



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

TESIS

**“EFECTOS CONDUCTUALES Y NEUROINMUNES EN RATAS
ADULTAS ASOCIADOS CON LA EXPOSICIÓN NEONATAL AL
ESTRÉS Y A LIPOPOLISACÁRIDO”**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
OPCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR AGROPECUARIA**

PRESENTA:

**M.C.
Luis Miguel Saavedra Pimentel**

Directoras de tesis:

D en C. María de la Luz Torner Aguilar

D en C. Alejandra Ochoa Zarzosa

MORELIA, MICHOACÁN, JUNIO 2021

Este trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Neuroendocrinología del Centro de Investigación Biomédica de Michoacán (CIBIMI, IMSS), y el Módulo 3 del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), bajo la asesoría de la D en C. María de la Luz Torner Aguilar y la D en C. Alejandra Ochoa Zarzosa.

La investigación fue apoyada por:

Apoyo a becario CONACyT No. 305230.

Apoyo a MLTA No. Proyecto CB-2014:243419.

IMSS: FIS/IMSS/PROT/G14/1299.

CIC-UMSNH.

COMITÉ TUTORAL

D en C. Joel Edmundo López Meza

D en C. Esperanza Meléndez Herrera

D en C. María Esther Olvera Cortés

DEDICATORIA

Con todo cariño, admiración y respeto para las personas que nunca dejaron de creer en mí, siempre me han impulsado para seguir adelante a pesar de tantas adversidades, les agradezco su apoyo y comprensión, le agradezco a dios por permitirme pasar más tiempo con ustedes.

PAPÁ Y MAMÁ.

También agradezco a mi familia, a mi querida esposa por su apoyo y comprensión y a mi hijo el cual me motiva día a día a darlo todo, a pesar del cansancio y adversidades, siempre estaré para ti, eres lo mejor que me ha pasado. 05/08/18.

AGRADECIMIENTOS

Les agradezco a las Doctoras María de la Luz Torner Aguilar y Alejandra Ochoa Zarzosa, por el tiempo brindado para resolver mis dudas, por la paciencia que tuvieron en mi formación, pero sobre todo por llevar a buen fin este proyecto y permitir que este sueño se hiciera realidad.

A mi comité tutorial D en C. Joel Edmundo López Meza, D en C. Esperanza Meléndez Herrera y D. en C. María Esther Olvera Cortés por todas sus aportaciones y observaciones, fueron parte fundamental en mi formación y en la realización de este proyecto, muchas gracias.

A mis amigos del laboratorio que durante este viaje estuvieron presentes en determinados momentos, agradezco por tantos buenos momentos que pasamos Andry, Martha, Roberto, Pedro, Escarlet, Diana, Marco, Edel, Aldo, Arturo.

A mis hermanos Lola, Sandra, Alejandro y Marí, que siempre estuvieron allí cuando los necesite, sé que siempre cuento con su apoyo.

Finalmente le agradezco a dios por darme la oportunidad de vivir este sueño.

ÍNDICE GENERAL	Página
Índice de figuras	9
Índice de tablas	10
Abreviaturas	11
Resumen	13
Abstract	15
1.- Introducción general	17
2.- Antecedentes generales	19
2.1.- Estrés	19
2.2.- Estrés y sistema nervioso	19
2.3.- Estrés y activación del eje HPA	20
2.4.- Estrés y sistema inmune	21
2.5.- Hipocampo	22
2.6.- Estrés en etapas tempranas de la vida	22
2.7.- Separación materna	23
2.8.- Separación materna y enfermedades psiquiátricas	24
2.9.- LPS	24
2.9.1.- Programación por LPS	25
3.- Microglía	26
3.1.- Astrocitos	27
3.2.- Citocinas y enfermedades neuropsiquiátricas	28

3.3.- Antecedentes directos	29
4.- Justificación	30
5.- Hipótesis	31
6.- Objetivos	31
6.1.- Objetivo general	31
6.2.- Objetivos específicos	31
7.- Estrategia experimental	32
8.- Material y métodos	33
8.1.- Animales	33
8.2.- Procedimiento de separación materna	33
8.3.- Administración de LPS	34
8.4.- Análisis estadístico	34
9.- Resultados	35
9.1.- Capítulo I	35
9.2.- Artículo original	35
10.- Capítulo II	46
10.1.- Resumen	46
10.2.- Introducción capítulo II	48
10.3.- Material y métodos	49
10.3.1- Extracción de RNA de tejidos hipocampal	49
10.3.2.- Síntesis de cDNA	49

10.3.3.- PCR punto final	50
10.3.4.- PCR tiempo real	50
10.4.- Resultados	52
10.4.1.- Evaluación de la expresión de TNF – α en el hipocampo de ratas macho adultas	52
10.4.2.- Evaluación de la expresión de IL-1β en el hipocampo de ratas macho adultas	53
10.4.3.- Evaluación de la expresión de IL-6 en el hipocampo de ratas macho adultas	54
10.4.4.- Evaluación de la expresión IL-10 en el hipocampo de ratas macho adultas	55
11.- Discusión	56
12.- Conclusión	58
13.- Referencias	59
14.- Discusión general	61
15.- Conclusión general	65
16.- Referencias generales	66
17.- Capítulo III	78
17.1.- Artículo de divulgación	78

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.- Eje HPA y su relación con el sistema inmune	21
Figura 2.- Señalización a través del LPS para inducir la liberación de citocinas	25
Figura 3.- Esquema experimental	32
Figura 4.- Respuesta dinámica al estrés de TNF- α en el hipocampo de ratas macho adulto en condiciones basales y de estrés	52
Figura 5.- Respuesta dinámica al estrés de IL-1 β en el hipocampo de ratas macho adulto en condiciones basales y de estrés	53
Figura 6.- Respuesta dinámica al estrés de IL-6 en el hipocampo de ratas macho adulto en condiciones basales y de estrés	54
Figura 7.- Respuesta dinámica al estrés de IL-10 en el hipocampo de ratas macho adulto en condiciones basales y de estrés	55

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1.- Secuencias de oligonucleótidos	51

ABREVIATURAS

A: Adrenalina

Ach: Acetilcolina

ACTH: Hormona Adrenocorticotrópica

B: Bazo

CE: Corteza Entorrinal

CONT: Control

Cort: Corticosterona

CRH: Hormona Liberadora de Corticotropina

CS: Corteza Suprarrenal

ELS: Estrés en la Vida Temprana

GD: Giro Dentado

GFAP: Proteína Ácida Glial Fibrilar

GL: Ganglios Linfáticos

HPA. Eje Hipotálamo Pituitaria Adrenales

IFN α : Interferón Alfa

IGF-1: Factor de Crecimiento Similar a la Insulina 1

IL-2: Interleucina 2

IL-4: Interleucina 4

IL-6: Interleucina 6

IL-13: Interleucina 13

IL -1 β : Interleucina 1 beta

IL-10: Interleucina 10

iNOS: Óxido Nítrico Sintasa Inducible

LB: Linfocitos B

LPS: Lipopolisacárido
LPVH: Núcleo Paraventricular del Hipotálamo
LT: Linfocitos T
M: Macrófagos
MO: Médula ósea
NA: Noradrenalina
NK: Célula Asesina Natural
PN: Posnatal
SGA: Síndrome General de Adaptación
SNC: Sistema Nervioso Central
SNS: Sistema Nervioso Simpático
SM: Separación Materna
Sub: Subículum
T: Timo
TLAMG: Tejido Linfoide Asociado a la Mucosa Intestinal
TLR-2: Receptor 2 tipo Toll
TLR-4: Receptor 4 tipo Toll
TLR-9: Receptor 9 tipo Toll
TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa
VEH: Vehículo
VP: Vía Perforante
VPH: Vía Perforante Lateral

