



**Universidad Michoacana de San
Nicolás de Hidalgo
Instituto de Investigaciones sobre los
Recursos Naturales**



**Efecto del estrés temprano sobre la cognición y la
emocionalidad después de una lesión cerebral traumática
en ratas adultas y su relación con la plasticidad
hipocampal**

TESIS

Para obtener el título profesional de
MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA INTEGRATIVA

PRESENTA

L.B. Ana Fernanda Salinas García

Programa de Maestría en Ciencias en Ecología Integrativa del
Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales, UMSNH

Directora de tesis:

D.C. Esperanza Meléndez Herrera

Co- Directora de Tesis:

D.C. Naima Lajud Ávila

Morelia, Mich. Mayo de 2024

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	5
MARCO TEÓRICO	7
Estrés, alostasis y carga alostática	7
La respuesta al estrés	8
La hipótesis de Barker de la programación temprana y la relación entre los genes y el ambiente	11
El estrés durante las etapas tempranas de la vida	11
Modelos de experiencias adversas tempranas	13
El hipocampo, el aprendizaje y la memoria	14
Neurogénesis hipocampal	16
Efectos de ELS sobre el hipocampo, la neurogénesis y el aprendizaje	17
Las lesiones cerebrales traumáticas	19
Modelos de lesiones cerebrales traumáticas	21
ANTECEDENTES	23
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	24
CAPITULO 1	25
CAPITULO 2	27
DISCUSIÓN GENERAL	44
CONCLUSIÓN GENERAL	47
REFERENCIAS	48

Resumen

Estudios anteriores han demostrado que el estrés durante la vida temprana (ELS) afecta el aprendizaje espacial después de una lesión cerebral traumática (TBI) pediátrica. Sin embargo, aún es necesario evaluar si este aumento en la vulnerabilidad se mantiene cuando la lesión se realiza en ratas adultas. Por ello, nos planteamos el objetivo de evaluar el efecto del ELS sobre la cognición y la emocionalidad después de una TBI en ratas adultas y su relación con la plasticidad hipocampal. Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague Dawley, sometidas a separación materna (SM180) durante 3 horas durante los primeros 21 días postnatales (PND) como modelo de ELS, mientras que los controles (CONT) permanecieron sin manipular. En el DPN 110, las ratas fueron sometidas a un impacto cortical controlado leve (2.6 mm) o se mantuvieron como testigos (SHAM). El desempeño cognitivo se evaluó con el laberinto acuático de Morris (MWM) del día post lesión 14-19. La neurogénesis y la activación microglial fueron evaluadas 24 horas después de finalizar el MWM. La memoria a corto plazo se evaluó en la prueba de desplazamiento de objetos 14 días después de la lesión, y la emocionalidad se evaluó con las pruebas de campo abierto y nado forzado. Nuestros resultados indican que el grupo SM180+mTBI, pero no el CONT+mTBI, mostró déficits cognoscitivos en el MWM. La SM180 y la TBI causaron una disminución en la neurogénesis hipocampal de forma independiente, pero este efecto no se vio exacerbado en los animales SM180+mTBI. La SM180 y la mTBI causaron un aumento sinérgico en la activación microglial de la región CA1 del hipocampo. Los resultados indican que las ratas SM180+SHAM y CONT+mTBI, pero no las ratas SM180+mTBI, muestran deterioro cognoscitivo en la prueba de localización de objetos. Además, el grupo SM180+mTBI presentó mayor tiempo de inmovilidad en comparación con los grupos SHAM y el grupo CONT+mTBI en la prueba de nado forzado. Nuestros datos sugieren que la SM180 exagera los efectos de la mTBI en adultos sobre el desempeño cognoscitivo en el MWM, la neuroinflamación en CA1 del hipocampo, y la conducta tipo depresiva en el nado forzado. Adicionalmente, y de forma opuesta a nuestra hipótesis, observamos que la memoria de localización de objetos está intacta en animales con SM180+mTBI. La SM180 disminuye neurogénesis hipocampal y este efecto no se ve exacerbado por la mTBI. Estos datos apoyan la idea que el ELS tiene efectos adaptativos y maladaptivos diferenciales después de un segundo reto en la vida adulta, en este caso la lesión.

PALABRAS CLAVE: estrés durante la vida temprana, hipocampo, aprendizaje, emocionalidad, memoria

Abstract

Early life stress (ELS) affects cognitive performance and emotionality in adult animals. These effects are associated to a decrease in neurogenesis and an increase in neuroinflammation in the hippocampus. Previous studies have shown that ELS affects spatial learning after a mild pediatric traumatic brain injury (TBI). However, whether this increased vulnerability persists after an adult injury remains unknown. Therefore, we aimed to evaluate the effect of ELS on cognition and emotionality after a mild TBI in adult rats and its relationship to hippocampal plasticity. Male Sprague Dawley rats were subjected to 3-hour maternal separation (MS180) during the first 21 postnatal days (PND) as a model of ELS, while controls (CONT) remained undisturbed. At PND 110, rats underwent a mild controlled cortical impact (2.6 mm) or were kept as sham-operated (SHAM). Cognitive performance was assessed with the Morris water maze (MWM) from post-injury days 14-19. Neurogenesis and microglial activation were evaluated 24 hours after completing the MWM. Short-term memory was assessed in the object location test 14 days after injury, and emotional behavior was assessed with open field and forced swim tests. Our results indicate that the MS180+mTBI group, but not the CONT+mTBI group, showed cognitive deficits in the MWM. MS180 and TBI independently caused a decrease in hippocampal neurogenesis, but this effect was not exacerbated in MS180+mTBI animals. MS180 and mTBI caused a synergistic increase in microglial activation in the CA1 region of the hippocampus. Results indicate that MS180+mTBI rats, but not MS180+SHAM or CONT+TBI rats, exhibited cognitive impairment in the object location test. Additionally, the MS180+mTBI group showed increased immobility time compared to SHAM and CONT+mTBI groups in the forced swim test. Our data suggest that MS180 exacerbates cognitive impairment in the MWM, neuroinflammation in the CA1 hippocampal region, and depressive-like behavior in the forced swim test caused by mTBI in adult animals. Furthermore, contrary to our hypothesis, we observed intact object location memory in animals with MS180+mTBI. MS180 decreases hippocampal neurogenesis, and this effect is not exacerbated by mTBI. Thus, our data support the idea that ELS exerts differential adaptive and maladaptive effects after a second hit, such as TBI, later in life.

INTRODUCCIÓN

La exposición al estrés durante las etapas tempranas de la vida (early life stress, ELS) causa alteraciones cognoscitivas, aumenta el riesgo a desarrollar trastornos emocionales y a sufrir lesiones en la edad adulta (Heim et al., 1997; Aisa et al., 2007; Ruiz et al., 2018; Juruena et al., 2020; Roque et al., 2021). El ELS afecta la maduración y el desarrollo de la corteza prefrontal, la amígdala y el hipocampo (van Bodegom et al., 2017). Esto puede causar alteraciones en el aprendizaje, la memoria y la orientación espacial (Lupien et al., 2009; Baykara et al. 2013; Pervanidou & Chrousos, 2018). Adicionalmente, el ELS programa las respuestas fisiológicas del eje neuroendocrino hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales (HPA. Baykara et al., 2013; Lajud et al., 2012). Los procesos cognoscitivos como la memoria y el aprendizaje son esenciales para la supervivencia de los organismos en un entorno que se encuentra en constante cambio.

En la naturaleza, los organismos están expuestos a distintas amenazas como son las lesiones físicas que afectan el funcionamiento del sistema nervioso central. Estudios en modelos animales han mostrado que las lesiones cerebrales traumáticas (TBI, por sus siglas en inglés) causan alteraciones cognoscitivas; afectan la actividad del nicho neurogénico (Faul et al., 2010; Pearn et al., 2016; Needham et al., 2019) y aumentan la neuroinflamación hipocampal (Sun et al., 2020; Risbrough et al., 2022). En humanos las TBI son reportadas comúnmente en individuos que han sufrido ELS (OMS, 2016).

Debido a la dificultad del estudio de los efectos del ELS en los organismos silvestres, se han desarrollado diversos modelos en animales de laboratorio que nos permiten estudiar el fenómeno de forma controlada (Cattane et al., 2022). El modelo de ELS más estudiado es la separación maternal de 3h (SM180) en roedores. El modelo consiste en exponer a las crías a estrés crónico durante la vida temprana separándolas de su madre por períodos de tres horas diarias durante las primeras dos o tres semanas de vida (Plotsky & Meaney, 1993; Neumann et al., 2005; Lajud et al., 2012). La SM180 induce efectos a largo plazo, entre ellos un aumento en la reactividad del eje HPA, así como un aumento en la conducta tipo depresiva (Lajud

et al., 2012). Adicionalmente, se han reportado alteraciones cognoscitivas en las pruebas de reconocimiento patrones y de localización de objetos (Banqueri et al., 2017; Sánchez et al., 2021; Roque et al., 2021), el laberinto acuático de Morris y el laberinto de Barnes (Aisa et al., 2007; Hernández et al., 2016;).

El hipocampo es una estructura cerebral relacionada con la retroalimentación negativa del eje HPA, el aprendizaje, la memoria y la conducta tipo depresiva (Izquierdo et al., 2016, Chaaya et al., 2018). Además, contiene uno de los nichos neurogénicos que perduran activos a lo largo de toda la vida y es susceptible a los efectos del estrés (McEwen 2002). Estas nuevas neuronas participan en la modulación del asa de retroalimentación negativa del eje HPA (Snyder et al., 2011). Se ha observado que la SM180 afecta la neurogénesis en el hipocampo (Suri et al., 2013; Ruiz et al., 2018). Por lo que se ha propuesto que estos cambios en la neurogénesis podrían ser uno de los mecanismos que subyacen los efectos a largo plazo observados en los animales que sufrieron ELS (Lajud et al., 2015, Ruiz et al., 2018).

La SM180 tiene un efecto diferencial dependiente de la edad. Por ejemplo, Resultados previos mostraron que, en adolescentes, la SM180 aumenta los niveles de corticosterona basal, pero no causa déficits cognoscitivos, ni afecta la plasticidad hipocampal (Suri et al., 2013; 2013, Díaz Chávez et al., 2020); no obstante, la SM180 causa alteraciones claras sobre la reactividad del eje HPA, la plasticidad hipocampal y la conducta en adultos jóvenes, que se agravan en los animales maduros (Suri et al., 2013; Ruiz et al., 2018). Resultados previos de nuestro grupo mostraron que la SM180 aumenta la vulnerabilidad a una TBI pediátrica (Díaz Chávez et al., 2020); sin embargo, el efecto de la SM180 después de una lesión en animales adultos ha sido poco estudiado. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la vulnerabilidad a las TBI inducida por ELS también podría aumentar con la edad. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del ELS sobre la cognición y la emocionalidad después de una TBI en ratas adultas y su relación con la plasticidad hipocampal.

MARCO TEÓRICO

Estrés, alostasis y carga alostática

En 1950, el fisiólogo Hans Selye acuñó el término “estrés” para describir una respuesta inespecífica del organismo ante estímulos adversos. Selye denominó la respuesta al estrés como el “Síndrome general de adaptación” y describió tres etapas. En la etapa de alarma el organismo percibe el estímulo adverso, en la etapa de adaptación se activa la respuesta inespecífica del organismo que le permite superar o adaptarse a las exigencias del estímulo adverso, y por último la etapa de agotamiento donde si el estímulo adverso se prolonga, la respuesta del organismo ante el estímulo se vuelve ineficiente (Selye 1950).

La homeostasis y la alostasis fueron dos términos que ampliaron el concepto de estrés. Cannon (1929) fue el primero en utilizar el término de homeostasis que se refiere a los mecanismos mediante los cuales el organismo mantiene su equilibrio fisiológico ante algún estímulo adverso. A su vez, Sterling y Eyer (1988) propusieron el término alostasis que se puede definir como la serie de procesos mediante los cuales el organismo mantiene su estabilidad a través del cambio. McEwen y Akil (2020) definen a la alostasis como: “el proceso activo mediante el cual los organismos se adaptan a las posibles amenazas y cambios en su entorno con el fin de mantener la homeostasis y promover la supervivencia”.

Eventualmente, el concepto de estrés de Selye cayó en desuso, ya que no permite diferenciar entre los efectos adaptativos y mal adaptativos del estrés y no considera que los organismos no solo son capaces de responder ante un estímulo adverso, sino que también son capaces de aprender a anticiparlo, regular sus respuestas y efectuarlas para mitigar o eludir el estímulo adverso (Ramsay y Woods, 2014). Por esto, en la actualidad podemos definir al estrés como el conjunto de respuestas fisiológicas ante un estímulo que amenace la homeostasis del organismo: estas respuestas son reguladas por el eje HPA en mamíferos (Stephens et al., 2012; McEwen & Akil, 2020).

El estrés se puede clasificar según el tiempo que dura el estímulo adverso y sus efectos. El estrés agudo ocurre durante un periodo corto y en respuesta a un solo episodio adverso. Al presentarse el estímulo amenazante se liberan mediadores químicos como las catecolaminas y los glucocorticoides (GC). Estos cambios están destinados a ser pasajeros y posteriormente restaurar la homeostasis del organismo (Sapolsky et al., 2000; McEwen, 2007; Zárata et al., 2014). Mientras que, el estrés crónico, ocurre cuando se expone a un individuo de forma prolongada y/o constante ante un estímulo adverso. Esto provoca que los niveles de los GC se eleven de forma indefinida, lo que impide restaurar la homeostasis del individuo y desencadena efectos negativos a la salud (Sapolsky et al., 2000; McEwen, 2007; Zárata, et al., 2014). Los mediadores de la respuesta al estrés tienen efectos bifásicos, por lo que es importante mantener un balance entre estos (Ramsay & Woods, 2014; McEwen, 2017). La alostasis es el proceso que permite mantener el equilibrio entre los mediadores de manera dinámica, esto promueve efectos adaptativos (McEwen & Akil, 2020). Un exceso o una actividad desequilibrada de los mediadores de la respuesta al estrés provoca efectos maladaptativos en el individuo, a esto se le conoce como sobrecarga alostática (Ramsay & Woods, 2014; McEwen, 2017).

La respuesta al estrés

La respuesta al estrés ocurre en dos etapas: una rápida mediada por el sistema nervioso autónomo (SNA), y una lenta mediada por el eje HPA. El SNA inerva los órganos del músculo liso, el sistema vascular, las diversas glándulas y el corazón. Este sistema forma plexos con el corazón y los pulmones, el tracto gastrointestinal, el sistema genitourinario y los vasos sanguíneos. De esta forma, el SNA puede realizar ajustes en la respiración, la circulación, la digestión y las respuestas inmunitarias y reproductivas, para mantener el balance de la homeostasis interna. La activación del SNA moviliza fuentes de energía y la liberación de catecolaminas, que favorecen la respuesta rápida de “enfrentamiento o huida” en situaciones de estrés (Purves & Williams, 2001; Squire, 2003; Sapolsky et al., 2000; McEwen, 2007).

Por otro lado, durante la activación de la respuesta lenta al estrés mediada por el eje HPA, el hipotálamo es activado por los estímulos sensoriales, y esto conduce a la liberación de una cascada de hormonas (Lupien et al., 2005). La hormona liberadora de corticotropina (CRH) y el neuropéptido arginina vasopresina (AVP) se secretan en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) y ambas llegan a la glándula hipófisis para estimular la secreción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH). La ACTH se vierte a la circulación periférica hasta llegar a las glándulas suprarrenales donde estimula la secreción de los GC (Fig. 1). Los principales GC efectores de la respuesta al estrés son la corticosterona en roedores y el cortisol en humanos. Durante la activación de la respuesta al estrés los GC promueven la movilización de fuentes de energía, inducen la lipólisis y proteólisis (Sapolsky et al., 2000; McEwen, 2007; Herman et al., 2016).

Los GC interactúan con dos tipos de receptores en el cerebro, los receptores tipo 1 o mineralocorticoides (MR) y los tipo 2 o glucocorticoides (GCR, Groeneweg et al., 2011). En condiciones fisiológicas, cuando las concentraciones de GC son bajas, los MR se encuentran ocupados de forma casi permanente debido a que tienen una mayor afinidad por su ligando que los receptores tipo 2 (DeRijk et al., 2011; McEwen, 2007). Por su parte, los GCR que tienen una menor afinidad, sólo se activan cuando las concentraciones de glucocorticoides aumentan, como en los estados de estrés (de Kloet et al., 2005). Los GCR se encuentran distribuidos en todo el cerebro, principalmente en la hipófisis, el hipotálamo, la corteza prefrontal y el hipocampo (McEwen, 2017). En estas estructuras son mediadores del asa de retroalimentación negativa del eje HPA, lo cual permite inhibir la respuesta al estrés y restaurar la homeostasis (McEwen, 2002; 2017).

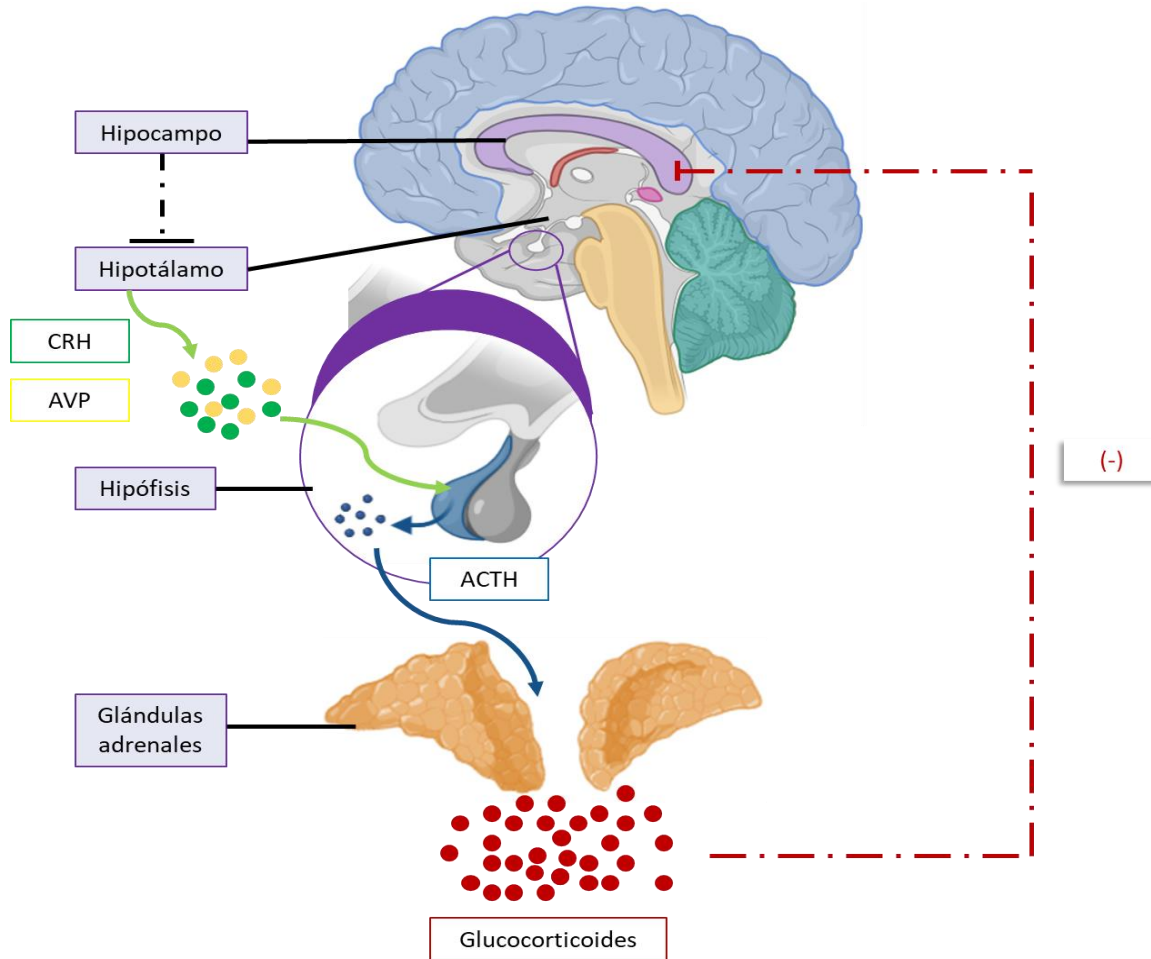


Figura 1. Esquema del eje hipotálamo–hipófisis–adrenal (Creado con BioRender.com)

En conjunto, estos cambios biológicos preparan al organismo para tener un desempeño óptimo bajo condiciones adversas, pero están destinados a ser transitorios (McEwen, 2002). Cuando el estrés se vuelve crónico, estos cambios se mantienen por periodos más largos, lo que causa sobrecarga alostática (Ramsay & Woods, 2014; McEwen, 2017). Los efectos bifásicos de las acciones de los mediadores de la alostasis se pueden observar claramente con los efectos de los GC, que actúan en conjunto con otros mediadores. De forma aguda, los GC y las catecolaminas mejoran la inmunidad adquirida y la memoria, además los GC por sí solos tienen efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores. De forma crónica, los

niveles de GC se han asociado con efectos maladaptativos como el síndrome metabólico, la atrofia hipocampal y alteraciones conductuales (McEwen, 2002, 2017).

La hipótesis de Barker de la programación temprana y la relación genes por el ambiente

En las etapas tempranas los organismos pueden percibir las características del ambiente en el que se desarrollan y desarrollar un fenotipo acorde a éste, a esto se le conoce como programación temprana (Daskalakis, et al., 2013). Barker y colaboradores (1993) fueron los primeros en evidenciar que el ambiente donde se desarrolla el individuo influye sobre su fenotipo. En un estudio sobre prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 e hipertensión en hombres de 64 años, se observó que aquéllos que presentaron un menor peso al nacer tuvieron mayor riesgo a desarrollar estas enfermedades (Barker, et al., 1993). Barker propuso que el estado nutricional de la madre influye en el estado nutricional del feto, una mala nutrición provoca cambios estructurales y funcionales en diferentes sistemas y órganos. A largo plazo, estos cambios se asocian con la aparición de enfermedades. Otro ejemplo de programación temprana es la de los renacuajos del género *Spea* que producen morfos inducidos por el ambiente: un morfo omnívoro de desarrollo más lento y un morfo carnívoro de desarrollo más rápido que es inducido por la presencia de alimento y se especializa en presas animales, como camarones de hadas (Sommer, 2020). También, se ha observado que la plasticidad fenotípica asociada a las estaciones que ocurre en la forma de las alas de una gran diversidad de mariposas esta mediada por cambios en mediadores endócrinos causados por las variaciones ambientales durante el desarrollo embrionario (Van de Burg et al., 2021). En general, es aceptado que los individuos en desarrollo son susceptibles al ambiente debido a que esto les permite generar cambios fenotípicos y adaptarse a su entorno.

El estrés en etapas tempranas de la vida (ELS)

En adultos, los efectos negativos del estrés desaparecen gradualmente una vez que se elimina el factor estresante; no obstante, cuando la exposición ocurre

durante las etapas tempranas de la vida, sus consecuencias son permanentes. El estrés temprano, como un cuidado materno deficiente o fragmentado durante las etapas tempranas de la vida, afecta la maduración y el desarrollo de las estructuras cerebrales. Esto aumenta la vulnerabilidad a presentar psicopatologías y problemas a la salud a largo plazo (Juruena *et al.*, 2020).

La hipótesis más aceptada sugiere que la exposición al ELS causa alteraciones en programa la reactividad del eje HPA a largo plazo (van Bodegom *et al.*, 2017). Se ha observado que los individuos que sufrieron ELS muestran un aumento en la actividad basal del eje HPA a nivel de CRH y corticosterona (Roque *et al.*, 2022; Peles *et al.*, 2023; Cevik *et al.*, 2023). También hay otros estudios que muestran que el ELS puede causar un aumento en la reactividad del eje haciéndolo que los individuos sean más vulnerables a estresores posteriores (Saavedra *et al.*, 2022; Nederhof & Schmidt, 2012). La hipótesis de la programación del eje HPA establece que los puntos de referencia sobre los que va a funcionar el eje se establecen en las etapas temprano y su reactividad se ve programada para el resto de su vida (Lupien *et al.*, 2009; Juruena *et al.*, 2020).

En mamíferos, durante el desarrollo temprano distintas estructuras cerebrales se encuentran en maduración, tales como el hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal, por lo que son susceptibles a los efectos del ELS (Lupien *et al.*, 2009; Pervanidou & Chrousos, 2018). El hipocampo es una estructura que se desarrolla de manera posnatal, y su nivel máximo de neurogénesis ocurre al día posnatal (DPN) 5. Este periodo es una ventana de mayor vulnerabilidad al estrés. Datos de nuestro grupo de trabajo han mostrado que el estrés temprano disminuye la neurogénesis en el hipocampo al DPN15 (Lajud, *et al.*, 2012) y estos efectos perduran hasta la edad adulta (Mirescu & Gould, 2006; Lajud & Torner, 2015; Suri *et al.*, 2013; Ruiz *et al.*, 2018). Por otro lado, se ha observado un cambio en la tasa de GCR en el hipocampo, siendo menor en los animales estresados (Meaney *et al.*, 1991; De Kloet *et al.*, 1998; Bonapersona *et al.*, 2019). Estas alteraciones se han relacionado con problemas de aprendizaje y memoria dependiente del hipocampo (Oomen *et al.*, 2010).

Los efectos negativos del ELS se pueden explicar con base en dos hipótesis. La hipótesis de estrés acumulativo propone que un organismo que ha sufrido estrés temprano es vulnerable a que un segundo evento adverso tenga un efecto aditivo que ponga en peligro su supervivencia (Nederhof & Schmidt, 2012). Es decir, que la acumulación crónica y sostenida de sobrecarga alóstática asociada a la programación de la respuesta al estrés tiene como consecuencia un agotamiento de los sistemas biológicos de alostasis y la aparición de patologías. Por su parte, la hipótesis del desajuste evolutivo nos explica los efectos del estrés desde otra perspectiva. Un individuo que sufrió ELS estará mejor adaptado para desenvolverse en un ambiente adverso en la vida adulta, pero si el ambiente no concuerda con el fenotipo puede producir patologías (Nederhof & Schmidt, 2012).

Modelos de experiencias adversas tempranas

Debido a la enorme variabilidad de factores estresantes que pueden ocurrir en la fauna silvestre es necesario usar modelos donde se controlen las variables y así tener un mayor entendimiento del fenómeno de ELS. Existen distintos modelos utilizados para evaluar los efectos del estrés durante las etapas tempranas de la vida, tales como el cuidado materno fragmentado inducido por la limitación de material de cama, la deprivación maternal por 24 horas y la separación maternal periódica. La SM180 en roedores es el más usado para reproducir los efectos del ELS y consiste en separar a las crías de sus madres por periodos de tres horas diarias durante las primeras dos o tres semanas de vida (Orso et al., 2019; Cui et al., 2020; Nishi, 2020). Este es un periodo lo suficientemente largo para activar la respuesta del eje HPA de las crías sin afectar su patrón de alimentación o causar desnutrición.

A largo plazo, los animales con SM muestran desregulación del eje HPA, y mayor secreción de GC en condiciones basales (Liu et al., 1997; Plotsky & Meaney 1986; Hout et al., 2002; Lajud et al., 2012). Se ha reportado que los animales SM tienen un peor desempeño en pruebas de memoria, como el laberinto acuático de Morris, la prueba de reconocimiento de patrones y localización de objetos (Aisa et

al., 2007; Banqueri et al., 2017; Sanchez *et al.*, 2021). Además, la SM aumenta la conducta tipo depresiva en la prueba de nado forzado y la conducta de ansiedad en el campo abierto y en laberinto elevado en cruz (George et al., 2010; Wei et al., 2010; Cui et al., 2020; Hamdan, et al., 2022). También aumenta la activación microglial en el hipocampo (García- Rubio et al., 2016; Bachiller et al., 2020).

