



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES SOBRE LOS
RECURSOS NATURALES**

ÁREA TEMÁTICA: RECURSOS BIÓTICOS

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**EFFECTOS A LARGO PLAZO DE LA TRANSFERENCIA DE
MICROBIOTA EN ANIMALES SOMETIDOS A ESTRÉS
TEMPRANO**

PRESENTA

M.C. ROBERTO RUIZ GONZÁLEZ

**DIRECTORA DE TESIS:
D. C. NAIMA LAJUD ÁVILA**

MORELIA, MICHOACÁN. OCTUBRE DE 2023.





Agradezco al Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) y al Instituto de Investigaciones sobre los recursos Naturales (INIRENA) por las facilidades otorgadas para realizar esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por brindarme una beca de manutención para llevar a cabo mis estudios (Número de becario 743762).

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Neurobiología del Desarrollo del centro de Investigación Biomédica de Michoacán del Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIMI-IMSS) y contó con apoyo financiero de la convocatoria de investigación de la Biocodex Microbiota Foundation.

Al Laboratorio de Neurobiología de la Conducta Motivada a cargo del Dr. Luis Alberto Téllez Lima del Instituto de Neurobiología (INB) de la universidad autónoma de México (UNAM) por permitirme realizar una estancia de investigación y las facilidades brindadas para llevar a cabo los experimentos de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A mis papas Javier Ruiz Gómez y Felipa González López y a mis hermanos Francisco Javier Ruiz González e Israel Ruiz González que siempre me apoyaron y confiaron en mí. ¡GRACIAS FAMILIA!
- ❖ A mi asesora Naima Lajud Ávila que gracias a su guía se logró culminar este proyecto.
- ❖ A mis sinodales Esperanza Meléndez Herrera, María De La Luz Torner Aguilar, Omar Guzmán Quevedo y Luis Alberto Téllez Lima que semestre a semestre aportaron grandes ideas en beneficio del proyecto de investigación.
- ❖ A mis amigos Ulises Maciel Ponce, Arturo Díaz Chávez, Pablo Eduardo Cisneros Aguilar, Edel Pineda López, Aldo Iván Arellano Nava, Luis miguel Saavedra Pimentel, Angelica Roque Galicia, Pedro Alberto Romero Juárez y en general a todos mis amigos, que sin su ayuda esto no habría sido posible.
- ❖ A mi novia María Guadalupe Cruz Corona que siempre me apoyo durante este proceso.
- ❖ En general a todos los que me apoyaron ¡MUCHAS GRACIAS!

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT	2
III. INTRODUCCIÓN	3
IV. MARCO TEÓRICO	6
4.1 El concepto de estrés y la respuesta al estrés	6
4.1.1 Activación de eje HPA	8
4.1.2 Inhibición del eje HPA.....	10
4.2 El estrés durante las etapas tempranas de la vida.....	11
4.2.1 Consecuencias a largo plazo de la exposición al estrés durante la vida temprana.....	12
4.2.2 Modelos animales de estrés durante la vida temprana.....	13
4.3 La neurogénesis hipocampal	14
4.4 La microbiota intestinal y el eje microbiota intestino cerebro	17
4.4.1 El eje microbiota- intestino- cerebro.....	18
4.4.2 La microbiota intestinal y el eje HPA.....	20
4.4.3 Estrategias para modificar la microbiota intestinal.....	21
V. ANTECEDENTES.....	24
VI. HIPÓTESIS.....	26
VII. OBJETIVOS.....	26
7.1 General:	26
7.1.1 Específicos:.....	26
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	27
8.1 Separación maternal (SM)	30
8.2 Depleción de microbiota inducida por antibióticos	30
8.3 Terapia de transferencia de microbiota fecal	30
8.4 Prueba de desplazamiento de objetos	31
8.5 Prueba de nado forzado.....	31
8.6 Curva de tolerancia a la glucosa.....	31
8.7 Recolección de muestras.....	32
8.8 Evaluación de corticosterona, insulina, colesterol y triglicéridos en plasma	32
8.9 Inmunohistoquímica	32

8.10 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).....	33
8.11 Análisis estadísticos.....	35
IX. RESULTADOS.....	36
9.1 La AIMD replicó los efectos de la SM, pero no los exacerbó	36
9.1.1 Efectos de la SM y la AIMD sobre el peso del ciego.....	36
9.1.2 Efectos de la SM y la AIMD sobre la conducta tipo depresiva	37
9.1.3 La AIMD atenuó el desbalance metabólico causado por la SM.....	38
9.1.4 Tanto la SM como la AIMD aumentaron los niveles de corticosterona ..	39
9.1.5 La AIMD y la SM disminuyeron el número de células DCX+	40
9.2 La TMF revirtió los efectos de la AIMD en animales control	41
9.2.1 La TMF restauró la composición de la microbiota intestinal después de la AIMD.....	41
9.2.2 La TMF revirtió las alteraciones conductuales inducidas por la AIMD ...	42
9.3 La TMF en combinación con la AIMD revirtió los efectos de la SM	44
9.3.1 Efectos de la TMF en combinación con la AIMD sobre la microbiota intestinal.....	44
9.3.2 La TMF en combinación con la AIMD revirtió los efectos conductuales causados por la SM	45
9.3.3 La TMF en combinación con la AIMD revirtió las alteraciones metabólicas inducidas por la SM	47
9.3.4 La TMF en combinación con la AIMD restauró la neurogénesis hipocampal en los animales SM	49
9.4 Los efectos de la TMF fueron estables un mes después de interrumpir la cohabitación.....	51
9.4.1 La TMF modificó la microbiota intestinal de forma duradera	51
9.4.2 La durabilidad de los efectos conductuales de la TMF depende de la interacción con el hospedero	52
9.4.3 Los efectos metabólicos de la TMF permanecieron un mes después de interrumpir la cohabitación.....	54
9.4.4 Los efectos de la TMF sobre la neurogénesis hipocampal se mantienen un mes después de interrumpir la cohabitación.....	56
9.5 La SM afectó de forma diferencial la microbiota intestinal de los animales “sucios” y de los animales microbiológicamente controlados.....	58
X. DISCUSIÓN.....	60
10.1 Efecto de la AIMD	60

10.2 Efectos de la TMF en combinación con la AIMD sobre las alteraciones causadas por la SM	62
XI. CONCLUSIÓN	69
XII. BIBLIOGRAFÍA	70
XIII. PUBLICACIONES.....	85

I. RESUMEN

El estrés en etapas tempranas de la vida aumenta la vulnerabilidad a sufrir patologías conductuales y metabólicas en la edad adulta. Si bien, se ha observado que las estrategias encaminadas a modificar la microbiota intestinal desde la vida temprana pueden prevenir algunos de los efectos deletéreos del estrés temprano; a la fecha, el efecto de modificar la microbiota intestinal en individuos adultos ha sido poco estudiado. Por lo cual, en el presente trabajo nos planteamos el objetivo de determinar si la depleción de microbiota inducida por antibióticos (AIMD) en combinación con la transferencia de microbiota fecal (TMF) revierte los efectos del estrés temprano sobre la memoria, la neurogénesis hipocampal, la conducta tipo depresiva, el riesgo metabólico y la disbiosis intestinal de manera duradera en animales adultos. Para esto, utilizamos ratas macho de la cepa Sprague Dawley control y sometidas a separación maternal (SM, 3 horas diarias del día postnatal 1 al 14). Para simular eficientemente la diversidad de la microbiota observada en la vida silvestre, los animales se mantuvieron en condiciones microbiológicamente no controladas (sucios). A los dos meses de edad, la mitad de los animales de cada grupo fueron sometidos al protocolo de AIMD y posteriormente se realizó la TMF mediante cohabitación (animales control con microbiota intacta cohabitaron con animales SM con depleción de microbiota y de forma inversa) durante 2 meses. Grupos independientes de animales fueron utilizados para evaluar la durabilidad de los efectos de la TMF. Nuestros resultados muestran que la AIMD replicó los efectos conductuales y neuroendocrinos de la SM, pero no los exacerba. La TMF en combinación con la AIMD revirtió de forma duradera los efectos conductuales, neuroendocrinos y metabólicos causados por la SM. Este estudio muestra la importancia de la microbiota intestinal como mediador de los efectos del estrés a largo plazo. Además, aporta evidencias de una posible estrategia terapéutica para los individuos adultos que ya presentan alteraciones causadas por el estrés temprano.

Palabras clave: *transferencia de microbiota fecal; separación maternal; microbiota intestinal; neurogénesis hipocampal; depresión.*

II. ABSTRACT

Early life Stress increases vulnerability to behavioral and metabolic pathologies in adulthood. Although it has been observed that strategies aimed at modifying the intestinal microbiota from early life can prevent some of the deleterious effects of early stress; to date, the effect of modifying the intestinal microbiota in adult individuals has been little studied. Therefore, in the present work we set out the objective of determining if antibiotic-induced microbiota depletion (AIMD) in combination with fecal microbiota transfer (FMT) reverses the effects of early stress on memory, hippocampal neurogenesis, depressive-like behavior, metabolic risk and intestinal dysbiosis in a lasting manner in adult animals. For this, we used male rats of the Sprague Dawley strain, control and subjected them to maternal separation (SM, 3 hours a day from postnatal day 1 to 14). To efficiently simulate the diversity of the microbiota observed in wildlife, animals were kept in microbiologically uncontrolled conditions (dirty). At two months of age, half of the animals in each group underwent the AIMD protocol and subsequently FMT was performed by cohabitation (control animals with intact microbiota cohabited with SM animals with microbiota depletion and vice versa) for 2 months. Independent groups of animals were used to assess the durability of the effects of TMF. Our results showed that AIMD replicated the behavioral and neuroendocrine effects of SM, but did not exacerbate them. TMF in combination with AIMD durably reversed the behavioral, neuroendocrine, and metabolic effects caused by SM. This study shows the importance of the intestinal microbiota as a mediator of the effects of stress in the long term. In addition, it provides evidence of a possible therapeutic strategy for adult individuals who already present alterations caused by early stress.

Keywords: fecal microbiota transfer; maternal separation; gut microbiota; hippocampal neurogenesis; depression.

III. INTRODUCCIÓN

La exposición al estrés durante las etapas tempranas de la vida (Early life stress, ELS), como la negligencia, el abuso físico, sexual, psicológico o cualquier tipo de maltrato infantil, aumenta la vulnerabilidad a sufrir enfermedades metabólicas, depresión y ansiedad en la edad adulta (WHO, 2020). A largo plazo, la exposición al ELS causa una desregulación del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales (Hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA), y en consecuencia una elevación en los niveles de glucocorticoides (GCs). Esta elevación de los niveles de GCs se relaciona con el aumento en la vulnerabilidad a sufrir diversas patologías (Ruiz *et al.*, 2018; Vargas *et al.*, 2016).

Se ha propuesto que dicha desregulación del eje HPA es causada por alteraciones estructurales y funcionales de las áreas encargadas de la regulación negativa de este eje, como el hipocampo (Jacobson & Sapolsky, 1991). El hipocampo es uno de los nichos neurogénicos que permanecen activos durante toda la vida y estas neuronas recién generadas participan en la retroalimentación negativa del eje HPA (Snyder *et al.*, 2012). Adicionalmente, Se ha observado que la exposición al ELS disminuye la neurogénesis hipocampal (Suri *et al.*, 2013; Mirescu *et al.*, 2004; Ruiz *et al.*, 2018), por lo que se ha propuesto que esta alteración en la plasticidad hipocampal podría ser uno de los mecanismos que subyacen los efectos a largo plazo del ELS.

Recientemente se ha propuesto que las alteraciones en el eje microbiota-intestino-cerebro, también podrían estar involucrados como parte de los mecanismos fisiopatológicos que subyacen los efectos del ELS (Hantsoo & Zemel, 2021; Vogel *et al.*, 2020). Se ha observado que la microbiota intestinal puede modular diferentes funciones cerebrales y participar en la comunicación bidireccional entre el intestino y el cerebro (Clarke *et al.*, 2014; Clarke *et al.*, 2013). Diversos estudios realizados en animales mantenidos en condiciones microbiológicamente controladas, mostraron que el ELS causa alteraciones en la microbiota intestinal (O'Mahony *et al.*, 2009) y que la microbiota es necesaria para la inducción de las alteraciones conductuales causadas por el ELS (De Palma *et al.*, 2015). En conjunto, estos datos

muestran que la microbiota intestinal juega un papel importante en el establecimiento de efectos del ELS. No obstante, el papel de la microbiota intestinal en el mantenimiento de los efectos del estrés en animales adultos no ha sido estudiado.

La TMF consiste en la obtención de microbiota de las heces de un individuo sano (donador), para transferirla a un individuo (receptor) con una alteración de la microbiota (disbiosis), con el objetivo de restaurar la microbiota intestinal dañada. La TMF ha demostrado ser eficiente en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés, como la obesidad, el síndrome de intestino irritable (Kelly *et al.*, 2016) y el síndrome metabólico (Luccia *et al.*, 2015). Además, existe evidencia que demuestra que la TMF podría ser eficaz en el tratamiento de otras psicopatologías causadas por el estrés como la depresión y la ansiedad (Li *et al.*, 2019).

Resultados previos mostraron que el tratamiento con probióticos desde la edad temprana previene la elevación de GCs causada por el ELS (Gareau *et al.*, 2007). Adicionalmente, se ha observado que en animales adultos libres de patógenos (germ-free, GF), la colonización con microbiota silvestre produce perfiles diferentes en los animales control y en los sometidos a ELS (O'Mahony *et al.*, 2009). Sin embargo, el efecto de modificar la microbiota en animales adultos que ya presentan las alteraciones causadas por el ELS no ha sido estudiado.

Durante las últimas décadas, el uso de animales GF o microbiológicamente controlados han sido herramientas útiles para estudiar la relación microbiota-hospedero y controlar posibles variables de confusión; no obstante, tienen la limitante de no simular la diversidad microbiana observada en la vida silvestre. Por esta razón, recientemente se ha sugerido que el uso de animales "sucios" (no microbiológicamente controlados) podría ser una herramienta que permita simular con mayor eficiencia la microbiota silvestre y estudiar de forma más eficaz la relación entre la microbiota y su hospedero (Beura *et al.*, 2016; Ericsson *et al.*, 2017). Por todo lo anterior, en el presente trabajo nos propusimos evaluar si la TMF

en combinación con la AIMD revierte los efectos de la SM de forma estable en un modelo de animales sucios.

IV. MARCO TEÓRICO

4.1 El concepto de estrés y la respuesta al estrés

El término estrés se utiliza para referirse a un estado de pérdida de la homeostasis. En la década de 1930, el fisiólogo austrohúngaro-canadiense Hans Selye definió a la pérdida de la homeostasis como un “síndrome producido por diversos agentes nocivos” y posteriormente conocido como síndrome de adaptación general (Selye, 1936). El concepto de estrés de forma general se puede definir como cualquier amenaza a la homeostasis del organismo, ya física o psicológica, real o imaginaria (Mawdsley & Rampton, 2005). En la actualidad existe un concepto más específico que define 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 GCs y la activación del eje simpático-adrenal, ante una situación que amenaza la homeostasis del organismo (Daneri, 2012).

El estrés puede clasificarse en estrés agudo y estrés crónico dependiendo de la duración del estímulo estresante. Generalmente, se considera como estrés agudo a un episodio de no más de dos horas. La exposición al estrés agudo activa una serie de respuestas fisiológicas y conductuales, como la respuesta de lucha o huida, que en conjunto aumentan la posibilidad de sobrevivencia (Reineke & Neilson, 2019). De forma aguda, la activación de la respuesta al estrés causa un aumento en la frecuencia cardíaca, la presión arterial, y los niveles de glucosa en sangre. También, promueve la dilatación bronco-alveolar, la disminución en la actividad digestiva y el aumento en el metabolismo energético (Lee *et al.*, 2015).

De forma opuesta, el estrés crónico se caracteriza por estímulos estresantes repetitivos y de larga duración. Durante este tipo de estrés los principales cambios fisiológicos son la retención de agua y sodio en los riñones, incremento en el volumen y presión sanguínea, alteración en el metabolismo de proteínas y grasas y disfunción del sistema inmunológico (Lee *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2021). El costo energético de la activación crónica de la respuesta al estrés ha sido denominado carga alostática (Bruce, 1998). Este concepto se refiere a la desorganización de los sistemas biológicos involucrados en la respuesta al estrés y se relaciona con el

desarrollo de un gran repertorio de patologías como enfermedades mentales, cardiovasculares, inflamatorias y metabólicas (Desbonnet *et al.*, 2010; O'Mahony *et al.*, 2009).

La respuesta al estrés está coordinada por dos tipos de respuestas fisiológicas principales: el sistema simpático-adrenal y el eje HPA (Deak, 2016; Packard *et al.*, 2016). De forma inicial, el hipotálamo integra la información de las vías sensoriales y viscerales, y desencadena la activación de la rama simpática del sistema nervioso autónomo. Desde el hipotálamo surgen fibras nerviosas que se conectan con las neuronas preganglionares, las cuales establecen sinapsis en los ganglios simpáticos con las neuronas postganglionares. Estas neuronas inervan directamente a las glándulas suprarrenales y estimulan la liberación de adrenalina y noradrenalina (Aich *et al.*, 2009). La liberación de estas catecolaminas activa un estado de alerta, que se acompaña de un aumento del flujo sanguíneo a los músculos esqueléticos, la frecuencia cardíaca, la presión arterial y la frecuencia respiratoria (Aich *et al.*, 2009). Además de disminuir la actividad de sistemas como el digestivo y el reproductivo, permitiendo una mejor respuesta ante la posible amenaza (Figura 1). De forma paralela la exposición al estrés promueve una respuesta lenta que es mediada por la activación del eje HPA. La activación de este eje desencadena una cascada de respuestas hormonales que culmina con la liberación de los GCs (Figura 1). Los GCs se encargan de movilizar reservas de energía (principalmente mediante la glucogenólisis y la lipólisis hepática) para asegurar que el organismo pueda responder de forma óptima ante el estímulo estresor (Herman *et al.*, 2016).

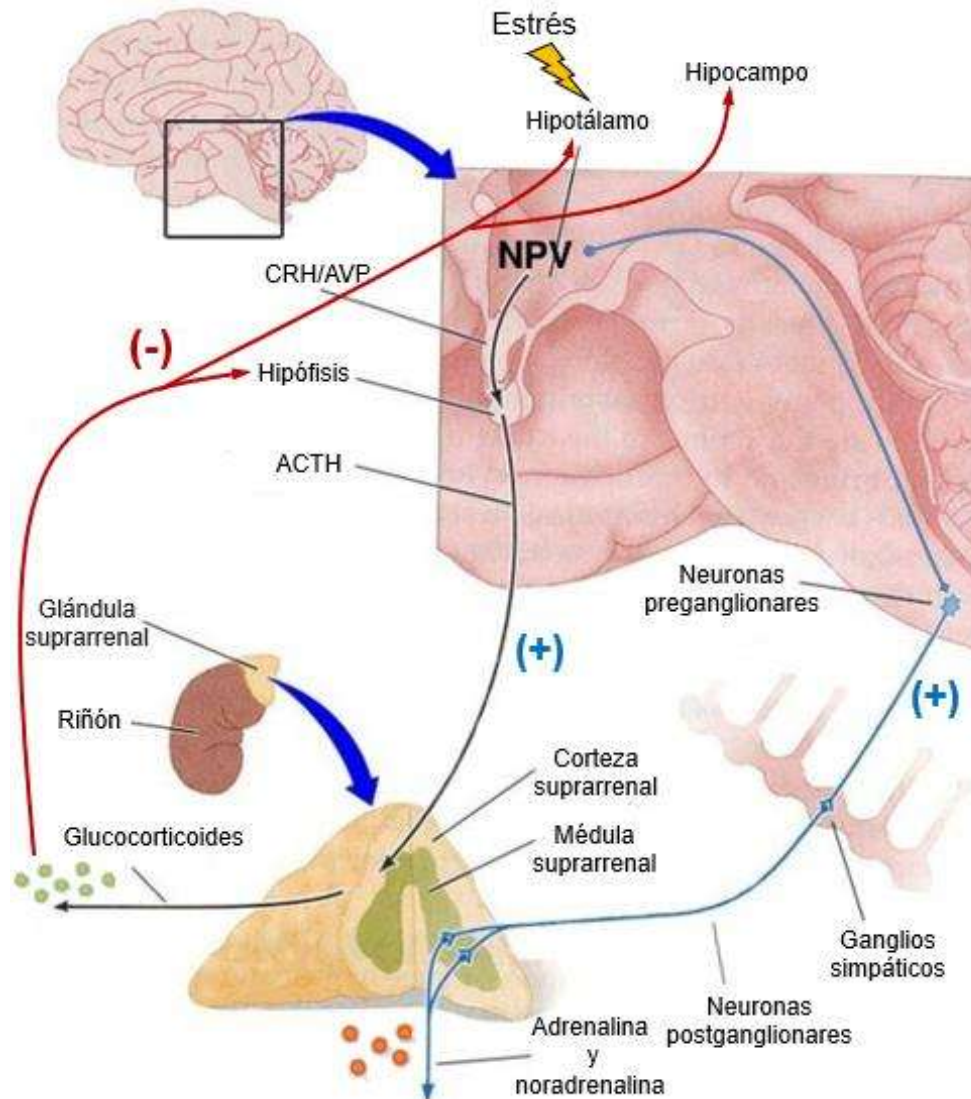


Figura 1. La respuesta al estrés. La exposición a una situación de estrés causa la activación del sistema simpático-adrenal que culmina con la liberación de adrenalina y noradrenalina. Por otra parte, se lleva a cabo la activación del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales (HPA). Comienza con la secreción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la arginina-vasopresina (AVP) por parte del hipotálamo. En la hipófisis estas hormonas estimulan la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) a la circulación sistémica. La unión de ACTH a sus receptores en las glándulas suprarrenales provocan la liberación de los glucocorticoides (GCs). Además, los GCs son los responsables de la retroalimentación negativa del eje HPA. (Imagen tomada y modificada de Medina *et al.*, 2014).

4.1.1 Activación de eje HPA

La activación del eje HPA comienza con la estimulación de las células parvocelulares del núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo (Herman, 2009). Las neuronas noradrenérgicas del tronco encefálico, principalmente del núcleo del

tracto solitario reciben aferentes del sistema nervioso periférico y del nervio vago que les permiten detectar las perturbaciones físicas del organismo (Herman *et al.*, 2003). Estas células inervan a las células parvocelulares que producen la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en el NPV (Herman *et al.*, 2003). De forma complementaria, algunas conexiones glutamatérgicas provenientes de los núcleos hipotalámicos dorsomedial, lateral y posterior podrían contribuir a la activación de las células CRHérgicas (Ulrich-lai *et al.*, 2011; Ziegler *et al.*, 2012). También, se ha observado que las proyecciones serotoninérgicas provenientes del núcleo del rafe podrían causar la activación de las células CRHérgicas (Herman *et al.*, 2003). Por otra parte, se cree que los estímulos psicosociales activan a las células CRHérgicas del NPV a través de la activación del hipocampo, la corteza prefrontal y la amígdala (Herman, 2009). Estas estructuras no proyectan directamente a las células del NPV, sino que se comunican mediante relevos en estructuras como el núcleo del lecho de la estría terminal (BST) y algunos núcleos hipotalámicos (Herman, 2009).

Posteriormente, la CRH viaja a través de la circulación hipotálamo-hipofisiaria hasta la hipófisis, donde se une a los receptores CRHR1, activando una cascada de señalización que culmina en la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH; Aguilera, 1994). La CRH promueve la transcripción del gen de la proopiomelanocortina (POMC), la cual es escindida mediante la enzima convertasa 1 en ACTH y beta-lipotropina para su posterior almacenaje en vesículas (Aguilera, 1994; Benjannet *et al.*, 1991). Arginina-vasopresina (AVP) también es liberada en el hipotálamo y se une a sus receptores AVP1b localizados en la hipófisis, potenciando el efecto de la CRH en la liberación de la ACTH (Aguilera & Rabadan-Diehl, 2000). La ACTH viaja a través de la circulación sistémica hasta las glándulas suprarrenales, donde se une a su receptor MC2R activando la biosíntesis de los GCs (Simpson, 1988; Hadley & Haskell-Luevano, 1999).

Los GCs desempeñan diferentes funciones además de su papel como efectores de la respuesta al estrés. Debido a su origen lipídico, los GCs pueden atravesar la pared celular y unirse a sus receptores intracelulares, una vez formado el complejo ligando/receptor se transloca al núcleo y se une a una secuencia consenso del ácido desoxirribonucleico (ADN) denominada "Elemento de Respuesta a GCs (GRE)". De

esta forma, los GCs pueden potenciar o reprimir la transcripción de diversos tipos de genes (Housman, 1987; Mangelsdorf *et al.*, 1995; Ratman *et al.*, 2013).

Se han descrito dos tipos de receptores intracelulares para los GCs: los receptores a mineralocorticoides (MR) y los receptores a GCs (GR). Estos receptores se expresan casi en todas las estructuras cerebrales (McEwen *et al.*, 1986). Los receptores a MR tienen una alta afinidad a los GCs naturales (cortisol, corticosterona y aldosterona) en comparación con los GR que tienen una alta afinidad por los GCs sintéticos (Grossmann *et al.*, 2004). Por esta razón, cuando las concentraciones basales de GCs se encuentran en niveles basales, hasta el 80% de los MR se encuentran ocupados; mientras que los GR solo estarán ocupados cuando las concentraciones de GCs sean lo suficientemente elevadas como para ocupar todos los MR y tener ligando disponible para los GR, como durante los eventos de estrés o durante el pico del ciclo circadiano (Reul & De Kloet, 1985). Por esto, los cambios inducidos por el estrés son atribuidos principalmente al efecto de la activación de los GR (Herman *et al.*, 2012).

4.1.2 Inhibición del eje HPA

Debido a que la exposición a altos niveles de GCs de forma prolongada puede causar daños a los organismos, éstos han desarrollado varios mecanismos de inhibición que permiten terminar la respuesta al estrés cuando ya no es necesaria. Estos mecanismos se denominan asas de retroalimentación negativa (Herman *et al.*, 2012).

Por un lado, el aumento de los niveles de GCs en sangre promueve la activación de los receptores a GR ubicados en el NPV, la corteza prefrontal y el hipocampo, activando así la retroalimentación negativa del eje (Herman *et al.*, 2012). La unión de los GCs a los GR en el NPV provoca una rápida síntesis y liberación de endocannabinoides (EC), que al unirse con sus receptores CB1 inhiben la liberación de glutamato reduciendo la activación de las células CRHérgicas (Di *et al.*, 2003). Por otro lado, el hipocampo y la corteza prefrontal envían proyecciones glutamatérgicas hacia las células GABAérgicas del BST, una vez activadas estas células envían señales inhibitorias hasta las células CRHérgicas del NPV (Herman,

2009). Se cree que estas estructuras son participes de la retroalimentación negativa del eje HPA, debido a que expresan MR y GR en gran abundancia. Además, se ha observado que las alteraciones en los GR en el hipocampo causan una retroalimentación negativa deficiente (Furay *et al.*, 2008). Algunos núcleos hipotalámicos (preóptico medial, dorsomedial y lateral) también envían proyecciones GABAérgicas a las células CRHérgicas del NPV (Herman *et al.*, 2005). Adicionalmente, el NPV está inervado por terminales neuropeptidérgicas liberadoras de encefalina y somatostatina que pueden inhibir la liberación de la CRH (Herman *et al.*, 2007).

4.2 El estrés durante las etapas tempranas de la vida

La exposición al estrés durante los primeros años de la vida se ha relacionado con diversas alteraciones estructurales, cognitivas y emocionales (Bodegom *et al.*, 2017). Esto, debido a que la infancia representa un periodo crítico en el desarrollo de las estructuras cerebrales encargadas de la modulación de la respuesta al estrés (Bodegom *et al.*, 2017). En humanos, una de las principales causas del estrés temprano es el maltrato infantil. Según la organización mundial de la salud (OMS), el maltrato infantil se define como todo aquel abuso y desatención del cual son objeto los menores de 18 años, e incluye el abuso físico, psicológico y sexual, la negligencia y la explotación comercial o cualquier situación que puedan causar un daño a la salud, el desarrollo o la dignidad del infante (WHO, 2020).

Actualmente, la hipótesis de trabajo más aceptada sugiere que la exposición al estrés durante la vida temprana causa alteraciones en el desarrollo de las estructuras cerebrales encargadas de la retroalimentación negativa del eje HPA, como el hipocampo y la corteza prefrontal (McEwen, 2012). Esto causa deficiencias en el asa de retroalimentación negativa del eje HPA que impiden que los niveles de GCs se restauren de forma eficiente, ya sea en condiciones basales (hiperactividad) o en respuesta a estresores subsecuentes (hiperreactividad; McEwen, 2012). Esta elevación crónica de los niveles de GCs se asocia a una acumulación de carga alostática a lo largo de la vida que, en consecuencia, promueve un fenotipo

maladaptativo y aumenta la vulnerabilidad a presentar patologías en la edad adulta (McEwen, 2012).

4.2.1 Consecuencias a largo plazo de la exposición al estrés durante la vida temprana

La depresión es una enfermedad de alta incidencia que se caracteriza por un estado de actividad reducida, disminución del interés o placer por todas o casi todas las actividades, insomnio y sentimiento de inutilidad o culpabilidad (American Psychiatric, 2013). La OMS ha reportado que al alrededor de 280 millones de personas sufren depresión, y se estima que 700000 personas se suicidan por esta causa anualmente (OMS, 2021). Esta enfermedad resulta de interacciones complejas entre factores sociales, psicológicos y biológicos (Nishi, 2020). Es conocido que las personas que vivieron una infancia adversa o que viven una vida sometida a estrés, son más vulnerables a padecer depresión, además de otras enfermedades conductuales (Nishi, 2020; OMS, 2021; Smith & Pollak, 2020) .

Se sabe que en condiciones normales el hipotálamo y el hipocampo participan en la modulación de los niveles de GCs circulantes; sin embargo, se ha observado que en las personas con depresión este mecanismo de regulación negativa no es eficiente (Stephan, 2004). Adicionalmente, el estrés crónico modifica los niveles de dopamina (DA), noradrenalina, glutamato e interfiere con la síntesis y liberación de serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT), siendo este uno de los diferentes mecanismos por los cuales el estrés puede causar depresión (Bulbena *et al.*, 2008; Daneri, 2012; Stephan, 2004; Lynnette *et al.*, 2020). Por otra parte, algunos estudios realizados *post mortem* de pacientes que sufrían depresión, mostraron que la exposición al estrés temprano causó alteraciones en el tamaño, la longitud y las ramificaciones dendríticas de las neuronas del hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal (McEwen *et al.*, 2016; Stockmeier *et al.*, 2004).

De forma complementaria, se ha observado que la exposición al estrés durante las etapas tempranas de la vida aumenta el riesgo de presentar alteraciones metabólicas como la obesidad (Colleluori *et al.*, 2022) o la resistencia a la insulina (Ilchmann-Diounou *et al.*, 2019). Los GCs son importantes reguladores de la

homeostasis de la glucosa, promueven la gluconeogénesis mediante la activación de la transcripción de genes que codifican enzimas de la vía gluconeogénica como: la piruvato carboxilasa (PC), la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa citosólica (PCK1), la fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBP1) y la glucosa-6-fosfatasa (G6PC; Kuo *et al.*, 2015). Además, los GCs reducen la captura de la glucosa en el músculo esquelético y el tejido adiposo blanco durante los eventos de estrés (Harris *et al.*, 2013). Durante los periodos de ayuno o inanición, los GCs regulan el nivel de glucosa plasmática debido a que esta es la principal fuente de energía para el cerebro (Charmandari *et al.*, 2005). Los GCs también modulan la liberación pancreática de insulina y glucagón (Rafacho *et al.*, 2014; Wise *et al.*, 1973). Además, participan en la modulación del apetito, ya que pueden estimular la liberación del neuropéptido Y (NPY) en el núcleo arcuato del hipotálamo (Kronenberg *et al.*, 2009).

4.2.2 Modelos animales de estrés durante la vida temprana

El estudio de los efectos del estrés temprano a corto o largo plazo se ha realizado principalmente en roedores, mediante modelos que asemejan la adversidad temprana observada en el humano. Estos modelos están relacionados con la negligencia materna (Autumn *et al.*, 2008), el maltrato materno (Rainecki & Moriceau, 2010), la separación (de Souza *et al.*, 2020) y la privación maternal (Miragaia *et al.*, 2018). Los resultados de las investigaciones apuntan a que los eventos adversos durante la infancia, causan una desregulación del eje HPA, lo cual aumenta la vulnerabilidad a sufrir diversos tipos de patologías (Lajud *et al.*, 2012; Smith & Pollak, 2020; Bodegom *et al.*, 2017).

Uno de los modelos de estrés en etapas tempranas de la vida más usado es la SM en roedores, el cual consiste en separar a las crías de su madre como estímulo estresor. Las consecuencias observadas en roedores sometidos a este modelo varían dependiendo el tiempo de separación (15 min-24 h), además de la cantidad de días (1-21). Por un lado, se ha observado que los periodos cortos de SM (15 min) no afectan el comportamiento de los animales (Zhang *et al.*, 2020). Por otra parte, la exposición a la SM por largos periodos y de forma repetitiva afecta la salud del organismo (Lajud *et al.*, 2012; Vargas *et al.*, 2016).

El eje HPA es un sistema importante que ayuda al individuo a hacer frente a los eventos adversos, preparando al organismo mediante la liberación de los GCs. Sin embargo, durante las dos primeras semanas de vida, las crías presentan un periodo de hiporespuesta al estrés (SHRP por sus siglas en inglés; Lajud & Torner, 2015). Este periodo permite que el sistema nervioso termine de desarrollarse de forma adecuada, debido a que las altas concentraciones de GCs pueden afectar el proceso (Sapolsky, 1996). Además, la interacción madre-cría contribuye a esta hiporespuesta al estrés. Sin embargo, algunos eventos de estrés en las primeras semanas de vida como lo es la SM, inducen la activación del eje HPA incluso durante el SHRP (McCormick *et al.*, 1998). Lo cual causa una elevación de los niveles de GCs y la estimulación de los GR, afectando el desarrollo y la función del cerebro de forma permanente.

A largo plazo, los animales sometidos a periodos largos de SM muestran un repertorio de alteraciones similares a las observadas en las víctimas de abuso. La SM causa un aumento en la conducta tipo depresiva (Donoso *et al.*, 2020; Roque *et al.*, 2021; Ruiz *et al.*, 2018), alteraciones en el desempeño cognoscitivo (Sousa *et al.*, 2014) y causa una elevación de los niveles basales de corticosterona (Gareau *et al.*, 2007; Ruiz *et al.*, 2018). Adicionalmente, se ha observado que las ratas sometidas a estrés temprano desarrollan altos niveles de glucosa en ayuno, colesterol, triglicéridos e inulina (Bernardi *et al.*, 2013; Maniam & Morris, 2010; Ruiz *et al.*, 2018; Ryu *et al.*, 2009; Vargas *et al.*, 2016), afecta la neurogénesis hipocampal (Suri *et al.*, 2013) y al sistema serotoninérgico (de Souza *et al.*, 2020).

4.3 La neurogénesis hipocampal

La neurogénesis hipocampal es el proceso de generación de neuronas nuevas que se originan a partir de las células madre (Olivares *et al.*, 2015). El hipocampo es una de las estructuras más sensibles al estrés temprano debido a su alta expresión de receptores a GCs (Furay *et al.*, 2008). Después del nacimiento, el hipocampo continúa desarrollándose teniendo un pico máximo de neurogénesis entre el día postnatal 3-9 (Lajud & Torner, 2015). La exposición a altas concentraciones de GCs durante el periodo de SHRP compromete su desarrollo y afecta su estructura, además de sus funciones (Lajud & Torner, 2015).