RESUMEN

El estrés en etapas tempranas de la vida (ELS) aumenta el riesgo de sufrir enfermedades psiquiátricas en la edad adulta. Las infecciones neonatales graves también contribuyen a desarrollar enfermedades afectivas. Estos factores estresantes desencadenan la activación inmediata del sistema neuroinmune. En este estudio se compararon los efectos a largo plazo de dos retos neonatales (estrés, inmunitario) por separado o en combinación sobre la conducta emocional, cambios en la citoarquitectura de las células gliales y expresión de citocinas en el hipocampo. Se usaron los siguientes grupos de ratas Sprague Dawley machos y hembras: 1) control + vehículo; 2) separación materna (SM, 3h / día desde el posnatal [PN] 1 al 14) + vehículo; 3) control + Lipopolisácarido (LPS, 0.5 mg/ kg, PN14); 4) SM + LPS. La conducta se analizó a partir del PN120 en los machos y de PN150 en hembras en diestro. La morfología celular (microglía y astrocitos) y la expresión de citocinas (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10) se analizó al PN140 en machos y PN170 en hembras; la expresión de citocinas se analizó en 2 puntos: de manera basal y a los 180 minutos posteriores a un tercer reto (nado forzado). Solo el LPS aumentó la conducta de ansiedad en ratas macho, mientras que en las hembras ambos desafíos la aumentaron. Con respecto a la conducta tipo depresiva, la SM originó una conducta tipo depresiva en machos y hembras. La densidad celular microglial no se afectó en el área CA3 del hipocampo de ratas macho, pero se redujo por todos los factores estresantes en el *Hilus*. En las hembras, el LPS disminuyó la densidad microglial en CA3 e *Hilus*. Todos los factores estresantes promovieron la activación microglial en CA3 e *Hilus* en machos y hembras. En los machos, la SM y LPS aumentaron la densidad astrocítica del *Hilus*, pero solo LPS la aumentó en CA3. La SM evitó el aumento de la densidad astrocítica en respuesta a LPS en ambas áreas. En las hembras, solo la SM redujo la población astrocítica de las áreas de *Hilus* y CA3. En conclusión, las respuestas conductuales y los cambios de las células gliales a los desafíos en etapas tempranas de la vida dependen del género, lo que sugiere un dimorfismo sexual además de la naturaleza del evento adverso enfrentado. Se evaluó también la expresión de citocinas en el hipocampo, en términos biológicos ningún reto solo o combinado modificó la expresión de TNF - α en estado basal y estrés. La SM incrementó la expresión de IL-1 β en condiciones basales; sin embargo, este incremento fue atenuado por el LPS. Por otro lado, en condiciones de estrés los grupos CONT + VEH, CONT + LPS y SM + VEH mostraron un incremento significativo en la expresión de esta citocina; la máxima expresión fue originada por la SM y atenuada en conjunto por el LPS. La expresión de IL-10 se incrementó en el estado basal únicamente en el grupo SM + VEH, mientras en condiciones de estrés los grupos CONT + VEH y SM + VEH presentaron una mayor expresión. Estos resultados indican que la expresión de citocinas pro y antiinflamatorias permanece elevada por un largo periodo de tiempo, sin embargo,

el sistema puede reaccionar de una manera más activa frente a cada estresor agudo que se presente demostrando una programación del sistema. En conclusión, la respuesta conductual a los factores estresantes en la vida temprana depende del tipo de desafío y del sexo. Además, todos los desafíos aumentaron la activación de las células gliales en el hipocampo a largo plazo; sin embargo, la respuesta específica de las células gliales depende del tipo de célula (microglía, astrocitos) en la zona del hipocampo y del sexo del individuo. Las respuestas gliales a un doble reto pueden ser parte de un mecanismo de respuesta adaptativa. Las respuestas gliales y conductuales a largo plazo a diferentes ELS pueden permitir una mejor comprensión del desarrollo de enfermedades psiquiátricas

Palabras clave: LPS, Separación materna, Estrés, Conducta de ansiedad, Conducta tipo depresiva, Citocinas

ABSTRACT

Early life stress (ELS) increases the risk of psychiatric illness in adulthood. Serious neonatal infections also contribute to developing affective diseases. These stressors trigger immediate activation of the neuroimmune system. Here we compare the long-term effects of various neonatal challenges alone (stress, immune) or in combination on emotional behavior, changes in glial cell cytoarchitecture, and cytokine expression in the hippocampus. Male and female Sprague Dawley rats were used: 1) control + vehicle; 2) maternal separation (SM, 3h / day from postnatal [PN] 1 to 14) + vehicle; 3) control + Lipopolysaccharide (LPS, 0.5 mg / kg, PN14); 4) SM + LPS. The behavior was analyzed from PN120 in males and PN150 in females in diestrus. Cell morphology (microglia and astrocytes) and cytokine expression (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10) were analyzed at PN140 in males and PN170 in females; cytokine expression was analyzed at 2 points at baseline and 180 minutes after a third challenge (forced swimming). Only LPS increased anxiety-like behavior in male rats, while both challenges increased it in females. Regarding depressive-like behavior, SM increased it in males, both LPS and SM increased it in females, and both challenges combined increased it in both sexes. Microglial cell density was not affected in the CA3 area of the hippocampus of male rats, but was reduced by all stressors in the *Hilus*. In females, LPS decreased microglial density in CA3 and *Hilus*. All stressors promoted microglial activation in CA3 and *Hilus* in males and females. In males, MS and LPS increased the astrocytic density of *Hilus*, but only LPS increased it in CA3. MS prevented the increase in astrocyte density in response to LPS in both areas. In females, only MS reduced the astrocytic population of the *Hilus* and CA3 areas. In conclusion, the behavioral responses and changes of glial cells to challenges in early life are gender-dependent, suggesting sexual dimorphism in addition to the nature of the adverse event faced. We also evaluated the expression of cytokines, in biological terms no single or combined challenge modified the expression of TNF α in basal state and stress, IL-1 β in basal condition increased expression in the MS VEH group, However, this increase was attenuated by the LPS, in such a way, under stress conditions the groups CONT VEH, CONT LPS and MS VEH significantly increase the expression, the maximum expression is caused by MS and jointly attenuated by LPS. The expression of IL-10 increases in the basal state only in the MS VEH group, while in the CONT VEH stress state and MS VEH present a higher expression. These results indicate that the expression of pro and anti-inflammatory cytokines remain elevated for a long period and yet the system can react more actively to each acute stressor that is present, demonstrating programming of the system.

