



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PROGRAMA DE MAESTRÍA INSTITUCIONAL EN EL ÁREA
DE LAS CIENCIAS BIOLÓGICAS

CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS EN
BIOTECNOLOGÍA (CMEB)

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS

EFECTO DE LA RE-COLONIZACIÓN BACTERIANA EN
RATAS SOMETIDAS A ESTRÉS DURANTE LA VIDA
TEMPRANA

QFB. ROBERTO RUIZ GONZALEZ

DIRECTORES DE TESIS:
D.C. JUAN JOSÉ VALDÉZ ALARCON
D. C. NAIMA LAJUD ÁVILA

MORELIA MICHOACÁN. MARZO DE 2019



El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Neurobiología del Desarrollo de la División de Neurociencias del Centro de Investigación Biomédica de Michoacán del Instituto Mexicano del Seguro Social, en el marco del protocolo de investigación titulado: "Efecto de la re-colonización bacteriana en ratas sometidas a estrés durante la vida temprana" con número de registro ante el comité nacional de investigación en salud no: R-2017-785-007. El cual, contó con apoyo financiero completo del fondo de investigación en salud No: FIS/IMSS/PROT/G14/1307.

CONTENIDO

- AGRADECIMIENTOS.....I
- ÍNDICE.....II
- ABREVIATURASV

AGRADECIMIENTOS

- ❖ Principalmente a mis papas (Javier Ruiz Gómez y Felipa González López) los cuales siempre me apoyaron al igual que a mis hermanos (Francisco Javier Ruiz González e Israel Ruiz González) que siempre estuvieron pendientes y confiaron en mí. ¡GRACIAS FAMILIA!
- ❖ A mis asesores (Naima Lajud Ávila y Juan José Valdez Alarcón) los cuales me guiaron de la mejor manera para poder desarrollar este proyecto.
- ❖ A mis revisores (Rosa Elvira Núñez Anita, Esperanza Meléndez herrera y Rosa Elena Pérez Sánchez) que semestre con semestre aportaban grandes ideas para mejorar la calidad de este trabajo.
- ❖ A mis amigos (Rosa Lidia Cisneros Aguilar, Diana Laura Díaz García, Kinberly Valles Méndez, Mariela Blanco Nambo, Yessica Yudith Márquez Martínez, Nancy Alexandra Francisco Álvarez, Arturo Díaz Chávez, Kevin Herrejón Mora, Pablo Eduardo Cisneros Aguilar y Luis miguel Saavedra Pimentel) los cuales hicieron más ameno todo este proceso.
- ❖ A aquellos que más que amigos son hermanos (Angélica Roque Galicia, Edel Pineda López, Aldo Iván Arellano Nava y Ulises Maciel Ponce), sin su ayuda esto no hubiera sido posible.
- ❖ A mi novia (María Guadalupe cruz Corona) la cual me ha aguantado todo este tiempo y ha sido sumamente comprensiva en todo momento.
- ❖ En general a todos los que me apoyaron ¡MUCHAS GRACIAS!

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT	2
III. INTRODUCCIÓN	3
IV. MARCO TEÓRICO	5
• EI CONCEPTO DE ESTRÉS Y LAS PATOLOGÍAS RELACIONADAS CON EL ESTRÉS	5
▪ LA RESPUESTA AL ESTRÉS Y EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS- GLÁNDULAS-SUPRARRENALES (EJE HPA)	6
▪ DEPRESIÓN	8
▪ SÍNDROME METABÓLICO	9
▪ ESTRÉS Y METABOLISMO	10
▪ ESTRÉS E HIPOCAMPO	12
▪ ESTRÉS Y NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL	12
• MICROBIOTA INTESTINAL	15
▪ EJE CEREBRO-INTESTINO	17
▪ RELACIÓN ENTRE LA MICROBIOTA Y LA RESPUESTA AL ESTRÉS	20
▪ RELACIÓN ENTRE LA DEPRESIÓN Y LA MICROBIOTA	20
▪ EFECTO DE LA MICROBIOTA SOBRE EL HIPOCAMPO	21
▪ EFECTO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL SOBRE EL METABOLISMO	22
• ESTRÉS DURANTE ETAPAS TEMPRANAS DE LA VIDA	23
• MODELO ANIMAL	24
V. ANTECEDENTES	25
VI. HIPÓTESIS	27
VII. OBJETIVOS	27
• OBJETIVO GENERAL	27
• OBJETIVOS PARTICULARES	27
VIII. METODOLOGÍA	28
• SEPARACIÓN MATERNAL	29
• ABATIMIENTO DE LA MICROBIOTA	30
• RECOLONIZACIÓN	30
• PRUEBA DE NADO FORZADO	30

• CATETERIZACIÓN	31
• CURVA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA INTRAVENOSA	31
• CURVA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA	32
• SACRIFICIO Y TOMA DE MUESTRAS	32
• PARÁMETROS DE RIESGO METABÓLICO	33
• EXTRACCIÓN DE ADN	33
• REACCIÓN DE LA POLIMERASA EN CADENA EN TIEMPO REAL (qPCR)	33
• CUANTIFICACIÓN DE MICROBIOTA	34
• INMUNOTINCIONES	35
• CONTEO SEMI-ESTEREOLÓGICO	35
• ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
IX. RESULTADOS	37
• EFECTOS DE LA SEPARACIÓN MATERNAL EN RATAS DE 4 MESES DE EDAD.	37
▪ LA SM AUMENTA LA CONDUCTA TIPO DEPRESIVA	37
LA SM AFECTA LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA Y AUMENTA EL RIESGO METABÓLICO	38
▪ LA SM DISMINUYE LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL	39
• EFECTOS DE EL ABATIMIENTO DE LA MICROBIOTA EN ANIMALES SOMETIDOS A SEPARACIÓN MATERNAL	40
▪ ABATIMIENTO DE LA MICROBIOTA	40
▪ EL ABATIMIENTO DE LA MICROBIOTA TIENE EFECTOS SIMILARES A LA SM SOBRE LA CONDUCTA TIPO DEPRESIVA	42
▪ EL ABATIMIENTO DE LA MICROBIOTA NO AFECTA LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA	43
EL ABATIMIENTO DE LA MICROBIOTA CAUSA UN AUMENTO EN EL NIVEL DE LA CORTICOSTERONA SIMILAR AL DE LA SM	44
▪ EL ABATIMIENTO DE MICROBIOTA NO AFECTA EL PESO CORPORAL , PERO AUMENTA EL PESO DEL CIEGO	45
▪ EL ABATIMIENTO DE MICROBIOTA INTESTINAL Y LA SM DISMINUYEN LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL	46
▪ LA SM CAUSA DISBIOSIS INTESTINAL	47
• EFECTOS DE LA RECOLONIZACIÓN BACTERIANA EN ANIMALES CONTROL Y SEPARACIÓN MATERNAL	

SOMETIDOS A ABATIMIENTO DE LA MICROBIOTA	49
▪ LA RECOLONIZACION RESTAURA LOS EFECTOS DE EL ABATIMIENTO DE LA MICROBIOTA	49
▪ LA RECOLONIZACIÓN CON MICROBIOTA DE ANIMALES CONTROL REVIERTE LOS EFECTOS DE LA SM SOBRE LA CONDUCTA TIPO DEPRESIVA	50
▪ LA RECOLONIZACIÓN CON MICROBIOTA DE ANIMALES CONTROL REVIERTE LOS EFECTOS DE LA SM SOBRE LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA	51
▪ LA RECOLONIZACIÓN CON MICROBIOTA CONTROL ATENÚA EL EFECTO DE LA SM SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE CORTICOSTERONA	52
▪ LA RECOLONIZACIÓN CON MICROBIOTA DE ANIMALES CONTROL NO TIENE LOS EFECTOS SOBRE EL PESO CORPORAL, PERO SI SOBRE EL PESO DEL CIEGO	53
▪ LA RECOLONIZACIÓN CON MICROBIOTA DE ANIMALES CONTROL ATENÚA LOS EFECTOS DE LA SM SOBRE LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL	54
▪ LA RECOLONIZACIÓN CON MICROBIOTA DE ANIMALES CONTROL, CAUSA UN PERFIL MICROBIANO DISTINTO	55
 X. DISCUSIÓN	 57
XI. CONCLUSIÓN	64
XII. BIBLIOGRAFÍA	65
XIII. ANEXO	74
• GLOSARIO DE TÉRMINOS	74
• PUBLICACIONES	78

ABREVIATURAS

5-HT: Serotonina

AACE: Asociación americana de endocrinología clínica

AB: Antibióticos orales

ACTH: Hormona adenocorticotropa

AGCC: Ácidos grasos de cadena corta

ATPIII: Panel III de Tratamiento de Adultos del Programa Nacional de Educación Sobre el Colesterol

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

BDNST: núcleo del lecho de la estría terminal

CA: Cuerno de Amón

CRH: Hormona liberadora de corticotropina

CRHR: Receptor a CRH

CSG: Capa sub-granular

CONT: Control

DAB: Diaminobencidina

DCX: Doblecortina

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DP: día postnatal

EDTA: Acido-etilendiaminotetracético

ELS: Estrés en etapas tempranas de la vida (Early life stress)

GABA: Ácido γ -aminobutírico

GCs: Glucocorticoides

GD: Giro dentado

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial

GLUT: Transportador de glucosa

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HPA: Hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales

IDF: Federación internacional de Diabetes

IGF: Factor de crecimiento insulínico

LHPA: Sistema límbico-HPA

MetS: Síndrome metabólico

NiCl: Cloruro de níquel

NPV: Núcleo paraventricular

NPY: Neuropeptido Y

OMS: Organización Mundial de la Salud

PB: Buffer de fosfatos

RI: Receptor a insulina

Prom: Promedio

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

QUICKI: Test del índice cuantitativo de la sensibilidad a la insulina

rRNA: Ácido ribonucleico ribosomal

R.P.M: Revoluciones por minuto

SM: Separación maternal

SNA: Sistema nervioso autónomo

SNC: Sistema nervioso central

SRI: Sustrato del receptor a insulina

ZSG: Zona sub-granular

I. RESUMEN

La exposición al estrés durante las etapas tempranas de la vida (ELS) causa una disminución en la neurogénesis hipocampal, aumento en la conducta tipo depresiva y en la vulnerabilidad metabólica. Recientemente se ha propuesto que la microbiota intestinal podría estar implicada en la modulación de la respuesta al estrés. No obstante, la relación entre la microbiota intestinal y la neurogénesis hipocampal ha sido poco estudiada. Nos planteamos el objetivo de evaluar si el abatimiento de la microbiota y la posterior recolonización con microbiota de animales control pueden incrementar o revertir, respectivamente, los efectos del ELS. Se utilizaron ratas macho adultas (3-4 meses) de la cepa Sprague Dawley, las cuales fueron asignadas a los grupos control y sometidas a separación maternal (SM, 3 horas diarias del día postnatal 1 al 14). Ambos grupos fueron sometidos a un esquema de abatimiento de microbiota mediante el tratamiento con antibióticos orales durante un mes y posteriormente a recolonización con microbiota de animales donadores. Se evaluó la conducta tipo depresiva, la homeostasis de la glucosa, concentraciones de corticosterona en plasma, peso corporal, peso del ciego, neurogénesis hipocampal y la abundancia relativa de especies bacterianas representativas de la microbiota intestinal. Nuestros resultados muestran que la SM causa una conducta tipo depresiva en la prueba de nado forzado, aumenta el riesgo metabólico, disminuye en la neurogénesis hipocampal y causa disbiosis intestinal. El abatimiento de la microbiota tiene efectos similares a la SM sobre a conducta, la corticosterona y la neurogénesis hipocampal, sin embargo, no afecta la regulación de la glucosa ni el peso corporal. La recolonización de las ratas sometidas a SM con microbiota procedente de ratas control revierte los efectos de la SM sobre la conducta y la homeostasis de la glucosa y atenúa los efectos sobre el peso corporal, la corticosterona, la neurogénesis hipocampal y la disbiosis intestinal.

Palabras clave: estrés; separación maternal; microbiota; neurogénesis; depresión

II. ABSTRACT

Early life stress (ELS) causes a decrease in hippocampal neurogenesis, increased depressive-like behavior and metabolic vulnerability. Recently it has been proposed that the intestinal microbiota could be involved in the modulation of the stress response. However, the relationship between intestinal microbiota and hippocampal neurogenesis has been little studied. We set ourselves the objective of evaluating whether the depletion of the microbiota and the subsequent recolonization with microbiota of control animals can increase or reverse, respectively, the effects of the ELS. Adult male rats (3-4 months) of the Sprague Dawley strain were used, which were assigned to the control groups and subjected to maternal separation (SM, 3 hours a day from postnatal day 1 to 14). Both groups were subjected to a pattern of microbiota depletion by treatment with oral antibiotics for one month and then recolonization with microbiota of donor animals. Depressive type behavior, glucose homeostasis, plasma corticosterone concentrations, body weight, caecum weight, hippocampal neurogenesis and the relative abundance of bacterial species representative of the gut microbiota were evaluated. Our results show that SM causes a depressive-like behavior in the forced swimming test, increases metabolic risk, decreases hippocampal neurogenesis and causes intestinal dysbiosis. The depletion of the microbiota has similar effects to SM on behavior, corticosterone and hippocampal neurogenesis, however, it does not affect the regulation of glucose or body weight. The recolonization of rats subjected to MS with microbiota from control rats reverts the effects of MS on the behavior and homeostasis of glucose and attenuates the effects on body weight, corticosterone, hippocampal neurogenesis and intestinal dysbiosis.

Keywords: stress; maternal separation; microbiota; neurogenesis; depression

III. INTRODUCCIÓN

La depresión y el síndrome metabólico (por sus siglas en inglés MetS) son problemas de gran importancia, ya que en los últimos años se ha registrado un incremento exponencial de estos casos a nivel global. La depresión es un trastorno del estado de ánimo, transitorio o permanente, caracterizado por sentimientos de abatimiento, infelicidad y culpabilidad que impide un buen desempeño laboral, escolar y provoca afecciones tanto al individuo como a las personas de su entorno (OMS 2012). Se denomina MetS al conjunto de alteraciones metabólicas como obesidad de distribución central, disminución de las concentraciones del colesterol unido a las lipoproteínas de alta densidad, elevación de las concentraciones de triglicéridos, aumento de la presión arterial, resistencia a la insulina e hiperglucemia (Zimmeta et al. 2005).

Se sabe que la exposición al ELS, como el maltrato infantil, el abandono, y el abuso sexual, físico o psicológico, causa una des-regulación del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales (HPA) (Sapolsky et al. 1991; Moussaoui et al. 2014). Esta des-regulación se ha asociado al aumento en la vulnerabilidad a sufrir diferentes tipos de psicopatologías (depresión y ansiedad), enfermedades metabólicas (síndrome metabólico y diabetes mellitus) e hiper reactividad al estrés (Gómez et al. 2006; Rozados 2001; Vargas et al. 2016). Se cree que la des-regulación del eje HPA es causada por alteraciones estructurales y funcionales de las áreas cerebrales encargadas de la regulación negativa del eje HPA, como el hipotálamo y el hipocampo. Estas estructuras son vulnerables ante elevadas concentraciones de la hormona del estrés: los glucocorticoides (GCs) (McEwen 2012). Se ha demostrado que concentraciones altas de GCs tienen efectos neurotóxicos y pueden causar modificaciones en la neurogénesis hipocampal (Bruce et al. 2002). Es conocido que la regulación del eje HPA está ligada íntimamente a la neurogénesis hipocampal, por lo que alteraciones en la neurogénesis hipocampal causarían una des-regulación del eje HPA, lo que aumentaría la vulnerabilidad a sufrir enfermedades metabólicas y conductuales. El

modelo de ELS más usado es la SM en roedores, esta consiste en separar a las crías de su madre por 3 horas diarias desde el día posnatal (DP)1 hasta el DP14. Este modelo simula los efectos a largo plazo observados en los humanos que sufrieron ELS. Los roedores sometidos a SM muestran conducta tipo depresiva, vulnerabilidad a alteraciones metabólicas y disminución de la neurogénesis hipocampal (Bernardi et al. 2013; Lajud et al. 2012; Vargas et al. 2016).

La relación que existe entre el cerebro y el intestino cada vez es más conocida, al igual que las consecuencias que conllevaría una des-regulación en cualquiera de las dos partes (Clarke et al. 2013; Neufeld et al. 2011; O'Mahony et al. 2009; Ogbonnaya et al. 2015). Los mecanismos de la regulación bidireccional son complejos, pero se centran principalmente en hormonas y metabolitos (Stilling et al. 2014; Cryan et al. 2012; O'Mahony et al. 2014; Dinan et al. 2014). Sin embargo, el impacto que ejerce la microbiota intestinal sobre la neurogénesis hipocampal aún es poco conocido. Por todo lo anterior, en el presente trabajo nos planteamos el objetivo de evaluar si la recolonización bacteriana de ratas control con microbiota intacta a ratas sometidas a SM puede revertir los efectos causados por el estrés temprano, la vulnerabilidad metabólica, la conducta tipo depresiva y las alteraciones en la neurogénesis hipocampal.

IV.MARCO TEÓRICO

EL CONCEPTO DE ESTRÉS Y LAS PATOLOGÍAS RELACIONADAS CON EL ESTRÉS

La palabra estrés proviene del latín *stringere*, que significa “pena o aflicción”. En el siglo XVII el físico Robert Hooke definió al estrés mencionando que es la relación entre la carga externa ejercida sobre un objeto y la deformación experimentada por el mismo, dependiendo el resultado de las propiedades estructurales del objeto y de las características de la fuerza externa (Sierra 2003). En 1936, Hans Selye usó el término estrés para referirse a una respuesta no específica del organismo ante cualquier demanda que se le imponga. Selye clasificó la respuesta al estrés en tres etapas (Chrousos et al. 1992; Daneri 2012).

- a) Fase inicial o también denominada fase de alarma: en esta etapa se detecta la presencia del estímulo estresor.
- b) Segunda fase o etapa de adaptación y respuesta: En esta fase se lleva a cabo la activación del sistema de respuesta que permite al organismo restaurar el equilibrio (proceso activo mediante el cual el cuerpo responde a los eventos cotidianos para mantener la homeostasis).
- c) Tercera fase o etapa de agotamiento: si el estímulo estresor se prolonga, se entra en esta última fase, donde surgen las alteraciones relacionadas con el estrés crónico.

A través del tiempo el concepto de estrés se ha actualizado tomando un sentido más complejo. Actualmente, puede ser definido como una “amenaza a la homeostasis del organismo que resulta en la activación de una cascada de respuestas fisiológicas a fin de restaurar el balance homeostático ideal”(Chrousos et al. 1992). Otra definición fue dada por Bruce McEwen (2000), quien propone que, “el estrés puede ser definido como una amenaza real o supuesta a la integridad fisiológica o psicológica de un individuo que resulta en una respuesta fisiológica y/o conductual”. Una de las definiciones más actuales menciona al

estrés como “un conjunto de respuestas fisiológicas de carácter hormonal que tienen lugar por la activación del eje HPA, con la correspondiente elevación de secreción de GCs y la activación del eje simpático-médulo-suprarrenal, así como la reacción a estímulos inespecíficos”(Daneri 2012; Sierra 2003).

Clasificación del estrés

El estrés se puede clasificar de diferentes maneras de acuerdo a su duración y efectos:

- Estrés agudo: es un episodio de corta duración y resulta en la liberación de monoaminas (noradrenalina principalmente) y GCs lo que permite una respuesta eficaz (lucha o huida) frente al evento estresante, es adaptativo y aumenta la probabilidad de sobrevivencia (Rodríguez 2013; McEwen 1999; Pacák et al. 2001).
- Estrés crónico: tipo de estrés de larga duración debido a que el estímulo estresante es constante. Este tipo de estrés se relaciona con diferentes patologías y con efectos directos en el eje HPA, así como en diversas estructuras que lo regulan (Rodríguez 2013).

LA RESPUESTA AL ESTRÉS Y EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-GLÁNDULAS SUPRARRENALES (EJE HPA)

Los componentes principales del sistema nervioso que llevan a cabo la respuesta ante un estímulo estresante son diversos, pero principalmente son el sistema neuroendocrino, específicamente el eje HPA. Cualquier evento estresante, activará la respuesta del eje HPA, lo cual desencadenará una cascada de señalización que comienza con la secreción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) por parte del núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo al sistema portal hipotálamo-hipofisiario (sistema de capilares que comunica las células hipotalámicas con la hipófisis). La presencia de CRH estimula a la hipófisis y esto causa la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) a la circulación sistémica. La ACTH se une a sus receptores en las glándulas suprarrenales causando la liberación de GCs. El principal GC efector de la

respuesta al estrés en humanos es el cortisol, mientras que su análogo en ratas es la corticosterona. La regulación del eje HPA se lleva a cabo mediante retroalimentación negativa, es decir los GCs en circulación se unen a sus receptores en el hipotálamo, la hipófisis y el hipocampo e inhiben la liberación de CRH y ACTH (Kronenberg et al. 2009). Además de modular el eje HPA, los GCs pueden movilizar fuentes de energía en forma de glucosa, la cual será aprovechada para responder de forma eficiente ante el evento estresante (bravo 1969; Katz 2012; Márquez et al. 2012; McEwen 2012; Daneri et al. 2012; Sapolsky et al. 2000)(Fig. 1).

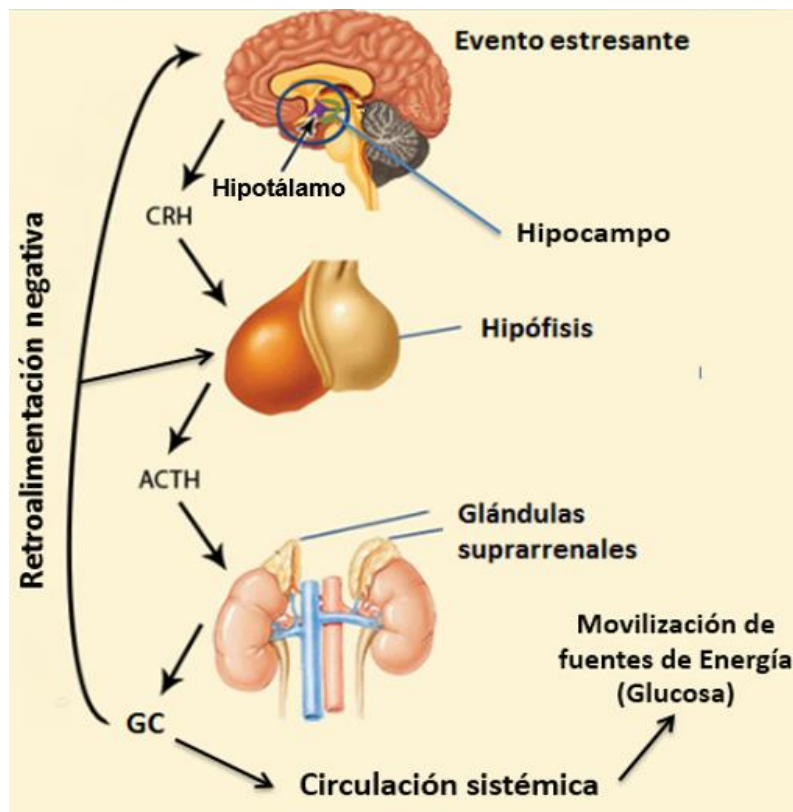


Fig. 1: Eje HPA. La exposición al estrés activa la secreción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) hipotalámica, la cual estimula a la hipófisis y causa la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) a la circulación sistémica. La ACTH causa la liberación de GCs de las glándulas suprarrenales. Los GCs son responsables de la retroalimentación negativa del eje HPA activando sus receptores en el hipotálamo, la hipófisis y el hipocampo para inhibirla liberación de CRH y ACTH*.

* Tomado y modificado de <http://goldfunctionalwellness.com/the-connection-between-oral-health-gut-health-and-overall-health/>

DEPRESIÓN

La depresión es una enfermedad de alta incidencia que se caracteriza por un estado deprimido, disminución del interés o placer por todas o casi todas las actividades, pérdida importante de peso sin hacer dieta o aumento de peso, insomnio, agitación, fatiga o pérdida de energía, sentimiento de inutilidad o culpabilidad, disminución de la capacidad para pensar o concentrarse, pensamientos de muerte recurrentes, ideas suicidas, intento de suicidio o un plan específico para llevarlo a cabo (American Psychiatric 2013). Una de las complicaciones en el diagnóstico de esta enfermedad es que frecuentemente se confunde con estados de ánimo habituales. Según la organización mundial de la salud la depresión tiene una alta tasa de mortalidad, aproximadamente de 1 millón de muertes anualmente (OMS 2012). La depresión es un problema grave, ya puede causar daños tanto al sujeto como a las personas de su entorno, alterando las actividades laborales, escolares, familiares y en el peor de los casos puede llevar al suicidio (Salud 2018). Esta enfermedad es el resultado de interacciones complejas entre factores sociales, psicológicos y biológicos (Salud 2018). Es conocido que las personas que viven con altos niveles de estrés son más vulnerables a padecer depresión y que generalmente la depresión es consecuencia de un evento estresante significativo (OMS 2012; Psicomed 2010). Desde hace varias décadas, la depresión ha sido considerada una de las patologías relacionadas con el estrés. En condiciones normales el hipotálamo y el hipocampo regularían los niveles de GCs circulantes; sin embargo, se ha visto que en personas con depresión este mecanismo de regulación negativa no es eficiente (SJ 2004). Adicionalmente, el estrés crónico disminuye los niveles de dopamina, noradrenalina e interfiere con la síntesis y liberación de serotonina siendo este, uno de los diferentes mecanismos por los cuales el estrés puede causar depresión (Anon 2008; Daneri et al. 2012; SJ 2004).

SÍNDROME METABÓLICO

El síndrome metabólico (MetS) se caracteriza por obesidad de distribución central, aumento en la concentración de triglicéridos, disminución de la concentración de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (HDL), aumento en la concentración de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL), aumento en la presión arterial, resistencia a la insulina e hiperglucemia (Bohr 2008; Carrillo et al. 2003). El MetS aumenta el riesgo de padecer diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares (Gómez et al. 2006).

En condiciones normales, la ingesta de alimento promueve la secreción de insulina de las células- β de los islotes de Langerhans del páncreas. La insulina es la hormona encargada de contrarrestar la acción de las hormonas generadoras de hiperglicemia y mantener bajos los niveles de glucosa en sangre (King 2016). La insulina circulante, a través de la unión a su receptor, aumenta la captación de glucosa en el músculo y el tejido adiposo, estimula la glucólisis, la lipogénesis, la glucogénesis, y la síntesis de proteínas. Así mismo, la insulina inhibe la producción hepática de glucosa, la β -oxidación de ácidos grasos, la glucogenólisis y la proteólisis (Zamora-Valdés et al. 2004; King 2016). En un estado de resistencia a la insulina, esta hormona deja de llevar a cabo sus funciones normales. La resistencia a la insulina causa un desbalance metabólico mediado principalmente por alteraciones en el control de la glucosa y la homeostasis de los lípidos a nivel de hígado, músculo esquelético y tejido adiposo (King 2016). Por lo cual la resistencia a la insulina tiene podría causar patologías como diabetes mellitus tipo 2, el MetS y los estados pro-inflamatorios asociados a la obesidad (Pajuelo et al. 2006). El mecanismo principal de la resistencia a la insulina es la alteración del transporte de glucosa. Esta alteración se caracteriza por defectos de la expresión de enzimas intracelulares y de la translocación del transportador de glucosa (GLUT) tipo 4, alteraciones en la actividad del receptor de insulina (RI), los sustratos del RI (SRI)-1 y SRI-2 y la fosfoinositol-3-cinasa (PI3-K) (Zamora-Valdés et al. 2004).

El origen fisiopatológico del síndrome metabólico no es muy claro y aún está en discusión. Potencialmente se sugiere que la base de la fisiopatología es la resistencia a la insulina; sin embargo, aún hay controversia. Algunos estudios sugieren que se tienen que tratar por individual cada uno de los componentes del MetS y no buscar solo un origen en común (Reaven 2006).

	ATP III	OMS	AACE	IDF
Triglicéridos mayor o igual a 150 mg/dL	X	X	X	X
HDL menor de 40 mg/dL en varones y 50 mg/dL en mujeres	X	X	X	X
Presión arterial mayor de 130/85 mmHg	X	X	X	X
Insulino resistencia (IR)		X		
Glucosa en ayunas mayor de 100 mg/dL	X		X	X
Glucosa 2 h: 140 mg/dL			X	
Obesidad abdominal	X			X
Índice de masa corporal elevado		X	X	
Microalbuminuria		X		
Factores de riesgo y diagnóstico	3 más IR	Más de 2	Criterio clínico	Obesidad abdominal

Tabla 1. Componentes de síndrome metabólico, según el Panel III de Tratamiento de Adultos del Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol (ATPIII), la organización mundial de la salud(OMS), la Asociación Americana de Endocrinología Clínica (AACE), la federación internacional de la diabetes(IDF)[†].

ESTRÉS Y METABOLISMO

La exposición al estrés estimula la liberación de hormonas como los GCs, el glucagón, la adrenalina y la ACTH entre otras. Los GCs como la corticosterona y el cortisol desempeñan diversas funciones. En el hígado, estimulan el depósito de glucógeno al incrementar a la glucógeno sintetasa e inhibir a la glucógeno fosforilasa. Los GC también estimulan el aumento en la glucosa hepática al activar enzimas claves de la gluconeogénesis, principalmente la glucosa-6-fosfatasa y la fosfoenolpiruvatocarboxiquinasa. En los tejidos periféricos, como el tejido muscular y el adiposo, los GCs inhiben la captación y la utilización de la glucosa, favorecen

[†]Tomado de Lizazaburu Robles 2013(Lizazaburu Robles 2013)

la degradación de proteínas dejando aminoácidos libres que pueden ser utilizados como sustrato en la gluconeogénesis, inhiben la utilización de la glucosa al disminuir la expresión de los GLUT y también pueden estimular la liberación de glucagón al unirse a sus receptores en el páncreas. De esta manera los GCs favorecen el aumento de glucosa en sangre (Delamano 2009).

Los GCs también son factores estimulantes de la adipogénesis. Su función es mediar el paso de pre-adipocitos a adipocitos maduros mediante la activación de los receptores del factor de proliferación del peroxisoma activado (PPARs) y de proteínas de unión a regiones CCAAT (C/EBP), los cuales tiene como función promover la expresión de una amplia variedad de genes y la síntesis de numerosos factores clave en el desarrollo del adipocito maduro (Gaillard et al. 1991; Lowell et al. 1999). Adicionalmente, los GCs promueven la lipólisis, el aumento de ácidos grasos libres, triglicéridos y colesterol total; mientras que los niveles de colesterol HDL disminuyen (Brandan 2014).

Los GCs tienen efecto sobre el control del apetito al estimular la liberación del neuropéptido Y (NPY) por parte del núcleo arcuato del hipotálamo (Kronenberg et al. 2009). Este péptido estimula la ingesta de alimentos de alto contenido calórico, esto aunado a la función de los GCs como estimulantes de la adipogénesis se relaciona directamente con la obesidad (León et al. 2008). Durante un evento estresante los niveles de CRH aumentan inhibiendo el apetito a través de la regulación del NPY, mientras que como ya se mencionó los GCs propician la ingesta con el fin de formar reservas energéticas que serán utilizadas para responder al evento estresante (Kronenberg et al. 2009). Durante un episodio de estrés se produce un pico de liberación de CRH a los pocos segundos del estímulo estresante, lo que ocasiona que los niveles de GCs se eleven minutos más tarde (Dallman et al. 2003). Sin embargo, el tiempo de acción de CRH es rápido y sus niveles regresan a la normalidad entre 10 y 12 minutos; en cambio, los GCs pueden actuar hasta por dos horas antes de regresar a niveles normales (Daneri 2012). Esto nos indica que el periodo de estimulación del apetito causado por los GCs se mantiene latente por un largo tiempo.

ESTRÉS E HIPOCAMPO

Hipocampo es un término que fue acuñado por el anatomista Giulio Cesare Aranzio, que hace referencia a la similitud entre esta estructura cerebral con un caballito de mar (Pearce 2001). Se trata de un pequeño órgano con una forma curvada y alargada, que se ubica en la parte interior del lóbulo temporal en humanos y va desde el hipotálamo hasta la amígdala. En la rata el hipocampo está ubicado más superficialmente que en el humano y es mucho más accesible (Sáez 2011). Está formado por el giro dentado (GD), el cuerno de Amón (CA) o hipocampo propiamente dicho y el subículo (Triglia 2009). Todas las estructuras del hipocampo presentan una única capa de somas neuronales densamente empaquetadas entre dos capas de células dispersas. El hipocampo juega un papel indirecto sobre el control de las emociones debido a su relación con la amígdala, la corteza prefrontal y el sistema límbico (López et al. 2009). Adicionalmente, tiene una función importante en la formación de nuevos recuerdos (acontecimientos, lugares y estímulos novedosos) (Squire 2002) y sobre la memoria espacial y la orientación (Matsumura et al. 1999). Otra de las funciones más importantes del hipocampo es la regulación negativa del eje HPA, lo que lo convierte en un centro de control de dicho eje (Herman and Mueller 2006). La inhibición del eje HPA por el hipocampo comienza en el GD la información fluye de CA3 a CA2 y posteriormente hacia CA1. CA1 manda proyecciones vía fimbria-fornix de donde salen aferentes glutamatérgicas hasta el núcleo del lecho de la estría terminal (BDNST) activando a las células GABAérgicas. Estas células envían proyecciones al NPV, inhibiendo la secreción de CRH por parte de las células parvocelulares HPA (Sapolsky et al. 1991; Ziegler et al. 2002).