En la edad adulta, esta forma de plasticidad neuronal ocurre en la zona sub ventricular (SVZ) de los ventrículos laterales, y en la zona subgranular (SGZ) del giro dentado (GD) del hipocampo (Lois & Alvarez-Buylla, 1994). Las neuronas nacidas en la SVZ participan en el aprendizaje olfativo, mientras que las neuronas nacidas en el GD se han implicado en aspectos específicos de la formación de la memoria espacial y la cognición (Sawada & Sawamoto, 2013). Además, la neurogénesis del GD participa como mediador de la regulación negativa del eje HPA (Snyder *et al.*, 2012).

La neurogénesis hipocampal comienza con la proliferación de las células troncales (Kronenberg *et al.*, 2003; Bohlen & Halbach, 2011). Estas células presentan características de la glía radial y expresan proteínas como la proteína ácida fibrilar glial, Ki67 y la nestina. A partir de estas células se dará origen a los progenitores neurales clasificados como tipo celular 2a, 2b y 3, dependiendo de las proteínas que expresen. Los tipos celulares 2b y 3 expresan la proteína doble cortina (DCX), un marcador de neuroblastos y de neuronas inmaduras. Sin embargo, los progenitores neurales 2a no expresan la proteína DCX. Estas nuevas células migran, se diferencian y se integran a la capa subgranular del giro dentado del hipocampo. Finalmente, generan procesos sinápticos que les permite integrarse a los circuitos hipocampales entre dos y cuatro semanas después de su nacimiento (Figura 2)(Sáez, 2011; van Praag Henriette *et al.*, 2002).

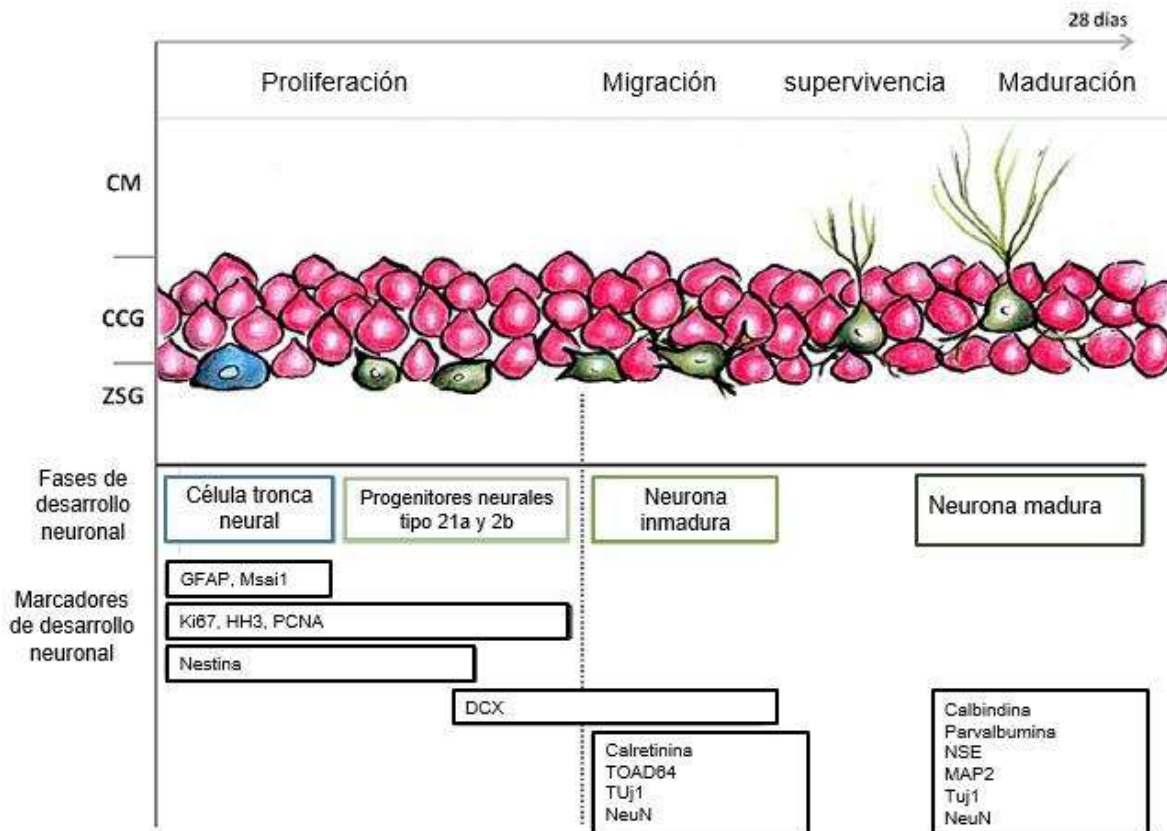


Figura 2. Fases de la neurogénesis hipocámpica. La neurogénesis hipocámpica inicia con la proliferación de las células troncales neurales que se localizan en la zona subgranular del giro dentado (ZSG), las cuales darán origen a los progenitores neurales. Los progenitores neurales comienzan con la migración hasta la capa de células granulares del giro dentado (CCG), dónde alcanzarán su madurez. Durante las distintas fases de la neurogénesis hipocámpica las células expresan proteínas específicas que pueden ser utilizadas para detectar la fase de desarrollo en la cual se encuentran, esto mediante técnicas de inmunohistoquímica. (Imagen tomada y modificada de Olivares *et al.*, 2015).

Estudios realizados en animales sometidos a estrés temprano mostraron una disminución de la neurogénesis hipocámpica en la edad adulta (Suri *et al.*, 2013; Mirescu *et al.*, 2004; Ruiz *et al.*, 2018). Esto acompañado de un aumento en los niveles de GCs, una retención disminuida de la memoria espacial y alteraciones conductuales. Más específicamente, se ha observado que los animales sometidos a SM a largo plazo (15 meses de edad) muestran una disminución del número de células Ki67+ y DCX+, junto con una disminución de la memoria espacial (Suri *et al.*, 2013). Otro estudio mostró que la SM causa niveles elevados de GCs, una disminución de las células DCX+ y alteraciones sobre la conducta tipo depresiva en animales de 4 y 10 meses de edad (Ruiz *et al.*, 2018).

4.4 La microbiota intestinal y el eje microbiota intestino cerebro

La microbiota intestinal es una comunidad compleja y dinámica de microorganismos (principalmente bacterias) que se localizan en el intestino (Wang & Wang, 2016). La relación entre los microorganismos y el hospedero se clasifica dependiendo de su asociación; 1) el mutualismo donde el microorganismo y el hospedero obtienen beneficios; 2) el comensalismo donde solo el microorganismo se ve beneficiado, sin embargo, el hospedero no se ve afectado; 3) el parasitismo en el que el microorganismo depende del hospedero, además de que puede causar daño (Suárez, 2012). Según los datos obtenidos del proyecto Human Microbiome y el MetaHIT se ha estimado que la microbiota intestinal humana consta de al menos 2776 especies bacterianas clasificadas en 11 filos (Bilen *et al.*, 2018; Huttenhower *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014). Dentro de estos, los filos Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria y Bacteroidetes constituyen más del 90% de la microbiota intestinal (Bilen *et al.*, 2018).

La microbiota intestinal desempeña múltiples funciones en el organismo. Constituye una barrera intestinal, estimula la regeneración de las células epiteliales intestinales, produce moco y ácidos grasos de cadena corta (AGCC; Paassen *et al.*, 2009). La microbiota también participa en la maduración del sistema inmunológico, innato y adaptativo (Nell *et al.*, 2010), promueve la síntesis y el metabolismo de nutrientes, hormonas y vitaminas; y juega un papel importante en la eliminación de drogas y venenos (Palacio *et al.*, 2016). Además, la microbiota evita la colonización del intestino por microorganismos patógenos al competir con ellos o mediante la liberación de péptidos antimicrobianos (Sekirov *et al.*, 2010). Durante el desarrollo cerebral la microbiota intestinal modula la mielinización en la corteza prefrontal, una estructura importante en el proceso del aprendizaje y la memoria (Stilling *et al.*, 2016).

4.4.1 El eje microbiota- intestino- cerebro

En la última década las investigaciones apuntan a que el cerebro y el intestino se mantienen en constante comunicación, y cada vez es más aceptado que la microbiota intestinal ejerce influencia sobre el comportamiento y la fisiología del huésped (Figura 3; Clemente *et al.*, 2012; Cryan & Dinan, 2012; Dinan & Cryan, 2017). Los mecanismos y vías por los cuales se lleva a cabo esta comunicación, aun requieren de investigación; no obstante, a la fecha se cree que el sistema endocrino, el sistema inmunológico, el sistema nervioso entérico (SNE), el sistema nervioso autónomo (SNA) y el nervio vago (NV) son los principales encargados de esta comunicación bidireccional (Collins, 2012; Cryan *et al.*, 2019; Mayer *et al.*, 2014; Sommer, 2016).

Recientemente se ha observado que el intestino puede intercambiar información con el cerebro mediante dos vías neurales. La primera vía es a través del SNE y el NV. Para que ocurra la activación de esta vía se propone que las bacterias pueden estimular directamente a las neuronas aferentes del SNE, y al nervio vago (Borre *et al.*, 2014). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que algunos de los efectos de la microbiota intestinal o de los probióticos pueden ser independientes de la activación vagal (Bauer *et al.*, 2016; Forsythe & Bienenstock, 2018). La segunda vía propuesta es a través de la comunicación del SNE que inerva el intestino con el SNA y NV. Esta vía se divide en varios relevos, iniciando con la activación de los ganglios mientéricos, los ganglios submucosos y las células gliales intestinales (Schemann & Neunlist, 2004); el segundo relevo ocurre en los ganglios prevertebrales que regulan las respuestas reflejas viscerales periféricas (Szurszewski, 1981); el tercer relevo es el SNA en la médula espinal y el núcleo del tracto solitario en el tronco encefálico y el núcleo dorsal del vago (Chang *et al.*, 2003). El cuarto relevo ocurre en los centros cerebrales superiores, donde la información de los centros corticales y subcorticales, incluidos los ganglios basales, se canaliza hacia los núcleos específicos del tronco encefálico, desde donde se controlan muchas funciones gastrointestinales (Wang & Wang, 2016).

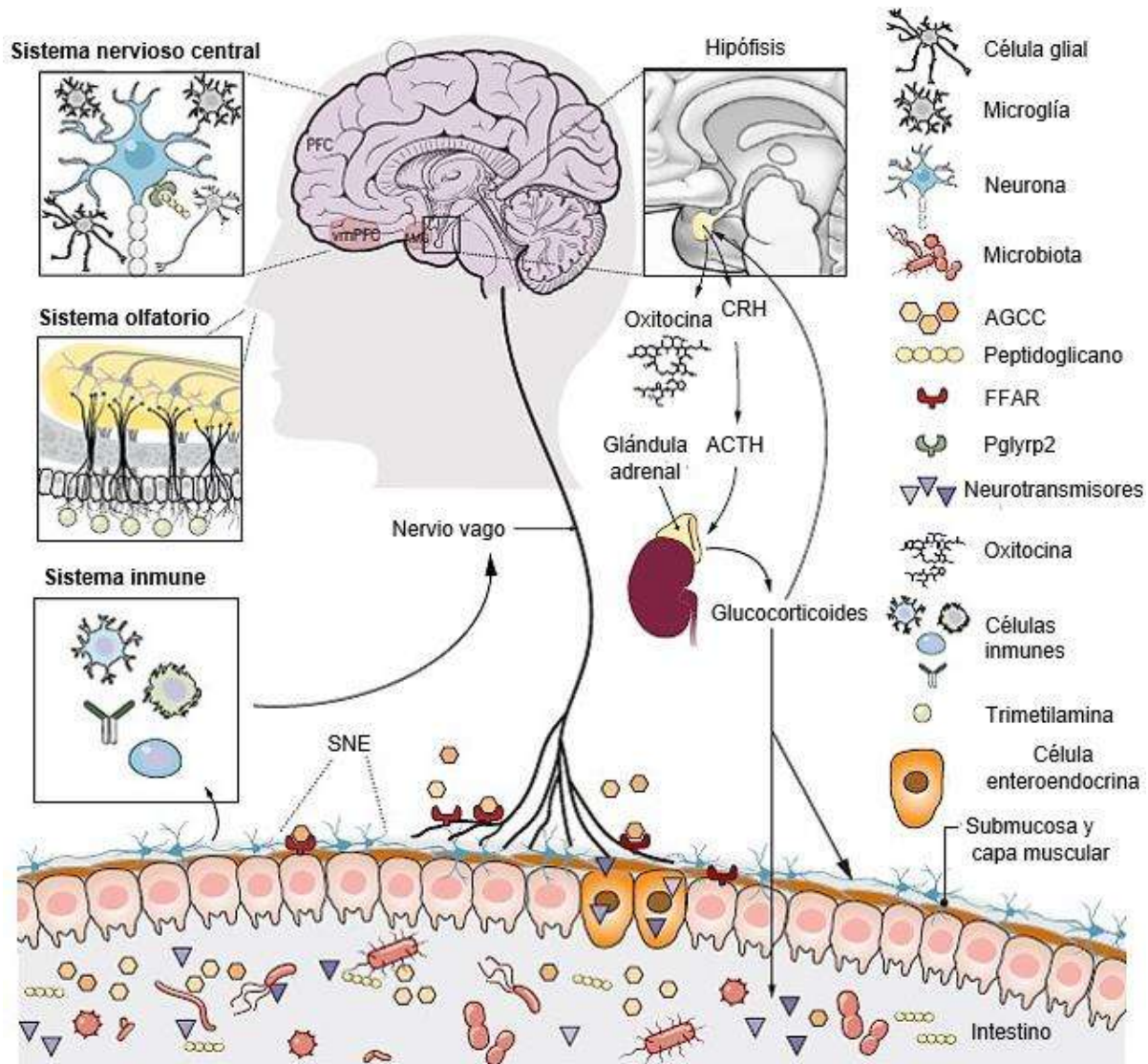


Figura 3. Eje microbiota-intestino-cerebro. Existen diferentes vías por las cuales el intestino y el cerebro se comunican. Las vías más estudiadas son el sistema nervioso entérico (SNE), el nervio vago y el sistema inmunológico. Las principales moléculas de señalización de este eje son los neurotransmisores, las hormonas y los ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Además, algunos componentes de la pared celular de las bacterias como el péptidoglicano pueden estimular al sistema inmunológico o directamente activar los receptores de reconocimiento de patógenos específico (PGLYRP2). Hormona liberadora de corticotropina (CRH), hormona adrenocorticotropa (ACTH), receptores de ácidos grasos libres (FFAR). (Imagen tomada y modificada de Sherwin *et al.*, 2019).

Además de la vía neural, la microbiota produce diversas moléculas (metabolitos y neurotransmisores) que sirven como mensajeros para establecer la comunicación con el cerebro (Cryan *et al.*, 2019). Las moléculas producidas por la microbiota incluyen a los AGCC, los metabolitos de los ácidos biliares, algunos neurotransmisores como GABA, 5-HT y las catecolaminas (Cryan *et al.*, 2019; Dinan & Cryan, 2017; O'Mahony *et al.*, 2014). De forma complementaria, las bacterias

pueden producir moléculas de detección de quórum las cuales regulan la expresión génica (principalmente en la producción de metabolitos y la patogenicidad) tanto en la bacteria que las secreta como en otras bacterias de la misma comunidad, provocando una respuesta global. Además, estas moléculas pueden influir en las células enteroendocrinas y en las terminaciones nerviosas que inervan el intestino (Rhee *et al.*, 2009). También, la microbiota intestinal puede modular la actividad del sistema inmune y la inflamación promoviendo la liberación de citocinas pro o antiinflamatorias. Las citocinas a su vez, pueden modular algunas funciones cerebrales como la conducta (Bailey *et al.*, 2011).

Los AGCC son los productos de la digestión bacteriana de los carbohidratos. Los AGCC pueden desarrollar funciones como la regulación de la producción de 5-HT y del péptido YY a nivel intestinal (Holzer *et al.*, 2012). Se les atribuye diversas funciones fisiológicas como la reducción de la ingesta de alimentos, la mejora de la tolerancia a la glucosa y la modulación de algunos componentes del sistema inmune (Cani *et al.*, 2013; Layden *et al.*, 2013; Vinolo *et al.*, 2011). Además, se ha descrito que el butirato puede regular la expresión de diversos genes al reducir la expresión de la histona desacetilasa (Stilling & Dinan, 2014).

Por otra parte, la microbiota está relacionada con la producción de neurotransmisores. Por ejemplo, *Bifidobacterium infantis* es capaz de elevar los niveles de triptófano en sangre y, por ende, a los niveles de 5-HT (O'Mahony *et al.*, 2014). *Candida* spp, *Escherichia coli*, *Streptococcus thermophilus* y *Enterococcus* spp se relacionan con un aumento en la producción de 5-HT. *Lactobacillus* spp pueden liberar norepinefrina, y *Bifidobacterium* pueden producir GABA. Por otra parte, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis* y *Proteus vulgaris* aumentan las concentraciones de dopamina y *Lactobacillus* spp de acetilcolina a nivel intestinal (Clarke *et al.*, 2014; Lyte, 2014).

4.4.2 La microbiota intestinal y el eje HPA

La investigación sobre la conexión entre el eje HPA y la microbiota se ha llevado a cabo principalmente en modelos de roedores GF. Las primeras investigaciones mostraron que los animales GF desarrollaron una respuesta alterada al estrés,

presentando niveles de GCs y ACTH significativamente más elevados que los animales control. Sin embargo, la colonización con microbiota restauró estas alteraciones (Sudo *et al.*, 2004). Esto sugirió que la microbiota desempeñaba un papel importante en la modulación de la respuesta al estrés. Además, Diversos trabajos mostraron que el uso de probióticos como *Lactobacillus helveticus* y *Bifidobacterium longum* pueden normalizar los niveles de GCs causados por una alterada regulación del eje HPA (Desbonnet *et al.*, 2010; Gareau *et al.*, 2007; Moussaoui *et al.*, 2014).

El hipocampo es una estructura altamente sensible a la disbiosis intestinal. En ratones GF se observó una disminución en la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), un factor importante en la plasticidad cerebral en el hipocampo (Neufeld *et al.*, 2011). Adicionalmente, los animales GF presentaron neuronas piramidales hipocampales más cortas, menos ramificadas y con un menor número de espinas (Luczynski *et al.*, 2016). Por el contrario, las neuronas piramidales de la amígdala exhibieron hipertrofia (Luczynski *et al.*, 2016).

4.4.3 Estrategias para modificar la microbiota intestinal

Durante las últimas décadas el uso de animales GF ha sido una herramienta útil para estudiar la relación microbiota-hospedero y controlar posibles variables de confusión. La investigación en animales GF ha permitido demostrar que la microbiota desempeña un papel fundamental en la modulación de diversas funciones cerebrales. Por ejemplo, los animales GF presentaron un comportamiento social deteriorado (Lardenoije *et al.*, 2015), alteraciones en los niveles de neurotransmisores (Heijtz *et al.*, 2011) e hipermielinización en la corteza prefrontal (Stilling *et al.*, 2015). Adicionalmente muestran alteraciones en la neurogénesis hipocampal (Kundu *et al.*, 2019; Scott *et al.*, 2020), la microglía (Erny *et al.*, 2015), la conducta (Heijtz *et al.*, 2011; Sudo *et al.*, 2004) y una respuesta alterada al estrés (Sudo *et al.*, 2004) .

Si bien, el uso de animales GF ha sido sumamente importante, tienen serias limitaciones. Particularmente se sabe que la microbiota es dinámica y cambia

constantemente, sin embargo, durante la infancia es muy susceptible a influencias ambientales (Cryan *et al.*, 2019). Así, la microbiota intestinal se considera un "agente ambiental" que modifica el desarrollo del cerebro durante los primeros años de vida (Heijtz *et al.*, 2011). Por lo tanto, criar animales en condiciones de GF podría producir efectos de confusión. De hecho, se ha observado que los animales criados como GF presentan alteraciones conductuales, neuroendocrinas y neuroinmunes similares a las observadas después de ELS (Arias *et al.*, 2014; De Palma *et al.*, 2015; Huo *et al.*, 2017; Johnson & Burnet, 2020).

Como alternativa, la AIMD en animales criados normalmente ha sido utilizada como una estrategia sencilla para evaluar el papel del microbioma intestinal en condiciones patológicas. La AIMD abate las poblaciones bacterianas en roedores que fueron colonizados normalmente desde el nacimiento, evitando así los efectos indeseables de criar animales en condiciones de G F (Moloney, *et al.*, 2016; Kennedy *et al.*, 2018). En adultos, la AIMD se ha asociado con alteraciones neuroendocrinas, disminución de la neurogénesis del hipocampo y cambios en la conducta de ansiedad y la conducta tipo depresiva (Guida *et al.*, 2018; Moloney, *et al.*, 2016). Además, se ha observado que la AIMD mejora la homeostasis de la glucosa y protege contra el desequilibrio metabólico inducido por una dieta rica en grasas (Carvalho *et al.*, 2012; Suárez-Zamorano *et al.*, 2015). En humanos, la exposición recurrente a antibióticos se ha relacionado con un mayor riesgo a sufrir depresión y ansiedad, esto se cree que es debido a la incapacidad de la restauración de la microbiota intestinal después de repetidas perturbaciones con antibióticos (Dethlefsen & Relman, 2011; Ido *et al.*, 2015).

En la etapa adulta la arquitectura de la microbiota se vuelve más estable y resistente a las perturbaciones, sin embargo, puede verse afectada por la dieta, los probióticos y los prebióticos (Cryan *et al.*, 2019). La modulación de la microbiota mediante el uso de probióticos y prebióticos se realiza con la finalidad de mejorar la salud del organismo. Los probióticos son microorganismos vivos benéficos, los prebióticos son principalmente fibras de origen vegetales que sirven como alimento a ciertos tipos de bacterias (Markowiak & Ślizewska, 2017). Algunos estudios preclínicos han demostrado que la ingestión de prebióticos y probióticos puede modular el

comportamiento (Ait-Belgnaoui *et al.*, 2014; Desbonnet *et al.*, 2010; Donoso *et al.*, 2020).

La transferencia de microbiota fecal es otro tipo de modulación de la microbiota. Esta técnica consiste en la manipulación de la microbiota a través del trasplante de microbiota fecal, donde la microbiota fecal de un donante sano se trasplanta al tracto intestinal de un paciente (Weingarden & Vaughn, 2017). Este tipo de modulación aun no es muy utilizado en la clínica, pero se han obtenido resultados satisfactorios como terapia en infecciones de *Clostridium difficile* (Hamilton *et al.*, 2012). Si bien, la TMF tradicionalmente se ha utilizado en individuos que poseen un ecosistema bacteriano nativo, recientemente se ha sugerido que su eficiencia puede ser mayor si se realiza en individuos previamente sometidos a AIMD.

V. ANTECEDENTES

Resultados previos de nuestro grupo de investigación mostraron que la SM causa una conducta tipo depresiva y afecta el metabolismo a largo plazo (Ruiz *et al.*, 2018; Vargas *et al.*, 2016). Además, se ha reportado que la SM causa alteraciones en la neurogénesis hipocampal. En efecto, Deepika suri y colaboradores mostraron que la SM provoca una disminución de la neurogénesis hipocampal, acompañada de una disminución en la expresión de BDNF en animales adultos (Suri *et al.*, 2013). Se sabe que la neurogénesis hipocampal es de suma importancia en la regulación del eje HPA. Snyder y colaboradores observaron que la inhibición de la neurogénesis hipocampal causó alteraciones en la regulación negativa del eje HPA, lo cual demostró que las neuronas nacidas en el nicho neurogénico del hipocampo en los animales adultos son fundamentales para mantener una respuesta normal al estrés (Snyder *et al.*, 2012). Lo anterior sugiere que los efectos de la SM sobre la neurogénesis hipocampal pueden ser uno de los mecanismos que subyacen a los efectos a largo plazo sobre la reactividad del eje HPA.

La relación entre el ELS y la microbiota intestinal ha sido un tema de interés en los últimos años. O'Mahony y colaboradores demostraron mediante PCR y electroforesis en gel de gradiente desnaturizante del gen del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) 16s que el perfil bacteriano de los animales sometidos a ELS fue distinto al de los animales control (O'Mahony *et al.*, 2009). Posteriormente, Moussaoui y colaboradores mostraron que el aumento de los niveles de corticosterona causados por el ELS provocan una mayor permeabilidad intestinal, lo que se relaciona con la disbiosis intestinal (Moussaoui *et al.*, 2014). Además, Desbonnet y colaboradores observaron que la administración de probióticos durante el periodo de la SM previno el aumento en la permeabilidad intestinal y la elevación de la corticosterona (Desbonnet *et al.*, 2010).

Por otra parte, el uso de los animales GF permitió estudiar el papel de la microbiota intestinal en el desarrollo de los efectos del ELS. De Palma y colaboradores, utilizando animales GF, mostraron que la SM afecta el eje HPA de una manera independiente de la microbiota. No obstante, la microbiota intestinal es necesaria

para la inducción de alteraciones conductuales causadas por la SM. Además, la colonización de los animales GF con microbiota procedente de los animales libres de patógenos específicos (SPF; controles) produjo distintos perfiles bacterianos en los animales control y en los animales SM. Adicionalmente la colonización causó alteraciones en el comportamiento de los animales SM, pero no en los animales control (De Palma *et al.*, 2015).

Hasta la fecha la evidencia acumulada muestra que la microbiota intestinal juega un papel importante como mediador de los efectos del ELS. No obstante, El uso de estrategias terapéuticas que modifiquen la microbiota intestinal en animales adultos sometidos a ELS ha sido poco estudiado.

VI. HIPÓTESIS

La transferencia de microbiota fecal en combinación con la depleción de microbiota inducida por antibióticos revertirá los efectos del estrés temprano.

VII. OBJETIVOS

7.1 General:

Determinar si la transferencia de microbiota fecal en combinación con la depleción de microbiota inducida por antibióticos revierte los efectos de la separación maternal de forma estable en un modelo de animales sucios.

7.1.1 Específicos:

1. Evaluar los efectos de la depleción de microbiota inducida por antibióticos en animales sometidos a separación maternal (neurogénesis, conducta y metabolismo).
2. Evaluar si los efectos de la separación maternal sobre la memoria, la neurogénesis hipocampal, la conducta tipo depresiva, el riesgo metabólico y la disbiosis intestinal son revertidos inmediatamente después de terminar la transferencia de microbiota fecal.
3. Evaluar la durabilidad de los efectos de la transferencia de microbiota fecal un mes después de ser interrumpida.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

Para todos los experimentos se obtuvieron ratas gestantes sincronizadas de la cepa Sprague-Dawley del bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, las cuales se dejaron habituar en nuestras instalaciones por una semana antes del parto. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas a una temperatura de 22°C, un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (luz encendida de 7:00 am a 7:00 pm) y acceso libre a comida (Purina, Lab Diet, EE. UU.) y agua. Cada grupo experimental contó con crías provenientes de al menos 4 madres diferentes. Al destete los animales fueron alojados en grupos de 4 ratas por caja. Se utilizaron solo los animales machos. Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo entre las 9:00 y las 13:00 horas y fueron aprobados por el comité nacional de ética del Instituto Mexicano del Seguro Social (R-2017-785-077). Además, los procedimientos se apegaron a las especificaciones de la norma mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Para el objetivo específico 1 (Figura 4A) los grupos estuvieron integrados por 8 a 10 individuos. El día de nacimiento de las crías fue considerado como día postnatal (DPN) 0. Al DPN 1 las crías fueron mezcladas y de forma aleatoria se asignaron a una camada. Las camadas estuvieron conformadas por 10 individuos (8 machos y 2 hembras). La mitad de las camadas fueron asignadas al grupo SM y la otra mitad al grupo control (CONT). Las crías del grupo SM fueron sometidas al protocolo de SM. Las crías del grupo CONT permanecieron sin alteraciones a excepción de la limpieza de rutina. Al DPN 21 los animales fueron destetados y se dejaron crecer en condiciones estándar de bioterio (STD) hasta el DPN 60. La mitad de los animales de cada grupo (CONT y SM) fueron sometidos a la AIMD del DPN 60 al 90 y el resto de animales permanecieron en condiciones estándar. Posteriormente se evaluaron los efectos de la AIMD.

Para el objetivo específico 2 (Figura 4B) se realizó el mismo diseño metodológico que para el objetivo específico 1. Sin embargo, después de la AIMD se realizó la TMF. Para esto, los animales con AIMD (receptores) fueron colocados a cohabitar por 2 meses (DPN 90 al 120) con los animales que permanecieron en condiciones

STD (donadores). Posteriormente se evaluaron los efectos de la TMF en combinación con la AIMD. Adicionalmente, un grupo independiente de animales se utilizó para evaluar si la TMF revertía los efectos de la AIMD. Para esto, un grupo de animales CONT sometidos a AIMD fueron colocados a cohabitar por un mes con un grupo de animales CONT que mantuvo su microbiota intacta.

Para el objetivo específico 3 (Figura 4C) se realizó el mismo diseño metodológico empleado para el objetivo específico 1 y 2. No obstante, después de los 2 meses de la TMF se impidió la cohabitación por un mes. Esto para evaluar la durabilidad de los efectos de la TMF. Adicionalmente, se realizó la misma metodología en un grupo de animales en condiciones microbiológicamente controladas (animales que contaron con material de cama, alimento, agua y aire estéril); posteriormente evaluamos las diferencias entre la microbiota de los animales sucios vs los animales en condiciones microbiológicamente controladas.

Se evaluó el aprendizaje espacial en la prueba de desplazamiento de objetos, la conducta tipo depresiva en la prueba de nado forzado y la tolerancia a la glucosa. Adicionalmente, analizamos las concentraciones de corticosterona e insulina en plasma y la composición de la microbiota intestinal por qPCR. Se analizó la neurogénesis hipocampal mediante inmunotinciones contra Ki67 y doblecortina.

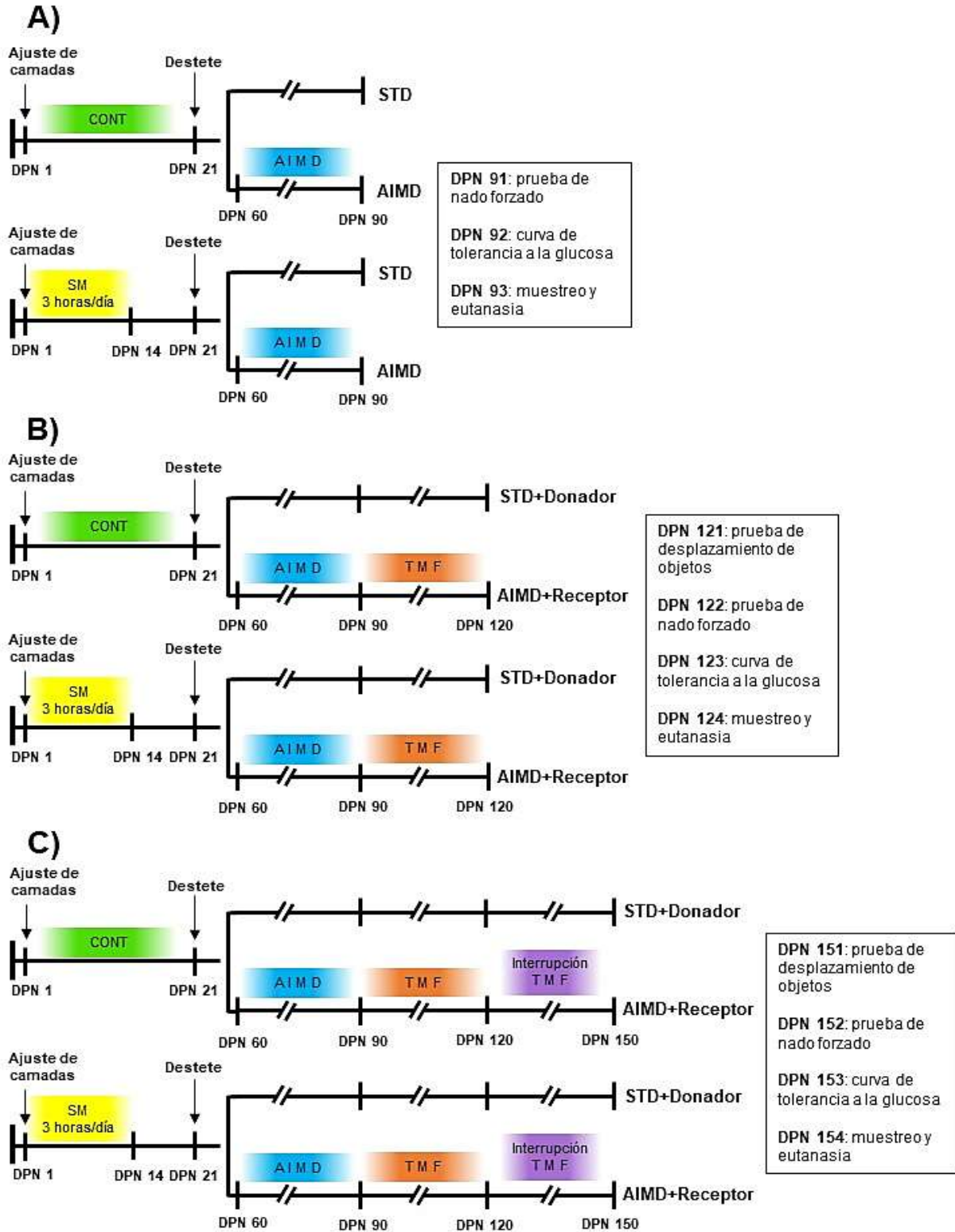


Figura 4. Diseño experimental. Línea de tiempo del diseño experimental del A) objetivo específico 1, B) objetivo específico 2 y C) objetivo específico 3.

8.1 Separación maternal (SM)

Para la SM, al DPN 1 las crías del grupo SM fueron separadas de su madre y colocadas en una caja de acrílico (temperatura controlada de 30-33°C), las crías fueron separadas por separadores de cartón. Las cajas de acrílico fueron colocadas en una habitación independiente al de la madre para evitar la comunicación mediante vocalizaciones. Después de la separación de 3 horas, las crías fueron devueltas a la jaula de sus respectivas madres. Este procedimiento se repitió sistemáticamente hasta el DPN 14 de las 9:00 a las 12:00 horas. Las crías del grupo CONT no fueron perturbadas a excepción de la limpieza de rutina (Ruiz-González *et al.*, 2022; Vargas *et al.*, 2016).

8.2 Depleción de microbiota inducida por antibióticos

Al día DPN 60 a la mitad de los animales de cada grupo se les administró un tratamiento con antibióticos durante 30 días. El esquema de antibióticos utilizados constó de ampicilina (1g/L), neomicina(1g/L), vancomicina (0.5g/L) y metronidazol (1g/L) administrados en el agua de los bebederos. Los antibióticos fueron sustituidos cada tercer día para evitar la pérdida de su actividad. Los animales fueron monitoreados durante la administración de los antibióticos y no se observaron señales visibles de distrés o pérdida de peso (Ekmekciu *et al.*, 2017; Ruiz-González *et al.*, 2022; Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004).

8.3 Terapia de transferencia de microbiota fecal

Para la TMF, los animales AIMD (receptores) fueron colocados en cohabitación en las cajas de los animales que mantenían su microbiota intacta (donadores) durante dos meses. Específicamente, los animales SM+AIMD fueron colocados a cohabitar con animales CONT+STD, mientras que los animales CONT+AIMD fueron colocados en cohabitación con animales SM+STD.