In conclusion, the behavioral response to stressors in early life depends on the type of challenge and gender. Furthermore, all of the challenges increased glial cell

activation in the hippocampus in the long term; however, the specific response of glial cells depends on the type of cell (microglia, astrocytes) in the hippocampal area and the sex of the individual. Glial responses to a double insult can be part of an adaptive response mechanism. Long-term glial and behavioral responses to different ELS may allow for a better understanding of the development of psychiatric illness

Keywords: LPS, Maternal separation, Stress, Anxiety-like behavior, Depressive-like behavior, Cytokines.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La exposición al estrés en la vida temprana (ELS) tiene efectos negativos en el desarrollo cerebral (Heim y Nemeroff, 2002). La incidencia de la depresión y los trastornos de ansiedad en todo el mundo en 2015 se estimó en 4.4% y 3.6%, respectivamente, afectando a una mayor proporción de mujeres (OMS, 2017). En los últimos años, la atención se ha centrado en las células gliales como uno de los actores involucrados en los trastornos depresivos (Yirmiya et al., 2015). Las células microgliales experimentan cambios que conducen a un estado activado que produce citocinas inflamatorias. Esta activación puede provocar cambios en el comportamiento y el estado de ánimo y se han asociado con infecciones, estrés crónico y otros retos (Yirmiya et al., 2015). Los astrocitos son reguladores de la función neuronal, pero también juegan un papel como moduladores de la función inmune cerebral. Las alteraciones en las funciones astrocíticas se han asociado recientemente con trastornos depresivos; sin embargo, el papel de los astrocitos aún no está claro (Abbink et al., 2019).

El hipocampo participa en la regulación de la conducta emocional (Bartsch y Wulff, 2015), debido al estrés crónico; sus funciones se ven afectadas, ya que se ha observado que pacientes deprimidos muestran un volumen hipocampal reducido (Lucassen et al., 2014). Asimismo, es conocido que ELS activa el sistema neuroinmune del hipocampo a medida que induce cambios inmediatos en las células gliales, específicamente aumentando la activación microglial y disminuyendo la población de astrocitos en las regiones CA3 e *Hilus* del hipocampo (Roque et al., 2016; Saavedra et al., 2017). Hasta la fecha, solo un estudio ha documentado cambios duraderos en animales machos (Banqueri et al., 2019), y se desconoce si la respuesta es similar en las hembras.

El lipopolisacárido (LPS) una endotoxina bacteriana que simula una infección, induce alteraciones conductuales similares a la depresión o ansiedad a diferentes edades en animales de experimentación (Salazar et al., 2012) y tiene un impacto particularmente importante durante el período neonatal (Bilbo y Schwarz, 2009). Recientemente se reportó que la inyección de LPS en el día posnatal PN14 aumenta

la densidad de astrocitos y la activación microglial en las áreas CA1 y CA3 del hipocampo de ratas macho y hembra adultas (Berkiks et al., 2019). También se conoce que la microglía activada se encuentra en una mayor proporción en animales que sufrieron ELS, sobre todo a nivel del hipocampo (Hoogland et al., 2015). Los astrocitos también se activan frente a retos inmunes cambiando su morfología a astrocitos hipertrofiados los cuales tienen la capacidad de secretar citocinas proinflamatorias (Liddelow and Barres 2017). Estas citocinas liberadas por los astrocitos son muy relevantes para las neuronas ya que pueden modificar la excitabilidad neuronal, metabolismo, así como su neurotransmisión.

Estudios en animales y humanos han demostrado que los retos inmunes pueden inducir conducta tipo depresiva (Raison et al., 2006) y esta conducta está relacionada con incrementos en los niveles de citocinas proinflamatorias como IL-6 (Haapakoski et al., 2015). Se conoce que la administración de LPS induce una conducta tipo depresiva relacionada con el incremento de citocinas proinflamatorias ocasionando neuroinflamación además de atenuar la neurogénesis hipocampal en roedores (Ekdahl et al., 2003). Sin embargo, los efectos combinados de los factores estresantes se han estudiado poco. Una suma de adversidades (modelo de estrés acumulativo) en la vida temprana, como las que se estudian aquí, podría poner al individuo en mayor riesgo de sufrir psicopatología en la edad adulta (McEwen, 1998).

En general, pocos estudios han comparado los efectos de diferentes tipos de ELS sobre el comportamiento emocional en la edad adulta, y se desconoce si los cambios inmediatos observados en las células gliales persisten hasta la edad adulta en machos y hembras. En este estudio se investigó si la respuesta temprana de las células gliales a diferentes desafíos neonatales se mantiene si están hay mayores concentraciones de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, y si a su vez, estas alteraciones afectan el comportamiento emocional de ratas macho y hembra adultas.

2. ANTECEDENTES GENERALES

2.1. ESTRÉS

El término estrés comenzó a utilizarse en Fisiología por Hans Selye en 1936. Selye definió el estrés como *“un síndrome o conjunto de reacciones fisiológicas, no específicas del organismo, a distintos agentes nocivos de naturaleza física o química presentes en el medio ambiente”* (Pearlin, et al., 1982; Lazarus, 1991; Warr, 1994). Walter Cannon en la primera mitad del siglo XX lo definió como “el mecanismo de pelea o lucha”, (Brown, and Fee. 2002). Lazarus (2006) definió el estrés como un proceso dinámico que ocurre cuando un individuo evalúa las demandas situacionales como superiores a los recursos disponibles. Bhargava (2008) sostiene, a diferencia de Lazarus, que algunos eventos son estresantes de forma innata con relación a su grado de incertidumbre.

2.2. ESTRÉS Y SISTEMA NERVIOSO

El sistema nervioso autónomo en su división simpática es el efector de la respuesta inmediata al estrés, donde una situación adversa genera la activación de las neuronas preganglionares del tipo simpático, ubicadas en el asta intermedio lateral de los segmentos torácico 1 a lumbar 2 de la médula espinal, y la liberación concomitante de la noradrenalina por las neuronas postganglionares simpáticas (Truex RC and Carpenter MB. 1971). De tal forma la activación simpática estimula a las células cromafines de la médula de las glándulas suprarrenales para secretar adrenalina al torrente sanguíneo. (Truex RC and Carpenter MB. 1971). La adrenalina incrementa la frecuencia respiratoria y cardíaca, así como el flujo sanguíneo a los músculos, con lo que prepara al organismo para ejercer una de dos respuestas la de “pelear o huir” (McEwen., 2007). Ambos tipos hormonales, glucocorticoides y catecolaminas, liberados en la respuesta del organismo al estrés ejercen funciones inmunomoduladoras con lo que contribuyen a regular el funcionamiento del sistema inmune.

2.3. ESTRÉS Y ACTIVACIÓN DEL EJE HPA

La respuesta lenta al estrés está mediada por la activación del eje Hipotálamo-Pituitaria- Adrenales (HPA). Estructuras como la amígdala y el hipocampo evalúan la adversidad de los estímulos que rodean al animal y estimulan al hipotálamo. Este provoca la secreción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) desde el núcleo paraventricular. La CRH provoca la secreción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) por parte de la adenohipófisis al torrente sanguíneo, que lleva a la estimulación de la corteza suprarrenal y la secreción de corticosterona permitiendo ajustar el comportamiento a las demandas del ambiente (Zarate et al. 2014). La corticosterona a través de sus receptores puede activar a las células del sistema inmune, como se muestra en la Figura 1.