ESTRÉS Y NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL

La neurogénesis se refiere al proceso de proliferación, migración, supervivencia, diferenciación e integración de nuevas neuronas a partir de células madre neurales (Olivares et al. 2015). La zona subgranular del GD del hipocampo y la zona subventricular son los dos nichos neurogénicos que permanecen activos en

la etapa adulta (Arias-Carrión et al. 2007). En la zona subventricular las células madre neurales se encuentran en la parte anterior de la zona subventricular y migran como neuroblastos por la banda migratoria rostral hasta el bulbo olfatorio integrándose como interneuronas inhibitorias periglomerulares (Lois and Alvarez-Buylla 1994). En cuanto al nicho neurogénico del hipocampo, las células madre neurales se ubican en la capa subgranular del GD, donde dan origen a los progenitores neurales, de los cuales se originan las nuevas neuronas. Los progenitores neurales se diferencian y migran desde la capa subgranular hasta la capa granular del GD (durante esta fase las células expresan la proteína doble cortina). Una vez alcanzada la capa granular, las células maduran y se integran a los circuitos hipocampales, principalmente como neuronas excitadoras (Sáez 2011)(Fig. 2).

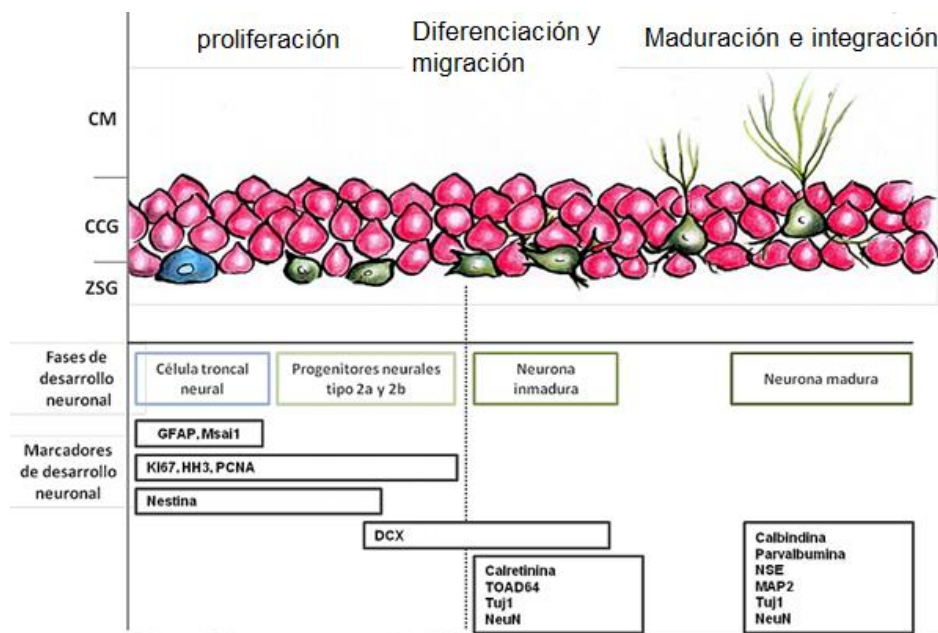


Fig. 2: Representación del proceso de la neurogénesis hipocampal y de los marcadores celulares que se expresan durante cada etapa. La neurogénesis inicia con la proliferación de las células troncales neurales localizadas en la zona subgranular del GD, que darán origen a progenitores neurales, de los cuales se originarán las nuevas neuronas. Los progenitores neurales inician la migración hacia la capa de células granulares del GD, continuando con su integración a los circuitos neuronales del hipocampo. Durante la neurogénesis los progenitores neuronales expresan proteínas específicas a lo largo de su maduración. Zona subgranular (ZSG), capa de células granulares (CCG)[‡].

[‡] Tomado de J. Olivares et al. 2015(Olivares, Juárez, and García 2015)

El proceso de neurogénesis está regulado de manera positiva o negativa existiendo factores que contribuyen a esta regulación, los cuales pueden ser clasificados como factores internos (hormonas, neurotransmisores etc.) y factores externos (Deng et al. 2010; Gage 2011; Zhao 2006). Entre los factores internos que regulan la neurogénesis positivamente podemos mencionar a: Notch, a las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs), las Efrinas (Eph), Noggin y Sonic hedgehog (Shh)(Alvarez-Buylla and Lim 2004), además de factores de crecimiento como: el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-I) y el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2)(Kuhn et al. 1997; Pencea et al. 2001). Estos factores pueden regular la neurogénesis tanto positiva como negativamente dependiendo de su nivel de expresión. Algunos neurotransmisores como el glutamato y las monoaminas, como la serotonina (5-HT), la noradrenalina y la dopamina, pueden regular la neurogénesis de forma positiva (McEwen and Gould 1995). Así mismo, las hormonas, entre las cuales encontramos a los esteroides ováricos y los estrógenos también pueden estimular la neurogénesis. Un factor muy importante que regula la neurogénesis de forma negativa es el envejecimiento, debido a que la tasa de producción neuronal disminuye conforme se incrementa la edad (Arias-Carrión et al. 2007). Entre los factores externos que regulan positivamente la neurogénesis encontramos la actividad física, el tratamiento con antidepresivos y una alimentación balanceada. El estrés crónico, el tabaco, y una alimentación pobre en nutrientes se han relacionado con una disminución de neurogénesis (Daniel A 2002).

Los altos niveles de GCs liberados durante el estrés crónico inhiben la neurogénesis hipocampal, ya que el hipocampo es una zona densamente poblada con receptores para esta hormona (McEwen et al. 1999; Mirescu et al. 2004). La disminución de la neurogénesis se asocia a la depresión (Suri et al. 2013). Snyder y colaboradores mencionan que se requiere de la neurogénesis hipocampal para que el sistema endocrino tenga una función normal (Snyder et al. 2012). El uso de animales transgénicos o el uso de radiación para lograr la inhibición de la

neurogénesis hipocampal en roedores adultos permitió identificar un pequeño grupo de neuronas en el GD que es crítico para que el hipocampo pueda realizar su función de regulación negativa del eje HPA (Snyder et al. 2012).

MICROBIOTA INTESTINAL

La microbiota es el conjunto de microorganismos que se localizan de manera normal en distintos nichos (piel, tracto gastrointestinal, tracto respiratorio, etc.) del cuerpo de los seres vivos (Palacio et al. 2016). Las interacciones de la microbiota asociada a organismos vivos puede clasificarse en tres grandes grupos: 1) mutualismo en el que tanto el microorganismo como el hospedero salen beneficiados de su interacción; 2) comensalismo en el que el microorganismo se ve beneficiado mientras que el hospedero no se ve perjudicado ni beneficiado; 3) parasitismo en el que el microorganismo depende del hospedero causándole daño (Suárez 2012). El tracto digestivo de los mamíferos es uno de los microambientes más complejos y diversos; particularmente, el ciego es la porción del tracto digestivo con mayor abundancia de microorganismos (Benavides and Guénet 2003). Muchos de los microorganismos que residen en el tracto gastrointestinal forman asociaciones mutualistas indispensables para el buen funcionamiento de los organismos hospederos (Guarner 2007; Palacio et al. 2016).

Anteriormente se creía que la colonización bacteriana del tracto gastrointestinal se llevaba a cabo inmediatamente tras el nacimiento, debido a los factores ambientales y alimenticios del recién nacido; no obstante, hace algunos años la idea cambió. Algunos estudios demostraron que la colonización se lleva a cabo intraútero, debido a que se ha observado que es posible detectar poblaciones bacterianas en las primeras muestras de las deposiciones del recién nacido (Rodríguez et al. 2015). adicionalmente, estudios recientes han dado pie a creer que la colonización del tracto gastrointestinal a través de la barrera placentaria podría llevarse a cabo antes del nacimiento (Versalovic 2014). Estos datos se han

visto reforzados debido a que se han detectado bacterias en sangre del cordón umbilical y en el líquido amniótico (Jiménez et al. 2005; Shan et al. 2014).

En la edad adulta la población microbiana en el intestino es sumamente compleja. Está compuesta de entre 500 y 1000 especies de microorganismos, siendo las bacterias las más abundantes. Los filos más abundantes son Firmicutes (como *Lactobacillus*) y los Bacteroidetes (como *Bacteroides*) (Qin et al. 2010). Los firmicutes en su gran mayoría son gram positivos, pueden presentar forma de bacilo o de coco, dentro de este filo encontramos a las clases bacilli, clostridia y mollicutes como las principales clases. Muchas de las bacterias dentro de este filo son capaces de estimular el sistema inmunológico, específicamente las células Tregs, son productores de butirato, propionato y acetato, algunos neurotransmisores y secretan enzimas que pueden hidrolizar carbohidratos complejos. Los bacteroidetes son un grupo de bacterias gram negativo anaerobias, la clase conocida de este filo es Bacteroidia. Este grupo de bacterias producen algunas vitaminas como la vitamina A y K2, pueden estimular al sistema inmune a secretar interleucina 10, son productores de lactato y contribuyen en la absorción intestinal.

La microbiota intestinal juega un papel de suma importancia como modulador de la fisiología del hospedero. Esta, puede regular la proliferación y diferenciación de células epiteliales (Falk et al. 1998), evita la colonización por parte de microorganismos patógenos, modula el sistema inmunológico, tanto innato como adaptativo, y desarrolla múltiples funciones en el metabolismo y la absorción de nutrientes (O'Hara and Shanahan 2006). Adicionalmente, la microbiota intestinal contribuye a metabolizar sustratos no digeribles, proporciona gran variedad de enzimas y vías bioquímicas que el organismo no posee, contribuye a la fermentación de hidratos de carbono, principalmente en el ciego y el colon, realiza la producción de ácidos grasos de cadena corta y diferentes vitaminas (vitamina K, B12, biotina y ácido fólico) que pueden ser aprovechadas por el hospedero, también contribuye en la absorción de algunos minerales y en la síntesis de aminoácidos (Palacio et al. 2016).

Una microbiota sana está constituida principalmente por los filos firmicutes y Bacteroidetes y en menor cantidad por actinobacteria y verrucomicrobia. Sin embargo, la microbiota está en continuo cambio a nivel género y especie. En el esófago, el duodeno y el yeyuno el género más abundante es estreptococo. En el estómago helicobacter predomina y en el intestino grueso la diversidad es muy amplia, pero principalmente dominan bacterias de los filos firmicutes y bacteroidetes (Jandhyala et al. 2015)

Según METAgenomics of the Human Intestinal Tract, la microbiota puede ser clasificada según el estado simbiótico entre el huésped y los microorganismos los cuales son estables tanto en su geografía como en los géneros, sin embargo, pueden ser afectados por algunos factores externos. Existen tres enterotipos. Enterotipo 1, predominan principalmente los bacteroides y tienen funciones sacarolíticas. Enterotipo 2, predomina Prevotella y se comportan como degradadores de glucoproteínas de mucina. Enterotipo 3, mayor abundancia de ruminococos, también pueden degradar la mucina, además de transportar azúcares a través de la membrana (Jandhyala et al. 2015).

EL EJE CEREBRO-INTESTINO

Desde hace muchos años se había planteado la existencia de una conexión entre el cerebro y el intestino; sin embargo, la propuesta ha tomado fuerza en los últimos años. La idea de un eje cerebro-intestino con una regulación bidireccional ha sido bien recibida, al igual que la noción de que la microbiota desempeña un papel de suma importancia en su regulación (Fig.3). Adicionalmente, se ha demostrado que el desarrollo neurológico depende en gran medida del buen funcionamiento del eje cerebro-intestino (Heijtz et al. 2011). Los mecanismos de cómo se lleva a cabo la regulación bidireccional entre el cerebro y el intestino aún son poco conocidos. Recientemente se ha propuesto al sistema endocrino, el inmunológico, estructuralmente al nervio vago y la microbiota intestinal como los principales encargados de la regulación bidireccional (Bercik et al. 2012; Mayer et al. 2014; Sommer F 2016).

Las bacterias comensales que conforman la microbiota intestinal producen moléculas como neurotransmisores, hormonas y algunos metabolitos bacterianos, que pueden modular la actividad de diversas estructuras cerebrales (Clarke et al. 2013; Louis and Flint 2009; Mayer et al. 2014; O'Mahony et al. 2014; Smith et al. 2013). La principal vía de comunicación es a través de la interacción de estas moléculas con terminaciones nerviosas (principalmente el nervio vago) o viajando a través de circulación sistémica (Cryan and Dinan 2012). La regulación de la microbiota hacia el cerebro se lleva a cabo mediante la secreción de metabolitos y neurotransmisores. Los principales elementos secretados por la microbiota que pueden modular la actividad del SNC son los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), el ácido gamma amino butírico (GABA), el triptófano, la serotonina, las catecolaminas, algunos metabolitos de los ácidos biliares y citocinas. Estos pueden activar diversas vías de señalización mediante la interacción con sus receptores en células locales, con el nervio vago, ramificaciones o a través de circulación sistémica (vena portal principalmente). Por ejemplo, *Bifidobacterium infantis* es capaz de elevar los niveles de triptófano en sangre y por ende los niveles de serotonina (O'Mahony et al. 2014). *Candida* spp, *Escherichia coli*, *Streptococcus thermophilus* y *Enterococcus* spp se relacionan con la producción de serotonina. *Lactobacillus* spp pueden liberar norepinefrina, y *Bifidobacterium* pueden producir GABA. Por otra parte, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycooides*, *Bacillus subtilis* y *Proteus vulgaris* se relacionan con la producción de dopamina y *Lactobacillus* spp con la liberación de acetilcolina (Clarke et al. 2014; Lyte 2014). Los AGCC como el butirato el propionato y el acetato pueden ejercer efectos al interactuar con receptores acoplados proteína G, el butirato incluso puede regular la expresión genética de histonas desacetilasas (Stilling et al. 2014). Los AGCC son los productos de la digestión bacteriana de los carbohidratos. Los AGCC pueden desarrollar funciones como la regulación de la serotonina enteroendocrina y del péptido YY (Reichmann, and Farzi 2012). Los AGCC en circulación pueden viajar hasta la barrera hematoencefálica y ser transportados a través de ella por los transportadores monocarboxilato y llegar al sistema nervioso central siendo

aprovechados como fuente de energía principalmente durante el desarrollo cerebral también los AGCC pueden regular la expresión de tirosina hidroxilasa afectando así la síntesis de algunos neurotransmisores (Rafiki et al. 2003).

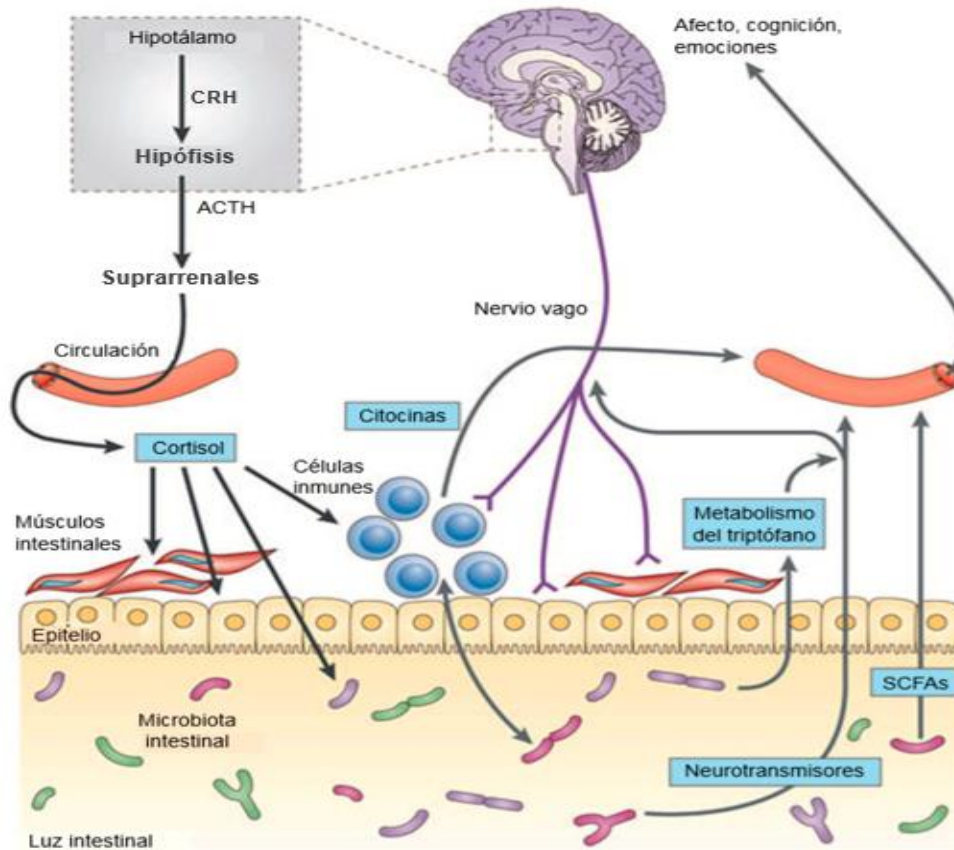


Fig.3: El eje cerebro-intestino. La comunicación entre el cerebro y el intestino está mediada principalmente por moléculas como neurotransmisores, hormonas y algunos metabolitos bacterianos que son producidas por la microbiota e interactúan con el nervio vago o viajan a través de circulación sistémica. Hormona liberadora de corticotropina (CRH), hormona adrenocorticotropa (ACTH), ácidos grasos de cadena corta (SCFAs)[§].

Por su parte, el sistema nervioso central regula al sistema gastrointestinal a través del sistema nervioso autónomo (SNA). El SNA puede regular las funciones intestinales tales como la motilidad, permeabilidad intestinal, secreción de ácidos y moco intestinal. Estos cambios causados por el SNA pueden tener efectos en el cambio de pH y el suministro de nutrientes en ciertas partes del intestino. Estas

[§] Tomado y modificado de F.Cryan 2012(Cryan and Dinan 2012)

alteraciones pueden causar un desequilibrio en la microbiota intestinal al modificar su microambiente causando una sobre población o la erradicación de un tipo específico de bacterias (Van Felius et al. 2003).

RELACIÓN ENTRE LA MICROBIOTA Y LA RESPUESTA AL ESTRÉS

La asociación entre el estrés y la microbiota cada vez es más evidente. Los primeros estudios para demostrar esto se llevaron a cabo en ratones libres de patógenos (GF) y ratones libres de patógenos específicos (PFS). Se demostró que los animales GF tenían los niveles de corticosterona y de ACTH significativamente más elevados al compararlos con ratones PFS. Esta hiperactivación del eje HPA fue corregida cuando los animales fueron colonizados con *Bifidobacterium infantis* (Sudo et al. 2004). De forma similar, se ha observado que *Lactobacillus helveticus* y *Bifidobacterium longum* pueden disminuir los niveles de corticosterona (Messaoudi et al. 2011). Al igual que la microbiota puede regular la liberación de la hormona del estrés, el estrés tiene un fuerte impacto sobre la microbiota. La exposición al estrés se ha asociado a un aumento en la permeabilidad intestinal que puede estar mediada por el aumento de GCs y CRH, a través de la activación de sus receptores CRHR1 y CRHR2. Este aumento en la permeabilidad intestinal les permite a las bacterias trasladarse a través del intestino causando una disbiosis intestinal (Rivier, and Moeser 2012; Rodiño et al. 2015).

RELACIÓN ENTRE LA DEPRESIÓN Y LA MICROBIOTA

La influencia bacteriana sobre el eje HPA cada vez es más clara, por lo que se ha planteado que la microbiota puede estar vinculada a la depresión (Kelly et al. 2016). Diferentes grupos de investigación han demostrado que las alteraciones en los niveles de monoaminas producidas por la microbiota, como la noradrenalina y la serotonina son claves en la depresión (Clarke et al. 2013; Neufeld et al. 2011). Así mismo, la depresión se ha asociado con cambios en la microbiota intestinal. Estudios han demostrado que pacientes que padecen depresión presentan niveles más altos de *Bacteroidetes*, *Proteobacterias* y *Actinobacterias*

en sus muestras fecales, mientras que los niveles de *Firmicutes* fueron significativamente más bajos en comparación con pacientes sanos (Palacio et al. 2016; Cryan and Dinan 2012). Adicionalmente, la depresión se ha asociado con una disminución en la riqueza de la microbiota intestinal (Cryan and Dinan 2012; Heijtz et al. 2011). Estudios adicionales observaron que el trasplante de microbiota de pacientes deprimidos a ratas con abatimiento de microbiota indujo la presentación de conducta de tipo depresiva y alteraciones en el metabolismo del triptófano (Jiang et al. 2015; Kelly et al. 2016). Por otra parte, se demostró que la administración de una combinación de *Lactobacillus helveticus* y *Bacteroides longum* disminuye de forma significativa las alteraciones conductuales como la ansiedad y la depresión sin tener efectos secundarios adversos (Messaoudi et al. 2011). En conjunto, estos datos nos indican que la microbiota intestinal tiene un papel crítico en el desarrollo de la depresión.

EFFECTOS DE LA MICROBIOTA SOBRE EL HIPOCAMPO.

La información de cómo la microbiota pueda estar relacionada con el hipocampo es escasa. El hipocampo es una zona muy susceptible a los cambios del BDNF, factor relacionado con la plasticidad cerebral, la neurogénesis, el crecimiento, desarrollo y supervivencia neuronal, que juega un papel crítico en el aprendizaje, la memoria y la conducta. En ratones GF se ha demostrado una disminución en la expresión de BDNF (Clarke et al. 2013; Heijtz et al. 2011; Sudo et al. 2004). También se ha observado que los ratones GF sufren alteraciones neuronales como menor número de ramificaciones dendríticas y déficit en el número de espinas (Luczynski et al. 2016). Datos recientes muestran que la neurogénesis hipocampal puede estar regulada por la microbiota intestinal, debido a que se ha observado que los ratones GF exhiben una mayor neurogénesis en el hipocampo dorsal inmediatamente después del destete. Sin embargo, estos estudios muestran que los ratones GF que fueron colonizados después del destete no logran revertir los efectos sobre la neurogénesis hipocampal en la etapa adulta, lo

que sugiere que el periodo pre-destete podría ser un periodo crítico durante el cual la microbiota ejerce su influencia sobre la neurogénesis (Ogbonnaya et al. 2015).

EFFECTOS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL SOBRE EL METABOLISMO

La microbiota es ampliamente relacionada con el metabolismo, ya que puede aportar los genes implicados en el metabolismo de los lípidos y de los glúcidos. También puede aportar ciertas enzimas que contribuyen a la digestión de polisacáridos complejos y otros compuestos que no podrían ser digeridos (Graaf 2008; Hooper et al. 2001). Se ha demostrado que los ratones criados en condiciones normales tienen un 40% más de grasa corporal, en comparación con ratones criados en GF, sometidos a la misma dieta. El trasplante de microbiota de ratones normales a GF incrementa significativamente su nivel de grasa corporal e intolerancia a la glucosa (Bäckhed et al. 2004). También se ha demostrado que los ratones GF están protegidos contra la obesidad y las alteraciones en la glucosa e insulina causadas por la dieta alta en azúcares y grasas (Bäckhed et al. 2007). Sin embargo, hay estudios donde demuestran que una dieta alta en grasas por sí sola puede modificar la microbiota intestinal de forma independiente a la obesidad (Hildebrandt et al. 2009).

Las enzimas de la microbiota intestinal tienen la capacidad de convertir los polisacáridos complejos en monosacáridos y ácidos grasos de cadena corta (AGCC) fácilmente absorbibles. Los AGCC pueden ser transformados en lípidos a través de la síntesis lipídica llevada a cabo en el hígado. El acetato y el propionato actúan en la acumulación de lípidos al inhibir la lipólisis, de esta forma la microbiota puede regular la formación de tejido adiposo (Hong et al. 2005). Las bacterias también pueden regular los niveles de colesterol, glucosa y la absorción de lípidos mediante el metabolismo de los ácidos biliares. La desconjugación de los ácidos biliares provoca un aumento en la eliminación de bilis en heces y su síntesis a partir del colesterol (Freestone et al. 2008; Park et al. 2007). La microbiota también está implicada en el metabolismo de la colina, que es

metabolizada a trimetilamina, la cual a su vez es metabolizada a trimetilamina-N-óxido en el hígado. Las altas concentraciones de trimetilamina-N-óxido pueden causar el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Zeneng et al. 2011). Otra función descrita de la microbiota es la síntesis de vitaminas como la vitamina K y varios componentes de la vitamina B, la síntesis de aminoácidos y péptidos antimicrobianos, síntesis del ácido linoléico conjugado el cual tiene efectos antidiabéticos, hipolipidémicos y propiedades inmunomoduladoras y antimicrobianas (Marin et al. 2015)

ESTRÉS DURANTE LAS ETAPAS TEMPRANAS DE LA VIDA

El estrés en etapas tempranas de la vida (early life stress, ELS), como el maltrato infantil, el abandono y el abuso físico, psicológico o sexual, se ha demostrado que a largo plazo conlleva una serie de consecuencias graves y en muchos casos irreversibles. Esto se debe a que los sistemas encargados de la regulación del estrés se encuentran aún inmaduros, por lo que los eventos de estrés crónico en la vida temprana pueden desencadenar repercusiones físicas como cognitivas. Según la OMS el maltrato infantil se define como una serie de abusos y desatenciones de los cuales son objeto todo aquel menor de 18 años de edad. Este concepto incluye maltrato físico, psicológico, desatención y negligencia, abuso sexual, explotación comercial y cualquier otra situación donde se pueda ver afectada la salud, desarrollo, dignidad o poner en riesgo la vida del niño (OMS 2015). El estrés en etapas tempranas de la vida se ha asociado con trastornos de aprendizaje y memoria, alteraciones cognitivas, problemas emocionales y comportamientos autodestructivos (Audrey et al. 2010; Lee 2007; Bellis 2005). La exposición al ELS causa alteraciones en el desarrollo normal de las estructuras encargadas de la regulación de la respuesta al estrés. Se ha observado que a largo plazo estas alteraciones están relacionadas con la disminución de la neurogénesis hipocampal, alteraciones en la mielinización, poda neural y cambios estructurales y funcionales del hipocampo. Adicionalmente se sabe que el estrés

temprano causa alteraciones en la colonización de la microbiota intestinal y que esto podría causar alteraciones en la regulación del metabolismo y de la respuesta al estrés a largo plazo.

MODELO ANIMAL

Uno de los modelos más utilizados para la evaluación de las alteraciones causadas por el estrés crónico es el modelo de SM en ratas, ya que este modelo replica los efectos observados en el humano. El modelo de la SM consiste en separar a las crías de su madre durante 3 horas diarias por los primeros 14 días de vida. Se ha observado a largo plazo que los animales sometidos a SM presentan conducta tipo depresiva (Masrour et al. 2018; Yamawaki et al. 2018), ansiosa (Bondar et al. 2018; Jin et al. 2018), alteraciones metabólicas (Vargas et al. 2016), neuroendocrinas así como afecciones en el aprendizaje y la memoria (Guo et al. 2018), además de disminución de la neurogénesis hipocampal¹⁰

V. ANTECEDENTES

La neurogénesis hipocampal juega un papel importante en la modulación de la respuesta del eje HPA. En 2012 Snyder y colaboradores demostraron que se requiere de la neurogénesis hipocampal para una regulación normal del eje HPA (Snyder et al. 2012). Adicionalmente se ha reportado que la SM tiene efectos deletreos sobre el nicho neurogénico hipocampal. Deepika Suri y colaboradores en 2013 observaron que los animales sometidos a SM sufren una disminución de la neurogénesis hipocampal, una de-sregulación epigenética de la expresión de BDNF y deficiencias en tareas cognitivas, en animales de 15 meses (Suri et al. 2013). Esta evidencia, sugiere que las alteraciones en la neurogénesis hipocampal causadas por la SM podrían ser uno de los mecanismos que subyacen a los efectos a largo plazo sobre la reactividad del eje HPA. Adicionalmente, resultados previos de nuestro grupo mostraron que las SM también puede causar alteraciones metabólicas moderadas. En 2016 Vargas y colaboradores, observaron que la SM causa una conducta tipo depresiva y alteraciones en los parámetros de riesgo metabólico en roedores de dos meses de edad (Vargas et al. 2016).

Por otra parte, se ha observado que existe una relacion estrecha entre la microbiota intestinal y los efectos de la SM. O'Mahony y colaboradores en 2009, realizaron un análisis de rRNA 16s de la materia fecal de ratas sometidas a SM, y demostraron que la microbiota de estos animales es significativamente diferente de aquélla presentada por los animales no estresados (O'Mahony et al. 2009). Por su parte, Gareau y colaboradores en 2007, demostraron que el tratamiento con probióticos logra normalizar el nivel de corticosterona después de la SM (Gareau et al. 2007). Moussaoui y colaboradores en 2014 demostraron que el estrés temprano, aumenta los niveles de corticosterona, lo cual permite una mayor permeabilidad intestinal, causando modificaciones en la microbiota intestinal. (Moussaoui et al. 2014). Más tarde, en 2015 De Palma y colaboradores usando ratones libres de patógenos específicos y libres de gérmenes desde el nacimiento,

demonstraron que la SM altera el eje HPA de una manera independiente de la microbiota. Sin embargo, la microbiota es necesaria para la inducción de alteraciones conductuales causadas por la SM. Adicionalmente observaron que la colonización con microbiota silvestre en los animales adultos libres de patógenos, produce distintos perfiles microbianos en los animales control y en los sometidos a SM, las cuales se asociaron con alteraciones conductuales en la SM, pero no en los animales control (De Palma et al. 2015). Adicionalmente, en 2015 Galley J y colaboradores observaron que crías sometidas a SM como un estímulo estresor, tienen una disminución significativa en *Lactobacillus* spp, esto concuerda con diferentes estudios que han probado que el estrés cambia la composición de la microbiota intestinal (Galley et al. 2015). Recientemente, Amini-khoei y colaboradores demostraron que los cambios en la microbiota causados por la SM están mediados por la corticosterona al igual que las alteraciones en el comportamiento (Amini-khoei et al. 2019).

Estos datos sugieren que la disbiosis intestinal juega un papel crucial como mediador de los efectos de la SM. Sin embargo, el efecto de la recolonización en animales sometidos a SM no ha sido estudiado.

VI. HIPÓTESIS

La re-colonización con microbiota proveniente de animales control reverte los efectos de la SM sobre la neurogénesis hipocampal y disminuye la conducta tipo depresiva y el riesgo metabólico

VII. OBJETIVOS

General:

Determinar si la re-colonización con microbiota de animales control reverte los efectos de la SM sobre la neurogénesis hipocampal, la conducta tipo depresiva y el riesgo metabólico.

Particulares:

- ❖ Evaluar los efectos del abatimiento de la microbiota mediante la administración de antibióticos orales (AB), sobre la conducta tipo depresiva, los parámetros de riesgo metabólico y la neurogénesis hipocampal en animales control y sometidos a SM.
- ❖ Evaluar los efectos de la re-colonización bacteriana sobre la conducta tipo depresiva, los parámetros de riesgo metabólico y la neurogénesis hipocampal en animales sometidos a abatimiento de la microbiota control y SM.
- ❖ Determinar si la re-colonización bacteriana revierte la disbiosis causada por la SM, mediante la evaluación de la composición de la microbiota en animales que fueron sometidos a abatimiento de la microbiota y re-colonizados con microbiota control y SM.

