hippocampus of adult female mice. *Journal Neuroinflammation*, 9; 71.
26. Engeland G. Nielsen V. Kavaliers M. Ossenkopp KP. (2001) Locomotor activity changes following lipopolisaccharide treatment in mice: a multivariate assesment of behavioral tolerance. *72: (4); 481-491.*
27. Enthoven L. Kloet E. Otzil M. (2008). Differential development of stress system. *Brain* 12: 17; 62-69.
28. Esquivel B.B Levin G. Rivarola M.A. y Suarez M.M. (2009). Maternal separation and lesión of alters anxiety and adrenal activity in male rats. *International Journal Neuroscience* 119: (9); 1319-1336.
29. Espinosa E, Bermudez F. (2001). Relación conducta- inmunidad: el papel de las citocinas. *Revista de investigación clínica*, 53 (3); 240- 253.
30. Frotscher M, Seress L, Schwerdtfeger WK, Buhl E. (1991). The mossy cells of the fascia dentate: a comparative study of their fine structure and synaptic connections in rodents and primates. *J Comp Neurol* 312;145–63.
31. Garcia X, Kaski J.C. (1999). Cardiopatía isquémica: marcadores de inflamación y riesgo cardiovascular. *Revista española de cardiología.* 52:

990-1003.

32. Gauldie J, Richards C, Harnish D. (1987) Interferon beta/B cell stimulating factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci.* 84; 251-7.261
33. Gauldie J, Richards C, Northemann W, Fey G, Baumann H. (1989). IL-6 is the monocyte-derived HSF that regulates receptor-specific acute phase gene regulation in hepatocytes. *Ann NY Acad Sci.* 557; 46-57
34. Gadiant RA. Cron KC. Otten V. (1990) Interleukin 1 beta and tumor necrosis factor- alpha synergistically stimulate nerve growth factor (NGF) release from cultured rat astrocytes. *Neuroscience Lett* 117; 335.
35. Giulian, D., Young, D. G., Woodward, J., Brown, D. C., and Lachman, L. B. (1988). Interleukin-1 is an astroglial growth factor in the developing brain. *Journal. Neuroscience.* 8; 709–714.
36. Gómez G. B. Escobar A. (2006). Estrés y sistema Inmune. *Revista Mexicana de Neurociencia.* 7 (1); 30-38.
37. Gunnar M.R. Frenn K. (2009). Moderate versus severe early life stress: Associations with stress reactivity and regulation in 10 -12 year- old children. *Psychoneuroendocrinology.* 34; 62-75.
38. HarveyD. Smith R. English K. Mahon B. Commins S. (2006). Interleukin -10 (IL-10) but not Lipopolisaccharide (LPS) produces increased motor activity and abnormal exploratory patterns while impairing spatial learning in Balb/c mice. *Psysiology & Behavior* 87; 842-847.
39. Heim C. Nemeroff. (2001). The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biology Psychiatry.* 48 (12); 1023-1039.
40. Heyser C.J. Maliah E. Samimi A. Campbell IL. Gold LH.(1997) Progressive decline in avoidance learning paralleled by inflammatory neurodegeneration in transgenic mice expressing interleukin 6 in the brain. *Proc Acad Sci* 90; 1500.

41. Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. (1990). Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell*. 63:149-157.
42. Jahng J. (2010). An animal model of eating disorders associated with stressful experience in early life. *Human Behavior*. 75; 213- 230.
43. Järlestedt K, Naylor S, Dean J, Hagberg H, and Mallard. (2013). Decreased survival of newborn neurons in the dorsal Hippocampus after neonatal LPS exposure in mice. *Neuroscience* 253; 21-28.
44. Jara L. (2011). Interacción inmuno-neuro-endocrina en enfermedades reumáticas autoinmunes: un Nuevo desafío para el reumatólogo. *Reumatol Clin* 7; 85-87.
45. Jyvaesjaervi S, Joukamaa M, Vaesaenen, E, Larivaara P, Kivela, S, Keinaenen-Kiukaanniemi S. (1999). Alexithymia, Hypochondriacal Beliefs, and Psychological Distress Among Frequent Attenders in Primary Health Care. *Comprehensive Psychiatry*. 40; 292-298.
46. Kalia M. (2002). Assessing the economic impact of stress – the modern day hidden epidemic, *Metabolism*, 51,(6): 49-53.
47. Kendler KS, Gardner CO, Prescott CA. (2002). Toward a comprehensive developmental model for major depression in women. *American Journal Psychiatry*; 159; 1133–1145.
48. Khalaf-Nazzal R, Francis F (2013). Hippocampal development - old and new findings. *Neurosci*. 248; 225-42.
49. Kiecolt-Glaser, McGuire L., Robles T, Glaser. (2002). Psychoneuroimmunology and Psychosomatic Medicine: Back to the Future. *Psychosomatic Medicine*. 64; 15-28.
50. Kliewer W. (1997). Children’s coping with chronic illness, *Issues in clinical child psychology*. 25; 275–300.
51. Kop.w,J, (1999). Chronic and acute psychological risk factors for clinical manifestations of coronary artery disease. *Psychosomatic Medicine* 61; 476-487.