Un aspecto importante del eje HPA, es su capacidad para autorregularse. La alta concentración de corticosterona en sangre provoca una retroalimentación negativa sobre receptores ubicados en el hipotálamo, hipófisis anterior, e hipocampo inhibiendo su secreción. Una vez superada la adversidad este mecanismo de retroalimentación suprime los procesos biológicos provocados por la respuesta de estrés, restituyendo la homeostasis (Cigolani y Houssay, 2000).

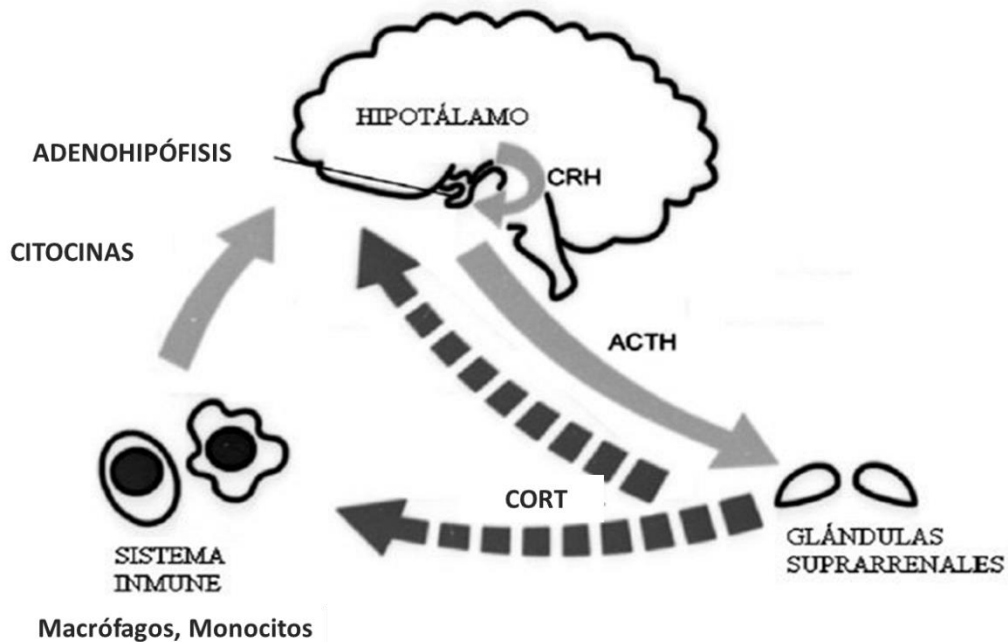


Figura 1.- Eje (HPA) y su relación con el sistema inmune. Se muestran algunos de los órganos y células del sistema inmune que poseen receptores para glucocorticoides y que en condiciones de estrés presentan inhibición en su funcionamiento. CRH: Hormona Liberadora de Corticotropina, ACTH: Hormona Adrenocorticotrópica, CORT: Corticosterona,

2.4. ESTRÉS Y SISTEMA INMUNE

Los mediadores principales del estrés, las catecolaminas noradrenalina y adrenalina, y los glucocorticoides; liberados a partir de la activación del Sistema Nervioso Simpático y el eje HPA, ejercen un efecto directo sobre las células del sistema inmune al acoplarse a sus receptores localizados en la membrana y citoplasma respectivamente; también ejercen una influencia indirecta al alterar la secreción de citocinas ($\text{TNF } \alpha$, IL-6, IL-1 β , IL-2). Todas estas son necesarias para la adecuada maduración y movilización de los linfocitos y otras células de origen inmunitario (Glaser, and Klecolt-Glaser, 2005).

2.5. HIPOCAMPO

El hipocampo forma parte activa en la retroalimentación negativa ejercida por los glucocorticoides para suprimir los procesos biológicos provocados por la respuesta de estrés. Es una estructura importante para el adecuado procesamiento emocional y cognitivo el cual transmite la información de la corteza al hipotálamo (Weininger et al., 2019). El hipocampo y la amígdala son estructuras cerebrales de gran importancia en la regulación de las respuestas conductuales y neuroendocrinas al estrés, además de ser muy vulnerables a los efectos neurotóxicos del estrés en sí mismos (Herman et al., 1997). La región del giro dentado e *Hilus* representa el circuito de entrada del hipocampo canalizando información desde la corteza entorrinal hacia el hipocampo. Este es uno de los dos lugares donde ocurre la neurogénesis adulta (Samuels et al., 2011). Por otra parte, la neurogénesis disminuida en el giro dentado se ha asociado con desórdenes depresivos (Adam Samuels et al., 2015). El CA3 muestra una rica conectividad dentro del hipocampo y tiene funciones como un "marcapasos" fundamental para la codificación y decodificación de la información, además de ser una de las zonas hipocampales más sensibles al estrés (Ishizuka et al., 1990). Varios estudios han demostrado que una disminución en el tamaño de esta zona es un factor de riesgo para padecer desórdenes psiquiátricos (Buzsáki et al., 2002).

2.6. ESTRÉS EN ETAPAS TEMPRANAS DE LA VIDA

ELS en el humano está definido como maltrato infantil, abuso o negligencia y se asocia con enfermedades como la depresión (Heim et al., 2012) y la ansiedad (Phillips et al., 2005). Otros investigadores recientemente han demostrado que los efectos del estrés temprano inducido en ratas en etapa neonatal son duraderos, afectando el desarrollo cognitivo y emocional (Benmhammed et al., 2019). Se ha demostrado que las afecciones a diversas psicopatologías dependen de varios factores entre los que se encuentran, por ejemplo, la ventana de tiempo en el cual se presentó el episodio estresante (Andersen et al., 2008), así como los diferentes factores genéticos y epigenéticos (Palma-Gudiel and, Fañanás, 2016).

2.7. SEPARACIÓN MATERNA

Si bien la SM puede referirse a una variedad de manipulaciones postnatales, estos paradigmas generalmente implican la separación de los animales recién nacidos de la madre durante al menos tres horas al día durante 14 días. La SM interfiere con la influencia reguladora postnatal que la madre tiene sobre la fisiología y el desarrollo del animal, y muchos la consideran un análogo del maltrato infantil humano (Carlyle et al., 2012). Sin embargo, cabe señalarse que la edad a la que se produce la SM en la mayoría de los experimentos con animales corresponde al tercer trimestre del embarazo y a los primeros años de vida en el humano, al menos en términos de algunos aspectos del desarrollo cerebral (Semple et al., 2013). Varios estudios encontraron que, si bien la SM por sí sola no produce cambios en la preferencia por la sacarosa (prueba de anhedonia para valorar conducta tipo depresiva), la aparición de un segundo factor estresante o desafío en la adolescencia o la edad adulta da como resultado una preferencia reducida por la sacarosa (Hill et al., 2014). Este modelo se le conoce como el “Doble Hit” (doble golpe), donde la SM le confiere cierta vulnerabilidad al individuo para desarrollar psicopatologías posteriores, pero el inicio de la sintomatología solo ocurre después de la exposición a un factor estresante posterior (Maynard et al., 2001). Se conoce que la SM induce una hiperactivación del eje HPA, a pesar de estar en el periodo hiporresponsivo en los roedores, y esta hiperactividad del eje se ha descrito en animales con conducta tipo depresiva (Borges-Aguiar et al., 2018). El periodo hiporresponsivo se caracteriza por bajos niveles basales de hormonas del estrés (corticosterona y ACTH) y una relativa falta de respuesta a los factores estresantes externos (Bock et al., 2005).