VIII. METODOLOGÍA

Se utilizaron ratas machos de la sepa Sprague Dawley CONT o sometidas a SM (Fig.4). Todos los grupos estuvieron integrados de 5 a 8 individuos dependiendo del experimento. El día de nacimiento fue considerado como día postnatal (DP) 0. Al día DP1 todas las crías fueron mezcladas y se ajustaron las camadas a 10 individuos (8 machos y 2 hembras), se asignaron la mitad de las ratas al grupo CONT y la otra mitad al grupo SM. La SM comenzó desde el DP1 hasta el día DP14. El destete de ambos grupos se realizó al DP21 y se dejaron crecer en condiciones estándar de bioterio hasta el DP60 o DP120 (4 meses) dependiendo el experimento a realizar. En el experimento uno, se caracterizó el efecto de la SM sobre la conducta tipo depresiva, la tolerancia a la glucosa, el riesgo metabólico y la neurogénesis hipocampal en animales de 4 meses de edad. Posteriormente, en el segundo experimento se utilizaron grupos independientes de animales. Al DP60 la mitad de los animales de cada grupo (CONT y SM) fueron sometidos a abatimiento de microbiota mediante la administración de un esquema de AB por 4 semanas (1 mes), formando así los grupos SM-AB y CONT-AB. Una vez que se abatió la microbiota (DP90) la mitad de las ratas SM-AB y CONT-AB se evaluaron inmediatamente, mientras que el resto fueron recolonizadas desde el DP90 hasta el DP120 (1mes) con microbiota de animales donadores intactos (no sometidos a tratamiento con antibiótico) a través de la cohabitación. Se evaluó la conducta tipo depresiva en la prueba de nado forzado y se realizó la curva de tolerancia a la glucosa, después del tratamiento con el coctel de antibióticos (DP90) y después de la recolonización (DP120). Los animales se sacrificaron al día DP93 (tratamiento con AB) y al día DP123 (recolonización) con una sobredosis de pentobarbital sódico(Ochoa 1999). Se obtuvieron muestras de sangre intracardiaca y se centrifugaron, el suero y las muestras del contenido del ciego fueron almacenados a -30°C hasta su procesamiento. Posteriormente los animales fueron perfundidos por vía intracardiaca y se obtuvieron los cerebros, los cuales fueron almacenados en solución de sacarosa al 20% en refrigeración. Los cerebros fueron procesados en un criostato realizando cortes de 40µm de grosor.

Para evaluar la neurogénesis se realizaron inmunotinciones utilizando un anticuerpo específico contra DCX para cuantificar el número y densidad de células DCX+ en el hipocampo. Los parámetros de riesgo metabólico fueron analizados a partir de las muestras de suero. Se extrajo DNA bacteriano de las muestras de contenido del ciego y se analizó la composición de la microbiota mediante PCR tiempo real (qPCR).

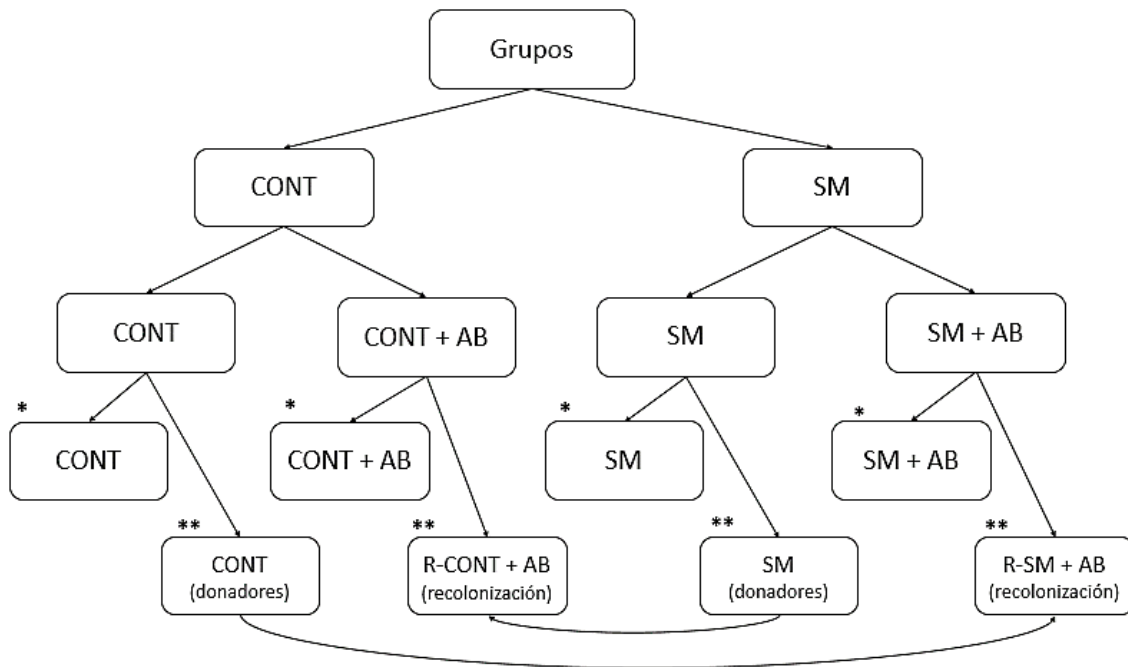


Fig. 4: grupos experimentales. Control (CONT), separación maternal (SM), abatimiento de microbiota mediante mezcla de antibióticos orales (AB), recolonización(R). *Grupos que fueron sacrificados al día postnatal 93. ** Grupos que fueron al día postnatal 123.

SEPARACIÓN MATERNAL

Para la SM las crías fueron separadas de su madre por 3 horas diarias durante las dos primeras semanas de vida (DP1-14), colocadas en una caja de acrílico con tapa (micro-aislador) de 24x18 cm con limpio y fueron colocadas en un cojín térmico ajustado a 32°C en un cuarto independiente a la colonia. Las crías se

mantuvieron dentro de la misma caja, pero aisladas de sus hermanos por paneles separadores.

ABATIMIENTO DE LA MICROBIOTA

Para el abatimiento de la microbiota se utilizó un coctel de antibióticos orales el cual fue suministrado a través de los bebederos de las ratas experimentales. El coctel consta de una mezcla de ampicilina (eficiente contra bacterias gram positivas y algunas gram negativas) (1 g/l), vancomicina (eficiente contra bacterias gram positivas) (500 mg/l), sulfato de neomicina (eficiente contra bacterias gram negativas) (1 g/l) y metronidazol (antiparasitario, también es eficiente contra algunas bacterias gram positivas y algunas gram negativas) (1g/l) disueltos en agua potable de acuerdo a lo previamente descrito (Rakoff-Nahoum et al. 2004). La administración se realizó del DP60 al DP90. Para prevenir la pérdida del efecto de los antibióticos por la disminución de su actividad, los bebederos fueron cambiados cada tercer día.

RECOLONIZACIÓN

A partir del DP90 los animales asignados al grupo con abatimiento de microbiota (tratados con el coctel de antibiótico) se trasladaron a cohabitar en una caja con los animales del grupo donador (animales con microbiota intacta) respectivo. Los animales permanecieron en estas condiciones durante un mes.

PRUEBA DE NADO FORZADO

La prueba de nado forzado se realizó en un cilindro de acrílico transparente de 30 cm de diámetro y 50 cm de altura, el cual se llenó con agua hasta los 40 cm a 21°C de acuerdo a lo previamente descrito (Torner et al. 2017). Los animales se colocaron en el cilindro por un periodo de 10 minutos durante los cuales se registró su comportamiento mediante el uso de un programa de cómputo (EVENTLOG, MSDOS). En la prueba se evaluó el escalamiento o pataleo (conducta activa), nado, inmovilidad o flotamiento (conducta pasiva o

desesperanza) y la latencia al primer episodio de inmovilidad o flotación. El agua fue sustituida por agua limpia cada cuatro ratas o entre grupos para evitar la contaminación cruzada.

CATETERIZACIÓN

Para la cateterización, las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina (80mg/kg) y xilacina (6mg/kg), se les realizó una incisión a la altura de la clavícula para exponer la vena yugular, donde se introdujo un catéter (0.64mmDI/1.19mm DO) el cual estaba lleno de solución de heparina (3%) de acuerdo a lo previamente descrito (Vargas et al. 2016). El catéter se fijó con hilo de seda negro, la parte del catéter libre se extrajo por la nuca para asegurarlo fuera del alcance de la rata y se dejó lleno de una solución de gentamicina (2%) para evitar infecciones. La incisión fue suturada con hilo de seda y se limpió con antiséptico. Las ratas se dejaron recuperar por una semana en cajas de aislamiento.

CURVA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA (INTRAVENOSA)

Para la curva de tolerancia a la glucosa, las ratas se dejaron en ayuno durante 12 horas de acuerdo a lo previamente descrito (Vargas et al. 2016). A las 9:00 am del día de la prueba los animales se conectaron a una tubería de muestreo y se dejaron estabilizar por una hora. Tomamos muestras de sangre basales y se administró una carga de glucosa intravenosa (50% 1ml/kg) obtuvimos muestras de sangre (400 µl que se sustituían por solución salina) 15, 30, 60 y 120 min después de la administración y cuantificamos la concentración de glucosa en un glucómetro comercial (Roche. Accu-ChekPerforma). Las muestras fueron recolectadas en micro tubos con 0.5µl de EDTA (10%) y 10µl de Aprotinina, centrifugadas 10min/5090 r.p.m/4°C para separar el plasma y las muestras se almacenaron en congelación hasta su procesamiento.

CURVA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA

Para la curva de tolerancia a la glucosa los animales fueron dejados en ayuno durante 12 horas. Se tomó la muestra de sangre de la cola a las 9 h y después se les inyectó intra-peritonealmente una dosis de glucosa (1ml/kg de peso. Glucosa 50% PISA). Se continuaron tomando muestras de sangre de la cola al minuto 30, 60 y 120 después de la administración de la glucosa. La concentración de glucosa en sangre fue medida mediante un glucómetro comercial (Roche Accu-Check).

SACRIFICIO Y TOMA DE MUESTRAS

Los animales se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico (aprox 0.5-1ml), siguiendo la norma que establece las disposiciones para la investigación en salud en el Instituto Mexicano del Seguro Social, la Ley General de Salud (última reforma DOF 25-01-2013) y el manual de procedimientos recomendables para la investigación con animales. Así mismo nos apegamos estrictamente a la norma oficial de uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999, NOM-033-ZOO-1995 y NOM-051-ZOO-1995). Se tomaron muestras de sangre intracardiaca (400 µl) las cuales fueron colectadas en microtubos con 0.5µl de EDTA (10%) y 10µl de Aprotinina, centrifugadas por 10min/9600 r.p.m a 4°C para separar el plasma el cual fue almacenado a -30°C hasta su procesamiento. Se colectaron muestras del contenido del ciego en microtubos estériles y se almacenaron a -40°C. Posteriormente, los animales fueron perfundidos por vía intracardiaca (200 ml solución lavadora NaCl 0.9% / 200 ml paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos 0.1 M), los cerebros fueron disecados y colocados en una solución fijadora por 24 horas y después transferidos a soluciones seriadas de sacarosa al 10% y 20% en amortiguador de fosfatos. Los cerebros fueron procesados en un criostato y se almacenaron en solución crioprotectora (25% glicerol, 25% monoetilen glicol y 50% buffer de fosfatos).

PARÁMETROS DE RIESGO METABÓLICO.

Las concentraciones de corticosterona e insulina en plasma se evaluaron mediante el uso de kits comerciales de ELISA (AssayDesigns EIA kit, CrystalChem EIA kit). La determinación de triglicéridos y colesterol en plasma se llevo a cabo mediante ensayos colorimétricos estándar (RANDOX). La concentración de glucosa en sangre se evaluó durante el muestreo mediante el uso de un glucómetro portátil comercial (AccucheckPerforma). El índice homeostático de resistencia a la insulina QUICKI se calculó mediante la fórmula: $1 / (\log (\text{insulina en ayuno } \mu\text{U/mL}) + \log (\text{glucosa en ayuno mg/dL}))$.

EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción del ADN bacteriano de las muestras de ciego, se llevó a cabo mediante el uso de un kit comercial (ISOLATE Fecal DNA Kit - BIOLINE) siguiendo el protocolo del fabricante.

REACCIÓN DE LA POLIMERASA EN CADENA EN TIEMPO REAL (qPCR)

Para la cuantificación, el ADN se amplificó utilizando pares de oligonucleótidos para ARN ribosomal 16S específicos para cada grupo, de acuerdo a los protocolos previamente descritos (Stenblom *et al.* 2016) y el marcador fluorescente SYBR Green. La abundancia relativa de cada uno de los genes se calculó tomando como referencia los productos de la amplificación con oligonucleótidos universales para bacterias totales. La qPCR se realizó en apego a las normas MIQE97 (Minimum Information for the Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments)(Stephen *et al.* 2009).

Grupo		Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)
Bacterias totales	F	GCA GGC CTA ACA CAT GCA AGT C	292
	R	CTG CTG CCT CCC GTA GGA GT	
<i>Bacteroides fragilis</i>	F	ATA GCC TTT CGA AAG RAA GAT	495
	R	CCA GTA TCA ACT GCA ATT TTA	

<i>Clostridium</i> <i>coccoides</i>	F R	AAA TGA CGG TAC CTG ACT AA CTT TGA GTT TCA TTC TTG CGA A	440
<i>Clostridium leptum</i>	F R	GCA CAA GCA GTG GAG T CTT CCT CCG TTT TGT CAA	239
<i>Lactobacillus</i> spp	F R	AGC AGT AGG GAA TCT TCC A CAC CGC TAC ACA TGG AG	341
<i>Enterobacteriaceae</i>	F R	CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	512

CUANTIFICACIÓN DE MICROBIOTA

Se realizó una curva de crecimiento de *E. coli* (cepa ATCC25922). Se inoculó medio Luria Bertani (LB) con *E. coli* ajustándose a una densidad óptica (DO₅₂₀) inicial (0.055) y se tomó una muestra del medio cada 1.5 hrs (hasta las 9 hrs) a las cuales se le midió la DO y se sembraron en placas con medio LB, se dejó crecer durante 12 horas a 37°C, posteriormente se contó el número de unidades formadoras de colonia (UFC), con el fin de poder relacionar el número de UFC y la DO.

Se inoculó medio LB con *E. coli* y se dejó crecer durante 12 horas, se tomó 1ml de medio LB sin inocular y se agregó del medio donde se cultivó *E.coli* hasta ajustarse a una DO₅₂₀ de 1.089 que corresponde a 10¹⁰UFC. Se hicieron diluciones seriadas (10¹⁰-10⁴) de cada una de estas diluciones se extrajo el ADN mediante el uso de un kit comercial (Zymo Research D4068 Quick-DNA Universal Kit) y se realizó qPCR al DNA extraído de cada una de las diluciones, esto con el fin de obtener una curva estándar que relacione las UFC y la Cq obtenida por el qPCR.

Para la cuantificación de bacterias totales se realizó qPCR al ADN extraído de las muestras de ciego de las ratas y los datos de Cq obtenidos se extrapolaron con la curva estándar, obteniendo el número de UFC.

INMUNOTINCIONES

Los cortes de cerebro fueron lavados con buffer de fosfatos (PB) para eliminar la solución crioprotectora, y se incubaron en PBT (PB + triton 0.3%) con peróxido de hidrógeno al 10% (H₂O₂) y después en metanol para bloquear endoperoxidasas. Los cortes se colocaron en solución de bloqueo (PBT + suero de caballo 5%) y se realizó una inmunotinción colorida usando una solución de anticuerpo primario (Cabra-anti-DCX marca Santa Cruz Biotechnology, 1:1000 en solución de bloqueo). Los cortes fueron visualizados con un anticuerpo secundario biotinilado (burro-anti-cabra, Vector Laboratories, 1:750 en solución de bloqueo), el sistema de amplificación de avidina-biotina (Elite ABC kit, 5µl/ml, Vector laboratories) y el sistema de revelado Ni-DAB (buffer 0.7%+ diaminobencidina 2.8%+ cloruro de níquel 0.7%+ H₂O₂ 0.7% y agua 95.05%, Vector Laboratories). Se realizó una tinción de contraste con hematoxilina eosina.

CONTEO SEMI-ESTEREOLOGICO

Seleccionamos de manera aleatoria una serie de cortes de cada rata (240 µm de distancia entre cada uno), de forma que todas las partes de la estructura tuvieron la misma probabilidad de ser evaluadas. Las laminillas se observaron con un microscopio (axioscope, Karl Zeiss) y un objetivo 20x y se realizó un conteo manual de células DCX+ en el hipocampo dorsal en el GD. Para la evaluación del área (mm²) de la capa granular y sub granular del GD se utilizó el programa Axiovision Real 4.0 (Karl Zeiss) y un objetivo 5x. El volumen de la capa granular del GD se calculó mediante el principio de Cavalieri: $V_{(e)} = T \sum_{i=1}^n A_i$. Donde el volumen es la suma de las áreas de cada corte con un grosor T (40µm) multiplicado por la distancia de muestreo (240µm). Se calculó la densidad total de

células marcadas con DCX (No cels/mm³) mediante el uso de la formula $Nv=Q/ah$ donde Q es el número de células marcadas, a el área de cada corte y h la distancia entre cada corte.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software comercial Statview 5.0.1 (AbacusConcepts, Inc., Berkeley, CA). Para la evaluación del efecto de la SM en animales de 4 meses de edad los datos se analizaron mediante una prueba t de Student (CONT/SM). La curva de tolerancia a la glucosa se analizó mediante una ANOVA de medidas repetidas. Los datos de las estimaciones estereológicas del número y la densidad de células DCX+, la conducta tipo depresiva, los parámetros de riesgo metabólico y la abundancia relativa de bacterias comensales de los animales sometidos a abatimiento de microbiota o recolonización fueron analizados mediante una ANOVA de dos factores (SM/abatimiento de microbiota o SM/re-colonización). El análisis de los datos de la curva de tolerancia a la glucosa se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas. Cuando el análisis mostró efectos significativos se usó la prueba *post-hoc* Fisher-LSD para determinar las diferencias entre los grupos. La significancia estadística fue establecida con un valor de $p \leq 0.05$. Para evaluar los cambios en la composición de la microbiota intestinal se llevó a cabo un análisis de abundancia relativa.

IX. RESULTADOS

EFFECTOS DE LA SEPARACIÓN MATERNAL EN RATAS DE 4 MESES DE EDAD.

LA SM AUMENTA LA CONDUCTA TIPO DEPRESIVA.

Para evaluar el efecto de la SM sobre la conducta tipo depresiva se realizó la prueba de nado forzado (Fig.5). observamos que las ratas de 4 meses de edad sometidas a SM presentan un menor tiempo de escalamiento ($p \leq 0.01$), mayor tiempo de nado ($p \leq 0.01$), mayor tiempo de inmovilidad ($p \leq 0.01$) y menor tiempo de latencia al primer episodio de inmovilidad ($p \leq 0.01$).

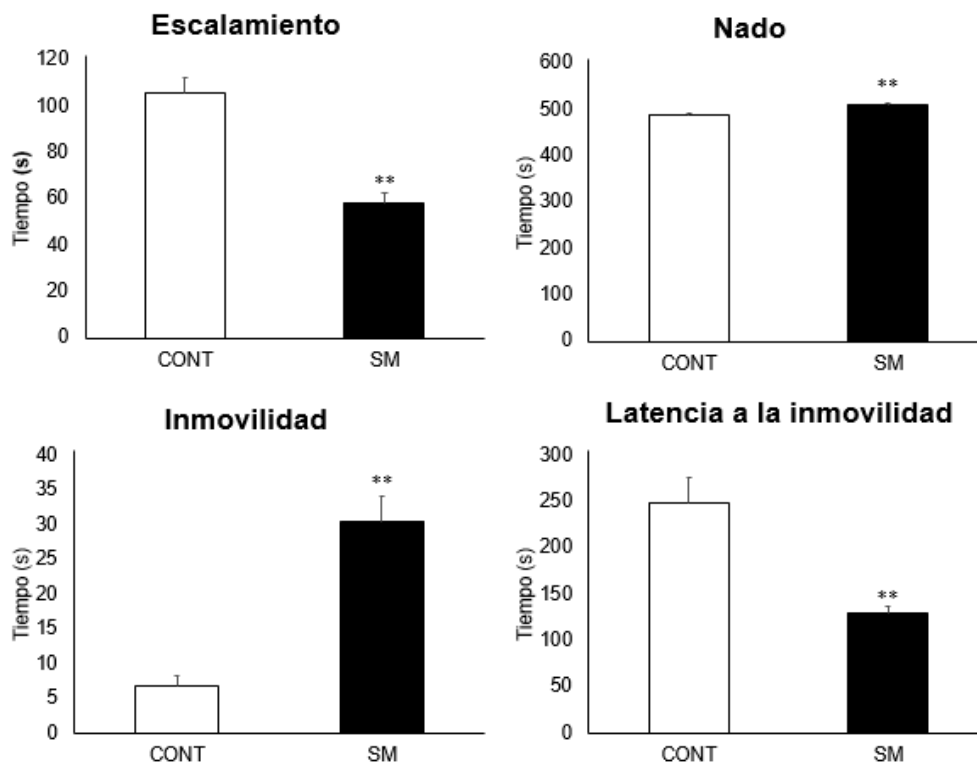


Fig. 5: La SM causa conducta tipo depresiva en la prueba de nado forzado. Animales control (CONT) o separación maternal (SM) de cuatro meses de edad mantenidos en condiciones estándar de bioterio. ($Prom \pm EST$, t de Student, $**p \leq 0.01$ vs control. $n=10$.)

LA SM AFECTA LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA Y AUMENTA EL RIESGO METABÓLICO.

para evaluar los efectos de la SM sobre el metabolismo realizó la curva de tolerancia a la glucosa intravenosa observamos que las ratas sometidas a SM presentan niveles de glucosa en ayuno más elevados que los controles en ($p \leq 0.05$) y en las muestras tomadas al minuto 120 ($p \leq 0.01$) después de haberse administrado la carga de glucosa. El análisis estadístico mostró un efecto significativo de la administración de glucosa ($F_{4,74}$: 16, $p \leq 0.0001$) y la SM ($F_{1,74}$: 7, $p \leq 0.02$), pero no de la interacción (Fig. 6).

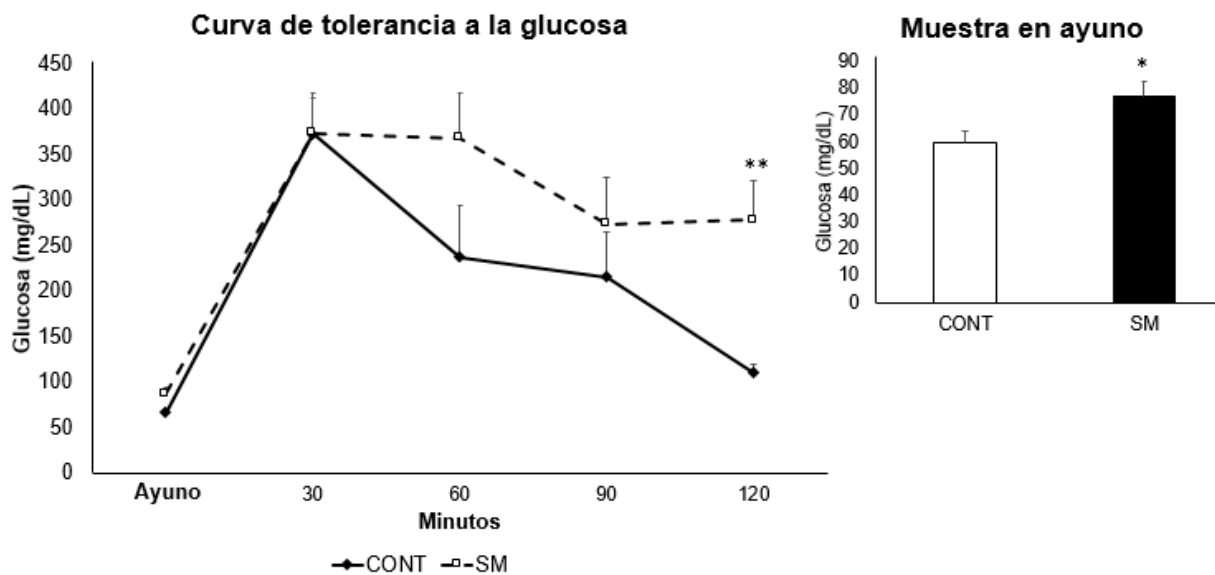


Fig. 6: La SM causa alteraciones en la homeostasis de la glucosa. Animales control (CONT) o separación maternal (SM) de cuatro meses de edad mantenidos en condiciones estándar de bioterio. (Prom \pm EST, ANOVA, * $p \leq 0.05$ vs control, ** $p \leq 0.01$ vs control. CONT n=8, SM n=7)

Al evaluar los parámetros de riesgo metabólico observamos que la SM causa un aumento en la concentración de colesterol ($p \leq 0.01$), triglicéridos ($p \leq 0.05$), e insulina ($p \leq 0.05$) en plasma y una disminución en el índice de resistencia a la insulina (QUICKI, $p \leq 0.01$). Adicionalmente, observamos que la SM aumentó significativamente la concentración de corticosterona después del ayuno de 12 hrs ($p \leq 0.01$). Así mismo, observamos que la SM causó obesidad (aumento en el peso corporal mayor a 10%) en los animales de 4 meses de edad ($p \leq 0.01$).

	CONT	SM
Colesterol (mg/dl)	34.75±4.68	61.50±4.49**
Triglicéridos (mg/dl)	67.67±10.61	115.39±12.79*
Insulina(pMol/L)	146.14±15.73	204.13±18.22*
Quicki	0.368±0.007	0.340±0.004**
Corticosterona(pg/ml)	75.26±5.58	227.12±57.50**
Peso (g)	387±10.63	440.50±9.54**

Tabla 2: La SM aumenta el riesgo metabólico. Parámetros metabólicos de animales de animales control (CONT) o separación maternal (SM) de cuatro meses de edad mantenidos en condiciones estándar de bioterio. (*Prom ± EST*, t de Student, * $p \leq 0.05$ vs control, ** $p \leq 0.01$ vs control. CONT $n=8$, SM $n=7$.)

LA SM DISMINUYE LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL

Para evaluar la neurogénesis hipocampal se realizaron inmunotinciones contra DCX en cortes cerebrales, observamos que las ratas sometidas a SM muestran una disminución en el número ($p \leq 0.05$) y la densidad de células DCX+ ($p \leq 0.05$) en la capa subgranular del GD al comparar con el grupo control (Fig. 7).

Imágenes representativas de una inmunotinción contra DCX

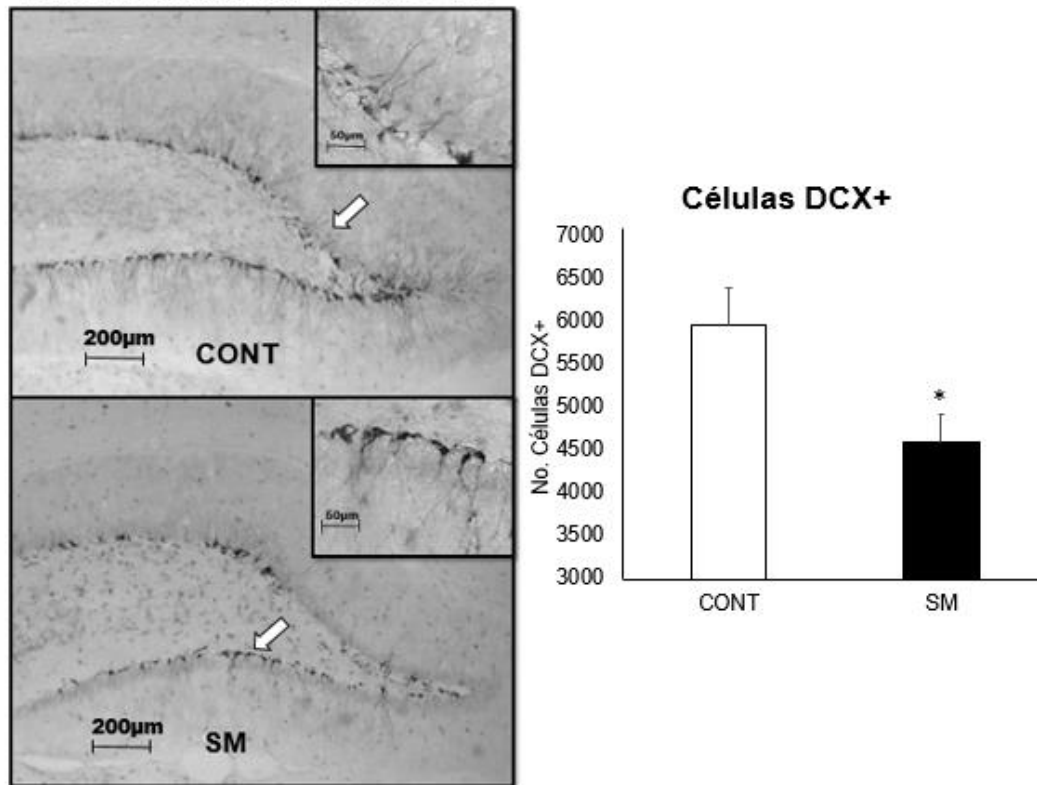


Fig.7: La SM disminuye la neurogénesis hipocámpal. Animales control (CONT) o separación maternal (SM) de cuatro meses de edad mantenidos en condiciones estándar de bioterio. (*Prom ± EST, t de Student, *p ≤ 0.05 vs control. n=8.*)

EFFECTOS DE EL ABATIMIENTO DE LA MICROBIOTA EN ANIMALES SOMETIDOS A SEPARACIÓN MATERNAL

ABATIMIENTO DE LA MICROBIOTA

Para evaluar que la microbiota fue abatida cuantificamos el gen de ADN ribosomal (ADNr) 16s de bacterias en el ciego como una medida indirecta del contenido de bacterias totales en cada tratamiento. La SM no modifica el número de unidades formadoras de colonia en el ciego, a diferencia del tratamiento con antibióticos, el

cual causa una disminución del 99.97% en el número de unidades formadoras de colonia. El análisis estadístico no mostró efecto significativo de la SM, pero si del tratamiento con antibióticos sobre el número de unidades formadoras de colonias estimadas mediante la cuantificación de ADN 16s de bacterias ($F_{1,19}$: 276.13, $p \leq 0.0001$), al igual que en su interacción ($F_{1,19}$: 5.67143 $p \leq 0.03$). Las comparaciones múltiples mostraron una disminución significativa del número de unidades formadoras de colonias tanto del grupo CONT+AB como el grupo SM+AB ($p < 0.01$, Fig.8).

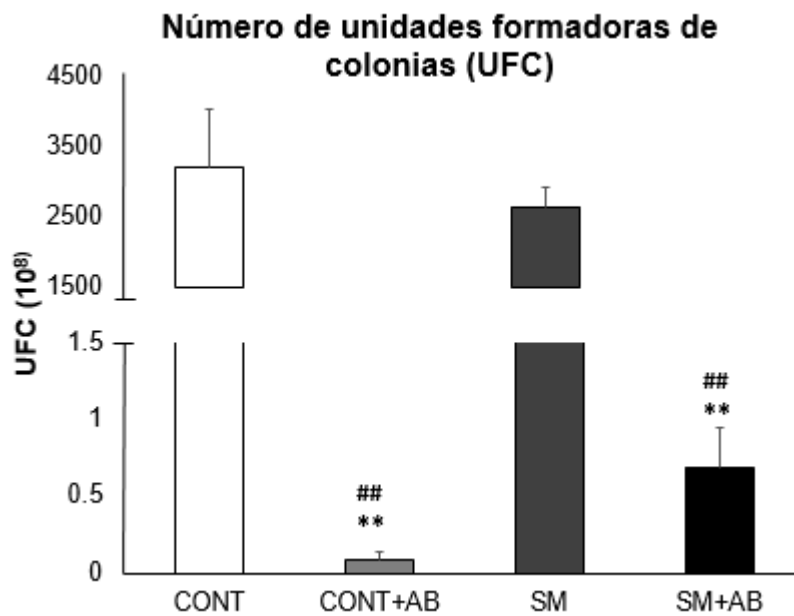


Fig. 8: El tratamiento con antibióticos causó una disminución en el número de unidades formadoras de colonias (UFC) estimadas a partir de ADN 16s de bacterias en el ciego. Animales control (CONT) o sometidos a abatimiento de microbiota (CONT+AB), separación maternal (SM) o sometidos a abatimiento de microbiota (SM+AB). (Prom ± EST, ANOVA, ** $p \leq 0.01$ vs CONT y ## $p \leq 0.01$ vs SM. $n = 5$)

EL ABATIMIENTO DE LA MICROBIOTA TIENE EFECTOS SIMILARES A LA SM SOBRE LA CONDUCTA TIPO DEPRESIVA

Para evaluar la conducta tipo depresiva se realizó la prueba de nado forzado. La SM disminuye el tiempo de escalamiento y aumenta el tiempo de inmovilidad. Por su parte, el abatimiento de la microbiota causó un efecto similar a los observados por la SM. El análisis estadístico mostró un efecto significativo de la SM sobre el tiempo de inmovilidad ($F_{1,27}$: 10, $p \leq 0.004$), mientras que observamos un efecto significativo del abatimiento de la microbiota sobre el tiempo de escalamiento ($F_{1,27}$: 11.4, $p \leq 0.002$). No observamos efecto significativo de la interacción. Las comparaciones múltiples mostraron que de forma similar a los observado en los animales de 4 meses de edad, la SM causó una disminución en el tiempo de escalamiento ($p \leq 0.05$), así como un aumento en el tiempo de inmovilidad ($p \leq 0.01$). Adicionalmente observamos que las ratas sometidas a abatimiento presentan una disminución en el tiempo de escalamiento ($p \leq 0.01$) y mayor tiempo de inmovilidad ($p \leq 0.05$) comparado con el grupo CONT (Fig. 9).