El hipocampo, el aprendizaje y la memoria

El hipocampo es una estructura cerebral que está formada por el *Cornu Ammonis* (CA) y que se divide en: CA1, CA2 y CA3, el giro dentado, el complejo subicular y la corteza entorrinal. Estas regiones forman una apariencia trilaminar. Las dendritas de las células piramidales en la región de CA1 forman una delgada capa (*stratum radiatum*) donde reciben las sinapsis de las colaterales de Schaffer, es decir, de los axones de las células piramidales de CA3. Las células granulares del giro dentado proyectan sus fibras musgosas a la región de CA3 del hipocampo, mientras que los axones de las células colaterales de CA3 envían sus proyecciones a la capa polimórfica del giro dentado (Fig. 2) (Paxinos, 2004; Witter et al., 2000; Aimone et al., 2014; Hernández, et al., 2016).

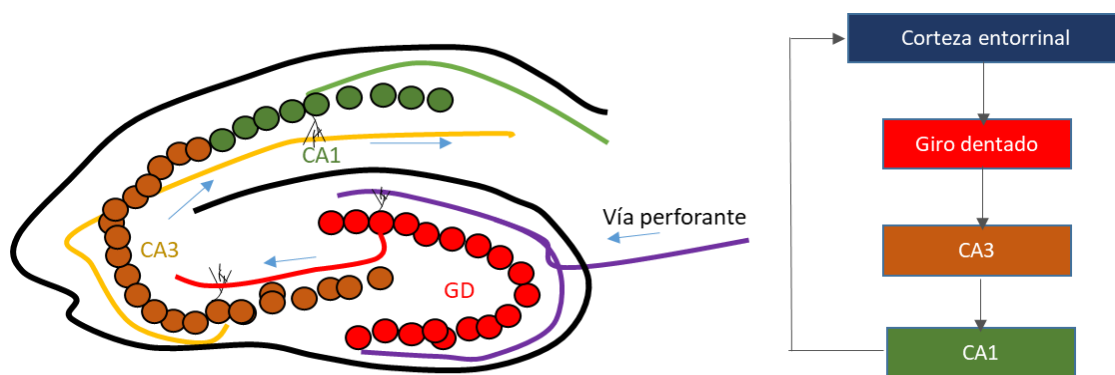


Figura 2. El circuito hipocampal. Las células musgosas del giro dentado (GD) reciben la información de la vía perforante y éstas envían sus proyecciones a CA3, cuyas neuronas proyectan hacia CA1 para comunicarse con la corteza entorrinal (Modificado de Paxinos, 2004).

El aprendizaje y la memoria son procesos cognoscitivos importantes para el desarrollo de los organismos, ya que permiten que el individuo tenga la capacidad de adaptarse a un entorno que está en constante cambio. La memoria es resultado del aprendizaje. En mamíferos se han observado diferentes tipos de memoria donde están involucradas diferentes estructuras cerebrales (Hernández et al., 2016). El hipocampo se ha relacionado con la memoria declarativa que permite el almacenamiento de hechos y eventos. Un tipo de memoria declarativa es la memoria espacial, la cual consiste en almacenar y recuperar información sobre rutas, configuraciones y localizaciones espaciales. Las lesiones en el hipocampo en individuos con amnesia producen déficits selectivos en la memoria declarativa; sin embargo, la capacidad de distinguir nuevos objetos con base en su familiaridad permanece intacta (Giovanello et al., 2003; Eichenbaum et al., 2014).

La capacidad de recordar información es esencial para la supervivencia y el éxito adaptativo de los organismos. La memoria a corto plazo permite retener una cantidad limitada de información durante un período breve, es fundamental para procesos cognoscitivos inmediatos, como la toma de decisiones rápidas y la resolución de problemas. Por otro lado, la memoria a largo plazo tiene la capacidad de almacenar una gran cantidad de información de manera indefinida, facilitando el aprendizaje continuo y la adaptación a lo largo del tiempo. La neuroinflamación puede alterar la neurogénesis, lo que afecta el aprendizaje y la memoria (Loane et al., 2016; Lozano et al., 2021). Las nuevas neuronas generadas en el hipocampo proporcionan, parcialmente, el sustrato anatómico que procesa y codifica la nueva información adquirida (Mirescu & Gould, 2006; Eichenbaum et al., 2014).

Trabajos en humanos y animales han mostrado que la memoria espacial se ve afectada después de que el hipocampo sufre algún daño (Hernández, et al., 2016). De igual manera, se propone que el ELS induce modificaciones sobre la formación hipocampal, lo que provoca problemas de aprendizaje y memoria en la edad adulta (Cohen et al., 2016; Tractenberg et al., 2016; Frank et al., 2019).

Neurogénesis hipocampal

La neurogénesis es el proceso de generación, diferenciación, maduración e integración de nuevas neuronas (Cope & Gould, 2019; Gage, 2019). En la vida adulta sólo hay dos regiones que presentan un nicho neurogénico: la zona subventricular y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo. Esta última región tiene una mayor actividad neurogénica (Mirescu & Gould, 2006; Fares et al., 2019).

La neurogénesis inicia con la proliferación de las células madre gliales radiales que se encuentran en la zona subgranular del giro dentado; estas células tienen la capacidad de originar neuronas o astrocitos nuevos (Cope & Gould, 2019; Fares et al., 2019). La progenie de las células madre gliales radiales se denomina células progenitoras neurales. Estas células inmaduras migran desde la zona subgranular hacia la zona granular del giro dentado e inician su diferenciación a neuronas maduras. Estas nuevas neuronas maduras que sobreviven se integran al circuito del hipocampo, y realizan funciones cognitivas y conductuales (Cope & Gould, 2019; Gage, 2019. Fig. 3).

El nicho neurogénico del hipocampo perdura activo durante toda la vida y es susceptible a diferentes estímulos ambientales, como el aprendizaje, el ejercicio, el enriquecimiento ambiental o el estrés (McEwen, 2002; Mirescu & Gould, 2006; Cope & Gould, 2019; Gage, 2019). Por ejemplo, el aprendizaje, el ejercicio y el enriquecimiento promueven la neurogénesis, mientras que el estrés la inhibe (Mirescu & Gould, 2006; Cope & Gould, 2019).

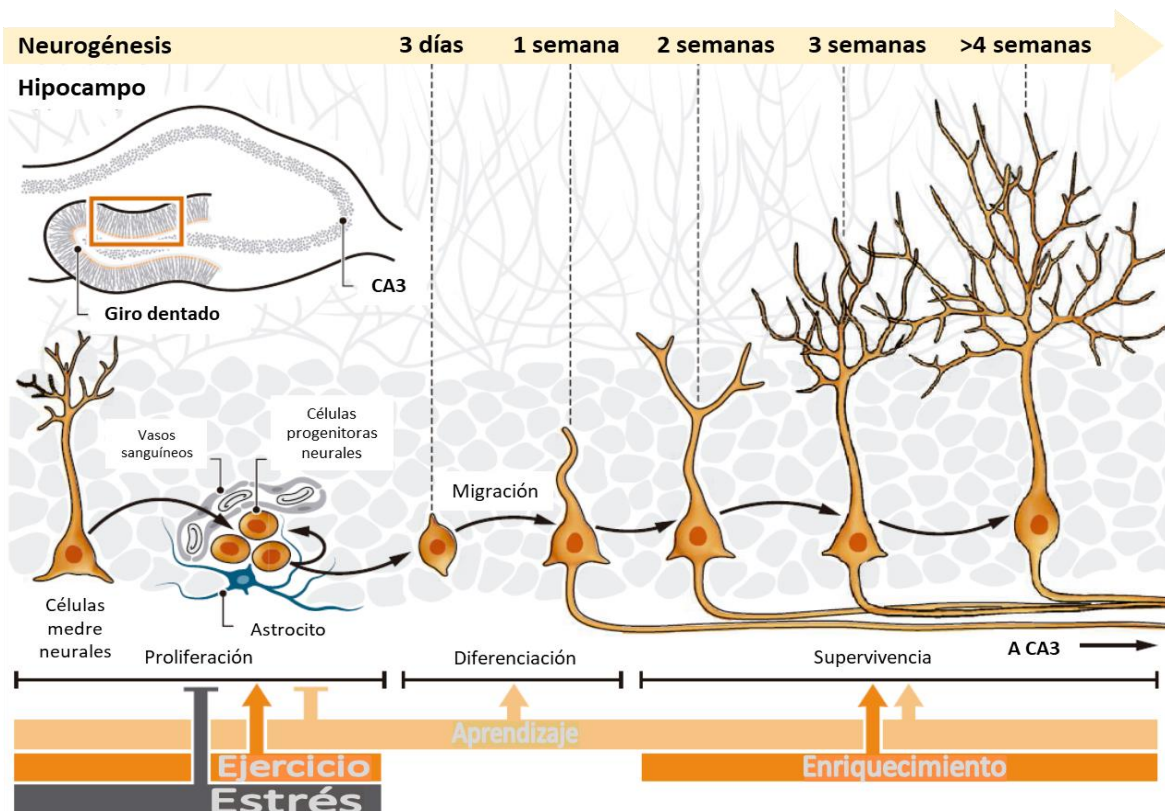


Figura 3. Esquema de la neurogénesis hipocámpica y de los estímulos ambientales que la afectan (tomado y modificado de Gage, 2019).

Efectos de ELS sobre el hipocampo, la neurogénesis y el aprendizaje

El hipocampo es una estructura altamente plástica y vulnerable a los efectos del estrés debido a que posee una alta concentración de GCR, principalmente en las etapas tempranas del desarrollo (McEwen, Gould and Sakai, 1992; Sapolsky et al., 2000; Lupien et al., 2009). Además de su participación en el aprendizaje y la memoria, el hipocampo es una región encargada del asa de retroalimentación negativa del eje del estrés (Izquierdo et al., 2016, Chaaya et al., 2018). El ELS se ha asociado con la atrofia hipocámpica, un menor número de neuronas nuevas en el hipocampo y problemas de aprendizaje y memoria en la edad adulta (Huot et al., 2002; Mirescu & Gould, 2006; Cope & Gould, 2019). La neurogénesis del hipocampo también se ve afectada por lesiones en el sistema nervioso central (Zhang et al., 2020).

Las consecuencias del protocolo de SM dependen de la etapa de desarrollo, la duración y la cantidad de días de la experiencia de separación. Se ha observado que la SM180 durante las primeras dos semanas de vida no afecta el desempeño cognitivo de animales adultos evaluados en el MWM (Hout et al., 2002; Aisa et al., 2007; Diehl et al., 2012; Xue et al., 2013). Además, resultados previos de nuestro grupo mostraron que la SM180 por 3 horas al día del DPN1 al 21 tampoco afecta el desempeño cognitivo en animales adolescentes (Díaz et al., 2020). Sin embargo, se ha observado que la SM por 4 horas (SM240) del DPN 1 al 21 sí causa alteraciones en el MWM de adolescentes (Wang et al., 2015) y adultos (Banqueri et al., 2017).

Durante las primeras dos semanas de vida se ha observado que las crías de roedores tienen una respuesta al estrés atenuada ante estímulos ambientales, a este lapso se le conoce como "período hipo-responsivo al estrés" (SHRP, por sus siglas en inglés). Durante este período, los receptores a GCR en el hipocampo son menos sensibles a la corticosterona, lo que provoca una inhibición en la liberación de CRH (Sapolsky y Meaney, 1986). Esto contribuye a mantener los niveles de GCR adecuados para la maduración y desarrollo del cerebro (Sapolsky y Meaney, 1986; Gunnar y Cheatham, 2003). Un estímulo estresante etiológicamente adecuado para las crías, como la SM, activa la respuesta al estrés incluso durante el SHRP (Lajud et al., 2012). La SM en crías disminuye la neurogénesis en el hipocampo sin alterar los niveles de corticosterona de forma crónica durante el desarrollo (Lajud et al., 2012). Se sabe que la mayoría de las neuronas granulares del hipocampo se desarrollan y extienden sus axones entre los días DPN1 al 21 de vida (Huot et al., 2002). Este pico de neurogénesis coincide con el período de hiporrespuesta al estrés (DPN4-14), y la exposición a niveles elevados de corticosterona durante el período neonatal puede afectar el desarrollo del hipocampo (Schlessinger et al., 1975; Amaral et al., 1981; Bayer et al., 1982). En la edad adulta, los animales SM muestran disminución en la neurogénesis hipocámpal, la expresión del receptor a glucocorticoides y un aumento en los niveles basales de corticosterona (Mirescu et al., 2004). La SM aumenta el número de espinas sinápticas en las células granulares del hipocampo (Zetter et al., 2021). Los efectos de la SM sobre el hipocampo se han

relacionado con alteraciones en los procesos de aprendizaje y memoria en individuos adultos (Huot et al., 2002).

Las lesiones cerebrales traumáticas (TBI)

Las TBI son contusiones provocadas por una fuerza externa que altera el funcionamiento del cerebro. Dependiendo de la gravedad de la TBI, puede provocar problemas de salud a corto o largo plazo, como pérdida de la conciencia y déficits en el aprendizaje y la memoria (Faul et al., 2010; Pearn et al., 2016).

En su entorno natural, los animales están constantemente expuestos a lesiones que pueden afectar el funcionamiento de su sistema nervioso central. Estas lesiones pueden ocurrir debido a la depredación, las peleas para proteger el territorio y los accidentes de tránsito (Seiler et al., 2004; Ackermans et al., 2021). La mayoría de estos animales son diagnosticados con fracturas y otros tipos de lesiones, como las TBI, que causan trastornos neurológicos y de comportamiento (Seiler et al., 2004). Por ejemplo, en los bovinos combativos durante la temporada reproductiva, muchos animales machos artiodáctilos (mamíferos con pezuñas pares y cetáceos) realizan exhibiciones luchando con sus cabezas, cuernos o astas como muestra de dominancia en su jerarquía social (Ackermans et al., 2021, 2022). Este tipo de bovinos exhiben tauopatías relacionadas con las TBI causadas por las embestidas a pesar de la anatomía del cráneo (Ackermans et al., 2021, 2022). En cetáceos también se ha reportado alteraciones en la fisiología, el comportamiento y la integridad cerebral causadas por TBI producidas por las ondas de presión submarinas de explosiones asociadas con actividades de construcción, sísmicas, caza con arpones explosivos o comportamiento de embestida (Ackermans et al., 2021). El estudio de las TBI en aves es difícil debido a la falta de conocimiento sobre su neurofisiología (Ackermans et al., 2021). Los pájaros carpinteros son conocidos por su habilidad para golpear sus cabezas poderosamente contra los árboles, aparentemente sin experimentar lesiones debido a su anatomía, pero aun así se

han reportado acumulaciones de tau fosforilada en todo el cerebro de estas aves, aunque no se asocian con alteraciones conductuales (Ackermans et al., 2021).

Después de una TBI, se desencadenan procesos fisiopatológicos complejos, que generan daño tanto a nivel estructural como funcional (Pavlovic et al., 2019). El daño provocado por una TBI se puede clasificar en dos fases. La primera fase es la lesión primaria. Esta ocurre por la deformación del tejido cerebral causada por la fuerza producida por el impacto, lo que implica la pérdida de células (Pearn et al., 2016; Needham et al., 2019). El daño provocado por la lesión primaria desencadena una serie de cambios metabólicos, bioquímicos e inflamatorios que provocan que el daño se extienda a zonas no impactadas del cerebro (Ji et al., 2012; Pearn et al., 2016; Pavlovic et al., 2019). Las células dañadas liberan moléculas que son reconocidas por las células inmunitarias residentes e infiltradas, a través de receptores de reconocimiento de patrones. Además, los astrocitos, la microglía y las neuronas dañadas en el sitio de la lesión secretan citocinas y quimiocinas (Loane et al., 2016). Estos mediadores inmunitarios activan a la microglía y los astrocitos en el sitio de la lesión y reclutan células inmunitarias periféricas que atraviesan la barrera hematoencefálica dañada durante el período agudo de la lesión. Estos procesos moleculares dan lugar a la lesión secundaria, que puede ocurrir horas o semanas después del impacto inicial (Maas et al., 2008). La lesión secundaria incluye la excitotoxicidad (provocada por la liberación masiva de glutamato), el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la alteración de la barrera hematoencefálica y la inflamación (Lozano et al., 2021). La liberación de citocinas, quimiocinas y radicales libres obstaculizan la reparación cerebral y contribuyen a la neuroinflamación crónica, los deterioros cognoscitivos y conductuales a largo plazo (Loane et al., 2016).

En el sistema nervioso central sano, la microglía elimina los desechos celulares sin cambiar su fenotipo ramificado. En cambio, en respuesta a lesiones o infecciones, la microglía se activa, lo que resulta en cambios morfológicos y en la expresión génica. La neuroinflamación es un componente clave del entorno patológico de las TBI, y dependiendo de los tipos de células involucradas, su estado

de activación y la temporalidad (ya sea aguda o crónica), puede tener efectos tanto perjudiciales como favorables en la neurogénesis adulta (Loane et al., 2016; Lozano et al., 2021).

Modelos de TBI

Los modelos animales se centran en estudiar las consecuencias de una TBI sobre el desempeño cognoscitivo. Los déficits que se presentan posterior a una TBI se deben a la muerte celular y a la pérdida de las conexiones neuronales de diversas estructuras, como lo son la corteza prefrontal, la amígdala y el hipocampo, las cuales están estrechamente relacionadas con los procesos del aprendizaje y la memoria (Colicos et al., 1996). Se ha reportado que los animales que han sufrido una TBI tienen un peor desempeño en las tareas que evalúan el aprendizaje y memoria (Bondi et al., 2014; Algamal et al., 2019). En la fauna silvestre las TBI son heterogéneas y de naturaleza diversa, por lo que las características y consecuencias de cada TBI varían según el individuo, su causa y localización (Prieto *et al.*, 2009; Xiong *et al.*, 2013). Por esto, se han diseñado diversos modelos para el estudio de las lesiones cerebrales, el impacto cortical controlado (CCI) es uno de los más utilizados.

El CCI utiliza un dispositivo de aire comprimido que empuja un impactador sobre la duramadre intacta (Fig. 4). La severidad de la lesión se controla al ajustar los parámetros mecánicos como: el ángulo, la velocidad y la profundidad del impacto. Al tener control sobre estos parámetros permite que el CCI tenga una gran reproducibilidad (Romine *et al.*, 2014).

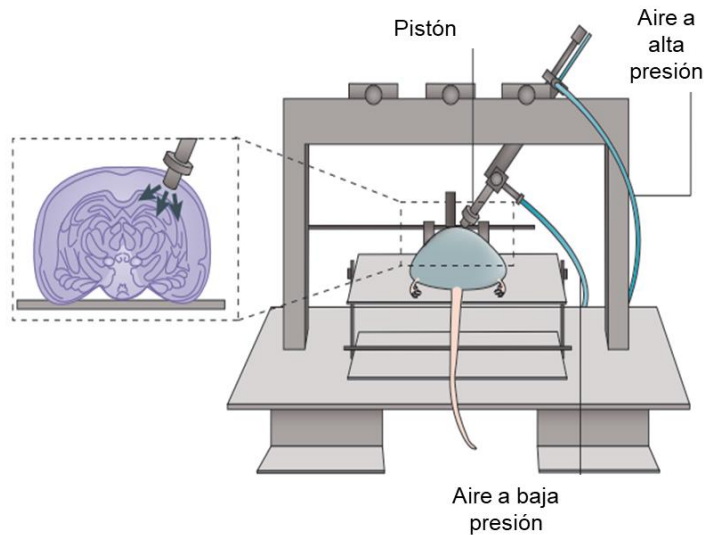


Figura 4. Representación del modelo de impacto cortical controlado (tomado de Xiong, et al., 2013).

El CCI es un modelo que produce pérdida de tejido cortical, hematoma subdural agudo, lesión axonal, conmoción cerebral, disfunción de la barrera hematoencefálica e incluso induce estado de coma (Xiong, *et al.*, 2013). En murinos se ha observado que el CCI disminuye el desempeño cognoscitivo en pruebas como el laberinto acuático de Morris (MWM), el laberinto de Barnes, y el reconocimiento de patrones (Paterno *et al.*, 2017). Los déficits se han asociado a los procesos de neurodegeneración e inflamación que causan una atrofia progresiva de la corteza y el hipocampo (Xiong *et al.*, 2013; Semple *et al.*, 2016).

ANTECEDENTES

La SM180 tiene un efecto diferencial dependiente de la edad. Por ejemplo, Resultados previos mostraron que, en adolescentes, la SM180 aumenta los niveles de corticosterona basal, pero no causa déficits cognoscitivos, ni afecta la plasticidad hipocampal (Suri et al., 2013; Díaz-Chávez et al., 2020); no obstante, la SM180 causa alteraciones claras sobre la reactividad del eje HPA, la plasticidad hipocampal y la conducta en adultos jóvenes, que se agravan en los animales maduros (Suri et al., 2013; Ruiz et al., 2018). Datos de nuestro grupo de trabajo han mostrado que la SM180 aumenta la vulnerabilidad a una TBI pediátrica de intensidad moderada (mTBI) causando déficits en el desempeño cognoscitivo en el MWM. A su vez, estas alteraciones se relacionan con un aumento en marcadores de inflamación hipocampal (Díaz Chávez *et al.*, 2020). En conjunto, estos hallazgos sugieren que la vulnerabilidad a las TBI inducida por ELS también podría aumentar con la edad.

Posteriormente, Sánchez y colaboradores (2020) observaron déficits en el aprendizaje y memoria en animales sometidos a la SM180 y mTBI a la edad de 2 meses al realizar pruebas de condicionamiento contextual del miedo y en el MWM. Además, también observaron que la combinación de la SM180 y la mTBI exagera la atrofia cortical. Sin embargo, aún es necesario evaluar si la separación maternal exagera las alteraciones cognoscitivas, conductuales y en la emocionalidad causadas por una TBI en animales adultos, y si estas alteraciones se asocian con disminución en la neurogénesis hipocampal y con la neuroinflamación.

HIPÓTESIS

La separación maternal exagera las alteraciones cognoscitivas y la emocionalidad causadas por una TBI en animales adultos. Estas alteraciones se asocian con disminución en la neurogénesis hipocampal y con neuroinflamación.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de la separación maternal sobre la cognición y la emocionalidad después de una lesión cerebral traumática en ratas adultas y su relación con la neurogénesis hipocampal y con neuroinflamación.

Objetivos particulares

1. Determinar el efecto de la separación maternal sobre el aprendizaje espacial y su relación con la neurogénesis hipocampal y la inflamación en animales con TBI
2. Determinar si la TBI exagera los efectos de la separación maternal sobre la emocionalidad y la memoria de asociación objeto-lugar

El Capítulo 1 cumple con el primer objetivo particular, mientras que el segundo objetivo se aborda en el Capítulo 2.

CAPÍTULO 1



Open camera or QR reader and scan code to access this article and other resources online.

ORIGINAL ARTICLE

PATHOPHYSIOLOGICAL MECHANISMS

Early Life Stress Negatively Impacts Spatial Learning Acquisition and Increases Hippocampal CA1 Microglial Activation After a Mild Traumatic Brain Injury in Adult Male Rats

Ana Fernanda Salinas-García,^{1,2} Angélica Roque,^{1,2} Jonathan Zamudio-Flores,^{1,2} Esperanza Meléndez-Herrera,² Anthony E. Kline,^{3–8} and Naima Lajud^{1,*}

Abstract

Early life stress (ELS) affects neurogenesis and spatial learning, and increases neuroinflammation after a pediatric mild traumatic brain injury (mTBI). Previous studies have shown that ELS has minimal effects in juveniles but shows age-dependent effects in adults. Hence, we aimed to evaluate the effects of ELS in adult male rats after an mTBI. Maternal separation for 180 min per day (MS180) during the first 21 post-natal (P) days was used as the ELS model. At P110, the rats were subjected to a mild controlled cortical impact injury (2.6 mm) or sham surgery. Spatial learning was evaluated in the Morris water maze (MWM) 14 days after surgery and both microglial activation and neurogenesis were quantified. The results indicate that MS180 + mTBI, but not control (CONT) + mTBI, rats show deficiencies in the acquisition of spatial learning. mTBI led to comparable increases in microglial activation in both the hilus and cortical regions for both groups. However, MS180 + mTBI rats exhibited a greater increase in microglial activation in the ipsilateral CA1 hippocampus subfield compared with CONT + mTBI. Interestingly, for the contralateral CA1 region, this effect was observed exclusively in MS180 + mTBI. ELS and mTBI independently caused a decrease in hippocampal neurogenesis and this effect was not increased further in MS180 + mTBI rats. The findings demonstrate that ELS and mTBI synergistically affect cognitive performance and neuroinflammation, thus supporting the hypothesis that increased inflammation resulting from the combination of ELS and mTBI could underlie the observed effects on learning.

Keywords: controlled cortical impact; maternal separation; microglia; neurogenesis; spatial learning

Introduction

Adverse childhood experiences (ACE) are pernicious forms of early life stress (ELS) that affect the development of the central nervous system (CNS) and increase the vulnerability to pathologies later in life.^{1–4} Recent evidence

suggests a positive association between ACE and traumatic brain injury (TBI).^{5,6} Specifically, individuals reporting high ACE scores have significantly greater chances of suffering an adult TBI than those reporting no ACE. Moreover, a history of stressful events may predispose those

¹División de Neurociencias, Centro de Investigación Biomédica de Michoacán, Instituto Mexicano del Seguro Social, Morelia, Michoacán, México.

²Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.

³Department of Physical Medicine and Rehabilitation, ⁴Safar Center for Resuscitation Research, ⁵Center for Neuroscience, ⁶Center for the Neural Basis of Cognition,

⁷Department of Critical Care Medicine, ⁸Department of Psychology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania, USA.

*Address correspondence to: Naima Lajud, PhD, Laboratorio de Neurobiología del Desarrollo, División de Neurociencias, Centro de Investigación Biomédica de Michoacán, Instituto Mexicano del Seguro Social, Morelia, Michoacán, México E-mail: naima.lajud@imss.gob.mx

with mild TBI (mTBI) to have poor outcomes.⁷ Also, vulnerable populations like incarcerated women and the homeless have a positive association between ELS and TBI.^{8,9} The importance of early prevention of ACE is undeniable, but there is also a need to focus on the adult population that experienced ELS and have endured its consequences for decades. While pre-clinical models can enhance our understanding of the relationship between ELS and adult TBI, there is currently a scarcity of such models that incorporate these variables and afford an appropriate transability of research.

Maternal separation (MS) in rodents is the most extensively characterized model of ELS.¹⁰⁻¹² Despite some variations in duration, this model is a chronic stressor that commonly consists of daily separation of newborn animals from their dams for 180 min (3 h, MS180) during the first 2 or 3 weeks of life. As adults, MS180 male rats show an increase in baseline hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) activity.^{11,13-17} MS180 also causes a decrease in adult hippocampal neurogenesis^{16,18,19} and “primes” microglia to be more responsive to subsequent challenges later in life, leaving a permanent memory of the stressful experience.²⁰⁻²²

Previous work from our group has shown that the combination of MS180 and pediatric mTBI impacts cognitive performance in the Morris water maze (MWM), increases microglial activation in the contralateral CA1 and promotes cytokine expression in the hippocampus.^{23,24} However, we found that mTBI did not have an additional effect on HPA axis activity in maternally separated adolescents.²⁴ In addition, MS180 alone did not affect the survival of dentate gyrus newly generated cells, nor did it trigger hippocampal neuroinflammation in juveniles.²³

MS180 has an age-dependent effect on hippocampal neurogenesis and HPA axis reactivity.^{16,19} Although we only observed a mild effect of MS180 in adolescents,²³ its impact became more apparent with age.^{15-17,25,26} Moreover, it has been proposed that the heightened inflammatory profile of microglia in aging is associated with “primed” phenotype that could be modulated by stress,²⁷ and that ELS-induced priming could increase reactivity to a secondary insult such as an immune challenge²⁸ or CNS injury.^{20,29} Taken together, these findings suggest that the vulnerability to TBI induced by ELS could also increase with age. Therefore, the goal of this study was to investigate if ELS affects spatial learning, microglial activation, and neurogenesis following an mTBI in adult rats.