2.8. SEPARACIÓN MATERNA Y ENFERMEDADES PSIQUIÁTRICAS

La vulnerabilidad a los trastornos emocionales, incluida la conducta tipo depresiva y la ansiosa, se deriva de eventos estresantes durante los primeros años de vida. Las experiencias adversas en la vida temprana, especialmente la interrupción de la relación madre-cría, se han asociado con enfermedades psiquiátricas graves en la edad adulta. La estimulación temprana por mediadores del estrés se ha relacionado con una hiperactividad del eje HPA y esta a su vez con incrementos en la liberación de catecolaminas y glucocorticoides que pueden culminar con trastornos de ansiedad y depresión en la vida adulta (Kendler et al., 1992). En diversos estudios en animales que son sometidos a SM y posteriormente a nado forzado (prueba para evaluar conducta tipo- depresiva) y laberinto elevado en cruz (para evaluar conducta tipo ansiedad) en la etapa adulta, se han alterado las conductas de tipo emocional (Frank et al., 2019).

2.9. LPS

El LPS es el componente principal de la membrana de las bacterias Gram negativas, el cual es utilizado actualmente como un simulador de infecciones bacterianas. Es uno de los inductores más potentes de la inflamación, ya que favorece un incremento de la secreción de citocinas, radicales libres y eicosanoides. En general se acepta que el LPS activa el sistema inmunitario lo que incrementa la secreción y expresión de citocinas de tipo pro-inflamatorio. En consecuencia, las citocinas promueven la secreción de una cascada hormonal en el eje HPA, provocando así la respuesta hormonal al estrés antes mencionada (Zakharova et al., 2015).

2.9.1. PROGRAMACIÓN POR EL LPS

El LPS es reconocido por receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos llamados receptores tipo Toll (TLR), de manera específica el TLR4 (Erridge 2010). Esta activación de TLR4 inicia una cascada de señalización que contribuye al inicio de la respuesta febril y la liberación local de prostaglandina (PG) E₂ del hígado que actúa sobre el vago para enviar una señal al cerebro. Se provoca una elevación inicial de los glucocorticoides y posteriormente se activan cascadas de fosforilación que conducen a la fosforilación del inhibidor (I) κ B. Esta señal libera el factor nuclear NF- κ B de su complejo y se transloca al núcleo, donde inicia la transcripción de citocinas pro-inflamatorias como la interleucina IL-1 β , IL-6 y TNF- α , así como de citocinas antiinflamatorias como la IL-10. (Cartmell et al., 2003, Figura 2).

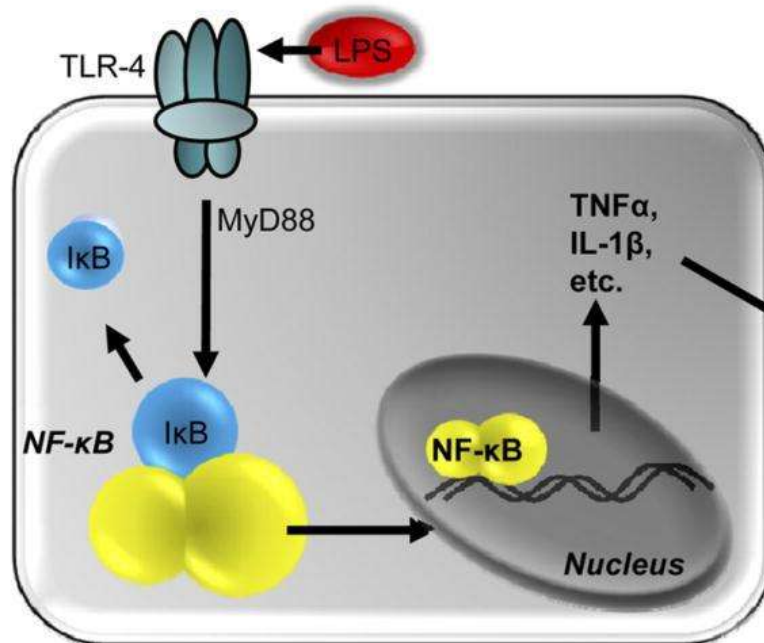


Figura 2.- Señalización a través del LPS para inducir la liberación de citocinas. El LPS se une al receptor TLR4, lo que induce que se fosforile el inhibidor (I)κB que libera el factor nuclear NF-κB de su complejo, el cual posteriormente se transloca al núcleo, e inicia la transcripción de citocinas proinflamatorias.

A mediados y finales de la década de 1990, Shanks y sus colegas establecieron que un desafío inmune experimentado en los días posnatales PN3 y PN5 del período neonatal en la rata puede conducir a alteraciones permanentes en la función del eje HPA y la regulación inmune. Parece haber una ventana crítica de protección después de PN7 y antes de PN28 en el desarrollo durante la cual el desafío inmune único con LPS es capaz de ejercer efectos de programación (Spencer et al., 2006). Varios estudios han demostrado que, las concentraciones circulantes de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α se atenúan significativamente en ratas adultas que fueron tratadas neonatalmente con LPS en comparación con los controles tratados con solución salina (Ellis et al., 2005; Kentner et al., 2010). Cabe señalarse que los niveles de citocinas en ratas Fischer adultas no se atenúan si la primera exposición a LPS ocurre entre los días PN3 y PN5, lo que indica que los mecanismos específicos de la edad, la dosis o la cepa pueden estar involucrados (Walker et al., 2006).

3. MICROGLIA

La microglía son células mieloides de la respuesta inmune en el sistema nervioso central (SNC). Estas células modulan la función neuronal durante la respuesta inflamatoria y la poda sináptica durante el desarrollo y están implicadas en la adecuada plasticidad en el cerebro sano. Son capaces de responder rápidamente incluso a cambios menores en el cerebro y son muy sensibles a varios mediadores del estrés como la corticosterona (Wei et al., 2010).

La microglía frente a estímulos adversos incrementa su densidad, probablemente por el reclutamiento de macrófagos, así como también modifica su morfología, presentando somas más grandes y proyecciones más pequeñas y gruesas (Walker et al., 2014). Además, presentan un incremento en la expresión de la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (Iba-1), que es un marcador de superficie celular el cual es específico de linaje y está presente en microglía activa y en reposo. (Frick et al., 2013). La SM puede desencadenar la activación de células de la microglía en el hipocampo de crías de rata (Gracia-Rubio et al., 2016; Roque et al., 2016; Saavedra et al., 2017).