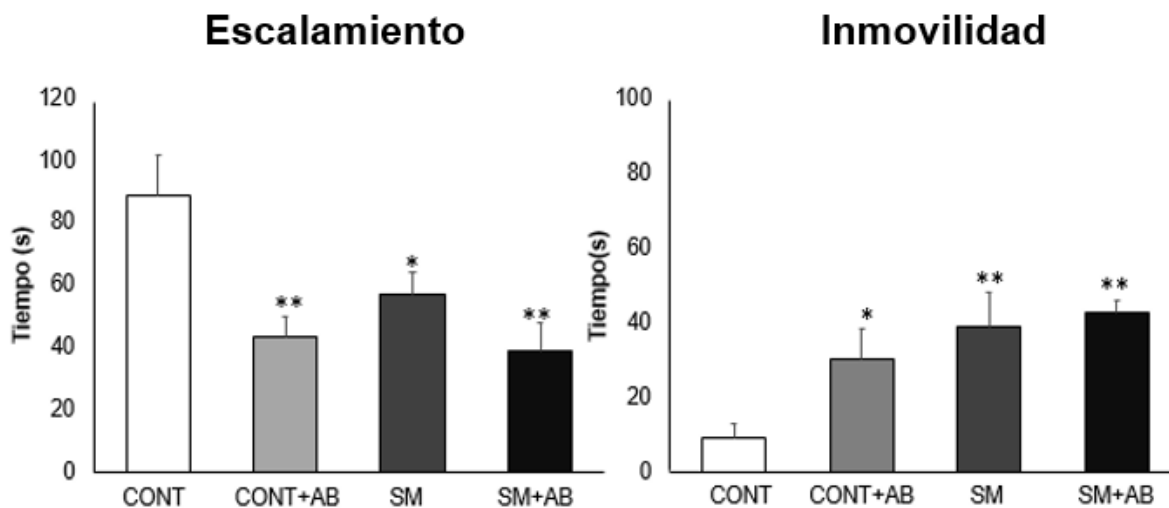


Fig. 9: El abatimiento de la microbiota causa una conducta tipo depresiva en la prueba de nado forzado. Animales control (CONT) o sometidos a abatimiento de microbiota (CONT+AB), separación maternal (SM) o sometidos a abatimiento de microbiota (SM+AB). (Prom \pm EST, ANOVA, * $p \leq 0.05$ vs CONT y ** $p \leq 0.01$ vs CONT. $n=7$.)

EL ABATIMIENTO DE LA MICROBIOTA NO AFECTA LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA

En la evaluación de los parámetros metabólicos, la curva de tolerancia a la glucosa no mostró alteraciones en las ratas sometidas a abatimiento de la microbiota. El análisis estadístico mostró un efecto significativo de la administración de glucosa intra-peritoneal ($F_{1,83}$: 209.2, $p \leq 0.0001$), pero no de la SM o el abatimiento de la microbiota. Sin embargo, la SM presenta un efecto significativo en las concentraciones de glucosa en ayuno en la ANOVA ($F_{1,27}$: 5.2, $p \leq 0.03$). Las comparaciones múltiples mostraron que únicamente los animales SM presentan un aumento en la concentración de glucosa en ayuno al comparar con el grupo CONT (Fig. 10).

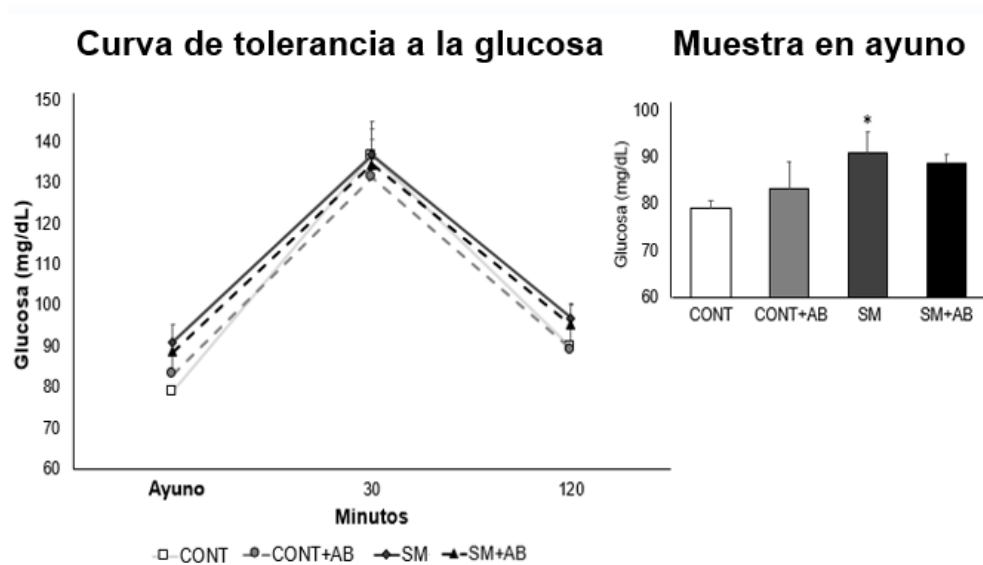


Fig.10: El abatimiento de la microbiota no causa alteraciones en la homeostasis de la glucosa. Animales control (CONT) o sometidos a abatimiento de microbiota (CONT+AB), separación maternal (SM) o sometidos a abatimiento de microbiota (SM+AB). ($Prom \pm EST$, ANOVA, $*p \leq 0.05$ vs CONT. $n=7$.)

EL ABATIMIENTO DE LA MICROBIOTA CAUSA UN AUMENTO EN EL NIVEL DE LA CORTICOSTERONA SIMILAR AL DE LA SM

Otro de los parámetros metabólicos evaluados fue la concentración de corticosterona en plasma. En el análisis estadístico la SM mostró un efecto significativo ($F_{1,27}:10.04$, $p \leq 0.0041$). Sin embargo, el tratamiento con antibióticos o la interacción no presentó efecto. Las comparaciones múltiples mostraron un aumento significativo en los niveles de corticosterona del grupo CONT+AB ($p \leq 0.05$) al igual que los grupos SM y SM+AB ($p \leq 0.01$) con respecto a los animales CONT (Fig. 11).

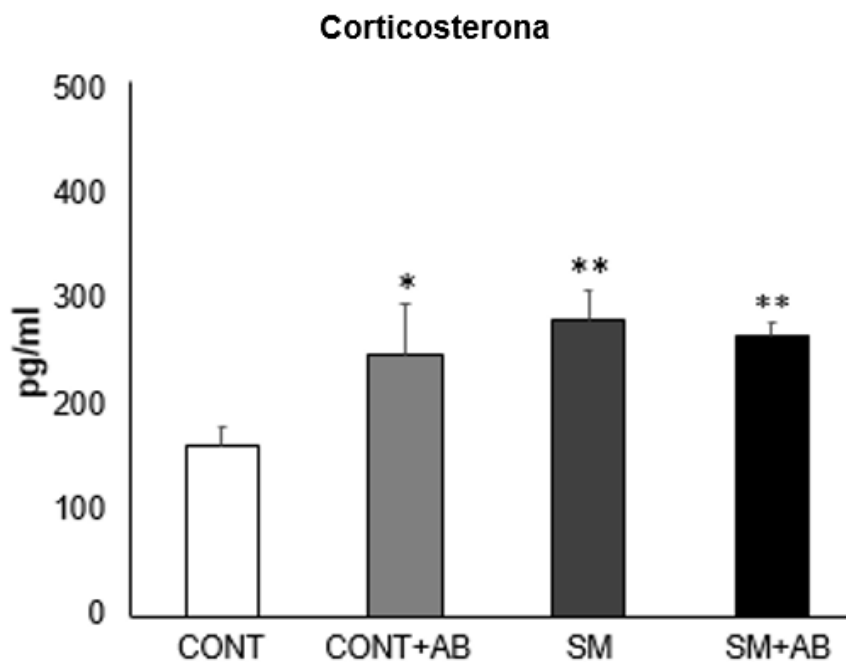


Fig. 11: El abatimiento de la microbiota causa un aumento en los niveles de corticosterona similar al causado por la SM. Concentraciones de corticosterona en sangre de animales control (CONT) o sometidos a abatimiento de microbiota (CONT+AB), separación maternal (SM) o sometidos a abatimiento de microbiota (SM+AB). (Prom \pm EST, ANOVA, * $p \leq 0.05$ vs CONT y ** $p \leq 0.01$ vs CONT. $n = 7$)

EL ABATIMIENTO DE MICROBIOTA NO AFECTA EL PESO CORPORAL, PERO AUMENTA EL PESO DEL CIEGO

Al analizar el peso corporal al sacrificio no observamos un efecto significativo de la SM, ni de el abatimiento de microbiota sobre el peso corporal. Sin embargo, el efecto de la SM prevalece únicamente al realizar una comparación simple (t de Student $p \leq 0.05$). Observamos que las ratas sometidas a abatimiento presentan un aumento en el peso del ciego ($F_{1,21}: 59.6, p \leq 0.001$, Fig. 12).

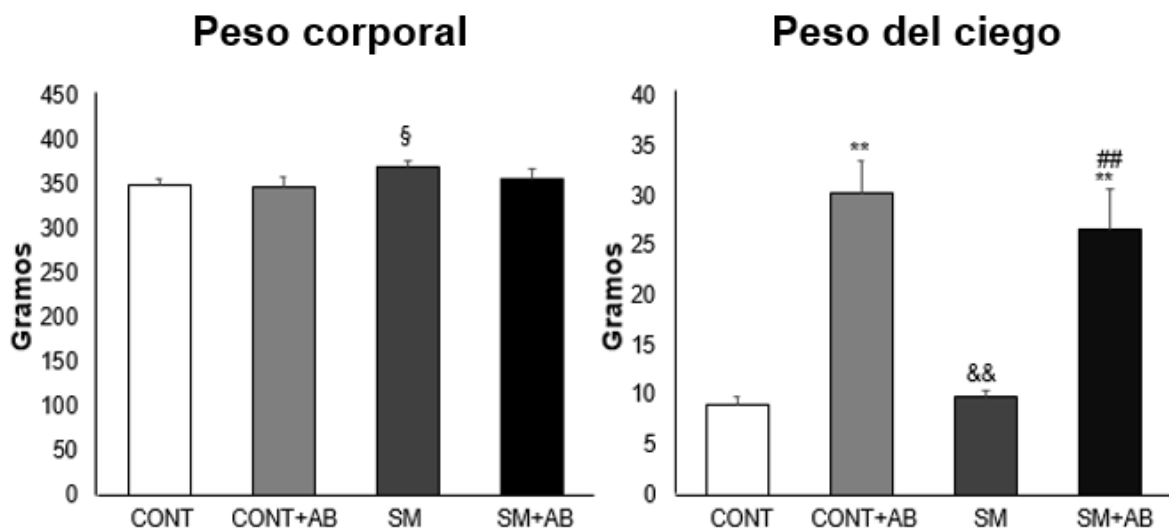
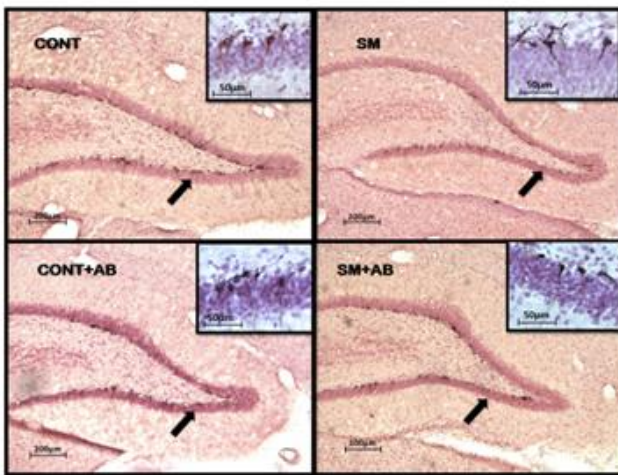


Fig. 12: El abatimiento de la microbiota no causa alteraciones en el peso corporal, pero si en el peso del ciego. Animales control (CONT) o sometidos a abatimiento de microbiota (CONT+AB), separación maternal (SM) o sometidos a abatimiento de microbiota (SM+AB). (Prom \pm EST, ANOVA, ** $p \leq 0.01$ vs CONT, && $p \leq 0.01$ vs CONT+AB, ## $p \leq 0.01$ vs SM, t de Student: § $p \leq 0.05$ vs CONT. $n=7$)

EL ABATIMIENTO DE MICROBIOTA INTESTINAL Y LA SM DISMINUYEN LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL

Para la evaluación de la neurogénesis hipocampal se realizaron inmunotinciones contra DCX. El análisis estadístico mostró un efecto significativo de la SM ($F_{1,23}$: 10.97, $p \leq 0.003$), y la interacción ($F_{1,23}$: 4.05, $p \leq 0.05$), pero no del abatimiento de la microbiota sobre el número de células DCX+ en el GD del hipocampo; las comparaciones múltiples mostraron que tanto los animales SM, SM+AB ($p \leq 0.01$) y los animales CONT+AB ($p \leq 0.05$), presentan una disminución en el número de células DCX+ (Fig. 13). No observamos diferencias significativas en el volumen del GD o la densidad de células DCX+.

Imágenes representativas de inmunotinciones contra DCX



Células DCX+

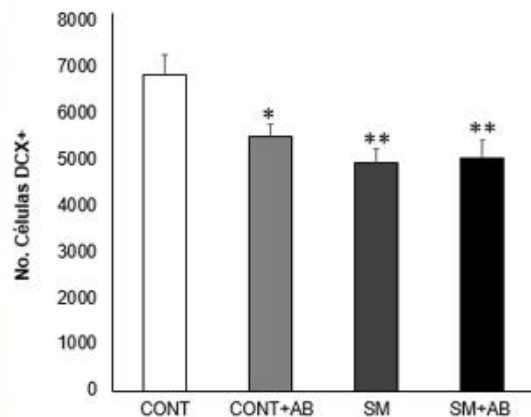


Fig.13: El abatimiento de la microbiota y la SM disminuyen la neurogénesis hipocampal. Animales control (CONT) o sometidos a abatimiento de microbiota (CONT+AB), separación maternal (SM) o sometidos a abatimiento de microbiota (SM+AB). (*Prom ± EST*, ANOVA, * $p \leq 0.05$ vs CONT, ** $p \leq 0.01$ vs CONT. $n=6$.)

LA SM CAUSA DISBIOSIS INTESTINAL

En condiciones estándar los animales control muestran una mayor abundancia relativa de *Lactobacillus* spp (40% aprox.), seguida de *C. coccoides* (30% aprox.) y en menor medida *B. fragilis* y *C. leptum* (10% y 18% aprox., respectivamente). La abundancia relativa de Enterobacterias fue menor al 1%. No obstante, observamos que este mismo grupo de bacterias se vuelve predominante en los animales tratados con antibióticos (97-99%). Por otra parte, observamos que en los animales SM hay una proporción similar de *C. coccoides* y *Lactobacillus* spp (36% aprox.), seguida por *C. leptum* (25% aprox.), mientras que la abundancia relativa de *B. fragilis* y Enterobacterias fue menor al 1%.

El análisis estadístico de la microbiota intestinal (Fig. 14) mostró un efecto del tratamiento con antibióticos sobre la abundancia relativa de *C. coccoides* ($F_{1,19}$: 129.12, $p \leq 0.0001$), Enterobacterias ($F_{1,19}$: 39687.54, $p \leq 0.0001$), *B. fragilis* ($F_{1,19}$: 19.78, $p \leq 0.0004$) *C. leptum*, ($F_{1,19}$: 146.13, $p \leq 0.0001$) y *Lactobacillus* spp ($F_{1,19}$: 213.62, $p \leq 0.0001$). Las comparaciones múltiples mostraron una disminución significativa de microbiota ($p \leq 0.01$) al comparar los grupos de abatimiento (SM + AB y CONT+ AB) con los grupos control (SM y CONT). Las ANOVAs mostraron que existe un efecto significativo de la SM sobre la abundancia relativa de las Enterobacterias ($F_{1,19}$: 4.48, $p \leq 0.05$) y *B. fragilis* ($F_{1,19}$: 13.54, $p \leq 0.002$). Al realizar las comparaciones múltiples observamos que la SM causó una disminución de *B. fragilis* ($p \leq 0.01$) al comparar con el grupo CONT. No observamos efecto de la SM sobre la abundancia relativa de *C. coccoides*, *C. leptum*, ni *Lactobacillus* spp. Adicionalmente el análisis estadístico mostró que existe una interacción significativa entre el abatimiento y la SM sobre la abundancia relativa de las Enterobacterias ($F_{1,19}$: 5.79, $p \leq 0.02$), *B. fragilis* ($F_{1,19}$: 13.41, $p \leq 0.002$), y *C. leptum*, ($F_{1,19}$: 4.52, $p \leq 0.04$).

Porcentaje de abundancia relativa en muestras de ciego

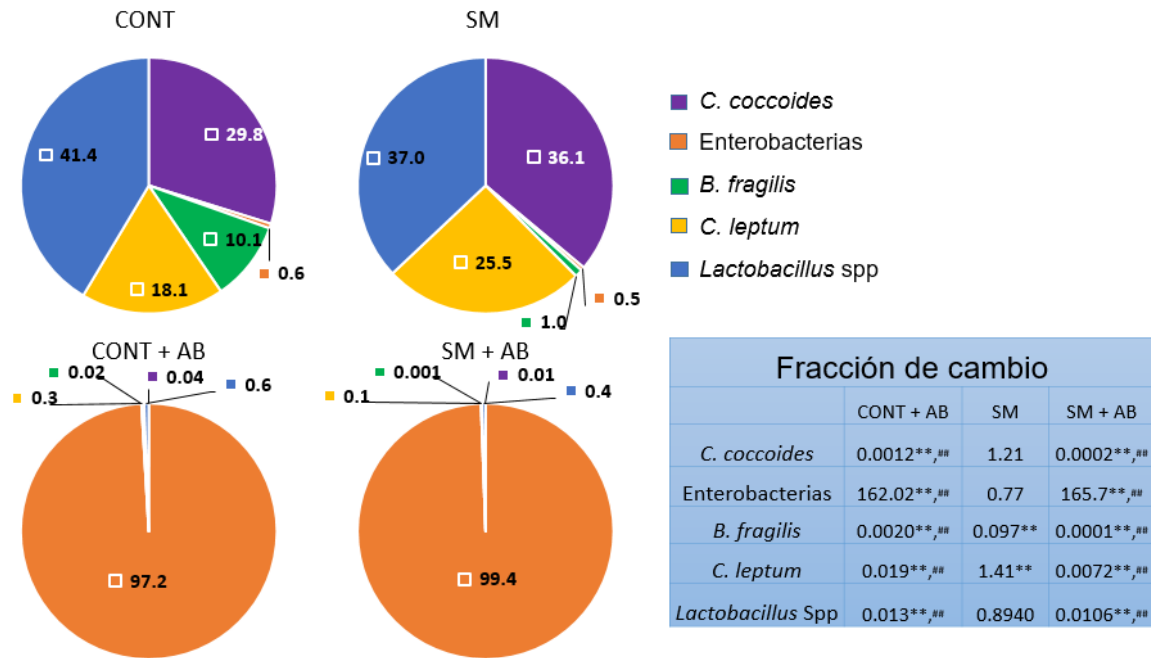


Fig. 14: abundancia relativa (%) de microbiota en muestras de ciego. Animales control (CONT) o sometidos a abatimiento de microbiota (CONT+AB), separación maternal (SM) o sometidos a abatimiento de microbiota (SM+AB). (Prom ± EST, ANOVA, ^{**}p ≤ 0.01 vs CONT+STD, ^{##}p ≤ 0.01 vs SM+STD, &&p ≤ 0.01 vs CONT+AB. n=5.)

EFFECTOS DE LA RECOLONIZACIÓN BACTERIANA EN ANIMALES CONTROL Y SEPARACIÓN MATERNAL SOMETIDOS A ABATIMIENTO DE LA MICROBIOTA

LA RECOLONIZACION RESTAURA LOS EFECTOS DE EL ABATIMIENTO DE LA MICROBIOTA

Para evaluar que la recolonización se llevó a cabo, cuantificamos el gen de ADN ribosomal (ADNr) 16s de bacterias en el ciego como una medida indirecta del contenido de bacterias totales en cada tratamiento. El análisis estadístico no mostró efecto significativo sobre el número de unidades formadoras de colonias (UFC) estimadas a partir de ADN16s de bacterias en el ciego (Fig. 15).

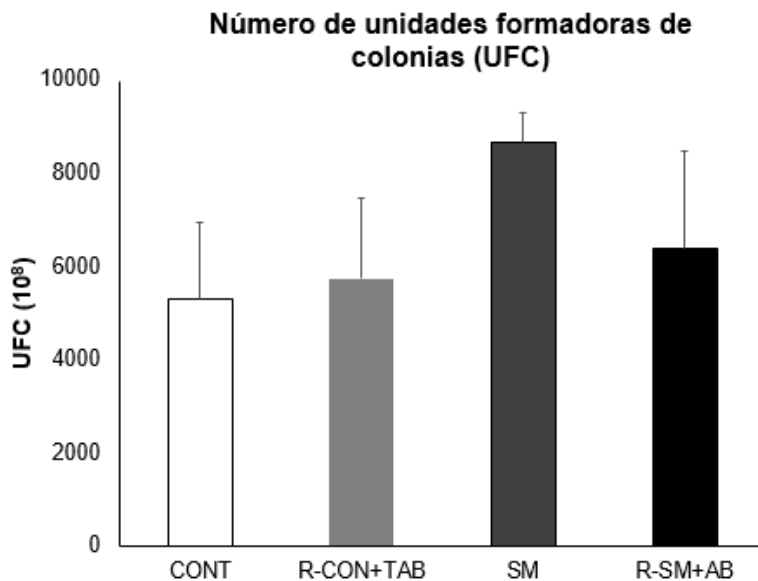


Fig. 15: la recolonización restaura los efectos del abatimiento de la microbiota. Número de unidades formadoras de colonias (UFC) estimadas a partir de ADN16s de bacterias en el ciego de animales control (CONT) o recolonizados (R-CONT+AB), separación maternal (SM) o recolonizados (R-SM+AB). (Prom \pm EST, ANOVA. n= 5.)

LA RECOLONIZACIÓN CON MICROBIOTA DE ANIMALES CONTROL REVIERTE LOS EFECTOS DE LA SM SOBRE LA CONDUCTA TIPO DEPRESIVA

En la prueba de nado forzado, la cual evalúa la conducta tipo depresiva, el análisis estadístico no mostró efecto significativo de la SM o la recolonización sobre el tiempo de escalamiento, pero si en la interacción ($F_{1,29}$: 17.5, $p \leq 0.003$). En el tiempo de inmovilidad, observamos efecto de la SM ($F_{1,29}$: 5.5, $p \leq 0.02$) y de la interacción ($F_{1,29}$: 4.9, $p \leq 0.03$) pero no de la recolonización. Las comparaciones múltiples mostraron que la SM provoca una disminución en el tiempo de escalamiento ($p \leq 0.01$) y un aumento en el tiempo de inmovilidad ($p \leq 0.01$). La recolonización de animales control con microbiota procedente de animales SM disminuye el tiempo de escalamiento ($p \leq 0.01$), pero no se observa efecto en el tiempo de inmovilidad. Los animales SM recolonizados con microbiota de animales control no muestran diferencias significativas respecto al grupo control, pero al comparar con la SM observamos un aumento en el tiempo de escalamiento ($p \leq 0.05$) y una disminución en el tiempo de inmovilidad ($p \leq 0.05$, Fig. 16).

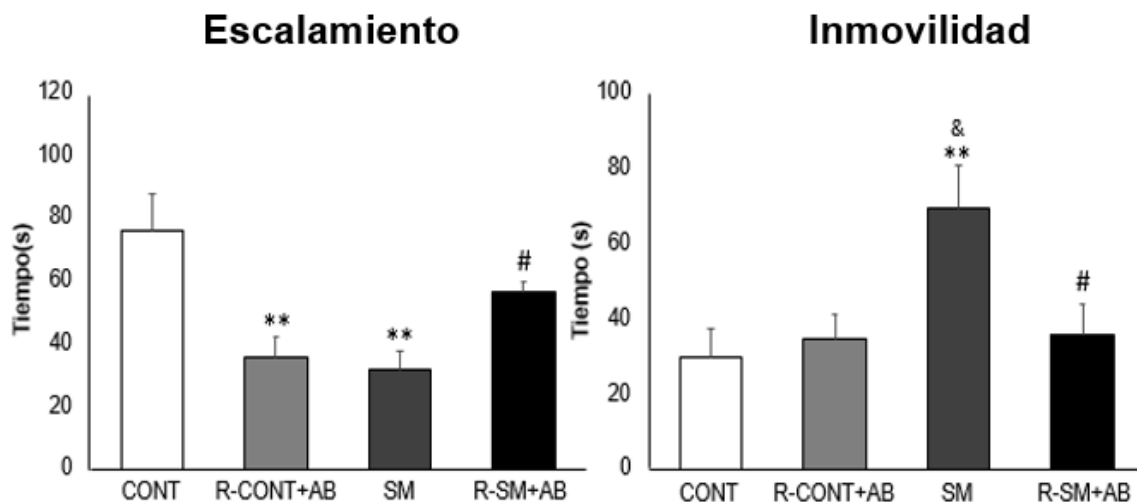


Fig. 16: la recolonización con microbiota de animales control revierte los efectos de la SM en la prueba de nado forzado. Animales control (CONT) o recolonizados (R-CONT+AB), separación maternal (SM) o recolonizados (R-SM+AB). (Prom \pm EST, ANOVA, * $p \leq 0.05$ y ** $p \leq 0.01$ vs CONT, & $p \leq 0.05$ vs R-CONT+AB, # $p \leq 0.05$ vs SM. CONT y R-SM+AB $n=8$, SM y R-CONT+AB $n = 7$.)

LA RECOLONIZACIÓN CON MICROBIOTA DE ANIMALES CONTROL REVIERTE LOS EFECTOS DE LA SM SOBRE LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA

El análisis estadístico de la curva de tolerancia a la glucosa, uno de los parámetros metabólicos evaluados, no mostró efecto de la SM ni de la recolonización, pero sí de su interacción ($f_{1,92}$: 4.9, $p \leq 0.03$) y también en la administración de glucosa intra-peritoneal ($f_{1,92}$: 84.4, $p \leq 0.0001$). Al analizar las concentraciones de glucosa en ayuno en la ANOVA no observamos efecto significativo de la SM, ni de la recolonización, pero sí de su interacción ($f_{1,29}$: 12.1, $p \leq 0.001$). Las comparaciones múltiples mostraron que la SM causó un aumento en los niveles de glucosa en ayuno ($p \leq 0.05$). Los animales SM recolonizados con microbiota de animales control no mostraron diferencias significativas respecto al grupo control mantenido en condiciones estándar. Sin embargo, al comprar con la SM estándar observamos una disminución de los niveles de glucosa en ayuno ($p \leq 0.01$). En cuanto a los controles recolonizados con microbiota de animales SM no observamos efecto (Fig.17).

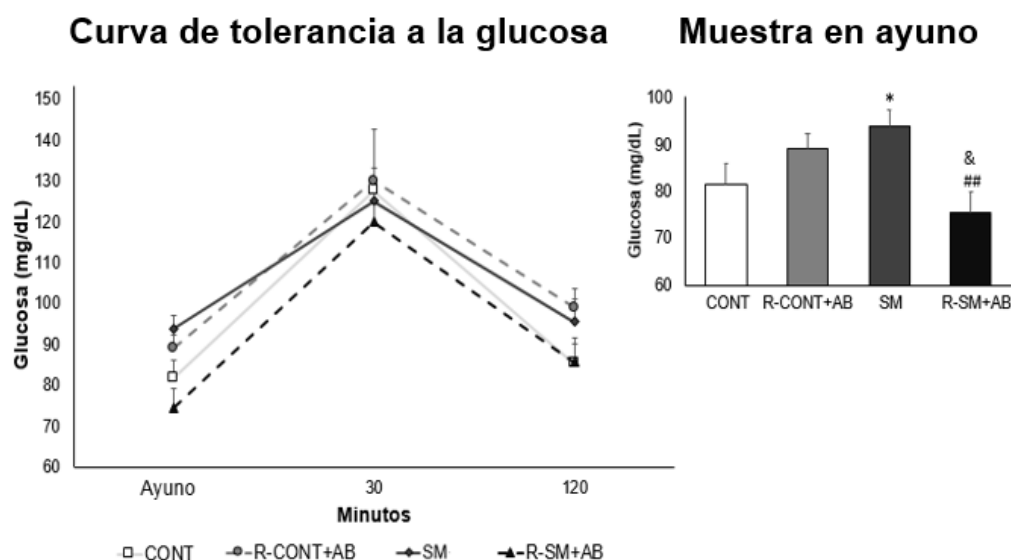


Fig.17: la recolonización microbiana revierte los efectos sobre la homeostasis de la glucosa causados por la SM. Animales Control (CONT) o recolonizados (R-CONT+AB), separación maternal (SM) o recolonizados (R-SM+AB). (Prom \pm EST, ANOVA, * $p \leq 0.05$ vs CONT, ## $p \leq 0.05$ vs SM, & $p \leq 0.05$ vs CONT+AB. CONT y R-SM+AB $n=8$. SM y R-CONT+AB $n = 7$.)

LA RECOLONIZACIÓN CON MICROBIOTA CONTROL ATENÚA EL EFECTO DE LA SM SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE CORTICOSTERONA

El análisis estadístico de las concentraciones de corticosterona en plasma no mostró un efecto significativo de la recolonización, pero sí de la SM ($F_{1,28}$: 6.52, $p \leq 0.017$) y su interacción ($F_{1,28}$: 6.35, $p \leq 0.018$); las comparaciones múltiples mostraron una diferencia significativa del grupo SM ($p \leq 0.01$) (Fig.18).

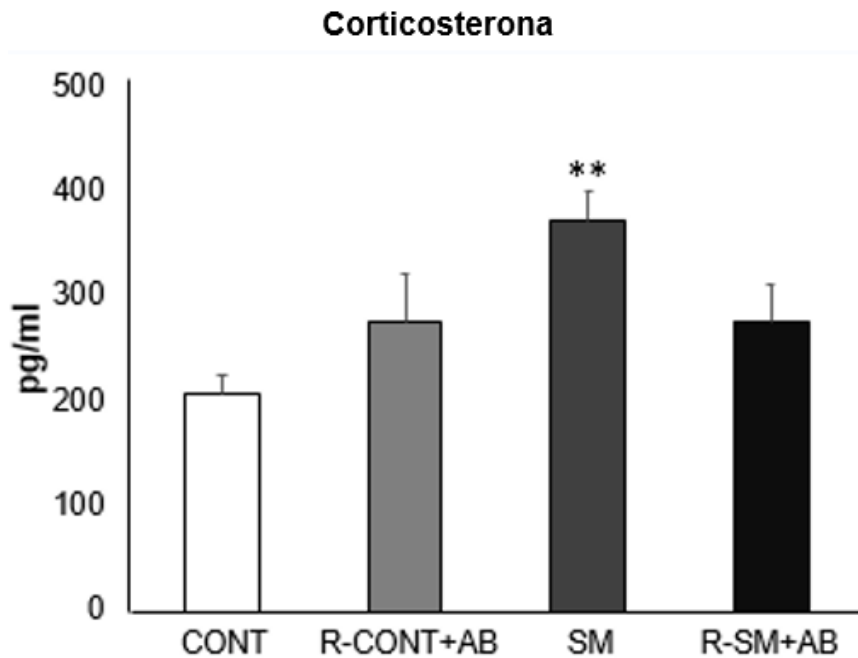


Fig. 18: la recolonización con microbiota control a ratas estresadas atenúa los efectos de la SM sobre la corticosterona. Animales control (CONT) o recolonizados (R-CONT+AB), separación maternal (SM) o recolonizados (R-SM+AB). (Prom \pm EST, ANOVA, ** $p \leq 0.01$ vs CONT. CONT y R-SM+AB $n=8$, SM y R-CONT+AB. $n = 7$.)

LA RECOLONIZACIÓN CON MICROBIOTA DE ANIMALES CONTROL NO TIENE LOS EFECTOS SOBRE EL PESO CORPORAL, PERO SI SOBRE EL PESO DEL CIEGO

El análisis estadístico del peso no mostró efecto significativo de la SM ni de la recolonización, pero si en la interacción ($F_{1,29}$: 4.9, $p \leq 0.03$). En cuanto al análisis estadístico del peso de los ciegos no observamos ningún efecto significativo. Las comparaciones múltiples mostraron que, de forma similar a lo observado en los animales mantenidos en condiciones estándar, la SM causa un aumento significativo en el peso corporal ($p \leq 0.05$). En cuanto a recolonización de la SM no se observó efecto al comparar con los controles ni con la SM estándar (Fig. 19).