8.4 Prueba de desplazamiento de objetos

Un día antes de la prueba los animales fueron colocados de forma individual en la arena (80x60x30 cm) durante 15 min para que se habituaran a la arena. El día de la prueba los animales fueron colocados en la arena en la cual había dos objetos idénticos y se les permitió explorar durante 10 minutos (familiarización). Se dio un intervalo inter ensayo de 1 hora y los animales fueron regresados a la arena durante 10 minutos. Sin embargo, en este caso uno de los objetos había sido desplazado. Se registro el tiempo durante el cual los animales exploraban (olfatear o tocar) el objeto desplazado y el objeto familiar. Ambos periodos fueron grabados con una cámara web y se utilizó el software EVENTLOG para el análisis de los datos (Roque *et al.*, 2021).

8.5 Prueba de nado forzado

Los animales se colocaron en un tanque de acrílico (55x35cm) con 4/5 partes de agua limpia por 10 minutos, durante los cuales fueron grabados con una cámara web. Se registro el tiempo durante el cual la rata presentaba una conducta activa (escalamiento, las patas delanteras del animal rompían el plano del agua) o una conducta pasiva (inmovilidad, el animal solo presentaba movimientos que le permitieran tener la cabeza fuera del agua). Los datos fueron analizados mediante el software EVENTLOG. El agua fue cambiada entre cada grupo para evitar la contaminación cruzada (Roque *et al.*, 2021).

8.6 Curva de tolerancia a la glucosa

Los animales permanecieron en ayunas durante 12 horas. A las 9 AM, a los animales se les pinchó la cola para coleccionar muestras de sangre. Posteriormente se administró una carga de glucosa 1g/kg (50%, DX-50; Pisa) intraperitonealmente y se coleccionaron muestras 30, 60 y 120 min después de la administración de la glucosa. Las concentraciones de glucosa fueron evaluadas utilizando un glucómetro comercial (Ruiz-González *et al.*, 2022).

8.7 Recolección de muestras

Se realizó eutanasia a los animales con una sobredosis de pentobarbital sódico vía intraperitoneal. Inmediatamente se obtuvieron muestras de sangre intracardiaca colectadas en microtubos de 1.5ml con 0.5µl de EDTA (10%) y 10µl de Aprotinina. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 9600rpm/10 min y el plasma se almacenó a -30°C.

Para la recolección de las muestras de contenido de ciego se realizó una incisión en la línea media del estómago y se expuso el ciego, el cual fue ligado y extraído para coleccionar su contenido en microtubos estériles de 1.5ml. Los microtubos fueron almacenados a -30°C.

Inmediatamente después los animales fueron perfundidos por vía intracardiaca con 200 ml solución NaCl 0.9% y 200 ml paraformaldehído al 4% (PFA) en buffer de fosfatos (PB) 0.1 M. Los cerebros fueron disecados y colocados en PFA por 24 horas y después fueron transferidos a soluciones seriadas de sacarosa al 20% y 30%. Los cerebros fueron almacenados en refrigeración.

8.8 Evaluación de corticosterona, insulina, colesterol y triglicéridos en plasma

Las concentraciones de corticosterona e insulina en plasma se evaluaron utilizando kits de ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (Corticosterone ELISA kit ENZO, rat insulin ELISA kit CrystalChem), siguiendo las instrucciones del fabricante. La evaluación de las concentraciones de triglicéridos y colesterol en plasma se llevó a cabo utilizando ensayos colorimétricos estándar (RANDOX, London), siguiendo las indicaciones del fabricante.

8.9 Inmunohistoquímica

Los cerebros fueron procesados en un criostato, se realizaron cortes de 40µm de grosor a lo largo del eje lateral-medial del hipocampo. Los cortes se colocaron en tubos con solución crioprotectora (25% etilenglicol, 25% glicerina y 50% PB) y fueron almacenados en refrigeración. Los cortes sagitales fueron seleccionados de

manera aleatoria (240 μm de distancia entre cada uno) para realizar las inmunotinciones contra doblecortina (DCX) y Ki67.

Los cortes fueron lavados con PB para eliminar la solución crioprotectora, se incubaron en PBT (PB + triton 0.3%) con peróxido de hidrógeno al 10% (H_2O_2) y después en metanol absoluto. Los cortes se colocaron en solución de bloqueo (PBT + suero de caballo 5%) y posteriormente se incubaron durante toda la noche en una solución de anticuerpo primario (cabra anti DCX marca Santa Cruz Biotechnology, 1:1500 y conejo anti Ki67 ABCAM 1:1500). Después los cortes fueron incubados en una solución de anticuerpo secundario biotinilado (burro anti cabra, Vector Laboratories, 1:750 y: anti conejo, ABCAM, 1:750). Para la visualización de utilizó el sistema de amplificación de avidina-biotina (Elite ABC kit, Vector Laboratories) y el sistema de revelado Ni-DAB (DAB staining kit, Vector Laboratories). Entre cada paso los cortes fueron lavados con PB. Se realizaron tinciones de contraste con hematoxilina si era necesario. 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 (mm^2) 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 (40 μm) multiplicado por la distancia de muestreo (240 μm). Se calculó la densidad total de células marcadas con DCX (No cels/ mm^3) mediante el uso de la formula $N_v = Q/ah$ donde Q es el número de células marcadas, a el área de cada corte y h la distancia entre cada corte (Ruiz *et al.*, 2018).

8.10 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

La extracción del ADN de las muestras de contenido de ciego se llevó a cabo mediante el uso de un kit de extracción de ADN de muestras fecales (ISOLATE Fecal DNA Kit, BIOLINE), siguiendo las indicaciones del fabricante. Cada una de las reacciones de qPCR estaba compuesta por 100ng de ADN, Master Mix (iTaq™

Universal SYBR® Green Supermix, Bio-Rad) y oligonucleótidos (directo e inverso, 10µM/µL each, Invitrogen, Camarillo, CA; Tabla 1) para ARN ribosomal 16S específicos para cada especie. La qPCR se realizó por 40 ciclos utilizando el equipo CFX 96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Cada muestra se analizó por duplicado. Se construyeron curvas estándar para cada gen y se obtuvo el número de copias del gen de ARNr 16s de *Bacteroides fragilis*, *Bifidobacterium longum* subsp. *Longum*, *Clostridium coccooides*, *Clostridium leptum* y *Lactobacillus* spp. Para cada curva estándar se realizó una PCR punto final usando los oligonucleótidos de interés. El producto de la PCR fue sometido a una electroforesis en un gel de agarosa (0.5%). Se recortó la sección de interés del gel y fue colocada en un microtubo (con un orificio en el fondo) de 600µl que contenía fibra de vidrio en el fondo. Este sistema se colocó en un microtubo de 1.5ml y se centrifugó a 12000 rpm. A la solución líquida contenida en el microtubo de 1.5ml se le agregó 100µl cloroformo y fue centrifugada por 5 min a 12000 rpm. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo donde se le agregó 15µl de NaCl (2M) y 150µl de isopropanol, se almacenó en refrigeración durante 30 min y posteriormente fue centrifugada por 5 min a 12000 rpm. La fase acuosa fue desechada y a la pastilla formada se le agregó 50µl etanol al 70% y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min. Se desechó el etanol y el precipitado se dejó secar. Posteriormente el precipitado fue resuspendido en 50µl agua destilada estéril. Se evaluó la concentración del ADN por medio de un nanodrop y mediante la ecuación matemática “número de copias = (concentración de ADN*6.022x10²³) / (número de pares de bases del amplicon*1x10⁹*660)” se obtuvo el número de copias por µl. Para construir la curva estándar se ajustó la concentración a 1x10¹⁰ número de copias/µl y se realizaron diluciones 1:10 hasta 1x10⁶ número de copias/µl. La qPCR se realizó en apego a las normas Minimum Information for the Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (Bustin *et al.*, 2009).

Tabla 1. Oligonucleótidos específicos.

Especie bacteriana	Primer	Secuencia	Tamaño de Amplicon (pb)
Bacterias totales	F	GCA GGC CTA ACA CAT GCA AGT C	292
	R	CTG CTG CCT CCC GTA GGA GT	
<i>Bifidobacterium longum</i> <i>subsp. Longum</i>	F	TTC CAG TTG ATC GCA TGG TC	831
	R	GGG AAG CCG TAT CTC TAC GA	
<i>Lactobacillus spp</i>	F	AGC AGT AGG GAA TCT TCC A	341
	R	CAC CGC TAC ACA TGG AG	
<i>Bacteroides Fragilis</i>	F	ATA GCC TTT CGA AAG RAA GAT	495
	R	CCA GTA TCA ACT GCA ATT TTA	
<i>Clostridium coccooides</i>	F	AAA TGA CGG TAC CTG ACT AA	440
	R	CTT TGA GTT TCA TTC TTG CGA A	
<i>Clostridium leptum</i>	F	GCA CAA GCA GTG GAG T	239
	R	CTT CCT CCG TTT TGT CAA	

8.11 Análisis estadísticos

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software GB-STAT v6.0. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para el índice de discriminación, el tiempo de escalamiento, el tiempo de inmovilidad, las concentraciones de corticosterona, insulina, colesterol y triglicéridos en plasma, el número de células DCX+ y de células Ki67+ y el número de copias del gen de ARNr 16s. Para la curva de tolerancia a la glucosa se realizó una ANOVA de tres vías de medidas repetidas. En todos los casos donde la ANOVA reveló diferencias significativas se realizó una prueba *post-hoc* de Newman-Keuls para evidenciar las diferencias entre grupos. Para los parámetros de la TMF de animales control estándar a los animales control con AIMD se utilizó una prueba *t de Student*. Los datos se presentan como el promedio del grupo (Prom) \pm error estándar (EST). La significancia estadística se estableció como $p \leq 0.05$.

IX. RESULTADOS

9.1 La AIMD replicó los efectos de la SM, pero no los exacerbó

9.1.1 Efectos de la SM y la AIMD sobre el peso del ciego

El ANOVA de dos vías indicó un efecto significativo de la AIMD sobre la carga bacteriana total del ciego ($F_{1,16}$: 167.1, $p < 0.0001$) y el peso relativo del ciego ($F_{1,16}$: 50.6, $p < 0.0001$), pero no sobre la masa corporal (Tabla 2). Las comparaciones múltiples mostraron que la AIMD causó una disminución de más del 99% en la carga bacteriana total en comparación con las ratas STD ($p < 0.0001$; Tabla 2). Las ratas tratadas con la AIMD también mostraron un mayor peso relativo del ciego en comparación con las ratas STD ($p < 0.0001$; Tabla 2). Al analizar las especies bacterianas específicas por qPCR (Tabla 2), se encontró una disminución significativa causada por la AIMD sobre el número de copias del gen de ARNr 16s de *Lactobacillus* spp ($F_{1,16}$: 184, $p < 0.0001$), *Bacteroides fragilis* ($F_{1,16}$: 43.5, $p < 0.0001$), *Clostridium coccooides* ($F_{1,16}$: 44.5, $p < 0.0001$) y *Clostridium leptum* ($F_{1,16}$: 78.9, $p < 0.0001$). Además, observamos un efecto significativo de la SM en *Lactobacillus* spp ($F_{1,16}$: 20.6, $p < 0.0003$) y *Bacteroides fragilis* ($F_{1,16}$: 31.1, $p < 0.0001$) en el número de copias del gen de ARNr 16s, pero no se observó efecto sobre *Clostridium coccooides* y *Clostridium leptum* (Tabla 2). Específicamente, las comparaciones múltiples revelaron una disminución del 50% en el número de copias del gen de ARNr 16s de *Lactobacillus* spp y una disminución del 91% de *Bacteroides fragilis* en las ratas SM en relación con los controles ($p < 0.0001$; Tabla 2).

Tabla 2: Efectos de la depleción de microbiota inducida por antibióticos y la separación maternal sobre el peso relativo del ciego y la microbiota intestinal.

	CONT+STD	SM+STD	CONT+AIMD	SM+AIMD
Masa corporal (g)	356.8 ± 8.8	370.1 ± 5.1	348.5 ± 9.85	356.2 ± 9.5
Peso relativo del ciego (g/kg)	25.3 ± 3.0	27.1 ± 1.4	84.4 ± 8.4**	75.7 ± 12.0**
Carga total de bacterias (%)	100 ± 13.5	91.08 ± 5.6	0.15 ± 0.05**	0.79 ± 0.19**
Lactobacillus spp (No. de copias del gen ARNr 16s x 10 ⁶)	303.5 ± 27.7	151.1 ± 11.4**	0.01 ± 0.002**	0.01 ± 0.003**
Bacteroides fragilis (No. de copias del gen ARNr 16s x 10 ⁶)	514.7 ± 75.0	43.0 ± 9.0**	< 0.01**	< 0.01**
Clostridium coccoides (No. de copias del gen ARNr 16s x 10 ⁶)	1545 ± 288	1134 ± 213	< 0.01**	< 0.01**
Clostridium leptum (No. de copias del gen ARNr 16s x 10 ⁶)	14.63 ± 1.4	11.6 ± 2.2	< 0.01**	< 0.01**

Animales control (CONT) o separación maternal (SM) en condiciones estándar (STD) o sometidos a depleción de microbiota inducida por antibióticos (AIMD). *Prom ± EST. ANOVA, **p < 0.01 vs CONT+STD. Masa corporal n=8, peso relativo del ciego y microbiota intestinal n=5.*

9.1.2 Efectos de la SM y la AIMD sobre la conducta tipo depresiva

El ANOVA de dos vías indicó un efecto principal de la AIMD ($F_{1,28}$: 7.4, $p= 0.01$) y de la SM ($F_{1,28}$: 4.7, $p= 0.03$) en el tiempo de escalamiento, pero no en su interacción. Las comparaciones múltiples revelaron que los animales CONT+AIMD ($p < 0.05$), SM+STD ($p < 0.05$) y SM+AIMD ($p < 0.01$) mostraron una disminución del tiempo de escalamiento en comparación con los animales CONT+STD (Figura 5A). Al evaluar el tiempo de inmovilidad, el ANOVA de dos vías mostró un efecto significativo de la SM ($F_{1,28}$: 9.1, $p= 0.005$), pero no de la AIMD o su interacción. Las comparaciones múltiples mostraron un aumento en el tiempo de inmovilidad en los grupos SM+STD ($p < 0.05$) y SM+AIMD ($p < 0.05$) en comparación con el grupo CONT+STD (Figura 5B).

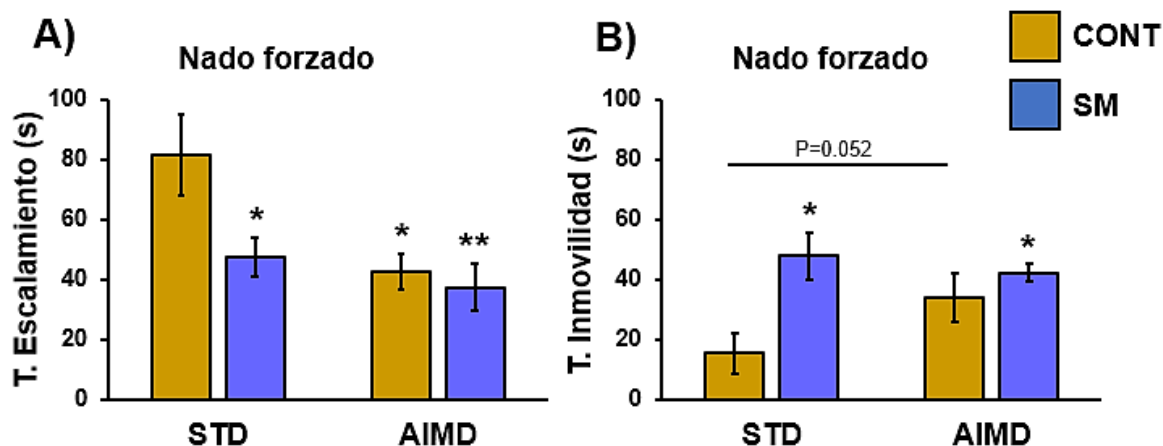


Figura 5. Efecto de la AIMD y la SM sobre la conducta de tipo depresiva. A) Tiempo de escalamiento y B) tiempo de inmovilidad de animales control (CONT) o separación maternal (SM) después mantenidos en condiciones estándar de bioterio (STD) o sometidos a depleción de microbiota inducida por antibióticos (AIMD). ($Prom \pm EST$, ANOVA, * $p \leq 0.05$ vs CONT+STD, ** $p \leq 0.01$ vs CONT+STD. $n=8$).

9.1.3 La AIMD atenuó el desbalance metabólico causado por la SM

La curva de tolerancia a la glucosa se realizó después de un ayuno nocturno de 12 horas (Figura 6A). El ANOVA de tres vías de medidas repetidas indicó un efecto principal del tiempo después de la administración de glucosa ($F_{2,56}$: 114, $p < 0.0001$) y de la SM ($F_{1,56}$: 5.5, $p = 0.02$), pero no de la AIMD, ni de sus interacciones. Las comparaciones múltiples no revelaron diferencias entre los grupos. El ANOVA de dos vías de los niveles de colesterol en plasma reveló un efecto significativo de la SM ($F_{1,28}$: 5.3, $p = 0.02$) y la AIMD ($F_{1,28}$: 4.5, $p = 0.04$), sin efecto de la interacción. Las comparaciones múltiples revelaron que los animales SM+STD mostraron un aumento significativo ($p < 0.05$) en los niveles de colesterol en comparación con los animales CONT+STD y CONT+AIMD (Figura 6B). Además, los animales SM+STD mostraron niveles de colesterol significativamente ($p < 0.05$) más altos en comparación con los animales SM+AIMD ($p < 0.05$ Figura 6B). No hubo efecto de los tratamientos sobre los niveles de triglicéridos en plasma (Figura 6C).

9.1.4 Tanto la SM como la AIMD aumentaron los niveles de corticosterona

El ANOVA de dos vías de los niveles de corticosterona mostró un efecto significativo de la SM ($F_{1,28}$: 11.9, p = 0.002) y la interacción ($F_{1,28}$: 5.5, p = 0.03), pero no de la AIMD. Las comparaciones múltiples revelaron que la SM provocó un aumento de los niveles de corticosterona tanto en condiciones STD (p < 0.01) como en la condición de AIMD (p < 0.05; Figura 6D). Además, Los animales CONT+AIMD mostraron mayores niveles de corticosterona en comparación con los animales CONT + STD (p < 0.05; Figura 6D).

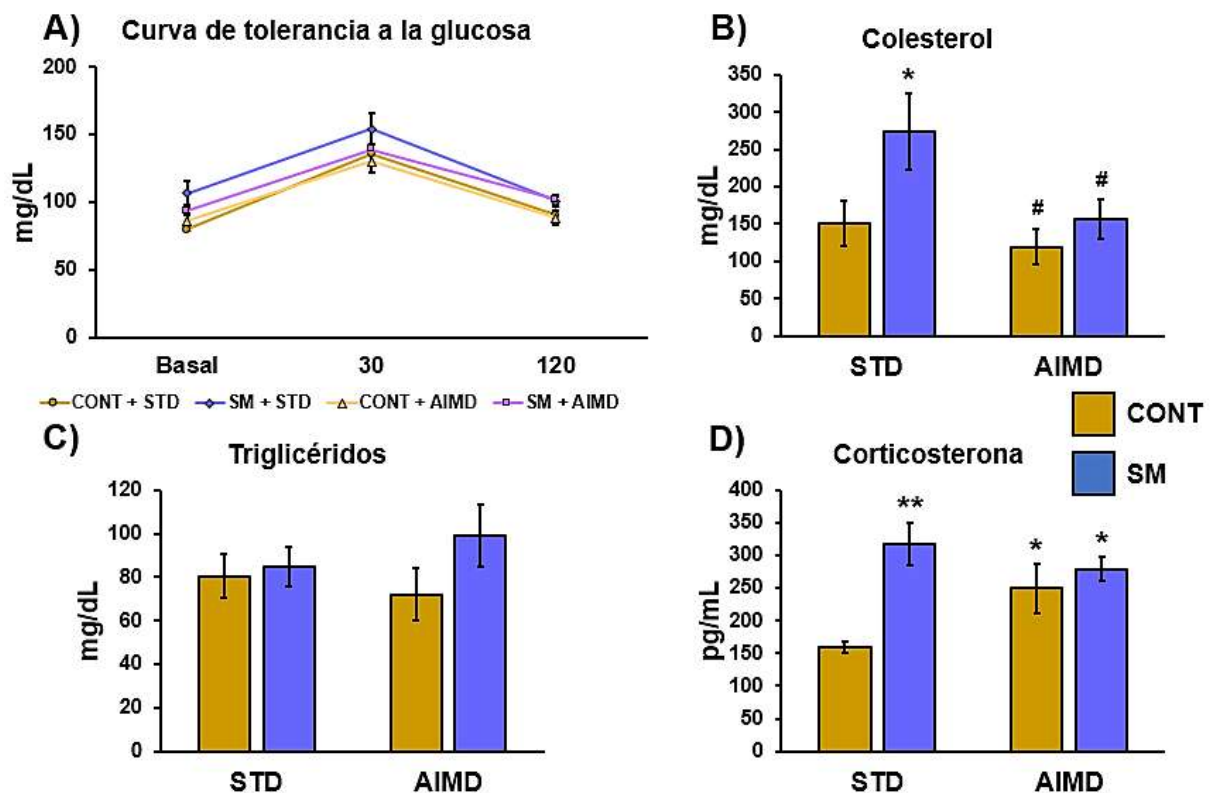


Figura 6. Efecto de la AIMD y la SM sobre los niveles de la glucosa, el colesterol, los triglicéridos y la corticosterona. A) Curva de tolerancia a la glucosa y concentraciones plasmáticas de B) colesterol, C) triglicéridos y D) corticosterona de animales control (CONT) o separación materna (SM) después mantenidos en condiciones estándar de bioterio (STD) o sometidos a depleción de microbiota inducida por antibióticos (AIMD). ($Prom \pm EST$, ANOVA, $*p \leq 0.05$ vs CONT+STD, $**p \leq 0.01$ vs CONT+STD, $\#p \leq 0.05$ vs SM+STD. $n=8$).

9.1.5 La AIMD y la SM disminuyeron el número de células DCX+

El ANOVA de dos vías del número de células DCX+ mostró un efecto significativo de la SM ($F_{1,28}$: 8.7, p = 0.006) y la interacción ($F_{1,28}$: 7.5, p = 0,01), pero no de la AIMD. Las comparaciones múltiples revelaron que los grupos SM+STD, CONT+AIMD y SM+AIMD presentaron una disminución (p < 0.05) en el número de células hipocampales DCX+ en comparación con el grupo CONT+STD (Figura 7B). No se observaron diferencias entre las ratas SM+STD y SM+AIMD (Figura 7B).

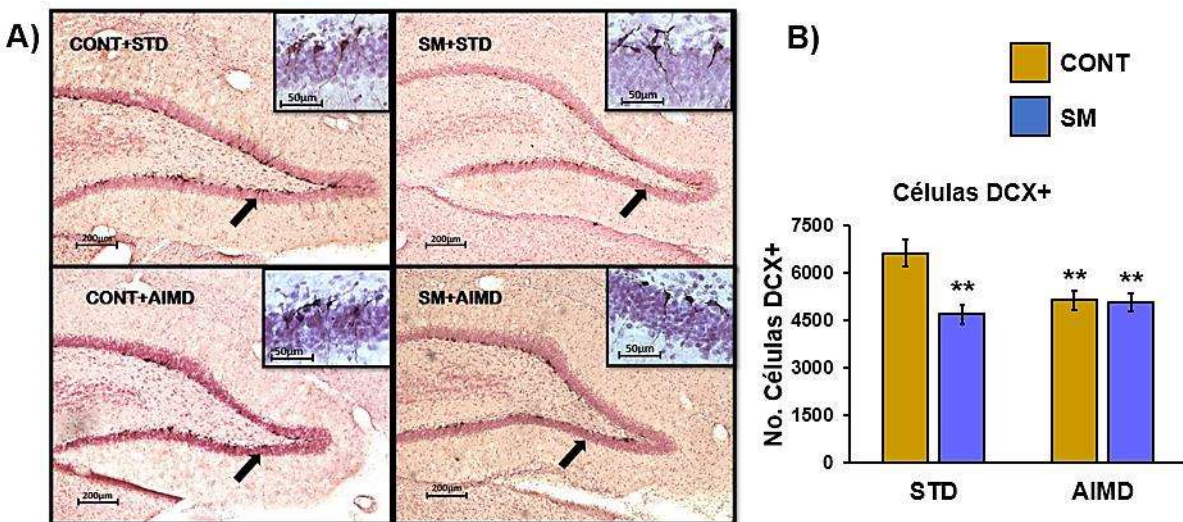


Figura 7. Efecto de la AIMD y la SM sobre la neurogénesis hipocampal. A) imágenes representativas de una inmunotinción contra el marcador de neuronas inmaduras DCX y B) estimación estereológica del número de células DCX+ de animales control (CONT) o separación maternal (SM) después mantenidos en condiciones estándar de bioterio (STD) o sometidos a depleción de microbiota inducida por antibióticos (AIMD). ($Prom \pm EST$, ANOVA, $**p \leq 0.01$ vs CONT+STD. $n=8$).

9.2 La TMF revirtió los efectos de la AIMD en animales control

9.2.1 La TMF restauró la composición de la microbiota intestinal después de la AIMD

Nuestros resultados mostraron que un mes de cohabitación con animales STD fue suficiente para restaurar la disbiosis intestinal causada por la AIMD. No observamos diferencias significativas en la masa corporal, el peso relativo del ciego, ni en la composición de la microbiota intestinal (Tabla 3).

Tabla 3: Efecto de la transferencia de microbiota fecal después de la depleción de microbiota inducida por antibióticos.

	CONT+STD	CONT+AIMD+TMF
Masa corporal (g)	424.87 ± 7.18	441.14 ± 5.87
Peso relativo del ciego (g/kg)	34.44 ± 1.59	37.11 ± 2.16
Lactobacillus spp (No. de copias del gen ARNr 16s x 10 ⁸)	6.50 ± 1.66	9.93 ± 2.97
Bifidobacterium longum subsp. Longum (No. de copias del gen ARNr 16s x 10 ⁸)	0.00025 ± 0.00003	0.00021 ± 0.00004
Bacteroides fragilis (No. de copias del gen ARNr 16s x 10 ⁸)	10.51 ± 4.46	8.05 ± 3.26
Clostridium coccoides (No. de copias del gen ARNr 16s x 10 ⁸)	11.76 ± 2.32	11.17 ± 2.05
Clostridium leptum (No. de copias del gen ARNr 16s x 10 ⁸)	0.17 ± 0.03	0.23 ± 0.06

Animales control (CONT) en condiciones estandar (STD) o con depleción de microbiota inducida por antibióticos (AIMD) y sometidos a transferencia de microbiota fecal (TMF). (Prom ± EST, t de Student. CONT+STD n= 8 y CONT+AIMD+TMF n= 7).

9.2.2 La TMF revirtió las alteraciones conductuales inducidas por la AIMD

El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los animales CONT+STD y los animales sometidos a AIMD en combinación con TMF sobre la memoria en la prueba de desplazamiento de objetos (Figura 8A). Tampoco observamos efectos significativos sobre los parámetros de escalamiento e inmovilidad en la prueba de nado forzado (Figura 8B y C).

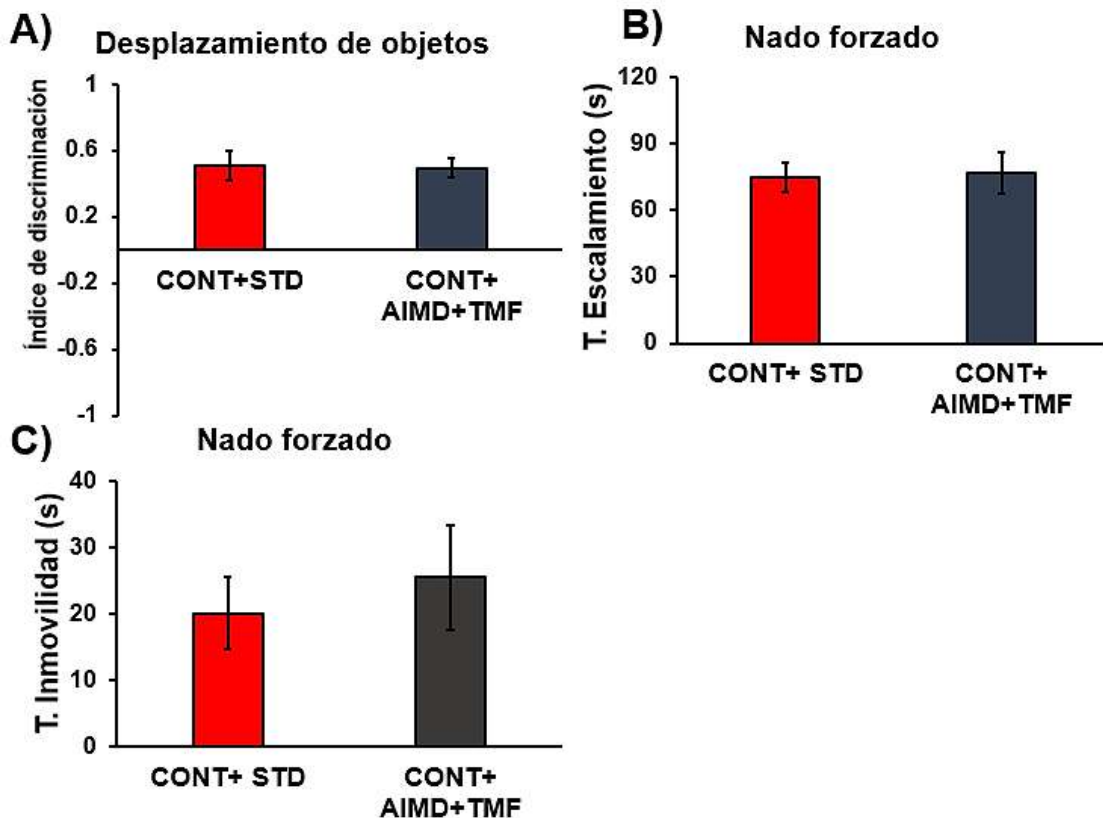


Figura 8. Efecto de la TMF sobre la memoria y la conducta tipo depresiva después de la AIMD.

A) Índice de discriminación entre el objeto conocido y el objeto desplazado en la prueba de desplazamiento de objetos y B) tiempo de escalamiento y C) tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado de animales control (CONT) mantenidos en condiciones estándar de bioterio (STD) o sometidos a depleción de microbiota inducida por antibióticos (AIMD) y posteriormente a transferencia de microbiota fecal (TMF). (*Prom* \pm *EST*, *t* de Student. CONT+STD *n*= 8 y CONT+AIMD+TMF *n*= 7).

Adicionalmente, observamos que no existen diferencias entre los animales CONT+STD y los animales sometidos a AIMD+TMF en la curva de tolerancia a la glucosa (Figura 9A). El análisis estadístico reveló que existe una disminución significativa ($p < 0.05$) de las concentraciones de corticosterona en plasma del grupo CONT+AIMD+TMF con respecto al grupo CONT+STD (Figura 9B).

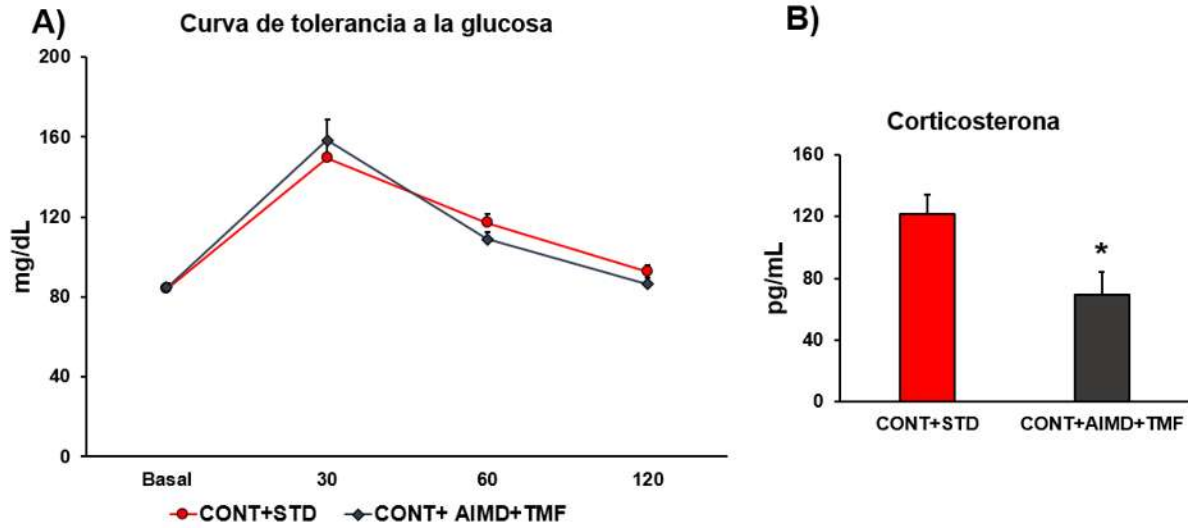


Figura 9. Efecto de la TMF sobre las concentraciones de glucosa y corticosterona en plasma después de la AIMD. A) curva de tolerancia a la glucosa y B) concentraciones de corticosterona en plasma de animales control (CONT) mantenidos en condiciones estándar de bioterio (STD) o sometidos a depleción de microbiota inducida por antibióticos (AIMD) y posteriormente a transferencia de microbiota fecal (TMF). (*Prom ± EST, t de Student, * $p \leq 0.05$ vs CONT+STD. CONT+STD $n=8$ y CONT+AIMD+TMF $n=7$.*)

9.3 La TMF en combinación con la AIMD revirtió los efectos de la SM

9.3.1 Efectos de la TMF en combinación con la AIMD sobre la microbiota intestinal

El ANOVA de dos vías del número de copias del gen de ARNr 16s de *Lactobacillus* spp no mostró efectos significativos de la SM o la TMF, pero sí de su interacción ($F_{1,31}$: 4.59, $p= 0.041$). Las comparaciones múltiples mostraron un aumento significativo del número de copias del gen de ARNr 16s en el grupo SM+AIMD+Receptor ($p< 0.05$) y CONT+AIMD+Receptor ($p< 0.05$) con respecto al grupo SM+STD+Donador (Tabla 4). Además, mediante una prueba de *t de Student* confirmamos que la SM disminuyó ($p<0.01$) el número de copias del gen de ARNr 16s de *Lactobacillus* spp al comparar con el grupo CONT+STD+Donador. El ANOVA de dos vías no reveló diferencias significativas en ninguna de las demás bacterias analizadas (*Bacteroides fragilis*, *Bifidobacterium longum subsp. Longum*, *Clostridium coccooides* y *Clostridium leptum*; Tabla 4). El ANOVA de dos vías no indicó un efecto significativo de los tratamientos sobre la masa corporal o el peso relativo del ciego (Tabla 4).

Tabla 4: Efectos de la transferencia de microbiota fecal en combinación con la depleción de microbiota inducida por antibióticos sobre la microbiota intestinal.