Las células de la microglía en respuesta a un reto inmunitario inducido por bacterias como *Escherichia coli* y/o LPS pueden inducir neuroinflamación (Lutsik et al., 1991). La microglía expresa receptores de reconocimiento de patrones como TLR2, TLR4 y TLR9, que detectan lipopéptidos y lipopolisacáridos (Olson y Miller, 2004), originando un incremento en citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-1 β) y quimioatrayentes, los cuales promueven el reclutamiento de células mielomonocíticas (neutrófilos y monocitos) en el SNC (Dominguez-Punaro et al., 2007).

Además, puede incrementar la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), así como especies reactivas de nitrógeno y oxígeno lo que puede conducir a deterioro cognitivo y alteraciones conductuales tales como la depresión y la ansiedad (Hoffmann, et al. 2007).

3.1. ASTROCITOS

Los astrocitos son las células gliales más abundantes, ya que constituyen el 25% del volumen cerebral (Tower y Young 1973). La proteína ácida glial fibrilar (GFAP), inducida en daño cerebral y degeneración del SNC y cuya expresión aumenta con la edad, es el marcador clásico para la identificación inmunohistoquímica de astrocitos (Eng et al., 2000). Al formar la sinapsis tripartita, los astrocitos son pieza clave para el sitio neuronal presináptico y postsináptico. Se conoce que la exposición a SM reduce la expresión de GFAP en la mayoría de los estudios, y por tanto reduce la inmunorreactividad, lo cual puede estar relacionado con un número menor de astrocitos (Naskar et al., 2019).

El término astrogliosis reactiva hace referencia a una serie de cambios en los astrocitos que ocurren a nivel molecular, celular y funcional como respuesta a daños y enfermedades del SNC de distinto grado, mientras que la cicatriz glial inhibe la regeneración axonal y migración celular (Silver y Miller 2004). Estos resultados sugieren que los modelos de corta o larga duración de estrés durante las etapas tempranas de la vida dan forma a la plasticidad celular de astrocitos durante la etapa adulta (Çalışkan et al., 2020). Recientemente se ha sugerido que una disminución

en la densidad de astrocitos se relaciona con una mayor incidencia de enfermedades psiquiátricas al existir una disminución en la síntesis de transportadores astrocitarios de glutamato (Fullana et al., 2018).

3.2. CITOCINAS Y ENFERMEDADES NEURO-PSIQUIÁTRICAS

Las citocinas son las moléculas moduladoras e inductoras que utilizan las células del sistema inmune para comunicarse entre sí y con los otros sistemas. Por lo general tienen funciones pleiotrópicas. Existe una extensa literatura que indica que las citocinas participan tanto en el desarrollo del SNC como en la modulación de sus funciones, al mismo tiempo que los neurotransmisores modulan las respuestas del sistema inmune (Elenkov et al., 2000). Los primeros trabajos señalaron que la producción excesiva de moléculas proinflamatorias destinadas a la defensa o la reparación de un tejido dañado, por lo general se acompaña de cambios importantes en la conducta sin que haya un compromiso aparente del SNC (Dantzer, 2001). Se ha observado que las citocinas que pueden influir sobre la conducta son las mismas que inducen y/o modulan la respuesta vascular de las reacciones inflamatorias y que, por lo tanto, pueden ser clasificadas como facilitadoras o inhibidoras de la inflamación. Entre las primeras se pueden enlistar la IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-18, IL-2 y las quimiocinas. Entre las segundas, las más importantes son IL-10, IL-4 e IL-13. La expresión de sus correspondientes receptores cerebrales es necesaria para que se manifiesten los efectos de las citocinas sobre la conducta. Se ha podido observar que cuando, experimentalmente, se administran antagonistas y/o agonistas de los receptores para las citocinas inflamatorias, se presentan de inmediato cambios en la memoria, el sueño y la conducta, así como en el pronóstico de sus enfermedades neurológicas (Baldessarini y Frankenburg 1991). Se ha observado que la administración de IFN- α a voluntarios sanos no solo los deprime y les estimula el eje HPA, aumentando la producción de cortisol, sino también aumenta la producción de IL-6 (Cassidy et al., 2002). Otros investigadores han demostrado que las concentraciones de citocinas pro-inflamatorias se ven reducidas tras la administración de antidepresivos (Kubera et al., 2000).

3.3. ANTECEDENTES DIRECTOS

Datos de nuestro laboratorio han demostrado que los animales que fueron sometidos a SM mostraron una respuesta inflamatoria en el hipocampo de manera inmediata. Utilizando crías de ratas macho sometidas a SM 3 h/día del PN1-PN14, la SM incrementó la activación de células de la microglía en el *Hilus* hipocampal, disminuyó la densidad de astrocitos y el número de procesos astrocíticos. En cuanto a la expresión de citocinas pro-inflamatorias en el hipocampo la SM incrementó los niveles de IL-1 β en condiciones basales y estos aumentaron aún más bajo condiciones de un evento de estrés único; sin embargo, IL-6 y TNF- α no sufrieron cambios. Además, las concentraciones periféricas de IL-1 β disminuyeron en condiciones basales y de estrés, La concentración de IL-6 solo se incrementó en los animales en condiciones de estrés, pero TNF- α no se modificó (Roque et al., 2016).

En un estudio posterior las crías de rata macho fueron sometidas a SM 3 h diarias del PN1-PN14. Al PN14 las crías recibieron una inyección intraperitoneal de solución salina o LPS (1 mg/kg peso/día). Las crías se sacrificaron a las 24 h posteriores a la inyección. Se observó que la SM y el LPS reducen la densidad total de microglía en CA3 e *Hilus*, pero ambos retos incrementan su activación en las zonas previamente descritas. Se observó también una disminución en la densidad de astrocitos por la SM y el LPS en ambas zonas CA3 e *Hilus*. El LPS aumentó la secreción periférica de IL -1 β , TNF- α e IL-6, y la concentración de la proteína IL-1 β del hipocampo; sin embargo, las citocinas se atenuaron cuando ambos retos actuaron de manera conjunta (Saavedra et al., 2017). Si bien cada reto (SM, LPS) por separado es capaz de causar alteraciones morfológicas y funcionales en el hipocampo en etapa neonatal, se desconoce el impacto de cada uno de los retos solos o combinados a largo plazo sobre la conducta emocional y la respuesta neuroinmune del hipocampo.

4. JUSTIFICACIÓN

Se sabe que es muy común en varios segmentos de la población la presencia de estresores tales como el maltrato infantil, la pobreza extrema, negligencia parental, entre otros padecidos en etapas tempranas de la vida. Por otra parte, las infecciones en etapas neonatales (que son la principal causa de ingreso hospitalario en países en vías de desarrollo) pueden coexistir con los estresores previamente mencionados.

El estrés en etapas tempranas de la vida está relacionado con el incremento de enfermedades mentales, tales como depresión, ansiedad, esquizofrenia etc. Además, datos experimentales de nuestro laboratorio mostraron que el estrés por SM se asocia a un incremento en el número de microglía activada, una disminución de astrocitos y un aumento en la expresión de citocinas pro-inflamatorias en el hipocampo. Por otra parte, una infección simulada con LPS produce un incremento en la activación de la microglía, así como también en los niveles circulantes de diversas citocinas entre las que encontramos principalmente IL-6, IL -1 β y TNF- α .