Methods

Animals

Ten time pregnant female Sprague–Dawley rats were obtained from the Neurobiology Institute of the National Autonomous University of Mexico at gestation Day 14

and allowed to acclimatize in the facility 1 week before delivery. Rats were maintained in temperature-controlled rooms ($20 \pm 2^\circ\text{C}$, $20 \pm 3\%$ humidity) with a 12-h light/dark cycle and *ad libitum* food and water. Day of birth was considered post-natal Day zero (P0). On P1, litters were cross-fostered, culled to eight pups (4-6 males), and randomly assigned to MS180 or control (CONT) groups. Pups were weaned at P21, and on P110 were randomly assigned to trauma (mTBI at 2.6 mm) or Sham groups using a random number generator. Only males were evaluated; females were reserved for a different study. To avoid litter-dependent effects, cross-fostering and random assignment of each rat to experimental condition was performed. Each group consisted of individuals from five different dams ($n = 10$ rats per group).

All behavioral tests were performed by an experimenter blinded to conditions and testing was conducted before 13:00 h to avoid the effects of circadian variation. All procedures were approved by the National Research Committee of the Mexican Social Security System (R-2019-785-060) and were carried out in accordance with the Institute of Laboratory Animal Resources Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the official regulations for use and care of laboratory animals of Mexico (NOM-062-ZOO-1999). Every effort was made to reduce the number of rats used and to minimize suffering.

Maternal separation

MS180 was performed as previously described.^{15-17,24-26,30} Briefly, on P1, MS180 litters were separated from their dam and transferred to a box filled with clean sawdust and placed over a heating pad with controlled temperature ($30-32^\circ\text{C}$). Pups were then relocated to a room independent from the main colony and then returned to the dam after 3 h (180 min) of separation. Separation was performed daily from 09:00 to 12:00 h until weaning at P21. The CONT group remained undisturbed except for routine cage cleaning twice a week.

Controlled cortical injury

Rats weighing 320-490 g were subjected to a controlled cortical injury (CCI) or Sham injury on P110 with some modifications to the procedure previously described.^{24,30-32} Briefly, anesthesia was induced and maintained with inspired concentrations of 5% and 2% isoflurane, respectively, in O_2 . The rats were secured in a stereotaxic frame and a midline scalp incision was made under aseptic conditions. The skin and fascia were reflected to expose the skull and a craniectomy encompassing bregma and lambda and the sagittal and coronal sutures was made in the right hemisphere with a power drill. The bone flap was removed, the impacting rod (Leica Impact One™ Stereotaxic CCI Instrument) was extended, and the impact tip (5 mm, flat) was centered and lowered through the craniectomy until it

touched the dura mater, then the rod was retracted, the impact tip was advanced 2.6 mm and an impact (4 m/sec) produced an mTBI. The incision was sutured and a topical veterinary antimicrobial, anti-inflammatory, and healing cream (Petskrim, Grupo LoVet, Mex) was applied. Body temperature was monitored with a rectal probe and maintained at 37 ± 0.5 °C with a heating blanket. A surgical plane of anesthesia was continued through the entire procedure using a commercial stereotaxic anesthesia mask (Harvard Apparatus), including suturing. Sham-operated rats underwent similar surgical procedures but were not subjected to the impact. The rats were administered penicillin (10,000 U/kg body weight intraperitoneally, PISA, Mex) for 3 days to prevent post-operative infections.

Acute neurological evaluations

Assessment of hind limb reflexive ability commenced immediately after the cessation of anesthesia by gently squeezing the rats' hindpaw every 5 sec and recording the time to elicit a withdrawal response. Righting reflex was determined by the time required to turn from the supine to prone position three consecutive times.^{30–33}

Motor performance

The beam-balance task was utilized to evaluate gross motor performance from P110 to P115, as previously described.^{31,33} Briefly, rats were trained to balance on an elevated narrow beam (1.5 cm wide) until they reached a 60 s criterion before surgery. The time the rats remained on the beam was recorded on post-operative Days 1–5.

Spatial learning evaluation

Cognitive performance was assessed in a Morris water maze (MWM) task³⁴ from P124 to P129. The maze consisted of a circular pool (160 cm diameter \times 60 cm height) that was filled with water ($26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) to a height of 28 cm. The pool was divided in four quadrants and located in the center of a room with salient visual cues that remained constant throughout the training. The platform was placed 2 cm below the water's surface in the northeast quadrant. For evaluating spatial learning acquisition, each rat was provided four trials per day (4-min inter-trial interval) for 5 consecutive days of training. In each trial, the rat was placed in the maze facing the wall starting from a different quadrant and given a maximum time of 120 sec to find the platform. Rats that were unable to find the platform were manually guided to it and allowed to remain on it for 20 sec before being removed, towel dried, and returned to their cage between trials. The time to reach the platform was recorded in all trials. On P129, a probe trial was performed to assess memory retention and consisted of removing the escape platform and allowing each rat to swim freely for

30 sec. The percentage of time the rats spent in the target quadrant (i.e., previous location of the platform) was calculated. On the same day, but after the probe trial, a visible platform test was performed with the platform elevated 2 cm above the water level to determine the contribution of factors such as visual acuity and sensory-motor performance.^{30,32,33,35}

Tissue collection

Euthanasia was performed at P131. Rats received an overdose of sodium pentobarbital (intraperitoneally) and were intracardially perfused with 200 mL of saline solution (0.9% NaCl) and 200 mL of 4 % paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer solution (PB). The brains were extracted, placed in 4 % PFA for 24 h, transferred to 20 % and 30 % sucrose in PB until they sank, and then were frozen. Random systematic sampling of 40- μm thick slices along the coronal axis of the hippocampus was performed on a cryostat. The sections were placed in tubes with cryoprotective solution (25 % glycerol, 25 % ethylene glycol, 50 % PB) until processing.

Immunohistochemistry

Immunostainings were performed as previously described.^{16,23} Briefly, endogenous peroxidases were blocked in hydrogen peroxide and methanol, and slices were further incubated in primary antibody solution. For neurogenesis assessment, we used a primary antibody for detecting the marker for neuroblasts and immature neurons doublecortin (guinea pig anti-DCX, 1:7000, Millipore Cat. No. AB2253). For microglial detection, we utilized an anti-ionized calcium-binding adapter molecule 1 antibody (rabbit anti-Iba1, 1:3000, Wako Cat No.019-19741). Next, they were incubated in the corresponding biotinylated secondary antibody solution (1:750, anti guinea pig Cat. No BA-700 and anti-rabbit Cat. No. BA-1000, Vector Laboratories) and visualized with an avidin-biotin complex (Elite ABC kit, Vector Laboratories) and a Ni-DAB solution (DAB staining kit, Vector Laboratories), mounted, and cover-slipped.

Microglial morphology analysis

Microglial morphology in the cortical area surrounding the injury (CX), the cornu Ammonis I (CA1), and hilus hippocampal regions from the ipsilateral and contralateral hemisphere were evaluated. For each rat, 20 cells from four different slices from each area were analyzed (5 cells/4 slices/6 areas). The sections were selected to correspond to the same level in all rats to achieve a uniform analysis. Images were obtained using a light microscope with 200 \times magnification. The cell-body area and the covered environment area (CEA) including cytoplasmic elongations were calculated using the ZEISS ZEN lite software (v. 3.7, Carl Zeiss), by a researcher blinded

to the experimental conditions as previously described.^{36,37} The data were utilized for calculating the ratio of these parameters (CEA/cell-body area). Microglial cells were additionally classified as resident or activated/bushy based on their CEA/cell-body area ratio.

DCX+ cell counting

Rats were euthanized 3 weeks after mTBI or Sham surgery so that the double cortin-positive (DCX+) cells included in the quantifications were those generated during the first few days after CCI. Total number estimations were performed as previously described.^{15,16,23} For DCX+ cell number estimations, a series of sagittal sections (240- μ m intervals) were randomly selected for immunohistochemistry and all DCX+ positive cells along the entire hippocampus dentate gyrus (DG) were counted by a researcher blinded to the experimental conditions. Total cell numbers were calculated according to the Cavalieri principle. Both the contralateral and ipsilateral hemispheres were evaluated.

Statistical analysis

The results are expressed as the mean \pm standard error of the mean (S.E.M.). The acute neurological assessments, probe trial, microglial activation, and neurogenesis values were analyzed by two-way analyses of variance (ANOVAs) with ELS and injury as factors. The escape latencies were evaluated by a three-way repeated measures ANOVA with time (repeated factor), stress, and injury as factors. When the ANOVA revealed a significant effect, Tukey's *post hoc* tests were utilized to determine specific group differences. The results were considered significant when $p \leq 0.05$.

For estimating the CEA/cell-body area ratio threshold, microglial cells were classified as resident, or activated/bushy based on their morphology^{38,39} by an experienced researcher blinded to the condition. The CEA/cell-body area ratio from 473 resident cells, 363 intermediate, and 713 bushy/activated cells were utilized to perform a simple descriptive analysis and was calculated as previously described.^{36,37} The median ratio for resident cells was 63.6 (99.5% CI: 28.0-248.6) and for bushy/activated cells was 9.5 (99.5% CI: 3.8-26.7), thus allowing us to establish that a ratio smaller than 23 allows detection of bushy cells with a 99.5% confidence. This threshold was utilized to calculate the percentage of activated cells per subject.

For correlation analysis and multi-variate models, entire data sets for each variable (i.e., all rats) were tested with the Shapiro-Wilk test for normal distribution. Microglial activation and neurogenesis entire data sets ($n=32$) failed the normality test, and therefore a Spearman's correlation analysis was estimated using GraphPad Prism 7.0 (GraphPad software, USA). A heat-map was obtained for correlation coefficients and p values. Further

multi-variate linear regressions (MLR) and linear mixed models (LMM) were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) to confirm the associations. For LMM, we entered the treatments, inflammation, and neurogenesis markers as fixed effects, while the day of training and the individual were considered as a random effect. The model with the best goodness of fit was selected using the smaller Conditional Akaike Information Criterion (cAIC).

Results

MS180 did not affect body weight on the day of surgery (CONT: 390.9 ± 6.7 g, MS180: 401 ± 6.1 g, $p > 0.05$). Mild TBI rats showed an increase in right and left hindlimb withdrawal reflex after a brief paw pinch ($p=0.001$ and $p=0.005$, respectively) as well as in righting reflex after the cessation of anesthesia ($p=0.04$) when compared with Sham controls. Two-way ANOVAs for the four groups indicated a significant effect of mTBI on the time required for right ($F[1,35]=11.7$, $p=0.001$) and left ($F[1,35]=8.14$, $p=0.004$) hindlimb withdrawal reflex after a brief paw pinch, and for the righting reflex after the cessation of anesthesia ($F[1,35]=4.3$, $p=0.044$). No effects of stress or interaction were observed.

Multiple comparisons revealed that there were no differences among the mTBI groups in hindlimb withdrawal reflex (right paw reflex: CONT + mTBI: 196.9 ± 14.0 sec, MS180 + mTBI: 182.0 ± 24.1 sec, $p > 0.05$; left paw reflex: CONT mTBI = 209.3 ± 16.0 sec, MS180 mTBI: 191.7 ± 25.3 sec, $p > 0.05$), or in righting reflex (CONT + mTBI: 255.6 ± 18.7 sec, MS180 + mTBI: 249.8 ± 17.2 sec, $p > 0.05$) after the cessation of anesthesia. The lack of significant differences in the neurological indices suggests that both CONT and MS180 groups experienced an equivalent level of injury and anesthesia.

No differences were observed in reflexes for Sham rats (right paw reflex: CONT: 139.7 ± 9.1 sec and MS180: 119.1 ± 17.2 sec, $p > 0.05$; left paw reflex: CONT: 154.4 ± 19.2 sec and MS180 = 125.7 ± 17.9 sec, $p > 0.05$; and righting reflex: CONT: 201.9 ± 31.3 sec and MS180: 189.3 ± 39.0 sec, $p > 0.05$). One MS180 + Sham rat presented a post-surgical infection and was excluded from the study. There were no additional health issues with the rats as they all gained weight over time and reached the visible platform in under 120 sec, which is indicative of normal visual acuity.

Gross motor assessment: beam-balance

One rat was excluded from the beam balance analysis due to it being too heavy and unable to sustain its own weight in the beam during the training. A three-way repeated measures ANOVA revealed a significant effect of injury ($F[1,34]=19.8$, $p < 0.0001$) and day ($F[4,136]=3.71$, $p=0.008$), as well as injury \times time interaction ($F[4,136]=5.1$, $p=0.003$), but not of stress or other interactions

(Fig. 1B). The *post hoc* analysis revealed that both CONT and MS180 mTBI groups were significantly impaired relative to Shams ($p < 0.001$). TBI groups showed a significant motor impairment that improved over the course of the 5 days of testing ($p = 0.02$). *Post hoc* analysis showed that although no main differences were observed between CONT and MS180 injured groups ($p > 0.05$), only CONT + mTBI rats significantly decreased their time on the beam on Day 1 of training when compared with Sham (Fig. 1B).

Cognitive performance: acquisition of spatial learning and probe trial

A repeated measures three-way ANOVA for the acquisition phase of the MWM (Fig. 1C) indicated a significant main effect of injury ($F[1,35] = 8.5$, $p = 0.006$) and train-

ing day ($F[4,140] = 47.3$, $p < 0.0001$), but not of stress or interactions ($p > 0.05$). Multiple comparisons for the main treatment effect revealed that only MS180 + mTBI rats exhibited cognitive deficits as evidenced by significantly longer time to locate the escape platform compared with the Shams ($p = 0.009$). Additionally, MS180 rats showed a significantly longer time to locate the escape platform at Day 1 compared with the Shams ($p < 0.01$), thus suggesting that MS180 and mTBI synergistically affect spatial learning in this task (Fig. 1C). There were no differences between CONT and maternally separated Sham rats, or between CONT + Sham and CONT + mTBI rats in the acquisition phase of the MWM ($p > 0.05$).

On P132, the platform was removed, and the percent time spent in the target quadrant was calculated. There

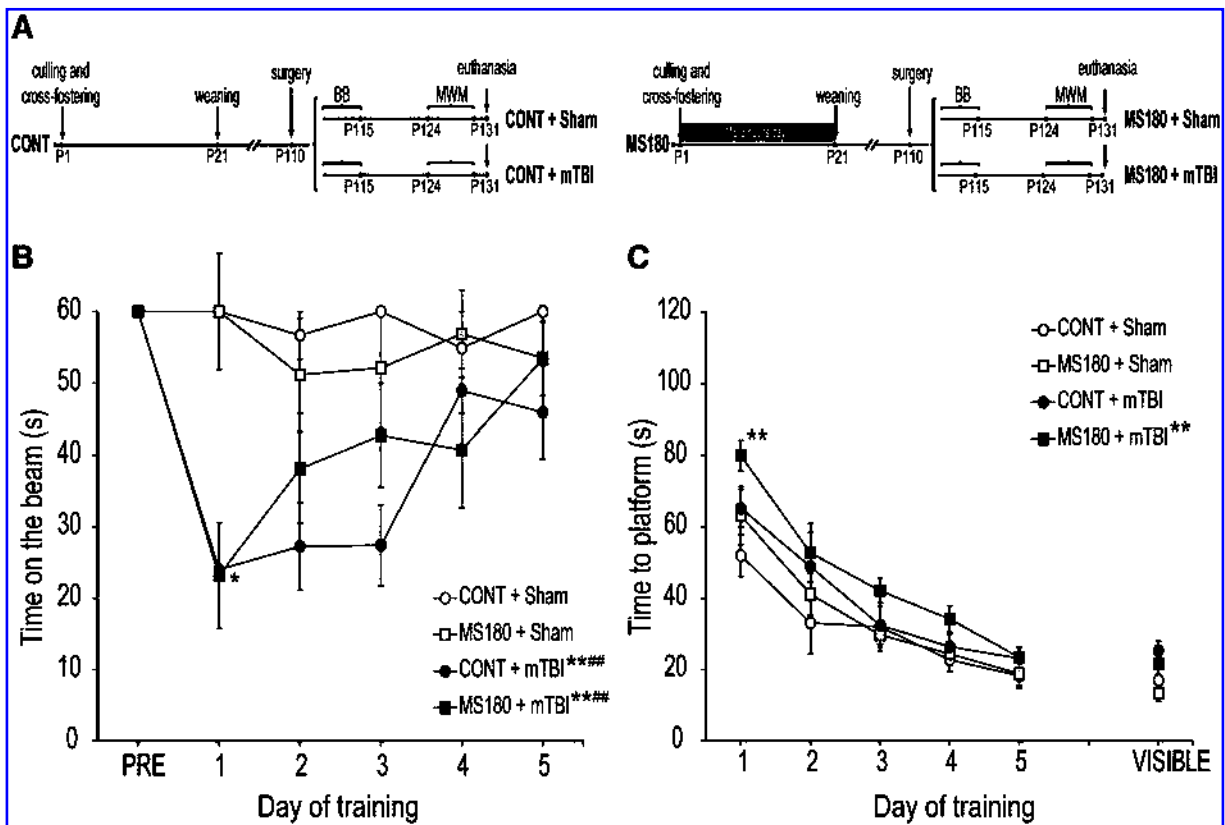


FIG. 1. Mild traumatic brain injury (mTBI) affected motor performance regardless of early life condition; however, early life stress (ELS) and mTBI synergistically affected cognitive performance in the Morris water maze (MWM). **(A)** Control (CONT) and maternally separated (180 min/day, MS180) rats were subjected to either a mild controlled cortical impact (2.6 mm, mTBI), or sham surgery on post-natal Day (P) 110 and tested on the **(B)** beam balance test from post-injury Days 1–5 (Mean \pm standard error of the mean [S.E.M.] repeated measures analysis of variance [ANOVA] * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. CONT + Sham, # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ vs. MS180 + Sham; $n = 8-10$). **(C)** Time required to locate the hidden platform in the MWM was evaluated from post-injury Day 14 to 19 (Mean \pm S.E.M. Repeated measures ANOVA * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. CONT + Sham, # $p < 0.05$ vs. MS180 + Sham, § $p < 0.05$ vs. CONT + mTBI; $n = 9-10$).

was no effect of treatments on memory retrieval (CONT + Sham: 24.5 ± 4.6 %, MS180 + Sham: 25.1 ± 6.7 %, CONT + mTBI: 21.4 ± 4.3 %, MS180 + mTBI: 21.4 ± 5.6 %, $p > 0.05$). On the same day, a visible platform assay was performed to determine visual accuracy (Fig. 1B) and swimming speed. There were no effects of treatments in any of these parameters ($p > 0.05$).

Microglial activation: CEA/cell body ratio and percent of activated cells

We quantified the covered environment area (CEA)/cell body ratio and estimated the proportion of Iba1+ cells that presented an activated phenotype as markers of inflammation. Two-way ANOVA showed a significant effect of TBI on the CEA/cell body ratio (Table 1) of the ipsilateral cortex ($F[1,28]=34.8$, $p < 0.0001$), hippocampal CA1 ($F[1,28]=36.9$, $p < 0.0001$), and hilus subfields ($F[1,28]=37.8$, $p < 0.0001$), but no effect of stress or interaction ($p > 0.05$). Multiple comparisons revealed that all TBI groups significantly decreased the CEA/cell body ratio of Iba1+ cells when compared with CONT + Sham ($p < 0.01$) and MS180 + Sham ($p < 0.05$). No significant effects were observed for the CEA/cell body ratio of Iba1+ cells in the contralateral hemisphere (Table 1; $p > 0.05$).

A two-way ANOVA for the proportion of Iba1+ cells that presented an activated phenotype showed a significant effect of injury in the ipsilateral CA1 subfield ($F[1,28]=58.64$, $p < 0.0001$; Fig. 2B) and stress \times mTBI interaction ($F[1,28]=6.5$, $p < 0.016$). Multiple comparisons revealed that both CONT + mTBI and MS180 + mTBI rats showed a significant increase in the percentage of activated Iba1+ cells in the CA1, when compared with CONT + Sham rats ($p < 0.0001$), and this effect was significantly higher in MS180 + mTBI rats ($p = 0.023$). A significant effect of stress was observed in the contralateral CA1 subfield ($F[1,28]=6.7$, $p = 0.014$; Fig. 2C), and multiple comparisons indicated that only MS180 + TBI rats showed an increase in the proportion of bushy and amoeboid Iba1+ cells compared with shams ($p = 0.022$). Moreover, MS180 + TBI rats were significantly different from CONT + TBI ($p = 0.007$).

Two-way ANOVAs showed a significant effect of TBI on the ipsilateral hilus ($F[1,28]=111.3$, $p < 0.0001$; Fig. 3) and ipsilateral cortex ($F[1,28]=71.5$, $p < 0.0001$; Fig. 4), but no effect of stress or interaction ($p > 0.05$). Multiple comparisons revealed that both CONT + mTBI and MS180 + mTBI rats showed a significant increase in the percentage of bushy and amoeboid Iba1+ cells when compared with CONT + Sham rats ($p < 0.001$). No differences were observed in the proportion of activated microglial cells contralaterally ($p > 0.05$).

Neurogenesis: estimations of DCX+ cell numbers

Adult neurogenesis was evaluated by estimating the number of DCX+ cells in the dentate gyrus of the hippocampus (Fig. 5). A two-way ANOVA for the ipsilateral hemisphere (Fig. 5B) indicated there was a significant effect of injury ($F[1,28]=6.7$, $p = 0.014$) and stress \times mTBI interaction ($F[1,28]=4.2$, $p = 0.046$). The Tukey's *post hoc* test revealed that MS180 + Sham, CONT + TBI, and MS180 + TBI groups showed a similar decrease in the number of DCX+ cells ($p < 0.05$). In the contralateral side (Fig. 5C), a significant effect of stress \times mTBI interaction was observed ($F[1,28]=5.5$, $p = 0.025$), however no further differences were observed in the *post hoc* test.

Correlation analysis and linear models

A Spearman's correlation analysis was performed to determine if neurogenesis or increased neuroinflammation across the different brain structures showed a significant association with our outcome variables (Supplementary Fig. S1). As expected, the analysis indicated a positive correlation between the percentage of Iba1+ cells with amoeboid or bushy morphology in the three brain structures of the ipsilateral hemisphere and acute neurological parameters ($p < 0.05$).

The percentage of activated Iba1+ cells in the ipsilateral CA1 region was negatively correlated with time spent balancing on the beam on the first day ($p < 0.01$). Also, a positive correlation was found between time to platform during all MWM acquisition days, more

Table 1. Microglial Morphological Analysis: CEA/Cell Body Ratio of Iba1+ Cells

	CONT + Sham	MS180 + Sham	CONT + mTBI	MS180 + mTBI
Cortex				
Ipsilateral	49.0 ± 6.1	48.8 ± 6.0	$22.8 \pm 5.5^{*}\#$	$13.6 \pm 1.4^{*}\#\#\#$
Contralateral	50.7 ± 6.9	54.7 ± 4.8	48.8 ± 6.9	47.1 ± 6.4
CA1				
Ipsilateral	69.2 ± 10.2	64.0 ± 5.1	$33.1 \pm 6.7^{*}\#\#$	$17.7 \pm 2.6^{*}\#\#\#$
Contralateral	67.9 ± 9.6	71.4 ± 8.4	63.1 ± 5.4	51.6 ± 7.9
Hilus				
Ipsilateral	47.8 ± 7.5	48.1 ± 4.7	$19.5 \pm 6.3^{*}\#\#\#$	$8.6 \pm 1.2^{*}\#\#\#$
Contralateral	47.3 ± 6.2	48.9 ± 5.5	45.7 ± 5.6	38.5 ± 6.9

Mean \pm standard error of the mean, analysis of variance $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ and $***p < 0.001$ vs. CONT + Sham; $\#p < 0.05$, $\#\#p < 0.01$, and $\#\#\#p < 0.001$ vs. MS180 + Sham; $n = 8$. mTBI, mild traumatic brain injury.