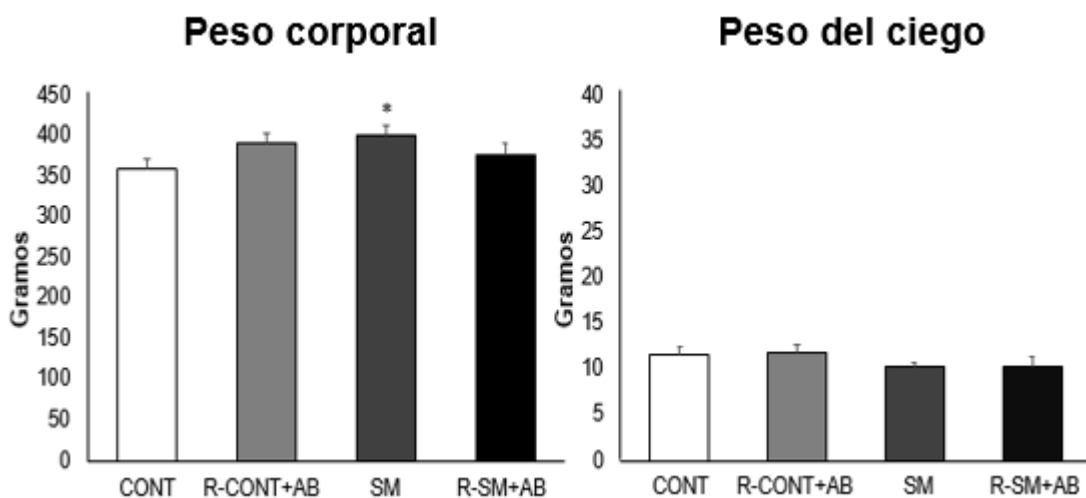
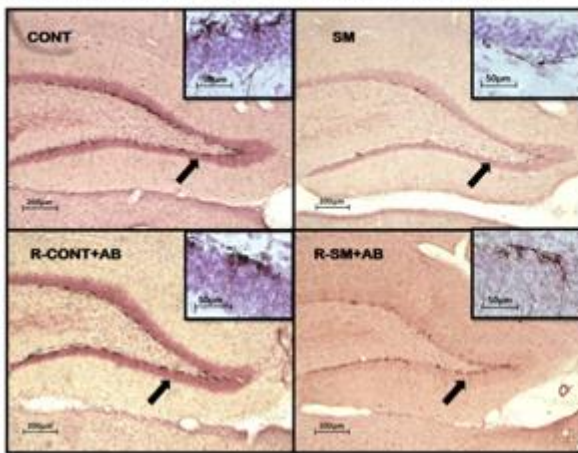


Fig.19: la recolonización microbiana restaura las alteraciones en el peso causadas por la SM y revierte el efecto en el peso del ciego causado por el abatimiento de la microbiota. a) peso corporal y b) peso del ciego de animales control (CONT) o recolonizados (R-CONT+AB), separación materna (SM) o recolonizados (R-SM+AB). (Prom \pm EST, ANOVA. CONT y R-SM+AB $n=8$, R-CONT+AB y SM $n=7$)

LA RECOLONIZACIÓN CON MICROBIOTA DE ANIMALES CONTROL ATENÚA LOS EFECTOS DE LA SM SOBRE LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL.

En la evaluación de la neurogénesis hipocampal el análisis estadístico no mostró efecto de la SM o la recolonización sobre el número de células DCX+ en el GD del hipocampo, pero sí de su interacción ($F_{1,23}:7.01$, $p \leq 0.015$); las comparaciones múltiples muestran una disminución significativa de células DCX+ en los grupos R-CONT+AB y SM ($p \leq 0.01$) (Fig. 20).

Imágenes representativas de inmunotinciones contra DCX



Células DCX+

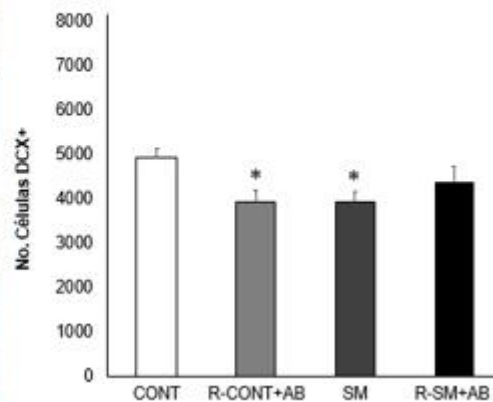


Fig. 20: la recolonización microbiana atenúa los efectos de la SM sobre la neurogénesis hipocampal. Animales control (CONT) o recolonizados (R-CONT+AB), separación maternal (SM) o recolonizados (R-SM+AB). (Prom \pm EST, ANOVA, * $p \leq 0.05$ vs CONT. $n = 6$).

LA RECOLONIZACIÓN CON MICROBIOTA DE ANIMALES CONTROL CAUSA UN PERFIL MICROBIANO DISTINTO

En condiciones estándar los animales control muestran una mayor abundancia relativa de *C. coccoides* (45% aprox.), seguida de *Lactobacillus* spp (34% aprox.) y en menor medida *B. fragilis* y *C. leptum* (6% y 14% aprox., respectivamente). La abundancia relativa de Enterobacterias fue menor al 1%. Observamos que las ratas control recolonizadas con microbiota proveniente de ratas SM muestran una mayor abundancia relativa de *C. leptum* (42% aprox.) seguida por Enterobacterias y *Lactobacillus* spp (24% y 22% aprox.) y en menor medida *C. coccoides* y *B. fragilis* (8% y 4%). Por otro lado, las ratas SM recolonizadas con microbiota procedente animales controles, muestran una abundancia relativa similar (Enterobacterias 22%, *Lactobacillus* spp 21%, *B. fragilis* 20%, *C. leptum* 19% y *C. coccoides* 18% aprox.). Los animales SM muestran una mayor abundancia relativa de *C. leptum* (32% aprox.) seguida por Enterobacterias y *C. coccoides* (23% y 22% aprox.) y en menor cantidad *B. fragilis* y *Lactobacillus* spp (16% y 7% aprox.).

El análisis estadístico de la microbiota (Fig. 21) mostró un efecto significativo de la SM ($F_{1,19}$: 6.64, $p \leq 0.02$), de la recolonización ($F_{1,19}$: 58.48, $p \leq 0.0001$) y su interacción ($F_{1,19}$: 37.46, $p \leq 0.0001$) sobre *C. coccoides*. El análisis estadístico de las Enterobacterias mostró un efecto significativo de la SM ($F_{1,19}$: 16.74, $p \leq 0.0009$), de la recolonización ($F_{1,19}$: 17.69, $p \leq 0.0007$) y de la interacción ($F_{1,19}$: 23.02, $p \leq 0.0002$). En cuanto a *B. fragilis* el análisis estadístico mostró un efecto significativo de la SM ($F_{1,19}$: 90.01, $p \leq 0.0001$) y por la interacción ($F_{1,19}$: 5.24, $p \leq 0.03$), pero no por la recolonización. El análisis estadístico de *C. leptum* no mostró efecto significativo de la SM, pero sí de la recolonización ($F_{1,19}$: 12.76, $p \leq 0.0025$) y de la interacción ($F_{1,19}$: 79.002, $p \leq 0.0001$). Observamos un efecto significativo de la SM ($F_{1,19}$: 29.73, $p \leq 0.0001$) y de la interacción ($F_{1,19}$: 25.49, $p \leq 0.0001$), pero no de la recolonización en el análisis estadístico de *Lactobacillus* spp.

Porcentaje de abundancia relativa en muestras de ciego

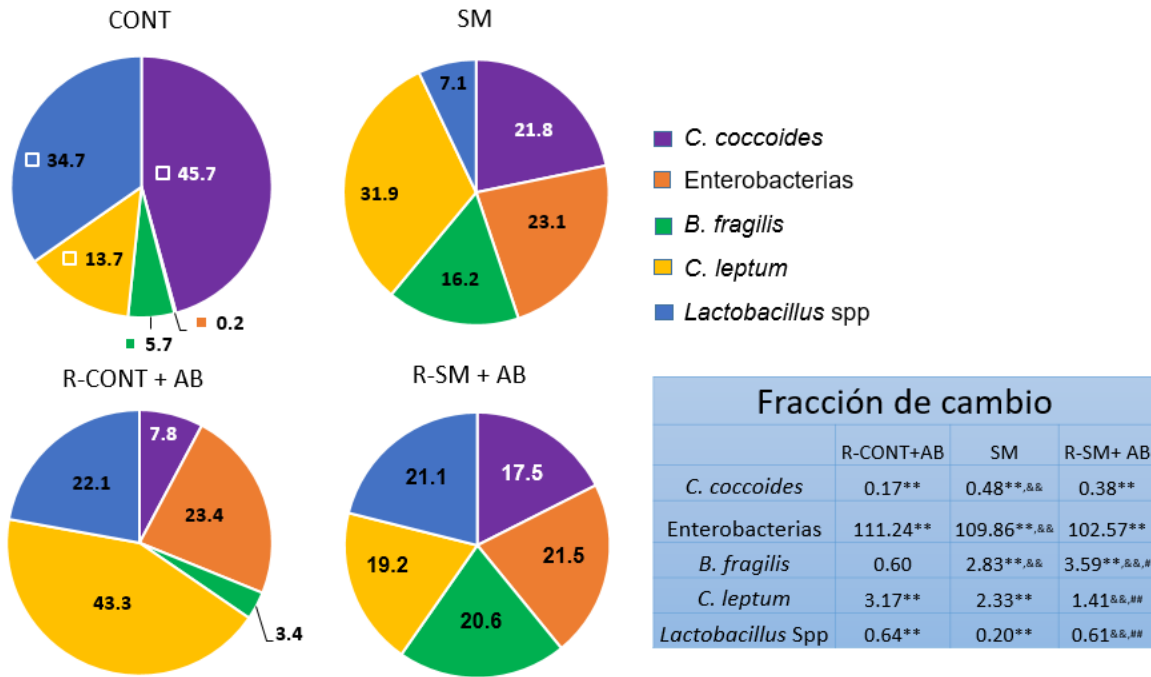


Fig. 21: abundancia relativa (%) de microbiota en muestras de ciego. Animales control (CONT) o con abatimiento de microbiota y recolonizados con microbiota de animales SM (R-CONT+AB), separación maternal (SM) o con abatimiento de microbiota y recolonizados con microbiota de animales control (R-SM+AB). Prom \pm EST, ANOVA, ** $p \leq 0.01$ vs CONT, # $p \leq 0.05$ vs SM, ## $p \leq 0.01$ vs SM, && $p \leq 0.01$ vs R-CONT+AB. n=5.

X. DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran que la SM causa un aumento en la conducta tipo depresiva y alteraciones metabólicas que se asocian con una disminución de la neurogénesis hipocampal y disbiosis intestinal. Adicionalmente observamos que el abatimiento de la microbiota, causa alteraciones similares a las causadas por la SM y que este efecto no se exagera cuando los animales tienen una historia previa de estrés. En el presente trabajo, demostramos por primera vez que la recolonización de animales sometidos a SM con microbiota procedente de animales controles, revierte los efectos de la SM sobre la conducta tipo depresiva, las concentraciones de glucosa en ayuno, el peso del ciego y atenúa los efectos sobre los niveles de corticosterona, el peso corporal, la neurogénesis hipocampal y la disbiosis intestinal. Por otra parte, observamos que los animales control que fueron recolonizados con microbiota procedente de animales sometidos a SM muestran una disminución en la neurogénesis hipocampal, pero no presentan otras alteraciones.

El esquema de antibióticos utilizado logró el abatimiento de la microbiota. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con antibióticos causa una reducción del 99.97% en el contenido de microbiota del ciego, lo cual concuerda con lo ya reportado (Rakoff-Nahoum et al. 2004; Ekmekciú et al. 2017; Heimesaat et al. 2018). La administración del coctel de antibióticos no causó daños a la salud de las ratas, estas fueron monitoreadas y no observamos pérdida de peso, cambios en el pelaje ni alteraciones en la defecación (diarrea o estreñimiento). La cohabitación entre las ratas a las cuales se les abatió la microbiota y las ratas donadoras, es un método eficaz y no invasivo para lograr la transferencia de microbiota (recolonización), la cual se da través del contacto corporal pero principalmente por la coprofagia. Algunos grupos de investigación han demostrado que la transferencia de microbiota peroral, es un buen método de recolonización después de que las ratas han sido sometidas a un régimen de antibióticos

(Ekmekciu et al. 2017; Heimesaat et al. 2018). De forma similar, nuestros resultados muestran que 4 semanas de cohabitación logran la transferencia de microbiota. No observamos diferencias significativas en la estimación del número de unidades formadoras de colonias entre los grupos tratados con antibióticos y los controles. Sin embargo, dado que la cohabitación no revierte completamente los efectos del estrés y los animales recolonizados muestran un perfil de abundancia relativa diferente al de los animales control, no es posible descartar que el tiempo de cohabitación no sea lo suficientemente largo como para restaurar el balance en la microbiota o que al haber alterado la microbiota original, la recolonización lleve a un nuevo estado estable en cuanto a la diversidad de la microbiota.

La prueba más utilizada para evaluar la conducta tipo depresiva en ratas, es la prueba de nado forzado, ya que esta prueba está muy estandarizada y los resultados se han logrado replicar por muchos grupos de investigación (Genty et al. 2018; Lajud et al. 2012; Miragaia et al. 2018). De acuerdo a lo previamente reportado por nuestro equipo de trabajo (Vargas et al. 2016). Observamos que las ratas SM presentan un menor tiempo de escalamiento y un mayor tiempo de inmovilidad, lo que se interpreta como una conducta tipo depresiva. Observamos que el abatimiento de la microbiota causó un efecto similar al causado por la SM. Las ratas tratadas con antibióticos presentan una conducta pasiva en la prueba de nado forzado, esto puede deberse a que el abatimiento de la microbiota causa una des-regulación de algunos neurotransmisores importantes en la modulación de la conducta. Por ejemplo, se ha observado que algunas especies de *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Saccharomyces* y otras bacterias están involucradas en la producción de neurotransmisores como serotonina, dopamina y norepinefrina. Estos son fundamentales en la regulación de la conducta a través de la estimulación de las neuronas aferentes del sistema nervioso entérico, las cuales envían señales al cerebro a través del nervio vago (Evrensel and Ceylan 2015; Galland 2014). También se sabe que la microbiota regula la disponibilidad de triptófano y por ende la producción de serotonina a nivel del SNC (O'Mahony et

al. 2014). Por otra parte, la recolonización con microbiota procedente de animales sometidos a SM causa una conducta tipo depresiva, lo cual concuerda con lo ya reportado. Se ha que que la transferencia de microbiota de pacientes humanos deprimidos a ratas, mediante trasplante fecal causa la aparición de características propias de la depresión (Kelly et al. 2016). Adicionalmente, observamos que la recolonización con microbiota proveniente de donadores control revierte los efectos de la SM sobre la conducta tipo depresiva. Los animales SM recolonizados muestran un mayor tiempo de escalamiento y un menor tiempo de inmovilidad al comparar con el grupo SM.

Se sabe que el estrés temprano como lo es la SM aumenta la vulnerabilidad a padecer alteraciones metabólicas. Se ha reportado que las ratas sometidas a SM presentan alteraciones en los niveles de corticosterona, glucosa, peso corporal, triglicéridos y en la expresión de algunos genes relacionados con el metabolismo (Maghami et al. 2018; Maniam and Morris 2010; Shreya et al. 2016). Recientemente, nuestro grupo de investigación reportó que el estrés en etapas tempranas de la vida, causa una des-regulación de los niveles de glucosa, corticosterona, insulina, el índice QUICKI, triglicéridos, colesterol y aumento del peso corporal en ratas de 2 meses de edad (Vargas et al. 2016). Esto concuerda con nuestros resultados, donde observamos una des-regulación de los mismos parámetros metabólicos en ratas de 4 meses de edad (resultados ya publicados (Ruiz et al. 2018)). Para la evaluación de los efectos del abatimiento y recolonización, se consideró evaluar los niveles de corticosterona, glucosa y el peso corporal, debido a que son los parámetros más representativos. Nuestros resultados muestran que el abatimiento de microbiota, no afecta los niveles de glucosa ni el peso corporal, sin embargo, causa un aumento en los niveles de corticosterona, similar a lo observado en los animales libres de gérmenes, donde se reporta un aumento en los niveles de corticosterona en plasma (Neufeld et al. 2011). Recientemente se observó que el tratamiento con un esquema de antibióticos (ampicilina y cefoperazona), no causó la elevación en los niveles de

corticosterona en roedores (Ceylani et al. 2018), lo cual apoya la idea de que la microbiota puede ser un modulador de esta hormona. Sin embargo, no podemos descartar el efecto de los antibióticos, debido a que el esquema usado en este proyecto es parcialmente diferente. En cuanto a la recolonización con microbiota proveniente de animales sometidos a SM, no observamos efectos significativos en ninguno de estos tres parámetros. La recolonización de ratas estresadas con microbiota sana causó la normalización de los niveles de corticosterona, glucosa y el peso corporal, al comparar con el grupo control, efecto similar se ha observado en diversos trabajos donde animales estresados han normalizado sus niveles de corticosterona después de un tratamiento con probióticos (*L. helveticus* y *B. longum*)(Ait-Belgnaoui et al. 2014) (*L. rhamnosus* y *L. helveticus*)(Gareau et al. 2007), al igual que, *L. plantarum* se relaciona con una reducción en el peso corporal (Million et al. 2012).

Algunos grupos de investigación han observado una disminución de la neurogénesis hipocampal causada por el estrés en etapas tempranas de la vida (Suri et al. 2013; Mirescu et al. 2004). Nuestro grupo de investigación previamente reportó que las ratas sometidas a SM muestran una disminución en la neurogénesis hipocampal en crías (Lajud et al. 2012), lo cual concuerda con nuestros resultados. Las ratas SM presentan un menor número de células DCX+ en el GD. Adicionalmente, observamos que el abatimiento de la microbiota, causa un efecto similar al de la SM sobre neurogénesis hipocampal. Esto concuerda con lo ya reportado, donde se observó una disminución de la neurogénesis hipocampal después del tratamiento con antibióticos (Möhle et al. 2016). En cuanto a nuestros grupos de recolonización observamos una disminución de la neurogénesis en las ratas control recolonizadas con microbiota de ratas SM. Sin embargo, observamos que en el grupo de ratas SM que fueron recolonizadas con microbiota proveniente de animales donadores control, la neurogénesis se normaliza al no presentar diferencias significativas al comparar con el grupo control. Sin embargo, este efecto es parcial ya que tampoco muestran diferencias significativas con respecto a los SM. Es importante mencionar que el proceso de neurogénesis es largo, por

lo cual, no es posible descartar que se necesita más tiempo de recolonización para observar un efecto robusto. Estos resultados apoyan la idea de que la microbiota puede modular la neurogénesis hipocampal. No obstante, los mecanismos aun no son bien conocidos. Uno de los mecanismos más aceptados, es que la microbiota, puede modular la expresión del BDNF cerebral a través de la estimulación del nervio vago (O'Leary et al. 2018). Dicho factor es de suma importancia ya que está implicado en la plasticidad neuronal y estimula la neurogénesis hipocampal. Existen reportes en donde animales libres de gérmenes presentan una des-regulación del BDNF en diferentes estructuras cerebrales como la corteza y el hipocampo (Sudo et al. 2004), y en regiones de este como lo es el GD (Neufeld et al. 2011). Otro de los mecanismos que han sido propuestos es que los monocitos ly6c^{hi} sirven como un enlace entre el intestino y el cerebro, contribuyendo a la modulación de la neurogénesis. Se sabe que el tratamiento con antibióticos puede disminuir el número de monocitos ly6c^{hi}, lo cual se ha relacionado con la disminución en la neurogénesis hipocampal, sin embargo, el tratamiento con probióticos (*S. thermophilus*, *B. breve*, *B. longum*, *B. infantis*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. paracasei* y *L. delbrueckii*) puede restaurar las alteraciones causadas por los antibióticos sobre los monocitos ly6c^{hi} y la neurogénesis (Möhle et al. 2016).

Se ha demostrado que la exposición al estrés en etapas tempranas de la vida causa alteraciones en el perfil microbiano (O'Mahony et al. 2009). Esto concuerda con nuestros resultados, donde observamos que las poblaciones microbianas analizadas cambian debido al estrés temprano. Los cambios más robustos se observaron a los 4 meses de edad, donde observamos que todas las poblaciones bacterianas del grupo SM eran significativamente diferentes al grupo control. Como se mencionó anteriormente el tratamiento con antibióticos para el abatimiento de la microbiota, tuvo una alta eficiencia (99.97%). Un grupo de enterobacterias fue resistente a este esquema de antibióticos, lo cual causó un gran interés. No obstante, la identificación de las enterobacterias resistentes se abordará en futuros proyectos. En nuestros grupos de recolonización observamos

que las ratas control recolonizadas con microbiota proveniente de animales sometidos a SM, presentan diferencia significativa en todas las poblaciones bacterias analizadas, menos en *B. fragilis* al compararlas con el control. En cuanto al grupo de ratas SM recolonizadas con microbiota proveniente de animales control, observamos que todas las poblaciones bacterianas analizadas presentan diferencia significativa al comparar con el grupo control, a excepción de *C. leptum*. Estas diferencias pueden ser explicadas debido a que el tiempo de recolonización, no es suficiente para que se lograran restablecer estas poblaciones de forma normal, por lo cual, en futuros proyectos se implementara un mayor tiempo de cohabitación para aumentar la eficiencia de la recolonización. Es importante mencionar que, si bien solo se restauraron 1 de las 5 poblaciones analizadas, la diversidad bacteriana en el intestino es muy amplia por lo cual otras poblaciones bacterianas pueden haberse normalizado o modificado, lo cual representa una limitante en este trabajo, sin embargo, en próximos proyectos se analizara a fondo la diversidad microbiana intestinal.

Diversos trabajos han reportado los beneficios de los probióticos como una posible diana terapéutica en enfermedades conductuales como la depresión. estos estudios han dado énfasis principalmente en dos grandes grupos de bacterias: *Lactobacillus* spp y *Bifidobacterium* spp (Abildgaard et al. 2018; Karen-anne et al. 2018). Se ha observado que el tratamiento con probióticos se asocia con una mejoría conductual, e incluso el tratamiento con probióticos ha sido comparado con el efecto de los antidepresivos comerciales comúnmente prescritos en clínica (Desbonnet et al. 2010). Sin embargo, el tratamiento con probióticos puede no ser suficiente para corregir las alteraciones de las cuales subyacen diversas patologías, como la depresión debido a que la microbiota ya establecida va a competir con las bacterias administradas, para lo cual, en nuestro modelo primero se abate la microbiota y a través de la cohabitación se realiza la recolonización de microbiota sana, la cual tiene mayor posibilidad de establecerse en el huésped.

Algunos grupos de investigación proponen que la microbiota intestinal puede modular la respuesta al estrés a través del eje cerebro-intestino, mediante los metabolitos bacterianos, e inclusive tener un efecto benéfico sobre las alteraciones causadas por el estrés. Sin embargo, las vías de comunicación aún son poco conocidas, se cree que el nervio vago y la circulación sistémica son dos puntos fundamentales en esta interacción. La información disponible hasta el momento señala que la producción en cantidades adecuadas de algunos neurotransmisores, factores tróficos y algunas enzimas por parte de la microbiota, son la respuesta para las mejoras conductuales, metabólicas y en la neurogénesis hipocampal en animales estresados. Por lo cual los tratamientos con probióticos y en este trabajo la recolonización con microbiota sana, son métodos implementados para reestablecer una microbiota funcional. Nuestros resultados apoyan la idea de que la microbiota es un punto fundamental en la modulación de la respuesta al estrés y de sus efectos a largo plazo. Sin embargo, se requiere de más estudios para lograr esclarecer la función de la microbiota intestinal y su posible uso terapéutico.

XI. CONCLUSIÓN

En conclusión, la SM aumenta el riesgo metabólico disminuye la neurogénesis hipocampal, causa alteraciones conductuales y disbiosis intestinal.

El abatimiento de la microbiota tiene efectos similares a los observados en la SM.

La recolonización de ratas sometidas a SM con microbiota procedente de ratas sanas revierte la conducta tipo depresiva y atenúa los efectos sobre la neurogénesis, el metabolismo y la microbiota.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- ABC, DEFINICIÓN. 2015. "Triglicéridos." <https://www.definicionabc.com/salud/trigliceridos.php>.
- Abildgaard, Anders et al. 2018. "The Antidepressant-like Effect of Probiotics and Their Faecal Abundance May Be Modulated by the Cohabiting Gut Microbiota in Rats." *European Neuropsychopharmacology*: 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2018.10.011>.
- Ait-Belgnaoui, A. et al. 2014. "Probiotic Gut Effect Prevents the Chronic Psychological Stress-Induced Brain Activity Abnormality in Mice." *Neurogastroenterology and Motility* 26(4): 510–20.
- Alvarez-Buylla, Arturo, and Daniel A. Lim. 2004. "For the Long Run: Maintaining Germinal Niches in the Adult Brain." *Neuron* 41(5): 683–86.
- American Psychiatric Association. 2013. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, DSM-5 *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, DSM-5*. <http://displus.sk/DSM/subory/dsm5.pdf>.
- Amini-khoei, Hossein et al. 2019. "On the Role of Corticosterone in Behavioral Disorders, Microbiota Composition Alteration and Neuroimmune Response in Adult Male Mice Subjected to Maternal Separation Stress." *International Immunopharmacology* 66(August 2018): 242–50.
- Anon. 2008. "Guía de Práctica Clínica Para El Manejo de Pacientes Con Trastornos de Ansiedad En Atención Primaria. Versión Completa." : <http://www.guiasalud.es/egpc/ansiedad/completa/apa>.
- ARIAS-CARRIÓN.O, OLIVARES-BAÑUELOS.T, DRUCKER-COLIN.R. 2007. "Neurogénesis En El Cerebro Adulto." *Revista de neurología*.
- Audrey R. Tyrka, Margaret C. Wyche, Megan M. Kelly, Lawrence H. Price, and Linda L Carpenter. 2010. "Symptoms : Influence of Maltreatment Type." *American Journal of Psychiatry* 165(3): 281–87.
- Bäckhed, Fredrik et al. 2004. "The Gut Microbiota as an Environmental Factor That Regulates Fat Storage." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(44): 15718–23. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=524219&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Bäckhed, Fredrik, Jill K. Manchester, Clay F. Semenkovich, and Jeffrey I. Gordon. 2007. "Mechanisms Underlying the Resistance to Diet-Induced Obesity in Germ-Free Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(3): 979–84. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1764762&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Benavides, Fernando J, and Jean Louis Guénet. 2003. "Biología Y Manejo Reproductivo Del Ratón." *Manual de genética de roedores de laboratorio. Principios básicos y aplicaciones* 1: 59–83.
- Bercik P, Collins SM, Verdu EF. 2012. "Microbes and the Gut-Brain Axis." *Neurogastroenterol Motil* 24(5): 405–13.
- Bernardi, Juliana R et al. 2013. "Early Life Stress Interacts with the Diet Deficiency of Omega-3 Fatty Acids during the Life Course Increasing the Metabolic Vulnerability in Adult Rats." *PLoS one* 8(4): e62031. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3629088&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Bohr, Niels. 2008. "Síndrome Metabólico : Definición , Historia , Criterios." 39: 96–106.
- Bondar, Natalya P., Arina A. Lepeshko, and Vasilij V. Reshetnikov. 2018. "Effects of Early-Life Stress on Social and Anxiety-Like Behaviors in Adult Mice: Sex-Specific Effects." *Behavioural Neurology* 2018: 32–34.
- Brandan, Nora C. 2014. "Hormonas de La Corteza Adrenal." *Facultad de Medicina. UNNE.*: 0–19.
- Brown, E. Sherwood, A. John Rush, and Bruce S. McEwen. 1999. "Hippocampal Remodeling and Damage by Corticosteroids: Implications for Mood Disorders." *Neuropsychopharmacology*

- 21(4): 474–84.
- Calzada León, Raúl, Nelly Altamirano Bustamante, and María de la Luz Ruiz Reyes. 2008. “Reguladores Neuroendocrinos Y Gastrointestinales Del Apetito Y La Saciedad.” *Biología* 65: 468–87. [file:///C:/Users/DELL/Desktop/NEUROPSICOLOGIA/reguladores neuroendocrinos del hambre.pdf](file:///C:/Users/DELL/Desktop/NEUROPSICOLOGIA/reguladores%20neuroendocrinos%20del%20hambre.pdf).
- Cameron, H a, B S McEwen, and E Gould. 1995. “Regulation of Adult Neurogenesis by Excitatory Input and NMDA Receptor Activation in the Dentate Gyrus.” *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15(6): 4687–92.
- Carrillo Esper, Raúl, Nartín Sánchez Zúñiga, and Sandra Elizondo Argueta. 2003. “Síndrome Metabólico.” *Management* 5(figura 1).
- Ceylani, Taha, Ewa Jakubowska-do, Hikmet Taner Teker, and Ayse Gul Gozen. 2018. “The E Ff Ects of Repeated Antibiotic Administration to Juvenile BALB / c Mice on the Microbiota Status and Animal Behavior at the Adult Age.” (April).
- Chrousos GP, Gold PW. 1992. “The Concepts of Stress and Stress System Disorders. Overview of Physical and Behavioral Homeostasis.” *Journal American Medical Asociation* 267, 9: 1244–1252.
- Clarke, Gerard et al. 2014. “Minireview : Gut Microbiota : The Neglected.” 28(August): 1221–38.
- Clarke G, Grenham S, Scully P, Fitzgerald P, Moloney RD, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF. 2013. “The Microbiome-Gut-Brain Axis during Early Life Regulates the Hippocampal Serotonergic System in a Sex-Dependent Manner.” *Mol Psychiatry* 18(6): 666–73.
- Cryan, John F., and Timothy G. Dinan. 2012. “Mind-Altering Microorganisms: The Impact of the Gut Microbiota on Brain and Behaviour.” *Nature Reviews Neuroscience* 13(10): 701–12. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3346>.
- Dallman, Mary F et al. 2003. “Chronic Stress and Obesity: A New View Of ‘comfort Food’.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(20): 11696–701. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12975524>.
- Daneri, Rubén N. Muzio M. Florencia. 2012. “Biología Del Comportamiento.” *UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES FACULTAD DE PSICOLOGÍA* 1: 8–13.
- Daniel A, Peterson. 2002. “Stem Cells in Brain Plasticity and Repair.” *Curr Opin Pharmacol.* 2(1): 34–42.
- Deepika Suri, Vandana Veenit, Ambalika Sarkar, Devi Thiagarajan, Arvind Kumar, Eric J. Nestler, Sanjeev Galande, and Vidita A. Vaidya, and Department. 2013. “Early Stress Evokes Age-Dependent Biphasic Changes in Hippocampal Neurogenesis, Bdnf Expression, and Cognition.” *Biol Psychiatry* 18(9): 1199–1216.
- Delamano, Alexis Mejías. 2009. “Glucocorticoides.” *Departamento de Farmacología Facultad de Medicina U.B.A.* <http://anestesiario.org/WP/uploads/2012/11/glucocorticoides2010-13027501575066-phpapp02.pdf>.
- Deng, Wei, James B Aimone, and Fred H Gage. 2010. “New Neurons and New Memories: How Does Adult Hippocampal Neurogenesis Affect Learning and Memory?” *Nature reviews. Neuroscience* 11(5): 339–50. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2822>.
- Desbonnet, L et al. 2010. “EFFECTS OF THE PROBIOTIC BIFIDOBACTERIUM INFANTIS IN THE MATERNAL SEPARATION MODEL OF DEPRESSION.” *NSC* 170(4): 1179–88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.08.005>.
- E, Gould. 1999. “Serotonin and Hippocampal Neurogenesis.” *Neuropsychopharmacology* 21: S46–51.
- Ekmekci, Ira, Eliane von Klitzing, et al. 2017. “Fecal Microbiota Transplantation, Commensal Escherichia Coli and Lactobacillus Johnsonii Strains Differentially Restore Intestinal and Systemic Adaptive Immune Cell Populations Following Broad-Spectrum Antibiotic Treatment.” *Frontiers in Microbiology* 8(DEC): 1–18.
- Ekmekci, Ira, Eliane Von Klitzing, et al. 2017. “Immune Responses to Broad-Spectrum Antibiotic Treatment and Fecal Microbiota Transplantation in Mice.” *Frontiers in Immunology* 8: 397.
- Española, Real Academia. 2014. “Abatimiento.” *Diccionario de la lengua española*. <http://dle.rae.es/?id=03oqGow>.
- Evensel, Alper, and Mehmet Emin Ceylan. 2015. “The Gut-Brain Axis: The Missing Link in

- Depression." *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience* 13(3): 239–44.
- F.F., Masrour, Peeri M., Azarbayjani M.A., and Hosseini M.-J. 2018. "Voluntary Exercise During Adolescence Mitigated Negative the Effects of Maternal Separation Stress on the Depressive-Like Behaviors of Adult Male Rats: Role of NMDA Receptors." *Neurochemical Research* 0(0): 1–8.
<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L621536108>
<http://dx.doi.org/10.1007/s11064-018-2519-6>
<http://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=15736903&id=doi:10.1007%2Fs11064-018-2519-6&atitle=Voluntary+Exercise+Duri>.
- Falk, P G, L V Hooper, T Midtvedt, and J I Gordon. 1998. "Creating and Maintaining the Gastrointestinal Ecosystem: What We Know and Need to Know from Gnotobiology." *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* 62(4): 1157–70.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9841668>.
- Van Felius ID, Akkermans LM, Bosscha K, Verheem A, Harmsen W, Visser MR, Gooszen HG. 2003. "Interdigestive Small Bowel Motility and Duodenal Bacterial Overgrowth in Experimental Acute Pancreatitis." *Neurogastroenterol Motil* 15(3): 267–76.
- Freestone, Primrose P E, Sara M. Sandrini, Richard D. Haigh, and Mark Lyte. 2008. "Microbial Endocrinology: How Stress Influences Susceptibility to Infection." *Trends in Microbiology* 16(2): 55–64.
- Gaillard, Danielle, Martin Wabitsch, Bernard Pipy, and Raymond Ncgre. 1991. "Cont Ro I of Term I N A I D I Ffe Re N T I at lo N of Ad I Pose Precursor Cells by Glucocorticoids." 32(Upr 7300): 569–79.
- Galland, Leo. 2014. "The Gut Microbiome and the Brain." *Medicinal Food* 12: 1261–72.
- Galley, Jeffrey D. et al. 2015. "The Structures of the Colonic Mucosa-Associated and Luminal Microbial Communities Are Distinct and Differentially Affected by a Prolonged Murine Stressor." *Gut Microbes* 5(6): 748–60.
- Gareau, Mélanie G et al. 2007. "Probiotic Treatment of Rat Pups Normalises Corticosterone Release and Ameliorates Colonic Dysfunction Induced by Maternal Separation." *Gut* 56(11): 1522–28.
- Genty, Julien, Milène Tetsi Nomigni, Fernand Anton, and Ulrike Hanesch. 2018. "The Combination of Postnatal Maternal Separation and Social Stress in Young Adulthood Does Not Lead to Enhanced Inflammatory Pain Sensitivity and Depression-Related Behavior in Rats." *PLoS ONE* 13(8): 1–27.
- Gómez, Inés, and José Ramón. 2006. "Dislipemia Diabética, Síndrome Metabólico Y Riesgo Cardiovascular." *Rev Esp Cardiol Supl* 6: 13G–23G.
- de Graaf AA, Venema K. 2008. "Gaining Insight into Microbial Physiology in the Large Intestine: A Special Role for Stable Isotopes." *Adv Microb Physiol* 53: 73–168.
- Guarner, F. 2007. "Papel de La Flora Intestinal En La Salud Y En La Enfermedad." *Nutrición Hospitalaria* 22(Supl.2): 14–19.
- Guo, Lili et al. 2018. "Electroacupuncture Ameliorates Cognitive Deficit and Improves Hippocampal Synaptic Plasticity in Adult Rat with Neonatal Maternal Separation." 2018.
- Heijtz, R. D. et al. 2011. "Normal Gut Microbiota Modulates Brain Development and Behavior." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(7): 3047–52.
<http://www.pnas.org/content/108/7/3047.abstract>.
- Heimesaat, M. M. et al. 2018. "Gram-Negative Bacteria Aggravate Murine Small Intestinal Th1-Type Immunopathology Following Oral Infection with *Toxoplasma Gondii*." *The Journal of Immunology* 177(12): 8785–95.
<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.177.12.8785>.
- Henry M. Kronenberg, Shlomo Melmed, Kenneth S. Polonsky, P. Reed Larsen. 2009. *Williams Tratado de ENDOCRINOLOGÍA*. 11th ed.
- Herman, James P., and Nancy K. Mueller. 2006. "Role of the Ventral Subiculum in Stress Integration." *Behavioural Brain Research* 174(2): 215–24.
- Hildebrandt, Marie a et al. 2009. "High Fat Diet Determines the Composition of the Murine Gut Microbiome Independently of Obesity." *Gastroenterology* 137(5): 1–18.