Si bien cada reto (estrés, - inmune) por separado es capaz de causar alteraciones morfológicas y funcionales en el hipocampo en etapas tempranas, se desconoce el impacto de ambos retos solos o de manera conjunta durante la etapa adulta. No se han evaluado los efectos del estrés temprano por SM o LPS sobre los mecanismos inflamatorios a nivel cerebral a largo plazo, o sobre la conducta emocional en la etapa adulta.

5. HIPÓTESIS

La exposición a diferentes estresores en la etapa neonatal promueve alteraciones permanentes en las células gliales, y resulta en alteraciones en la conducta emocional de ratas adultas macho y hembra.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar si la exposición a diferentes estresores en la etapa neonatal promueve alteraciones permanentes en las células gliales y si resultan en alteraciones en la conducta emocional de ratas adultas macho y hembra.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1. Evaluar las consecuencias funcionales de dos estresores a largo plazo mediante el análisis de las conductas tipo depresiva y de ansiedad en ratas adultas.
- 2. Analizar los cambios morfológicos y la densidad celular de los astrocitos y células microgliales en CA3 e *Hilus* en ratas adultas sometidas a dos retos en etapa neonatal.
- 3. Analizar la respuesta neuro-inflamatoria de dos retos solos o combinados a través de la evaluación de la expresión de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF- α) y anti-inflamatorias (IL-10) en el hipocampo.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

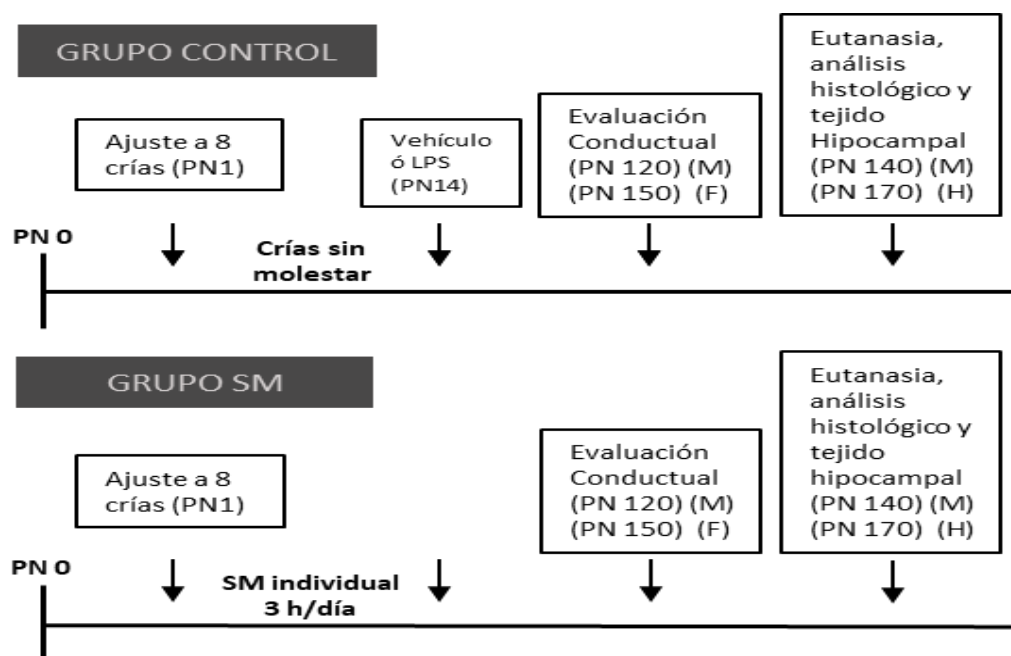


Figura 3.- Esquema experimental. Descripción de los procedimientos, evaluación de la conducta, análisis inmunohistológico y expresión de citocinas en los grupos Control y SM. El día PN0 fue designado como el día del nacimiento, al PN1 se ajustó la camada a 8 crías por grupo. Desde PN1 hasta PN14, las crías fueron sometidas a SM individual 3 h / día o permanecieron sin manipulación en el nido de la madre. Al PN14, se aplicaron inyecciones de LPS o vehículo a las crías. La evaluación de la conducta comenzó al PN120 en machos y PN150 en hembras en diestro. Las ratas machos se sacrificaron al PN140, las ratas hembra al PN170 y se extrajeron sus cerebros para análisis histológico y expresión de citocinas.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

La metodología asignada para cumplir con los diferentes objetivos del presente trabajo se describe cada una por separado en su respectivo capítulo.

8.1. ANIMALES

Las crías de rata Sprague Dawley machos y hembras se mantuvieron en condiciones estándar, bajo un ciclo de luz / oscuridad 12:12 (la luz se enciende a las 7:00 am), una temperatura aproximada de 22-24 °C, y libre acceso al agua y comida. Las camadas se destetaron al PN21 y las ratas se colocaron en jaulas con 4 sujetos, según su sexo, hasta el día 120 posnatal (PN120). Todos los procedimientos experimentales cumplieron con los reglamentos publicados por la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y los lineamientos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos. El protocolo fue evaluado y aprobado por el Comité Nacional de Ética del Instituto Mexicano del Seguro social (R-2015–785–103). Se minimizó el sufrimiento de los animales y el número de animales utilizados. Se cumplió con todos los requisitos sugeridos por la Lista de Verificación de las Directrices ARRIVE para la Investigación Animal.

8.2. PROCEDIMIENTO DE SEPARACIÓN MATERNA

El día de nacimiento se identificó como PN0. Las camadas se ajustaron a 8 crías (se realizó un sorteo aleatorio de crías) que consistían en 4-5 machos y 3-4 hembras en PN1. La SM consistió en separar a las crías de la madre y hermanos por un período de 3 h diarias de PN1 a PN14. La separación se realizó de 9:00 a.m. a 12:00 pm; las crías se colocaron en cajas con temperaturas controladas de 32–35 °C y un lecho de aserrín. Las cajas se dividieron en 8 compartimentos, uno para cada cría. Los grupos control permanecieron sin alterar en el nido materno hasta el destete.

8.3. ADMINISTRACIÓN DE LPS

Se disolvió el lipopolisacárido (LPS, 0,5 mg / kg; *E. coli* 055: B5; Sigma Aldrich) en solución salina al 0.9% y se administró por vía intraperitoneal a las crías asignadas al PN14.

8.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados se calcularon con la media del grupo +/- SEM. Se aplicó ANOVA de dos vías para analizar las pruebas de laberinto elevado en cruz, campo abierto, nado forzado, análisis histológico de la densidad celular, activación de la glía y evaluación de la expresión de citocinas pro y antiinflamatorias. Se utilizaron dos factores y dos niveles: Factor A, SM, dos niveles (Control, MS); Factor B, LPS, dos niveles (Vehículo, LPS); la interacción se analizó entre el factor A y B (A x B). Se realizó la prueba post hoc de Newman-Keuls, en su caso, para analizar las diferencias entre grupos. Estadísticas separadas se realizaron entre algunos grupos en pares utilizando la prueba t de Student. Se utilizó el software GB-stat V6.0 (Dynamic Microsystems) como programa estadístico.