52. Lavenex P, Suzuki WA, Amaral DG. (2004). Perirhinal and parahippocampal cortices of the macaque monkey: Intrinsic projections and interconnections. *J Comp Neurol.* 472; 371-94.
53. Libby P. Inflammatory mechanisms: (2007). The molecular basis of inflammation and disease. *Nutrition Reviews;* 65 (12); 140-146.
54. Maeshima N, Fernandez RC. (2013). Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. *Front Cell Infect Microbiol.* 12-33.
55. Macrí S, Chiarotti F, Wurbel H. (2008). Maternal separation and maternal care act independently on the development of HPA responses in male rats. *Behavior Brain Response.* 191; 227-234.
56. Manly J. y Cicchetti, D. (1991). Continuing toward an operational definition of psychological maltreatment. *development and Psychopathology.* 3: 19-30.
57. Marmendal M. (2005). Maternal Separation in the Rat: Long-term Effects of Early Life Events on Emotionality. *Drug Response and Neurobiology* 12: 165-175.
58. Martínez E.C, Terán B. B, García J, Lozano H, Medina M, Sosa F, (2001) Transporte del paciente crítico en unidades móviles terrestres. *Revista de la Asociación Mexicana de Medicina Crítica y Terapia Intensiva.* 15 (4): 130-131.
59. Martínez E, y Díaz, D. (2007). Una aproximación psicosocial al estrés escolar. *Educación y Educadores.* 10 (2); 123-133.
60. McEwen B. (1998). Stress, adaptation, and disease. *Allostasis and allostatic load.* *Academic.* 840; 33-44.
61. McEwen (2002). Cortisol, cushing syndrome, and shrinking brain-new evidence for reversibility *Journal clinical Endocrinol Metabolic* 87; 1947-1958.
62. McEwen (2005). Stressed or stressed out: what is the difference? *Journal of Psychiatry and neuroscience.* 30; 315-318.
63. McLoyd V, y Wilson L. (1991). The strain of living poor: Parenting, social support, and child mental health. *Children in poverty.* 5; 105-135.
64. Melgoza, J. (1999). Sin estrés. 1 Ed. España: Editorial SAFELIZ.S.Z. 123.

65. Miller GE, Chen E, Parker KJ. (2011). Psychological stress in childhood and susceptibility to the chronic diseases of aging: Moving toward a model of behavioral and biological mechanisms. *Psychological Bulletin*. 6; 959-97.
66. Mohn, C. Fernández J. Laurentiis, A. Bornstein S & Rettori. (2011). Adrenal gland responses to lipopolysaccharide after stress and ethanol administration in male rats. *Informa Healthcare USA* 14(2); 216–226.
67. Moreno L, Lamprea M, Dueñas Z. (2009) Diferencias en los comportamientos asociados con La ansiedad de ratas macho y hembra expuestas a un protocolo de estrés crónico por separación Maternal temprana. *Suma Psicológica*. 16 (1):31-43.
68. Moscoso, M.S. (1998). Estrés salud y emociones: estudio de la ansiedad, cólera y hostilidad. *Revista de Psicología*, 3; 9-17.
69. Moser (1998). Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8; 608-619.
70. Mucke, L. & Eddleston, M. (1993). Astrocytes in infectious and immune-mediated diseases of the central nervous system. 7; 1226-1232.
71. Munk, Guire, y Holbrook. (1984). Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Revista endocrinología*. 5: 25-44.
72. Nishi M, Horii-Hayashi N, Sasagawa Mayumi Nishi T, Horii-Hayashi N and Sasagawa T. (2014). Effects of early life adverse experiences on the brain: implications from maternal separation models in rodents. *Front. Neurosci*, 8(166);1-6
73. Olivares H.J. Juárez E. García F. (2015) El hipocampo: neurogenesis y aprendizaje. *Revista Médica Universidad de Veracruz*. 20-28.
74. Pablos R. Virrarán R. Argüeles S. Herrera A. Venero L. Ayala A. & Machado A. (2006). Stress increased vulnerability to inflammation in the rat prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience*. 26 (211); 5709-5719.