- Holzer, Peter, Florian Reichmann, and Aitak Farzi. 2012. "Neuropeptide Y, Peptide YY and Pancreatic Polypeptide in the Gut-Brain Axis." *Neuropeptides* 46(6): 261–74.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.npep.2012.08.005>.
- Hong YH, Nishimura Y, Hishikawa D, Tsuzuki H, Miyahara H, Gotoh C, Choi KC, Feng DD, Chen C, Lee HG, Katoh K, Roh SG, Sasaki S. 2005. "Acetate and Propionate Short Chain Fatty Acids Stimulate Adipogenesis via GPCR43." *Endocrinology*. 12(146): 5092–99.
- Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. 2001. "Molecular Analysis of Commensal Host-Microbial Relationships in the Intestine." *Science* 2.(291): 881–84.
- Infojardin. 2015. "Recolonización." <http://www.infojardin.net/glosario/raleo/recolonizacion.htm>.
- Ingeniería, Real Academia de. 2016. "Inmunotinción." <http://diccionario.raing.es/es/lema/inmunotincion>.
- Jacobson, Lauren, and Robert Sapolsky. 1991. "The Role of the Hippocampus in Feedback Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Axis." *Endocrine* 12(2): 118–34.
- Jandhyala, Sai Manasa et al. 2015. "Role of the Normal Gut Microbiota." 21(29): 8787–8803.
- Jiang H, Ling Z, Zhang Y, Mao H, Ma Z, Yin Y, Wang W, Tang W, Tan Z, Shi J, Li L, Ruan B. 2015. "Altered Fecal Microbiota Composition in Patients with Major Depressive Disorder." *Brain Behav Immun* 48: 186–94.
- Jiménez E, Fernández L, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Nueno-Palop C, Narbad A, Olivares M, Xaus J, Rodríguez JM. 2005. "Isolation of Commensal Bacteria from Umbilical Cord Blood of Healthy Neonates Born by Cesarean Section." *Curr Microbiol* 4: 270–74.
- Jin, Shengtao et al. 2018. "Anxiety-like Behaviour Assessments of Adolescent Rats after Repeated Maternal Separation during Early Life." *NeuroReport* 29(8): 643–49.
- Jorge M Roodriguez, M.G. 2013. "Neurobiología Del Estrés Agudo Y Crónico : Su Efecto En El Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal Y La Memoria." *columbia university medical center*. 472–494.
- Joseph-bravo, Patricia. 1969. "El Estrés Y Sus Efectos En El Metabolismo Y El Aprendizaje." : 65–76.
- Katz DA, Sprang G, Cooke C. 2012. "The Cost of Chronic Stress in Childhood: Understanding and Applying the Concept of Allostatic Load." *Psychodyn Psychiatry*: 40(3):469-80.
- Kelly, John R. et al. 2016. "Transferring the Blues: Depression-Associated Gut Microbiota Induces Neurobehavioural Changes in the Rat." *Journal of Psychiatric Research* 82: 109–18.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2016.07.019>.
- KidsHealth. 2019. "Glucagón." <https://kidshealth.org/es/parents/glucagon-esp.html>.
- King, Michael W. 2016. "Introducción a Las Actividades de Insulina." <https://themedicalbiochemistrypage.org/es/insulin-sp.php>.
- Kuhn, H G et al. 1997. "Epidermal Growth Factor and Fibroblast Growth Factor-2 Have Different Effects on Neural Progenitors in the Adult Rat Brain." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17(15): 5820–29.
- 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: 410–20.
- Lee V, Hoaken PN. 2007. "Cognition, Emotion, and Neurobiological Development: Mediating the Relation between Maltreatment and Aggression." *Child Maltreat.*: 281–98.
- Lizazaburu Robles, Juan Carlos. 2013. "Síndrome Metabólico : Concepto Y Aplicación Práctica Metabolic Syndrome : Concept and Practical Application Juan Carlos Lizazaburu Robles." *Articulo De Revision*: 315–20.
- Lois, C, and A Alvarez-Buylla. 1994. "Long-Distance Neuronal Migration in the Adult Mammalian Brain." *Science* 264(5162): 1145–48.
<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.8178174>.
- López Mejía, David Iñaki, Azucena Valdovinos de Yahya, Mónica Méndez-Díaz, and Víctor Méndozza-Fernández. 2009. "El Sistema Límbico Y Las Emociones: Empatía En Humanos Y Primates." *Psicología Iberoamericana* 17: 60–69.
- Louis, Petra, and Harry J. Flint. 2009. "Diversity, Metabolism and Microbial Ecology of Butyrate-Producing Bacteria from the Human Large Intestine." *FEMS Microbiology Letters* 294(1): 1–8.

- Lowell, Bradford B et al. 1999. "An Essential Regulator of Adipogenesis and Modulator of Fat Cell Function: PPAR γ ." *Cell* 99(3): 239–42.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867400816542>.
- Luczynski, Pauline et al. 2016. "Adult Microbiota-Deficient Mice Have Distinct Dendritic Morphological Changes: Differential Effects in the Amygdala and Hippocampus." *European Journal of Neuroscience* 44(9): 2654–66.
- Lyte, M. 2014. "Microbial Endocrinology: Host-Microbiota Neuroendocrine Interactions Influencing Brain and Behavior." *Gut microbes* 5: 381–389.
- Maghami, Soheila, Homeira Zardooz Id, Fariba Khodaghali, and Fatemeh Binayi. 2018. "Maternal Separation Blunted Spatial Memory Formation Independent of Peripheral and Hippocampal Insulin Content in Young Adult Male Rats." *Plos one* 13 (10): 1–23.
- Maniam, Jayanthi, and Margaret J Morris. 2010. "Long-Term Postpartum Anxiety and Depression-like Behavior in Mother Rats Subjected to Maternal Separation Are Ameliorated by Palatable High Fat Diet." *Behavioural Brain Research* 208(1): 72–79.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2009.11.005>.
- Marin, Laura, Elisa M. Miguelez, Claudio J. Villar, and Felipe Lombo. 2015. "Bioavailability of Dietary Polyphenols and Gut Microbiota Metabolism: Antimicrobial Properties." *BioMed Research International* (905215): 18.
- Márquez, F. balada. C, R. Nadal, D. Redolar, J. S. 2012. *FARMACOLOGÍA Y ENDOCRINOLOGÍA DEL COMPORTAMIENTO*.
- Matsumura, Nobuhisa et al. 1999. "Spatial- and Task-Dependent Neuronal Responses during Real and Virtual Translocation in the Monkey Hippocampal Formation." *J. Neurosci.* 19(6): 2381–93. <http://www.jneurosci.org.sare.upf.edu/content/19/6/2381.long>.
- Mayer, Emeran a et al. 2014. "Gut Microbes and the Brain: Paradigm Shift in Neuroscience." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34(46): 15490–96.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25392516>.
- 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): 17180–85.
- McEwen, Bruce S. 2002. "Cortisol, Cushing's Syndrome, and a Shrinking Brain - New Evidence for Reversibility." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87(5): 1947–48.
- McEwen BS, Seeman T. 1999. "Protective and Damaging Effects of Mediators of Stress. Elaborating and Testing the Concepts of Allostasis and Allostatic Load." *annals of the new york academy of sciences*: 896:30-47.
- MD, De Bellis. 2005. "The Psychobiology of Neglect." *Child Maltreat.* 10(2): 150–72.
- Messaoudi M, Lalonde R, Violle N, Javelot H, Desor D, Nejdi A, Bisson JF, Rougeot C, Pichelin M, Cazaubiel M, Cazaubiel JM. 2011. "Assessment of Psychotropic-like Properties of a Probiotic Formulation (Lactobacillus Helveticus R0052 and Bifidobacterium Longum R0175) in Rats and Human Subjects." *Br J Nutr* 105(5): 755–64.
- Million, Matthieu et al. 2012. "Comparative Meta-Analysis of the Effect of Lactobacillus Species on Weight Gain in Humans and Animals." *Microbial Pathogenesis* 53(2): 100–108.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2012.05.007>.
- Miragaia, Alexandra S. et al. 2018. "Maternal Deprivation Increases Anxiety- and Depressive-Like Behaviors in an Age-Dependent Fashion and Reduces Neuropeptide Y Expression in the Amygdala and Hippocampus of Male and Female Young Adult Rats." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 12(August): 1–17.
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2018.00159/full>.
- Mirescu, Christian, Jennifer D. Peters, and Elizabeth Gould. 2004. "Early Life Experience Alters Response of Adult Neurogenesis to Stress." *Nature Neuroscience* 7(8): 841–46.
- Möhle, Luisa et al. 2016. "Ly6Chi Monocytes Provide a Link between Antibiotic-Induced Changes in Gut Microbiota and Adult Hippocampal Neurogenesis." *Cell Reports* 15(9): 1945–56.
- Moussaoui, Nabila et al. 2014. "Changes in Intestinal Glucocorticoid Sensitivity in Early Life Shape the Risk of Epithelial Barrier Defect in Maternal-Deprived Rats." *PLoS ONE* 9(2): 1–9.
- Mu, Y, and F H Gage. 2011. "Adult Hippocampal Neurogenesis and Its Role in Alzheimer's Disease." *Mol Neurodegener* 6(1): 85.

- <http://www.molecularneurodegeneration.com/content/6/1/85>.
- Neufeld, K. M., N. Kang, J. Bienenstock, and J. A. Foster. 2011. "Reduced Anxiety-like Behavior and Central Neurochemical Change in Germ-Free Mice." *Neurogastroenterology and Motility* 23(3): 255–65.
- Neufeld, Karen-Anne M, Nancy Kang, John Bienenstock, and Jane a Foster. 2011. "Effects of Intestinal Microbiota on Anxiety-like Behavior." *Communicative & integrative biology* 4(4): 492–94.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3181531&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Neufeld, Karen-anne Mcvey, Sebastian Kay, and John Bienenstock. 2018. "Mouse Strain Affects Behavioral and Neuroendocrine Stress Responses Following Administration of Probiotic Lactobacillus Rhamnosus JB-1 or Traditional Antidepressant Fluoxetine." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 12(May): 1–7.
- O'Hara, A M, and F Shanahan. 2006. "The Gut Flora as a Forgotten Organ." *EMBO Rep* 7(7): 688–93.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16819463.
- O'Leary, Olivia F. et al. 2018. "The Vagus Nerve Modulates BDNF Expression and Neurogenesis in the Hippocampus." *European Neuropsychopharmacology* 28(2): 307–16.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2017.12.004>.
- O'Mahony, S. M. et al. 2014. "Serotonin, Tryptophan Metabolism and the Brain-Gut-Microbiome Axis." *Behavioural Brain Research* 277: 32–48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.027>.
- O'Mahony, Siobhain M. et al. 2009. "Early Life Stress Alters Behavior, Immunity, and Microbiota in Rats: Implications for Irritable Bowel Syndrome and Psychiatric Illnesses." *Biological Psychiatry* 65(3): 263–67. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.06.026>.
- Ochoa, Lilia. 1999. "Norma Oficial Mexicana, Especificaciones Técnicas Para La Producción, Cuidado Y Uso de Los Animales de Laboratorio." *Nom-062-Zoo*: 1–58.
- Ogbonnaya, Ebere S. et al. 2015. "Adult Hippocampal Neurogenesis Is Regulated by the Microbiome." *Biological Psychiatry* 78(4): e7–9.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.12.023>.
- Olivares, Juan David, Enrique Juárez, and Fabio García. 2015. "El Hipocampo: Neurogénesis Y Aprendizaje." *Revista Médica de la Universidad Veracruzana* 15(June): 20–28.
http://www.medigraphic.com/pdfs/veracruzana/muv-2015/muv151c.pdf%0Ahttps://www.uv.mx/rm/num_anteriores/revmedica_vol15_num1/articulos/el_hipocampo.pdf.
- OMS. 2012. "Depresión." <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/es/>.
- . 2015. "Maltrato Infantil." <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs150/es/>.
- Overman, Elizabeth L., Jean E. Rivier, and Adam J. Moeser. 2012. "CRF Induces Intestinal Epithelial Barrier Injury via the Release of Mast Cell Proteases and TNF-???" *PLoS ONE* 7(6): 1–9.
- Pacák K, Palkovits M. 2001. "Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Responses: Implications for Stress-Related Disorders." *endocrine review* 22: 502–48.
- Pajuelo, Jaime, and Rosa Pando. 2006. "Resistencia a La Insulina En Adolescentes Con Sobrepeso Y Obesidad." 67(1): 23–29.
- Palacio, Susana Delgado, Rosa Teresa, Emilia Cercenado, and Cercenado Mansilla. 2016. "Diagnóstico Microbiológico." *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*: 5–9.
- De Palma G, Blennerhassett P, Lu J, Deng Y, Park AJ, Green W, Denou E, Silva MA, Santacruz A, Sanz Y, Surette MG, Verdu EF Collins SM, Bercik P. 2015. "Microbiota and Host Determinants of Behavioural Phenotype in Maternally Separated Mice." *Nat Commun* 28;6:7735.
- Park, Yoo Heon et al. 2007. "Effect of Dietary Inclusion of Lactobacillus Acidophilus ATCC 43121 on Cholesterol Metabolism in Rats." *Journal of Microbiology and Biotechnology* 17(4): 655–62.
- Paul Zimmeta, K George MM Albertib, Manuel Serrano Ríos. 2005. "Una Nueva Definición

- Mundial Del Síndrome Metabólico Propuesta Por La Federación Internacional de Diabetes: Fundamento Y Resultados." *revista española de cardiología* 58: 1371–76.
- Pearce, J. M. 2001. "Ammon's Horn and the Hippocampus." *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 71(3): 351.
- Pencea, V, K D Bingaman, S J Wiegand, and M B Luskin. 2001. "Infusion of Brain-Derived Neurotrophic Factor into the Lateral Ventricle of the Adult Rat Leads to New Neurons in the Parenchyma of the Striatum, Septum, Thalamus, and Hypothalamus." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21(17): 6706–17.
- Psicomed. "Trastornos Del Estado de Animo." <http://www.psicomed.net/dsmiv/dsmiv6.html>.
- Qin, Junjie et al. 2010. "A Human Gut Microbial Gene Catalog Established by Metagenomic Sequencing." *Nature* 464(7285): 59–65.
- Rafiki A, Boulland JL, Halestrap AP, Ottersen OP, Bergersen L. 2003. "Highly Differential Expression of the Monocarboxylate Transporters MCT2 and MCT4 in the Developing Rat Brain." *Neuroscience*. 3(122): 677–88.
- Real Academia Española. 2014a. "Antibiótico." *Diccionario de la lengua española*. <http://dle.rae.es/?id=2pNbK3K>.
- . 2014b. "Bacteria." *Diccionario de la lengua española*. <http://dle.rae.es/?id=4I0hfLH>.
- . 2014c. "Colesterol." *Diccionario de la lengua española*. <http://dle.rae.es/?id=9IjhmCt>.
- . 2014d. "Depresión." *Diccionario de la lengua española*. <http://dle.rae.es/?id=CG97oEp>.
- . 2014e. "Estrés." *Diccionario de la lengua española*. <http://dle.rae.es/?id=GzAga0a>.
- . 2014f. "Hiperglucemia." *Diccionario de la lengua española*. <http://dle.rae.es/?id=KR7VHMg>.
- . 2014g. "Hipófisis." *Diccionario de la lengua española*. <http://dle.rae.es/?id=KTNApcR>.
- . 2014h. "Hipotálamo." *Diccionario de la lengua española*. <http://dle.rae.es/?id=KURIWb7>.
- . 2014i. "Homeostasis." *Diccionario de la lengua española*. <http://dle.rae.es/?id=KauluQX>.
- . 2014j. "Hormona." *Diccionario de la lengua española*. <http://dle.rae.es/?id=KfGUs55>.
- . 2014k. "Insulina." *Diccionario de la lengua española*. <http://dle.rae.es/?id=LouKPtF>.
- . 2014l. "Intestino, Na." *Diccionario de la lengua española*. <http://dle.rae.es/?id=LxtUnr6>.
- . 2014m. "Metabolismo." *Diccionario de la lengua española*. <http://dle.rae.es/?id=P4EcqNv>.
- . 2014n. "Metabolito." *Diccionario de la lengua española*. <http://dle.rae.es/?id=P4GdZRN>.
- . 2014o. "Neurotransmisor, Ra." *Diccionario de la lengua española*. <http://dle.rae.es/srv/search?m=30&w=neurotransmisor>.
- Reaven, Gerald M. 2006. "The Metabolic Syndrome: Is This Diagnosis Necessary?" *The American journal of clinical nutrition* 83(6): 1237–47.
- Rodiño-Janeiro, Bruno K. et al. 2015. "Role of Corticotropin-Releasing Factor in Gastrointestinal Permeability." *Journal of Neurogastroenterology and Motility* 21(1): 33–50.
- Rodríguez, Juan Miguel et al. 2015. "The Composition of the Gut Microbiota throughout Life, with an Emphasis on Early Life." *Microbial ecology in health and disease* 26: 26050. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25651996%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/article-render.fcgi?artid=PMC4315782>.
- Rozados, Ricardo. 2001. "PSICONEUROENDOCRINOLOGIA DE LA DEPRESION." http://www.psicomag.com/neurobiologia/EMTR_SOBRE_LA_ACTIVIDAD_NEUROENDOCRINA/PSICONEUROENDOCRINOLOGIA_DE_LA_DEPRESION.php.
- Rubén, R, P. & Daneri, D.M.F. 2012. "Biología Del Comportamiento." *Universidad de buenos aires* 1: 2–22.
- Ruiz, Roberto et al. 2018. "Early Life Stress Accelerates Age-Induced Effects on Neurogenesis , Depression , and Metabolic Risk." *Psychoneuroendocrinology* 96(300): 203–11. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.07.012>.
- Sáez, Sandr Rodríguez. 2011. "Activación de La Neurogénesis En El Hipocampo de Raton Adulto Por Factores Embrionarios." *Investigacion biomédica*: 2–8.
- Salud, Organizacion Mundial de la. 2018. "Depresión." <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/depression>.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. 2000. "How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative actions." Sapolsky RM, Romero LM, M. A. (2000). How Do Glucocorticoids Influence Stress

- Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stim." *endocrine review*: 1:55-89.
- Seth Rakoff-Nahoum, Justin Paglino, Stephen Edberg Fatima Eslami-Varzaneh, and Ruslan Medzhitov. 2004. "Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis Seth." *cell press* 118(3): 229–41.
<http://www.jstor.org/stable/3557550?origin=crossref>.
- Shan, Meimei et al. 2014. "Mucus Enhances Gut Homeostasis and Oral Tolerance by Delivering Immunoregulatory Signals." *Science* 342(6157): 447–53.
- Shreya Ghosh¹, Kushal K. Banerjee¹, Vidita A. Vaidya^{1*}, Ullas Kolthur-Seetharam^{1*}. 2016. "Early Stress History Alters Serum IGF1 and Impairs Muscle Mitochondrial Function in Adult Male Rats." *J Neuroendocrinol*. 28 (9).
- Sierra, Juan Carlos. 2003. "Ansiedad , Angustia Y Estrés : Tres Conceptos a Diferenciar." *Mal-Estar*: 10–59.
- SJ, Claes. 2004. "CRH, Stress, and Major Depression: A Psychobiological Interplay." *Vitam Horm*: 69:117-50.
- Smith, Patrick M et al. 2013. "The Microbial Metabolites, Short Chain Fatty Acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis." *Science* 341(6145).
- Snyder, Jason S et al. 2012. "Adult Hippocampal Neurogenesis Buffers Stress Responses and Depressive Behavior." *Nature* 476(7361): 458–61.
- Sommer F, Bäckhed F. 2016. "Know Your Neighbor: Microbiota and Host Epithelial Cells Interact Locally to Control Intestinal Function and Physiology." *Bioessays* 38(5): 455–64.
- Squire, LR; Schacter DL. 2002. *The Neuropsychology of Memory*.
- Stephen A. Bustin, Vladimir Benes, Jeremy A. Garson, Jan Hellemans, Jim Huggett, Mikael Kubista, Reinhold Mueller, Tania Nolan, Michael W. Pfaffl, Gregory L. Shipley Jo Vandesompele, and Carl T. Wittwer. 2009. "The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments." *Clinical Chemistry* 65(8): 55:4 611–622.
- Stilling, Roman M., Seth R. Bordenstein, Timothy G. Dinan, and John F. Cryan. 2014. "Friends with Social Benefits: Host-Microbe Interactions as a Driver of Brain Evolution and Development?" *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4(October): 1–17.
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2014.00147/abstract>.
- Stilling RM, Dinan TG, Cryan JF. 2014. "Microbial Genes, Brain & Behaviour - Epigenetic Regulation of the Gut-Brain Axis." *Genes Brain Behav* 13(1): 69–86.
- Suárez, Evaristo. 2012. *Microbiota Autóctona, Probióticos Y Prebióticos*.
<http://www.sepy.es/probioticos-y-prebioticos.pdf>.
- Sudo, Nobuyuki et al. 2004. "Postnatal Microbial Colonization Programs the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal System for Stress Response in Mice." *The Journal of physiology* 558(Pt 1): 263–75.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1664925&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Torner, L., P. M. Plotsky, I. D. Neumann, and T. R. de Jong. 2017. "Corrigendum to 'Forced Swimming-Induced Oxytocin Release into Blood and Brain: Effects of Adrenalectomy and Corticosterone Treatment' (Psychoneuroendocrinology (2017) 77 (165–174) (S0306453016306801) (10.1016/j.psyneuen.2016.12.006))." *Psychoneuroendocrinology* 85: 218. <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.12.006>.
- Triglia, Adrian. 2009. "Hipocampo: Funciones Y Estructura Del Órgano de La Memoria." :
<https://psicologiymente.net/neurociencias/hipocam>.
- Vargas, Javier, Mariana Junco, Carlos Gomez, and Naima Lajud. 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): 1–21.
- Versalovic, James. 2014. "The Placenta Harbors a Unique Microbiome." *Sci T ransl Med* 6(237–ra65): 1–22.
- Wikipedia. 2014. "Microbiota Normal." *Enciclopedia Libre*.
https://es.wikipedia.org/wiki/Microbiota_normal.
- . 2016. "Disbiosis." *Enciclopedia Libre*. <https://es.wikipedia.org/wiki/Disbiosis>.
- . 2018a. "Glándulas Suprarrenales." *Enciclopedia Libre*.

- https://es.wikipedia.org/wiki/Glándula_suprarrenal.
- . 2018b. “Glucocorticoide.” *Enciclopedia Libre*. <https://es.wikipedia.org/wiki/Glucocorticoide>.
- . 2018c. “Hormona Adrenocorticotropa.” *Enciclopedia Libre*.
https://es.wikipedia.org/wiki/Hormona_adrenocorticotropa.
- . 2018d. “Hormona Liberadora de Hormona Adrenocorticotropa.” *Enciclopedia Libre*.
https://es.wikipedia.org/wiki/Hormona_liberadora_de_hormona_adrenocorticotropa.
- . 2018e. “Neurogénesis.” *Enciclopedia Libre*. <https://es.wikipedia.org/wiki/Neurogénesis>.
- . 2018f. “Síndrome Metabólico.” *Enciclopedia Libre*.
https://es.wikipedia.org/wiki/Síndrome_metabólico.
- . 2019. “Sistema Endocrino.” *Enciclopedia Libre*.
https://es.wikipedia.org/wiki/Sistema_endocrino.
- WordReference. 2019. “Neurona.” *Diccionario de la lengua española*.
<http://www.wordreference.com/definicion/neurona>.
- Yamawaki, Yosuke, Misako Nishida, Kana Harada, and Hiroyuki Akagi. 2018. “Data on the Effect of Maternal Separation Coupled with Social Isolation in a Forced Swim Test and Gene Expression of Glial Fibrillary Acid Protein in the Prefrontal Cortex of Rats.” *Data in Brief* 18: 496–500. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.03.055>.
- Zamora-Valdés, Daniel, Norberto Carlos Chávez-tapia, and Nahum Méndez-sánchez. 2004. “Mecanismos Moleculares de Resistencia a La Insulina.” *Médica Sur* 11: 149–59.
- Zeneng Wang, Elizabeth Klipfell, Brian J. Bennett, Robert Koeth, Bruce S. Levison, Brandon DuGar, Ariel E. Feldstein, Earl B. Britt, Xiaoming Fu, Yoon-Mi Chung, Yuping Wu, Phil Schauer, Jonathan D. Smith, Hooman Allayee, W. H. Wilson Tang, Joseph A. DiDon, Aldons J. Lusis & Stanley L. Hazen. 2011. “Gut Flora Metabolism of Phosphatidylcholine Promotes Cardiovascular Disease.” *Nature*. (472): 57–63.
- Zhao, C. 2006. “Distinct Morphological Stages of Dentate Granule Neuron Maturation in the Adult Mouse Hippocampus.” *Journal of Neuroscience* 26(1): 3–11.
<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.3648-05.2006>.
- Ziegler, Dana R, and James P Herman. 2002. “Neurocircuitry of Stress Integration: Anatomical Pathways Regulating the Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis of the Rat.” *Integrative and comparative biology* 42(3): 541–51.

XIII. ANEXO

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Abatimiento: Acción y efecto de abatir (disminuir) (RAE. 2014).

Antibiótico: sustancia química capaz de paralizar el desarrollo de ciertos microorganismos patógenos, por su acción bacteriostática, o de causarles la muerte, por su acción bactericida, y que es producida por un ser vivo o fabricada por síntesis (RAE. 2014).

Bacteria: microorganismo unicelular sin núcleo diferenciado, algunas de cuyas especies descomponen la materia orgánica, mientras que otras producen enfermedades (RAE. 2014).

Ciego: parte del intestino grueso situada entre el intestino delgado y el colon, muy desarrollada en los herbívoros y sobre todo en los roedores (RAE. 2014).

Colesterol: alcohol esteroídico, blanco e insoluble en agua. Participa en la estructura de algunas lipoproteínas plasmáticas y a su presencia en exceso se atribuye la génesis de la aterosclerosis (RAE. 2014).

Depresión: Síndrome caracterizado por una tristeza profunda y por la inhibición de las funciones psíquicas, a veces con trastornos neurovegetativos (RAE. 2014).

Disbiosis: desbalance del equilibrio microbiano (Wikipedia. 2016).

Estrés: tensión provocada por situaciones agobiantes que originan reacciones psicosomáticas o trastornos psicológicos a veces graves (RAE. 2014).

Glándulas Suprarrenales: son dos estructuras retroperitoneales, la derecha de forma piramidal y la izquierda de forma semilunar, ambas están situadas encima de los riñones. Su función consiste en regular las respuestas al estrés, a través de la síntesis de corticosteroides y catecolaminas (Wikipedia. 2018).

Glucagón: hormona que eleva el nivel de glucosa en la sangre, es secretada por las células alfa del páncreas (KidsHealth. 2019).

Glucocorticoides: hormonas de la familia de los corticosteroides que participan en la regulación del metabolismo de carbohidratos favoreciendo la gluconeogénesis y la glucogenogénesis hepática con actividad inmunosupresora. Su acción reguladora se extiende también al metabolismo intermedio de grasas y proteínas (Wikipedia. 2018).

Hiperglucemia: nivel de glucosa en la sangre superior al normal (RAE. 2014).

Hipófisis: glándula de secreción interna, situado en la excavación de la base del cráneo llamada silla turca, que está compuesto de dos lóbulos, uno anterior, glandular, y otro posterior, nervioso, y que produce hormonas que influyen en el crecimiento, en el desarrollo sexual, etc. (RAE. 2014).

Hipotálamo: región del encéfalo situada en la base cerebral, unida a la hipófisis por un tallo nervioso y en la que residen centros importantes de las funciones vegetativas (RAE. 2014).

Homeostasis: conjunto de fenómenos de autorregulación, que conducen al mantenimiento de la constancia en la composición y propiedades del medio interno de un organismo (RAE. 2014).

Hormona: producto de secreción de ciertas glándulas que, transportado por el sistema circulatorio, excita, inhibe o regula la actividad de otros órganos o sistemas de órganos (RAE. 2014).

Hormona adrenocorticotropa: hormona polipeptídica, producida por la hipófisis y que estimula a las glándulas suprarrenales. Ejerce su acción sobre la corteza suprarrenal estimulando la secreción de corticosteroides (Wikipedia. 2018).