	CONT+STD+ Donador	SM+STD+ Donador	CONT+AIMD+ Receptor	SM+AIMD+ Receptor
Peso corporal (g)	407.0 ± 7.84	407.5 ± 9.18	404.25 ± 15.57	402.5 ± 13.87
Peso relativo del ciego (g/kg)	28.53 ± 2.42	28.48 ± 2.19	27.58 ± 1.7	29.35 ± 2.26
Lactobacillus spp (No. de copias del gen ARNr 16s x 10 ⁸)	12.83 ± 2.76	2.95 ± 0.96	11.08 ± 3.72 [#]	12.58 ± 2.4 [#]
Bifidobacterium longum subsp. Longum (No. de copias del gen ARNr 16s x 10 ⁸)	0.00012 ± 0.00001	0.00012 ± 0.00003	0.00011 ± 0.00001	0.00012 ± 0.00001
Bacteroides fragilis (No. de copias del gen ARNr 16s x 10 ⁸)	74.38 ± 71.63	9.21 ± 5.73	88.03 ± 84.17	105.63 ± 101.91
Clostridium coccoides (No. de copias del gen ARNr 16s x 10 ⁸)	67.45 ± 11.59	45.94 ± 7.34	69.40 ± 14.83	59.53 ± 15.46
Clostridium leptum (No. de copias del gen ARNr 16s x 10 ⁸)	1.60 ± 0.45	0.35 ± 0.14	1.40 ± 0.71	1.69 ± 0.60

Animales control (CONT) o separación maternal (SM) en condiciones estándar (STD) o sometidos a depleción de microbiota inducida por antibióticos (AIMD). *Prom ± EST. ANOVA, #p < 0.05 vs SM+STD+Donador. n=8.*

9.3.2 La TMF en combinación con la AIMD revirtió los efectos conductuales causados por la SM

El ANOVA de dos vías del índice de discriminación (ID) de la prueba de desplazamiento de objetos mostró un efecto significativo de la interacción ($F_{1,39}$: 8.8, $p=0.005$), pero no de la SM o la TMF. Las comparaciones múltiples mostraron que la SM causó una disminución significativa ($p < 0.05$) en el ID al comparar con el grupo CONT+STD+Donador (Figura 10A). Además, el grupo SM+AIMD+Receptor mostró un aumento significativo ($p < 0.05$) en el ID al comparar con el grupo SM+STD+Donador (Figura 10A).

En la prueba de nado forzado, el ANOVA de dos vías mostró un efecto significativo de la interacción sobre el tiempo de escalamiento ($F_{1,39}: 20.30, p= 0.0001$) y el tiempo de inmovilidad ($F_{1,39}: 18.53, p= 0.0001$), no observamos efecto de la SM o de la TMF. Las comparaciones múltiples mostraron una disminución del tiempo de escalamiento en el grupo SM+STD+Donador ($p < 0.01$) y en el grupo CONT+AIMD+Receptor ($p < 0.01$) al comparar con el grupo CONT+STD+Donador (Figura 10B). Además, observamos un aumento del tiempo de escalamiento en el grupo SM+AIMD+Receptor ($p < 0.05$) con respecto al grupo CONT+AIMD+Receptor (Figura 10B). Observamos un aumento en el tiempo de inmovilidad en el grupo SM+STD+Donador ($p < 0.05$) y del grupo CONT+AIMD+Receptor ($p < 0.05$) al comparar con el grupo CONT+STD+Donador (Figura 10C). Adicionalmente, observamos una disminución del tiempo de inmovilidad en el grupo SM+AIMD+Receptor ($p < 0.05$) con respecto al grupo SM+STD+Donador y al grupo CONT+AIMD+Receptor (Figura 10C).

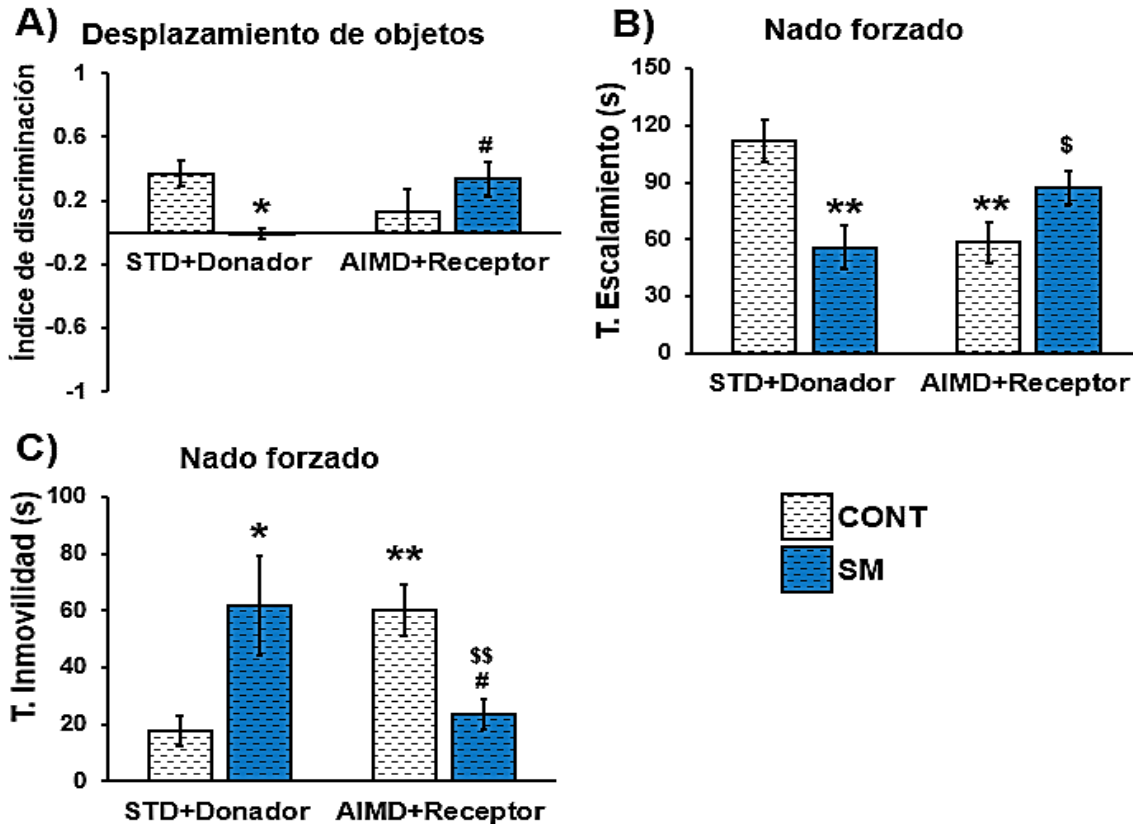


Figura 10. Efecto de la TMF en combinación con la AIMD sobre las alteraciones causadas por la SM en la memoria espacial y la conducta tipo depresiva. A) Índice de discriminación entre el objeto conocido y el objeto desplazado, B) Tiempo de escalamiento y C) tiempo de inmovilidad de animales control (CONT) o separación maternal (SM) después mantenidos en condiciones estándar de bioterio (STD) o sometidos a depleción de microbiota inducida por antibióticos (AIMD) y posteriormente a transferencia de microbiota fecal (TMF). (*Prom ± EST, ANOVA, *p ≤ 0.05 vs CONT+STD+Donador, **p ≤ 0.01 vs CONT+STD+Donador, #p ≤ 0.05 vs SM+STD+Donador, \$p ≤ 0.05 vs CONT+AIMD+Receptor, \$\$p ≤ 0.01 vs CONT+AIMD+Receptor. n=10*).

9.3.3 La TMF en combinación con la AIMD revirtió las alteraciones metabólicas inducidas por la SM

El ANOVA de tres vías de medidas repetidas de la curva de tolerancia a la glucosa mostró un efecto significativo de la interacción ($F_{1,127}: 7.10, p= 0.012$) y del tiempo después de la administración de glucosa ($F_{1,127}: 92.20, p< 0.0001$), pero no observamos efecto de la SM o de la TMF. Las comparaciones múltiples indicaron que la SM causó un aumento ($p< 0.01$) en los niveles de glucosa 30 minutos después de la administración de la carga glucosa al comparar con el grupo

CONT+STD+Donador (Figura 11A). Adicionalmente, observamos una disminución ($p < 0.01$) en los niveles de glucosa 30 minutos después de la administración de la carga de glucosa en el grupo SM+AIMD+Receptor con respecto al grupo SM+STD+Donador (Figura 11A).

El ANOVA de dos vías de los niveles de corticosterona en plasma reveló un efecto significativo de la interacción ($F_{1,31}: 7.96, p = 0.008$), pero no de la SM o de la TMF. Las comparaciones múltiples mostraron que la SM aumenta ($p < 0.05$) los niveles de corticosterona al comparar con el grupo CONT+STD+Donador. Además, observamos una disminución ($p < 0.05$) en el grupo SM+AIMD+Receptor al comparar con el grupo SM+STD+Donador (Figura 11B). El ANOVA de dos vías de los niveles de insulina en plasma no mostró efecto significativo de la SM, la TMF o la interacción (Figura 11C).

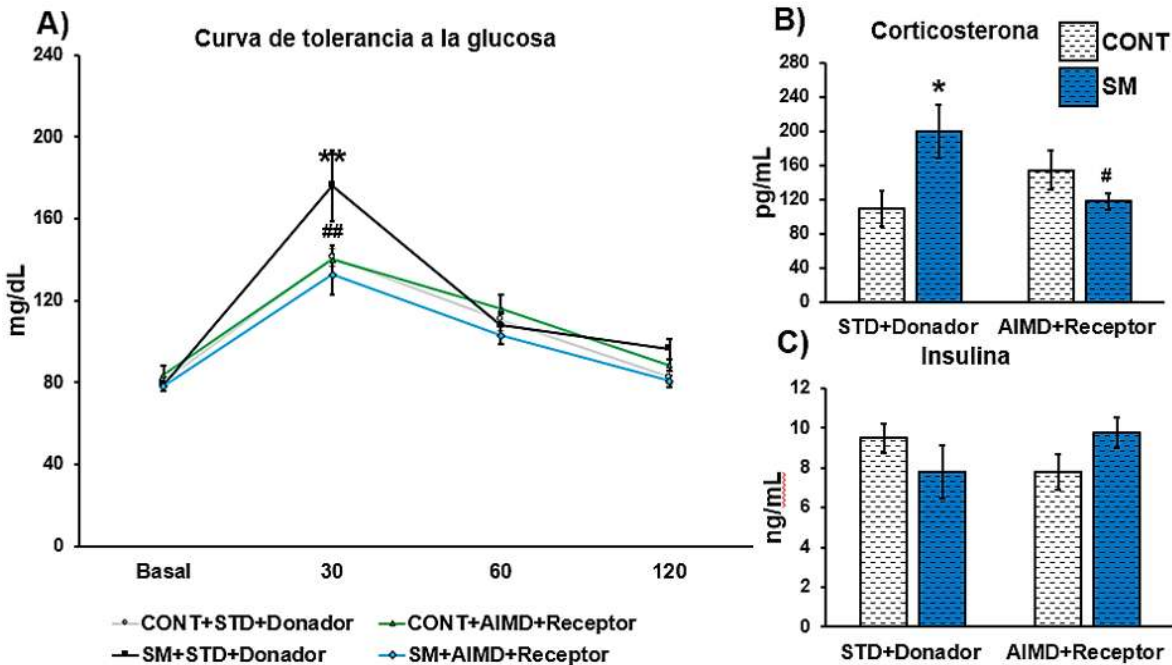


Figura 11. Efecto de la TMF en combinación con la AIMD sobre las alteraciones causadas por la SM en la homeostasis de la glucosa y los niveles de corticosterona. A) curva de tolerancia a la glucosa, B) concentraciones de corticosterona y C) insulina en plasma de animales control (CONT) o separación maternal (SM) después mantenidos en condiciones estándar de bioterio (STD) o sometidos a depleción de microbiota inducida por antibióticos (AIMD) y posteriormente a transferencia de microbiota fecal (TMF). (Prom \pm EST, ANOVA, * $p \leq 0.05$ vs CONT+STD+donador, ** $p \leq 0.01$ vs CONT+STD+donador, # $p \leq 0.05$ vs SM+STD+donador, ## $p \leq 0.01$ vs SM+STD+donador. $n=8$).

9.3.4 La TMF en combinación con la AIMD restauró la neurogénesis hipocampal en los animales SM

El ANOVA de dos vías del número de células DCX+ mostró un efecto significativo de la SM ($F_{1,31}$: 7.69, $p= 0.009$), pero no de la TMF o la interacción. Las comparaciones múltiples no revelaron diferencias entre grupos. Sin embargo, mediante una prueba de *t de Student* observamos que la SM disminuyó ($p<0.05$) el número de células DCX+ al comparar con el grupo CONT+STD+Donador (Figura 12B). Además, observamos un aumento ($p< 0.05$) del número de células DCX+ en el grupo SM+AIMD+Receptor al comparar con el grupo SM+STD+Donador (Figura 12B). Con respecto al número de células Ki67+, el ANOVA de dos vías no mostró efecto significativo de la SM, la TMF o la interacción (Figura 12D).

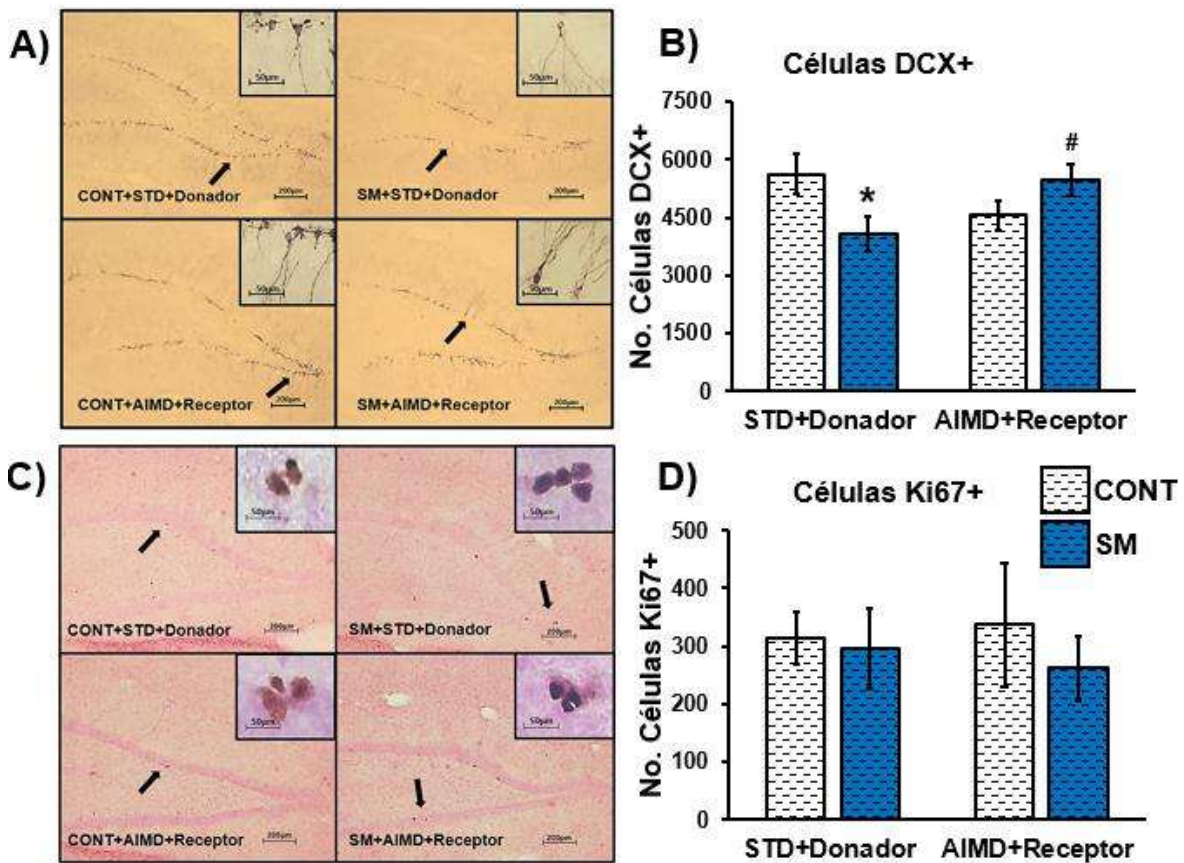


Figura 12. Efecto de la TMF en combinación con la AIMD sobre las alteraciones causadas por la SM en la neurogénesis hipocámpal. A) imágenes representativas de una inmunotinción contra el marcador de neuronas inmaduras DCX y B) estimación estereológica del número de células DCX+, C) imágenes representativas de una inmunotinción contra el marcador de células en proliferación Ki67 y D) estimación estereológica del número de células Ki67+ de animales control (CONT) o separación maternal (SM) después mantenidos en condiciones estándar de bioterio (STD) o sometidos a depleción de microbiota inducida por antibióticos (AIMD) y posteriormente a transferencia de microbiota fecal (TMF). (Prom \pm EST, *t* de Student, * $p \leq 0.05$ vs CONT+STD+Donador, # $p \leq 0.05$ vs SM+STD+Donador. $n = 8$).

9.4 Los efectos de la TMF fueron estables un mes después de interrumpir la cohabitación

9.4.1 La TMF modificó la microbiota intestinal de forma duradera

Se evaluó la microbiota intestinal un mes después de interrumpir la TMF. El análisis estadístico no reveló diferencias significativas en el número de copias del gen de ARNr 16s de *Bacteroides fragilis*, *Bifidobacterium longum subsp. Longum*, *Clostridium coccooides* y *Clostridium leptum* (Tabla 5). Sin embargo, el ANOVA de dos vías del número de copias del gen de ARNr 16s de *Lactobacillus* spp mostró un efecto significativo de la TMF ($F_{1,31}: 5.81, p= 0.022$), pero no de la SM o la interacción. Las comparaciones múltiples mostraron que la SM causó una disminución ($p < 0.05$) del número de copias del gen de ARNr 16s de *Lactobacillus* spp al comparar con el grupo CONT+STD+Donador y con el grupo CONT+AIMD+Receptor (Tabla 5). Además, observamos un aumento ($p < 0.05$) del número de copias del gen de ARNr 16s de *Lactobacillus* spp en el grupo SM+AIMD+Receptor al comparar con el grupo SM+STD+Donador (Tabla 5). El ANOVA de dos vías no indicó un efecto significativo de la masa corporal o el peso relativo del ciego (Tabla 5).

Tabla 5: Durabilidad de los efectos de la TMF en combinación con la AIMD sobre el peso corporal y la microbiota intestinal después de interrumpir la cohabitación.

	CONT+STD DONADOR	SM+STD DONADOR	CONT+AIMD RECEPTOR	SM+AIMD RECEPTOR
Peso corporal (g)	435.37 ± 11.94	442.37 ± 14.98	447 ± 4.65	422 ± 9.55
Peso relativo del ciego (g/kg)	27.37 ± 1.27	24.58 ± 2.20	27.03 ± 2.42	28.84 ± 1.59
Lactobacillus spp (No. de copias del gen ARNr 16s x 10 ⁸)	12.72 ± 2.60	4.43 ± 1.27*	14.53 ± 3.15 [#]	14.55 ± 2.46 [#]
Bifidobacterium longum subsp. Longum (No. de copias del gen ARNr 16s x 10 ⁸)	0.00082 ± 0.0001	0.00099 ± 0.00009	0.0011 ± 0.0001	0.00088 ± 0.0001
Bacteroides fragilis (No. de copias del gen ARNr 16s x 10 ⁸)	4.00 ± 1.35	4.99 ± 1.41	5.07 ± 2.04	7.02 ± 1.91
Clostridium coccooides (No. de copias del gen ARNr 16s x 10 ⁸)	57.20 ± 16.13	54.33 ± 7.52	59.21 ± 5.53	48.69 ± 3.77
Clostridium leptum (No. de copias del gen ARNr 16s x 10 ⁸)	1.11 ± 0.19	1.58 ± 0.14	0.86 ± 0.26	1.04 ± 0.16

Animales control (CONT) o separación maternal (SM) en condiciones estándar (STD) o sometidos a depleción de microbiota inducida por antibióticos (AIMD). *Prom ± EST. ANOVA, *p < 0.05 vs CONT+STD+Donador, #p < 0.05 vs SM+STD+Donador. n=8.*

9.4.2 La durabilidad de los efectos conductuales de la TMF depende de la interacción con el hospedero

En la prueba de desplazamiento de objetos realizada un mes después de interrumpir la TMF, el ANOVA de dos vías reveló un efecto significativo de la interacción ($F_{1,39}: 49.30, p= 0.0001$), pero no observamos efecto de la SM o de la TMF. Las comparaciones múltiples mostraron una disminución del ID en el grupo SM+STD+Donador ($p < 0.01$) y en el grupo CONT+AIMD+Receptor ($p < 0.01$), al comparar con el grupo CONT+STD+Donador (Figura 13A). Adicionalmente, observamos un aumento ($p < 0.01$) del ID en el grupo SM+AIMD+Receptor con

respecto al grupo SM+STD+Donador y al grupo CONT+AIMD+Receptor (Figura 13A).

En la prueba de nado forzado en el tiempo de inmovilidad el ANOVA de dos vías mostró un efecto significativo de la interacción ($F_{1,39}: 34.55, p= 0.0001$), pero no de la SM o de la TMF. Las comparaciones múltiples indicaron una disminución del tiempo de escalamiento en el grupo SM+STD+Donador ($p < 0.01$) y en el grupo CONT+AIMD+Receptor ($p < 0.01$) al comparar con el grupo CONT+STD+Donador (Figura 13B). Además, observamos un aumento ($p < 0.01$) en el tiempo de escalamiento en el grupo SM+AIMD+Receptor al comparar con el grupo SM+STD+Donador y con el grupo CONT+AIMD+Receptor (Figura 13B). En cuanto al tiempo de inmovilidad, el ANOVA de dos vías indicó un efecto significativo de la SM ($F_{1,39}: 6.087, p= 0.018$) y de la interacción ($F_{1,39}: 2.88, p= 0.0003$), pero no de la TMF. Las comparaciones múltiples mostraron un aumento ($p < 0.01$) del tiempo de inmovilidad en el grupo SM+STD+Donador al comparar con el grupo CONT+STD+Donador (Figura 13C). Adicionalmente, observamos una disminución del tiempo de inmovilidad en el grupo SM+AIMD+Receptor ($p \leq 0.01$) y en el grupo CONT+AIMD+Receptor ($p \leq 0.01$) con respecto al grupo SM+STD+Donador (Figura 13C).

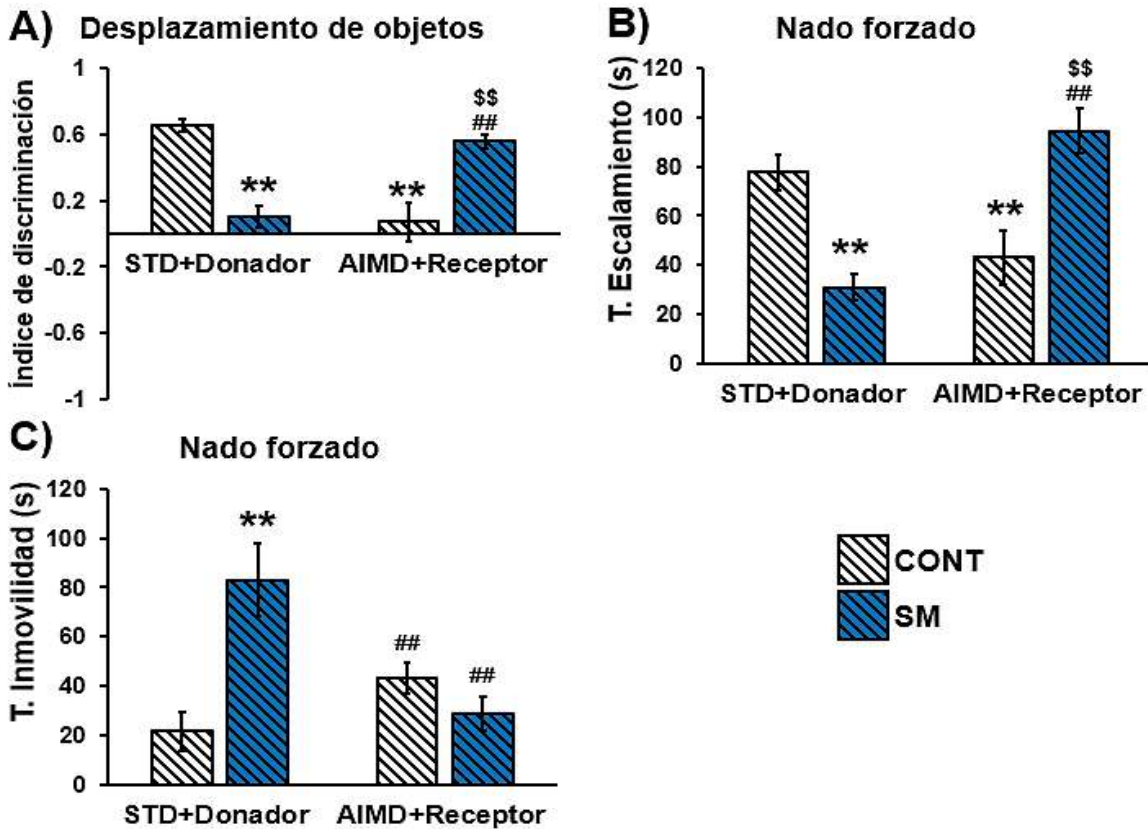


Figura 13. Durabilidad de los efectos de la TMF sobre la memoria y la conducta tipo depresiva después de interrumpir la cohabitación. A) Índice de discriminación entre el objeto conocido y el objeto desplazado, B) Tiempo de escalamiento y C) tiempo de inmovilidad de animales control (CONT) o separación maternal (SM) después mantenidos en condiciones estándar de bioterio (STD) o sometidos a depleción de microbiota inducida por antibióticos (AIMD) y posteriormente a transferencia de microbiota fecal (TMF) evaluados un mes después de interrumpir la cohabitación. (Prom \pm EST, ANOVA, ** $p \leq 0.01$ vs CONT+STD+Donador, ## $p \leq 0.01$ vs SM+STD+Donador, \$\$ $p \leq 0.01$ vs CONT+AIMD+Receptor. $n=10$).

9.4.3 Los efectos metabólicos de la TMF permanecieron un mes después de interrumpir la cohabitación

El ANOVA de tres vías de medidas repetidas de la curva de tolerancia a la glucosa no mostró efecto de la SM, pero sí de la TMF ($F_{1,127}$: 6.36, $p= 0.017$), la interacción ($F_{1,127}$: 4.55, $p= 0.041$) y del tiempo después de la administración de glucosa ($F_{1,127}$: 206.96, $p= 0.0001$). Las comparaciones múltiples indicaron un aumento ($p < 0.01$) de los niveles de glucosa en el grupo SM+STD+Donador 30 minutos después de la administración de glucosa al comparar con el grupo CONT+STD+Donador y con el grupo CONT+AIMD+Receptor (Figura 14A). Además, observamos una disminución de los niveles de glucosa en el grupo SM+AIMD+Receptor 30 ($p \leq 0.01$) y 120 ($p \leq$

0.05) minutos después de la administración de glucosa con respecto al grupo SM+STD+Donador (Figura 14A).

El ANOVA de dos vías de las concentraciones de corticosterona plasma mostró un efecto significativo de la interacción ($F_{1,31}$: 11.90, $p = 0.001$), pero no de la SM o de la TMF. Las comparaciones múltiples mostraron que la SM causó un aumento ($p < 0.05$) de las concentraciones de corticosterona al comparar con el grupo CONT+STD+Donador (Figura 14B). Además, observamos una disminución ($p \leq 0.05$) en los niveles de corticosterona en el grupo SM+AIMD+Receptor con respecto al grupo SM+STD+Donador (Figura 14B). El ANOVA de dos vías de las concentraciones de insulina en plasma no mostró efecto significativo de la SM, la TMF o de la interacción (Figura 14C).

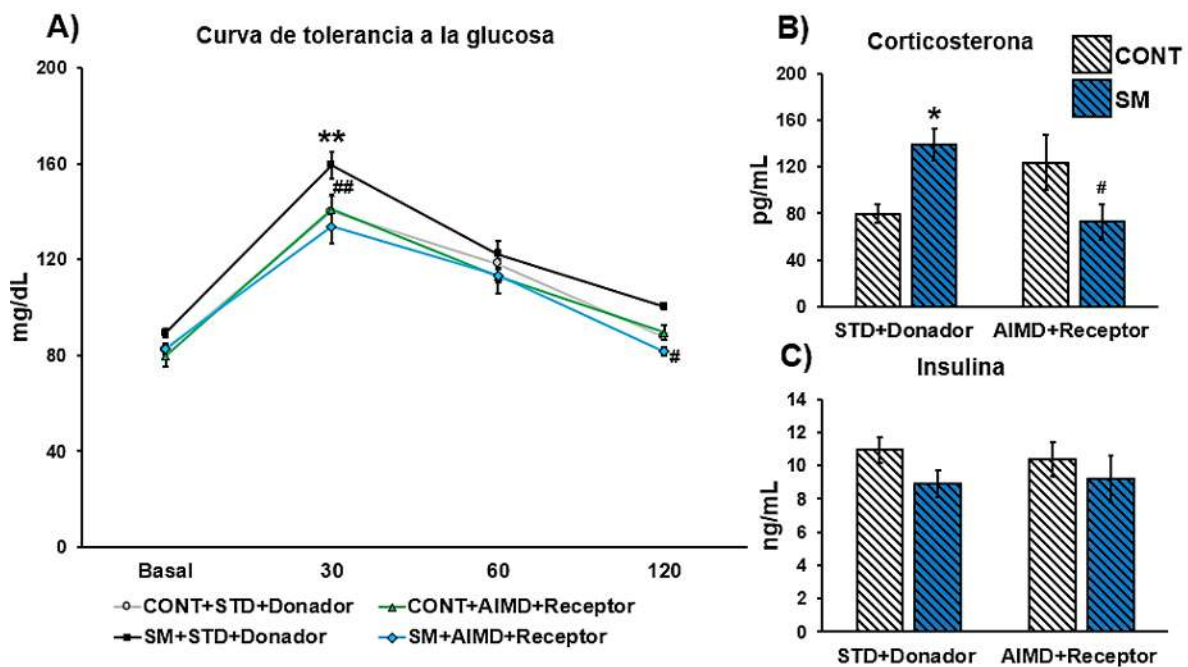


Figura 14. Durabilidad de los efectos de la TMF sobre la homeostasis de la glucosa y las concentraciones de corticosterona después de interrumpir la cohabitación. A) curva de tolerancia a la glucosa, B) concentraciones de corticosterona e C) insulina en plasma de animales control (CONT) o separación maternal (SM) después mantenidos en condiciones estándar de bioterio (STD) o sometidos a depleción de microbiota inducida por antibióticos (AIMD) y posteriormente a transferencia de microbiota fecal (TMF) evaluados un mes después de interrumpir la cohabitación. (Prom \pm EST, ANOVA, * $p \leq 0.05$ vs CONT+STD+Donador, ** $p \leq 0.01$ vs CONT+STD+Donador, # $p \leq 0.05$ vs SM+STD+Donador, ## $p \leq 0.01$ vs SM+STD+Donador. $n=8$).

9.4.4 Los efectos de la TMF sobre la neurogénesis hipocampal se mantienen un mes después de interrumpir la cohabitación

El ANOVA de dos vías del número de células DCX+ indicó un efecto significativo de la SM ($F_{1,31}$: 8.33, $p= 0.007$) y de la interacción ($F_{1,31}$: 8.53, $p= 0.006$), pero no de la TMF. Las comparaciones múltiples revelaron que la SM disminuyó ($p < 0.01$) el número de células DCX+ al comparar con el grupo CONT+STD+Donador y con el grupo CONT+AIMD+Receptor (Figura 15B). Además, observamos un aumento ($p < 0.05$) en el número de células DCX+ en el grupo SM+AIMD+Receptor al comparar con el grupo SM+STD+Donador (Figura 15B). Con respecto al número de células Ki67+, el ANOVA de dos vías reveló un efecto significativo de la SM ($F_{1,31}$: 4.40, $p= 0.045$) y de la TMF ($F_{1,31}$: 6.50, $p= 0.016$), pero no de la interacción. Las comparaciones múltiples mostraron que la SM causó una disminución ($p < 0.05$) del número de células Ki67+ al comparar con el grupo CONT+STD+Donador y con el grupo CONT+AIMD+Receptor (Figura 15D). Adicionalmente, observamos un aumento ($p < 0.05$) en el número de las células Ki67+ en el grupo SM+AIMD+Receptor con respecto al grupo SM+STD+Donador (Figura 15D).

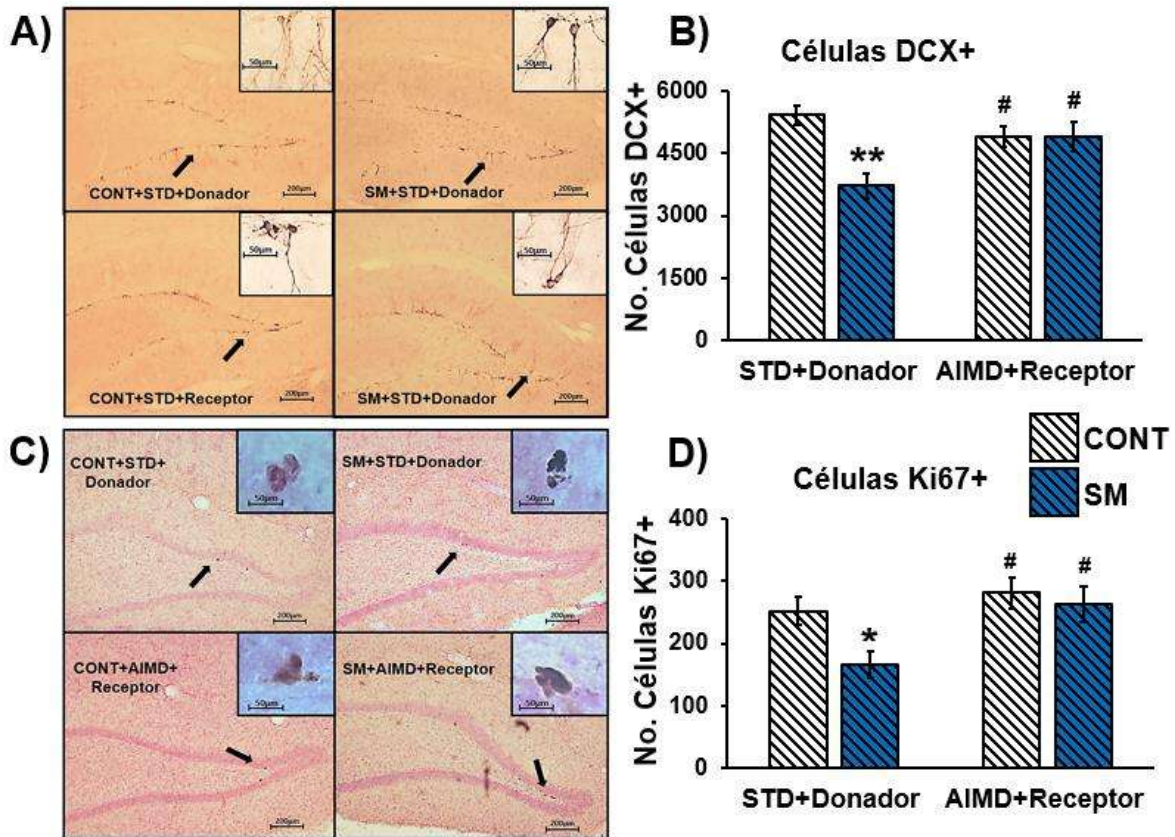


Figura 15. Durabilidad de los efectos de la TMF sobre la neurogénesis hipocampal después de interrumpir la cohabitación. A) imágenes representativas de una inmunotinción contra el marcador de neuronas inmaduras DCX, B) estimación estereológica del número de células DCX+, C) imágenes representativas de una inmunotinción contra el marcador de células en proliferación Ki67 y D) estimación estereológica del número de células Ki67+ de animales control (CONT) o separación maternal (SM) después mantenidos en condiciones estándar de bioterio (STD) o sometidos a depleción de microbiota inducida por antibióticos (AIMD) y posteriormente a transferencia de microbiota fecal (TMF) evaluados un mes después de interrumpir la cohabitación. (*Prom ± EST, ANOVA, *p ≤ 0.05 vs CONT+STD+Donador, **p ≤ 0.01 vs CONT+STD+Donador, #p ≤ 0.05 vs SM+STD+Donador. n=8*).