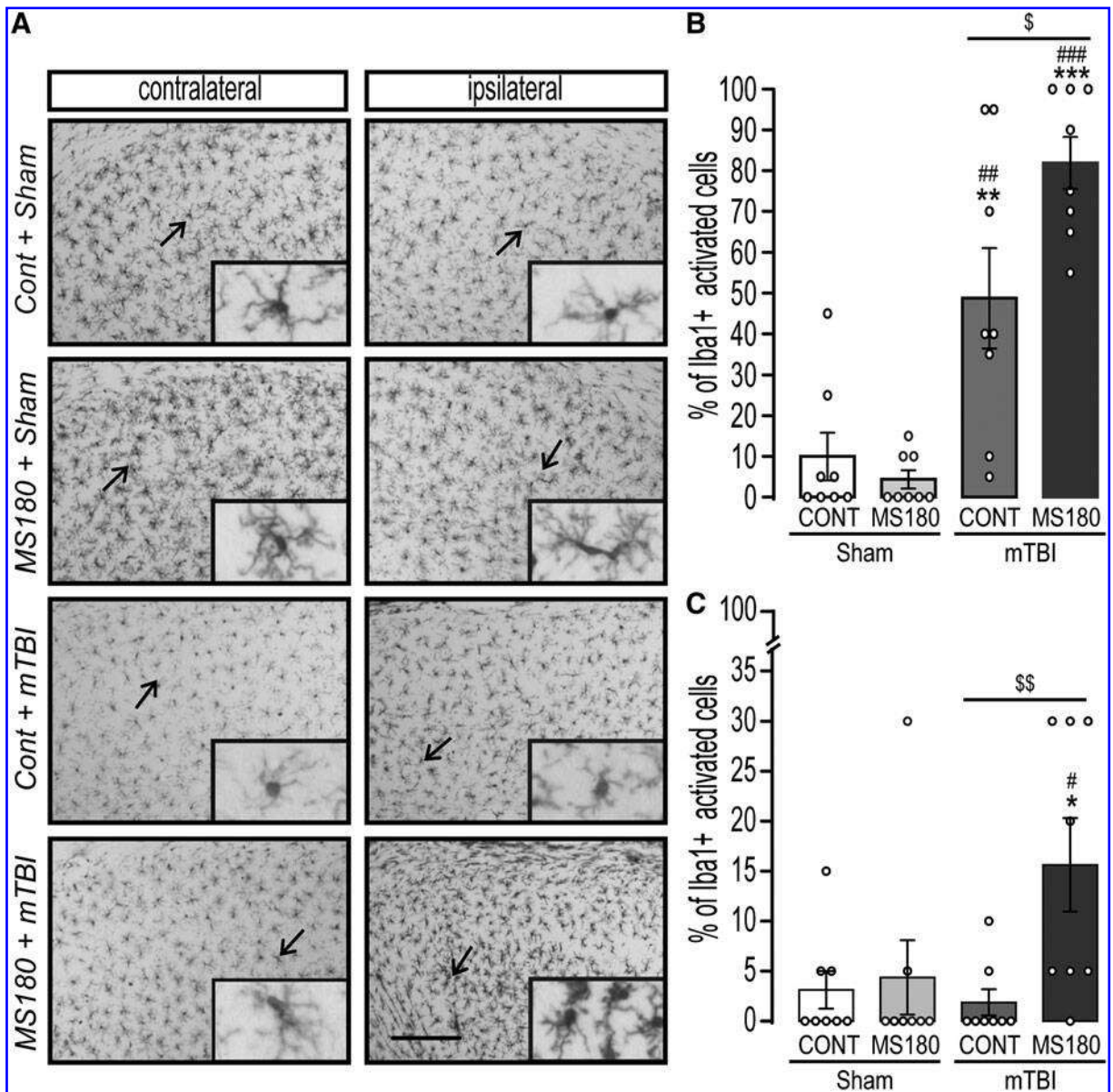


FIG. 2. Early life stress and mild traumatic brain injury (mTBI) synergistically increased neuroinflammation in the ipsilateral CA1 hippocampus subfield. Control (CONT) and maternally separated (180 min/day, MS180) rats were subjected to either a mild controlled cortical impact (2.6 mm, mTBI), or sham surgery on post-natal Day (P) 110. Microglial morphology was evaluated on post-injury Day 21. **(A)** Representative microphotographs of an Iba1 immunostaining in the ipsilateral (right panels) and contralateral (left panels) CA1 hippocampus subfield. Inserts depict higher magnifications of cells pointed at by arrows. **(B)** Percentage of microglial cells that present an amoeboid or bushy phenotype in the ipsilateral and **(C)** contralateral CA1 subfield. (Scale bar: 100 μ m. Mean \pm standard error of the mean analysis of variance ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. CONT + Sham, # $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ vs. MS180 + Sham, $^{\$}p < 0.05$ and $^{\$\$}p < 0.01$ vs. CONT + mTBI; $n = 8$).

pronounced initially ($p < 0.01$) compared with the fourth and fifth days ($p < 0.05$). Conversely, microglial activation in the contralateral CA1 area correlated positively with time to platform during Days 2-5 ($p < 0.05$). The ipsilateral hilus region showed a negative correlation with

time on the beam during Days 1-3, and a positive correlation with time to platform during training. The association was stronger on Day 1 ($p < 0.01$) than the following days ($p < 0.05$). For the contralateral hilus, microglial activation showed a negative link with the

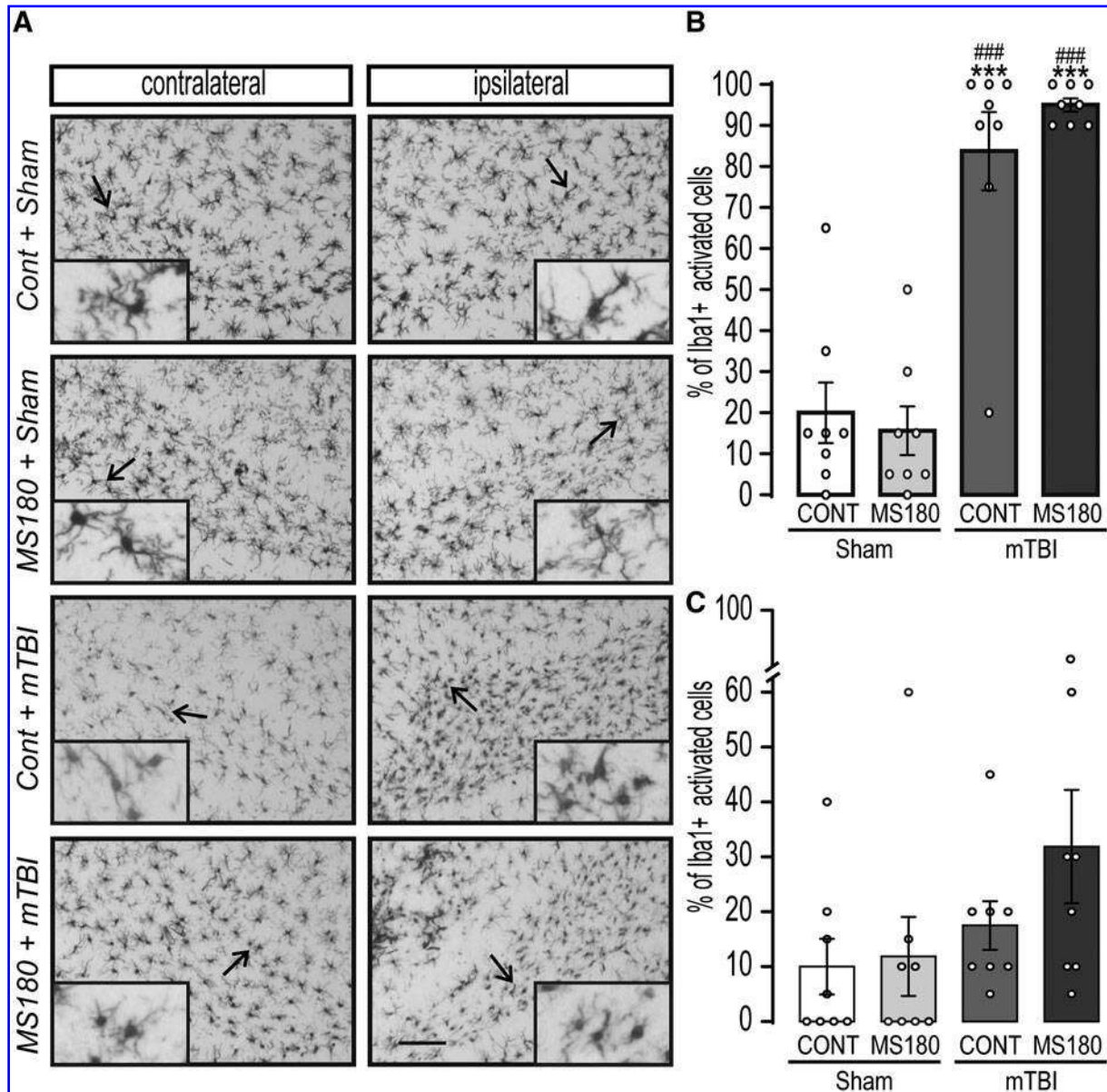


FIG. 3. Mild traumatic brain injury (mTBI) increased neuroinflammation in the ipsilateral hilus. **(A)** Representative microphotographs of an Iba1 immunostaining in the ipsilateral (right panels) and contralateral (left panels) hilus of control (CONT) and maternally separated (180 min/day, MS180) rats that were subjected to an mTBI or Sham surgery as adults. Inserts depict higher magnifications of cells pointed to by arrows. **(B)** Percentage of microglial cells that present an amoeboid or bushy phenotype in the ipsilateral and **(C)** contralateral hilus. (Scale bar: 100 μ m. Mean \pm standard error of the mean analysis of variance, *** p < 0.001 vs. CONT + Sham, and ### p < 0.001 vs. MS180 + Sham; n = 8).

first beam balance day and a positive one with platform time during MWM Days 1 and 2 (p < 0.05). Interestingly, microglial activation in the ipsilateral cortex was positively linked during the initial three training days and shifted to the contralateral cortex on Days 4 and 5 (p < 0.05).

In contrast to microglial activation, the number of DCX+ cells in the ipsilateral hemisphere positively corre-

lated with the time on the beam on the first day (p < 0.05) and was negatively linked to the second day of MWM training (p < 0.05). Conversely, DCX+ cell count in the contralateral hemisphere only correlated positively with the second and third days of beam balance (p < 0.05).

Type III ANOVA of fixed effects in LMM indicated a significant effect of TBI ($F[1,155.5] = 41.12$, p < 0.001),

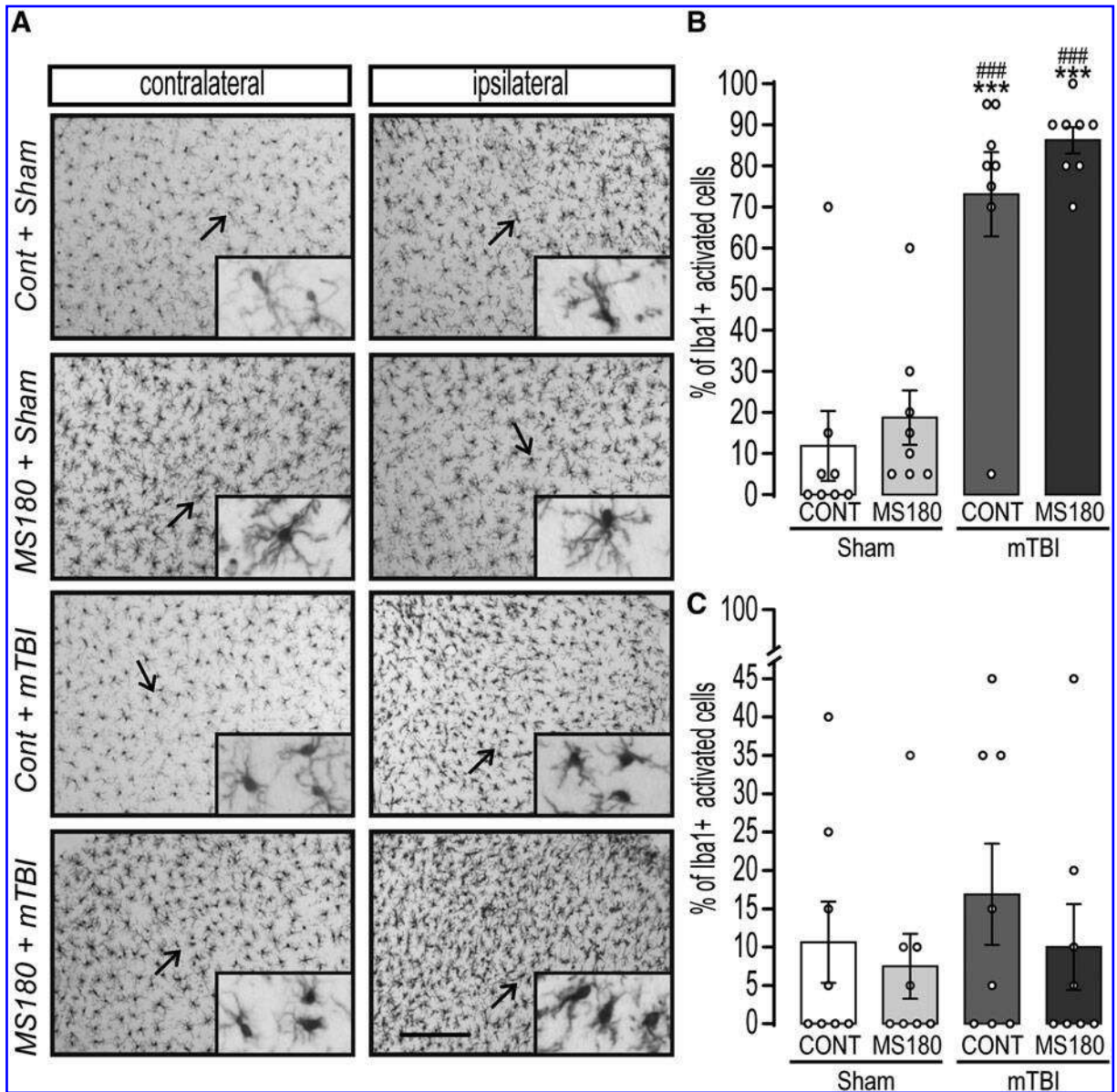


FIG. 4. Mild traumatic brain injury (mTBI) increased neuroinflammation in the ipsilateral cortex adjacent to the injury. **(A)** Representative microphotographs of an Iba1 immunostaining in the ipsilateral (right panels) and contralateral (left panels) cortical area adjacent to the lesion of control (CONT) and maternally separated (180 min/day, MS180) rats, that were subjected to an mTBI or Sham surgery as adults. Inserts depict higher magnifications of cells pointed to by arrows. **(B)** Percentage of microglial cells that present an amoeboid or bushy phenotype in the ipsilateral and **(C)** contralateral cortical area. (Scale bar: 100 μ m. Mean \pm standard error of the mean analysis of variance, ** $p < 0.01$ vs. CONT + Sham, and ### $p < 0.01$ vs. MS180 + Sham; $n = 8$).

but not of stress ($p > 0.05$) on the time on the beam in the beam balance task. A tendency for a significant effect was observed for the TBI \times Stress interaction ($F[1,155.5] = 41.12$, $p < 0.051$). The ANOVA for the fixed effects in the LMM for the MWM showed a significant effect of TBI ($F[1,80.5] = 5.51$, $p = 0.021$), but not of

stress or interaction ($p > 0.05$). The individual fixed effects estimations are presented in the Supplementary Table S1. MLRs (Supplementary Table S1) indicated that TBI significantly predicted for microglial activation in the ipsilateral CA1 (adjusted R^2 : 0.595, $p < 0.001$), hilus (adjusted R^2 : 0.783, $p < 0.001$) and cortex (adjusted

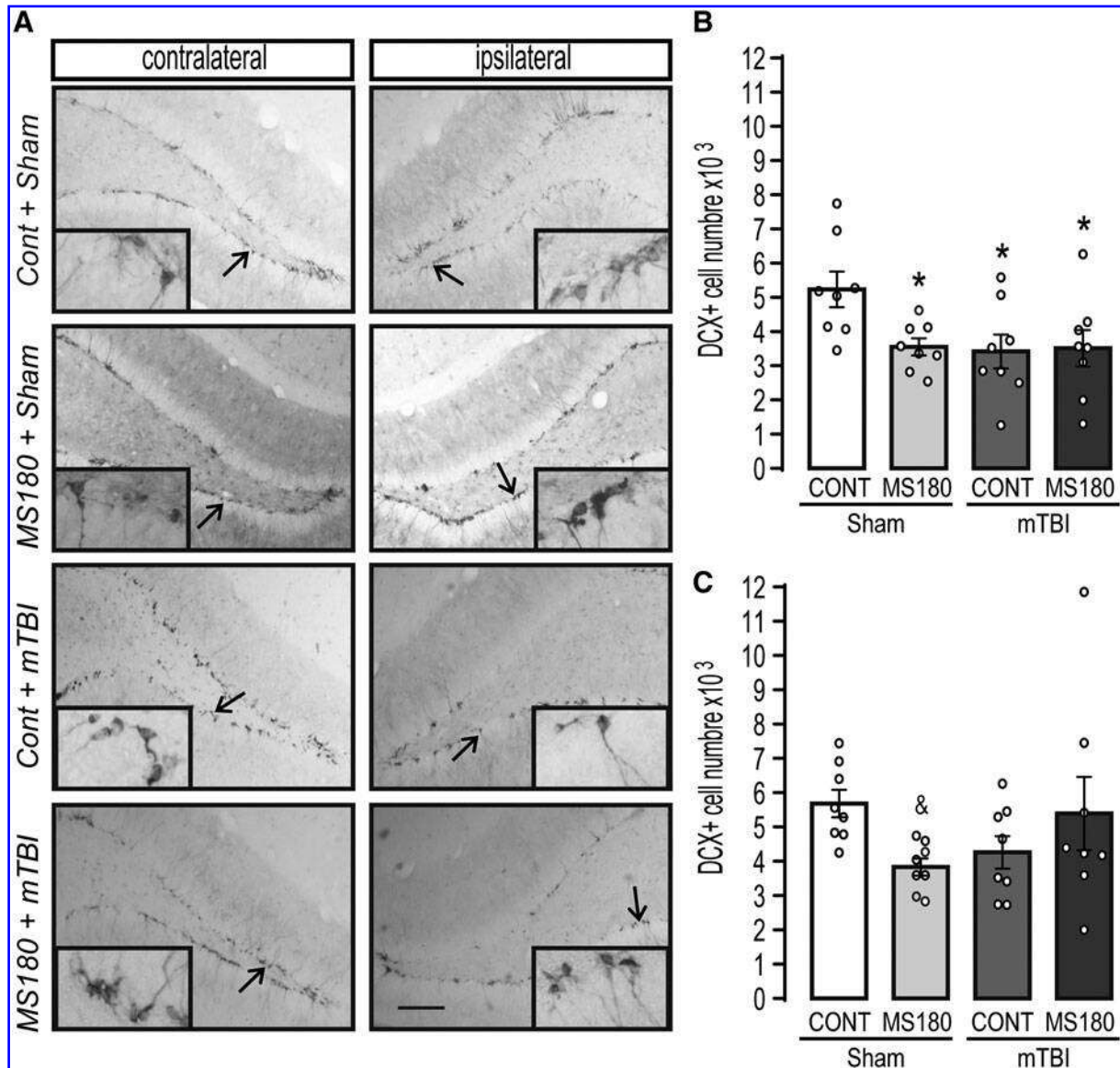


FIG. 5. Early life stress caused a decrease in hippocampal neurogenesis and this effect was not exacerbated by mTBI. **(A)** representative microphotographs of an immunostaining for the immature neuronal marker doublecortin (DCX) in the ipsilateral (right panels) and the contralateral (left panels) subgranular cell layer of control (CONT) and maternally separated (180 min/day, MS180) rats that were subjected to a mTBI or Sham surgery as adults. Inserts depict higher magnifications of cells pointed to by arrows. **(B)** Estimations of the total DCX+ cell numbers in the ipsilateral and **(C)** contralateral dentate gyrus. (Scale bar: 100 μ m. Mean \pm standard error of the mean analysis of variance, * $p < 0.05$ vs. CONT + Sham; Student's t-test & $p < 0.01$ vs. CONT + Sham; $n = 8$).

$R^2: 0.696, p < 0.001$); while in the contralateral side a significant effect was observed only for the CA1 region (adjusted $R^2: 0.110, p = 0.036$).

We further assessed the relationship between behavior, plasticity, and inflammation by adjusting a series of LMM including DCX+ cell number and Iba1+ cell activation as covariates (Supplementary Data S1). For the

beam balance test, type III ANOVA of fixed effects from the best fitted model suggested a significant effect of TBI ($F[1,153.46] = 31.78, p < 0.001$) and the interaction between TBI and the proportion of activated microglial cells in the ipsilateral CA1 ($F[1,153.46] = 4.13, p = 0.018$). The individual fixed effects estimations are presented in the Supplementary Table S2. While for the

MWM we observed that the model with the best goodness of fit (Supplementary Data S1) included a significant interaction between TBI and the proportion of bushy and activated Iba1+ cells in the ipsilateral CA1 ($F[2,52.69] = 6.25, p = 0.004$), the interaction between TBI and the proportion of bushy and activated Iba1+ cells in the contralateral CA1 ($F[2,52.69] = 9.09, p < 0.001$), and the triple interaction involving TBI, proportion of bushy and activated Iba1+ cells in the ipsilateral and contralateral CA1 ($F[1,52.69] = 8.04, p = 0.006$). Also, the model included a significant interaction between the ipsilateral and contralateral CA1 regions ($F[1,52.69] = 11.17, p = 0.002$). Additionally, we observed that the interaction between stress and TBI did not demonstrate a significant effect ($F[3,52.69] = 1.9, p > 0.05$); however, it did contribute to reduce the AIC coefficient and improving model fitness (Supplementary Data S1). The individual fixed effects estimations are presented in the Supplementary Table S2.

Discussion

Adverse childhood experiences (ACE) are forms of chronic childhood stress that increase the vulnerability to subsequent stressors later in life,^{40,41} and are associated with a higher risk of experiencing an mTBI.⁵ Moreover, it is known that a history of stressful events may predispose persons with mTBI to have poor outcomes.⁷ In this study, we evaluated for the first time the relationship between ELS and mTBI using a well-validated CCI injury model, as well as their relationship with hippocampal neuroinflammation and neurogenesis. The data show that ELS and mTBI synergistically affect the acquisition of spatial learning evaluated in the MWM. However, this synergistic effect was only observed when analyzing the proportion of activated microglia in the CA1 hippocampus subfield but not when analyzing hippocampal neurogenesis and microglial activation in the cortical area adjacent to the lesion and the hilus.

The MWM is a task that has been widely used to assess spatial learning and memory in rodents, and the deficits observed in this task are considered a strong correlate to the memory impairments observed in humans post-TBI.^{31,34,42,43} In the present study, we used an experimental strategy specifically designed to determine if there is a synergistic effect of both factors on cognitive performance evaluated in the MWM. On one hand, we chose to use an mTBI model (2.6 mm/5 mm tip/no angle) as it is not severe enough to mask the potential additive effect of stress and avoids the ceiling effect. Consistent with observations in humans,^{6,44-46} CONT + mTBI rats showed spontaneous recovery, as mTBI only caused motor impairments during the first three days post-injury but did not have any deleterious effects on spatial learning during the chronic phase. However, in agreement with our prior results in juveniles,²³ the sub-

group previously exposed to ELS did show deficits in the acquisition of spatial learning. It is important to note that, unlike what is observed in pediatric TBI, we did not observe any effect on the probe trial in this study, which confirms the idea that the developing brain is more vulnerable to the combined effect of ELS and brain injury than the adult brain.

We chose to perform MS during the first 3 weeks of life (P1-21) to increase the deleterious effects of stress on hippocampal development. This is because the second and third weeks of life in rodents are a critically vulnerable time-window during which the hippocampus undergoes a delicate process of dendritic refinement and synaptic pruning that makes it highly sensitive to environmental influences.⁴⁷⁻⁴⁹ Further, this methodological design allowed us to directly compare the results with our previous data obtained in pediatrics and thus more finely determine the effect of age.

The long-term effects of ELS on hippocampal-dependent memory across different ELS rodent models are controversial,⁵⁰ as some groups report deleterious effects on the MWM⁴⁹ and others do not report any effect.⁵² Previous work shows that the timing of MS differentially affects MWM performance in adults.⁵³ MS180 during the first week of life does not affect cognitive performance but does cause alterations when MS180 occurs during the third week of life (P14-P21). In the present study, we separated pups from P1 to 21 and did not find any effect of MS180 on spatial learning, which confirms the hypothesis that the timing and duration of the stressor can affect behavior differentially. Consistent with this idea, Sanchez and colleagues studied the relationship between ELS and TBI using a fluid percussion brain injury model; however, unlike our results, no synergistic effect of ELS with TBI was observed in the learning phase of the MWM.⁵² Nevertheless, it is important to note that in that study the authors did not observe the increase in baseline corticosterone levels that is normally associated with MS form P1-14,¹⁵⁻¹⁷ and only observed an elevation when evaluating rats 90 min after subjecting them to immobilization stress.⁵⁴

Microglial cell activation increased in the cortex adjacent to the injury, as well as the ipsilateral hippocampus (CA1 and hilus) in both control and stressed rats. Importantly, MS increased both the ipsilateral and contralateral CA1 microglial activation after mTBI. This microglial activation pattern coincides with that reported in juvenile rats.²³ Also, in congruence with previous results, under basal conditions, no differences were observed between CONT and MS180 rats, and increases in Iba1+ immunoreactivity were only observed after a secondary challenge/injury.^{28,37,55} Here, we utilized Iba1 immunostaining for the evaluations of microglial activation, instead of employing molecular methodologies such as cytokine quantification. Accumulating evidence shows that

“primed” microglial metabolic and transcriptomic profiles are associated with cytoskeletal remodeling, which supports both pro-inflammatory and anti-inflammatory roles in both physiological and pathological conditions.^{55–58}

Moreover, cell number and morphology assessed in Iba1 immunostaining, but not protein expression, can serve as a sensitive marker for detecting microglial activation, as it efficiently correlates with activation markers such as CD11b.⁵⁹ In this study, we evaluated microglial cell activation based on phenotypical changes in Iba1+ cells. To achieve this, we conducted a detailed characterization of cell morphology, allowing us to establish a 99% confidence threshold to distinguish cells with an activated phenotype (bushy and amoeboid). Further studies should be done to confirm if increased cytokine activity is also present in MS180 + mTBI adults.

The Spearman analysis indicated a positive correlation between time to platform and microglial activation in the ipsilateral CA1 region, which is more pronounced during the initial three days of the test. Additionally, the contralateral CA1 region showed an association during Days 2–5. These associations were further confirmed through an LMM, where we observed that the best-fitting model includes the interaction between the lesion and the proportion of bushy and amoeboid Iba1+ cells in the CA1 regions of both hemispheres. These interactions suggest that the impact of TBI on spatial learning might be modulated by microglial activation in both hemispheres. Notably, although the interaction between mTBI and stress did not exhibit a significant effect in the model, removing these variables reduced the goodness of fit. This implies that these variables are essential for capturing the complexity of the effects observed within a biological context. Taken together, these findings suggest that the effect of mTBI on microglial activation is not constant, but rather influenced by stress, particularly in the contralateral CA1 region, supporting the hypothesis that the increased inflammation resulting from the combination of mTBI and stress could underlie the observed effects on learning. The differential microglial activation within brain areas observed here is supported by studies showing a variance in immunophenotypes between cortical and hippocampal regions in adult mice.⁶⁰

Clinical studies have demonstrated that under normal conditions, brain injury symptoms often subside within days or weeks after the injury; however, a subgroup of patients exhibit persistent cognitive deficits.^{44,45} It has been proposed that this heightened vulnerability could be attributed to prior exposure to ELS.⁶ In line with this, our data revealed that under control conditions, the rats effectively recover from motor deficits caused by mTBI and do not exhibit cognitive impairments. Nevertheless, MS180 negatively impacts spatial learning after an mTBI. Previous reports utilizing a focal brain injury model showed that, ELS caused an increase in microglial

activation in remote areas of the brain that was consistent with a primed phenotype.²⁰ In congruence, we observed that mTBI increases microglial activation in the ipsilateral CA1 region of CONT rats, but not in the contralateral region; conversely, in MS180 rats, we observed enhanced microglial activation in both hemispheres.

The LMMs indicated that mTBI and stress interact with the differential inflammatory response between the injured and non-injured sides to explain the alterations observed in the MWM. Collectively, our findings lead us to hypothesize that under control conditions, TBI leads to heightened neuroinflammation on the ipsilateral side; however, as the contralateral side remains intact, it could compensate for the deficits caused by the injury and enable recovery. Conversely, MS triggers microglial priming, rendering the brain more reactive and causing abnormal microglial activation in both the ipsilateral and contralateral sides. Consequently, the contralateral side is no longer capable of compensating for the injured hemisphere, resulting in cognitive deficiencies. While LMMs provide valuable insights, they also have limitations. LMMs involve numerous parameters, including fixed effects, random effects, and various interactions that can complicate the determination of precise causal relationships between variables. Further studies are needed to confirm our hypothesis. Nevertheless, our hypothesis finds support in previous research that demonstrated that contralateral hippocampal function is inhibited after cerebral ischemic injury; however, environmental enrichment (EE) can promote plasticity in the contralateral hippocampus to promote cognitive function.⁵⁹

Microglial activation is associated with neuroinflammation, decreased neurogenesis, and abnormal neuronal circuits.⁶² Resting microglia support neuronal activity by controlling synaptic pruning, neuronal excitability, debris removal, and by providing trophic support.^{62,63} Moreover, previous studies have shown that cognitive improvement induced by EE after a moderate TBI correlates with a decrease in microglial activation in the hippocampus CA subfield.⁶⁴ This connection between microglial activation and cognition relates to alterations in synaptic plasticity by upregulation of genes associated with inflammation and long-term potentiation.⁶⁵

In contrast to our previous report in juveniles,²³ we observed that ELS decreases the number of DCX+ cells that survive in the hippocampus, and this effect is not exacerbated by mTBI, which does not support our hypothesis. Previous works have shown that MS decreases hippocampal neurogenesis in adult males.^{16,19,37,66} In the present study, we observed a main effect of ELS on the number of DCX+ cells contralaterally, but not ipsilaterally; and the previously reported differences in the ipsilateral hemisphere could only be confirmed by performing a simple comparison equivalent to that of previous studies.¹⁶ Moreover, this effect was not further increased by

mTBI, thus suggesting that ELS affects the hippocampus neurogenic niche down to a lower threshold that cannot be surpassed. Additionally, the lack of an additive effect on neurogenesis indicates that microglial effects are not associated with neuroblast apoptosis or decreased proliferation.

Our study is not without limitations, and one of them is that we did not include female rats in our evaluations at this stage. This decision was based on the controversial nature of the effects of MS on female rats, as several studies have indicated that MS has no effects on female offspring.^{67–70} Specifically, female rats are resilient to the behavioral effects of MS and exhibit stress-induced neurogenesis.⁷¹ This sexual dimorphism deserves attention by itself; therefore, our study aimed to conduct an initial characterization of the synergistic effects of MS and mTBI using only male subjects, as the effects of MS in this sex have been consistently reported. Further studies are necessary to determine if female rats also demonstrate resilience to the synergistic effect of MS + TBI, similar to their resistance to MS alone.