Hormona liberadora de corticotropina: es una hormona peptídica involucrada en la respuesta al estrés, y también la encargada de activar la secreción hipofisiaria de ACTH (Wikipedia. 2018).

Inmunotinción: técnicas se basan en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a los correspondientes antígenos. Esta reacción es visible sólo si el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe o emite luz o produce coloración (Ingeniería. 2016).

Insulina: hormona segregada por los islotes de Langerhans en el páncreas, que regula la cantidad de glucosa existente en la sangre (RAE. 2014).

Intestino: Conducto membranoso, provisto de tejido muscular, que forma parte del aparato digestivo de diversos animales, se halla situado a continuación del estómago, está plegado en muchas vueltas en la mayoría de los vertebrados y presenta en sus paredes numerosas glándulas secretoras del jugo intestinal (RAE. 2014).

Metabolismo: conjunto de reacciones químicas que efectúan las células de los seres vivos con el fin de sintetizar o degradar sustancias (RAE. 2014).

Metabolito: producto del metabolismo (RAE. 2014).

Microbiota: conjunto de microorganismos que se localizan de manera normal en distintos sitios del cuerpo de los seres vivos (Wikipedia. 2014).

Neurogénesis: proceso por el cual se generan nuevas neuronas a partir de células madre y células progenitoras (Wikipedia. 2018).

Neurona: célula diferenciada perteneciente al sistema nervioso, capaz de propagar el impulso nervioso a otra neurona. Está compuesta por una zona de recepción, las dendritas, y otra de emisión, el axón (WordReference. 2019).

Neurotransmisor: sustancia que transmite los impulsos en la sinapsis nerviosa. El neurotransmisor es liberado desde la neurona presináptica, atraviesa el espacio sináptico y actúa sobre los receptores celulares específicos de la célula objetivo (RAE. 2014).

Recolonización: Reinvasión de especies que habían sido temporalmente erradicadas o desplazadas por otras (Infojardin. 2015).

Síndrome Metabólico: es un conjunto de factores fisiológicos, bioquímicos, clínicos y metabólicos que conllevan un aumento del riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular o diabetes mellitus tipo 2 (Wikipedia. 2018).

Sistema endocrino: sistema formado por neuronas y glándulas que producen y secretan hormonas. Estas regulan el crecimiento, el desarrollo y el mantenimiento del cuerpo y todo lo que conlleva como el metabolismo, el desarrollo sexual, la respuesta al estrés entre otros (Wikipedia. 2019).

Triglicéridos: lípidos formados por glicerol y ácidos grasos, constituyen la principal forma de almacenamiento de energía del organismo (ABC. 2015).

PUBLICACIONES



EFEECTO DE LA RECOLONIZACIÓN BACTERIANA EN RATAS SOMETIDAS A ESTRÉS DURANTE LA VIDA TEMPRANA

Roberto Ruiz González¹, Angélica Roque Galicia², Edel Pineda López³, Juan José Valdez Alarcón⁴, Naima Lajud Avila⁵

Eje1. Investigación Básica
Mesa 5: Ciencias Médicas, Biomedicina y Salud

Palabras Clave: (estrés, diabetes, neurogénesis, microbiota, depresión)

RESUMEN

El estrés durante la vida temprana se ha relacionado con una disminución en la neurogénesis hipocampal, conducta tipo depresiva y vulnerabilidad metabólica. Se ha propuesto que la microbiota podría estar implicada en la modulación de la respuesta al estrés. Sin embargo, la relación entre la microbiota y los efectos del estrés temprano han sido poco estudiados. Nuestro objetivo es evaluar si el abatimiento de la microbiota y la posterior recolonización con microbiota de animales control pueden revertir, los efectos del estrés temprano. Se utilizaron ratas machos (3-4 meses) de la cepa Sprague Dawley control y sometidos a separación materna (SM, 3hrs/día del día postnatal 1 al 14) a los cuales se sometió a un esquema de abatimiento de microbiota mediante un tratamiento con antibióticos orales durante un mes y posteriormente a recolonización con microbiota de animales control. Nuestros resultados muestran que la SM causa una conducta tipo depresiva, aumenta el riesgo metabólico y disminuye la neurogénesis. El abatimiento de la microbiota tiene efectos similares a la SM, sin embargo, no afecta la regulación de la glucosa ni el peso corporal. La recolonización revierte los efectos de la SM sobre la conducta tipo depresiva, la homeostasis de la glucosa, y parcialmente sobre el peso corporal, la corticosterona y la neurogénesis. En conclusión, la recolonización de ratas SM con microbiota de animales control revierte parcialmente los efectos causados por el estrés en etapas tempranas de la vida.

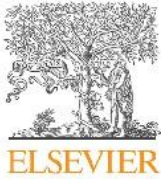
¹Centro de Investigación Biomédica del estado de Michoacán; rip_9631@hotmail.com

²Centro de Investigación Biomédica del estado de Michoacán; roque_galicia@yahoo.com

³Centro de Investigación Biomédica del estado de Michoacán; e_pl_27@hotmail.com

⁴Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; jvaldezalarcon@gmail.com

⁵Centro de Investigación Biomédica del estado de Michoacán; naimalajud@yahoo.com.mx



Early life stress accelerates age-induced effects on neurogenesis, depression, and metabolic risk

Roberto Ruiz^{a,b}, Angélica Roque^a, Edel Pineda^a, Paula Licon-Limón^c, Juan José Valdéz-Alarcón^b, Naima Lajud^{a,*}

^a División de Neurociencias, Centro de Investigación Biomédica de Michoacán—Instituto Mexicano del Seguro Social, Morelia, Michoacán, Mexico

^b Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

^c Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – Benemérita y Centenaria Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Corticosterone
Diabetes
Doublecortin
Maternal separation

ABSTRACT

Early life stress (ELS) affects hippocampal neurogenesis, increases depressive-like behavior, and causes mild metabolic imbalance in early adulthood (2 months). However, whether these effects worsen in mid life remains unclear. To test whether age-dependent effects of ELS on hippocampal neurogenesis are related to deficient hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis feedback that causes increased comorbidity of depression and metabolic risk, we evaluated the effects of periodic maternal separation (MS180) in young (4-months-old) and middle-aged (10-months-old) adult rats. MS180 caused more severe depressive-like behavior in middle-aged adults than in young animals. There were no behavioral phenotypic differences between young MS180 and control middle-aged groups. MS180 similarly affected glucose tolerance, increased fasting corticosterone, insulin, and the quantitative insulin sensitivity check index (QUICKI) at both ages. However, middle-aged adult MS180 rats showed more severe age-induced obesity (> 40% BW) than controls (> 22% BW). MS180 differentially affected dorsal and ventral neurogenesis. In young adults, MS180 animals only showed a decrease in dorsal hippocampal neurogenesis as compared to their age-matched counterparts. In contrast, at 10 months of age, MS180 caused a similar decrease in both dorsal and ventral hippocampal neurogenesis as compared to age-matched controls, and a more severe decrease as compared to young animals. Taken together, our data indicate that MS180 animals show an early onset of age-induced alterations on depression and metabolic risk, and these effects relate to alterations in hippocampal neurogenesis.

1. Introduction

Metabolic syndrome (MetS) is a cluster of risk factors that include obesity, insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension. MetS increases the risk for cardiovascular disease and type 2 diabetes (T2DM), and shows a high comorbidity with depression (Zanoveli et al., 2016). However, this relationship is complex and poorly understood. Clinical evidence has shown that while T2DM did not predict symptoms of depression or anxiety, these symptoms emerged as significant risk factors for the onset of T2DM. This relationship was independent of established risk factors (Engum, 2007). Moreover, it has been shown that appropriate control of depressive symptoms in women can improve metabolic imbalances (Rotella and Mannucci, 2013). These findings suggest that there may be a common etiology underlying the comorbidity of these diseases, and that depression is not solely a

complication of metabolic imbalances in the brain.

Both depression and MetS are stress-related pathologies that relate to high glucocorticoid (GC) levels. Hyperactivity of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis has been implicated as an important pathophysiological mechanism underpinning both diseases (Zanoveli et al., 2016). GCs increase insulin resistance, stimulate glucose production in the liver, and affect insulin secretion from pancreatic β -cells (Whirlledge and DeFranco, 2017). Moreover, circulating GCs follow an age-related trajectory, which can be affected by both the external environment and internal physiological events (Zambrano et al., 2015). Stress-induced rises in GC levels accelerate aging processes and contribute to the development of age-related pathologies (McEwen, 2002). Both GC resistance and GC-enhanced aging have a strong influence on brain metabolic pathways (Chen et al., 2013). Furthermore, a MetS or T2DM phenotype can be rapidly induced in rats by combining

* Corresponding author at: Camino de la Arboleda No. 300, Colonia Ex-Hacienda La Huerta, Morelia, Michoacán, 58341, Mexico.
E-mail address: naima.lajud@imss.gob.mx (N. Lajud).

exogenous administration of GCs and a high fat diet (Shpilberg et al., 2012).

Adverse early environmental experiences, such as child abuse and neglect, contribute to the development of both depression and metabolic disease (Morris et al., 2014). Early life stress (ELS) programs HPA activity by elevating basal GC levels (Doom et al., 2014) and increases individuals' vulnerability to anxiety and depression (Heim et al., 2008). However, there is a paucity of information on whether the age-enhanced trajectory of depression and metabolic risk is affected by early adverse experiences. Maternal separation during the first few weeks of life (MS180) is a widely used rodent model of ELS that mimics many of the long-term consequences observed in victims of child abuse (O'Mahony et al., 2011). Previous work from our group has shown that MS180 causes mild metabolic imbalances in combination with depressive-like behavior in early adulthood. Two-month-old MS180 animals showed a passive coping strategy in the forced swimming test; altered glucose homeostasis; and mildly increased fasting glucose, triglycerides, cholesterol, and body weight (< 10% increase). However, MS180 alone was not sufficient to induce MetS in juveniles (Vargas et al., 2016).

The hippocampus is one of the main structures related to HPA axis negative feedback. Additionally, the hippocampal formation is rich in GC receptors and is highly sensitive to developmental stress (McEwen et al., 1968). The subgranular zone (SGZ) of the hippocampal dentate gyrus (DG) is one of the two neurogenic niches that remain active throughout life. In this region, neural precursors proliferate, differentiate, and migrate to be integrated as part of resident brain circuits (Altman and Das, 1965). Suppression of adult neurogenesis increases basal and stress-induced GC levels, suggesting that these newly generated neurons play a role in functional inhibition of the HPA axis by the hippocampus (Schloesser et al., 2009). In rats, ELS decreases hippocampal neurogenesis (Lajud et al., 2012; Mirescu et al., 2004; Suri et al., 2014). Therefore, it has been proposed that alterations in the activity rates of the neurogenic niche could also contribute to altered negative feedback of the HPA axis that is caused by ELS (Maccari et al., 2014). However, the relationship between MS180-induced effects on neurogenesis, behavioral consequences, and metabolic imbalances have not been studied.

Depression and its comorbidity with MetS or T2DM are considered a more significant health issue in middle-aged than in young individuals (Korten et al., 2012a; Park et al., 2003). Clinical evidence has shown that men tend to have onsets of obesity and hypertriglyceridemia in young adulthood, hypertension in middle age, and diabetes later in life (Tsay et al., 2016). In animal models, the effects of ELS have been mainly studied either before the onset of age-induced increases in metabolic risk and when hippocampal maturation is incomplete (2-month-old juveniles), or after the onset of age-induced metabolic imbalances and hippocampal deterioration (> 16-month-old senescent rats). This has resulted in poor bench-to-bedside translatability of results. Therefore, the aim of the present study was to test the hypothesis that ELS aggravates the effect of age on hippocampal neurogenesis, causing deficiencies in HPA axis feedback that lead to increased comorbidity of depression and metabolic risk. To assess this, we evaluated hippocampal neurogenesis in rats subjected to MS180 at two translationally relevant ages (4 and 10 months of age), and correlated the results with emotionality and metabolic risk.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Time-pregnant female Sprague–Dawley E14 rats were obtained from the animal facility of the Neurobiology Institute—UNAM and habituated in our facility for 1 week. Animals were maintained in standard temperature-controlled rooms with a 12-h light/dark cycle (lights on at 07:00 h), with free access to food and water (Purina,

LabDiet, St. Louis, MO, USA). Day of birth was considered as postnatal day zero (P0). On P1, litters were cross-fostered, culled to eight pups (four to six males), and randomly assigned to the periodic maternal separation protocol (MS180 group) or left undisturbed with their mothers, except for routine cage cleaning (CONT group). This procedure was performed to ensure that each neonate, and not the whole litter, could be assigned to a different treatment group and be considered as an independent experimental unit (Festing, 2006). Pups were weaned at P21 and group housed (two to three siblings per cage) until adulthood. To avoid sex- and litter-dependent effects, only males were evaluated. Since cross-fostering may reduce, but not entirely eliminate, litter effects, each experimental group included animals from four to five different dams. We evaluated MS180 effects on behavior, stress response, metabolic risk, and neurogenesis in young (P120/4 M) or middle-aged (P300/10 M) adult rats.

All experiments were carried out in accordance with the official regulations for use and care of laboratory animals of Mexico (NOM-062-ZOO-1999), and the Institute of Laboratory Animal Resources Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, revised 1996). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used. The present protocol was approved by the local ethics committee (1602) of the Instituto Mexicano del Seguro Social.

2.2. Maternal separation

At 09:00 h, litters were removed and pups placed together in a separate small polymethyl methacrylate (Plexiglas®) cage filled with a mixture of clean sawdust and bedding from the nest, in a room separate from the main colony, at a controlled temperature (30–33 °C) for 180 min (MS180), as previously described (Lajud et al., 2012). The whole procedure was repeated daily from P1 to P14 using the same cages throughout the entire exposure period.

2.3. Forced swimming test

For the forced swimming test (FST), adult rats were placed individually into a Plexiglas® cylinder (35 × 50 cm) filled with water at 21 °C for 10 min. Behavior was recorded with a webcam. Struggling, swimming, and immobility behavior were defined as previously described (Lajud et al., 2012). The data were collected by an experimenter blinded to the conditions and were analyzed with EVENTLOG software.

2.4. Jugular vein catheterization and blood sampling

Animals were implanted with a 15-cm Silastic®/polyethylene (Dow Corning Corporation, MI, USA) catheter under ketamine (80 mg/kg)/xylazine (6 mg/kg) anesthesia, as previously described (Lajud et al., 2012; Neumann et al., 1998). After surgery, the rats were handled daily and left to recover for 1 week. Rats were fasted overnight and then subjected to the intravenous glucose tolerance test (IVGTT). The following day, we evaluated HPA axis reactivity. For sampling, rats were left to stabilize for 60 min. Blood samples were withdrawn (0.2 mL) and immediately substituted by sterile 0.9% saline. For the IVGTT, fasting samples were collected before intravenous infusion of 1 g/kg glucose (50%, DX-50; Pisa, Guadalajara, Mexico) and 30, 60, and 120 min after glucose administration. To evaluate HPA axis reactivity, baseline samples were collected after 120 min of stabilization. Animals were then subjected to a 2-min cold swim and samples were collected at 5, 15, and 60 min after this stress exposure. Samples were collected in tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (5% solution, 5 µL/200 µL blood) and aprotinin (0.039 units/tube; Sigma, St. Louis, MO, USA), and then centrifuged at 4000 rpm at 4 °C. Samples were stored at –30 °C until further analysis.

2.5. Metabolic phenotyping and endocrine parameters

All procedures and samplings were performed in concordance with the recommendations of the “Metabolic Phenotyping Guidelines for Assessing Glucose Homeostasis in Rodent Models” (Bowe et al., 2014). Glucose concentration was measured using an Accu-Check glucose meter (Roche Diagnostics, Edo. Mexico, Mexico). The hormone content was assessed in duplicate using ELISA and commercially available kits for insulin (Crystal Chem, Downers Grove, IL, USA) and free corticosterone (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA; sensitivity, 26.99 pg/mL). The limit of detection was 0.156 ng/mL for insulin and 26.99 pg/mL for corticosterone. Intra- and inter-assay coefficients of variation were less than 10% for all comparisons. Colorimetric assays were performed for triglycerides and low-/high-density lipoprotein cholesterol (Randox, London, UK). The quantitative insulin sensitivity check index (QUICKI) was calculated according to the formula $1/(\log(\text{insulin}) + \log(\text{glucose}))$ (Bowe et al., 2014).

2.6. Immunostaining

Immunostaining was performed as previously described (Lajud et al., 2012). A series of random, systematic, serial, sagittal, 40- μm thick sections were pre-treated with H_2O_2 , blocked in 5% horse serum (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA), and incubated with primary antibody (goat anti-doublecortin [DCX], Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Sections were incubated with the corresponding biotinylated secondary IgG and the avidin–biotin peroxidase complex solution (Vectastain ABC, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). The reaction product was visualized using a Vector DAB kit (Vector Laboratories). Sections were mounted on gelatin-coated slides and coverslipped with Cytoseal (Thermo Scientific, Kalamazoo, MI, USA).

2.7. Cell counting

For stereology, sections were evaluated as previously described (Lajud et al., 2012). A series of one in six brain sections (240- μm apart) were used for generating stereological counts of DCX + cells along the extent of the dorsal and ventral hippocampus. The total cell number and density were obtained from both the dorsal and ventral blades of the DG. The granular cell layer (GCL) and SGZ volume was estimated according to the Cavalieri principle, where the volume is the sum of the areas of each 40- μm -thick section. Due to age-related differences in brain size, the dorsal hippocampus was defined as the anatomical equivalent to Lateral: 0.9 mm / Ventral: 4.8 mm to Lateral: 3.9 / Ventral: 5.0 mm (14–16 sections per animal) and the ventral hippocampus as Lateral: 3.9 mm / Ventral: 7.1 mm to Lateral: 4.2 / Ventral: 7.1 mm (4–6 sections per animal).

2.8. DCX+ -cell stage analysis

Adult newborn neurons were classified according to the presence and shape of their apical dendrites. Type 2b cells were characterized by a small soma; irregular-shaped nucleus; and short, horizontally orientated processes. Type 3 cells represent a transition from slowly proliferating neuroblasts to postmitotic immature neurons, and were characterized by processes of intermediate length and immature morphology. DCX + cells were considered postmitotic neurons, when the full dendritic tree was visible and arborizations reached the molecular layer.

2.9. Statistical analysis

Data are presented as group means \pm SE. All statistical analyses were performed using the statistical software GB-stat V6.0 (Dynamic Microsystems, Silver Spring, MD, USA). Data were compared using a two-way analysis of variance (ANOVA), with MS180 and age as factors.

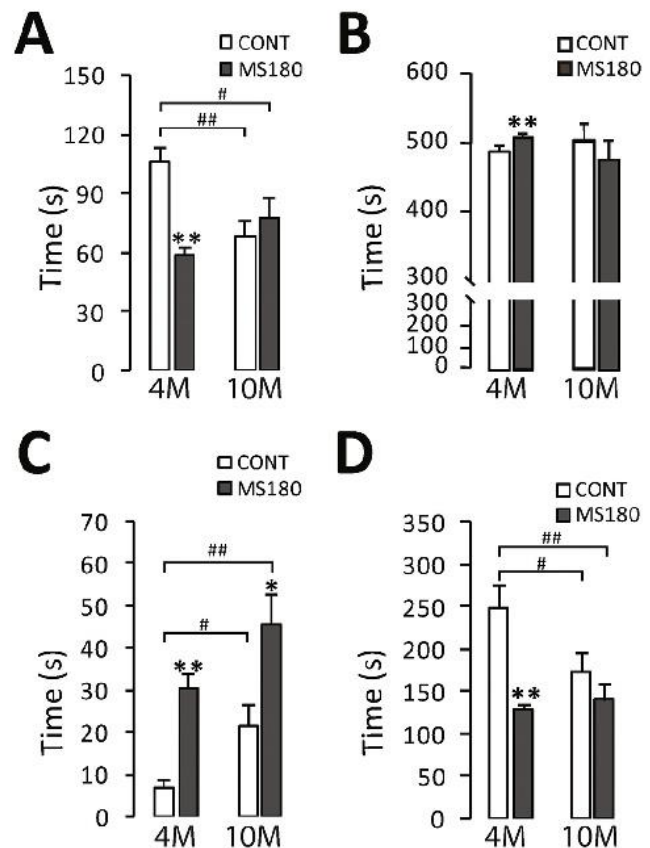


Fig. 1. Early life stress accelerates the onset of depressive-like behavior. Time of A) struggling, B) swimming, C) immobility, and D) latency to first episode of immobility of control (CONT) and maternally separated (MS180) young (4 M) and mature (10 M) rats. (Mean \pm SEM, * $p \leq 0.05$ vs age matched control, ** $p \leq 0.01$ vs age matched control, # $p \leq 0.05$ vs CONT 4 Months, ## $p \leq 0.01$ vs CONT 4 Months, $n = 10$).

Body-weight gain, stress reactivity, and IVGTT data were compared using repeated measures three-way ANOVA, with time as the variable factor, and MS180 and age as fixed factors. If ANOVA revealed a statistically significant difference, Fisher's post-hoc test was used to determine group differences. ANOVA summary tables are presented as supporting information (Table S1). Measures of fasting corticosterone (CORT) and metabolic indices were correlated using the Pearson's product-moment correlation.

3. Results

3.1. Early life stress accelerates the onset of depressive-like behavior

In the FST (Fig. 1), ANOVA (Table S1) showed a significant effect of age on immobility duration, without effects on other test parameters. We observed an effect of MS180 and age \times treatment interaction on struggling and immobility time as well as the latency to the first episode of immobility. Multiple comparisons showed that MS180 decreased struggling time ($p \leq 0.01$), the latency to the first episode of immobility ($p \leq 0.01$), and increased swimming ($p \leq 0.01$) in young but not middle-aged adults. However, immobility time was significantly increased by MS180 at both ages ($p \leq 0.05$). Both middle-aged controls and middle-aged MS180 rats showed a decrease in the struggling time and latency to immobility, as well as an increase in immobility duration as compared to young controls. No difference was observed between young MS180 and middle-aged controls.

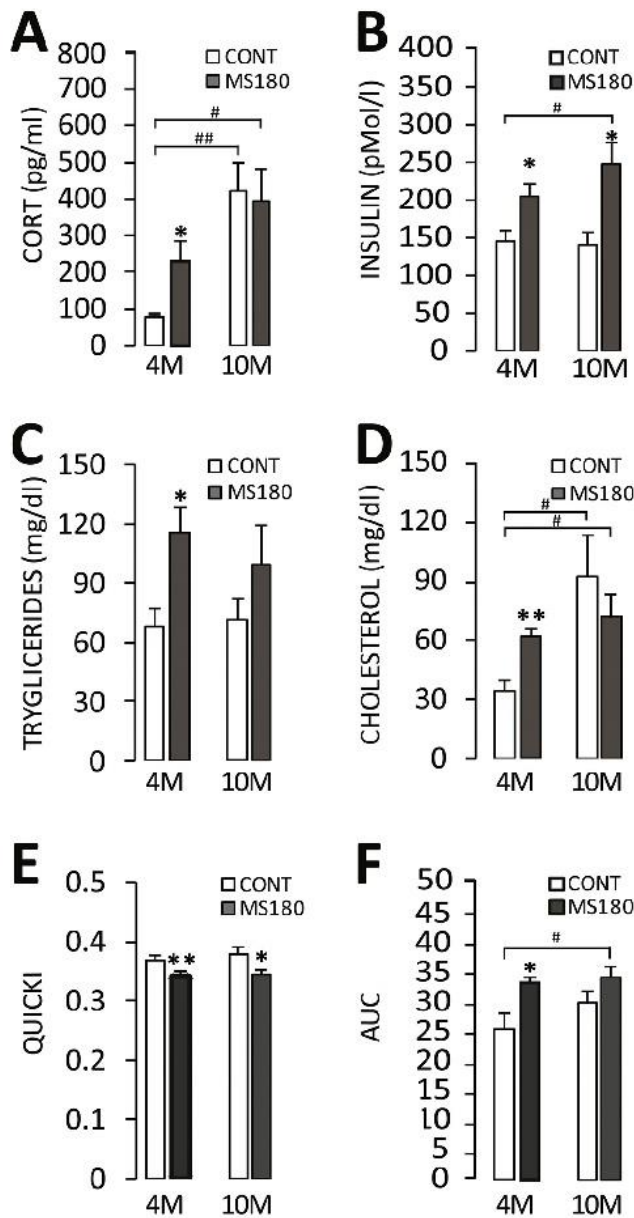


Fig. 2. Early life stress increases metabolic risk in both young and mature animals. Metabolic phenotyping and endocrine parameters of control (CONT) and maternally separated (MS180) young (4 M) and mature (10 M) rats. A) corticosterone (CORT), B) insulin, C) triglycerides, and D) cholesterol. E) quantitative insulin sensitivity check index (QUICKI) index and F) area under the glucose tolerance test curve (AUC). (Mean ± SEM, ANOVA; * $p \leq 0.05$ vs age-matched control, ** $p \leq 0.01$ vs age-matched control, # $p \leq 0.05$ vs 4 M control, ## $p \leq 0.01$ vs 4 M CONT, $n = 7-8$).

3.2. Early life stress-induced effects on fasting metabolic parameters are not aggravated in middle-aged rats

In young adults (Fig. 2), MS180 treatment increased fasting CORT levels ($p \leq 0.05$), insulin ($p \leq 0.05$), triglycerides ($p \leq 0.05$), cholesterol ($p \leq 0.01$), the area under the IVGTT (AUC, $p \leq 0.05$), and affected the QUICKI index ($p \leq 0.01$). In middle-aged animals, MS180 treatment increased fasting insulin ($p \leq 0.05$) and affected the QUICKI index as compared to age-matched controls. There was no statistically significant difference in plasma cholesterol and triglycerides or the AUC in middle-aged MS180 animals compared to their age-matched counterparts. Middle-aged MS180 rats showed an increase in CORT levels

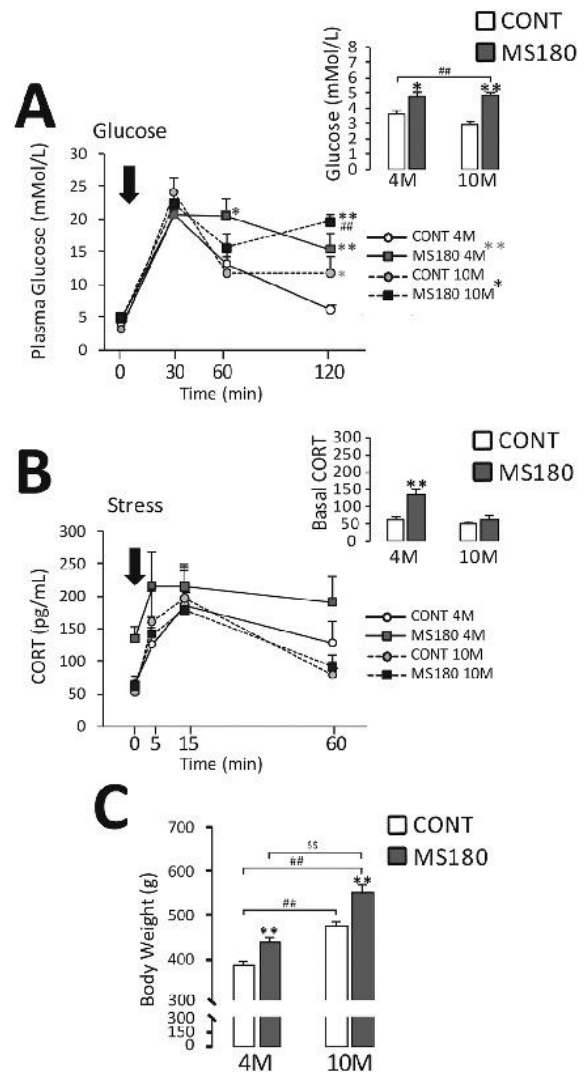


Fig. 3. Age-dependent effects of early life stress on glucose tolerance, hypothalamic–pituitary–adrenal axis activity and body weight. A) Plasma glucose levels in the IVGTT after a 12 h fast; 15, 30, 60, and 120 min after an intravenous glucose (50%, 1 g/kg) load; and area under the IVGTT curve (insert). B) Corticosterone (CORT) plasma levels before (insert) and 5, 15, 30, and 60 min after stress exposure (2 min cold swim stress). C) Body weight at sacrifice of control (CONT) and maternally separated (MS180) young (4 M) and mature (10 M) adult rats. (Mean ± SEM, * $p \leq 0.05$ vs age matched control, ** $p \leq 0.01$ vs age matched control, ## $p \leq 0.01$ vs CONT 4 Months, ## $p \leq 0.01$ vs MS180 4 Months, $n = 7-8$).

($p \leq 0.05$), plasma insulin ($p \leq 0.05$), cholesterol ($p \leq 0.05$), and the AUC as compared to young controls. ANOVA analysis (Table S1) showed a significant effect of age on fasting corticosterone ($p \leq 0.0005$) and cholesterol ($p \leq 0.01$) levels. We observed a significant effect of MS180 treatment on fasting glucose ($p \leq 0.001$), the AUC ($p \leq 0.02$), fasting insulin ($p \leq 0.001$), the QUICKI index ($p \leq 0.002$), and triglyceride ($p \leq 0.01$) values. There was no interaction of age × treatment in any of the fasting parameters. Pearson’s product-moment analysis showed a significant correlation between fasting CORT and cholesterol ($p \leq 0.01$), with no other correlations with any of the other metabolic parameters (insulin, fasting glucose, AUC, triglycerides, QUICKI, and body weight).

3.3. Early life stress affects glucose tolerance, basal HPA axis reactivity, and body weight

Both young ($p \leq 0.05$) and middle-aged ($p \leq 0.01$) MS180 animals displayed increased fasting glucose levels as compared to age-matched controls (Fig. 3A, insert). In the IVGTT, glucose administration caused a significantly greater increase in blood glucose levels at 30 ($p \leq 0.05$) and 60 ($p \leq 0.01$) min post-injection in young MS180 rats than in age-matched controls (Fig. 3A). As for middle-aged adults, MS180 animals showed increased glucose concentrations at 120 min ($p \leq 0.01$) after glucose administration as compared to both young and middle-aged controls. Moreover, both MS180 groups failed to return to baseline after 120 min ($p \leq 0.001$ vs. basal). Statistical analysis (Table S1) revealed significant effects of maternal separation ($p \leq 0.0001$) and time after glucose administration ($p \leq 0.0001$), but not age. We observed a significant interaction of age \times glucose administration ($p \leq 0.02$) and treatment \times glucose administration ($p \leq 0.004$). There were no significant differences between young and middle-aged control animals or young and middle-aged MS180 groups.

In the HPA axis reactivity test, we observed that MS180 increased basal corticosterone levels (Fig. 3B, insert) in young but not middle-aged adults ($p \leq 0.05$), without further affecting stress reactivity (Fig. 3B). ANOVA (Table S1) showed a significant effect of age ($p \leq 0.002$), treatment ($p \leq 0.003$), and age \times treatment interaction ($p \leq 0.02$) on basal corticosterone levels. However, only stress exposure showed a significant effect when corticosterone was evaluated at 5, 15, and 60 min after exposure to 2 min of cold swim stress ($p \leq 0.001$).

MS180 caused a 14% increase in the body weight of young animals ($p \leq 0.01$) and a 16% increase in the body weight of middle-aged adults ($p \leq 0.01$) as compared to their age-matched counterparts (Fig. 3C). Middle-aged controls showed a 23% increase ($p \leq 0.01$), while middle-aged MS180 adults showed a 43% increase ($p \leq 0.01$) in body weight as compared to young controls. ANOVA (Table S1) showed a significant effect of age ($p \leq 0.0001$) and MS180 ($p \leq 0.0001$), but no other interactions. Multiple comparisons indicated that MS180 middle-aged adult rats showed a significantly higher body weight than young MS180 and middle-aged control rats (Fig. 3C, $p \leq 0.01$).

3.4. Effect of ELS on hippocampal neurogenesis has an earlier onset in the dorsal hippocampus

In young adults, MS180 treatment caused a decrease in the density (nuclei number/mm³) of DCX + cells in the dorsal but not the ventral hippocampus (Fig. 4, $p \leq 0.01$). However, in middle-aged animals, we observed a significant decrease in the density of DCX + cells in both the dorsal and ventral poles of the hippocampal formation ($p \leq 0.05$). Moreover, the age-induced decrease in neurogenesis was significantly greater in middle-aged MS180 animals than in middle-aged controls in both the dorsal (CONT 10 M, $84.7 \pm 1\%$ vs. MS180 10 M, $91.4 \pm 0.9\%$; $p \leq 0.001$) and the ventral (CONT 10 M, $76.2 \pm 2\%$ vs. MS180 10 M, $86.8 \pm 2\%$; $p \leq 0.05$) poles of the hippocampus. ANOVA showed a significant effect of the dorso-ventral axis ($p \leq 0.0001$), age ($p \leq 0.0001$), treatment ($p \leq 0.006$), as well as a significant dorso-ventral axis \times age ($p \leq 0.001$) and dorso-ventral axis \times treatment ($p \leq 0.004$) interactions in DCX + cell density (Fig. 4).