9.5 La SM afectó de forma diferencial la microbiota intestinal de los animales “sucios” y de los animales microbiológicamente controlados

Se evaluó el número de copias del gen de ARNr 16s de *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium longum subsp. Longum*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium coccooides* y *Clostridium leptum* mediante qPCR. El ANOVA de dos vías del número de copias del gen de ARNr 16s de *Lactobacillus* spp reveló un efecto significativo de la condición MBC ($F_{1,29}: 4.49$, $p= 0.04$), pero no de la SM o la interacción. Las comparaciones múltiples no revelaron diferencias entre grupos. El ANOVA de dos vías del número de copias del gen de ARNr 16s de *Bifidobacterium longum subsp. Longum* indicó un efecto significativo de la SM ($F_{1,29}: 91,54$, $p< 0.0001$), pero no de la MBC o la interacción. Las comparaciones múltiples mostraron una disminución ($p< 0.01$) del número de copias del gen de ARNr 16s de *Bifidobacterium longum subsp. Longum* de los grupos de animales sucios con respecto a los grupos de animales en condiciones MBC. El ANOVA de dos vías de *Bacteroides fragilis*, *Clostridium coccooides* y *Clostridium leptum* no indicó diferencias significativas (Tabla 6). El ANOVA de dos vías indicó que no existen diferencias significativas de la masa corporal o del peso relativo del ciego (Tabla 6).

Tabla 6: Efecto de las condiciones de alojamiento sobre la microbiota intestinal en animales control y separación maternal.

	CONT+ MBC	SM+MBC	CONT+SUCIOS	SM+SUCIOS
Peso corporal (g)	418.5 ± 9.42	414.5 ± 13.48	435.37 ± 11.94	442.37 ± 14.98
Peso relativo del ciego (g/kg)	26.45 ± 0.90	28.38 ± 1.87	27.37 ± 1.27	24.58 ± 2.20
Lactobacillus spp (No. de copias del gen ARNr 16s x 10 ⁸)	13.33 ± 3.49	9.45 ± 3.77	12.72 ± 2.60	4.43 ± 1.27
Bifidobacterium longum subsp. Longum (No. de copias del gen ARNr 16s x 10 ⁸)	0.000023 ± 0.000003	0.000010 ± 0.000001	0.00082 ± 0.0001 ^{**##}	0.00099 ± 0.00009 ^{**##}
Bacteroides fragilis (No. de copias del gen ARNr 16s x 10 ⁸)	3.07 ± 0.48	3.67 ± 0.44	4.00 ± 1.35	4.99 ± 1.41
Clostridium coccoides (No. de copias del gen ARNr 16s x 10 ⁸)	52.71 ± 8.03	44.11 ± 4.68	57.20 ± 16.13	54.33 ± 7.52
Clostridium leptum (No. de copias del gen ARNr 16s x 10 ⁸)	0.69 ± 0.12	1.27 ± 0.53	1.11 ± 0.19	1.58 ± 0.14

Animales control (CONT) o separación maternal (SM) en condiciones microbiológicamente controladas (MBC) o en condiciones no microbiológicamente controladas (SUCIOS). *Prom ± EST.* ANOVA, ^{**}*p* < 0.01 vs CONT+MBC, ^{##}*p* < 0.01 vs SM+MBC. CONT+MBC, CONT+SUCIOS y SM+SUCIOS *n* = 8 y SM+MBC *n* = 6.

X. DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó por primera vez el efecto de la TMF en combinación con la AIMD sobre las alteraciones causadas por la SM en un modelo de ratas sucias. Además, se evaluó la durabilidad de los efectos de la TMF después de interrumpir la transferencia. Los resultados mostraron que la AIMD causó efectos conductuales y neuroendocrinos similares a la SM. Por otra parte, la combinación de la TMF y la AIMD restauró los efectos conductuales, neuroendocrinos, metabólicos y la disbiosis intestinal causados por la SM. Además, los datos indican que los efectos benéficos de la TMF fueron estables un mes después de interrumpir la transferencia de microbiota. En el presente trabajo se demostró que la terapia de TMF tiene un potencial uso en la reversión de los efectos causados por la SM en la edad adulta.

10.1 Efecto de la AIMD

Nuestro primer interés fue averiguar si el tratamiento con los antibióticos por 30 días lograba depletar la microbiota intestinal. Se realizó la cuantificación de bacterias totales de muestras de contenido de ciego mediante qPCR y observamos que la AIMD causó una disminución de la microbiota intestinal mayor al 99.9%, lo cual concuerda con la literatura (Ekmekciu *et al.*, 2017; Heimesaat *et al.*, 2018; Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004). Por otra parte, algunos estudios han reportado que la SM altera la composición de la microbiota intestinal (Amini-khoei *et al.*, 2019; Park *et al.*, 2021; Usui *et al.*, 2021), lo cual concuerda con los resultados de este trabajo, donde se observó que la SM afectó el número de copias del gen de ARNr 16s de *Lactobacillus* spp y *Bacteroides fragilis*. Sin embargo, el efecto de la SM sobre la composición de la microbiota intestinal es controversial, ya que se ha observado que los filos o géneros bacterianos afectados variaron dependiendo del estudio (Amini-khoei *et al.*, 2019; Fukui *et al.*, 2018; Karen *et al.*, 2021; Kemp *et al.*, 2021), esto podría ser explicado por factores como la dieta, la especie o el alojamiento.

La prueba de nado forzado es una de las pruebas más utilizadas para evaluar la conducta tipo depresiva debido a que es fácil de realizar y los resultados se han

logrado replicar por muchos grupos de investigación (Desbonnet *et al.*, 2010; Donoso *et al.*, 2020; Roque *et al.*, 2021). Los resultados de este trabajo mostraron que la SM causó una conducta tipo depresiva, en congruencia con lo reportado en la literatura (Desbonnet *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2018). Además, se observó que los animales CONT+AIMD presentaron una conducta similar a los animales SM, ya que mostraron una disminución en el tiempo de escalamiento y una tendencia de aumento en el tiempo de inmovilidad. En congruencia con los resultados de este trabajo, se ha observado que el tratamiento crónico con antibióticos causó una disminución en el tiempo de escalamiento y un aumento en el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado (Moloney, *et al.*, 2016). Otros estudios revelaron que la ausencia de la microbiota intestinal afectó el comportamiento de los animales (Desbonnet *et al.*, 2015; Neufeld *et al.*, 2011). Adicionalmente, se ha observado que los animales carentes de microbiota intestinal mostraron una alteración sobre el sistema serotoninérgico, el cual juega un papel importante en la modulación de la conducta (Clarke *et al.*, 2013).

El ELS es un factor que aumenta la vulnerabilidad a sufrir alteraciones metabólicas a largo plazo (Deschênes *et al.*, 2018). Los resultados de este trabajo muestran que la SM causó un aumento en los niveles de corticosterona, lo cual ha sido reportado en la literatura por diversos grupos de investigación (Gareau *et al.*, 2007; Lajud *et al.*, 2012; Maniam & Morris, 2010). Además, se observó que los animales CONT+AIMD, de forma similar a los animales SM, mostraron niveles elevados de corticosterona. Esto sugiere que la microbiota intestinal desempeña un papel importante en la regulación de la corticosterona. En apoyo a esta idea, algunos estudios revelaron que los animales GF presentaron niveles elevados de corticosterona en comparación a los animales SPF (Neufeld *et al.*, 2011; Sudo *et al.*, 2004). Aunque, forma opuesta, Hoban y colaboradores mostraron que el tratamiento con antibióticos no afecta los niveles de corticosterona (Moloney *et al.*, 2016). Por otra parte, en este estudio se observó que los animales SM+STD presentaron niveles elevados de colesterol en comparación con los controles, similar a lo observado en la literatura (Ruiz *et al.*, 2018). Inesperadamente, la AIMD restauró los efectos de la SM sobre las concentraciones de colesterol. Este estudio

mostró que los niveles de colesterol del grupo SM+AIMD fueron similares a los del grupo control. Consideramos que este efecto es importante y deberá ser estudiado más a fondo en estudios futuros.

La disminución de la neurogénesis hipocampal es una de las consecuencias a largo plazo del ELS (Mirescu *et al.*, 2004). En el presente estudio se observó que la SM causó una disminución del número de células DCX+ en el giro dentado del hipocampo, similar a lo reportado en la literatura (Suri *et al.*, 2013; Lajud *et al.*, 2012). Además, se observó que los animales CONT+AIMD presentaron un número de células DCX+ similar a los animales SM. Esto podría ser explicado debido a que la microbiota intestinal participa en la regulación de los factores neurotróficos como BDNF, el cual es un importante regulador del proceso de la neurogénesis (Kundu *et al.*, 2019). Adicionalmente, se ha observado que el tratamiento con antibióticos causó una disminución de los monocitos Ly6C^{hi} que se cree que son moduladores de la neurogénesis (Möhle *et al.*, 2016).

10.2 Efectos de la TMF en combinación con la AIMD sobre las alteraciones causadas por la SM

La competencia entre los microorganismos administrados y la microbiota residente es uno de los obstáculos que causa que la modificación de la microbiota intestinal tenga una baja eficiencia. En el presente trabajo se utilizó la AIMD para eliminar la microbiota residente y posteriormente se realizó la TMF, lo cual aumentó la posibilidad de que los microorganismos administrados se establecieran y lograran proliferar.

Se sabe que el ELS tiene un impacto importante sobre la composición y la abundancia de la microbiota intestinal en la edad adulta (Park *et al.*, 2021; Usui *et al.*, 2021). En congruencia con la literatura y con los resultados previos, este estudio confirmó que la SM causa una disminución del número de copias del gen de ARNr 16s de *Lactobacillus* spp. Además, se observó que la TMF en combinación con la AIMD revirtió este efecto. Afín a los resultados de del presente trabajo, se ha

observado que la TMF restauró la disbiosis intestinal causada por el estrés crónico impredecible en adultos. Más específicamente, la TMF logró normalizar la expresión de la proteína Zonula occludens-1 (ZO-1) y la ocludina (proteínas que regulan la permeabilidad intestinal), además, restauró la mucosa del tracto gastrointestinal y el desequilibrio de la microbiota intestinal de los animales adultos sometidos a estrés (Rao *et al.*, 2021).

Se propone que los niveles elevados de corticosterona causados por el ELS son los principales responsables del desequilibrio de la microbiota intestinal. En apoyo a esta idea, algunos estudios mostraron un aumento en la permeabilidad intestinal, acompañado de un desequilibrio en la microbiota intestinal en animales que presentaron niveles elevados de corticosterona (Amini-khoei *et al.*, 2019; Fukui *et al.*, 2018; Moussaoui *et al.*, 2016). Además, es bien conocido que los GCs pueden activar el sistema inmunológico, el cual puede ejercer una fuerte influencia sobre la microbiota intestinal (O'Mahony *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2021). Por otra parte, se plantea que la restauración del equilibrio de la microbiota intestinal depende de la permeabilidad intestinal. Se ha observado que las enfermedades inflamatorias como la colitis aguda causaron una disminución en la expresión de las proteínas de unión estrecha (la ocludina, la ZO- 1 y las claudinas; Mennigen *et al.*, 2009). Sin embargo, la administración de una mezcla de probióticos (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus bulgaricus*) logró mejorar la expresión de estas proteínas (Mennigen *et al.*, 2009). Adicionalmente, los AGCC promueven el mantenimiento de la barrera intestinal y estimulan la regeneración epitelial (Lewis *et al.*, 2010).

El ELS ha sido identificado como un factor de riesgo que contribuye a la disfunción de la memoria (Bremner *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 2020). Los resultados en el presente trabajo mostraron que la SM causó deficiencias en la memoria espacial, lo cual concuerda con la literatura (Sousa *et al.*, 2014). Además, se observó que la TMF en combinación con la AIMD logró revertir los efectos de la SM sobre la memoria espacial en la prueba de desplazamiento de objetos. Similar a los resultados del

presente trabajo, se ha observado que la administración de probióticos (*Lactobacillus rhamnosus*) o prebióticos (polidextrosa y galactooligosacárido) desde el destete logró prevenir las alteraciones causadas por la SM sobre la memoria espacial (Neufeld *et al.*, 2019). No obstante, el efecto de modificar la composición de la microbiota en animales adultos nunca había sido estudiado. Se sabe que el ELS causa alteraciones en los niveles de ácido gamma-aminobutírico (GABA) y en sus receptores, lo cual se relaciona con alteraciones sobre la memoria (Martisova *et al.*, 2012). Por otra parte, la administración de *Lactobacillus rhamnosus* JB-1 logró normalizar los niveles de GABA en animales adultos sometidos a estrés crónico (Kochalska *et al.*, 2020). Adicionalmente, la administración de *Lactobacillus rhamnosus* GG previno las alteraciones en la expresión del receptor GABA A2 en el hipocampo en ratas sometidas a SM (Neufeld *et al.*, 2019).

La conducta tipo depresiva es uno de los efectos comúnmente observados en los modelos animales de ELS (Miragaia *et al.*, 2018; Ruiz *et al.*, 2018). Los resultados en el presente trabajo mostraron que los animales SM presentaron una disminución en el tiempo de escalamiento y un aumento en el tiempo de inmovilidad, lo cual concuerda con la literatura (Desbonnet *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2018). Además, se observó que los animales SM+AIMD+Receptor presentaron tiempos de escalamiento e inmovilidad similares a los animales control. Esto demuestra que la TMF en combinación con la AIMD restauró los efectos de la SM sobre la conducta tipo depresiva. En congruencia con nuestros resultados, la modificación de la microbiota intestinal mediante la administración de *Lactobacillus plantarum* PS128 (ratones de 2 meses de edad) o *Bifidobacterium infantis* (ratas de 3 meses de edad) mejoró el despeño de los animales SM en la prueba de nado forzado (Desbonnet *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2016).

En humanos, la terapia con probióticos también ha mostrado buenos resultados en el tratamiento del trastorno depresivo mayor. La administración de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium bifidum* a humanos con trastorno depresivo mayor durante 8 semanas, logró disminuir la puntuación en el Inventario de depresión de Beck (IDB) en comparación con un grupo de humanos a los cuales

se les administró un placebo (Akkasheh *et al.*, 2016). La etiología de la depresión aun no es clara, se cree que está relacionada con las alteraciones sobre los neurotransmisores como DA, 5-HT, noradrenalina y glutamato y algunos factores de plasticidad neuronal como el BDNF (Duman & Monteggia, 2006; Hamon & Blier, 2013). Se ha observado que los animales GF a los cuales se les transfirió microbiota de pacientes depresivos exhibieron un comportamiento similar a la depresión, acompañado de una disminución de 5-HT, DA y noradrenalina en el hipocampo y un aumento de las concentraciones plasmáticas de citocinas proinflamatorias (Kelly *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2020).

Los resultados en el presente trabajo mostraron que la SM causó deficiencias en la regulación de la glucosa, lo cual concuerda con la literatura (Ruiz *et al.*, 2018). Adicionalmente, la TMF en combinación con la AIMD logró revertir las alteraciones causadas por la SM sobre las concentraciones de glucosa. Esto indica que la microbiota intestinal puede modular la regulación de la glucosa. Algunos estudios mostraron que la administración de probióticos (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus thermophilus*) o alimentos lácteos enriquecidos con probióticos a pacientes con diabetes tipo 2, logró reducir los niveles de glucosa en ayunas (Asemi *et al.*, 2013; Ejtahed *et al.*, 2012). Además, se ha observado que algunas especies de *Lactobacillus* y de *Bifidobacterium* pueden aumentar las concentraciones de butirato, el cual induce la secreción del péptido similar al glucagón 1 (GLP-1), un factor importante en la regulación de la glucosa (Yadav *et al.*, 2013). En el presente estudio se observó que la TMF logró restaurar el número de *Lactobacillus* de los animales SM, lo que podría de forma indirecta mejorar la regulación de la glucosa. Sin embargo, se requiere de más estudios dirigidos específicamente a la microbiota intestinal y su relación con la regulación del metabolismo energético, debido a que existe poca evidencia en la literatura.

Es bien sabido que el ELS provoca alteraciones en la función del eje HPA, lo cual provoca un aumento en los niveles de corticosterona (Sousa *et al.*, 2014; Vargas *et al.*, 2016). En congruencia con lo previamente reportado (Gareau *et al.*, 2007; Ruiz

et al., 2018), en este estudio se demostró que los animales SM presentaron niveles elevados de corticosterona. Además, se observó que los animales SM+AIMD+Receptor presentaron niveles de corticosterona similares a los animales control, lo cual indica que la TMF en combinación con la AIMD revirtió los efectos de la SM. En congruencia con los resultados de este estudio, algunos trabajos han demostrado que la microbiota intestinal es importante en la regulación de los niveles de la corticosterona. Se ha observado que la administración de *Lactobacillus paracasei* durante el periodo de ELS previno las alteraciones sobre las concentraciones de corticosterona y la ACTH en plasma y la expresión del GR en la corteza prefrontal (Karen *et al.*, 2021). De forma similar, el tratamiento con *Lactobacillus rhamnosus* R0011 y *Lactobacillus helveticus* R0052 previno los efectos de la SM sobre las concentraciones de corticosterona y la permeabilidad intestinal (Gareau *et al.*, 2007). Adicionalmente la TMF logró revertir el aumento en la permeabilidad intestinal y la inflamación a nivel cerebral causada por el estrés en animales adultos (Rao *et al.*, 2021).

El papel de la microbiota intestinal en la respuesta al estrés se ha estudiado ampliamente en animales GF; estos animales mostraron concentraciones elevadas de la ACTH y la corticosterona después de un evento de estrés en comparación con los controles (Sudo *et al.*, 2004). Además, los animales GF también mostraron un aumento en la expresión del gen de la CRH en el hipotálamo y una disminución de la expresión del gen del GR en el hipocampo (Crumeyrolle-Arias *et al.*, 2014). Por otra parte, la colonización de los animales GF con microbiota de los animales SPF en la edad temprana, previno las alteraciones en la respuesta al estrés (Sudo *et al.*, 2004). El mecanismo por el cual la microbiota intestinal puede causar cambios en la liberación de la corticosterona aun no es claro. Se plantea que el aumento en la permeabilidad intestinal causado por el estrés permite la traslocación de componentes bacterianos a través de la luz intestinal, lo cual causa la activación del sistema inmune y, en consecuencia, la liberación de citocinas y prostaglandinas (de Punder & Pruijboom, 2015; Fukui *et al.*, 2018; Serrats *et al.*, 2010).

Diversos grupos de investigación han demostrado que el ELS altera la neurogénesis hipocampal. Los resultados del presente estudio mostraron que la SM causó una disminución en el número de células DCX+ y Ki67+, lo cual concuerda con la literatura (Suri *et al.*, 2013; Lajud *et al.*, 2012; Mirescu *et al.*, 2004). Adicionalmente, la TMF en combinación con la AIMD logró revertir los efectos de la SM sobre la neurogénesis hipocampal. Se observó que el número de células DCX+ y Ki67+ de los animales SM+AIMD+Receptor fueron similares a los de los animales control. Los resultados de este estudio indicaron que la microbiota intestinal está implicada en la regulación de la neurogénesis hipocampal. Los mecanismos por los cuales la microbiota intestinal puede regular a la neurogénesis hipocampal aun no son claros. Se ha observado que la disminución de los monocitos Ly6C^{hi} causada por un tratamiento con antibióticos afectó a la neurogénesis hipocampal. Además, la administración de probióticos (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus delbrueckii*) logró restaurar el número de monocitos Ly6C^{hi} y, en consecuencia, a la neurogénesis hipocampal (Möhle *et al.*, 2016). En el mismo estudio observaron que la eliminación específica de los de los monocitos Ly6C^{hi} causó una disminución de la neurogénesis hipocampal. Asimismo, observaron que la administración de los monocitos Ly6C^{hi} a los animales con AIMD restauró la neurogénesis hipocampal (Möhle *et al.*, 2016). Por lo tanto, se propone que los monocitos Ly6C^{hi} podrían ser uno de los mecanismos por los cuales la microbiota intestinal puede regular a la neurogénesis hipocampal.

Otro de los mecanismos propuestos sugiere que la microbiota intestinal puede regular la expresión de BDNF y, por ende, a la neurogénesis hipocampal. Algunos estudios mostraron que los animales GF presentaron alteraciones sobre la neurogénesis hipocampal y los niveles de BDNF en diferentes estructuras cerebrales, como la corteza y el hipocampo (Neufeld *et al.*, 2011; Sudo *et al.*, 2004). Además, la colonización de los animales GF con microbiota de animales control, logró normalizar la expresión de BDNF y la neurogénesis hipocampal (Kundu *et al.*, 2019). Adicionalmente, sabe que la expresión de BDNF puede ser modulada por el

butirato, el cual es producido en cantidades adecuadas por la microbiota intestinal de los animales sanos (Barichello *et al.*, 2015; Furusawa *et al.*, 2013).

Durante la infancia la microbiota intestinal es susceptible a cambios drásticos en su arquitectura. El ELS aumenta los niveles de corticosterona, lo cual afecta la permeabilidad intestinal y, por ende, a la composición de la microbiota intestinal (Amini-khoei *et al.*, 2019; Gareau *et al.*, 2007; Ruiz *et al.*, 2018). La disbiosis intestinal altera la comunicación cerebro-intestino y, en consecuencia, algunas funciones cerebrales (Cryan & Dinan, 2012; Liu *et al.*, 2020; Neufeld *et al.*, 2019). En el presente trabajo demostramos que corregir la disbiosis intestinal mediante la TMF revirtió las alteraciones conductuales, neuroendocrinas y metabólicas causadas por el ELS en animales adultos. Creemos que uno de los puntos clave de la reversión de los efectos del estrés es la restauración de la neurogénesis hipocampal, ya que se ha observado que la inhibición de esta causa la desregulación del eje HPA (Snyder *et al.*, 2012). La restauración de la neurogénesis hipocampal podría regular la liberación de los GCs y esto contribuir a mejorar la permeabilidad intestinal. En consecuencia, la microbiota intestinal proliferaría de forma normal, restaurando la disbiosis intestinal. Lo anterior, permitiría una comunicación eficiente entre el cerebro y el intestino, lo cual mejoraría el estado de salud del organismo.

XI. CONCLUSIÓN

La AIMD simula los efectos conductuales y neuroendocrinos causados por la SM. La TMF en combinación con la AIMD revirtió los efectos conductuales, neuroendocrinos y metabólicos del estrés temprano, y restauró la disbiosis intestinal. Además, nuestros datos indicaron que los efectos de la TMF fueron estables un mes después de interrumpir la cohabitación. Nuestros hallazgos evidenciaron la importancia de la microbiota intestinal como mediador de los efectos a largo plazo del estrés temprano. Así mismo, el presente trabajo proporcionó evidencia de una posible estrategia terapéutica, que podría ser utilizada en individuos adultos que ya presentan las alteraciones inducidas por el estrés temprano.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, G. (1994). Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. In *Frontiers in Neuroendocrinology* (Vol. 15, Issue 4, pp. 321–350). <https://doi.org/10.1006/frne.1994.1013>
- Aguilera, G., & Rabadan-Diehl, C. (2000). Vasopressinergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: Implications for stress adaptation. *Regulatory Peptides*, *96*(1–2), 23–29. [https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(00\)00196-8](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(00)00196-8)
- Aich, P., Potter, A. A., & Griebel, P. J. (2009). Modern approaches to understanding stress and disease susceptibility: A review with special emphasis on respiratory disease. In *International Journal of General Medicine* (Issue 2). <https://doi.org/10.2147/ijgm.s4843>
- Ait-Belgnaoui, A., Colom, A., Braniste, V., Ramalho, L., Marrot, A., Cartier, C., Houdeau, E., Theodorou, V., & Tompkins, T. (2014). Probiotic gut effect prevents the chronic psychological stress-induced brain activity abnormality in mice. *Neurogastroenterology and Motility*, *26*(4), 510–520. <https://doi.org/10.1111/nmo.12295>
- Akkasheh, G., Kashani-Poor, Z., Tajabadi-Ebrahimi, M., Jafari, P., Akbari, H., Taghizadeh, M., Memarzadeh, M. R., Asemi, Z., & Esmailzadeh, A. (2016). Clinical and metabolic response to probiotic administration in patients with major depressive disorder: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrition*, *32*(3), 315–320. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2015.09.003>
- American Psychiatric, A. (2013). Diagnostic and statistical manual of mental disorders, DSM-5. In *Diagnostic and statistical manual of mental disorders, DSM-5*. <https://doi.org/doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596.dsm17>
- Amini-khoei, H., Haghani-samani, E., Beigi, M., Soltani, A., Alizadeh, A., Reza, M., & Validi, M. (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), 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.11.037>
- Asemi, Z., Zare, Z., Shakeri, H., Sabihi, S. S., & Esmailzadeh, A. (2013). Effect of multispecies probiotic supplements on metabolic profiles, hs-CRP, and oxidative stress in patients with type 2 diabetes. *Annals of Nutrition and Metabolism*, *63*(1–2), 1–9. <https://doi.org/10.1159/000349922>
- Bailey, M. T., Dowd, S. E., Galley, J. D., Hufnagle, A. R., Rebecca, G., & Lyte, M. (2011). Exposure to social stressors alters the structure of the intestinal microbiota. *Brain Behav Immun*, *25*(3), 397–407. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.10.023>
- Barichello, T., Generoso, J. S., Simões, L. R., Faller, C. J., Ceretta, R. A., Petronilho, F., Lopes-Borges, J., Valvassori, S. S., & Quevedo, J. (2015). Sodium Butyrate Prevents Memory Impairment by Re-establishing BDNF and GDNF Expression in Experimental Pneumococcal Meningitis. *Molecular Neurobiology*, *52*(1), 734–740. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8914-3>
- Bauer, K. C., Huus, K. E., & Finlay, B. B. (2016). Microbes and the mind: Emerging hallmarks of the gut microbiota-brain axis. *Cellular Microbiology*, *18*(5), 632–644. <https://doi.org/10.1111/cmi.12585>
- Benjannet, S., Rondeau, N., Day, R., Chrétien, M., & Seidah, N. G. (1991). PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic

- residues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(9), 3564–3568. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.9.3564>
- Bercik P, Collins SM, V. EF. (2012). Microbes and the gut-brain axis. *Neurogastroenterol Motil*, 24(5), 405–413. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2012.01906.x>
- Bernardi, J. R., Ferreira, C. F., Senter, G., Krolow, R., de Aguiar, B. W., Portella, A. K., Kauer-Sant'anna, M., Kapczynski, F., Dalmaz, C., Goldani, M. Z., & Silveira, P. P. (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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062031>
- Beura, L. K., Hamilton, S. E., Bi, K., Schenkel, J. M., Odumade, O. A., Casey, K. A., Thompson, E. A., Fraser, K. A., Rosato, P. C., Filali-Mouhim, A., Sekaly, R. P., Jenkins, M. K., Vezys, V., Nicholas Haining, W., Jameson, S. C., & Masopust, D. (2016). Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice. *Nature*, 532(7600), 512–516. <https://doi.org/10.1038/nature17655>
- Bilen, M., Dufour, J. C., Lagier, J. C., Cadoret, F., Daoud, Z., Dubourg, G., & Raoult, D. (2018). The contribution of culturomics to the repertoire of isolated human bacterial and archaeal species. *Microbiome*, 6(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0485-5>
- Borre, Y. E., O'Keeffe, G. W., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2014). Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends in Molecular Medicine*, 20(9), 509–518. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.05.002>
- Bulbena Vilarrasa Antonio, Casquero Ruiz Rafael, & Santiago Hernando María. (2008). *Guía de Práctica Clínica para el Manejo de Pacientes con Trastornos de Ansiedad en Atención Primaria. Versión completa.* https://portal.guiasalud.es/wp-content/uploads/2018/12/GPC_430_Ansiedad_Lain_Entr_compl.pdf
- Burger-van Paassen, N., Vincent, A., Puiman, P. J., van der Sluis, M., Bouma, J., Boehm, G., van Goudoever, J. B., Van Seuningen, I., & Renes, I. B. (2009). The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: Implications for epithelial protection. *Biochemical Journal*, 420, 211–219. <https://doi.org/10.1042/BJ20082222>
- Cani, P. D., Everard, A., & Duparc, T. (2013). Gut microbiota, enteroendocrine functions and metabolism. *Current Opinion in Pharmacology*, 13(6), 935–940. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.09.008>
- Carvalho, B. M., Guadagnini, D., Tsukumo, D. M. L., Schenka, A. A., Latuf-Filho, P., Vassallo, J., Dias, J. C., Kubota, L. T., Carvalheira, J. B. C., & Saad, M. J. A. (2012). Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signalling in high-fat fed mice. *Diabetologia*, 55(10), 2823–2834. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2648-4>
- Chang, H. Y., Mashimo, H., & Goyal, R. K. (2003). Musings on the wanderer: What's new in our understanding of vago-vagal reflex? IV. Current concepts of vagal efferent projections to the gut. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 284, 357–366. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00478.2002>
- Charlis Raineke, Stephanie Moriceau, and R. M. S. (2010). Developing a Neurobehavioral Animal Model of Infant Attachment to an Abusive Caregiver. *Biol Psychiatry*, 15(67(12)), 1137–1145. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.12.019>
- Charmandari, E., Tsigos, C., & Chrousos, G. (2005). Endocrinology of the stress response. *Annual Review of Physiology*, 67, 259–284. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.040403.120816>

- Clarke G, Grenham S, Scully P, Fitzgerald P, Moloney RD, Shanahan F, Dinan TG, C. J. (2013). The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol Psychiatry*, 18(6), 666–673. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.77>
- Clarke, G., Stilling, R. M., Kennedy, P. J., Stanton, C., Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2014). Minireview: Gut Microbiota: The Neglected Endocrine Organ. *Molecular Endocrinology*, 28(August), 1221–1238. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1108>
- Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view. *Cell*, 148(6), 1258–1270. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.035>
- Colleluori, G., Galli, C., Severi, I., Perugini, J., & Giordano, A. (2022). Early Life Stress, Brain Development, and Obesity Risk: Is Oxytocin the Missing Link? *Cells*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/cells11040623>
- Crumeyrolle-Arias, M., Jaglin, M., Bruneau, A., Vancassel, S., Cardona, A., Daugé, V., Naudon, L., & Rabot, S. (2014). Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 42, 207–217. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.01.014>
- Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2012). Mind-altering microorganisms: The impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(10), 701–712. <https://doi.org/10.1038/nrn3346>
- Cryan, J. F., O’riordan, K. J., Cowan, C. S. M., Sandhu, K. v., Bastiaanssen, T. F. S., Boehme, M., Codagnone, M. G., Cussotto, S., Fulling, C., Golubeva, A. v., Guzzetta, K. E., Jaggar, M., Long-Smith, C. M., Lyte, J. M., Martin, J. A., Molinero-Perez, A., Moloney, G., Morelli, E., Morillas, E., ... Dinan, T. G. (2019). The microbiota-gut-brain axis. *Physiological Reviews*, 99(4), 1877–2013. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>
- Daneri, R. N. M. M. F. (2012). Biología del comportamiento. *universidad de buenos aires facultad de psicología*, 1, 8–13.
- Daniel Erny, Anna Lena Hrabě de Angelis, Diego Jaitin, Peter Wieghofer, Ori Staszewski, Eyal David, Hadas Keren-Shaul, Tanel Mahlakoi, Kristin Jakobshagen, Thorsten Buch, Vera Schwierzeck, Olaf Utermöhlen, Eunyoung Chun, Wendy S Garrett, Kathy D McCoy, A, and M. P. (2015). Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci*, 18(7), 965–977. <https://doi.org/10.1038/nn.4030>
- De Palma, G., Blennerhassett, P., Lu, J., Deng, Y., Park, A. J., Green, W., Denou, E., Silva, M. A., Santacruz, A., Sanz, Y., Surette, M. G., Verdu, E. F., Collins, S. M., & Bercik, P. (2015). Microbiota and host determinants of behavioural phenotype in maternally separated mice. *Nature Communications*, 6, 7735. <https://doi.org/10.1038/ncomms8735>
- de Punder, K., & Pruijboom, L. (2015). Stress induces endotoxemia and low-grade inflammation by increasing barrier permeability. *Frontiers in Immunology*, 6(MAY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00223>
- de Souza, J. A., da Silva, M. C., Costa, F. C. O., de Matos, R. J. B., de Farias Campina, R. C., do Amaral Almeida, L. C., da Silva, A. A. M., Cavalcante, T. C. F., Tavares, G. A., & de Souza, S. L. (2020). Early life stress induced by maternal separation during lactation alters the eating behavior and serotonin system in middle-aged rat female offspring. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 192(March), 172908. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.172908>

- Deak, R. L. S. and T. (2016). a users guide to hpa axis research. *Physiology & Behavior*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.11.014>.A
- Deepika Suri, Vandana Veenit, Ambalika Sarkar, Devi Thiagarajan, Arvind Kumar, Eric J. Nestler, Sanjeev Galande, and V. A. V., & Department. (2013). Early Stress Evokes Age-Dependent Biphasic Changes in Hippocampal Neurogenesis, Bdnf Expression, and Cognition. *Biol Psychiatry*, 18(9), 1199–1216. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.07.011>.Innate
- Desbonnet, L., Clarke, G., Traplin, A., O'Sullivan, O., Crispie, F., Moloney, R. D., Cotter, P. D., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2015). Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: Implications for brain and behaviour. *Brain, Behavior, and Immunity*, 48(April), 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.04.004>
- Desbonnet, L., Garrett, L., Clarke, G., Kiely, B., Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2010). Effects of the probiotic Bifidobacterium infantis in the maternal separation model of depression. *Neuroscience*, 170(4), 1179–1188. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.08.005>
- Deschênes, S. S., Graham, E., Kivimäki, M., & Schmitz, N. (2018). Adverse childhood experiences and the risk of diabetes: Examining the roles of depressive symptoms and cardiometabolic dysregulations in the Whitehall II cohort study. *Diabetes Care*, 41(10), 2120–2126. <https://doi.org/10.2337/dc18-0932>
- Dethlefsen, L., & Relman, D. A. (2011). Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 4554–4561. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000087107>
- Di, S., Malcher-Lopes, R., Halmos, K. C., & Tasker, J. G. (2003). Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: A fast feedback mechanism. *Journal of Neuroscience*, 23(12), 4850–4857. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-12-04850.2003>
- Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2017). Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. *Journal of Physiology*, 595(2), 489–503. <https://doi.org/10.1113/JP273106>
- Donoso, F., Egerton, S., Bastiaanssen, T. F. S., Fitzgerald, P., Gite, S., Fouhy, F., Ross, R. P., Stanton, C., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2020a). Polyphenols selectively reverse early-life stress-induced behavioural, neurochemical and microbiota changes in the rat. *Psychoneuroendocrinology*, 116. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2020.104673>
- Donoso, F., Egerton, S., Bastiaanssen, T. F. S., Fitzgerald, P., Gite, S., Fouhy, F., Ross, R. P., Stanton, C., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2020b). Polyphenols selectively reverse early-life stress-induced behavioural, neurochemical and microbiota changes in the rat. *Psychoneuroendocrinology*, 116(March), 104673. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2020.104673>
- Douglas Bremner, J., Randall, yenny, Scottc, my M., capelli, S., research Richard DelaneyD, P., McCarthy, G., & Charney, D. S. (1995). Deficits in short-term memory in adult survivors abuse of childhood. *Psychiatry Research*, 59, 97–107. [https://doi.org/10.1016/0165-1781\(95\)02800-5](https://doi.org/10.1016/0165-1781(95)02800-5)
- Duman, R. S., & Monteggia, L. M. (2006). A Neurotrophic Model for Stress-Related Mood Disorders. In *Biological Psychiatry* (Vol. 59, Issue 12, pp. 1116–1127). <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.02.013>