In summary, our findings suggest that although all mTBI rats gain motor recovery during the post-injury phase, ELS and mTBI synergistically affect cognitive performance in the chronic phase. We theorize that ELS causes a chronic activation of microglial cells after an mTBI that is specific to the CA1 hippocampus subfield and that is only evidenced after mild injuries. This effect could account for the worse outcomes observed after mTBI in humans with a history of ELS.

Transparency, Rigor, and Reproducibility Summary

The study and analysis plan were registered prior to beginning data collection with the National Research Committee of the Mexican Social Security System (R-2019-785-060).^{1,2,3} A sample size of 10 rats per group was planned for behavior, and eight rats for histology were estimated using the finite population formula and based on previous studies.^{1,2,3} The progeny of 10 time pregnant rats were cross-fostered, culled to eight pups (4–6 males), and randomly assigned to groups.^{4,5} Forty male rats were randomly assigned to trauma versus sham groups using a random number generator and were blinded.^{4,5,6} One rat presented a post-surgical infection and was excluded from the study.⁴ All behavioral analyses and histological materials were performed by investigators blinded to group and trauma status.⁶ All rats were tested in the animal facility under standard light and temperature conditions between 9:00 AM and 1:00 PM in a fed state.⁷ Histological analyses were performed in eight batches, with one sample from each group randomly assigned to each batch.⁸ Specificity of antibodies used for histology was verified by suppliers and confirmed with a negative control.⁸ Normal distribution of data was

confirmed using the Shapiro-Wilk test.⁹ The sample sizes and degrees of freedom reflect the number of independent measurements (rats).⁹ Non-independence of measurements was addressed using repeated measures ANOVAs and linear mixed models.⁹ Data will be made available on request.¹³ The authors agree to provide the full content of the manuscript on request by contacting the corresponding author.¹⁵

Data Availability

Data will be made available on request.

Authors' Contributions

Ana Fernanda Salinas-García: Investigation, Data Curation, Visualization, Writing - Original Draft. Angélica Roque: Investigation, Data Curation, Visualization. Jonathan Zamudio-Flores: Investigation, Data Curation. Esperanza Meléndez-Herrera: Supervision, Conceptualization, Writing—Review and Editing. Anthony E. Kline: Methodology, Writing - Review and Editing. Naima Lajud: Project administration, Supervision, Formal analysis, Resources, Writing—Review and Editing, Funding acquisition.

Funding Information

This work was supported by a grant from Coordinación de Investigación en Salud- Fundación IMSS (NL). AFSG and JZF are graduate students in the Programa de Maestría en Ciencias en Ecología Integrativa—Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo and were supported by CONACYT (CVU 805864 and 1187161).

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

Supplementary Material

Supplementary Figure S1
Supplementary Table S1
Supplementary Table S2
Supplementary Data S1

References

1. Brown DW, Anda RF, Tiemeier H, et al. Adverse childhood experiences and the risk of premature mortality. *Am J Prev Med* 2009;37(5):389–396; doi: 10.1016/j.amepre.2009.06.021
2. Heim C, Nemeroff CB. Neurobiology of early life stress: clinical studies. *Semin Clin Neuropsychiatry* 2002;7(2):147–159; doi: 10.1053/scnp.2002.33127
3. Lind K, Toure H, Brugel D, et al. Extended follow-up of neurological, cognitive, behavioral and academic outcomes after severe abusive head trauma. *Child Abuse Negl* 2016;51:358–367; doi: 10.1016/j.chiabu.2015.08.001
4. Teicher MH, Andersen SL, Polcari A, et al. The neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment. *Neurosci Biobehav Rev* 2003;27(1-2):33–44; doi: 10.1016/s0149-7634(03)00007-1
5. Ma Z, Bayley MT, Perrier L, et al. The association between adverse childhood experiences and adult traumatic brain injury/concussion: a scoping review. *Disabil Rehabil* 2019;41(11):1360–1366; doi: 10.1080/09638288.2018.1424957

6. Weil ZM, White B, Whitehead B, et al. The role of the stress system in recovery after traumatic brain injury: a tribute to Bruce S. McEwen. *Neurobiol Stress* 2022;19:100467; doi: 10.1016/j.yjnstr.2022.100467
7. van Veldhoven LM, Sander AM, Struchen MA, et al. Predictive ability of preinjury stressful life events and post-traumatic stress symptoms for outcomes following mild traumatic brain injury: analysis in a prospective emergency room sample. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011;82(7):782–787; doi: 10.1136/jnnp.2010.228254
8. Colantonio A, Kim H, Allen S, et al. Traumatic brain injury and early life experiences among men and women in a prison population. *J Correct Heal Care* 2014;20(4):271–279; doi: 10.1177/1078345814541529
9. Song MJ, Nikoo M, Choi F, et al. Childhood trauma and lifetime traumatic brain injury among individuals who are homeless. *J Head Trauma Rehabil* 2018;33(3):185–190; doi: 10.1097/HTR.0000000000000310
10. Nishi M. Effects of early-life stress on the brain and behaviors: implications of early maternal separation in rodents. *Int J Mol Sci* 2020;21(19):7212; doi: 10.3390/ijms21197212
11. Plotsky PM, Meaney MJ. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res* 1993;18(3):195–200; doi: 10.1016/0169-328x(93)90189-v
12. Van Bodegom M, Homberg JR, Henckens MJAG. Modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by early life stress exposure. *Front Cell Neurosci* 2017;11:87; doi: 10.3389/fncel.2017.00087
13. Marais L, van Rensburg SJ, van Zyl JM, et al. Maternal separation of rat pups increases the risk of developing depressive-like behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus. *Neurosci Res* 2008;61(1):106–112; doi: 10.1016/j.neures.2008.01.011
14. Lukas M, Bredewold R, Neumann ID, et al. Maternal separation interferes with developmental changes in brain vasopressin and oxytocin receptor binding in male rats. *Neuropharmacology* 2010;58(1):78–87; doi: 10.1016/j.neuropharm.2009.06.020
15. Lajud N, Roque A, Cajero M, et al. Periodic maternal separation decreases hippocampal neurogenesis without affecting basal corticosterone during the stress hypo-responsive period, but alters HPA axis and coping behavior in adulthood. *Psychoneuroendocrinology* 2012;37(3):410–420; doi: 10.1016/j.psyneuen.2011.07.011
16. Ruiz R, Roque A, Pineda E, et al. Early life stress accelerates age-induced effects on neurogenesis, depression, and metabolic risk. *Psychoneuroendocrinology* 2018;96:203–211; doi: 10.1016/j.psyneuen.2018.07.012
17. Roque A, Valles Méndez KM, Ruiz R, et al. Early life stress induces a transient increase in hippocampal corticotropin-releasing hormone in rat neonates that precedes the effects on hypothalamic neuropeptides. *Eur J Neurosci* 2021;55(9-10):2108–2121; doi: 10.1111/ejn.15193
18. Mirescu C, Peters JD, Gould E. Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nat Neurosci* 2004;7(8):841–846; doi: 10.1038/nn1290
19. Suri D, Veenit V, Sarkar A, et al. Early stress evokes age-dependent biphasic changes in hippocampal neurogenesis, BDNF expression, and cognition. *Biol Psychiatry* 2013;73(7):658–666; doi: 10.1016/j.biopsych.2012.10.023
20. Catale C, Bisicchia E, Carola V, et al. Early life stress exposure worsens adult remote microglia activation, neuronal death, and functional recovery after focal brain injury. *Brain Behav Immun* 2021;94:89–103; doi: 10.1016/j.bbi.2021.02.032
21. Delpech JC, Wei L, Hao J, et al. Early life stress perturbs the maturation of microglia in the developing hippocampus. *Brain Behav Immun* 2016;57:79–93; doi: 10.1016/j.bbi.2016.06.006
22. Catale C, Gironda S, Iacono Lo, et al. Microglial function in the effects of early-life stress on brain and behavioral development. *J Clin Med* 2020;9(2):468; doi: 10.3390/jcm9020468
23. Diaz-Chávez A, Lajud N, Roque A, et al. Early life stress increases vulnerability to the sequelae of pediatric mild traumatic brain injury. *Exp Neurol* 2020;329:113318; doi: 10.1016/j.expneurol.2020.113318
24. Lajud N, Roque A, Cheng JP, et al. Early life stress preceding mild pediatric traumatic brain injury increases neuroinflammation but does not exacerbate impairment of cognitive flexibility during adolescence. *J Neurotrauma* 2021;38(4):411–421; doi: 10.1089/neu.2020.7354
25. Vargas J, Junco M, Gomez C, et al. Early life stress increases metabolic risk, HPA axis reactivity, and depressive-like behavior when combined with postweaning social isolation in rats. *PLoS One* 2016;11(9):e0162665; doi: 10.1371/journal.pone.0162665
26. Roque A, Ruiz-González R, Pineda-López E, et al. Prenatal immobilization stress and postnatal maternal separation cause differential neuroendocrine responses to fasting stress in adult male rats. *Dev Psychobiol* 2020;62(6):737–748; doi: 10.1002/dev.21947
27. Niraula A, Sheridan JF, Godbout JP. Microglia priming with aging and stress. *Neuropsychopharmacology* 2017;42(1):318–333; doi: 10.1038/npp.2016.185
28. Réus GZ, Giridharan VV, de Moura AB, et al. The impact of early life stress and immune challenge on behavior and glia cells alteration in late adolescent rats. *Int J Dev Neurosci* 2021;81(5):407–415; doi: 10.1002/jdn.10108
29. Norden DM, Muccigrosso MM, Godbout JP. Microglial priming and enhanced reactivity to secondary insult in aging, and traumatic CNS injury, and neurodegenerative disease. *Neuropharmacology* 2015;96(Pt A):29–41; doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.10.028
30. Lajud N, Díaz-Chávez A, Radabaugh HL, et al. Delayed and abbreviated environmental enrichment after brain trauma promotes motor and cognitive recovery that is not contingent on increased neurogenesis. *J Neurotrauma* 2019;36(5):756–767; doi: 10.1089/neu.2018.5866
31. Kline AE, Wagner AK, Westergom BP, et al. Acute treatment with the 5-HT(1A) receptor agonist 8-OH-DPAT and chronic environmental enrichment confer neurobehavioral benefit after experimental brain trauma. *Behav Brain Res* 2007;177(2):186–194; doi: 10.1016/j.bbr.2006.11.036
32. Moschonas EH, Niesman PJ, Vozzella VJ, et al. Enriching adult male rats prior to traumatic brain injury does not attenuate neurobehavioral or histological deficits. *Brain Res* 2023;1807:148314; doi: 10.1016/j.brainres.2023.148314
33. Radabaugh HL, LaPorte MJ, Greene AM, et al. Refining environmental enrichment to advance rehabilitation based research after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol* 2017;294:12–18; doi: 10.1016/j.expneurol.2017.04.01
34. Morris, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci. Methods* 1984;11(1):47–60; doi: 10.1016/0165-0270(84)90007-4
35. Kline AE, McAloon RL, Henderson KA, et al. Evaluation of a combined therapeutic regimen of 8-OH-DPAT and environmental enrichment after experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2010;27(11):2021–2032; doi: 10.1089/neu.2010.1535
36. Verdonk F, Roux P, Flamant P, et al. Phenotypic clustering: a novel method for microglial morphology analysis. *J Neuroinflammation* 2016;13(1):153; doi: 10.1186/s12974-016-0614-7
37. Ruiz-González R, Lajud N, Tejeda-Martínez AR, et al. Antibiotic-induced microbiota depletion in normally-reared adult rats mimics the neuroendocrine effects of early life stress. *Brain Res* 2022;1793:148055; doi: 10.1016/j.brainres.2022.148055
38. Roque A, Ochoa-Zarzosa A, Torner L. Maternal separation activates microglial cells and induces an inflammatory response in the hippocampus of male rat pups, independently of hypothalamic and peripheral cytokine levels. *Brain Behav Immun* 2015;55:39–48; doi: 10.1016/j.bbi.2015.09.017
39. Karperien A, Ahammer H, Jelinek HF. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Front Cell Neurosci* 2013;7(3):3; doi: 10.3389/fncel.2013.00003
40. Cotella EM, Durando PE, Suárez MM. A double-hit model of stress dysregulation in rats: Implications for limbic corticosteroid receptors and anxious behavior under amitriptyline treatment. *Stress* 2014;17(3):235–246; doi: 10.3109/10253890.2014.910649
41. Heim C, Nemeroff CB. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry* 2001;49(12):1023–1039; doi: 10.1016/s0006-3223(01)01157-x
42. Osier ND, Korpon JR, Dixon CE. Controlled cortical impact model. In: *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects*. (Kobeissy FH, ed.) CRC Press/Taylor & Francis: Boca Raton, FL; 2015.
43. Tucker LB, Velosky AG, McCabe JT. Applications of the Morris water maze in translational traumatic brain injury research. *Neurosci Biobehav Rev* 2018;88:187–200; doi: 10.1016/j.neubiorev.2018.03.010
44. Barlow KM. Postconcussion syndrome: a review. *J Child Neurol* 2016;31(1):57–67; doi: 10.1177/0883073814543305
45. Dwyer B, Katz DI. Postconcussion syndrome. *Handb Clin Neurol* 2018;158:163–178; doi: 10.1016/B978-0-444-63954-7.00017-3
46. Rees PM. Contemporary issues in mild traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil* 2003;84(12):1885–1894; doi: 10.1016/j.apmr.2003.03.001
47. Sandstrom NJ, Hart SR. Isolation stress during the third postnatal week alters radial arm maze performance and corticosterone levels in adulthood. *Behav Brain Res* 2005;156(2):289–296; doi: 10.1016/j.bbr.2004.05.033

48. Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, et al. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol* 2013;106:107:1–16; doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.04.001
49. Soch A, Sominsky L, Younesi S, et al. The role of microglia in the second and third postnatal weeks of life in rat hippocampal development and memory. *Brain Behav Immun* 2020;88:675–687; doi: 10.1016/j.bbi.2020.04.082
50. Rocha M, Wang D, Avila-Quintero V, et al. Deficits in hippocampal-dependent memory across different rodent models of early life stress: systematic review and meta-analysis. *Transl Psychiatry* 2021;11(1):231; doi: 10.1038/s41398-021-01352-4
51. Aisa B, Tordera R, Lasheras B, et al. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology* 2007;32(3):256–266; doi: 10.1016/j.psyneuen.2006.12.013
52. Baudin A, Blot K, Verney C, et al. Maternal deprivation induces deficits in temporal memory and cognitive flexibility and exaggerates synaptic plasticity in the rat medial prefrontal cortex. *Neurobiol Learn Mem* 2012;98(3):207–214; doi: 10.1016/j.nlm.2012.08.004
53. Cao X, Huang S, Cao J, et al. The timing of maternal separation affects morris water maze performance and long-term potentiation in male rats. *Dev Psychobiol* 2014;56(5):1102–1109; doi: 10.1002/dev.21130
54. Sanchez CM, Titus DJ, Wilson NM, et al. Early life stress exacerbates outcome after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2020;38(5):555–565; doi: 10.1089/neu.2020.7267.
55. Ferle V, Repouskou A, Aspiotis G, et al. Synergistic effects of early life mild adversity and chronic social defeat on rat brain microglia and cytokines. *Physiol Behav* 2020;215:112791; doi: 10.1016/j.physbeh.2019.112791
56. Lauro C, Limatola C. Metabolic reprogramming of microglia in the regulation of the innate inflammatory response. *Front Immunol* 2020;11:493; doi: 10.3389/fimmu.2020.00493
57. Yang S, Qin C, Hu ZW, et al. Microglia reprogram metabolic profiles for phenotype and function changes in central nervous system. *Neurobiol Dis* 2021;152:105290; doi: 10.1016/j.nbd.2021.105290
58. Raj DDA, Jaarsma D, Holtman IR, et al. Priming of microglia in a DNA-repair deficient model of accelerated aging. *Neurobiol Aging* 2014;35(9):2147–2160; doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.025
59. Shi FJ, Xie H, Zhang CY, et al. Is Iba-1 protein expression a sensitive marker for microglia activation in experimental diabetic retinopathy? *Int J Ophthalmol* 2021;14(2):200–208; doi: 10.18240/ijo.2021.02.04
60. Grabert K, Michael T, Karavolos MH, et al. Microglial brain region–dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nat Neurosci* 2016;19(3):504–516; doi: 10.1038/nn.4222
61. Wang Y, Wu J, Xie H, et al. Enriched environment promotes cognitive function recovery following cerebral ischemic injury via upregulating GABAergic and glutamatergic systems in the contralateral hippocampus. *Evid Based Complement Alternat Med* 2020;2020:8850119; doi: 10.1155/2020/8850119
62. Chen Z, Trapp BD. Microglia and neuroprotection. *J Neurochem* 2016;136 Suppl 1:10–17; doi: 10.1111/jnc.13062
63. Ji K, Akgul G, Wollmuth LP, et al. Microglia actively regulate the number of functional synapses. *PLoS One* 2013;8(2):e56293; doi: 10.1371/journal.pone.0056293
64. Tapias V, Moschonas EH, Bondi CO, et al. Environmental enrichment improves traumatic brain injury-induced behavioral phenotype and associated neurodegenerative process. *Exp Neurol* 2022;357:114204; doi: 10.1016/j.expneurol.2022.114204
65. Makinde HM, Cuda CM, Just TB, et al. Nonclassical monocytes mediate secondary injury, neurocognitive outcome, and neutrophil infiltration after traumatic brain injury. *J Immunol* 2017;199(10):3583–3591; doi: 10.4049/jimmunol.1700896
66. Mirescu C, Peters JD, Gould E. Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nat Neurosci* 2004;7(8):841–846; doi: 10.1038/nn1290
67. Weiss IC, Domeney AM, Heidbreder CA, et al. Early social isolation, but not maternal separation, affects behavioral sensitization to amphetamine in male and female adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2001;70(2-3):397–409; doi: 10.1016/s0091-3057(01)00626-8
68. Roman E, Ploj K, Nylander I. Maternal separation has no effect on voluntary ethanol intake in female Wistar rats. *Alcohol* 2004;33(1):31–39; doi: 10.1016/j.alcohol.2004.04.002
69. Lajud N, Torner L. Early life stress and hippocampal neurogenesis in the neonate: sexual dimorphism, long term consequences and possible mediators. *Front Mol Neurosci* 2015;8:3; doi: 10.3389/fnmol.2015.00003
70. Lundberg S, Abelson KSP, Nylander I, et al. Few long-term consequences after prolonged maternal separation in female Wistar rats. *PLoS One* 2017;12(12):e0190042; doi: 10.1371/journal.pone.0190042.
71. Lee YJ, Koe AS, Ashokan A, et al. Female rats are resilient to the behavioral effects of maternal separation stress and exhibit stress-induced neurogenesis. *Heliyon* 2020;6(8):e04753; doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04753

CAPÍTULO 2

LA SEPARACIÓN MATERNAL AUMENTA LA CONDUCTA TIPO DEPRESIVA SIN ALTERAR LA MEMORIA DE ASOCIACIÓN OBJETO-LUGAR EN ANIMALES ADULTOS CON LESIÓN CEREBRAL TRAUMÁTICA

Resumen

El estrés durante la vida temprana (ELS) afecta la memoria de asociación objeto-lugar, aumenta la conducta tipo depresiva y la conducta de ansiedad. Estudios anteriores han demostrado que el ELS afecta el aprendizaje espacial después de una lesión cerebral traumática (TBI) en adultos; no obstante, aún no está claro si la mTBI aumenta los efectos en la emocionalidad asociados con el ELS. Este estudio tuvo como objetivo evaluar si la mTBI exacerba los efectos del ELS sobre la emocionalidad y la memoria a corto plazo. La separación maternal durante 180 minutos al día (SM180) durante los primeros 21 días postnatales (DPN) se utilizó como modelo de ELS, mientras que los controles (CONT) permanecieron sin manipular. En el DPN 110, las ratas fueron sometidas a un impacto cortical controlado leve (2.6 mm) o se mantuvieron como testigos (SHAM). La memoria de corto plazo se evaluó en la prueba de localización de objetos 14 días después de la lesión, y la emocionalidad se evaluó en la prueba de campo abierto y la prueba de nado forzado. Los resultados indicaron que las ratas SM180+SHAM y CONT+TBI, pero no las ratas MS180+TBI, mostraron deterioro cognoscitivo en la prueba de localización de objetos. Además, el grupo SM180+mTBI presentó mayor tiempo de inmovilidad en comparación con los grupos SHAM y el grupo CONT+mTBI en la prueba de nado forzado. En conclusión, la combinación de ELS y mTBI no aumenta los efectos de la SM180 sobre la memoria de corto plazo y la conducta de ansiedad, pero causa una estrategia pasiva en respuesta al estrés por nado.

PALABRAS CLAVE: estrés durante la vida temprana, hipocampo, aprendizaje, emocionalidad, memoria de asociación objeto-lugar

INTRODUCCIÓN

La exposición al estrés durante la vida temprana (ELS) afecta el desarrollo del sistema nervioso central y programa la reactividad del eje hipocampo-hipófisis-adrenal (HPA. Heim et al., 1997 Sapolsky et al., 2000; Lupien et al., 2009; McEwen, 2007, 2017). A su vez, estos eventos aumentan la vulnerabilidad a desarrollar trastornos emocionales y a sufrir una lesión cerebral traumática (TBI) en la vida adulta (Heim et al., 1997; Aisa et al., 2007; Ruiz et al., 2018; Juruena et al., 2020; Roque et al., 2021). Las alteraciones inducidas por el ELS en el sistema nervioso central se asocian a déficits en la memoria espacial y la regulación emocional, lo que podría proporcionar una desventaja en la supervivencia de los individuos.

El modelo animal más utilizado para estudiar los efectos del ELS es la SM180 en ratas (Orso et al., 2019; Cui et al., 2020; Nishi, 2020). La SM180 tiene efectos negativos en la emocionalidad y la cognición a largo plazo, como un incremento en la conducta tipo ansiosa, en la conducta tipo depresiva y deterioro cognoscitivo en las pruebas de asociación objeto lugar (Wei et al., 2010; Banqueri et al., 2017; Cui et al., 2020; Hamdan, et al., 2022).

Las TBI son reportadas comúnmente en individuos que han sufrido ELS. Estudios en modelos animales han mostrado que las TBI causan alteraciones cognoscitivas y aumentan la conducta tipo depresiva en la prueba de nado forzado (Pearn, et al., 2016; Needham, et al., 2019). Trabajos anteriores de nuestro grupo demostraron que SM180 en combinación con una mTBI pediátrica afecta el desempeño cognoscitivo y aumenta la neuroinflamación hipocampal, tanto en animales juveniles como adultos (Díaz-Chávez et al., 2020; Salinas et al., 2023). Los eventos de la vida adulta y las experiencias adversas contribuyen a la forma en que los individuos se adaptan a un entorno en constante cambio (Daskalakis, et al., 2013). Por lo anterior, es pertinente suponer que la TBI exacerba los efectos de la separación maternal sobre la emocionalidad y la memoria a corto plazo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales experimentales

Se obtuvieron 8 ratas gestantes sincronizadas de la cepa Sprague-Dawley, las cuales se mantuvieron en habitaciones con temperatura y ciclo de luz controlados, comida y agua *ad libitum*. Se consideró el día de nacimiento como día postnatal (DPN) cero. En el día DPN1, las camadas se ajustaron a ocho crías (cinco machos y tres hembras) las cuales fueron asignadas aleatoriamente a las madres control (CONT) o sometidas a SM180. Al DPN21 las crías se destetaron y se dejaron crecer hasta la edad adulta. A los 110 días de edad, se sometieron a una mTBI y se dejaron recuperar por dos semanas. Todos los grupos estuvieron formados por individuos provenientes de al menos tres camadas diferentes. Evaluamos la conducta tipo ansiosa en la prueba de campo abierto, la conducta tipo depresiva en la prueba de nado forzado y la memoria de asociación objeto-lugar de corto plazo en la prueba de desplazamiento de objetos. El cuidado de los animales se realizó siguiendo la norma oficial de uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité de ética de la Comisión Nacional de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (R-2019-785-060).

Separación maternal

La SM consistió en aislar a las crías de su madre en cajas de acrílico con material de nido por periodos de 3 horas diarias (9:00 am a 12:00 pm) en un cuarto independiente a la colonia, del DPN 1 al 21 y con la temperatura controlada (30 - 32° C). El grupo control se mantuvo sin perturbar excepto en los días de limpieza rutinaria.

Lesión cerebral traumática por impacto cortical controlado (CCI)

Al DPN 110, la mitad de las ratas macho de cada camada fueron anestesiadas con isofluorano en concentraciones de 4% para la inducción y 2% para el mantenimiento durante la cirugía. Se aseguraron en un marco estereotáxico donde se realizó una craneotomía para producir una lesión cortical controlada leve

(2.6 mm) a una velocidad de 4 m/s mediante el uso de un impactador acoplado a un cilindro neumático. El resto permaneció como testigos a los cuales se les realizaron los mismos procedimientos quirúrgicos (anestesia, craneotomía, etc.) pero sin el impacto (grupo SHAM).

Evaluación neurológica aguda

La evaluación neurológica aguda se realizó inmediatamente después de terminar los procedimientos quirúrgicos del CCI. Para ello, se presionaron suavemente las patas de las ratas cada 5s y se registró el tiempo que la estimulación provocó una respuesta de retirada. El retorno del reflejo de enderezamiento se determinó por el tiempo necesario para que la rata pasara de la posición supina a la prona. Estos índices neurológicos se utilizaron para determinar el nivel de gravedad de la lesión y como criterio de exclusión para eliminar aquellos individuos cuyos parámetros se encontraron por fuera de los rangos establecidos (IC 99%).

Prueba de campo abierto

La prueba de campo abierto se realizó en una arena de plexiglás negro con material de cama (80 cm x 60 cm x 30 cm). La arena se iluminó con un gradiente de luz (centro 50 lux, esquinas 7 lux). Se colocó a las ratas en la arena con la nariz hacia la pared y se les dejó explorar la arena durante 5 min. Transcurrido este periodo, se encendieron las luces y se permitió que los animales exploraran durante 5 minutos para habituarlos a la siguiente prueba. La prueba se registró con el uso de una cámara web. Los videos fueron analizados usando el programa EVENTLOG (version 1.0 October 1986, R Hendersen). Se evaluó el número de entradas al centro, el tiempo en el centro y latencia al centro durante 5 min. Se consideró como un cruce cuando la rata realizó una entrada más allá de la altura de las patas delanteras en el centro de la arena.

Prueba de desplazamiento de objetos

La prueba de desplazamiento de objetos consistió en dos ensayos. En el primer ensayo, a los animales se les permitió explorar dos objetos idénticos durante 10 min. Los objetos fueron lo suficientemente pesados para evitar el movimiento de

los animales y se limpiaron con EtOH al 70 % y agua entre sujetos. Una hora después, se realizó un segundo ensayo, donde se reubicó uno de los objetos y se dejó explorar al sujeto durante 10 min. Las ratas siempre se colocaron en la arena con la nariz hacia la pared al comienzo de cada ensayo. Todas las sesiones fueron grabadas con la ayuda de una cámara web. Los videos fueron analizados usando el programa EVENTLOG (version 1.0 October 1986, R Hendersen). Se evaluó el tiempo de exploración en cada objeto durante los primeros 3 min de ambos ensayos. Adicionalmente, se calculó el índice de discriminación en el segundo ensayo mediante la fórmula: $(ID = \frac{\text{Tiempo de exploración del objeto desplazado}}{\text{Tiempo total de exploración de ambos objetos}})$.