75. Palkovits M. (1999). Interconnections between the neuroendocrine hypothalamus and the central autonomic system. *Frontier Neuroendocrinology* 20: 270-295.
76. Paykel, ES. (2001). Stress and affective disorders in humans. *Seminars in Clinical Neuropsychiatry*. 6; 4 -11.
77. Pousset F. (1994) Developmental expression of cytokine genes in the cortex and hippocampus of the rat central nervous system. *Brain Res* 12; (81) 143-146.
78. Sapolsky R. (2000). Glucocorticoid and hippocampal atrophy in neuropsychiatry disorders. *Archives of General Psychiatry*. 57; 925-935.
79. Selye. (1936). A syndrome produced by diverse noxious agents, *Nature*, 36: 32.
80. Sironi M, Breviario F, Prozerpio P. (1989). IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells. *J Immunol*. 142; 549-555.
81. Stence N, Waite, y Dailey M, (2001). Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia*. 33; 256–266.
82. Streit, J, Graeber, y Kreutzberg, G. (1988). Functional plasticity of microglia: a review. *Glia* 1; 301-307.
83. Streit, W. y Colton (1996). El sistema inmunitario del cerebro, *Investigación y Ciencia*, 12; 16-21.
84. Streit J. Walter, Pennel NA (1999). Reactive Microgliosis. *Progress in neurobiology*. 57; 563-581.
85. Strijbos PJ, Rathwell NJ. (1995) Interleukin 1 beta attenuates excitatory amino-acid induced neurodegeneration in vitro: involvement of nerve growth factor. *Journal Neuroscience* 15; 3468.
86. Suzumura, A., Takeuchi, H., Zhang, G., Kuno, R., & Mizuno, T. (2006). Roles of glia-derived cytokines on neuronal degeneration and regeneration. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1088; 219-229.
87. Suzuki W, Amaral DG (2003) Perirhinal and parahippocampal cortices of the macaque monkey: cytoarchitectonic and chemoarchitectonic organization. *J*

Comp Neurol. 463; 67–91.

88. Tartaglia LA, Goeddel DV.(1992). Two TNF receptors. *Immunol Today*. 13; 151-153.
89. Tayebati SK, Amenta F. (2008). Transmitter Systems in Circulating Immune Cells: A Target of immunopharmacological interventions. *Medical Chemical*. 15; 3228-3247.
90. Tennant C, (2000). Work Stress and Coronary Heart Disease. *Journal of Cardiovascular Risk* 7; 273-276.
91. Tracey KJ, Lowry SF, Fahey TJ II, Albert JD, Fong Y, Hesse D (1987). Cachectin/tumour necrosis factor induces lethal shock and stress hormone response in the dog. *Surg Gynecol Obstet*. 164; 415-422.
92. Trad y Greenblatt, E. (1990). Psychological aspect of child stress: The development and the spectrum of coping responses. 12; 23-49.
93. Todd K, Butterworth R, (1999). Early microglial response in experimental thiamine deficiency: an immunohistochemical analysis. *Glia*. 25; 190–198
94. Town T, Nikolic V, Tan J, (2005). The microglial "activation" continuum: from innate to adaptive responses. *Journal Neuroinflammation* 2: 24.
95. Tomoda, akewi, akawatani, Junco, Takako, Hamada, Terushisa. (2009). Metabolic dysfunction and circadian rhythm abnormalities in adolescents with sleep disturbance. *Neuroimage*. 47; 21-26.
96. Turrin N. (2010). Brain. Immune signaling: Focus on pathogen recognition and PGE2 synthesis. *Brain Immune trends* 28; 1-10.
97. Vanitallie. T. (2002). Stress: a Risk Factor for Serious Illness. *Metabolism*, 51; 40-45.
98. Wang, X., Rousset, C. I., Hagberg, H., and Mallard, C. (2006). Lipopolysaccharide-induced inflammation and perinatal brain injury. *Semin. Fetal Neonatal Medic*. 11; 343–353.
99. Zelena D, Meryl Z, Foldes A, Kovacs KJ, Toth Z Makara GB. (2003) Role of hypothalamic inputs in maintaining pituitary-adrenal responsiveness in repeated restraint. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285; 1110-7.

100. Zhang SJ, (2013). Functional connectivity of the entorhinal–hippocampal space circuit. *Philos Trans Biology Science*. 369; 201 205.