- E R Simpson, M. R. W. (1988). Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH. *Ann. Rev. Physiol*, 50, 427–440. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.50.030188.002235>
- Ejtahed, H. S., Mohtadi-Nia, J., Homayouni-Rad, A., Niafar, M., Asghari-Jafarabadi, M., & Mofid, V. (2012). Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. *Nutrition*, 28(5), 539–543. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.013>
- Ekmekciu, I., von Klitzing, E., Neumann, C., Bacher, P., Scheffold, A., Bereswill, S., & Heimesaat, M. M. (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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02430>
- Ericsson, A. C., Montonye, D. R., Smith, C. R., & Franklin, C. L. (2017). Modeling a Superorganism- Considerations Regarding the Use of “Dirty” Mice in Biomedical Research. In *YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE* (Vol. 90). <https://doi.org/PMID: 28955177>; PMID: PMC5612181.
- Fukui, H., Oshima, T., Tanaka, Y., Oikawa, Y., & Makizaki, Y. (2018). Effect of probiotic *Bifidobacterium bifidum* G9-1 on the relationship between gut microbiota profile and stress sensitivity in maternally separated rats. *Scientific Reports*, March, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30943-3>
- Furay, A. R., Bruestle, A. E., & Herman, J. P. (2008). The role of the forebrain glucocorticoid receptor in acute and chronic stress. *Endocrinology*, 149(11), 5482–5490. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0642>
- Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T. A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., Takahashi, M., Fukuda, N. N., Murakami, S., Miyachi, E., Hino, S., Atarashi, K., Onawa, S., Fujimura, Y., Lockett, T., ... Ohno, H. (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, 504(7480), 446–450. <https://doi.org/10.1038/nature12721>
- Gareau, M. G., Jury, J., MacQueen, G., Sherman, P. M., & Perdue, M. H. (2007a). Probiotic treatment of rat pups normalises corticosterone release and ameliorates colonic dysfunction induced by maternal separation. *Gut*, 56(11), 1522–1528. <https://doi.org/gut.2006.117176> [pii] 10.1136/gut.2006.117176
- Gareau, M. G., Jury, J., MacQueen, G., Sherman, P. M., & Perdue, M. H. (2007b). Probiotic treatment of rat pups normalises corticosterone release and ameliorates colonic dysfunction induced by maternal separation. *Gut*, 56(11), 1522–1528. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.117176>
- Grossmann, C., Scholz, T., Rochel, M., Bumke-Vogt, C., Oelkers, W., Pfeiffer, A. F. H., Diederich, S., & Bähr, V. (2004). Transactivation via the human glucocorticoid and mineralocorticoid receptor by therapeutically used steroids in CV-1 cells: A comparison of their glucocorticoid and mineralocorticoid properties. *European Journal of Endocrinology*, 151(3), 397–406. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1510397>
- Guida, F., Turco, F., Iannotta, M., De Gregorio, D., Palumbo, I., Sarnelli, G., Furiano, A., Napolitano, F., Boccella, S., Luongo, L., Mazzitelli, M., Usiello, A., De Filippis, F., Iannotti, F. A., Piscitelli, F., Ercolini, D., de Novellis, V., Di Marzo, V., Cuomo, R., & Maione, S. (2018). Antibiotic-induced microbiota perturbation causes gut endocannabinoidome changes, hippocampal neuroglial reorganization and depression in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 67, 230–245. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.09.001>

- Hadley, M. E., & Haskell-Luevano, C. (1999). The proopiomelanocortin system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 885, 1–21. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb08662.x>
- Hamilton, M. J., Weingarden, A. R., Sadowsky, M. J., & Khoruts, A. (2012). Standardized frozen preparation for transplantation of fecal microbiota for recurrent *Clostridium difficile* infection. *American Journal of Gastroenterology*, 107(5), 761–767. <https://doi.org/10.1038/ajg.2011.482>
- Hamon, M., & Blier, P. (2013). Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. In *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* (Vol. 45, pp. 54–63). <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.04.009>
- Hantsoo, L., & Zemel, B. S. (2021). Stress gets into the belly: Early life stress and the gut microbiome. *Behavioural Brain Research*, 414. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113474>
- Heijtz, R. D., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Bjorkholm, B., Samuelsson, A., Hibberd, M. L., Forssberg, H., & Pettersson, S. (2011). Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(7), 3047–3052. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010529108>
- Heimesaat, M. M., Bereswill, S., Fischer, A., Fuchs, D., Struck, D., Niebergall, J., Jahn, H.-K., Dunay, I. R., Moter, A., Gescher, D. M., Schumann, R. R., Gobel, U. B., & Liesenfeld, O. (2018). Gram-Negative Bacteria Aggravate Murine Small Intestinal Th1-Type Immunopathology following Oral Infection with *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology*, 177(12), 8785–8795. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.12.8785>
- Herman, J. P., Figueiredo, H., Mueller, N. K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M. M., Choi, D. C., & Cullinan, W. E. (2003). Central mechanisms of stress integration: Hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 24(3), 151–180. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2003.07.001>
- Herman, J. P., Mcklveen, J. M., Ghosal, S., Kopp, B., Wulsin, A., Makinson, R., Scheimann, J., & Myers, B. (2016). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Compr Physiol*, 6(2), 603–621. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150015.Regulation>
- Herman, J. P., Mcklveen, J. M., Solomon, M. B., Carvalho-Netto, E., & Myers, B. (2012). Neural regulation of the stress response: Glucocorticoid feedback mechanisms. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45(4), 292–298. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2012007500041>
- Herman, J. P., Ostrander, M. M., Mueller, N. K., & Figueiredo, H. (2005). Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary- adrenocortical axis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 29(8), 1201–1213. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2005.08.006>
- Herman JP, Figueiredo HF, Mueller NK, Ostrander MM, Zhang R, Tauchi M, Choi DC, Furay AR, Evanson NK, Nelson EB, U.-L. Y. (2007). Neurochemical Systems Regulating the Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis. In L. A. Blaustein J (Ed.), *Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology Behavioral neurochemistry, neuroendocrinology, and molecular neurobiology* (3rd ed., pp. 513–569).
- Herman, Y. M. U.-L. and J. P. (2009). Neural Regulation of Endocrine and Autonomic Stress Responses. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), 397–409. <https://doi.org/10.1038/nrn2647.Neural>
- Hoban, A. E., Moloney, R. D., Golubeva, A. V., McVey Neufeld, K. A., O'Sullivan, O., Patterson, E., Stanton, C., Dinan, T. G., Clarke, G., & Cryan, J. F. (2016). Behavioural and neurochemical

- consequences of chronic gut microbiota depletion during adulthood in the rat. *Neuroscience*, 339, 463–477. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.10.003>
- Hoban, A. E., Stilling, R. M., Ryan, F. J., Shanahan, F., Dinan, T. G., Claesson, M. J., Clarke, G., & Cryan, J. F. (2016). Regulation of prefrontal cortex myelination by the microbiota. *Translational Psychiatry*, 6(4), e774-9. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.42>
- Holzer, P., Reichmann, F., & Farzi, A. (2012). Neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide in the gut-brain axis. *Neuropeptides*, 46(6), 261–274. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2012.08.005>
- Huo, R., Zeng, B., Zeng, L., Cheng, K., Li, B., Luo, Y., Wang, H., Zhou, C., Fang, L., Li, W., Niu, R., Wei, H., & Xie, P. (2017). Microbiota modulate anxiety-like behavior and endocrine abnormalities in hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(NOV). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00489>
- Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J. H., Chinwalla, A. T., Creasy, H. H., Earl, A. M., Fitzgerald, M. G., Fulton, R. S., Giglio, M. G., Hallsworth-Pepin, K., Lobos, E. A., Madupu, R., Magrini, V., Martin, J. C., Mitreva, M., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., ... White, O. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207–214. <https://doi.org/10.1038/nature11234>
- Ido Lurie, Yu-Xiao Yang, Kevin Haynes, Ronac Mamtani, B. B. (2015). Antibiotic exposure and the risk for depression, anxiety, or psychosis: a nested case-control study. *J Clin Psychiatry*, 76(11), 1522–1528. <https://doi.org/10.4088/JCP.15m09961>
- Ilchmann-Diounou, H., Olier, M., Lencina, C., Riba, A., Barretto, S., Nankap, M., Sommer, C., Guillou, H., Ellero-Simatos, S., Guzylack-Piriou, L., Théodorou, V., & Ménard, S. (2019). Early life stress induces type 2 diabetes-like features in ageing mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 80, 452–463. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.04.025>
- Iqbal, A. M., Kumar, S., Hansen, J., Heyrman, M., Spee, R., & Lteif, A. (n.d.). *Association of Adverse Childhood Experiences with Glycemic Control and Lipids in Children with Type 1 Diabetes*. <https://doi.org/10.3390/children7020008>
- J Claes Stephan. (2004). CRH, stress, and major depression. *Psychobiological Interplay*, 69, 117–150. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(04\)69005-4](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(04)69005-4)
- J L Arriza, C Weinberger, G Cerelli, T M Glaser, B L Handelin, D E Housman, R. M. E. (1987). Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science*, 237(4812), 268–275. <https://doi.org/10.1126/science.3037703>
- Jacobson, L., & Sapolsky, R. (1991). The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrine*, 12(2), 118–134. <https://doi.org/10.1210/edrv-12-2-118>
- Johnson, K. V. A., & Burnet, P. W. J. (2020). Opposing effects of antibiotics and germ-free status on neuropeptide systems involved in social behaviour and pain regulation. *BMC Neuroscience*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12868-020-00583-3>
- Karen, C., Shyu, D. J. H., & Rajan, K. E. (2021). Lactobacillus paracasei Supplementation Prevents Early Life Stress-Induced Anxiety and Depressive-Like Behavior in Maternal Separation Model- Possible Involvement of Microbiota-Gut-Brain Axis in Differential Regulation of MicroRNA124a/132 and Glutamate Receptors. *Frontiers in Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.719933>

- Kelly, C. R., Hospital, T. M., Island, R., Kahn, S., Bowel, I., Kashyap, P., Clinic, M., Laine, L., Haven, N., Haven, W., Rubin, D., Atreja, A., Applab, S., Sinai, M., Moore, T., & Wu, G. (2016). Update on FMT 2015: Indications, Methodologies, Mechanisms and Outlook. *Gastroenterology*, *149*(1), 223–237. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.05.008>.Update
- Kelly, J. R., Borre, Y., O' Brien, C., Patterson, E., El Aidy, S., Deane, J., Kennedy, P. J., Beers, S., Scott, K., Moloney, G., Hoban, A. E., Scott, L., Fitzgerald, P., Ross, P., Stanton, C., Clarke, G., Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2016). Transferring the blues: Depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. *Journal of Psychiatric Research*, *82*, 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2016.07.019>
- Kemp, K. M., Colson, J., Lorenz, R. G., Maynard, C. L., & Pollock, J. S. (2021). Early life stress in mice alters gut microbiota independent of maternal microbiota inheritance. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, *320*(5), R663–R674. <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00072.2020>
- Kennedy, E. A., King, K. Y., & Baldrige, M. T. (2018). Mouse microbiota models: Comparing germ-free mice and antibiotics treatment as tools for modifying gut bacteria. *Frontiers in Physiology*, *9*(OCT). <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01534>
- Kochalska, K., Oakden, W., Słowik, T., Chudzik, A., Pankowska, A., Łazorczyk, A., Koziół, P., Andres-Mach, M., Pietura, R., Rola, R., Stanisz, G. J., & Orzyłowska, A. (2020). Dietary supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* JB-1 restores brain neurochemical balance and mitigates the progression of mood disorder in a rat model of chronic unpredictable mild stress. *Nutrition Research*, *82*, 44–57. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2020.06.019>
- Kronenberg, G., Reuter, K., Steiner, B., Brandt, M. D., Jessberger, S., Yamaguchi, M., & Kempermann, G. (2003). Subpopulations of Proliferating Cells of the Adult Hippocampus Respond Differently to Physiologic Neurogenic Stimuli. *Journal of Comparative Neurology*, *467*(4), 455–463. <https://doi.org/10.1002/cne.10945>
- Kundu, P., Lee, H. U., Garcia-Perez, I., Xue, E., Tay, Y., Kim, H., Faylon, L. E., Martin, K. A., Purbojati, R., Drautz-Moses, D. I., Ghosh, S., Nicholson, J. K., Schuster, S., Holmes, E., & Pettersson, S. (2019). Neurogenesis and longevity signaling in young germ-free mice transplanted with the gut microbiota of old mice. *Sci. Transl. Med*, *11*, 4760. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau4760>
- Kuo, T., McQueen, A., Chen, T. C., & Wang, J. C. (2015). Regulation of glucose homeostasis by glucocorticoids. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *872*, 99–126. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2895-8_5
- Lajud N, Roque A, Cajero M, Gutiérrez-Ospina G, T. 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>
- Lajud, N., & Torner, L. (2015). Early life stress and hippocampal neurogenesis in the neonate: Sexual dimorphism, long term consequences and possible mediators. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *8*(FEB), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00003>
- Lardenoije, R., Iatrou, A., Kenis, G., Kompotis, K., Harry, W. M., Mastroeni, D., Coleman, P., Lemere, C. A., Hof, P. R., Rutten, B. P. F., Building, G., Sun, B., City, S., Pasteur, L., Gustave, O., & Place, L. L. (2015). The epigenetics of aging and neurodegeneration. *Prog Neurobiol*, *131*, 21–64. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.05.002>.The

- Layden, B. T., Angueira, A. R., Brodsky, M., Durai, V., & Lowe, W. L. (2013). Short chain fatty acids and their receptors: New metabolic targets. *Translational Research*, 161(3), 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2012.10.007>
- Lee, D. Y., Kim, E., & Choi, M. H. (2015). Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress. *BMB Reports*, 48(4), 209–216. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2015.48.4.275>
- Lewis, K., Lutgendorff, F., Phan, V., Söderholm, J. D., Sherman, P. M., & McKay, D. M. (2010). Enhanced translocation of bacteria across metabolically stressed epithelia is reduced by butyrate. *Inflammatory Bowel Diseases*, 16(7), 1138–1148. <https://doi.org/10.1002/ibd.21177>
- Li, J., Jia, H., Cai, X., Zhong, H., Feng, Q., Sunagawa, S., Arumugam, M., Kultima, J. R., Prifti, E., Nielsen, T., Juncker, A. S., Manichanh, C., Chen, B., Zhang, W., Levenez, F., Wang, J., Xu, X., Xiao, L., Liang, S., ... Mende, D. R. (2014). An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nature Biotechnology*, 32(8), 834–841. <https://doi.org/10.1038/nbt.2942>
- Li, N., Wang, Q., Wang, Y., Sun, A., Lin, Y., Jin, Y., & Li, X. (2019). Fecal microbiota transplantation from chronic unpredictable mild stress mice donors affects anxiety-like and depression-like behavior in recipient mice via the gut microbiota- inflammation-brain axis. *Stress*, 22(5), 1–11. <https://doi.org/10.1080/10253890.2019.1617267>
- Liu, S., Guo, R., Liu, F., Yuan, Q., Yu, Y., & Ren, F. (2020). Gut microbiota regulates depression-like behavior in rats through the neuroendocrine-immune-mitochondrial pathway. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 16, 859–869. <https://doi.org/10.2147/NDT.S243551>
- Liu, Y. W., Liu, W. H., Wu, C. C., Juan, Y. C., Wu, Y. C., Tsai, H. P., Wang, S., & Tsai, Y. C. (2016). Psychotropic effects of *Lactobacillus plantarum* PS128 in early life-stressed and naïve adult mice. *Brain Research*, 1631, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.11.018>
- Lois, C., & Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, 264(5162), 1145–1148. <https://doi.org/10.1126/science.8178174>
- Luccia, B. Di, Crescenzo, R., Mazzoli, A., & Cigliano, L. (2015). Rescue of Fructose-Induced Metabolic Syndrome by Antibiotics or Faecal Transplantation in a Rat Model of Obesity. *PLoS ONE*, 10(8), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134893>
- Luczynski, P., Whelan, S. O., O'Sullivan, C., Clarke, G., Shanahan, F., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2016). Adult microbiota-deficient mice have distinct dendritic morphological changes: differential effects in the amygdala and hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 44(9), 2654–2666. <https://doi.org/10.1111/ejn.13291>
- Lynnette A. Averill, Chadi G. Abdallah, Lisa R. Fenton, Madonna K. Fasula, Lihong Jiang, Douglas L. Rothman, Graeme F. Mason, G. S. (2020). Early life stress and glutamate neurotransmission in major depressive disorder. *Physiology & Behavior*, 35, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2020.03.015>
- Lyte, M. (2014). Microbial endocrinology: Host-microbiota neuroendocrine interactions influencing brain and behavior. *Gut Microbes*, 5, 381-389. <https://doi.org/10.4161/gmic.28682>
- M. Kronenberg Henry, Melmed Shlomo, S. Polonsky Kenneth, & Larsen P. Reed. (2009). *Williams tratado de ENDOCRINOLOGÍA* (11th ed.).
- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., & Evans, R. M. (1995). The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell*, 83(6), 835–839. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90199-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90199-X)

- Maniam, J., & Morris, M. J. (2010a). 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. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.11.005>
- Maniam, J., & Morris, M. J. (2010b). Palatable cafeteria diet ameliorates anxiety and depression-like symptoms following an adverse early environment. *Psychoneuroendocrinology*, 35(5), 717–728. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.10.013>
- Markowiak, P., & Ślizewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9, 1021. <https://doi.org/10.3390/nu9091021>
- 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(5–6), 1944–1953. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.12.019>
- Mawdsley, J. E., & Rampton, D. S. (2005). Psychological stress in IBD: New insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut*, 54(10), 1481–1491. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.064261>
- Mayer, E. a, Knight, R., Mazmanian, S. K., Cryan, J. F., & Tillisch, K. (2014). Gut microbes and the brain: paradigm shift in neuroscience. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(46), 15490–15496. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3299-14.2014>
- Mc Ewen Bruce S. (1998). Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci*, 1;840:33-44. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09546.x>
- Mccormick, C. M., Kehoe, P., & Kovacs, S. (1998). Corticosterone release in response to repeated, short episodes of neonatal isolation: Evidence of sensitization. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 16(3–4), 175–185. [https://doi.org/10.1016/S0736-5748\(98\)00026-4](https://doi.org/10.1016/S0736-5748(98)00026-4)
- McEwen, B. S. (2012). Brain on stress: How the social environment gets under the skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(SUPPL.2), 17180–17185. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121254109>
- McEwen, B. S., De Kloet, E. R., & Rostene, W. (1986). Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiological Reviews*, 66(4), 1121–1188. <https://doi.org/10.1152/physrev.1986.66.4.1121>
- McEwen, B. S., Nasca, C., & Gray, J. D. (2016). Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology*, 41(1), 3–23. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.171>
- McVey Neufeld, K. A., O'Mahony, S. M., Hoban, A. E., Waworuntu, R. V., Berg, B. M., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2019). Neurobehavioural effects of Lactobacillus rhamnosus GG alone and in combination with prebiotics polydextrose and galactooligosaccharide in male rats exposed to early-life stress. *Nutritional Neuroscience*, 22(6), 425–434. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1397875>
- Mennigen, R., Nolte, K., Rijcken, E., Utech, M., Loeffler, B., Senninger, N., & Bruewer, M. (2009). Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296, 1140–1149. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90534.2008.-Changes>
- Miragaia, A. S., de Oliveira Wertheimer, G. S., Consoli, A. C., Cabbia, R., Longo, B. M., Girardi, C. E. N., & Suchecki, D. (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://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00159>

- Mirescu, C., Peters, J. D., & Gould, E. (2004). Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nature Neuroscience*, 7(8), 841–846. <https://doi.org/10.1038/nn1290>
- Möhle, L., Mattei, D., Heimesaat, M. M., Bereswill, S., Fischer, A., Alutis, M., French, T., Hambardzumyan, D., Matzinger, P., Dunay, I. R., & Wolf, S. A. (2016). Ly6Chi Monocytes Provide a Link between Antibiotic-Induced Changes in Gut Microbiota and Adult Hippocampal Neurogenesis. *Cell Reports*, 15(9), 1945–1956. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.074>
- Moussaoui, N., Braniste, V., Ait-Belgnaoui, A., Gabanou, M., Sekkal, S., Olier, M., Théodorou, V., Martin, P. G. P., & Houdeau, E. (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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088382>
- Moussaoui, N., Larauche, M., Biraud, M., Molet, J., Million, M., Mayer, E., & Taché, Y. (2016). Limited nesting stress alters maternal behavior and in vivo intestinal permeability in Male Wistar pup rats. *PLoS ONE*, 11(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155037>
- Nell, S., Suerbaum, S., & Josenhans, C. (2010). The impact of the microbiota on the pathogenesis of IBD: Lessons from mouse infection models. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 564–577. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2403>
- Neufeld, K. M., Kang, N., Bienenstock, J., & Foster, J. A. (2011). Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterology and Motility*, 23(3), 255–265. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2010.01620.x>
- Nishi, M. (2020). Effects of Early-Life Stress on the Brain and Behaviors: Implications of Early Maternal Separation in Rodents. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19). <https://doi.org/10.3390/ijms21197212>
- Olivares, J. D., Juárez, E., & García, F. (2015). El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje. *Revista Médica de La Universidad Veracruzana*, 15(June), 20–28.
- O'Mahony, S. M., Clarke, G., Borre, Y. E., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2014). Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behavioural Brain Research*, 277, 32–48. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.027>
- O'Mahony, S. M., Marchesi, J. R., Scully, P., Codling, C., Ceolho, A. M., Quigley, E. M., Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2009a). Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats: implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses. *Biol Psychiatry*, 65(3), 263–267. [https://doi.org/S0006-3223\(08\)00801-9](https://doi.org/S0006-3223(08)00801-9) [pii] 10.1016/j.biopsych.2008.06.026
- O'Mahony, S. M., Marchesi, J. R., Scully, P., Codling, C., Ceolho, A. M., Quigley, E. M. M., Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2009b). Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats: implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses. *Biological Psychiatry*, 65(3), 263–267. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.06.026>
- Organizacion Mundial de la Salud. (2021). *Depresión*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/depression>
- Packard, A. E. B., Egan, A. E., & Ulrich-Lai, Y. M. (2016). HPA axis-interactions with behavioral systems. In *Comprehensive Physiology* (Vol. 6, Issue 4). <https://doi.org/10.1002/cphy.c150042>

- Palacio, S. D., Teresa, R., Cercenado, E., & Mansilla, C. (2016). Diagnóstico microbiológico. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 59, 5–9.
- Park, H. J., Kim, S. A., Kang, W. S., & Kim, J. W. (2021). Early-life stress modulates gut microbiota and peripheral and central inflammation in a sex-dependent manner. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms22041899>
- Paul Forsythe, John Bienenstock, and W. A. K. (2018). *Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease, Advances in Experimental Medicine and Biology* (J. F. C. Mark Lyte, Ed.; 1st ed.). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_5.
- Rafacho, A., Gonçalves-Neto, L. M., Santos-Silva, J. C., Alonso-Magdalena, P., Merino, B., Taboga, S. R., Carneiro, E. M., Boschero, A. C., Nadal, A., & Quesada, I. (2014). Pancreatic alpha-cell dysfunction contributes to the disruption of glucose homeostasis and compensatory insulin hypersecretion in glucocorticoid-treated rats. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093531>
- Rao, J., Xie, R., Lin, L., Jiang, J., Du, L., Zeng, X., Li, G., Wang, C., & Qiao, Y. (2021). Fecal microbiota transplantation ameliorates gut microbiota imbalance and intestinal barrier damage in rats with stress-induced depressive-like behavior. *European Journal of Neuroscience*, 53(11), 3598–3611. <https://doi.org/10.1111/ejn.15192>
- Ratman, D., Vanden Berghe, W., Dejager, L., Libert, C., Tavernier, J., Beck, I. M., & De Bosscher, K. (2013). How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: A scope beyond tethering. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 380(1–2), 41–54. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.12.014>
- Reineke, L. C., & Neilson, J. R. (2019). Differences between acute and chronic stress granules, and how these differences may impact function in human disease. *Biochemical Pharmacology*, 162, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.10.009>
- Reul, J. M. H. M., & De Kloet, E. R. (1985). Two receptor systems for corticosterone in rat brain: Microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, 117(6), 2505–2511. <https://doi.org/10.1210/endo-117-6-2505>
- Rhee, S. H., Pothoulakis, C., & Mayer, E. A. (2009). Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 6(5), 306–314. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2009.35>
- Roque, A., Valles Méndez, K. M., Ruiz, R., Pineda, E., & Lajud, N. (2021). Early life stress induces a transient increase in hippocampal corticotropin-releasing hormone in rat neonates that precedes the effects on hypothalamic neuropeptides. *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1111/ejn.15193>
- Ruiz, R., Roque, A., Pineda, E., Licon-Limón, P., José Valdéz-Alarcón, J., & Lajud, N. (2018). Early life stress accelerates age-induced effects on neurogenesis, depression, and metabolic risk. *Psychoneuroendocrinology*, 96, 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.07.012>
- Ruiz-González, R., Lajud, N., Tejeda-Martínez, A. R., Flores-Soto, M. E., Valdez-Alarcón, J. J., Tellez, L. A., & Roque, A. (2022). Antibiotic-induced microbiota depletion in normally-reared adult rats mimics the neuroendocrine effects of early life stress. *Brain Research*, 1793. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2022.148055>
- Ryu, V., Yoo, S. B., Kang, D. W., Lee, J. H., & Jahng, J. W. (2009). Post-weaning isolation promotes food intake and body weight gain in rats that experienced neonatal maternal separation. *Brain Research*, 1295, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.08.006>

- S. Ivy Autumn, L. Brunson Kristen, Sandman Curt, & Z. Baram Tallie. (2008). Dysfunctional nurturing behavior in rat dams with limited access to nesting material: A clinically relevant model for early-life stress. *Neuroscience*, 154(3), 1132–1142. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.04.019>
- Sáez, S. R. (2011). Activación de la neurogénesis en el hipocampo de raton adulto por factores embrionarios. *Investigacion Biomédica*, 2–8.
- Sapolsky, R. M. (1996). Stress, glucocorticoids, and damage to the nervous system: the current state of confusion. *Stress*, 1(1), 1–19. <https://doi.org/10.3109/10253899609001092>
- Sawada, M., & Sawamoto, K. (2013). Mechanisms of neurogenesis in the normal and injured adult brain. *Keio Journal of Medicine*, 62(1), 13–28. <https://doi.org/10.2302/kjm.2012-0005-RE>
- Schemann, M., & Neunlist, M. (2004). The human enteric nervous system. *Neurogastroenterology and Motility*, 16, 55–59. <https://doi.org/10.1111/j.1743-3150.2004.00476.x>
- Scott, G. A., Terstege, D. J., Vu, A. P., Law, S., Evans, A., & Epp, J. R. (2020). Disrupted Neurogenesis in Germ-Free Mice: Effects of Age and Sex. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00407>
- Sekirov, I., Russell, S. L., Caetano M Antunes, L., & Finlay, B. B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiological Reviews*, 90, 859–904. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>
- Selye, H. (1936). A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature*, 138–32. <https://doi.org/10.1038/138032a0>
- Serrats, J., Schiltz, J. C., García-Bueno, B., van Rooijen, N., Reyes, T. M., & Sawchenko, P. E. (2010). Dual Roles for Perivascular Macrophages in Immune-to-Brain Signaling. *Neuron*, 65(1), 94–106. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.032>
- Seth Rakoff-Nahoum, J. P., Fatima Eslami-Varzaneh, S. E., & Medzhitov, and R. (2004). Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis. *Cell Press*, 118(3), 229–241. <https://doi.org/10.2307/3557550>
- Smith, K. E., & Pollak, S. D. (2020). Early life stress and development: potential mechanisms for adverse outcomes. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 12(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s11689-020-09337-y>
- Snyder, J. S., Soumier, A., Brewer, M., Pickel, J., & Cameron, H. a. (2012). Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behavior. *Nature*, 476(7361), 458–461. <https://doi.org/10.1038/nature10287.Adult>
- Sommer F, B. F. (2016). Know your neighbor: Microbiota and host epithelial cells interact locally to control intestinal function and physiology. *Bioessays*, 38(5), 455–464. <https://doi.org/10.1002/bies.201500151>
- Sousa, V. C., Vital, J., Costenla, A. R., Batalha, V. L., Sebastião, A. M., Ribeiro, J. A., & Lopes, L. V. (2014). Maternal separation impairs long term-potential in CA1-CA3 synapses and hippocampal-dependent memory in old rats. *Neurobiology of Aging*, 35(7), 1680–1685. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.024>
- 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 C. T. W. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 65(8), 55:4 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>

- Stilling, R. M., Ryan, F. J., Hoban, A. E., Shanahan, F., Clarke, G., Claesson, M. J., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2015). Microbes & neurodevelopment - Absence of microbiota during early life increases activity-related transcriptional pathways in the amygdala. *Brain, Behavior, and Immunity*, *50*, 209–220. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.07.009>
- Stilling RM, Dinan TG, C. JF. (2014). Microbial genes, brain & behaviour - epigenetic regulation of the gut-brain axis. *Genes Brain Behav*, *13*(1), 69–86. <https://doi.org/10.1111/gbb.12109>
- Stockmeier, C. A., Mahajan, G. J., Konick, L. C., Overholser, J. C., George, J., Meltzer, H. Y., Uylings, H. B. M., Friedman, L., & Rajkowska, G. (2004). Cellular Changes in the Postmortem Hippocampus in Major Depression. *Biol Psychiatry*, *56*(9), 640–650. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.08.022>. Cellular
- Suárez, E. (2012). Microbiota Autóctona, Probióticos Y Prebióticos. *Nutrición Hospitalaria*, *28*, 4–8. <http://www.sepy.es/probioticos-y-prebioticos.pdf>
- Suárez-Zamorano, N., Fabbiano, S., Chevalier, C., Stojanović, O., Colin, D. J., Stevanović, A., Veyrat-Durebex, C., Tarallo, V., Rigo, D., Germain, S., Ilievska, M., Montet, X., Seimbille, Y., Hapfelmeier, S., & Trajkovski, M. (2015). Microbiota depletion promotes browning of white adipose tissue and reduces obesity. *Nature Medicine*, *21*(12), 1497–1501. <https://doi.org/10.1038/nm.3994>
- Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X.-N. X., Kubo, C., & Koga, Y. (2004). Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *The Journal of Physiology*, *558*(Pt 1), 263–275. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.063388>
- Szurszewski, J. H. (1981). Physiology of mammalian prevertebral ganglia. *Annual Review of Physiology*, *43*, 53–68. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.43.030181.000413>
- Taiyi Kuo, Charles A. Harris, and J.-C. W. (2013). Metabolic functions of glucocorticoid receptor in skeletal muscle. *Physiology & Behavior*, *380*(1–2), 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.03.003>
- Ulrich-lai, Y. M., Jones, K. R., Ziegler, D. R., Cullinan, W. E., & Herman, J. P. (2011). Forebrain Origins of Glutamatergic Innervation to the Rat Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus: Differential Inputs to the Anterior Versus Posterior Subregions. *J Comp Neurol*, *519*(7), 1301–1319. <https://doi.org/10.1002/cne.22571>. Forebrain
- Usui, N., Matsuzaki, H., & Shimada, S. (2021). Characterization of early life stress-affected gut microbiota. *Brain Sciences*, *11*(7). <https://doi.org/10.3390/brainsci11070913>
- Van Bodegom, M., Homberg, J. R., & Henckens, M. J. A. G. (2017). Modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by early life stress exposure. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *11*(April), 1–33. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00087>
- van Praag Henriette, F. Schinder Alejandro, R. Christie Brian, Toni Nicolas, D. Palmer Theo, & H. Gage Fred. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, *415*, 1030–1034. <https://doi.org/10.1038/4151030a>
- Vargas, J., Junco, M., Gomez, C., & Lajud, N. (2016). Early life stress increases metabolic risk, HPA axis reactivity, and depressive-like behavior when combined with postweaning social isolation in rats. *PLoS ONE*, *11*(9), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162665>
- Vinolo, M. A. R., Ferguson, G. J., Kulkarni, S., Damoulakis, G., Anderson, K., Bohlooly-Y, M., Stephens, L., Hawkins, P. T., & Curi, R. (2011). SCFAs induce mouse neutrophil chemotaxis through the GPR43 receptor. *PLoS ONE*, *6*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021205>

- Vogel, S. C., Brito, N. H., & Callaghan, B. L. (2020). Early Life Stress and the Development of the Infant Gut Microbiota: Implications for Mental Health and Neurocognitive Development. *Current Psychiatry Reports*, 22(11). <https://doi.org/10.1007/s11920-020-01186-9>
- Von Bohlen Und Halbach, O. (2011). Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell and Tissue Research*, 345(1), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1196-4>
- Wang, H. X., & Wang, Y. P. (2016). Gut microbiota-brain axis. *Chinese Medical Journal*, 129(19), 2373–2380. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.190667>
- Weingarden, A. R., & Vaughn, B. P. (2017). Intestinal microbiota, fecal microbiota transplantation, and inflammatory bowel disease. *Gut Microbes*, 8, 238–252. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1290757>
- WHO. (2020). *Child maltreatment*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/child-maltreatment>
- Wise, J. K., Hendler, R., & Felig, P. (1973). Influence of glucocorticoids on glucagon secretion and plasma amino acid concentrations in man. *Journal of Clinical Investigation*, 52(11), 2774–2782. <https://doi.org/10.1172/JCI107473>
- Xu, J., Guan, X., Li, H., Zhang, M., & Xu, X. (2020). The Effect of Early Life Stress on Memory is Mediated by Anterior Hippocampal Network. *Neuroscience*, 451, 137–148. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.10.018>
- Yadav, H., Lee, J. H., Lloyd, J., Walter, P., & Rane, S. G. (2013). Beneficial metabolic effects of a probiotic via butyrate-induced GLP-1 hormone secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 288(35), 25088–25097. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.452516>
- Zhang, X., Li, H., Sun, H., Jiang, Y., Wang, A., Kong, Y., Sun, X., Zhu, G., Li, Q., Du, Z., Sun, H., & Sun, L. (2020). Effects of BDNF Signaling on Anxiety-Related Behavior and Spatial Memory of Adolescent Rats in Different Length of Maternal Separation. *Frontiers in Psychiatry*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00709>
- Ziegler, D. R., Edwards, M. R., Ulrich-Lai, Y. M., Herman, J. P., & Cullinan, W. E. (2012). Brainstem origins of glutamatergic innervation of the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Journal of Comparative Neurology*, 520(11), 2369–2394. <https://doi.org/10.1002/cne.23043>

XIII. PUBLICACIONES

Brain Research 1793 (2022) 148055



Contents lists available at ScienceDirect

Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/brainres



Antibiotic-induced microbiota depletion in normally-reared adult rats mimics the neuroendocrine effects of early life stress

Roberto Ruiz-González^{a,1}, Naima Lajud^{a,1,*}, Aldo Rafael Tejada-Martínez^b,
Mario Eduardo Flores-Soto^b, Juan José Valdez-Alarcón^c, Luis A. Tellez^d, Angélica Roque^a

^a Laboratorio de Neurobiología del Desarrollo, División de Neurociencias, Centro de Investigación Biomédica de Michoacán (CIBIM), Instituto Mexicano del Seguro Social, Morelia, Michoacán, Mexico

^b Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular, División de Neurociencias, Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO), Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, Mexico

^c Centro Multidisciplinario de Estudios Biotecnología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, Mexico

^d Laboratorio de Neurobiología de la Conducta Motivada, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Juriquilla, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:
Maternal separation
Dexamethasone
Iba1
Corticosterone
HPA axis

ABSTRACT

Early life stress induced by maternal separation (MS) causes neuroendocrine, behavioral, and metabolic alterations that are related to gut dysbiosis. MS also increases microglial activation and decreases neurogenesis. Whether these long-term alterations are maintained or worsened in the absence of gut microbiota remains unknown. Hence, this study evaluated the effect of MS symptomatology after antibiotic-induced microbiota depletion (AIMD) in adult rats. Control and maternally separated (3 h per day from postnatal day one to 14, MS180) rats were subjected to AIMD for one month, then assessed for behavioral, metabolic, and neuroendocrine responses. Effects of MS180 and AIMD on gut microbiota were confirmed by qPCR. The data indicate that MS180 caused a passive coping strategy in the forced swimming test and decreased hippocampal neurogenesis. In addition, fasting glucose, cholesterol, and corticosterone levels increased, which correlated with a decrease in *Lactobacillus spp* counts in the caecum. AIMD also increased immobility in the forced swimming test, decreased hippocampal neurogenesis, and augmented corticosterone levels. However, it had no effects on glucose homeostasis or plasma lipid levels. Furthermore, the MS180-induced long-term effects on behavior and neurogenesis were not affected by microbiota depletion. Meanwhile, the metabolic imbalance was partially reversed in MS180 + AIMD rats. These results show that AIMD mimics the behavioral consequences of MS180 but may prevent metabolic imbalance, suggesting that gut dysbiosis could be part of the mechanisms involved in the maintenance of the long-term consequences of early life stress.