Prueba de nado forzado

La prueba de nado forzado consistió en colocar a las ratas individualmente en un cilindro de 35 cm de ancho x 50 cm de altura lleno de agua a 21 °C hasta una profundidad de 40 cm durante 10 min. El comportamiento fue registrado con el uso de una cámara web. Se evaluó la conducta de escalamiento, de nado y flotación durante los 10 min. Se consideró como escalamiento el movimiento de las patas delanteras dirigidas hacia la superficie que rompe el plano del agua. Se consideró como nado a el movimiento horizontal a lo largo del cilindro y realizando movimientos en alguna de las extremidades. La inmovilidad, se consideró cuando el animal permanece flotando sin forcejear y sin realizar movimientos en las extremidades. Los videos fueron analizados usando el programa EVENTLOG (version 1.0 October 1986, R Hendersen).

Análisis estadístico

El análisis estadístico del peso corporal se realizó mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) de medidas repetidas utilizando el tiempo como factor repetido y el estrés o la lesión como factores independientes. Para los análisis estadísticos de los parámetros neurológicos agudos y las pruebas de conducta se realizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) utilizando el estrés o la lesión como factores independientes. Cuando en la ANOVA se detectaron efectos

significativos se realizaron comparaciones múltiples con la prueba de Tukey. La significancia estadística se estableció como $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

La TBI altera los parámetros neurológicos agudos sin afectar la ganancia de peso corporal

Diez animales fueron eliminados del estudio debido a que cumplieron con los criterios de eliminación para controlar la intensidad de la lesión. En el análisis estadístico de la evaluación neurológica aguda se observó un efecto significativo de la mTBI sobre el tiempo de aparición del reflejo de las extremidades (ANOVA, derecha $F_{3, 26}:5.44$ $p=0.005$ e izquierda, $F_{3, 26}:6.58$, $p=0.002$). Adicionalmente, observamos un efecto significativo de la mTBI sobre el tiempo que los animales tardaron en enderezarse (ANOVA, $F_{3, 26}:13.50$, $p<0.001$). No observamos efecto de la SM180 en ninguno de los parámetros ($p>0.05$). En las comparaciones múltiples del reflejo de enderezamiento observamos que los grupos CONT+TBI y SM180+TBI son diferentes al grupo SHAM ($p<0.05$, tabla 1) pero no se observaron diferencias entre el grupo CONT+TBI y SM180+TBI ($p>0.05$).

Tabla 1: Resumen de parámetros de la evaluación neurológica aguda.

Grupo	Reflejo de la pata derecha (s)	Reflejo de la pata izquierda (s)	Reflejo de enderezamiento (s)
CONT+SHAM	112.9 ±10.14	117.6 ± 8.8	149.6 ±7.88
SM180+SHAM	112.4 ±18.13	115.5 ± 19.9	162.7 ±27.89
CONT+mTBI	227.44 ± 38.42*	254.77±58.48*#	372.11 ±36.94**##
SM180+mTBI	218.1 ±42.61*	224.2 ±34	402.1 ±55.26***##

Control: CONT; separación maternal: SM180; lesión cortical controlada moderada: mTBI; testigos: Sham (Prom ± EST, ANOVA * $p<0.05$ y ** $p<0.01$ vs CONT + Sham, # $p<0.05$ y ## $p<0.01$ vs SM180+Sham n = 9-10).

La ANOVA de medidas repetidas no mostró un efecto significativo del tratamiento sobre el peso corporal ($p>0.05$) pero sí del tiempo postlesión ($F_{23, 828}:5.744$, $p<0.001$) y de la interacción entre el tiempo y el tratamiento ($F_{69, 828}:1.387$, $p=0.024$). En las comparaciones múltiples no se observaron diferencias entre los grupos ($p>0.05$, Fig. 1).

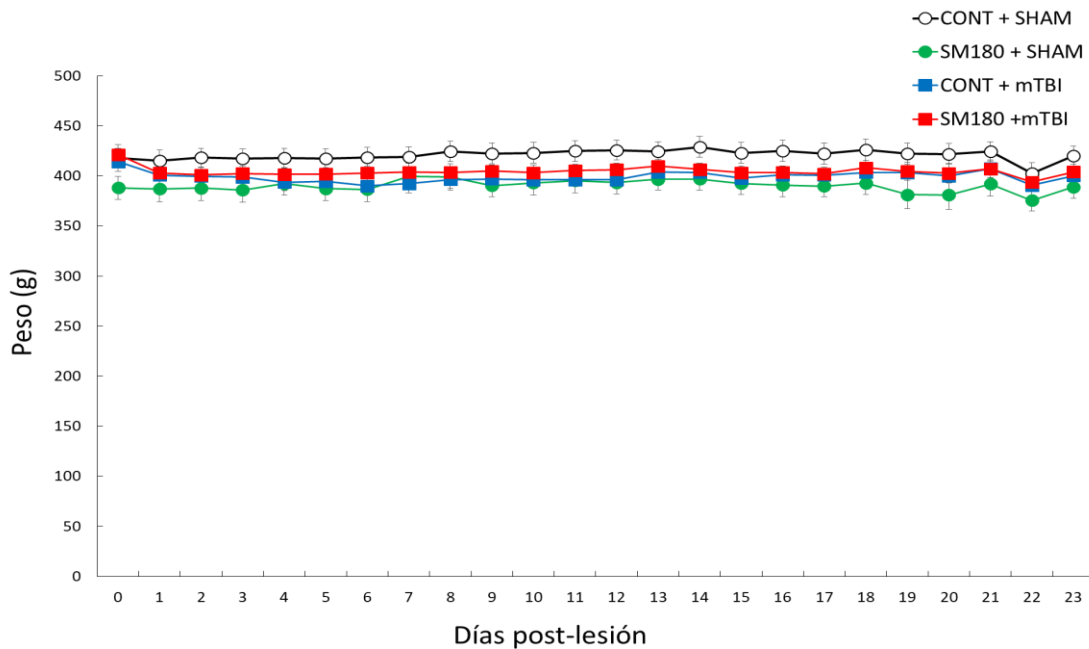


Figura 1. La SM y la TBI no afectan la ganancia de peso durante el periodo post lesión. La gráfica muestra el peso (g) de los animales control (CONT) o sometidos a separación maternal (SM180) a los que se les realizó una lesión cortical controlada leve (mTBI) en la vida adulta o que permanecieron como testigos (SHAM). Prom \pm EST, n= 9-10.

La SM180 y la TBI alteran la memoria en la prueba de desplazamiento de objetos

En el análisis estadístico de la prueba de desplazamiento de objetos, se observó que en el ensayo uno no hay efecto de la mTBI, la SM180 ni de los objetos en el tiempo de exploración ($p>0.05$), lo que nos indica que los resultados de la evaluación de la memoria no están sesgados por una preferencia innata por alguno de los objetos (Fig. 2A). En el ensayo dos, la ANOVA de tres vías no mostró un efecto de la mTBI ni de la SM180 ($p>0.05$) pero si del tiempo de exploración de los objetos ($F_{1, 35}:18.28$, $p<0.001$) pero no se observó efecto. Adicionalmente, se observó un efecto de la interacción entre el tiempo de exploración y el tratamiento

($F_{3,66}:3.025, p=0.036$). En las comparaciones múltiples intra-grupo se observó que los grupos CONT+SHAM y SM180+TBI mostraron un tiempo de exploración significativamente mayor en el objeto desplazado con respecto al conocido; mientras que estas diferencias no se observaron en los grupos SM180+SHAM y CONT+TBI (Fig. 2B). Por último, en el análisis estadístico del índice de discriminación no se observó efecto del tratamiento ($p>0.05$. Fig. 3).

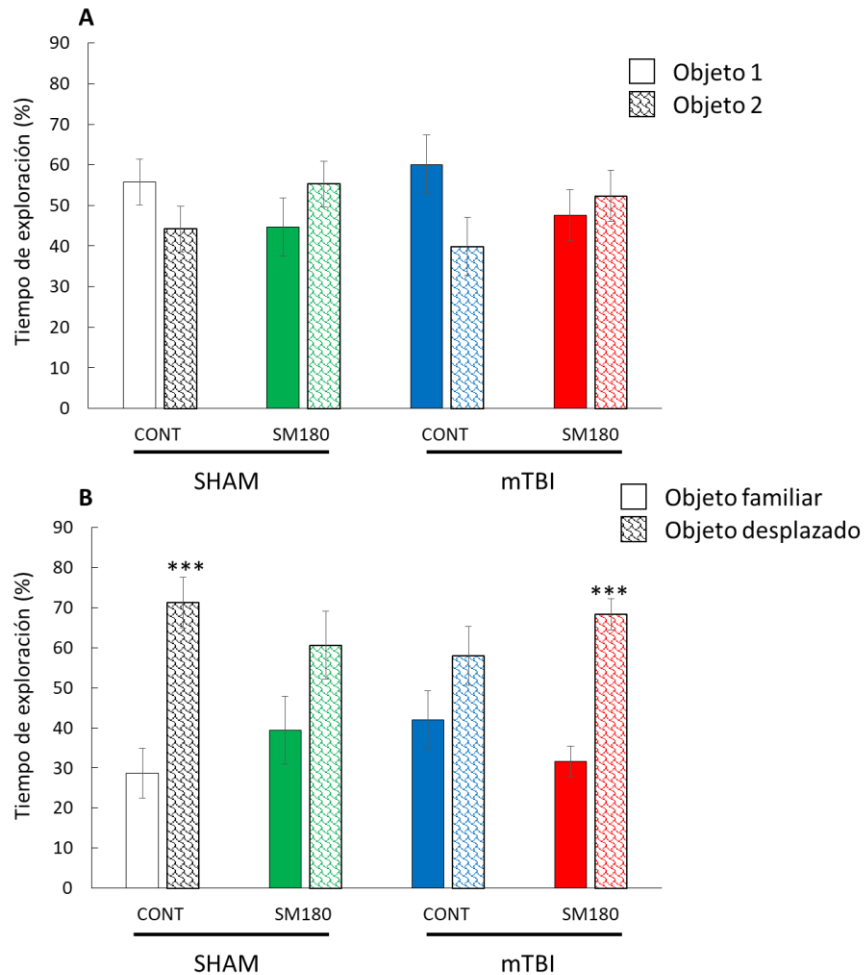


Figura 2. La TBI y la SM180 alteran la memoria en la prueba de desplazamiento de objetos. A) ensayo 1 y B) ensayo 2. Porcentaje de exploración de los animales control (CONT) o sometidos a separación maternal (SM180) a los que se les realizó una lesión cortical controlada de intensidad moderada (mTBI) en la vida adulta o que permanecieron como testigos (SHAM). Prom \pm EST, ANOVA, **** $p<0.0001$, *** $p>0.05$ vs. objeto familiar, $n=9-10$.

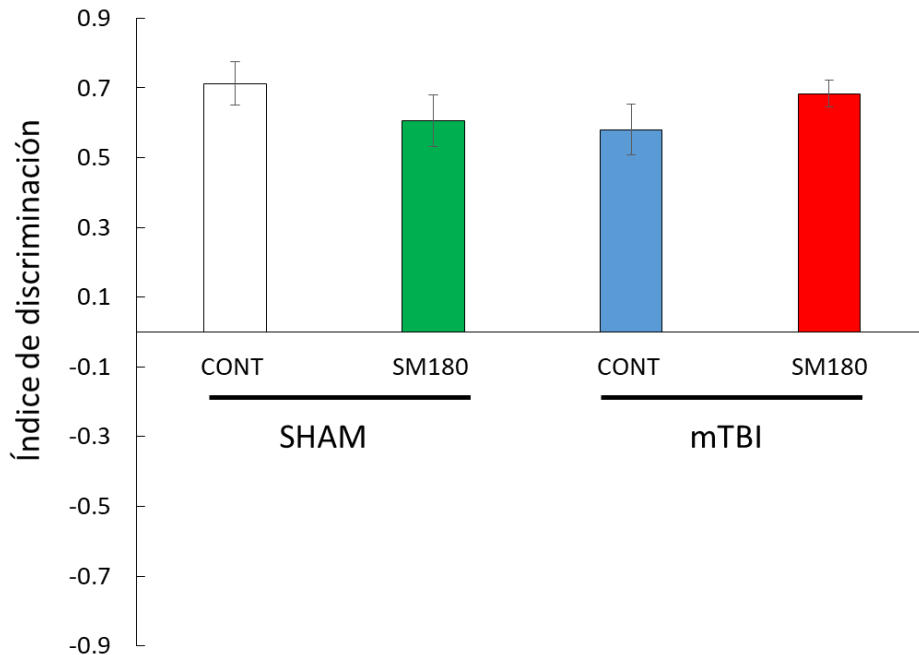


Figura 3. La TBI y la SM180 no tienen un efecto sobre el índice de discriminación en la prueba de desplazamiento de objetos. La gráfica muestra el índice de exploración de los animales control (CONT) o sometidos a separación maternal (SM180) a los que se les realizó una lesión cortical controlada (TBI) en la vida adulta o que permanecieron como testigos (SHAM). Prom \pm EST n= 9-10.

La combinación SM180 y mTBI aumenta la conducta pasiva en ratas

El análisis estadístico de la prueba de nado forzado no mostró un efecto de la mTBI, ni de la SM180 en el tiempo de escalamiento ($p > 0.05$, Fig. 4A) ni el tiempo de nado ($p > 0.05$, Fig. 4B). El ANOVA de dos vías mostró un efecto de la mTBI ($F_{1, 9}: 9.29, p=0.014$), de la SM180 ($F_{1, 9}: 9.59, p=0.013$) y de la interacción entre la mTBI y la SM180 ($F_{1, 9}: 7.79, p=0.021$) sobre la conducta de inmovilidad. Las comparaciones múltiples indican que el grupo SM180+mTBI mostró un mayor tiempo de inmovilidad en comparación con los grupos SHAM y el grupo CONT+mTBI ($p < 0.05$, Fig. 4C). Los efectos de la SM180 previamente reportados solamente fueron confirmados mediante una prueba t de Student ($p=0.018$).

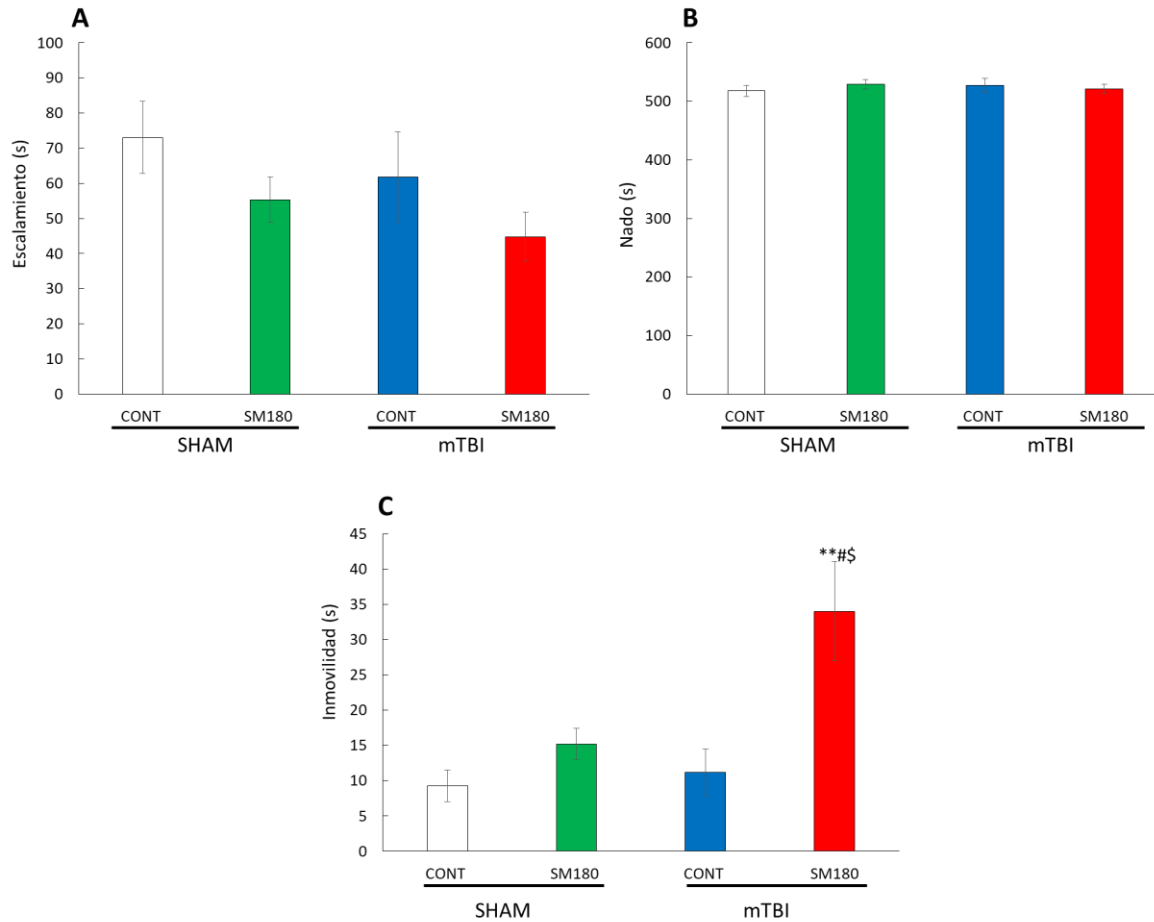


Figura 4. La SM180 y la mTBI tienen un efecto sinérgico sobre la conducta de inmovilidad en la prueba de nado forzado en animales con lesión traumática moderada. Las gráficas muestran el tiempo de escalamiento (A), nado (B) y flotación (C) de los animales control (CONT) o sometidos a separación maternal (SM180) a los que se les realizó una lesión cortical controlada (mTBI) en la vida adulta o que permanecieron como testigos (SHAM). Prom \pm EST, ANOVA; ** $p < 0.01$ vs CONT+Sham, # $p > 0.05$ vs SM180+Sham, \$ $p > 0.05$ vs CONT+TBI, $n = 9-10$.

La SM180 y la mTBI no alteran la conducta de tipo ansiosa en la prueba de campo abierto

En el análisis de la prueba de campo abierto no se observó un efecto de la SM180 ni de la mTBI sobre el tiempo que las ratas pasan en el centro de la caja ($p > 0.05$, Fig. 9A). El análisis estadístico para la latencia al centro y número de

entradas al centro no mostró un efecto significativo de la SM180 ni de la mTBI ($p > 0.05$. Fig. 9B y C).

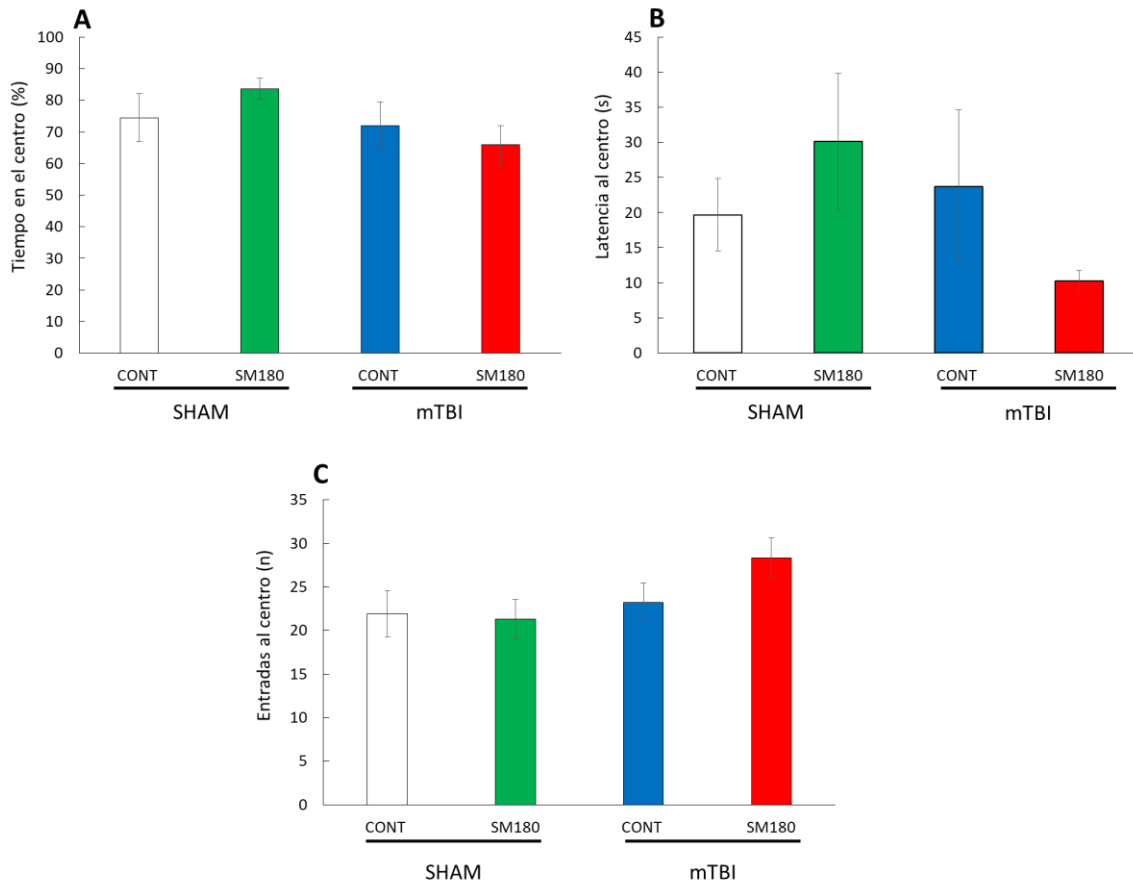


Figura 9. La SM180 y la TBI no afectan la conducta en la prueba de campo abierto. Las gráficas muestran el porcentaje de tiempo en el centro (A), latencia al centro en segundos (B) y el número de entradas al centro (C) de los animales control (CONT) o sometidos a separación maternal (SM180) a los que se les realizó una lesión cortical controlada moderada (mTBI) en la vida adulta o que permanecieron como testigos (SHAM. Prom \pm EST, n = 9-10).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo evaluamos el efecto de la SM180 sobre la memoria de asociación objeto-lugar y la emocionalidad después de una mTBI. Observamos que el grupo SM180+mTBI no presenta alteraciones en la memoria en la prueba de desplazamiento de objetos ni en la conducta de ansiedad. Sin embargo, presentan mayor tiempo de inmovilidad en comparación con los grupos SHAM y el grupo CONT+TBI en la prueba de nado forzado.

En modelos preclínicos de TBI la evaluación neurológica aguda nos permite evaluar la pérdida de conciencia después de la lesión y se consideran como un correlato de la escala de coma de Glasgow en humanos (Bell, *et al.*, 2014; Steiman, 2018). Como un paralelismo a la práctica clínica, las TBI en roedores se clasifican como leves, moderadas o severas con base en la profundidad de la lesión y los correlatos de pérdida de la conciencia. De forma experimental, estos parámetros nos permiten identificar a aquellos animales que, debido a las variaciones inherentes de la cirugía, recibieron una lesión que no se encontraba dentro del rango de severidad establecido (leve, mTBI). El análisis estadístico de los parámetros finales mostró que, en congruencia con los criterios de exclusión, la TBI alteró causó un aumento en el tiempo de parición de los reflejos en las patas y el reflejo de enderezamiento. Es importante destacar que no hubo diferencias entre los grupos lesionados, lo que nos indica que en ambos grupos las lesiones fueron de intensidades similares y las diferencias observadas en la conducta no son debidas a un sesgo metodológico.

En el presente trabajo observamos que ni la lesión, ni el estrés afectan el peso posterior a la lesión; lo cual sugiere que ninguna de nuestras variables altera el estado de salud general de los animales. Estos datos se encuentran en congruencia con estudios previos donde se ha observado que las TBI no afectan el peso corporal después de la lesión (Kalinichev, *et al.*, 2002; Bondi, *et al.*, 2014; Sánchez, *et al.*, 2020). No obstante, se encuentran en desacuerdo con resultados previos de nuestro grupo de investigación donde observamos que la SM180 aumenta el peso corporal en animales de dos y cuatro meses (Vargas *et al.*, 2016, Ruiz *et al.*, 2018). Esta

discrepancia puede ser explicada por el tipo de SM realizada en los trabajos previos, en los cuales las ratas fueron separadas simultáneamente de la madre y las otras crías de la camada (aislamiento social). El aislamiento social durante la SM hace que esta sea un estímulo estresante más severo que causa efectos más robustos a largo plazo.

La TBI y la SM180 disminuyen la memoria en la prueba de desplazamiento de objetos y su combinación promueve la localización del objeto novedoso

En la prueba de desplazamiento de objetos, observamos que el grupo CONT+SHAM y SM180+mTBI mostraron un mayor tiempo de exploración en el objeto desplazado con respecto al familiar, lo que indica que la memoria de localización de objetos está intacta. También observamos que los grupos SM180+SHAM y CONT+mTBI mostraron un tiempo de exploración similar en ambos objetos, lo que sugiere que la SM180 y la mTBI causan déficits en la memoria de desplazamiento de forma independiente. Sin embargo, estos déficits no se observaron en el grupo SM180+mTBI. Estos resultados sugieren que la combinación de estresores podría tener un impacto positivo sobre la ejecución de tareas que requieren la memoria a corto plazo, a diferencia de lo que ocurre en pruebas de aprendizaje espacial que evalúan la memoria a largo plazo (Díaz et al., 2021; Salinas et al., 2023). Este papel “protector” se encuentra en congruencia con la hipótesis del desajuste evolutivo (Nederhof & Schmidt, 2012), que establece que el ELS podría ejercer un rol adaptativo cuando el individuo adulto se desenvuelve en condiciones adversas o en presencia de un doble reto secundario (SM180+mTBI), y que los fenotipos maladaptativos solo aparecen cuando el ambiente no se ajusta a aquel para el cual el individuo fue programado (SM180+SHAM).

La combinación de la SM180 y la mTBI aumenta la conducta tipo depresiva pero no la conducta tipo ansiosa

En la prueba de nado forzado, observamos que la combinación de la SM180 y la mTBI aumenta sinérgicamente el tiempo de inmovilidad, lo que indica que el grupo SM180+mTBI presenta una conducta pasiva en respuesta al estrés por nado. Esta estrategia pasiva ha sido considerada como parámetro de conducta tipo depresiva en roedores.

En el presente trabajo únicamente observamos un efecto principal de la SM180 en el parámetro de inmovilidad; no obstante, las comparaciones post hoc no mostraron diferencias significativas entre el grupo SM180+SHAM y los controles. Las diferencias previamente reportadas únicamente pudieron ser confirmadas mediante una prueba *t* de Student (Ruiz et al., 2018). Los efectos de la SM180 en la conducta tipo depresiva en la prueba de nado forzado han sido ampliamente descritos (Lajud et al., 2012; Vargas et al., 2016; Cui et al., 2020; Roque et al., 2021); no obstante, en estos estudios únicamente se ha evaluado el efecto de la SM realizando una comparación sencilla (*t* de Student) con respecto al grupo control. A este respecto, es importante destacar que la ANOVA considera la variabilidad entre todos los grupos y puede ser más conservadora en sus conclusiones que la prueba *t* de Student, lo cual explica la discrepancia en los resultados.

Adicionalmente, se ha reportado que las TBI aumentan el riesgo a sufrir depresión (Stein et al., 2001). En modelos animales se ha observado que la TBI aumenta la conducta tipo depresiva en machos (Rashno et al., 2020; Yang et al., 2021). A diferencia de lo observado en la prueba de memoria de asociación objeto-lugar, los resultados obtenidos en la prueba de nado forzado son congruentes con la teoría del estrés acumulativo (Nederhof & Schmidt, 2012). En apoyo a esta idea, se ha reportado que la SM180, en combinación con una inyección de lipopolisacárido como simulador de un reto infeccioso, aumenta la conducta tipo depresiva en machos adultos (Saavedra et al., 2022).