Dorsal DCX + cell number was decreased in both young (CONT 4 M: 5968.5 ± 428 , MS180 4 M: 4587.75 ± 339 DCX + cells; $p \leq 0.05$) and middle-aged (CONT 10 M: 1096.5 ± 107 , MS180 10 M: 599.25 ± 74 DCX + cells; $p \leq 0.01$) groups. Similar to total DCX + cell density, the total cell number in the ventral pole of the hippocampus was affected in middle-aged (CONT 10 M: 207 ± 19 , MS180 10 M: 95.2 ± 17 DCX + cells; $p \leq 0.01$) but not young (CONT 4 M: 661.5 ± 80 , MS180 4 M: 576.7 ± 57 DCX + cells) animals, compared to age-matched controls. ANOVA (Table S1) showed a significant effect of the dorso-ventral axis ($p \leq 0.001$), age ($p \leq 0.0001$),

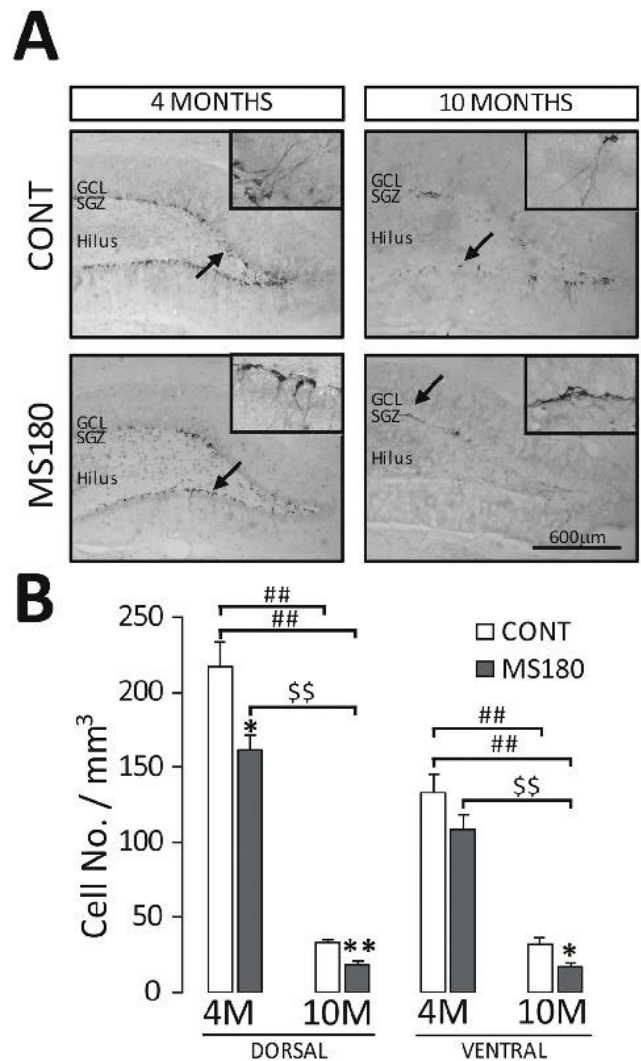


Fig. 4. Dorsal hippocampus is more vulnerable to early life stress-induced effects on neurogenesis. A) Representative images of doublecortin (DCX) immunostaining of control (CONT) and maternally separated (MS180) young (4M) and mature (10M) rats. Inserts depict higher magnifications of cells pointed out by the arrow. Stereological estimations of B) density of DCX + cells. GCL, granular cell layer; SGZ, subgranular zone. (Mean \pm SEM, * $p \leq 0.05$ vs age matched control, ** $p \leq 0.01$ vs age matched control, *** $p \leq 0.01$ vs CONT 4 Months. ** $p \leq 0.01$ vs MS180 4 Months, $n = 8$).

and treatment ($p \leq 0.002$) on the total number of DCX + cells, but no other interactions.

Age increased both dorsal (CONT 4 M: 2.8 ± 0.1 , MS180 4 M: 2.8 ± 0.09 , CONT 10 M: 3.3 ± 0.2 , MS180 10 M: 3.1 ± 0.1 mm³) and ventral (CONT 4 M: 0.51 ± 0.04 , MS180 4 M: 0.53 ± 0.04 , CONT 10 M: 0.75 ± 0.13 , MS180 10 M: 0.55 ± 0.06 mm³) DG volume. ANOVA showed a significant effect of age ($p \leq 0.01$) and dorso-ventral axis ($p \leq 0.001$), but not of MS180 in the GCL layer volume, but no interactions.

We evaluated the proportion of DCX + cells classified according to the presence and shape of their apical dendrites (Fig. 5). In the dorsal hippocampus, MS180 increased the proportion of immature type 2b cells in both young ($p \leq 0.05$) and middle-aged ($p \leq 0.01$) animals as compared to age-matched controls. No effect of MS180 was observed on the proportion of type 3 cells; however, MS180 decreased the proportion of postmitotic DCX + cells in middle-aged ($p \leq 0.01$) but not young animals. Age increased the proportion of immature type 2b cells and decreased that of postmitotic cells in both groups. Ten-month-old

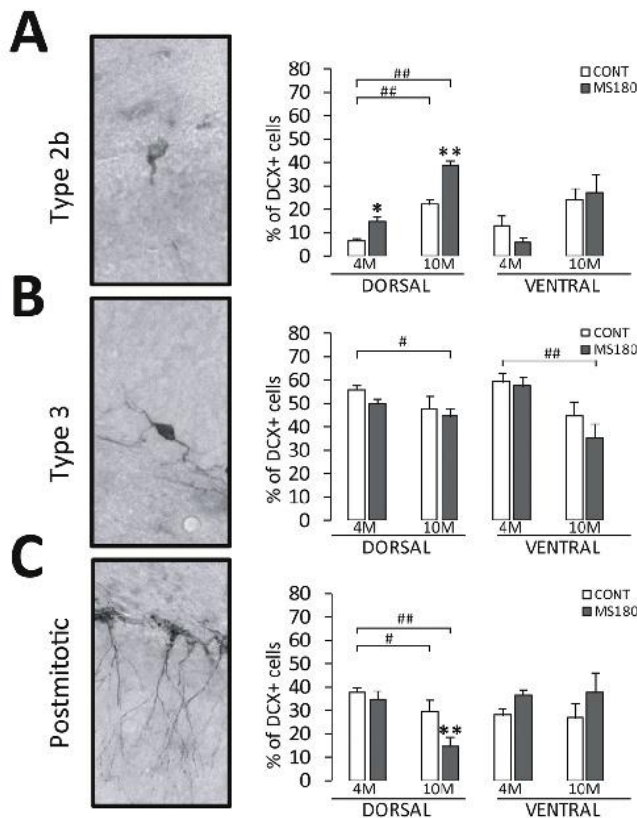


Fig. 5. Maternal separation affects maturation rates of doublecortin positive cells. Representative images and % of total doublecortin (DCX+) number of A) type 2a, B) type 2b, and C) type 3 neural precursor DCX+ cells of control (CONT) and maternally separated (MS180) young (4M) and mature (10M) rats. (Mean \pm SEM, ANOVA * $p \leq 0.05$ vs age matched control, ** $p \leq 0.01$ vs age matched control, # $p \leq 0.05$ vs CONT 4 Months, ## $p \leq 0.01$ vs CONT 4 Months, $n = 8$).

control animals showed an increase in the proportion of immature type 2b cells ($p \leq 0.01$) and a decrease in the proportion of postmitotic DCX+ cells ($p \leq 0.05$) as compared to young animals. Middle-aged MS180 animals showed an increase in the proportion of immature type 2b cells ($p \leq 0.01$), and a decrease in that of type 3 and postmitotic ($p \leq 0.01$) DCX+ cells as compared to young controls. Age-induced effects on DCX+ cell maturation were greater in MS180 mature animals as compared to middle-aged controls (Fig. 5). The proportion of type 2b and postmitotic cells in the ventral hippocampus was not affected; however, 10M old MS180 animals showed a decreased proportion of type 3 cells as compared to young controls.

4. Discussion

The middle-aged population is characterized by an increase in the incidence of depression and MetS (Korten et al., 2012b; Tsay et al., 2016). In animal models, the effects of ELS on HPA axis activity and metabolism have mainly been studied in juveniles, resulting in poor bench-to-bedside translatability of results. The present study is the first to evaluate the relationship between hippocampal neurogenesis, depression, and MetS in an ELS model at two translationally relevant ages. Here, we demonstrated that MS180 affects hippocampal neurogenesis in an age-dependent manner, which correlates with depressive-like behavior, but not with metabolic imbalances. Young MS180 animals showed a behavioral phenotype similar to that of middle-aged controls, indicating that MS180 accelerates the onset of age-induced depressive-like behavior.

MS180 has consistently been shown to cause a passive coping

strategy in the FST in young animals (Lajud et al., 2012; Marais et al., 2008; Vargas et al., 2016); however, the effect on 10-month-old adults has never been studied. We observed that while MS180 decreased struggling time and increased the latency to immobility in young adults, both middle-aged controls and middle-aged MS180 animals showed a similar behavior compared to young controls, indicating that age induces a passive coping strategy in this test. Moreover, both young adult MS180 and middle-aged adult controls displayed a similar behavioral phenotype, suggesting that MS180 accelerates the onset of age-induced passive behavior. Moretti and colleagues also observed that middle-aged rats displayed an increase in immobility time and a reduction in the time spent swimming as compared to young adult animals in a 2-day FST (Moretti et al., 2011). Furthermore, MS180 induced a greater increase in immobility time, the most significant parameter of the test, in middle-aged rats than in age-matched controls and young adults, indicating that MS180 has an age-dependent effect on depressive-like behavior. This effect also seems to be strain-dependent, as MS180 senescent Wistar rats display a similar behavioral phenotype to young animals (Martisova et al., 2012).

MS180 significantly increased MetS parameters and caused insulin resistance. In the present study, the QUICKI model was considered a more suitable parameter than other insulin-resistance indices (i.e., Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance), since it does not incorporate species-specific components and thus does not require adjustment. The higher plasma insulin and decreased QUICKI index values observed in MS180 rats reflect insulin resistance. In concordance, Raff and colleagues showed that MS180 from P2 to P6 increased body weight, HOMA-IR, and leptin levels in young adult rats, but this shorter separation protocol was not strong enough to affect insulin levels significantly (Raff et al., 2018). Contrary to our hypothesis, ELS did not increase metabolic risk in middle-aged rats, since both young and MS180 groups showed fasting metabolic parameters similar to those of young controls. However, blood glucose concentration at 120 min after administration and body weight were more severely affected in middle-aged MS180 animals. Moreover, MS180 induced severe obesity (> 40%) in middle-aged rats. Detailed descriptions of the metabolic phenotype of aged MS180 rats are scarce; therefore, further studies should evaluate whether this trend is increased or decreased in senescent animals.

One of the limitations of our study is that rats do not develop spontaneous obesity or diabetes in the absence of an external factor (i.e., genetic mutation in Zucker and Wistar-Kyoto rats, high-fat diet, etc.). Although the full syndrome clearly progresses with age, metabolic parameters always remain within levels that could be considered a pre-diabetic state. Hence, it is plausible that the acceleration of the onset of metabolic imbalance caused by MS180 peaks in young adulthood and does not increase further due to a ceiling effect. Another potential limitation of our study is that, in rodents, the total body weight measure is not directly correlated to body composition (visceral fat/non visceral fat ratio). We observed that ELS induced obesity as the animals aged. However, our current analysis does not allow us to evaluate whether this increase in body weight is directly correlated with increased visceral fat deposition. Further studies should elucidate whether ELS differentially affects visceral adipose tissue and body composition.

Unlike most of the studies that evaluate metabolic parameters and CORT concentrations in trunk blood at the time of sacrifice, we evaluated them by sampling through a jugular vein catheter; thus allowing quantification free of the confounding factors usually associated with trunk blood collection (Vahl et al., 2005). Corticosterone concentration was evaluated under basal conditions and in response to either a 12-h fast (for metabolic phenotyping), or after stress. MS180 increased the fasting CORT levels in young adults; however, both control and MS180 middle-aged rats showed a similar response to fasting. Aging per se increased GC levels (Sapolsky et al., 1983), explaining the elevated fasting CORT levels observed in middle-aged controls, and since no difference was observed between young MS180 and middle-aged

control rats, we deduced that ELS accelerates the onset of age-induced effects on fasting GC levels. A similar age-dependent effect has been observed in senescent MS180 Wistar rats (Solas et al., 2010). The effect of ageing on CORT levels is controversial. A possible explanation for the discrepancies seems to be how truly “basal” (i.e., unstressed) the samples were (Sapolsky, 1992). In agreement with our previous studies, we observed that MS180 increases basal GC levels without further affecting stress reactivity in young adults. Strikingly, both control and MS180 rats displayed similar concentrations of basal CORT levels at 10 months of age. Baseline CORT levels in middle-aged rats were similar to those of young animals. Notably, while stress-induced CORT levels were not affected by MS180, GC levels after 12-h fasting were significantly elevated in MS180 young adults, control, and MS180 middle-aged animals, indicating a differential response to metabolic (fasting) and physical (forced swim) stressors. In control juvenile animals (213–278 g), a 16-h fast is not enough to increase corticosterone levels (Nowland et al., 2011); however, we found a significant response to fasting in MS180 young adults and in both control and MS180 mature adults. Hence, the increased baseline corticosterone levels observed in MS180 young adults may be influenced by a residual effect of the previous day's fasting. However, this is unlikely, since our previous studies showed that baseline corticosterone levels in juveniles that were first subjected to fasting and the IVGTT 24 h before the measurement (Vargas et al., 2016) are similar to those of non-fasted animals (Lajud et al., 2012). This suggests that the elevated baseline corticosterone levels of 4-month-old MS180 rats could be related to an age-dependent effect, rather than previous fasting.

In the present study, there was no correlation between HPA axis reactivity and metabolic parameters. Fasting CORT correlated only with plasma cholesterol levels. Although the effects of chronic administration of GCs on metabolism are clear, whether increased GCs are the main mechanism underlying the long-term effects of ELS remains controversial. We have previously shown that, although juvenile MS180 rats display HPA axis dysregulation, GC levels do not correlate with metabolic parameters (Vargas et al., 2016). Additionally, we observed that, while MS180 increased both GC and insulin levels in young adults, it only increased insulin in middle-aged rats. It has been suggested that in young adults, impaired glucose tolerance is associated with changes in the HPA axis, while impaired glucose at older ages is associated with hypothalamic-pituitary-thyroid axis alterations (Zhou et al., 2016). Taken together, these findings suggest that mediators other than GC may be responsible for the long-term effects of ELS.

Decreased hippocampal neurogenesis has been related to both depression and impaired HPA axis feedback (Hanson et al., 2011; Schloesser et al., 2009). MS180 has lifelong deleterious effects on the SGZ neurogenic niche. We have previously demonstrated that MS180 decreases the number of BrdU + cells that survive in the DG during the postnatal period (Lajud et al., 2012). When comparing this effect with our present work, we found that the effects of MS180 are more moderate during the postnatal period and the effect was exacerbated as animals age. The effect of ELS on adult hippocampal neurogenesis remains controversial and depends on the neurogenesis phase evaluated. While survival of newly generated cells is affected during stress exposure (Lajud et al., 2012), a surge in proliferation has been observed beginning at the end of the stress period (Naninck et al., 2015), and prevailing until weaning (Suri et al., 2014). Juvenile (2-month-old) MS180 animals exhibited no difference in neurogenesis rates. However, a significant decrease was observed in senescent rats (Suri et al., 2014). In concordance with this, our results show that the effects of MS180 on neurogenesis are more severe in middle-aged adults compared to young adults, indicating that the compensatory effects on neural precursor cell proliferation observed immediately after the stress exposure disappears as animals age.

In rodents, hippocampal connectivity (Saper et al., 1976) and corticosteroid modulation of plasticity (Maggio and Segal, 2009) vary along the septo-temporal axis. The hippocampal ventral (temporal) pole

has been associated with emotionality and stress responses (Henke, 1990). Adult stress preferentially affects ventral hippocampus neurogenesis (Tanti et al., 2013), and ablation of ventral hippocampal neurogenesis abrogates the anxiolytic effects of fluoxetine in animals subjected to chronic foot shock stress (Wu and Hen, 2014). Therefore, we here investigated whether ELS could affect hippocampal neurogenesis in a dorso-ventral-dependent manner. Surprisingly, we show that, in young adults, MS180 only decreases hippocampal neurogenesis in the dorsal pole, while both poles were affected in middle-aged groups, indicating that the dorsal hippocampus is more vulnerable to ELS than the ventral pole.

DCX + cell number and differentiation were strongly reduced by MS180 in young adults and were hardly present in middle-aged rats. Surprisingly, we found no correlation between neurogenesis and corticosterone basal levels or stress response in any age group. MS180 only caused HPA axis dysregulation in young animals and the effect of MS180 on neurogenesis and behavior was more severe in middle-aged rats, where basal GCs were not increased. Similarly, Heine and colleagues observed that middle-aged rats show a decline in hippocampal neurogenesis, but found no correlation between cell birth and corticosterone or stress responses (Heine et al., 2004). We have previously shown that MS180 decreases hippocampal neurogenesis in neonates without chronically increasing basal corticosterone levels (Lajud et al., 2012). Moreover, it has been shown that blockade of glucocorticoid receptors by administration of RU486 in neonates (Liao et al., 2014) failed to attenuate the deleterious effects of ELS. Therefore, increased GCs may not be directly responsible for the age-dependent effects of MS180 on hippocampal plasticity.

It has been suggested that changes in the hippocampal insulin signaling pathway could be related to the age-related decrease in neurogenesis (Mainardi et al., 2015), T2DM (Ramos-Rodriguez et al., 2014), and adult chronic stress (Mehta et al., 2017). Chronic hyperglycemia and hyperinsulinemia stimulate overproduction of reactive oxygen species and cause alterations of intracellular second messenger pathways that could affect the neurogenic niche activity (Brownlee, 2001). We found that the effects of MS180 did not correlate with GC levels, but we observed an increase in insulin and fasting glucose at both ages, suggesting that chronic hyperinsulinemia/hyperglycemia may underlie the effects of MS180 on hippocampal neurogenesis. However, this is unlikely, since the effects of MS180 on neurogenesis and depressive-like behavior observed in juveniles (Vargas et al., 2016) have an earlier onset than that of metabolic imbalance, and worsen with age. Stress and ageing can increase both systemic and hypothalamic inflammation, microglial activation, and pro-inflammatory responses in the hippocampus (Jurgens and Johnson, 2012). Moreover, chronic inflammation leads to cellular damage, providing a neuroanatomical basis for the development of depression, obesity, and MetS. Chronic inflammation has therefore emerged as an important mechanism involved in the pathophysiology of ELS-induced effects (Roque et al., 2015). In rat pups, MS180 chronically activates hippocampal microglial cells, and increases interleukin 1-beta and tumor necrosis factor-alpha expression without affecting baseline inflammatory tone in the hypothalamus or peripheral plasma (Roque et al., 2015). However, further studies are needed to evaluate whether these differential effects prevail in adults.

5. Conclusion

Taken together, our results suggest that MS180 rats reproduce many of the relevant alterations observed in cases of depression co-morbid with MetS in middle-aged individuals. MS180 animals show an early onset of age-induced alterations on depression and metabolic risk and these effects relate to alterations in the hippocampal neurogenic niche.

Authors contribution

RR, AR, and EP performed experiments and contributed to

analyzing the data. RR and PL assisted in cryosectioning and histology. PL and JV assisted in manuscript preparation. NL designed the study, analyzed the data, and wrote the manuscript. All authors have approved the final article.

Conflicts of interest

None

Acknowledgements

Author RR is a masters student from Programa de Maestría Institucional en Ciencias, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo and received a fellowship from CONACYT. Funding for this study was provided by grant to NL from Fondo de Investigación en Salud-IMSS (grant number FIS/IMSS/PROT/G13/1223 and FIS/IMSS/PROT/G14/1307). The funding source had no further role in the study design; collection, analysis, and interpretation of data; writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. We would like to thank Editage (www.editage.com) for English language editing.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.07.012>.

References

- Altman, J., Das, G.D., 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 124, 319–335.
- Bowe, J.E., Franklin, Z.J., Hauge-Evans, A.C., King, A.J., Persaud, S.J., Jones, P.M., 2014. Metabolic phenotyping guidelines: assessing glucose homeostasis in rodent models. *J. Endocrinol.* 222, G13–25. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0182>.
- Brownlee, M., 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813–820. <https://doi.org/10.1038/414813a>.
- Chen, K.-C., Blalock, E.M., Curran-Rauhut, M.A., Kadish, I., Blalock, S.J., Brewer, L., Porter, N.M., Landfield, P.W., 2013. Glucocorticoid-dependent hippocampal transcriptome in male rats: pathway-specific alterations with aging. *Endocrinology* 154, 2807–2820. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1139>.
- Doom, J.R., Cicchetti, D., Rogosch, F.A., 2014. Longitudinal patterns of cortisol regulation differ in maltreated and nonmaltreated children. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 53, 1206–1215. <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2014.08.006>.
- Engum, A., 2007. The role of depression and anxiety in onset of diabetes in a large population-based study. *J. Psychosom. Res.* 62, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2006.07.009>.
- Festing, M.F.W., 2006. Design and statistical methods in studies using animal models of development. *ILAR J.* 47, 5–14.
- Hanson, N.D., Owens, M.J., Nemeroff, C.B., 2011. Depression, antidepressants, and neurogenesis: a critical reappraisal. *Neuropsychopharmacology* 36, 2589–2602. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.220>.
- Heim, C., Newport, D.J., Mletzko, T., Miller, A.H., Nemeroff, C.B., 2008. The link between childhood trauma and depression: insights from HPA axis studies in humans. *Psychoneuroendocrinology* 33, 693–710. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.03.008>.
- Heine, V.M., Maslam, S., Joëls, M., Lucassen, P.J., 2004. Prominent decline of newborn cell proliferation, differentiation, and apoptosis in the aging dentate gyrus, in absence of an age-related hypothalamus–pituitary–adrenal axis activation. *Neurobiol. Aging* 25, 361–375. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(03\)00090-3](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(03)00090-3).
- Henke, P.G., 1990. Hippocampal pathway to the amygdala and stress ulcer development. *Brain Res. Bull.* 25, 691–695.
- Jurgens, H.A., Johnson, R.W., 2012. Dysregulated neuronal–microglial cross-talk during aging, stress and inflammation. *Exp. Neurol.* 233, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.11.014>.
- Korten, N.C.M., Comijs, H.C., Lamers, F., Penninx, B.W.J.H., 2012a. Early and late onset depression in young and middle aged adults: differential symptomatology, characteristics and risk factors? *J. Affect. Disord.* 138, 259–267. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2012.01.042>.
- Korten, N.C.M., Comijs, H.C., Lamers, F., Penninx, B.W.J.H., 2012b. Early and late onset depression in young and middle aged adults: differential symptomatology, characteristics and risk factors? *J. Affect. Disord.* 138, 259–267. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2012.01.042>.
- Lajud, N., Roque, A., Cajero, M., Gutierrez-Ospina, G., Torner, L., 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, 410–420. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.07.011>.
- Liao, X.-M., Yang, X.-D., Jia, J., Li, J.-T., Xie, X.-M., Su, Y.-A., Schmidt, M.V., Si, T.-M., Wang, X.-D., 2014. Blockade of corticotropin-releasing hormone receptor 1 attenuates early-life stress-induced synaptic abnormalities in the neonatal hippocampus. *Hippocampus* 24, 528–540. <https://doi.org/10.1002/hipo.22254>.
- Maccari, S., Krugers, H.J., Morley-Fletcher, S., Szyf, M., Brunton, P.J., 2014. The consequences of early-life adversity: neurobiological, behavioural and epigenetic adaptations. *J. Neuroendocrinol.* 26, 707–723. <https://doi.org/10.1111/jne.12175>.
- Maggio, N., Segal, M., 2009. Differential modulation of long-term depression by acute stress in the rat dorsal and ventral hippocampus. *J. Neurosci.* 29, 8633–8638. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1901-09.2009>.
- Mainardi, M., Fusco, S., Grassi, C., 2015. Modulation of hippocampal neural plasticity by glucose-related signaling. *Neural Plast.* 2015, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/657928>.
- Marais, L., van Rensburg, S.J., van Zyl, J.M., Stein, D.J., Daniels, W.M., 2008. Maternal separation of rat pups increases the risk of developing depressive-like behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus. *Neurosci. Res.* 61, 106xx–112. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2008.01.011>.
- Martisova, E., Solas, M., Horrillo, I., Ortega, J.E., Meana, J.J., Tordera, R.M., Ramírez, M.J., 2012. Long lasting effects of early-life stress on glutamatergic/GABAergic circuitry in the rat hippocampus. *Neuropharmacology* 62, 1944–1953. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.12.019>.
- McEwen, B.S., 2002. Sex, stress and the hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process. *Neurobiol. Aging* 23, 921–939. <https://doi.org/S0197458002000271>.
- McEwen, B.S., Weiss, J.M., Schwartz, L.S., 1968. Selective retention of corticosterone by limbic structures in rat brain. *Nature* 220, 911–912.
- Mehta, V., Singh, T.R., Udayabanu, M., 2017. Quercetin ameliorates chronic unpredicted stress-induced behavioral dysfunction in male Swiss albino mice by modulating hippocampal insulin signaling pathway. *Physiol. Behav.* 182, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.09.019>.
- Mirescu, C., Peters, J.D., Gould, E., 2004. Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nat. Neurosci.* 7, 841–846. <https://doi.org/10.1038/nn1290nn1290>.
- Moretti, M., de Souza, A.G., de Chaves, G., de Andrade, V.M., Romao, P.R.T., Gavioli, E.C., Boeck, C.R., 2011. Emotional behavior in middle-aged rats: implications for geriatric psychopathologies. *Physiol. Behav.* 102, 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.09.019>.
- Morris, M.J., Beilharz, J.E., Maniam, J., Reichelt, A.C., Westbrook, R.F., 2014. Why is obesity such a problem in the 21st century? The intersection of palatable food, cues and reward pathways, stress, and cognition. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 58, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.12.002>.
- Naninck, E.F.G., Hoeijmakers, L., Kakava-Georgiadou, N., Meesters, A., Lazić, S.E., Lucassen, P.J., Korosi, A., 2015. Chronic early life stress alters developmental and adult neurogenesis and impairs cognitive function in mice. *Hippocampus* 25. <https://doi.org/10.1002/hipo.22374>.
- Neumann, I.D., Johnstone, H.A., Hatzinger, M., Liebsch, G., Shipston, M., Russell, J.A., Landgraf, R., Douglas, A.J., 1998. Attenuated neuroendocrine responses to emotional and physical stressors in pregnant rats involve adenohipophysial changes. *J. Physiol* 508 (Pt 1), 289–300.
- Nowland, M.H., Hugunin, K.M.S., Rogers, K.L., 2011. Effects of short-term fasting in male Sprague-Dawley rats. *Comp. Med.* 61, 138–144.
- O'Mahony, S.M., Hyland, N.P., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2011. Maternal separation as a model of brain-gut axis dysfunction. *Psychopharmacology (Berl)* 214, 71–88. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-2010-9>.
- Park, Y.-W., Zhu, S., Palaniappan, L., Heshka, S., Carnethon, M.R., Heymsfield, S.B., 2003. The metabolic syndrome. *Arch. Intern. Med.* 163, 427. <https://doi.org/10.1001/archinte.163.4.427>.
- Raff, H., Hoeynck, B., Jablonski, M., Leonovicz, C., Phillips, J.M., Gehrand, A.L., 2018. Insulin sensitivity, leptin, adiponectin, resistin, and testosterone in adult male and female rats after maternal-neonatal separation and environmental stress. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 314, R12–R21. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00271.2017>.
- Ramos-Rodríguez, J.J., Molina-Gil, S., Ortiz-Barajas, O., Jimenez-Palomares, M., Perdomo, G., Cozar-Castellano, I., Lechuga-Sancho, A.M., Garcia-Alloza, M., 2014. Central proliferation and neurogenesis is impaired in type 2 diabetes and prediabetes animal models. *PLoS One* 9, e89229. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089229>.
- Roque, A., Ochoa-Zarzosa, A., Torner, L., 2015. 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.* <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.09.017>.
- Rotella, F., Mannucci, E., 2013. Depression as a risk factor for diabetes: a meta-analysis of longitudinal studies. *J. Clin. Psychiatry* 74, 31–37. <https://doi.org/10.4088/JCP.12r07922>.
- Saper, C.B., Swanson, L.W., Cowan, W.M., 1976. The efferent connections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 169, 409–442. <https://doi.org/10.1002/cne.901690403>.
- Sapolsky, R.M., 1992. Do glucocorticoid concentrations rise with age in the rat? *Neurobiol. Aging* 13, 171–174. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(92\)90025-S](https://doi.org/10.1016/0197-4580(92)90025-S).
- Sapolsky, R.M., Krey, L.C., McEwen, B.S., 1983. The adrenocortical stress-response in the aged male rat: impairment of recovery from stress. *Exp. Gerontol.* 18, 55–64.
- Schloesser, R.J., Manji, H.K., Martinovich, K., 2009. Suppression of adult neurogenesis leads to an increased hypothalamo-pituitary-adrenal axis response. *Neuroreport* 20, 553–557. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e3283293e59>.

- Shpilberg, Y., Beaudry, J.L., D'Souza, A., Campbell, J.E., Peckett, A., Riddell, M.C., 2012. A rodent model of rapid-onset diabetes induced by glucocorticoids and high-fat feeding. *Dis. Model. Mech.* 5, 671–680. <https://doi.org/10.1242/dmm.008912>.
- Solas, M., Aisa, B., Mugueta, M.C., Del Río, J., Tordera, R.M., Ramírez, M.J., Del Río, J., Tordera, R.M., Ramírez, M.J., 2010. Interactions between age, stress and insulin on cognition: implications for Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* 35, 1664–1673. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.13>.
- Suri, D., Bhattacharya, A., Vaidya, V.A., 2014. Early stress evokes temporally distinct consequences on the hippocampal transcriptome, anxiety and cognitive behaviour. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 17, 289–301. <https://doi.org/10.1017/S1461145713001004S1461145713001004>. [pii].
- Tanti, A., Westphal, W.-P., Girault, V., Brizard, B., Devers, S., Leguisquet, A.-M., Surget, A., Belzung, C., 2013. Region-dependent and stage-specific effects of stress, environmental enrichment, and antidepressant treatment on hippocampal neurogenesis. *Hippocampus* 23, 797–811. <https://doi.org/10.1002/hipo.22134>.
- Tsay, Y.-C., Chen, C.-H., Pan, W.-H., 2016. Ages at onset of 5 cardiometabolic diseases adjusting for nonsusceptibility: implications for the pathogenesis of metabolic syndrome. *Am. J. Epidemiol.* 184, 366–377. <https://doi.org/10.1093/aje/kwv449>.
- Vahl, T.P., Ulrich-Lai, Y.M., Ostrander, M.M., Dolgas, C.M., Elfers, E.E., Seeley, R.J., D'Alessio, D.A., Herman, J.P., Ostrander, M.M., 2005. Comparative analysis of ACTH and corticosterone sampling methods in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289, E823–E828.
- 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 post-weaning social isolation in rats. *PLoS One* 11, e0162665. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162665>.
- Whirledge, S., DeFranco, D.B., 2017. Glucocorticoid signaling in health and disease: insights from tissue-specific GR knockout mice. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00728>.
- Wu, M.V., Hen, R., 2014. Functional dissociation of adult-born neurons along the dorsoventral axis of the dentate gyrus. *Hippocampus* 24, 751–761. <https://doi.org/10.1002/hipo.22265>.
- Zambrano, E., Reyes-Castro, L.A., Nathanielsz, P.W., 2015. Aging, glucocorticoids and developmental programming. *Age (Omaha)* 37, 52. <https://doi.org/10.1007/s11357-015-9774-0>.
- Zanoveli, J.M., Morais, Hde, Dias, I.Cda S., Schreiber, A.K., Souza, C.Pde, Cunha, J.Mda, 2016. Depression associated with diabetes: from pathophysiology to treatment. *Curr. Diabetes Rev.* 12, 165–178.
- Zhou, Y., Dong, Z., Ruhan, A., Liao, Z., Guo, J., Liu, C., Sun, X., 2016. The prevalence of impaired glucose regulation in anxiety disorder patients and the relationship with hypothalamic-pituitary-adrenal axis and hypothalamic-pituitary-thyroid axis activity. *J. Evid. Based. Med.* <https://doi.org/10.1111/jebm.12224>.