1. Introduction

The World Health Organization defines adverse childhood experiences as one of “the most intensive and frequently occurring sources of stress that children may suffer early in life”, frequently expressed as child abuse and neglect, violence, and household dysfunction (WHO, 2012). These harmful forms of early life stress (ELS) can compromise the function of the neuroendocrine and neuroimmune systems, leading to long-lasting behavioral and metabolic alterations that could persist even

years after the cessation of stress (Heim et al., 2010). Specifically, ELS is associated with a higher risk of depression, diabetes, cardiovascular disease, increased activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, and chronic inflammation (Danese and Tan, 2014; Flores-Torres et al., 2020; Heim et al., 2010; Teicher and Samson, 2016). Moreover, ELS is a predictor of brain-gut alterations associated with the activity of the HPA axis and mood disorders (Coley et al., 2021).

Maternal separation (MS) in rodents is the most widely used animal model of ELS. In the long-term, these animals display similar alterations

Abbreviations: AIMD, antibiotic-induced microbiota depletion; CONT, control group; CORT, corticosterone; ELS, early life stress; FST, forced swimming test; GC, glucocorticoid; HPA, hypothalamus-pituitary-adrenal; MS180, maternal separation for 180 min; PND, postnatal day; qPCR, quantitative polymerase chain reaction.

* Corresponding author at: Laboratorio de Neurobiología del Desarrollo, División de Neurociencias, Centro de Investigación Biomédica de Michoacán, Instituto Mexicano del Seguro Social, Camino de la arboleda No. 300. Colonia Ex Hda. De San José la de la Huerta, Morelia, Michoacán CP 58341, Mexico.

E-mail address: naima.lajud@imss.gob.mx (N. Lajud).

¹ Naima Lajud and Roberto Ruiz contributed equally to the study and shared first authorship.

<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2022.148055>

Received 20 June 2022; Received in revised form 9 August 2022; Accepted 11 August 2022

Available online 18 August 2022

0006-8993/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

to those observed in adults experiencing adverse childhood experiences, such as a passive coping strategy, impaired glucose homeostasis, and increased baseline corticosterone (CORT) levels (Amini-Khoei et al., 2019; Roque et al., 2020; Ruiz et al., 2018; Vargas et al., 2016). MS has been shown to affect hippocampal neurogenesis and increase neuroinflammation (Amini-Khoei et al., 2019; Nouri et al., 2020; Ruiz et al., 2018; Saavedra et al., 2021). Specifically, MS animals show a decrease in dentate gyrus doublecortin (DCX+) positive cells and an increase activated microglia in the CA3 region (Ruiz et al., 2018; Saavedra et al., 2021). Interestingly, many of the deleterious effects of MS on the HPA axis and behavior are not observed immediately after stress exposure, but rather develop through lifespan in a gradual and time-dependent form as a result of allostatic load accumulation (McEwen, 2012).

MS, is also considered an efficient model of dysfunctional gut-brain axis that causes gut dysbiosis in adults (O'Mahony et al., 2010), inducing changes in the gut microbiota composition that are related to increased CORT levels (Amini-Khoei et al., 2019). Recently, a link between gut microbiota and the MS-associated behavioral phenotype has been suggested (De Palma et al., 2015; Karen et al., 2021; Liao et al., 2019; McVey Neufeld et al., 2019). This interaction between gut microbiota and MS was mainly described using animals raised under germ-free (GF) conditions. De Palma and colleagues (2015) demonstrated that MS causes anxiety- and depressive-like behavior in normal, but not GF animals. Moreover, they found that the colonization of GF adult animals produced different colonic microbial profiles and behavioral outcomes in MS and non-stressed groups. These findings suggest that MS-induced alterations in microbiota may play a role not only in the development but also in the maintenance of the ELS long-term effects.

One potential caveat of GF models is that gut microbiota is considered an "environmental agent" that shapes brain development during the early life (Diaz Heljtz, 2016). Therefore, rearing animals under GF conditions could produce confounding effects. In fact, it has been reported that GF-reared animals present behavioral, neuroendocrine, and neuroimmune alterations akin to those observed after ELS. (Crumeyrolle-Arias et al., 2014; Cusimano et al., 2020; De Palma et al., 2015; Huo et al., 2017; Johnson and Burnet, 2020; Luo et al., 2018). As an alternative, antibiotic-induced microbiome depletion (AIMD) has been used in normally-reared animals to evaluate the role of the gut microbiome in pathological conditions. AIMD depletes bacterial populations in rodents that were normally colonized since birth, thus, avoiding the undesirable effects of raising animals under GF conditions (Hoban et al., 2016; Kennedy et al., 2018). In adults, AIMD has been associated with neuroendocrine alterations, decreased hippocampal neurogenesis, and changes in anxiety- and depressive-like behaviors (Guida et al., 2018; Hoban et al., 2016). Additionally, some reports have shown that AIMD improves glucose homeostasis and protects against high fat diet-induced metabolic imbalance (Carvalho et al., 2012; Suárez-Zamorano et al., 2015).

However, the effects of AIMD on adult animals that already present alterations associated to ELS has never been studied. We therefore investigated the behavioral, neuroendocrine, and metabolic consequences of MS (3 h per day from postnatal day one to 14, MS180) after one month of AIMD in normally-reared adult rats. Our primary goal was to determine whether the long-term alterations induced by MS180 are maintained or worsened in the absence of gut microbiota. Also, because some AIMD effects are akin to those of ELS, a secondary goal was to determine if AIMD-induced alterations are of similar magnitude to those induced by MS180. Our results shed light on the participation of gut microbiota in the maintenance of ELS long-term effects.

2. Experimental procedure

2.1. Animals

Eight time-pregnant female Sprague-Dawley rats were obtained from the animal facility of the Institute of Neurobiology (National

Autonomous University of Mexico) and were habituated for 1 week in our vivarium facility. Rats were housed in temperature-controlled rooms (22 °C) under a 12-hr light/dark cycle (lights on 07:00) with free access to food (Purina, Lab Diet, USA) and water. All experiments were approved by the National Ethics Committee of the Instituto Mexicano del Seguro Social (R-2017-785-077) and performed following the official regulations and the Animal Research Reporting of In Vivo Experiments guidelines. All experiments were performed between 09:00 and 13:00. Several studies have reported that MS has no effects on female offspring (Dimatelis et al., 2015; Lundberg et al., 2017) and thus only males were evaluated. Each experimental group consisted of pups from four different dams ($n = 8$ pups per group). To normalize the microbiota, all litters were weaned at postnatal day 21 (PND21) and littermates were housed together until adulthood (Moore and Stanley, 2016).

2.2. Maternal separation protocol

Maternal separation for 180 min per day (MS180) was used as an ELS model as previously described (Roque et al., 2020; Ruiz et al., 2018; Vargas et al., 2016). The day of delivery was considered postnatal day zero (PND0). To randomize the experimental units, eliminate any confounding effects of litter size, and homogenize microbiota, litters were cross-fostered and culled to 10 pups at PND1 (6–8 males and 2–4 females) with as little disturbance to the mothers and pups as possible. The litters were randomly assigned to the MS180 protocol or left undisturbed (CONT) with their mothers except during routine cage cleaning. Regarding the separation protocol, at 09:00, the MS180 litters were removed, and pups were individually placed in small Plexiglas cages filled with clean sawdust in a room different than the main colony room for 3 h at a controlled temperature (30 °C to 33 °C, using thermic pads). This procedure was repeated daily from PND1 to PND14.

2.3. AIMD

On PND60, half of the rats from each litter were assigned to the antibiotic treatment (AIMD) and the remaining were maintained under standard (STD) animal facility conditions. A mixture of ampicillin (1 g/L), vancomycin (500 mg/L), neomycin (1 g/L), and metronidazole (1 g/L) was provided in purified drinking water as previously described (Rakoff-Nahoum et al., 2004) for one month. This mixture reduces the bacterial DNA in the stool by 400-fold without causing morbidity (Rakoff-Nahoum et al., 2004). The antibiotic-treated water was changed every third day to avoid the loss of activity. The general health status was monitored daily and no signs of distress, decreased water consumption, diarrhea, or weight loss were observed. The cages were cleaned every second day to reduce the risk of the microbiota re-establishment. The antibiotic treatment continued during all the behavioral evaluations until euthanasia, and antiseptic measures were taken to avoid cross-contamination from non-treated animals during all tests.

2.4. Forced swimming test (FST)

At PND90, depressive-like behavior was evaluated with the FST as previously described (Vargas et al., 2016; Ruiz et al., 2018; Roque et al., 2020). Briefly, adult rats were placed in a Plexiglas cylinder (35 cm × 50 cm) filled with clean filtered water (21 °C) for 10 min. The sessions were recorded with a webcam and analyzed for the following behaviors: struggling (upward movement of the forepaws), swimming (horizontal movement throughout the tank), and immobility (floating without struggling and only making movements necessary to maintain the head above the water). The data were collected by a researcher blinded to the conditions and analyzed using the custom-written software, EVENTLOG (Lukas et al., 2010). The water was changed and the cylinder was sanitized between testing to avoid cross-contamination.

2.5. Glucose tolerance test (GTT)

After the FST, all rats were fasted overnight and then subjected to a GTT on PND91. For the sample collection, rats were gently immobilized with a fabric cloth and a small puncture was performed at the tip of the tail. Fasting samples were collected before i.p. administration of 1 g/kg glucose (50 %, DX-50; Pisa, Guadalajara, Mexico). Additional samples were collected 30 min and 120 min after glucose administration. Glucose concentrations were measured using an Accu-Check glucose meter (Roche Diagnostics, Edo. Mexico, Mexico).

2.6. Tissue and sample collection

Euthanasia and sample collections were performed under sterile conditions at PND92. Rats received an overdose of sodium pentobarbital (i.p.) and intracardial blood samples were collected. The caecum was exposed, ligated, extracted, and weighed. Caecum contents were collected in sterile 1.5 mL tubes and stored at -30°C until processing. The free CORT content in plasma was assessed in duplicates with a corticosterone ELISA kit (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) with a detection limit of 26.99 pg/mL. Colorimetric assays were performed for triglycerides and low- and high-density lipoprotein cholesterol (Randox, London, UK) in plasma samples. To minimize variability, hormone levels were measured in a single assay. The intra- and inter-assay coefficients of variation were $<10\%$ for all comparisons. After collecting the blood and caecum samples (the total time of sample collection was maintained under 3 min), the rats were rapidly perfused intracardially with 200 mL of saline solution (0.9 % NaCl) and 200 mL of 4 % paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer solution (PB). The brains were extracted, placed in 4 % PFA for 24 h, transferred to 30 % sucrose in PB until they sunk, and then were frozen. Random systematic sampling of 40 μm thick slices along the sagittal axis of the hippocampus was performed on a cryostat (Leica CM3050 S). The sections were placed in tubes with cryoprotective solution (25 % glycerol, 25 % ethylene glycol, 50 % PB) until processing.

2.7. Immunohistochemistry

A series of sagittal sections (240 μm intervals) were randomly selected for immunohistochemistry. Brain sections were pretreated with hydrogen peroxide and methanol and further incubated in primary antibody solution for detecting either the marker for neuroblasts and immature neurons doublecortin (goat anti-DCX, 1:1000, Santa Cruz), the proliferation-associated protein Ki-67 (rabbit anti-Ki-67, 1:3000, ABCAM), or the anti-ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) for microglia detection (rabbit anti-Iba-1 primary antibody, 1:500; Abcam). Next, they were incubated in the corresponding biotinylated secondary antibody solution (1:750, Vector Laboratories) and visualized with an avidin-biotin complex (Elite ABC kit, Vector Laboratories) and a Ni-DAB solution (DAB staining kit, Vector Laboratories), mounted, and cover-slipped. For the immunofluorescent detection, sections were visualized with the fluorescent avidin-FITC substrate kit (Vector Laboratories), counterstained with DAPI, mounted, and cover-slipped with DAKO mounting medium (DAKO, Glostrup, Denmark).

2.8. Counting DCX- and Ki67-positive cells

For stereology, the DCX- and Ki67-positive cells along the entire hippocampus were counted by a researcher blinded to the experimental conditions. The boundaries of the granular layer (GL) and subgranular zone (SGZ) of the DG were digitally outlined using the software Axio Vision 4.6 (Karl Zeiss). The number of cells in the outlined areas were quantified and total cell numbers and DG volume were calculated according to the Cavalieri principle (Lajud et al., 2012; Ruiz et al., 2018; Lajud et al., 2019; Diaz-Chávez et al., 2020).

2.9. Microglial morphology analysis

For the morphological analysis in the dorsal CA3 hippocampal region (from sagittal 3.90 mm and bregma -4.0 mm, to sagittal 1.4 mm and bregma -2.1 mm), 24 cells from 4 slices from each brain were analyzed. The sections were selected to correspond to the same level in all animals to achieve a uniform analysis using the basic principle of fractionation from medial to lateral areas. Images were obtained using a light microscope (Leica LDM6 Microscope) with 40x magnification (1920 \times 1440 pixels and 311.25 μm \times 233.44 μm respectively). The cell-body area and the covered environment area (CEA) including cytoplasmic elongations, along with the ratio of these parameters (CEA/cell-body area) were calculated by a researcher blinded to the experimental conditions, as previously described (Verdonk et al., 2016). The Leica Application Suite X (LAS X) for the Life Sciences Software was used to manually draw and quantify the areas.

2.10. Bacterial DNA extraction and real-time PCR

The total DNA content from caecum samples was extracted using a commercially available kit (ISOLATE fecal DNA kit, Bioline) according to the manufacturer's instructions. For 16S rRNA encoding gene (16S rDNA) quantification, specific oligonucleotide sequences were utilized (Supplementary Table 1). We used 100 ng of DNA for qPCR analyses with each reaction containing Master Mix 2X (iQ Universal SYBR Green Supermix, BioRad) and forward and reverse primers (10 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$ each, Invitrogen, Camarillo, CA; Supplementary Table 1). qPCR was performed for 40 cycles using the CFX 96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). 16 s rDNA copy counts were obtained for total bacteria load, *Lactobacillus* spp, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium coccoides*, and *Clostridium leptum* using previously reported sequences (Stenblom et al., 2016; Amini-Khoei et al., 2019). Each sample was run in duplicate. All experiments were performed in accordance with the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments guidelines (Bustin et al., 2009). The intra- and inter-assay coefficients of variation were $<10\%$ for all comparisons.

2.11. Statistical analyses

Data are presented as the group mean \pm standard error of the mean (SEM) and were compared using the analysis of variance (ANOVA) or the Student's *t*-test. When the ANOVA revealed a significant effect, the Neuman-Keuls post-hoc test was applied to determine specific group differences. Statistical significance was set at $p < 0.05$. For the correlation analysis, the entire data sets for each variable were tested with the Shapiro-Wilk test for normal distributions. The Pearson's correlation coefficient was estimated for normal variables using GraphPad Prism 7.0 (GraphPad software, CA., USA), while the Spearman's correlation coefficient was applied for variables that failed the normality test. A heat map was obtained for Pearson's or Spearman's correlation coefficients and *p*-values.

3. Results

3.1. AIMD and MS180 effects on caecum and microbiota

The two-way ANOVA indicated a significant effect of AIMD on caecum total bacterial load ($F_{1,16} = 167.1, p < 0.0001, n = 5$; Table 1) and caecum relative weight ($F_{1,16} = 50.6, p < 0.0001, n = 5$; Table 1), but not on body weight ($p > 0.05$). Multiple comparisons showed that AIMD effectively caused a 99 % decrease in total bacterial load when compared to STD rats ($p < 0.0001$; Table 1). AIMD-treated rats also showed increased relative weight of the caecum when compared to STD rats ($p < 0.0001$; Table 1). When analyzing specific bacterial species by qPCR (Table 1), a significant effect of AIMD was found on 16S DNA copies of *Lactobacillus* spp ($F_{1,16} = 184, p < 0.0001, n = 5$), *Bacteroides*

Table 1
Antibiotic-induced microbiota depletion (AIMD) and maternal separation (MS180) effects on caecum and bacterial counts.

	CONT + STD	MS180 + STD	CONT + AIMD	MS180 + AIMD
Body weight (g)	356.8 ± 8.8	370.1 ± 5.1	348.5 ± 9.85	356.2 ± 9.5
<i>n</i> = 8				
Caecum relative weight (g/kg)	25.3 ± 3.0	27.1 ± 1.4	84.4 ± 8.4**	75.7 ± 12.0**
<i>n</i> = 5				
Total bacterial load (%)	100 ± 13.5	91.08 ± 5.6	0.15 ± 0.05**	0.79 ± 0.19**
<i>n</i> = 5				
<i>Lactobacillus spp</i>	303.5 ± 27.7	151.1 ± 11.4**	0.01 ± 0.002**	0.01 ± 0.003**
(16S rDNA copies × 10 ⁶)				
<i>Bacteroides fragilis</i>	514.7 ± 75.0	43.0 ± 9.0**	<0.01**	<0.01**
(16S rDNA copies × 10 ⁶)				
<i>Clostridium coccoides</i>	1545 ± 288	1134 ± 213	<0.01**	<0.01**
(16S rDNA copies × 10 ⁶)				
<i>Clostridium leptum</i>	14.63 ± 1.4	11.6 ± 2.2	<0.01**	<0.01**
(16S rDNA copies × 10 ⁶)				

Data are presented as mean ± SEM. ANOVA ***p* < 0.01 vs CONT + STD.

fragilis ($F_{1,16} = 43.5$, $p < 0.0001$, $n = 5$), *Clostridium coccoides* ($F_{1,16} = 44.5$, $p < 0.0001$, $n = 5$), and *Clostridium leptum* ($F_{1,16} = 78.9$, $p < 0.0001$, $n = 5$). We further observed a significant effect of MS180 on *Lactobacillus spp* ($F_{1,16} = 20.6$, $p < 0.0003$, $n = 5$) and *Bacteroides fragilis* ($F_{1,16} = 31.1$, $p < 0.0001$, $n = 5$) 16S DNA copies, but no effect was observed on *Clostridium coccoides* and *Clostridium leptum* ($p > 0.05$). Specifically, the multiple comparison post hoc-analysis revealed a 50 % decrease in *Lactobacillus spp* and 91 % decrease in *Bacteroides fragilis* 16S DNA copies in the MS180 rats relative to controls ($p < 0.0001$).

3.2. MS180 and AIMD effects on FST

The two-way ANOVA indicated a significant effect of AIMD ($F_{1,28} = 7.4$, $p = 0.01$, $n = 8$) and MS180 ($F_{1,28} = 4.7$, $p = 0.03$, $n = 8$) on struggling time (Fig. 1B), but no interaction ($\text{group}_{\text{MS180/CONT}} \times \text{treatment}_{\text{AIMD/STD}}$) was found ($p > 0.05$). Multiple comparisons revealed that CONT + AIMD ($p < 0.05$), MS180 + STD ($p < 0.05$), and MS180 + AIMD ($p < 0.01$) rats showed decreased struggling time when compared to CONT + STD. No differences were observed among the CONT + AIMD, MS180 + STD, or MS180 + AIMD groups ($p < 0.05$). When evaluating immobility (Fig. 1C), the statistical analysis showed a significant effect of MS180 ($F_{1,28} = 9.1$, $p = 0.005$, $n = 8$) but not AIMD or their interaction. Multiple comparisons showed an increase in the immobility time for both MS180 + STD ($p < 0.05$) and MS180 + AIMD ($p < 0.05$) groups when compared to CONT + STD. However, no differences were observed between CONT + AIMD and the CONT + STD or MS180 + STD groups ($p > 0.05$).

3.3. AIMD ameliorated the metabolic imbalance in MS180 rats

GTT was performed after 12-h overnight fasting (Fig. 2B). A three-way repeated measures ANOVA indicated a significant effect of time after glucose administration ($F_{2,56} = 114$, $p < 0.0001$, $n = 8$) and MS180 ($F_{1,56} = 5.5$, $p = 0.02$, $n = 8$), but not AIMD or their interactions ($p > 0.05$). Multiple comparisons did not reveal differences between the groups. The two-way ANOVA for fasting glucose (Fig. 2C) showed a significant effect of MS180 ($F_{1,28} = 9.92$, $p = 0.004$, $n = 8$), but not AIMD

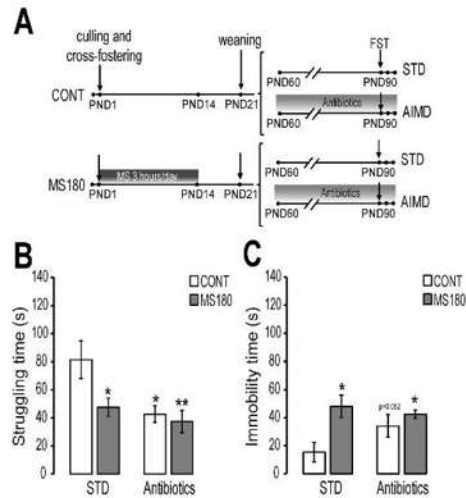


Fig. 1. Maternal separation and antibiotics-induced microbiota depletion lead to a passive coping strategy in the forced swimming test. A) Control (CONT) and maternally separated (180 min a day from day one to 14, MS180) rats were weaned at postnatal day (PND) 21 and allowed to grow until adulthood. At PND60 rats were either treated with antibiotics (AIMD) until testing or maintained under standard (STD) conditions. Rats were tested on the forced swimming test (FST) at PND90 for B) struggling and C) immobility time. Data are presented as mean ± SEM. ANOVA; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs CONT + STD; $n = 8$.

or their interaction ($p > 0.05$). Multiple comparisons revealed that only MS180 + STD increased fasting glucose when compared to CONT + STD ($p < 0.01$), and no differences were observed between AIMD and AIMD + MS180 groups and CONT + STD ($p > 0.05$). We observed a significant effect of MS180 ($F_{1,28} = 5.3$, $p = 0.02$, $n = 8$) and AIMD ($F_{1,28} = 4.5$, $p = 0.04$, $n = 8$) on cholesterol levels (Fig. 2D), without effect of MS180 × AIMD interaction ($p > 0.05$). Multiple comparisons revealed that MS180 + STD rats showed an increase in cholesterol levels compared to CONT + STD and CONT + AIMD ($p < 0.05$). Moreover, MS180 + STD animals showed significantly higher cholesterol levels when compared to MS180 + AIMD rats ($p < 0.05$). There was no effect of treatments on plasma triglyceride levels ($p > 0.05$, $n = 8$; Fig. 2E).

3.4. Both MS180 and AIMD increased CORT levels at the end of experimental protocol

The two-way ANOVA for CORT levels (Fig. 2F) showed a significant effect of MS180 ($F_{1,28} = 11.9$, $p = 0.002$, $n = 8$) and the interaction with AIMD ($F_{1,28} = 5.5$, $p = 0.03$, $n = 8$) but not AIMD alone ($p > 0.05$). Post-hoc analysis showed that MS180 caused increased CORT levels in both STD ($p < 0.01$) and AIMD conditions ($p < 0.05$). CONT + AIMD rats also showed increased CORT levels when compared to CONT + STD ($p < 0.05$), and no differences were observed between the MS180 + STD and MS180 + AIMD groups ($p > 0.05$).

3.5. MS180 and AIMD decreased the number of hippocampal DCX-positive cells without affecting proliferation or microglial morphology

The two-way ANOVA for DCX-positive cells showed a significant effect of MS180 ($F_{1,28} = 8.7$, $p = 0.006$, $n = 8$, Fig. 3A) and the interaction with AIMD ($F_{1,28} = 7.5$, $p = 0.01$, $n = 8$) but not AIMD alone ($p > 0.05$). The post-hoc analysis revealed that the MS180 + STD, CONT +

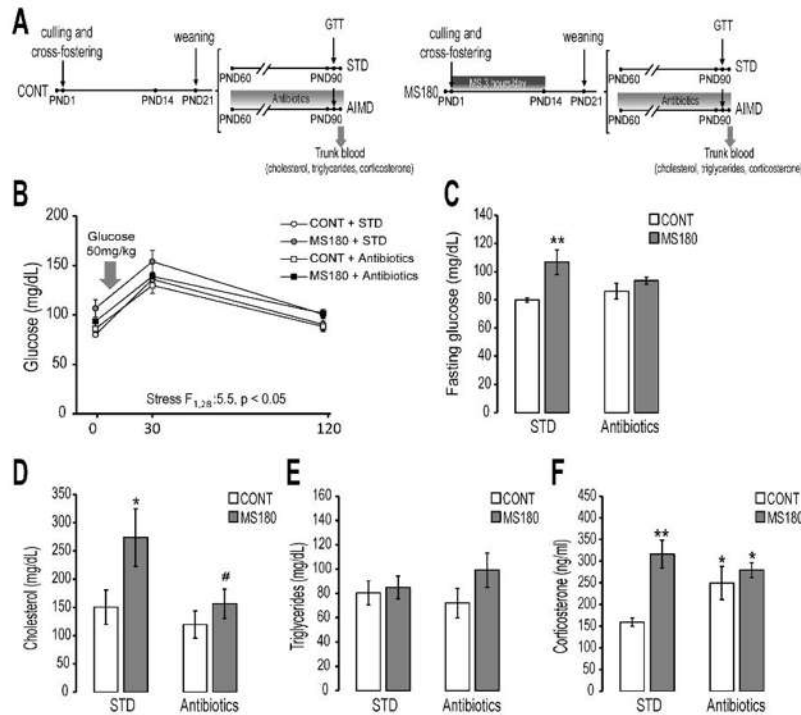


Fig. 2. Antibiotic-induced microbiota depletion ameliorates the maternal separation-induced metabolic imbalance. **A)** Control (CONT) and maternally separated (MS180, 180 min a day from day one to 14) rats were weaned at postnatal day (PND) 21 and allowed to grow until adulthood. At PND60 rats were either treated with antibiotics (AIMD) until testing or maintained under standard (STD) conditions. **B)** a glucose tolerance test was performed at PND91 (Repeated measures ANOVA; $n = 8$) and **C)** fasting glucose was evaluated after a 12-hour fasting. The levels of **D)** cholesterol, **E)** triglycerides, and **F)** corticosterone from trunk blood samples were quantified at euthanasia. Data are presented as mean \pm SEM; ANOVA; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs CONT + STD, # $p < 0.05$ vs MS180 + STD; $n = 8$.

AIMD, and MS180 + AIMD groups presented a decrease in the number of hippocampal DCX-positive cells compared to CONT + STD (Fig. 3B). No differences were observed between MS180 + STD and MS180 + AIMD rats ($p > 0.05$). No effects were observed in the DG volume ($p > 0.05$, $n = 8$). The statistical analysis for DCX-positive cells volumetric density (cell number/ mm^3) showed a significant effect of MS180 ($F_{1,28} = 4.5$, $p = 0.04$, $n = 8$) and multiple comparisons indicated that the MS180 + STD, CONT + AIMD, and MS180 + AIMD groups showed a decrease in hippocampal DCX-positive cell density compared to CONT + STD (Fig. 3C). No effects were observed on the number of Ki-67-positive nuclei (CONT + STD: 709.2 ± 220.9 ; MS180 + STD: 719 ± 242 ; CONT + AIMD: 616 ± 168 ; MS180 + AIMD: 590 ± 161 ; $p > 0.05$, $n = 5$).

We analyzed the microglial morphology in the hippocampal CA3 area. The two-way ANOVA indicated that there were no effects of MS180 or AIMD on Iba1-positive cell-body area ($p > 0.05$, $n = 7-8$, Fig. 4A), CEA ($p > 0.05$, $n = 7-8$; Fig. 4B) or the cell-body area/CEA ratio ($p > 0.05$, $n = 7-8$; Fig. 4C). However, the t -test for the comparison between CONT + STD and CONT + AIMD showed that microbiota depletion increases both CEA ($p = 0.03$, $n = 7-8$; Fig. 4B) and the CEA/cell-body area ratio ($p = 0.04$, $n = 7-8$; Fig. 4C).

3.6. Correlation analysis

Significant correlations between behavioral (Fig. 5, cluster I) or metabolic (Fig. 5, cluster II) outcomes and the hippocampal anatomy

(Fig. 5, cluster III) were revealed. The CORT levels at euthanasia showed a positive correlation with the fasting glucose levels ($r_{31} = 0.039$, $p = 0.02$) and a negative correlation with the number of DCX-positive cells ($r_{31} = -0.039$, $p = 0.02$). In addition, positive correlations were observed between Iba1-positive CAE (cluster IV) and the number ($r_{31} = 0.039$, $p = 0.02$) or density of DCX-positive cells ($r_{31} = 0.057$, $p = 0.0007$). Also, a negative correlation was observed between the caecum weight and microbiota counts ($r_{19} < -0.60$, $p < 0.001$) and a positive correlation within all microbiota counts ($r_{19} > 0.7$, $p < 0.0001$; Fig. 5, cluster V).

When analyzing the relationship between microbiota counts and outcomes, we observed positive correlations for the struggling time with *Bacteroides fragilis* ($r_{19} = 0.50$, $p = 0.02$) and *Lactobacillus spp* ($r_{19} = 0.46$, $p = 0.04$). Conversely, negative correlations were observed between immobility and *Clostridium coccoides* ($r_{19} = -0.50$, $p = 0.02$), *Bacteroides fragilis* ($r_{19} = -0.51$, $p = 0.02$), *Lactobacillus spp* ($r_{19} = -0.50$, $p = 0.01$) and *Clostridium leptum* ($r_{19} = -0.53$, $p = 0.03$). The number of DCX-positive cells showed a positive correlation with *Bacteroides fragilis* ($r_{19} = 0.50$, $p = 0.02$), *Lactobacillus spp* ($r_{19} = 0.47$, $p = 0.03$), and *Clostridium leptum* ($r_{19} = 0.48$, $p = 0.03$). Finally, correlations between *Clostridium coccoides* with the density of DCX-positive cells ($r_{19} = 0.48$, $p = 0.03$) and Iba1-positive CAE ($r_{19} = 0.53$, $p = 0.03$) were observed.

4. Discussion

We evaluated for the first time the effect of AIMD in normally-reared

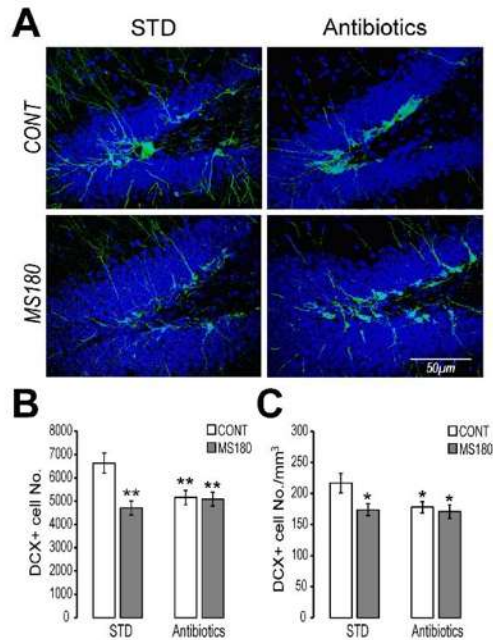


Fig. 3. Both antibiotic-induced microbiota depletion and maternal separation decrease hippocampal neurogenesis. **A)** Representative images of doublecortin (DCX, green) immunofluorescence counterstained with DAPI (blue) in control (CONT) and maternally separated (MS180) rats that were treated with antibiotics (AIMD) or maintained under standard (STD) conditions as adults. Stereological estimations of **B)** the number and **C)** the density of DCX-positive cells. Data are presented as mean ± SEM. ANOVA; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs CONT + STD; $n = 8$.

adult rats that were maternally separated as pediatrics and observed that AIMD reproduced the effects of MS180 on neurogenesis, behavior, and CORT levels, but not metabolism. Moreover, AIMD caused a mild attenuation of the MS180-induced metabolic imbalance. We found significant correlations between hippocampal plasticity, inflammation, behavioral, and metabolic outcomes. The *Bacteroides fragilis*, *Lactobacillus spp*, and *Clostridium leptum* counts correlated with the neurogenesis and behavior outcomes but not with metabolic imbalance. Meanwhile, CORT levels showed a significant correlation with the number of DCX-positive cells and fasting glucose levels. Therefore, an interrelated physiological mechanism is suggested for gut dysbiosis, glucocorticoids, and hippocampal plasticity as physiological substrates for ELS-induced behavioral and metabolic alterations.

We initially validated the efficiency of the AIMD treatment by quantifying the total bacteria load by qPCR. In agreement with previous observations (Rakoff-Nahoum et al., 2004; Grasa et al., 2015), we found that 30 days of antibiotic treatment effectively depleted 99 % of total bacterial load in the caecum. This effect was accompanied by an increase in the relative weight of the caecum of AIMD rats. The validation of bacterial depletion can be performed with culture-based methods of fecal samples but this method only accounts for cultivatable microbes. In this vein, qPCR of the gene encoding for 16S rRNA allows for a complete assessment of the caecum's total bacterial load (Moura et al., 2020).

The effects of MS180 on microbiota have been extensively characterized by both qPCR and metagenomic sequencing techniques (García-Ródenas et al., 2006; De Palma et al., 2015; Zhou et al., 2016; Amini-

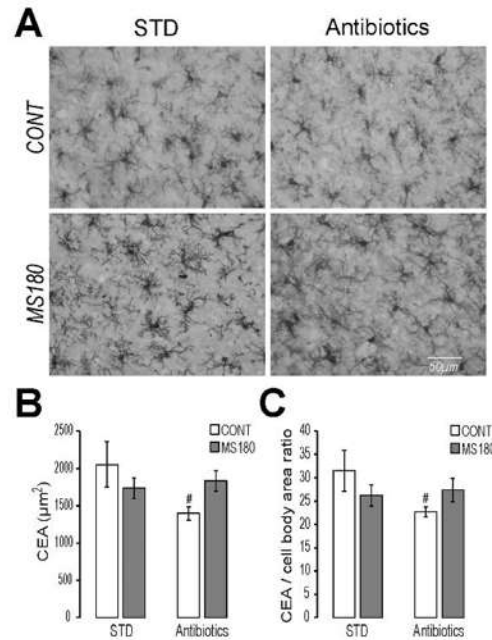


Fig. 4. Antibiotic-induced microbiota depletion increases microglial activation in the hippocampal CA3 subfield. **A)** Representative images of Iba1 immunostaining in control (CONT) and maternally separated (MS180) rats that were treated with antibiotics (AIMD) or maintained under standard (STD) conditions as adults. Calculation of the **B)** covered environment area (CEA) and **D)** the ratio of CEA/cell-body area. Data are presented as mean ± SEM. Student *t*-test; * $p < 0.05$ vs CONT + STD; $n = 7-8$.