En la prueba de campo abierto, observamos que ni la SM180 ni la mTBI alteraron el tiempo que los individuos pasan en el centro, ni el número de entradas y tampoco la latencia al centro, lo que indica que ninguno de los grupos presenta conducta tipo ansiosa. Los efectos de la SM180 en la conducta tipo ansiosa en

roedores son contradictorios. Diversos estudios han reportado que la SM180 aumenta la ansiedad en el laberinto elevado en cruz y la caja de luz/oscuridad (Hamdan, et al., 2022). En contraste, otros estudios no observan cambios (Lajud, et al., 2012). Esta discrepancia puede ser parcialmente explicada por el tipo de evaluación conductual y la edad de los individuos (Pavlovic et al., 2019). Se ha reportado que las TBI no aumentan la conducta tipo ansiosa 14 días después de la lesión (ratas juveniles) pero si, a los 28 y 60 días después de la lesión (en juveniles y adultos respectivamente (Ajao et al., 2012; Pu et al., 2023).

En estudios donde se realiza un doble reto (dos eventos adversos) se ha observado que el resultado depende de los eventos a los cuales es sometido el individuo. Saavedra y colaboradores (2022) reportan que la combinación de SM180 y lipopolisacárido aumenta la ansiedad en la prueba de campo abierto. Por el contrario, se ha reportado que las TBI en individuos expuestos a estrés crónico impredecible exhiben una disminución en la conducta tipo ansiedad (de la Tremblaye et al., 2021). En el estudio de ELS, la ansiedad es un fenómeno que busca ser mejor entendido y para esto se han propuesto estrategias en modelos animales para replicar este fenómeno. En roedores, las diferentes pruebas que permiten evaluar conducta tipo ansiosa ponen al individuo en disyuntiva donde se plantea el conflicto de acercamiento-evitación al que se enfrentan los roedores en la vida silvestre, equilibrando el deseo de explorar entornos novedosos y buscar recursos (acercamiento) mientras evitan depredadores y otras amenazas potencialmente dañinas (evitación. La-Vu et al., 2020). Lo anterior sugiere que la conducta tipo ansiedad en roedores suele ser discordante, ya que la variabilidad entre los eventos adversos a los que se puede enfrentar un individuo puede resultar en diferentes estrategias para contender con el conflicto/la prueba que afrontan.

CONCLUSIÓN

Nuestros datos sugieren que el ELS y la mTBI afectan el desempeño cognoscitivo en la prueba de desplazamiento de objetos, pero la combinación de ELS y mTBI no intensifica este efecto. Sin embargo, en la prueba de nado forzado

la combinación ELS y mTBI aumenta el tiempo de inmovilidad, lo que indica que ambos estresores tienen un efecto sinérgico sobre la conducta tipo depresiva

DISCUSIÓN GENERAL

En el primer capítulo, observamos que la SM180+mTBI afecta la adquisición del aprendizaje espacial en el MWM. La mTBI aumento la proporción de microglía activada en la corteza, el hipocampo y el hilus en ambos grupos, sin embargo, las ratas con SM180+mTBI exhibieron un mayor aumento en la activación microglial en CA1 ipsilateral del hipocampo en comparación con CONT+mTBI. En la región CA1 contralateral, este efecto se observó exclusivamente en SM180+mTBI. El ELS y la mTBI causaron una disminución en la neurogénesis del hipocampo de forma independiente y este efecto no se incrementó en las ratas SM180+mTBI. Adicionalmente, en el segundo capítulo observamos que el grupo SM180+mTBI no presenta alteraciones en la memoria en la prueba de desplazamiento de objetos. Sin embargo, mostraron un mayor tiempo de inmovilidad en comparación con los grupos SHAM y el grupo CONT+TBI en la prueba de nado forzado.

En la vida silvestre, la conducta de exploración de nuevos entornos, la búsqueda de recursos, la evitación depredadores y otras amenazas son fundamentales para la supervivencia de los individuos (Cassilhas et al., 2016; Wang et al., 2020). Los individuos tienen una gran capacidad de adaptarse a un entorno que se encuentra en constante cambio, mediante la modificación de su conducta. Entre las habilidades necesarias para la modificación de la conducta son el aprendizaje y la memoria. En el presente trabajo se evaluaron diferentes pruebas conductuales donde se plantean diferentes conflictos a los se enfrentan los roedores en la vida silvestre. Se ha sugerido que la orientación espacial depende de la neurogénesis, ya que el tamaño del territorio donde habitan roedores silvestres y su complejidad se correlaciona con la proliferación de neuronas en el hipocampo (Amrein et al., 2004; Cavegn et al., 2013). Nosotros observamos que la SM180 y la mTBI disminuyen la neurogénesis y este efecto no se incrementó en el grupo SM180+mTBI. Lo que concuerda con lo que observamos en la prueba de desplazamiento de objetos. Sin embargo, solo la combinación de SM180+mTBI afecto el desempeño en la prueba de MWM. Aunque ambas pruebas dependen del

hipocampo, el contexto y la duración de la prueba (el entorno) podrían jugar un papel importante en como el individuo las resuelven.

La prueba de desplazamiento evalúa la memoria espacial a corto plazo. Esta prueba se basa en la tendencia espontánea de los roedores a dedicar más tiempo a explorar un objeto desplazado que el familiar (Denninger et al., 2018) y depende de estructuras como el hipocampo y la corteza entorrinal (Mumby et al., 2002; Baker et al., 2011). Por su parte, el MWM permite evaluar el aprendizaje y la memoria de referencia a largo plazo (Othman et al., 2022). Esta tarea de navegación espacial es dependiente de hipocampo y corteza prefrontal (Green et al., 2013; Ekstrom et al., 2023). Esto sugiere que la memoria a corto y largo plazo tienen una vulnerabilidad diferencial a los eventos adversos que suceden a lo largo de la vida. Nuestros resultados podrían sugerir que la SM180 tiene un efecto dual en memoria después de un segundo reto, en este caso la mTBI en la edad adulta. El contexto y la duración de la tarea son fundamental para entender este efecto dual. Por ejemplo, se ha reportado que después de la prueba de adquisición para el reconocimiento de objetos, los niveles de corticosterona plasmática son menores que las concentraciones después del entrenamiento en el laberinto con reforzadores positivos (restricción/recompensa de alimentos) o negativos (inmersión en agua; Darcet et al., 2014; Denninger et al., 2018). Los individuos que sufrieron tanto la SM y la TBI podrían estar mejor preparados para resolver tareas a corto plazo y sin reforzadores, como el desplazamiento de objetos. Estos resultados son apoyados por estudios que muestran que el microambiente del cerebro en conjunto con el ambiente periférico promueve mecanismos compensatorios de forma aguda (Loane & Kumar, 2016). Sin embargo, cuando la prueba incrementa su complejidad y duración, los mecanismos compensatorios podrían ser insuficientes para mitigar los déficits provocados por la combinación de la SM180 y la TBI.

La prueba de nado forzado nos permite evaluar conducta activa o pasiva; esta última también es conocida como conducta tipo depresiva. Los animales muestran una conducta activa al buscar una salida del cilindro y una conducta pasiva al permanecer inmóviles durante más tiempo. En los animales como SM180 aumenta la conducta pasiva en la prueba de nado forzado (Lajud et al., 2012; Vargas et al., 2016; Cui et al., 2020; Roque et al., 2021). Nosotros observamos que el doble reto (SM180+mTBI) aumentó de forma sinérgica la conducta pasiva. Se reportó un aumento en el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado en animales con la neurogénesis hipocampal bloqueada (Snyder et al., 2011). Esto podría explicar porque observamos que nuestros animales presentan un mayor tiempo de inmovilidad, ya que vemos una disminución de la neurogénesis hipocampal. Sin embargo, nuestros resultados de neurogénesis no explican el efecto sinérgico que observamos con un doble reto. Otro mecanismo que podría explicar porque observamos un aumento en el tiempo de inmovilidad en los animales con la combinación de SM180+mTB es la neuroinflamación. Se ha reportado que la administración de IL-1 β y TNF- α en roedores aumente la conducta pasiva en la prueba de nado forzado (Kaster et al., 2012). La activación de microglía está asociada con neuroinflamación, disminución de la neurogénesis y circuitos neuronales anormales (Chen et al., 2016). Nuestros resultados sugieren que la activación participa en los efectos que observamos en los grupos con doble reto (la SM180 y la mTBI) en la prueba de nado forzado y MWM

Existen dos hipótesis que podrían explicar los efectos a largo plazo del ELS. Por un lado la hipótesis del estrés acumulativo propone que el ELS programa la actividad del eje HPA, causando una elevación crónica de los niveles de GC, lo que, a su vez, conduce a una acumulación de carga alostática que se vuelve cada vez más perjudicial con el tiempo (Meaney et al., 1991; McEwen, 2012). Por otro lado, la hipótesis del desajuste propone que los organismos perciben el entorno en el que se desarrollan y programan un fenotipo adecuado para ese entorno. Las patologías ocurren cuando el entorno en el que prosperan los organismos adultos no coincide con el que se programaron (Nederhof & Schmidt, 2012).

En nuestro grupo de trabajo, tenemos evidencia de que ambas hipótesis actúan simultáneamente y que estos efectos dependen de lo que se esté evaluando. En este caso, el ELS aumenta la vulnerabilidad al doble reto en parámetros como la neuroinflamación y el desempeño cognoscitivo en el MWM, pero tiene efectos diferenciales en memoria de localización de objetos, parámetros metabólicos y neuroendocrinos.

CONCLUSIÓN GENERAL

Nuestros datos sugieren que la SM180 exacerba los efectos en el desempeño cognoscitivo en el MWM, la neuroinflamación en CA1 del hipocampo, la conducta tipo depresiva en el nado forzado causada por una mTBI en animales adultos. Adicionalmente y contrario a lo que esperábamos observamos que la memoria de localización de objetos está intacta en animales con SM180+mTBI. La SM180 disminuye neurogénesis hipocampal y este efecto no se ve exacerbado por la mTBI. Estos datos apoyan la idea que el ELS tiene efectos diferenciales después de un segundo reto, en este caso la lesión.

REFERENCIAS

Ackermans NL, Varghese M, Wicinski B, Torres J, De Gasperi R, Pryor D, Elder GA, Gama Sosa MA, Reidenberg JS, Williams TM, Hof PR. Unconventional animal models for traumatic brain injury and chronic traumatic encephalopathy. *J Neurosci Res*. 2021 Oct; 99(10):2463-2477. Doi: 10.1002/jnr.24920. Epub 2021 Jul 13. PMID: 34255876; PMCID: PMC8596618.

Ackermans, N. L., Varghese, M., Wicinski, B., Torres, J., De Gasperi, R., Pryor, D., ... & Hof, P. R. (2021). Unconventional animal models for traumatic brain injury and chronic traumatic encephalopathy. *Journal of neuroscience research*, 99(10), 2463-2477.

Ackermans, N. L., Varghese, M., Williams, T. M., Grimaldi, N., Selmanovic, E., Alipour, A., ... & Hof, P. R. (2022). Evidence of traumatic brain injury in headbutting bovids. *Acta neuropathologica*, 144(1), 5-26.

Aimone, J. B., Li, Y., Lee, S. W., Clemenson, G. D., Deng, W., & Gage, F. H. (2014). Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiological reviews*, 94(4), 991-1026.

Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2007 Apr;32(3):256-66. doi: 10.1016/j.psyneuen.2006.12.013. Epub 2007 Feb 20. PMID: 17307298.

Aisa B, Tordera R, Lasheras B, et al. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology* 2007; 32: 256–266.

Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Río, J., & Ramírez, M. J. (2007). Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 32(3), 256-266.

Ajao, D. O., Pop, V., Kamper, J. E., Adami, A., Rudobeck, E., Huang, L., ... & Badaut, J. (2012). Traumatic brain injury in young rats leads to progressive behavioral deficits coincident with altered tissue properties in adulthood. *Journal of neurotrauma*, 29(11), 2060-2074.

Algamal, M., Saltiel, N., Pearson, A. J., Ager, B., Burca, I., Mouzon, B., ... & Crawford, F. (2019). Impact of repetitive mild traumatic brain injury on behavioral and hippocampal deficits in a mouse model of chronic stress. *Journal of neurotrauma*, 36(17), 2590-2607.

Amaral DG, Dent JA (1981) Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J Comp Neurol* 195:51–86

and chronic social defeat on rat brain microglia and cytokines. *Physiol Behav* 2020;

Aungst, S. L., Kabadi, S. V., Thompson, S. M., Stoica, B. A., & Faden, A. I. (2014). Repeated mild traumatic brain injury causes chronic neuroinflammation, changes in hippocampal synaptic plasticity, and associated cognitive deficits. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 34(7), 1223-1232.

Bachiller, S., Paulus, A., Vázquez-Reyes, S., García-Domínguez, I., & Deierborg, T. (2020). Maternal separation leads to regional hippocampal microglial activation and alters the behavior in the adolescence in a sex-specific manner. *Brain, Behavior, & Immunity-Health*, 9, 100142

Bagheri, F., Goudarzi, I., Lashkarbolouki, T., Elahdadi Salmani, M., Goudarzi, A., & Morley-Fletcher, S. (2022). The combined effects of perinatal ethanol and early-life stress on cognition and risk-taking behavior through oxidative stress in rats. *Neurotoxicity Research*, 40(4), 925-940.

Bales, J. W., Wagner, A. K., Kline, A. E., & Dixon, C. E. (2009). Persistent cognitive dysfunction after traumatic brain injury: a dopamine hypothesis. *Neuroscience & biobehavioral reviews*, 33(7), 981-1003.

Banqueri M, Méndez M, Arias JL. (2017) Behavioral effects in adolescence and early adulthood in two length models of maternal separation in male rats. *Behav Brain Res*. May 1;324:77-86. doi: 10.1016/j.bbr.2017.02.006. Epub 2017 Feb 7. PMID: 28185885.

Banqueri, M., Méndez, M., & Arias, J. L. (2017). Spatial memory-related brain activity in normally reared and different maternal separation models in rats. *Physiology & behavior*, 181, 80-85.

Barker, G. R., & Warburton, E. C. (2011). When is the hippocampus involved in recognition memory?. *Journal of Neuroscience*, 31(29), 10721-10731.

Barlow KM. Postconcussion syndrome: A review. *J Child Neurol* 2016; 31: 57–67

Baudin A, Blot K, Verney C, et al. Maternal deprivation induces deficits in temporal memory and cognitive flexibility and exaggerates synaptic plasticity in the rat medial prefrontal cortex. *Neurobiol Learn Mem* 2012; 98: 207–14.

Bayer SA, Yackel JW, Puri PS (1982) Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science* 216:890–892

Baykara, B., Aksu, I., Buyuk, E., Kiray, M., Sisman, A. R., Baykara, B., ... & Uysal, N. (2013). Progesterone treatment decreases traumatic brain injury induced anxiety and is correlated with increased serum IGF-1 levels; prefrontal cortex, amygdala, hippocampus neuron density; and reduced serum corticosterone levels in immature rats. *Biotechnic & Histochemistry*, 88(5), 250-257.

Bell, J. M. B. M., Jenkins, E. L., & Haarbauer-Krupa, J. (2014). Traumatic brain injury in the United States: epidemiology and rehabilitation. National Center for Injury Prevention and Control, Division of Unintentional Injury Prevention, Centers for Disease Control.

Boletín de la Organización Mundial de la Salud 2009; 87:246-246. DOI: 10.2471/BLT.08.052290

Bonapersona, V., Damsteegt, R., Adams, M. L., van Weert, L. T., Meijer, O. C., Joëls, M., & Sarabdjitsingh, R. A. (2019). Sex-Dependent modulation of acute stress reactivity after early life stress in mice: relevance of mineralocorticoid receptor expression. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 13, 181.

Bondi, C. O., Cheng, J. P., Tennant, H. M., Monaco, C. M., & Kline, A. E. (2014). Old dog, new tricks: the attentional set-shifting test as a novel cognitive behavioral task after controlled cortical impact injury. *Journal of neurotrauma*, 31(10), 926-937.

Cassilhas, R. C., Tufik, S., & De Mello, M. T. (2016). Physical exercise, neuroplasticity, spatial learning and memory. *Cellular and molecular life sciences*, 73, 975-983.

Cattane, N., Vernon, A. C., Borsini, A., Scassellati, C., Endres, D., Capuron, L., ... & Cattaneo, A. (2022). Preclinical animal models of mental illnesses to translate findings from the bench to the bedside: molecular brain mechanisms and peripheral biomarkers associated to early life stress or immune challenges. *European Neuropsychopharmacology*, 58, 55-79.

Centers for Disease Control and Prevention. (2015). *Traumatic Brain Injury In the United States: Epidemiology and Rehabilitation*. U.S.: Department of Health and Human Services.

Cevik, O. S., Cevik, K., Temel, G. O., & Sahin, L. (2023). Maternal separation increased memory function and anxiety without effects of environmental enrichment in male rats. *Behavioural Brain Research*, 441, 114280.

Cevik, O. S., Cevik, K., Temel, G. O., & Sahin, L. (2023). Maternal separation increased memory function and anxiety without effects of environmental enrichment in male rats. *Behavioural Brain Research*, 441, 114280.

Chen Z and Trapp BD. *Microglia and neuroprotection*. *J Neurochem*. 2016; 136: 10– 17.

Chen, Z., & Trapp, B. D. (2016). *Microglia and neuroprotection*. *Journal of neurochemistry*, 136, 10-17.

Cohen, S., Ke, X., Liu, Q., Fu, Q., Majnik, A., & Lane, R. (2016). Adverse early life environment increases hippocampal microglia abundance in conjunction with decreased neural stem cells in juvenile mice. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 55, 56-65.

Colicos, M. A., Dixon, C. E., & Dash, P. K. (1996). Delayed, selective neuronal death following experimental cortical impact injury in rats: possible role in memory deficits. *Brain research*, 739(1-2), 111-119.

Cope, E. C., & Gould, E. (2019). Adult neurogenesis, glia, and the extracellular matrix. *Cell Stem Cell*, 24(5), 690-705. doi.org/10.1016/j.stem.2019.03.023.

Cui, Y., Cao, K., Lin, H., Cui, S., Shen, C., Wen, W., ... & Zhang, R. (2020). Early-life stress induces depression-like behavior and synaptic-plasticity changes in a maternal separation rat model: gender difference and metabolomics study. *Frontiers in pharmacology*, 11, 102.

Cui, Y., Cao, K., Lin, H., Cui, S., Shen, C., Wen, W., ... & Zhang, R. (2020). Early-life stress induces depression-like behavior and synaptic-plasticity changes in a maternal separation rat model: gender difference and metabolomics study. *Frontiers in pharmacology*, 11, 102.

Cui, Y., Cao, K., Lin, H., Cui, S., Shen, C., Wen, W., Mo, H., Dong, Z., Bai, S., Yang, L., Shi, Y., and Zhang, R. (2020). Early-Life Stress Induces Depression-Like Behavior and Synaptic-Plasticity Changes in a Maternal Separation Rat Model: Gender Difference and Metabolomics Study. *Front. Pharmacol*.

- Darcet, F., Mendez-David, I., Tritschler, L., Gardier, A. M., Guilloux, J. P., & David, D. J. (2014). Learning and memory impairments in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 8, 136.
- Daskalakis, N. P., Bagot, R. C., Parker, K. J., Vinkers, C. H., & de Kloet, E. R. (2013). The three-hit concept of vulnerability and resilience: toward understanding adaptation to early-life adversity outcome. *Psychoneuroendocrinology*, 38(9), 1858-1873.
- Daskalakis, N. P., Bagot, R. C., Parker, K. J., Vinkers, C. H., & de Kloet, E. R. (2013). The three-hit concept of vulnerability and resilience: toward understanding adaptation to early-life adversity outcome. *Psychoneuroendocrinology*, 38(9), 1858-1873.
- De Kloet, E. R., Joëls, M., & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature reviews neuroscience*, 6(6), 463-475.
- De Kloet, E. R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M. S., & Joëls, M. (1998). Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease¹. *Endocrine Reviews*, 19(3), 269–301. doi:10.1210/edrv.19.3.0331
- de la Tremblaye, P. B., Wellcome, J. L., Wiley, K., Lomahan, C. A., Moschonas, E. H., Cheng, J. P., ... & Kline, A. E. (2021). Chronic unpredictable stress during adolescence protects against adult traumatic brain injury-induced affective and cognitive deficits. *Brain research*, 1767, 147544.
- Denninger, J. K., Smith, B. M., & Kirby, E. D. (2018). Novel object recognition and object location behavioral testing in mice on a budget. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (141), e58593.
- DeRijk, R. H., de Kloet, E. R., Zitman, F. G., & van Leeuwen, N. (2011). Mineralocorticoid receptor gene variants as determinants of HPA axis regulation and behavior. *Pediatric Adrenal Diseases*, 20, 137-148.
- Díaz-Chávez, A., Lajud, N., Roque, A., Cheng, J. P., Meléndez-Herrera, E., Valdéz-Alarcón, J. J.,... & Kline, A. E. (2020). Early life stress increases vulnerability to the sequelae of pediatric mild traumatic brain injury. *Experimental neurology*, 113318..
- Diehl, L. A., Alvares, L. O., Noschang, C., Engelke, D., Andrezza, A. C., Gonçalves, C. A. S., ... & Dalmaiz, C. (2012). Long-lasting effects of maternal separation on an animal model of post-traumatic stress disorder: effects on memory and hippocampal oxidative stress. *Neurochemical research*, 37(4), 700-707.
- Dinet, V., Petry, K. G., & Badaut, J. (2019). Brain–Immune Interactions and Neuroinflammation After Traumatic Brain Injury. *Frontiers in Neuroscience*, 13. doi:10.3389/fnins.2019.01178
- Dixon, K. J. (2017). Pathophysiology of traumatic brain injury. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics*, 28(2), 215-225. DOI 10.1016/j.pmr.2016.12.001
- Duval, F., González, F., & Rabia, H. (2010). Neurobiología del estrés. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*, 48(4), 307-318.
- Eichenbaum H, Cohen NJ. Can we reconcile the declarative memory and spatial navigation views on hippocampal function? *Neuron* 2014; 83: 764-70.33.

Faul, M., Wald, M. M., Xu, L., & Coronado, V. G. (2010). *Traumatic brain injury in the United States; emergency department visits, hospitalizations, and deaths, 2002-2006.*

Ferle V, Repouskou A, Aspiotis G, et al. *Synergistic effects of early life mild adversity*

Frank, D., Zlotnik, A., Kofman, O., Grinshpun, J., Severynovska, O., Brotfain, E., ... & Boyko, M. (2019). *Early life stress induces submissive behavior in adult rats. Behavioural brain research, 372, 112025.*

Gage, F. H. (2019). *Adult neurogenesis in mammals. Science, 364(6443), 827-828. DOI: 10.1126/science.aav688*

Galeeva, A., Pelto-Huikko, M., Pivina, S., & Ordyan, N. (2010). *Postnatal ontogeny of the glucocorticoid receptor in the hippocampus. Vitamins & Hormones, 82, 367-389.*

George, E.D., Bordner, K.A., Elwafi, H.M., Simen, A.A., 2010. *Maternal separation with early weaning: a novel mouse model of early life neglect. BMC Neurosci. 11, 123.*

Gilles, E.E., Berntson, G.G., Zipf, W.B., & Gunnar, M.R. (2000). *Neglect is associated with a blunting of the behavioral and biological stress responses in human infants. Paper presented at the International Conference of Infant Studies, Brighton, England.*

Giovanello KS, Verfaillie M, Keane MM. *Disproportionate deficit in associative recognition relative to item recognition in global amnesia. Cogn Affect Behav Neurosci 2003; 3: 186-94.*

Gracia-Rubio, I., Moscoso-Castro, M., Pozo, O. J., Marcos, J., Nadal, R., & Valverde, O. (2016). *Maternal separation induces neuroinflammation and long-lasting emotional alterations in mice. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 65, 104-117.*

Green MR, McCormick CM. *Effects of social instability stress in adolescence on long-term, not short-term, spatial memory performance. Behav Brain Res. 2013 Nov 1;256:165-71. doi: 10.1016/j.bbr.2013.08.011. Epub 2013 Aug 12. PMID: 23948213.*

Groeneweg, F. L., Karst, H., de Kloet, E. R., & Joëls, M. (2012). *Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. Molecular and cellular endocrinology, 350(2), 299-309.*

Gunnar, M. R., & Cheatham, C. L. (2003). *Brain and behavior interface: Stress and the developing brain. Infant Mental Health Journal: Official Publication of The World Association for Infant Mental Health, 24(3), 195-211.*

Gunnar, M. R., & Cheatham, C. L. (2003). *Brain and behavior interface: Stress and the developing brain. Infant Mental Health Journal: Official Publication of The World Association for Infant Mental Health, 24(3), 195-211.*

Hamdan JN, Sierra-Fonseca JA, Flores RJ, Saucedo S Jr, Miranda-Arango M, O'Dell LE, Gosselink KL. *Early-life adversity increases anxiety-like behavior and modifies synaptic protein expression in a region-specific manner. Front Behav Neurosci. 2022 Oct 19;16:1008556. doi: 10.3389/fnbeh.2022.1008556. PMID: 36338879; PMCID: PMC9626971.*

Heim, C., Owens, M. J., Plotsky, P. M., & Nemeroff, C. B. (1997). Persistent changes in corticotropin-releasing factor systems due to early life stress: relationship to the pathophysiology of major depression and post-traumatic stress disorder. *Psychopharmacology bulletin*, 33(2), 185.

Herman, J. P., McKlveen, J. M., Ghosal, S., Kopp, B., Wulsin, A., Makinson, R., ... & Myers, B. (2016). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Comprehensive Physiology*, 6(2), 603.

Hernández, J. D. O., Aguilar, E. J., & García, F. G. (2015). El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje. *Rev Med UV*, 21-28.

Huh, J. W., & Raghupathi, R. (2018). Therapeutic strategies to target acute and long-term sequelae of pediatric traumatic brain injury. *Neuropharmacology*. doi:10.1016/j.neuropharm.2018.06.025

Huot RL, Plotsky PM, Lenox RH, McNamara RK (2002) Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Res* 950:52–63

Huot, R. L., Plotsky, P. M., Lenox, R. H., & McNamara, R. K. (2002). Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain research*, 950(1-2), 52-63.

immune challenge on behavior and glia cells alteration in late adolescent rats. *Int J Dev*

Ivy, A. S., Rex, C. S., Chen, Y., Dubé, C., Maras, P. M., Grigoriadis, D. E., ... & Baram, T. Z. (2010). Hippocampal dysfunction and cognitive impairments provoked by chronic early-life stress involve excessive activation of CRH receptors. *Journal of Neuroscience*, 30(39), 13005-13015.

Jawad Fares, Zeina Bou Diab, Sanaa Nabha & Youssef Fares (2019) Neurogenesis in the adult hippocampus: history, regulation, and prospective roles, *International Journal of Neuroscience*, 129:6, 598-611, DOI: 10.1080/00207454.2018.1545771

Ji K, Akgul G, Wollmuth LP, et al. Microglia Actively Regulate the Number of Functional Synapses. *PLoS One* 2013; 8: 56293.

Ji, X., Tian, Y., Xie, K., Liu, W., Qu, Y., & Fei, Z. (2012). Protective effects of hydrogen-rich saline in a rat model of traumatic brain injury via reducing oxidative stress. *journal of surgical research*, 178(1), e9-e16.

Juruena M.F., Erer F., Cleare A.J., Young A.H. (2020) The Role of Early Life Stress in HPA Axis and Anxiety. In: Kim YK. (eds) *Anxiety Disorders. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1191. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9705-0_9

Kalinichev, M., Easterling, K. W., Plotsky, P. M., & Holtzman, S. G. (2002). Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 73(1), 131–140. doi:10.1016/s0091-3057(02)00781-5

Karve, I. P., Taylor, J. M., & Crack, P. J. (2016). The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *British journal of pharmacology*, 173(4), 692-702.