Khoei et al., 2019). We utilized qPCR to confirm the changes in specific bacterial species that have been reported to be influenced by MS180 in STD conditions (Amini-Khoei et al., 2019). In congruence with previous reports (Amini-Khoei et al., 2019; De Palma et al., 2015; García-Ródenas et al., 2006), our results indicated that MS180 decreased the *Lactobacillus spp* and *Bacteroides fragilis* counts in the caecum, even though no differences were observed in *Clostridium coccoides* and *Clostridium leptum*. While it is widely acknowledged that MS180 causes intestinal dysbiosis, the effects on specific bacterial species vary across studies. For example, decreases in *Lactobacillus* species have been reported in several studies (Amini-Khoei et al., 2019; De Palma et al., 2015), although others observed no alterations (García-Ródenas et al., 2006; Zhou et al., 2016). It has been suggested that variations in the environmental conditions such as housing, rodent species, strain, or diet can cause these discrepancies (Moore and Stanley, 2016), highlighting the relevance of replication studies when evaluating gut bacterial species.

MS180 has consistently shown to cause a passive coping strategy in the FST and increase baseline CORT levels in adults, as reported by our group (Roque et al., 2020; Ruiz et al., 2018; Vargas et al., 2016) and others (Aisa et al., 2008; Tractenberg et al., 2016). In the present study, the effects of MS180 were maintained after AIMD. However, CONT + AIMD rats did show a passive coping strategy in FST and increased CORT levels that were like those observed in MS180 rats. This result partially contradicts previous reports where chronic AIMD in adult rats caused a decrease in immobility without affecting plasma CORT response following FST (Hoban et al., 2016). These discrepancies could be caused

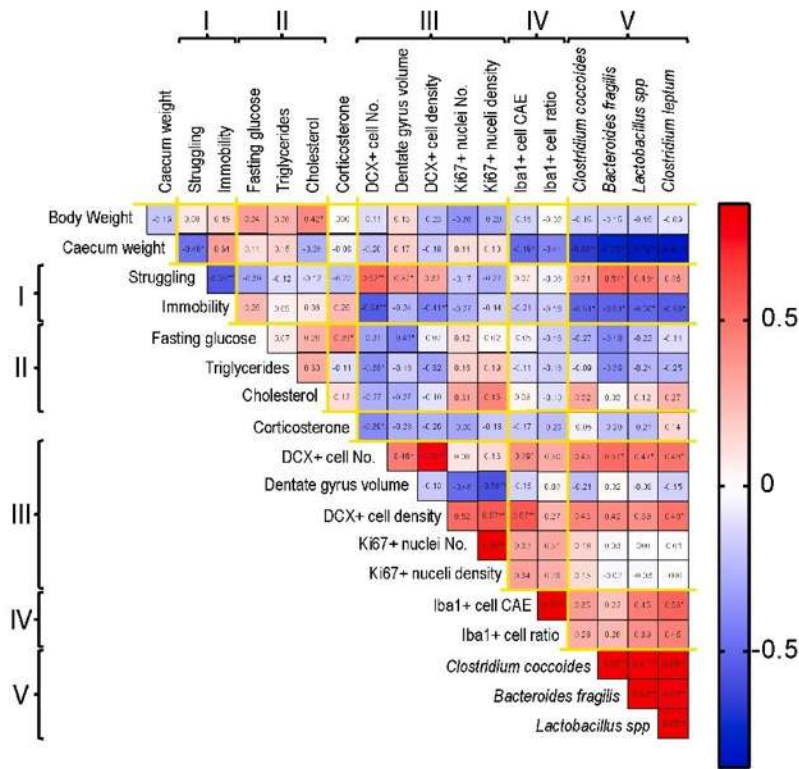


Fig. 5. Behavioral and metabolic outcomes correlate with bacterial counts. Color heat map of Pearson's and Spearman's correlation coefficients representing the association of struggling and immobility time in the forced swimming test (cluster I), metabolism biomarkers (cluster II), corticosterone and hippocampal neurogenesis (cluster III), and microglial activation (cluster IV) with bacterial counts (cluster V). The correlation coefficients are shown with continuous gradient colors, where significant positive correlation is marked in red ($r > 0.3$, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$), negative in blue ($r < -0.3$, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$), and white represents no significant correlation ($p > 0.05$).

by differences in the sampling methods (Sapolsky, 1992) or the applied AIMD protocols. In support of this idea, previous reports from our group showed that when collecting blood samples through a jugular vein catheter, MS180 does not increase CORT levels in response to forced swim stress (Ruiz et al., 2018; Vargas et al., 2016). Nevertheless, a different effect was observed when evaluating baseline jugular vein samples (Ruiz et al., 2018; Vargas et al., 2016) or after pentobarbital-induced euthanasia (Roque et al., 2020), indicating that the timing and method of blood collection could render different conclusions.

In the present study, MS180 and AIMD caused a similar decrease in hippocampal neurogenesis. While the previously reported effects on hippocampal microglial activation were confirmed for AIMD only when performing a Student's t-test (Cordella et al., 2021), we could not replicate those findings in MS180 rats (Saavedra et al., 2021), probably due to differences in quantification methods. It has been shown that the proportions of Ly6C^{hi} monocytes significantly decrease in AIMD mice, and transferring Ly6C^{hi} monocytes to AIMD mice rescues neurogenesis (Möhle et al., 2016). Similarly, to what happens in MS180 rats (Baek et al., 2012), the decrease in neurogenesis can be restored by exercise (Baek et al., 2012; Möhle et al., 2016), suggesting that the neuroimmune system could be a shared linking mechanism between AIMD- and MS-induced changes in gut microbiota, and adult hippocampal neurogenesis. In support of this idea, we observed a significant correlation of *Clostridium leptum* counts with Iba1-positive CAE, as well as the number of DCX-positive cells.

Our primary goal was to determine what effects depleting the gut microbiota would have in adult rats that were maternally separated as

pediatrics. As a secondary goal, we aimed to determine if AIMD alone in normally reared rats would induce behavioral, metabolic, and neuroendocrine responses similar to those induced by MS180. Our results demonstrate that AIMD did not significantly alter the effects of MS180, and the magnitude of AIMD- effects on behavior, neurogenesis, and CORT levels were similar to those observed in MS180. However, these results do not reject the hypothesis that the microbiota is related to the long-term consequences of stress, but rather suggest a "floor effect" that cannot be surpassed, with a lower threshold from which the decrease or absence of some of the microbiota components could not cause any further behavioral and neuroendocrine alterations.

Strikingly, AIMD ameliorated MS180- induced metabolic effects. MS180 + AIMD fasting glucose levels were no different from CONT + STD rats; however, they neither significantly differ from MS180 + STD rats. In addition, AIMD alleviates the blood cholesterol increases induced by MS180. These ameliorations of metabolic imbalance in MS180 + AIMD rats suggest that, when the whole microbiota is depleted, the metabolic effects of MS180 cannot be fully sustained. These findings support the notion that gut dysbiosis could be involved in the long-term maintenance of metabolic, but not neuroendocrine and behavioral, ELS-induced phenotypes. Moreover, this evidence provides the substrate for the development of gut microbiota targeted therapies that could reverse the effects of ELS in adult individuals that already present metabolic diseases, rather than just focusing on interventions that are only beneficial for early prevention and not efficient if applied to adults, such as probiotic treatments.

Correlation analyses allowed us to propose a biological model for the

effects of MS180 and AIMD. It has been suggested that the activation of the stress response during development of the hippocampal formation can program the activity of the neurogenic niche (Lajud and Torner, 2015; Sapolsky, 1985). Additionally, stress causes gut dysbiosis early in life and prevents the establishment of a balanced microbiome (Kemp et al., 2021). These alterations, in turn, could cause a deficiency in the negative feedback loop of the HPA axis that perpetuates and exacerbates the effects of ELS throughout life. The evidence presented here partially supports these hypotheses. While the central role of newly generated neurons on mediating the behavioral and neuroendocrine outcomes became evident through the analysis, we did not observe any effect on hippocampal cell proliferation, indicating that ELS and AIMD decrease new neurons' survival rather than affect the activity of the neurogenic niche. Moreover, even though a significant correlation of CORT levels with neurogenesis and fasting glucose was observed, corticosterone levels did not correlate with the rest of the metabolic and behavioral outcomes (Ruiz et al., 2018). This suggests that increased HPA axis activity is not the main driver of ELS- and AIMD-induced alterations.

One of the limitations of our study is that, although most studies attribute AIMD-induced phenotypic differences to the depletion of gut microbes, the antibiotic treatment also affects the bacteriophage populations (Górska et al., 2018). This is particularly relevant as recent evidence has suggested that viruses belonging to the order *Caudovirales* are related to depressive-like behaviors in macaques (Wu et al., 2022). Additionally, bacterial depletion by antibiotics allows the overgrowth of opportunistic parasites, potentially altering the results. Therefore, in the present study, we included the antiparasitic drug Metronidazole in our AIMD regime.

5. Conclusion

Our results indicate that microbiota depletion in normally-reared adult animals mimics the neuroendocrine and behavioral consequences of ELS. Additionally, microbiota depletion partially reversed the metabolic imbalance produced by ELS. Our results suggest that gut dysbiosis is not the only mechanism underlying the long-term consequences of early life stress, but gut microbiota is -to a certain extent- involved in its maintenance; providing a framework for future interventions aimed to restore gut dysbiosis related to ELS.

6. Data availability statement

All data are available upon reasonable request.

7. Ethics approval statement

All experiments were approved by the National Ethics Committee of the Instituto Mexicano del Seguro Social (R-2017-785-077) and were performed in accordance with the official regulations for the use and care of laboratory animals of Mexico (NOM-062-ZOO-1999) and the guidelines of the US National Institutes of Health.

CRedit authorship contribution statement

Roberto Ruiz-González: Methodology, Investigation, Data curation, Visualization, Validation. **Naima Lajud:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition. **Aldo Rafael Tejada-Martínez:** Investigation, Visualization, Data curation. **Mario Eduardo Flores-Soto:** Supervision, Investigation, Funding acquisition. **Juan José Valdez-Alarcón:** Supervision, Investigation, Methodology, Formal analysis. **Luis A. Tellez:** Conceptualization, Writing – review & editing. **Angélica Roque:** Methodology, Investigation, Data curation.

Declaration of Competing Interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: This study was partially funded by the Biocodex Microbiota Foundation and CONACyT-FOSISS No. 289897 (FIS/IMSS/PROT/1769) grants awarded to NL. Roberto Ruiz is a graduate student in Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo and received a scholarship from CONACyT (CVU no. 823101). The funding sources were not involved in the study design, nor in data collection, analysis, and interpretation, and did not contribute to, or influence, the writing and the decision of where to submit for publication.

Data availability

Data will be made available on request.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2022.148055>.

References

- Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Río, J., Ramírez, M.J., Del Río, J., Ramirez, M.J., 2008. Effects of maternal separation on hypothalamic-pituitary-adrenal responses, cognition and vulnerability to stress in adult female rats. *Neuroscience* 154, 1218–1226. doi: [10.1016/j.neuroscience.2008.05.011](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.05.011).
- Amini-Khoei, H., Haghani-Samani, E., Beigi, M., Soltani, A., Mobini, G.R., Balali-Dehkordi, S., Haj-Mirzazian, A., Raffeian-Kopaei, M., Alizadeh, A., Hojjati, M.R., Valldi, M., 2019. On the role of corticosterone in behavioral disorders, microbiota composition alteration and neuroimmune response in adult male mice subjected to maternal separation stress. *Int. Immunopharmacol.* 66, 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.11.037>.
- Baek, S.S., Jun, T.W., Kim, K.J., Shin, M.S., Kang, S.Y., Kim, C.J., 2012. Effects of postnatal treadmill exercise on apoptotic neuronal cell death and cell proliferation of maternal-separated rat pups. *Brain Dev.* 34, 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2011.01.011>.
- Bustin, S., Vladimirov, B., Garson, J., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M., Shipley, G., Vandecappelle, J., Wittwer, C., 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments [WWW Document]. *Clin. Chem.* <http://www.gene-quantification.com/mlq-justin-et-al-clin-chem-2009.pdf> (accessed 8/17/14).
- Carvalho, B.M., Guadagnini, D., Tsukumo, D.M.L., Schenka, A.A., Latuf-Filho, P., Vassallo, J., Dias, J.C., Kubota, I.T., Carvalheira, J.B.C., Saad, M.J.A., 2012. Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signalling in high-fat fed mice. *Diabetologia* 55, 2823–2834. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2648-4>.
- Coley, E.J.L., Mayer, E.A., Osadchiv, V., Chen, Z., Subramanyam, V., Zhang, Y., Hsiao, E. Y., Gao, K., Bhatt, R., Dong, T., Vora, P., Naliboff, B., Jacobs, J.P., Gupta, A., 2021. Early life adversity predicts brain-gut alterations associated with increased stress and mood. *Neurobiol. Stress* 15. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2021.100348>.
- Cortella, F., Sanchini, C., Rosito, M., Ferrucci, L., Pediconi, N., Cortese, B., Guerrieri, F., Pascucci, G.R., Antonangeli, F., Peruzzi, G., Giubettini, M., Basilio, B., Pagani, F., Grimaldi, A., D'Alessandro, G., Limatola, C., Ragozzino, D., Di Angelantonio, S., 2021. Antibiotics treatment modulates microglia-synapses interaction. *Cells* 10 (10). <https://doi.org/10.3390/cells10102648>.
- Crumeyrolle-Arias, M., Jaglin, M., Bruneau, A., Vancassel, S., Cardona, A., Daugé, V., Naudon, L., Rabot, S., 2014. Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* 42, 207–217. <https://doi.org/10.1016/j.psychneu.2014.01.014>.
- Cusimano, M.D., Zhang, S., Huang, G., Wolfe, D., Carpino, M., 2020. Associations between traumatic brain injury, drug abuse, alcohol use, adverse childhood events, and aggression levels in individuals with foster care history. *Neurotrauma Reports* 1, 241–252. <https://doi.org/10.1089/neur.2020.0032>.
- Danese, A., Tan, M., 2014. Childhood maltreatment and obesity: systematic review and meta-analysis. *Mol. Psychiatry* 19, 544–554. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.54>.
- De Palma, G., Bienerhassett, P., Lu, J., Deng, Y., Park, A.J., Green, W., Denou, E., Silva, M.A., Santacruz, A., Sanz, Y., Surette, M.G., Verdu, E.F., Collins, S.M., Bercik, P., 2015. Microbiota and host determinants of behavioural phenotype in maternally separated mice. *Nat. Commun.* 6, 7735. <https://doi.org/10.1038/ncomms8735>.
- Díaz Heijtz, R., 2016. Fetal, neonatal, and infant microbiome: perturbations and subsequent effects on brain development and behavior. *Sci. Fetal Neonatal Med.* 21 (6), 410–417.

- Díaz-Chávez, A., Lajud, N., Roque, A., Cheng, J.P., Meléndez-Herrera, E., Valdéz-Alarcón, J.J., Bondi, C.O., Kline, A.E., 2020. Early life stress increases vulnerability to the sequelae of pediatric mild traumatic brain injury. *Exp. Neurol.* 329, 113318. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113318>.
- Dimatelis, J.J., Vermeulen, L.M., Bugarith, K., Stein, D.J., Russell, V.A., 2015. Female rats are resistant to developing the depressive phenotype induced by maternal separation stress. *Metab. Brain Dis.* 31, 109–119. <https://doi.org/10.1007/s11011-015-9723-8>.
- Flores-Torres, M.H., Comerford, E., Signorello, L., Grodstein, F., Lopez-Ridaura, R., de Castro, F., Familiar, I., Ortiz-Panoso, E., Lajous, M., 2020. Impact of adverse childhood experiences on cardiovascular disease risk factors in adulthood among Mexican women. *Child Abuse. Negl.* 99. <https://doi.org/10.1016/j.chiabu.2019.104175>.
- García-Ródenas, C.L., Bergonzelli, G.E., Nütten, S., Schumann, A., Cherbut, C., Turini, M., Ornstein, K., Rochat, F., Corthésy-Theulaz, I., 2006. Nutritional approach to restore impaired intestinal barrier function and growth after neonatal stress in rats. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 43, 16–24. <https://doi.org/10.1097/01.mpg.0000226376.95623.9f>.
- Górska, A., Peter, S., Willmann, M., Autenrieth, I., Schlager, R., Huson, D.H., 2018. Dynamics of the human gut phageome during antibiotic treatment. *Comput. Biol. Chem.* 74, 420–427. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.03.011>.
- Grasa, L., Abecía, L., Forcén, R., Castro, M., de Jalón, J.A.G., Latorre, E., Alcalde, A.I., Murillo, M.D., 2015. Antibiotic-induced depletion of murine microbiota induces mild inflammation and changes in toll-like receptor patterns and intestinal motility. *Microb. Ecol.* 70, 835–848. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0613-8>.
- Guida, F., Turco, F., Iannotta, M., De Gregorio, D., Palumbo, I., Sarnelli, G., Furlano, A., Napolitano, F., Boccella, S., Luongo, L., Mazzitelli, M., Usiello, A., De Filippis, F., Iannotti, P.A., Piscitelli, F., Ercolini, D., de Novellis, V., Di Marzo, V., Cuomo, R., Maione, S., 2018. Antibiotic-induced microbiota perturbation causes gut endocannabinoid changes, hippocampal neuroglial reorganization and depression in mice. *Brain. Behav. Immun.* 67, 230–245. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.09.001>.
- Heim, C., Shugart, M., Craighead, W.E., Nemeroff, C.B., 2010. Neurobiological and psychiatric consequences of child abuse and neglect. *Dev. Psychobiol.* 52, 671–690. <https://doi.org/10.1002/dev.20494>.
- Hoban, A.E., Moloney, R.D., Golubeva, A.V., McVey Neufeld, K.A., O'Sullivan, O., Patterson, E., Stanton, C., Dinan, T.G., Clarke, G., Cryan, J.F., 2016. Behavioural and neurochemical consequences of chronic gut microbiota depletion during adulthood in the rat. *Neuroscience* 339, 463–477. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.10.003>.
- Huo, R., Zeng, B., Zeng, L., Cheng, K., Li, B., Luo, Y., Wang, H., Zhou, C., Fang, L., Li, W., Niu, R., Wei, H., Xie, P., 2017. Microbiota modulate anxiety-like behavior and endocrine abnormalities in hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 489. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00489>.
- Johnson, K.V.A., Burnet, P.W.J., 2020. Opposing effects of antibiotics and germ-free status on neuroepithelial systems involved in social behaviour and pain regulation. *BMC Neurosci.* 21, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12868-020-00583-3>.
- Karen, C., Shyu, D.J.H., Rajan, K.E., 2021. Lactobacillus paracasei supplementation prevents early life stress-induced anxiety and depressive-like behavior in maternal separation model-possible involvement of microbiota-gut-brain axis in differential regulation of MicroRNA124a/132 and glutamate receptors. *Front. Neurosci.* 15, 1115. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.719933>.
- Kemp, K.M., Colson, J., Lorenz, R.G., Maynard, C.L., Pollock, J.S., 2021. Early life stress in mice alters gut microbiota independent of maternal microbiota inheritance. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 320, R663–R674. doi: 10.1152/AJPREGU.00072.2020.
- Kennedy, E.A., King, K.Y., Baldrige, M.T., 2018. Mouse microbiota models: Comparing germ-free mice and antibiotics treatment as tools for modifying gut bacteria. *Front. Physiol.* 9, 1534. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01534>.
- Lajud, N., Díaz-Chávez, A., Radabaugh, H.L., Cheng, J.P., Rojo-Soto, G., Valdéz-Alarcón, J.J., Bondi, C.O., Kline, A.E., 2019. Delayed and abbreviated environmental enrichment after brain trauma promotes motor and cognitive recovery that is not contingent on increased neurogenesis. *J. Neurotrauma* 36, 756–767. <https://doi.org/10.1089/neu.2018.5866>.
- Lajud, N., Roque, A., Cajero, M., Gutiérrez-Ospina, G., Torner, L., Gutiérrez-Ospina, G., Torner, L., 2012. Periodic maternal separation decreases hippocampal neurogenesis without affecting basal corticosterone during the stress hypersensitive period, but alters HPA axis and coping behavior in adulthood. *Psychoneuroendocrinology* 37, 410–420. doi: S0306-4530(11)00209-5 [pii] 10.1016/j.psyneuen.2011.07.011.
- Lajud, N., Torner, L., 2015. Early life stress and hippocampal neurogenesis in the neonate: sexual dimorphism, long term consequences and possible mediators. *A minireview. Front. Mol. Neurosci.* 8, 3. <https://doi.org/10.3389/fmol.2015.00003>.
- Liao, J.F., Hsu, C.C., Chou, G.T., Hsu, J.S., Liang, M.T., Tsai, Y.C., 2019. Lactobacillus paracasei PS23 reduced early-life stress abnormalities in maternal separation mouse model. *Benef. Microbes* 10, 425–436. <https://doi.org/10.3920/bm2018.0077>.
- Lukus, M., Bredewold, R., Neumann, L.D., Veenema, A.H., 2010. Maternal separation interferes with developmental changes in brain vasopressin and oxytocin receptor binding in male rats. *Neuropharmacology* 58, 78–87. doi: S0028-3908(09)00174-9 [pii]10.1016/j.neuropharm.2009.06.020.
- Lundberg, S., Martinsson, M., Nylander, L., Roman, E., 2017. Altered corticosterone levels and social play behavior after prolonged maternal separation in adolescent male but not female Wistar rats. *Horm. Behav.* 87, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.11.016>.
- Luo, Y., Zeng, B., Zeng, L., Du, X., Li, B., Huo, R., Liu, L., Wang, H., Dong, M., Pan, J., Zheng, P., Zhou, C., Wei, H., Xie, P., 2018. Gut microbiota regulates mouse behaviors through glucocorticoid receptor pathway genes in the hippocampus. *Transl. Psychiatry* 8, 187. <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0240-5>.
- McEwen, B.S., 2012. Brain on stress: how the social environment gets under the skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109 (Suppl.), 17180–17185. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121254109>.
- McVey Neufeld, K.A., O'Mahony, S.M., Hoban, A.E., Waworuntu, R.V., Berg, B.M., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2019. Neurobehavioural effects of Lactobacillus rhamnosus GG alone and in combination with prebiotics polydextrose and galactooligosaccharide in male rats exposed to early-life stress. *Nutr. Neurosci.* 22, 425–434. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1397875>.
- Möhle, L., Mattel, D., Heimesaat, M.M., Bereswill, S., Fischer, A., Allatis, M., French, T., Hambarzumyan, D., Matzinger, P., Dunay, L.R., Wolf, S.A., 2016. Ly6Chi monocytes provide a link between antibiotic-induced changes in gut microbiota and adult hippocampal neurogenesis. *Cell Rep.* 15, 1945–1956. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.074>.
- Moore, R.J., Stanley, D., 2016. Experimental design considerations in microbiota/inflammation studies. *Clin. Transl. Immunol.* 5, e92.
- Moura, I.B., Normington, C., Ewin, D., Clark, E., Wilcox, M.H., Buckley, A.M., Chilton, C.H., 2020. Method comparison for the direct enumerating of bacterial species using a chemostat model of the human colon. *BMC Microbiol.* 20. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1669-2>.
- Nouri, A., Hashemzadeh, F., Soltani, A., Saghaei, E., Amini-Khoei, H., 2020. Progesterone exerts antidepressant-like effect in a mouse model of maternal separation stress through mitigation of neuroinflammatory response and oxidative stress. *Pharm. Biol.* 58, 64–71. <https://doi.org/10.1080/13880209.2019.1702704>.
- O'Mahony, S.M., Hyland, N.P., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2010. Maternal separation as a model of brain-gut axis dysfunction. *Psychopharmacol.* 214, 71–88. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-2010-9>.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., Medzhitov, R., 2004. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118, 229–241. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.002>.
- Roque, A., Ruiz-González, R., Pineda-López, E., Torner, L., Lajud, N., 2020. Prenatal immobilization stress and postnatal maternal separation cause differential neuroendocrine responses to fasting stress in adult male rats. *Dev. Psychobiol.* 62, 737–748. <https://doi.org/10.1002/dev.21947>.
- Ruiz, R., Roque, A., Pineda, E., Licona-Limón, P., José Valdéz-Alarcón, J., Lajud, N., 2018. Early life stress accelerates age-induced effects on neurogenesis, depression, and metabolic risk. *Psychoneuroendocrinology* 96, 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.07.012>.
- Saavedra, L.M., Hernández-Velázquez, M.G., Madrigal, S., Ochoa-Zarzosa, A., Torner, L., 2021. Long-term activation of hippocampal glial cells and altered emotional behavior in male and female adult rats after different neonatal stressors. *Psychoneuroendocrinology* 126. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2021.105164>.
- 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., 1985. Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: temporal aspects of neuronal vulnerability. *Brain Res* 359, 300–305. doi: 0006-8993(85)91440-4 [pii].
- Stenblom, E.-I., Westrom, B., Linning, C., Bonn, P., Farrell, M., Rehfeld, J.F., Montelius, C., 2016. Dietary green-plant thylakoids decrease gastric emptying and gut transit, promote changes in the gut microbial flora, but does not cause steatorrhea. *Nutr. Metab. (Lond)* 13, 67. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0128-4>.
- Suárez-Zamorano, N., Fabbiano, S., Chevalier, C., Stojanović, O., Collin, D.J., Stevanović, A., Veyrat-Durebex, C., Tarallo, V., Rigo, D., Germain, S., Ilievskaa, M., Montet, X., Scimille, Y., Hapfelmeier, S., Trajkovski, M., 2015. Microbiota depletion promotes browning of white adipose tissue and reduces obesity. *Nat. Med.* 21, 1497–1501. <https://doi.org/10.1038/nm.3994>.
- Teicher, M.H., Samson, J.A., 2016. Annual Research Review: Enduring neurobiological effects of childhood abuse and neglect. *J. Child Psychol. Psychiatry.* 57, 241–266. <https://doi.org/10.1111/jcpp.12507>.
- Tractenberg, S.G., Levandowski, M.L., de Azeredo, L.A., Orso, R., Rothmann, L.G., Hoffmann, E.S., Brenhouse, H., Grassi-Oliveira, R., 2016. An overview of maternal separation effects on behavioural outcomes in mice: Evidence from a four-stage methodological systematic review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 68, 489–503.
- Vargas, J., Junco, M., Gomez, C., Lajud, N., McCormick, C.M., 2016. Early life stress increases metabolic risk, HPA axis reactivity, and depressive-like behavior when combined with postweaning social isolation in rats. *PLoS ONE* 11 (9), e0162665.
- Verdonk, F., Roux, P., Flamant, P., Fiette, L., Bozza, F.A., Simard, S., Lemaire, M., Plaud, B., Shorte, S.L., Sharsar, T., Chrétien, F., Danckaert, A., 2016. Phenotypic clustering: A novel method for microglial morphology analysis. *J. Neuroinflammation* 13. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0614-7>.
- WHO, 2012. WHO | Adverse Childhood Experiences International Questionnaire (ACE-IQ).
- Wu, J., Chai, T., Zhang, H., Huang, Y., Perry, S.W., Li, Y., Duan, J., Tan, X., Hu, X., Liu, Y., Pu, J., Wang, H., Song, J., Jin, X., Ji, P., Zheng, P., Xie, P., 2022. Changes in gut viral and bacterial species correlate with altered 1,2-diacylglyceride levels and structure in the prefrontal cortex in a depression-like non-human primate model. *Transl. Psychiatry* 12, 74. <https://doi.org/10.1038/s41398-022-01836-x>.
- Zhou, X.-Y., Li, M., Li, X., Long, X., Zuo, X.-L., Hou, X.-H., Cong, Y.-Z., Li, Y.-Q., 2016. Visceral hypersensitive rats share common dysbiosis features with irritable bowel syndrome patients. *World J. Gastroenterol.* 22, 5211–5227. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i22.5211>.

Early life stress induces a transient increase in hippocampal corticotropin-releasing hormone in rat neonates that precedes the effects on hypothalamic neuropeptides

Angélica Roque  | Kinberli Marcela Valles Méndez | Roberto Ruiz  |
Edel Pineda  | Naima Lajud 

Laboratorio de Neurobiología del Desarrollo, División de Neurociencias, Centro de Investigación Biomédica de Michoacán, Instituto Mexicano del Seguro Social, Morelia, México

Correspondence

Naima Lajud, Laboratorio de Neurobiología del Desarrollo, División de Neurociencias, Centro de Investigación Biomédica de Michoacán, Instituto Mexicano del Seguro Social, Morelia, Michoacán, México.
Email: naima.lajud@imss.gob.mx, naimalajud@yahoo.com.mx

Funding information

Programa Para la Formación de Investigadores de la Coordinación de Investigación en Salud-IMSS; WWN/SFN Collaborative Research Network Program; Fondo de Investigación en Salud-IMSS, Grant/Award Number: FIS/IMSS/PROT/G13/1223 and FIS/IMSS/PROT/G15/1413; CONACYT, Grant/Award Number: FIS/IMSS/PROT/1769 and 509694/286252

Abstract

Early life stress (ELS) programs hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis activity and affects synaptic plasticity and cognitive performance in adults; however, the effects of ELS during the temporal window of vulnerability are poorly understood. This study aimed to thoroughly characterize the effects of ELS in the form of periodic maternal separation (MS180) during the time of exposure to stress. Hippocampal corticotropin-releasing hormone (CRH) gene expression and baseline HPA axis activity were analyzed at postnatal (P) days 6, 12, 15, and 21, and in adulthood (P75); these factors were correlated with plasticity markers and adult behavior. Our results indicate that MS180 induces an increase in hippocampal CRH expression at P9, P12, and P15, whereas an increase in hypothalamic CRH expression was observed from P12 to P21. Increased arginine-vasopressin expression and corticosterone levels were observed only at P21. Moreover, MS180 caused transient alterations in hypothalamic synaptophysin expression during early life. As adults, MS180 rats showed a passive coping strategy in the forced swimming test, cognitive impairments in the object location test, increased hypothalamic CRH expression, and decreased oxytocin (OXT) expression. Spearman's analysis indicated that cognitive impairments correlated with CRH and OXT expression. In conclusion, our data indicate that MS180 induces a transient increase in hippocampal CRH expression in neonates that precedes the effects on hypothalamic neuropeptides, confirming the role of increased CRH during the temporal window of vulnerability as a mediator of some of the detrimental effects of ELS on brain development and adult behavior.

KEYWORDS


corticosterone, corticotropin-releasing hormone, hippocampus, maternal separation, vasopressin

Abbreviations: AVP, arginine-vasopressin; CNS, central nervous system; CONT, control group; CORT, corticosterone; CRH, corticotropin releasing hormone; ELS, early life stress; FST, forced swimming test; GAPDH, glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase; GC, glucocorticoid; HPA, hypothalamus-pituitary-adrenal; MS180, maternal separation; OLT, object location test; OXT, oxytocin; P, postnatal day; PE, pro-estrous period; PSD-95, postsynaptic density protein 95; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; SDT, social discrimination test; SYP, synaptophysin.

Edited by: Vidita Vaidya

© 2021 Federation of European Neuroscience Societies and John Wiley & Sons Ltd

Prenatal immobilization stress and postnatal maternal separation cause differential neuroendocrine responses to fasting stress in adult male rats

Angélica Roque¹ | Roberto Ruiz-González¹ | Edel Pineda-López¹ | Luz Torner² | Naima Lajud¹ 

¹Laboratorio de Neurobiología del Desarrollo, División de Neurociencias, Centro de Investigación Biomédica de – Instituto Mexicano del Seguro Social, Morelia, Michoacán, México

²Laboratorio de Neuroendocrinología, División de Neurociencias, Centro de Investigación Biomédica de – Instituto Mexicano del Seguro Social, Morelia, Michoacán, México

Correspondence

Naima Lajud, Laboratorio de Neurobiología del Desarrollo, División de Neurociencias, Centro de Investigación Biomédica de Michoacán – Instituto Mexicano del Seguro Social, Camino de la Arboleda No. 300, Colonia Ex-Hacienda La Huerta, Morelia, Michoacán 58341, México.
Emails: naima.lajud@imss.gob.mx, naimalajud@yahoo.com.mx

Funding information

Programa para la Formación de Investigadores de la Coordinación de Investigación en Salud-IMSS; WWN/SFN Collaborative Research Network Program (CRNP); Fondo de Investigación en Salud-IMSS, Grant/Award Number: FIS/IMSS/PROT/G14/1307 and FIS/IMSS/PROT/G15/1413 ; Beca CONACYT Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Grant/Award Number: CVU 509694

Abstract

Prenatal immobilization stress (PNS) and postnatal maternal separation (MS180) are two widely used rodent models of early-life stress (ELS) that affect the hypothalamus–pituitary–adrenal (HPA) axis, cause behavioral alterations, and affect glucose tolerance in adults. We compared anxiety-like behavior, coping strategies, and HPA axis activity in PNS and MS180 adult (4-month-old) male rats and assessed their glucose tolerance and HPA axis response after mild fasting stress. Both PNS and MS180 induced a passive coping strategy in the forced swimming test, without affecting anxiety-like behavior in the elevated plus-maze. Moreover, both PNS and MS180 increased the hypothalamic corticotropin-releasing hormone expression; however, only MS180 increased the circulating corticosterone levels. Both early life stressors increased fasting glucose levels and this effect was significantly higher in PNS rats. MS180 rats showed impaired glucose tolerance 120 min after intravenous glucose administration, whereas PNS rats displayed an efficient homeostatic response. Moreover, MS180 rats showed higher circulating corticosteroid levels in response to fasting stress (overnight fasting, 12 hr), which were restored after glucose administration. In conclusion, early exposure to postnatal MS180, unlike PNS, increases the HPA axis response to moderate fasting stress, indicating a differential perception of fasting as a stressor in these two ELS models.

KEYWORDS

corticotropin-releasing hormone, early-life stress, forced swimming test, HPA axis, metabolic risk, oxytocin, vasopressin

1 | INTRODUCTION

Adverse maternal environments during pregnancy and negative postnatal experiences during development are associated with an increased risk of development of psychopathologies and metabolic diseases in adulthood, two of the most common causes of global disease burden (Bale et al., 2010; Clark, 1998; Conradt et al., 2018; Heim & Nemeroff,

2002; Luo et al., 2006). It is estimated that by 2020, the comorbidity of depression and metabolic disorders will be one of the primary causes of disability worldwide (Goldstein, Hale, Foster, Tobet, & Handa, 2019). Early-life stress (ELS) programs the hypothalamus–pituitary–adrenal (HPA) axis and vasopressin–oxytocin systems to augment stress responses (McEwen, 2017; Plotsky & Meaney, 1993; Teicher, Samson, Anderson, & Ohashi, 2016). Furthermore, increased reactivity of the HPA axis has deleterious effects on the brain structures, including the

ARTÍCULO

¡Preocupante! El mal uso de los antibióticos en la ganadería

Roberto Ruiz González y Naima Lajud Ávila



Imagen de Wolfgang Ehrecke en Pixabay

Roberto Ruiz González. Estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas, Opción en Recursos Bióticos, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Laboratorio de Neurobiología del Desarrollo del Centro de Investigación Biomédica de Michoacán-IMSS.

rip_9631@hotmail.com

Naima Lajud Ávila. Investigadora Titular del Laboratorio de Neurobiología del Desarrollo del Centro de Investigación Biomédica de Michoacán-IMSS.

naima.lajud@imss.gob.mx

La ganadería es una actividad económica del sector primario que consiste en el cuidado y alimentación de animales como cerdos, vacas, pollos entre otros, con la finalidad de producir carne, leche, lana, etc. El sector ganadero ha crecido de forma descomunal en las últimas décadas, debido a la creciente demanda alimenticia. Esta actividad aporta hasta un **40 % del valor de la producción agrícola mundial**; además, da empleo a alrededor de mil trescientos millones de personas. A nivel mundial, los principales países que practican la ganadería son Estados Unidos, Brasil, India, Argentina, Australia y México.