Kaster, M. P., Gadotti, V. M., Calixto, J. B., Santos, A. R., & Rodrigues, A. L. S. (2012). Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor- α in mice. *Neuropharmacology*, 62(1), 419-426.

Kim E, Lauterbach EC, Reeve A, Arciniegas DB, Coburn KL, Mendez MF, Rummans TA, Coffey EC; ANPA Committee on Research. Neuropsychiatric complications of traumatic brain injury: a critical review of the literature (a report by the ANPA Committee on Research). *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2007 Spring;19(2):106-27. doi: 10.1176/jnp.2007.19.2.106. PMID: 17431056.

Kline AE, Wagner AK, Westergom BP, et al. Acute treatment with the 5-HT(1A) receptor agonist 8-OH-DPAT and chronic environmental enrichment confer neurobehavioral benefit after experimental brain trauma. *Behav Brain Res* 2007; 177: 186– 94

Kumar, A., Alvarez-Croda, D. M., Stoica, B. A., Faden, A. I., & Loane, D. J. (2016). Microglial/macrophage polarization dynamics following traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*, 33(19), 1732-1750.

Lajud N, Roque A, Cheng JP, Bondi CO, Kline AE. Early Life Stress Preceding Mild Pediatric Traumatic Brain Injury Increases Neuroinflammation but Does Not Exacerbate Impairment of Cognitive Flexibility during Adolescence. *J Neurotrauma*. 2021 Feb 15;38(4):411-421. doi: 10.1089/neu.2020.7354.

Lajud, N., & Torner, L. (2015). Early life stress and hippocampal neurogenesis in the neonate: sexual dimorphism, long term consequences and possible mediators. *Frontiers in molecular neuroscience*, 8, 3.

Lajud, N., Diaz-Chavez, A., Radabaugh, H. L., Cheng, J. P., Rojo-Soto, G., Valdéz- Alarcón, J. J., ... & Kline, A. E. (2019). Delayed and abbreviated environmental enrichment after brain trauma promotes motor and cognitive recovery that is not contingent on increased neurogenesis. *Journal of neurotrauma*, 36(5), 756-767.

Lajud, N., Roque, A., Cajero, M., Gutiérrez-Ospina, G., & Torner, L. (2012). Periodic maternal separation decreases hippocampal neurogenesis without affecting basal corticosterone during the stress hyporesponsive period, but alters HPA axis and coping behavior in adulthood. *Psychoneuroendocrinology*, 37(3), 410–420.

La-Vu, M., Tobias, B. C., Schuette, P. J., & Adhikari, A. (2020). To approach or avoid: an introductory overview of the study of anxiety using rodent assays. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 14, 145.

Lighthall, J. W. (1988). Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. *Journal of neurotrauma*, 5(1), 1-15. Bales, J. W., Wagner, A. K., Kline, A. E., & Dixon, C. E. (2009). Persistent cognitive dysfunction after traumatic brain injury: a dopamine hypothesis. *Neuroscience & biobehavioral reviews*, 33(7), 981-1003.

Loane, D. J., & Kumar, A. (2016). Microglia in the TBI brain: the good, the bad, and the dysregulated. *Experimental neurology*, 275, 316-327.

Lozano, D., Gonzales-Portillo, G. S., Acosta, S., de la Pena, I., Tajiri, N., Kaneko, Y., & Borlongan, C. V. (2015). Neuroinflammatory responses to traumatic brain injury: etiology,

clinical consequences, and therapeutic opportunities. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 11, 97.

Lupien, S. J., Fiocco, A., Wan, N., Maheu, F., Lord, C., Schramek, T., & Tu, M. T. (2005). Stress hormones and human memory function across the lifespan. *Psychoneuroendocrinology*, 30(3), 225-242.

Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R., & Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), 434–445. doi:10.1038/nrn2639

Lyman, M., Lloyd, D. G., Ji, X., Vizcaychipi, M. P., & Ma, D. (2014). Neuroinflammation: The role and consequences. *Neuroscience Research*, 79, 1–12. doi:10.1016/j.neures.2013.10.004

Ma Z, Bayley MT, Perrier L, et al. The association between adverse childhood experiences and adult traumatic brain injury/concussion: a scoping review. *Disabil Rehabil* 2019; 41:1360–1366.

Ma, Z., Ma, Y., & Zhang, N. (2018). Development of brain-wide connectivity architecture in awake rats. *Neuroimage*, 176, 380-389.

Maas, A. I., Stocchetti, N., & Bullock, R. (2008). Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *The Lancet Neurology*, 7(8), 728-741.

Makena N, Bugarith K, Russell VA. Maternal separation enhances object location memory and prevents exercise-induced MAPK/ERK signalling in adult Sprague-Dawley rats. *Metab Brain Dis.* 2012 Sep;27(3):377-85. doi: 10.1007/s11011-012-9298-6. Epub 2012 Apr 3. PMID: 22476924; PMCID: PMC3422626.

Makinde HM, Cuda CM, Just TB, et al. Nonclassical Monocytes Mediate Secondary Injury, Neurocognitive Outcome, and Neutrophil Infiltration after Traumatic Brain Injury *J Immunol* 2017; 199: 3583–3591.

Martínez, J. I. S., Torres, F. B., Delfín, C. A., González, C. M. S., Saldaña, E. I. C., & Martínez, A. R (2016). *Nthe Nthe*.

McEwen, B. S. (2002). Sex, stress and the hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process. *Neurobiology of aging*, 23(5), 921-939.

McEwen, B. S. (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiological reviews*, 87(3), 873-904.

McEwen, B. S. (2007). Physiology and Neurobiology of Stress and Adaptation: Central Role of the Brain. *Physiological Reviews*, 87(3), 873–904. doi:10.1152/physrev.00041.200

McEwen, B. S. (2012). Brain on stress: how the social environment gets under the skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(supplement_2), 17180-17185.

McEwen, B. S. (2017). Neurobiological and systemic effects of chronic stress. *Chronic stress*, 1, 2470547017692328.

McEwen, B. S., & Akil, H. (2020). Revisiting the stress concept: implications for affective disorders. *Journal of Neuroscience*, 40(1), 12-21.

McEwen, B.S. (2012). Brain on stress: how the social environment gets under the skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 Suppl, 17180–17185.

Meaney, M. J., Viau, V., Bhatnagar, S., Betito, K., Iny, L. J., O'Donnell, D., & Mitchell, J. B. (1991). Cellular mechanisms underlying the development and expression of individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 39(2), 265-274.

Meaney, M.J., Viau, V., Bhatnagar, S., Betito, K., Iny, L.J., O'Donnell, D., and Mitchell, J.B.

Mirescu C, Peters JD, and Gould E. Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nat Neurosci* 2004; 7: 841–846.

Mirescu, C., & Gould, E. (2006). Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus*, 16(3), 233-238. doi.org/10.1002/hipo.20155

Monroy, E., Hernández-Torres, E., & Flores, G. (2010). Maternal separation disrupts dendritic morphology of neurons in prefrontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens in male rat offspring. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 40(2), 93–101. doi:10.1016/j.jchemneu.2010.05.00

Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of neuroscience methods*, 11(1), 47-60.

Morris, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *JNeurosci. Methods* 1984;11:47–60.

Morris, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *JNeurosci. Methods* 1984;11:47–60.

Mumby, D. G., Gaskin, S., Glenn, M. J., Schramek, T. E., & Lehmann, H. (2002). Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places, and contexts. *Learning & memory*, 9(2), 49-57.

Nederhof, E., & Schmidt, M. V. (2012). Mismatch or cumulative stress: toward an integrated hypothesis of programming effects. *Physiology & behavior*, 106(5), 691-700.

Needham, E. J., Helmy, A., Zanier, E. R., Jones, J. L., Coles, A. J., & Menon, D. K. (2019). The immunological response to traumatic brain injury. *Journal of neuroimmunology*, 332, 112-125.

Neurosci 2021; 81: 407–415.

Nishi, M. (2020). Effects of early-life stress on the brain and behaviors: implications of early maternal separation in rodents. *International journal of molecular sciences*, 21(19), 7212.

Nylander, I., & Roman, E. (2013). Is the rodent maternal separation model a valid and effective model for studies on the early-life impact on ethanol consumption?. *Psychopharmacology*, 229(4), 555-569.

Oomen, C. A., Soeters, H., Audureau, N., Vermunt, L., Van Hasselt, F. N., Manders, E. M., ... & Krugers, H. (2010). Severe early life stress hampers spatial learning and neurogenesis, but improves hippocampal synaptic plasticity and emotional learning under high-stress conditions in adulthood. *Journal of Neuroscience*, 30(19), 6635-6645.

Orso, R., Creutzberg, K. C., Wearick-Silva, L. E., Wendt Viola, T., Tractenberg, S. G., Benetti, F., & Grassi-Oliveira, R. (2019). How early life stress impact maternal care: a systematic review of rodent studies. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13, 197.

Osier ND, Korpon JR, and Dixon CE. Controlled Cortical Impact Model. In: *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects*. Boca Raton (FL). (Kobeissy FH, editor) CRC Press/Taylor & Francis; 2015. Chapter 16. 41.

Othman, M. Z., Hassan, Z., & Has, A. T. C. (2022). Morris water maze: a versatile and pertinent tool for assessing spatial learning and memory. *Experimental animals*, 71(3), 264-280.

Pacak, K., & Palkovits, M. (2001). Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocrine reviews*, 22(4), 502-548.

Paterno R, Metheny H, Cohen AS. Memory Deficit in an Object Location Task after Mild Traumatic Brain Injury Is Associated with Impaired Early Object Exploration and Both Are Restored by Branched Chain Amino Acid Dietary Therapy. *J Neurotrauma*. 2018 Sep 1;35(17):2117-2124. doi: 10.1089/neu.2017.5170. Epub 2018 Jul 9. PMID: 29774776; PMCID: PMC6098408.

Paterno, R., Folweiler, K. A., & Cohen, A. S. (2017). Pathophysiology and treatment of memory dysfunction after traumatic brain injury. *Current neurology and neuroscience reports*, 17(7), 52.

Pavlovic, D., Pekic, S., Stojanovic, M., & Popovic, V. (2019). Traumatic brain injury: neuropathological, neurocognitive and neurobehavioral sequelae. *Pituitary*, 22(3), 270-282.

Pavlovic, D., Pekic, S., Stojanovic, M., & Popovic, V. (2019). Traumatic brain injury: neuropathological, neurocognitive and neurobehavioral sequelae. *Pituitary*, 22, 270-282.

Pearn, M. L., Niesman, I. R., Egawa, J., Sawada, A., Almenar-Queralt, A., Shah, S. B., ... & Head, B. P. (2017). Pathophysiology associated with traumatic brain injury: current treatments and potential novel therapeutics. *Cellular and molecular neurobiology*, 37(4), 571-585.

Peles, G., Swaminathan, A., & Levkowitz, G. (2023). Glucocorticoid-sensitive period of corticotroph development—Implications for mechanisms of early life stress. *Journal of neuroendocrinology*, 35(11), e13229

Pervanidou, P., & Chrousos, G. P. (2018). Early-life stress: from neuroendocrine mechanisms to stress-related disorders. *Hormone research in paediatrics*, 89(5), 372-379.

Plotsky PM, Meaney MJ. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res*. 1993 May;18(3):195-200. doi: 10.1016/0169-328x(93)90189-v. PMID: 8497182.

Prieto, R., Gutiérrez-González, R., Pascual, J. M., Roda, J. M., Cerdán, S., Matias-Guiu, J., & Barcia, J. A. (2009). Modelos experimentales de traumatismo craneoencefálico. *Neurocirugía*, 20(3), 225-244.

Pu, H., Wang, Y., Yang, T., Leak, R. K., Stetler, R. A., Yu, F., ... & Chen, J. (2023). Interleukin-4 mitigates anxiety-like behavior and loss of neurons and fiber tracts in limbic structures in a microglial PPAR γ -dependent manner after traumatic brain injury. *Neurobiology of Disease*, 180, 106078.

Quirin, M., Pruessner, J. C., & Kuhl, J. (2008). HPA system regulation and adult attachment anxiety: Individual differences in reactive and awakening cortisol. *Psychoneuroendocrinology*, 33(5), 581–590. doi:10.1016/j.psyneuen.2008.01.01

Radabaugh HL, LaPorte MJ, Greene AM, et al. Refining environmental enrichment to advance rehabilitation based research after experimental traumatic brain injury. *Exp. Neurol* 2017; 294: 12–18. 34.

Ramsay, D. S., & Woods, S. C. (2014). Clarifying the roles of homeostasis and allostasis in physiological regulation. *Psychological review*, 121(2), 225.

Rashno, M., Ghaderi, S., Nesari, A., Khorsandi, L., Farbood, Y., & Sarkaki, A. (2020). Chrysin attenuates traumatic brain injury-induced recognition memory decline, and anxiety/depression-like behaviors in rats: Insights into underlying mechanisms. *Psychopharmacology*, 237, 1607-1619.

Rees PM. Contemporary Issues in Mild Traumatic Brain Injury. *Arch Phys Med Rehabil* 2003; 84:1885–1894.

Reinke, J. M., & Sorg, H. (2012). Wound Repair and Regeneration. *European Surgical Research*, 49(1), 35–43. doi:10.1159/000339613

Réus GZ, Giridharan VV, de Moura AB, et al. The impact of early life stress and

Risbrough VB, Vaughn MN, Friend SF. (2022) Role of Inflammation in Traumatic Brain Injury-Associated Risk for Neuropsychiatric Disorders: State of the Evidence and Where Do We Go From Here. *Biol Psychiatry*. Mar 1;91(5):438-448. doi: 10.1016/j.biopsych.2021.11.012

Rizk, M., Vu, J., & Zhang, Z. (2021). Impact of pediatric traumatic brain injury on hippocampal neurogenesis. *Neural Regeneration Research*, 16(5), 926.

Rocha M, Wang D, Avila-Quintero V, et al. Deficits in hippocampal-dependent memory across different rodent models of early life stress: systematic review and metaanalysis. *Transl Psychiatry* 2021; 11(1):231: DOI: 10.1038/s41398-021-01352-4.

Rodríguez-Fernández, J. M., García-Acero, M., & Franco, P. (2013). Neurobiología del estrés agudo y crónico: su efecto en el eje hipotálamohipófisis-adrenal y la memoria. *Universitas médica*, 54(4), 472-494.

Romine, J., Gao, X., & Chen, J. (2014). Controlled Cortical Impact Model for Traumatic Brain Injury. *Journal of Visualized Experiments*, (90). doi:10.3791/51781

Roque A, Ruiz-González R, Pineda-López E, Torner L, Lajud N. 2020 Prenatal immobilization stress and postnatal maternal separation cause differential neuroendocrine responses to fasting stress in adult male rats. *Dev Psychobiol.* Sep;62(6):737-748. doi: 10.1002/dev.21947.

Roque, A., Ochoa-Zarzosa, A., & Torner, L. (2016). Maternal separation activates microglial cells and induces an inflammatory response in the hippocampus of male rat pups, independently of hypothalamic and peripheral cytokine levels. *Brain, behavior, and immunity*, 55, 39-48.

Roque, A., Ruiz-González, R., Pineda-López, E., Torner, L., and Lajud, N. (2020). Prenatal immobilization stress and postnatal maternal separation cause differential neuroendocrine responses to fasting stress in adult male rats. *Dev. Psychobiol.* 62, 737–748.

Roque, A., Valles Méndez, K. M., Ruiz, R., Pineda, E., & Lajud, N. (2022). Early life stress induces a transient increase in hippocampal corticotropin-releasing hormone in rat neonates that precedes the effects on hypothalamic neuropeptides. *European Journal of Neuroscience*, 55(9-10), 2108-2121.

Roque, A., Valles Méndez, K. M., Ruiz, R., Pineda, E., & Lajud, N. (2021). Early life stress induces a transient increase in hippocampal corticotropin-releasing hormone in rat neonates that precedes the effects on hypothalamic neuropeptides. *European Journal of Neuroscience*. doi:10.1111/ejn.15193

Roque, A., Valles Méndez, K. M., Ruiz, R., Pineda, E., & Lajud, N. (2021). Early life stress induces a transient increase in hippocampal corticotropin-releasing hormone in rat neonates that precedes the effects on hypothalamic neuropeptides. *European Journal of Neuroscience*. doi:10.1111/ejn.15193

Roque, A., Valles Méndez, K.M., Ruiz, R., Pineda, E., and Lajud, N. (2021). Early life stress induces a transient increase in hippocampal corticotropin-releasing hormone in rat neonates that precedes the effects on hypothalamic neuropeptides. *Eur. J. Neurosci.*

Rothman, S. M., & Mattson, M. P. (2010). Adverse stress, hippocampal networks, and Alzheimer's disease. *Neuromolecular medicine*, 12(1), 56-70.

Ruiz, R., Roque, A., Pineda, E., Licon-Limón, P., Valdéz-Alarcón, J. J., & Lajud, N. (2018). Early life stress accelerates age-induced effects on neurogenesis, depression, and metabolic risk. *Psychoneuroendocrinology*, 96, 203-211.

Ruiz-González R, Lajud N, Tejeda-Martínez AR, et al. Antibiotic-induced microbiota depletion in normally-reared adult rats mimics the neuroendocrine effects of early life stress. *Brain Res* 2022; 1793:148055.

Saavedra, L. M., Hernández-Velázquez, M. G., Madrigal, S., Ochoa-Zarzosa, A., & Torner, L. (2021). Long-term activation of hippocampal glial cells and altered emotional behavior in male and female adult rats after different neonatal stressors. *Psychoneuroendocrinology*, 126, 105164. doi:10.1016/j.psyneuen.2021.105164

Saba, E. S., Karout, M., Nasrallah, L., Kobeissy, F., Darwish, H., & Khoury, S. J. (2021). Long-term cognitive deficits after traumatic brain injury associated with microglia activation. *Clinical Immunology*, 230, 108815.

Salinas, García, Ana Fernanda. (2022) "Evaluación del efecto de la exposición al estrés en etapas tempranas sobre el desempeño cognoscitivo después de una lesión traumática cerebral en la vida adulta" (Tesis de licenciatura no publicada) Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Sanchez, C. M., Titus, D. J., Wilson, N. M., Freund, J. E., & Atkins, C. M. (2021). Early life stress exacerbates outcome after traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*, 38(5), 555-565. DOI: 10.1089/neu.2020.7267

Sandstrom NJ and Hart SR. Isolation stress during the third postnatal week alters radial arm maze performance and corticosterone levels in adulthood. *Behav Brain Res* 2005; 156: 289–296. 46.

Sapolsky, R. M., & Meaney, M. J. (1986). Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain research reviews*, 11(1), 65-76.

Sapolsky, R. M., Romero, L. M., & Munck, A. U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine reviews*, 21(1), 55-89.

Schlessinger AR, Cowan WM, Gottlieb DI (1975) An autoradiographic study of the time of origin and the pattern of granule cell migration in the dentate gyrus of the rat. *J Comp Neurol* 159:149–176

Seiler, A., Helldin, J. O., & Seiler, C. (2004). Road mortality in Swedish mammals: results of a drivers' questionnaire. *Wildlife Biology*, 10(3), 225-233.

Selye, H. (1950). Stress and the general adaptation syndrome. *British medical journal*, 1(4667), 1383.

Sempere, L., Rodríguez-Rodríguez, A., Boyero, L., & Egea-Guerrero, J. J. (2019). Principales modelos experimentales de traumatismo craneoencefálico: de la preclínica a los modelos in vitro. *Medicina intensiva*, 43(6), 362-372.

Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, et al. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol* 2013;106–107:1–16: DOI: 10.1016/j.pneurobio.2013.04.001. 47.

Semple, B. D., Carlson, J., & Noble-Haeusslein, L. J. (2016). Pediatric rodent models of traumatic brain injury. *Injury Models of the Central Nervous System*, 325-343. DOI: 10.1007/978-1-4939-3816-2_18

Sharp DJ (2014) The association of traumatic brain injury with rate of progression of cognitive and functional impairment in a population-based cohort of Alzheimer's disease: the Cache County dementia progression study by Gilbert et al. Late effects of traumatic brain injury on dementia progression. *Int Psychogeriatr/IPA* 26(10):1591–1592. doi:10.1017/S1041610214001689

Siebold, L., Obenaus, A., & Goyal, R. (2018). Criteria to define mild, moderate, and severe traumatic brain injury in the mouse controlled cortical impact model. *Experimental neurology*, 310, 48-57.

Sierra, Juan Carlos, & Ortega, Virgilio, & Zubeidat, Ihab (2003). *Ansiedad, angustia y estrés: tres conceptos a diferenciar*. *Revista Mal-estar E Subjetividade*, 3(1), 10 - 59. [fecha de Consulta 12 de Septiembre de 2021]. ISSN: 1518-6148. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=27130102>

Simon, D. W., McGeachy, M. J., Bayir, H., Clark, R. S. B., Loane, D. J., & Kochanek, P. M. (2017). *The far-reaching scope of neuroinflammation after traumatic brain injury*. *Nature Reviews Neurology*, 13(3), 171–191. doi:10.1038/nrneuro.2017.13

Snyder, J. S., Soumier, A., Brewer, M., Pickel, J., & Cameron, H. A. (2011). *Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour*. *Nature*, 476(7361), 458-461.

Soch A, Sominsky L, Younesi S, et al. *The role of microglia in the second and third postnatal weeks of life in rat hippocampal development and memory*. *Brain Behav Immun* 2020; 88: 675–687.

Solís, H., & López-Hernández, E. (2009). *Neuroanatomía funcional de la memoria*. *Archivos de Neurociencias*, 14(3), 176-187.

Sommer, R. J. (2020). *Phenotypic plasticity: from theory and genetics to current and future challenges*. *Genetics*, 215(1), 1-13.

Steiman, Gerald S., (2018) *Single Isolated Concussion Part I: Definitions, Classification, and Prognosis*, *Practical neurology*, 70-74. <https://practicalneurology.com/articles/2018-mar-apr/single-isolated-concussion-part-i-definitions-classification-and-prognosis>

Stein, B.D., Zima, B.T., Elliot, M.N., Burnam, M.A., Shahinfar, A., Fox, N.A., and Leavitt, L.A. (2001). *Violence exposure among school-age children in foster care: relationship to distress symptoms*. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 40, 588–594

Stephens, M. A. C., & Wand, G. (2012). *Stress and the HPA axis: role of glucocorticoids in alcohol dependence*. *Alcohol research: current reviews*, 34(4), 468.

Sterling, P., & Eyer, J. (1988). *Allostasis: un nuevo paradigma para explicar la patología de la excitación*. *Manual de estrés vital, cognición y salud*. Chichester: John Wiley, 629-649.

Sun, G., Zhao, P., Fan, L., Bao, Z., Tu, Y., Li, C., ... Ji, J. (2020). *Curcumin alleviates neuroinflammation, enhances hippocampal neurogenesis, and improves spatial memory after traumatic brain injury*. *Brain Research Bulletin*. doi:10.1016/j.brainresbull.2020.05.0

Suri D, Veenit V, Sarkar A, et al. *Early Stress Evokes Age-Dependent Biphasic Changes in Hippocampal Neurogenesis, Bdnf Expression, and Cognition*. *Biol. Psychiatry* 2013;73: 658–666.

Tapias V, Moschonas EH, Bondi CO, et al. *Environmental enrichment improves traumatic brain injury-induced behavioral phenotype and associated neurodegenerative process*. *Exp Neurol* 2022; 357:114204: DOI: 10.1016/j.expneurol.2022.114204.

Titus DJ, Sakurai A, Kang Y, Furones C, Jergova S, Santos R, Sick TJ, Atkins CM (2013) *Phosphodiesterase inhibition rescues chronic cognitive deficits induced by traumatic brain injury*. *J Neurosci: Off J Soc Neurosci* 33(12):5216–5226. doi:10.1523/JNEUROSCI.5133-12.2013

Tractenberg, S. G., Levandowski, M. L., de Azeredo, L. A., Orso, R., Roithmann, L. G., Hoffmann, E. S., ... & Grassi-Oliveira, R. (2016). An overview of maternal separation effects on behavioural outcomes in mice: evidence from a four-stage methodological systematic review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 68, 489-503.

Tucker LB, Velosky AG, and McCabe JT. Applications of the Morris water maze in translational traumatic brain injury research. *Neurosci Biobehav Rev* 2018; 88:187–200.

Van Bodegom, M., Homberg, J. R., & Henckens, M. J. (2017). Modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by early life stress exposure. *Frontiers in cellular neuroscience*, Apr 19;11:87. doi: 10.3389/fncel.2017.00087.

van der Burg KR, Reed RD. Seasonal plasticity: how do butterfly wing pattern traits evolve environmental responsiveness? *Curr Opin Genet Dev*. 2021 Aug;69:82-87. doi: 10.1016/j.gde.2021.02.009.

Vargas, J., Junco, M., Gomez, C., & Lajud, N. (2016). Early life stress increases metabolic risk, HPA axis reactivity, and depressive-like behavior when combined with postweaning social isolation in rats. *PLoS one*, 11(9), e0162665.

Vargas, J., Junco, M., Gomez, C., and Lajud, N. (2016). Early Life Stress Increases Metabolic Risk, HPA Axis Reactivity, and Depressive-Like Behavior When Combined with Postweaning Social Isolation in Rats. *PLoS One* 11, e0162665

Wang, H. (Ed.). (2020). *Neural circuits of innate behaviors* (Vol. 1284). Springer Nature.

Wang, Q., Li, M., Du, W., Shao, F., & Wang, W. (2015). The different effects of maternal separation on spatial learning and reversal learning in rats. *Behavioural brain research*, 280, 16-23.

Wei, L., David, A., Duman, R.S., Anisman, H., Kaffman, A., 2010. Early life stress increases anxiety-like behavior in Balbc mice despite a compensatory increase in levels of postnatal maternal care. *Horm. Behav.*

Weil ZM, White B, Whitehead B, et al. The role of the stress system in recovery after traumatic brain injury: A tribute to Bruce S. McEwen. *Neurobiol Stress* 2022; 19: 100467

Witter, M. P., Wouterlood, F. G., Naber, P. A., & Van Haeften, T. (2000). Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 911(1), 1-24.

Xiong, Y., Mahmood, A., & Chopp, M. (2013). Animal models of traumatic brain injury. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(2), 128-142. DOI:10.1038/nrn3407

Xiong, Y., Mahmood, A., & Chopp, M. (2013). Animal models of traumatic brain injury. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(2), 128-142.

Xue, X., Shao, S., Wang, W., & Shao, F. (2013). Maternal separation induces alterations in reversal learning and brain-derived neurotrophic factor expression in adult rats. *Neuropsychobiology*, 68(4), 243-249.

Yang, S. T., Hung, H. Y., Ro, L. S., Liao, M. F., Amstislavskaya, T. G., Tikhonova, M. A., ... & Lu, K. T. (2021). Chronic administration of 7, 8-dhf lessens the depression-like behavior

of juvenile mild traumatic brain injury treated rats at their adult age. Pharmaceuticals, 13(12), 2169.

Zárate, S., Cardenas, F. P., Acevedo-Triana, C., Sarmiento-Bolaños, M. J., & León, L. A. (2014): *Efectos del estrés sobre los procesos de plasticidad y neurogénesis: una revisión. Universitas Psychologica, 13(3), 1181-1214. <http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.UPSY13-3.eep>*

Zhang, Z., Ishrat, S., O'Bryan, M., Klein, B., Saraswati, M., Robertson, C., & Kannan, S. (2020). *Pediatric traumatic brain injury causes long-term deficits in adult hippocampal neurogenesis and cognition. Journal of neurotrauma, 37(14), 1656-1667.*