9. RESULTADOS

9.1. CAPÍTULO I

Long-term activation of hippocampal glial cells and altered emotional behavior in male and female adult rats after different neonatal stressors.

Activación a largo plazo de las células gliales del hipocampo y conducta emocional alterada en ratas adultas macho y hembra después de diferentes estresores neonatales.

9.2. ARTÍCULO ORIGINAL



Contents lists available at ScienceDirect

Psychoneuroendocrinology

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

Long-term activation of hippocampal glial cells and altered emotional behavior in male and female adult rats after different neonatal stressors

Luis Miguel Saavedra^{a,b}, Martha Guadalupe Hernández-Velázquez^a, Scarlett Madrigal^a, Alejandra Ochoa-Zarzosa^b, Luz Torner^{a,*}

^a Centro de Investigación Biomédica de Michoacán, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mordida 58341, Michoacán, México

^b Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología - FMVZ, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Tarámbaro 58893, Michoacán, México

ARTICLE INFO

Keywords:

Maternal separation
Lipopolysaccharide
Depression
Anxiety
Microglia
Astrocytes

ABSTRACT

Early life stress increases the risk of developing psychiatric diseases in adulthood. Severe neonatal infections can also contribute to the development of affective illnesses. Stress and infections both trigger the immediate activation of the neuroimmune system. We compared the long-term effects of neonatal single or combined stress-immune challenges on emotional behavior and glial cell responses in the hippocampus. Male and female Sprague Dawley rats were randomly allocated across four conditions: (1) control + vehicle; (2) maternal separation (MS, 3 h/day on postnatal days [PN] 1–14) + vehicle; (3) control + lipopolysaccharide (LPS, 0.5 mg/kg, PN14); (4) MS + LPS. The rats' behaviors were analyzed from PN120 in males and from PN150 in diestrous females. LPS, but not MS, increased anxiety-like behavior in male rats; however, in females, it increased with both challenges. Depressive-like behavior increased after MS—but not LPS—in males and females. Combined stressors increased depressive-like behavior in both sexes. All stressors promoted microglial activation in CA3 and hilus in males and females. MS and LPS increased the astrocytic density within the male hilus, but LPS only increased it in CA3. MS prevented the rise in astrocytic density with LPS. In females, MS reduced the astrocytic population of the hilus and CA3 areas. Taken together, the behavioral and glial cell responses to early life challenges are sex-dependent and cell-type specific. This suggests a sexual dimorphism in the nature of the adverse event faced. These results have implications for understanding the emergence of psychiatric illnesses.

1. Introduction

Exposure to early life stress (ELS) has negative effects on brain development (Heim and Nemeroff, 2002; Lupien, et al. 2009). Parental neglect, child abuse, and extreme poverty, as examples of stress, play an important role in the genesis of psychiatric diseases, including depression, anxiety, and psychosis in adulthood (Kaufman and Charney, 2001; Gilbert et al., 2009). The incidence of depression and anxiety disorders around the world was estimated at 4.4% and 3.6%, respectively, in 2015, affecting a greater proportion of women than men (WHO, 2017).

In recent years, attention has been focused on glial cells as the other players involved in depressive disorders (Yirmiya et al., 2015). Microglial cells undergo changes leading to an activated state producing inflammatory cytokines. This activation may lead to changes in behavior and mood and have been associated with infections, chronic stress, and other insults (Rajkowska and Miguel-Hidalgo, 2007; Yirmiya et al.,

2015). Astrocytes are regulators of neuronal function but also play a role as modulators of the cerebral immune function. Alterations in astrocytic functions have been recently associated with depressive disorders, but the role of astrocytes is still unclear (Abbink et al., 2019).

The hippocampus is involved in the regulation of emotional behavior (Bartsch and Wulff, 2015). Hippocampal functions are affected in response to chronic stress and have been related to mood disorders, as depressed patients show reduced hippocampal volume (Lucassen et al., 2014). ELS activates the hippocampal neuroimmune system as it induces immediate changes in glial cells, specifically increasing the microglial activation and decreasing the astrocyte population in the CA3 and hilus regions of the hippocampus (Roque et al., 2016; Saavedra et al., 2017). To date, only one study has documented long-lasting changes in male animals (Banqueri et al., 2019), and it is unknown if the response is similar in females.

Severe infections can trigger depressive states or increase anxiety in

* Correspondence to: Centro de Investigación Biomédica de Michoacán, Instituto Mexicano del Seguro Social, Camino de la Arboleda 300, Ex Hacienda de San José la Huerta, Morelia 58341, Michoacán, México.

E-mail address: luz_torner@yahoo.com (L. Torner).

<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2021.105164>

Received 22 September 2020; Received in revised form 13 January 2021; Accepted 3 February 2021

Available online 9 February 2021

0306-4530/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

humans (Dantzer et al., 2008). Lipopolysaccharide (LPS), a bacterial endotoxin that causes infection, induces behavioral alterations similar to depression or anxiety at different ages in experimental animals (Salazar et al., 2012) and has a particularly important impact during the neonatal period (Bilbo and Schwarz, 2009). LPS injection at postnatal day (PN) 14 was reported to increase astrocyte density and microglial activation in the CA1 and CA3 areas of the hippocampus of adult male and female rats (Berkiks et al., 2019).

The combined effects of stressors have been scarcely studied. A sum of adversities (cumulative stress model) in early life such as the ones studied here might put the individual at a higher risk of suffering psychopathology in adulthood (McEwen, 1998). The presence of clusters of extreme poverty and infectious diseases has been described throughout the world (Plucinski et al., 2012). Here, we tested if an early double insult results in significant behavioral alterations in the long term.

We recently showed that LPS and/or MS induce immediate changes in the neuroimmune system, increasing the activation of microglia and reducing the astrocyte population in the hippocampus of PN15 pups (Saavedra et al., 2017). Overall, few studies have compared the effects of different types of ELS on emotional behavior in adulthood or addressed if the immediate changes observed in glial cells persist into adulthood in males and females. Here, we investigate whether the early glial cell response to different neonatal challenges is maintained and if they affect the emotional behavior of adult male and female rats.

2. Methods

2.1. Animals

Male and female Sprague Dawley rat pups were kept under standard conditions, under a 12:12 light / dark cycle (light turned on at 7:00 a. m.), an approximate temperature of 22–24 °C, and with free access to water and food. Litters were weaned at PN21, and the rats were placed in cages with groups of 4, according to their sex, until postnatal day 120 (PN120), the beginning of behavioral testing. All experimental procedures were performed according to the guidelines and standards approved by the Official Mexican Standard for the use and care of laboratory animals (NOM-062-ZOO-1999) and the guidelines of the American National Institutes of Health. The protocol was evaluated and approved by the National Committee of Ethics of the Instituto Mexicano del Seguro Social (R-2015-785-103). Efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used. We complied with all the requirements suggested by the ARRIVE Guidelines Checklist for Animal Research.

2.2. Maternal separation

The day of birth was identified as PNO. The litters were adjusted to 8 pups (through cross-fostering of pups from different dams) consisting of 4–5 males and 3–4 females at PN1. The maternal separation (MS) consisted of separating the pups from the mother and siblings for a period of 3 h daily from PN1 to PN14. The separation was carried out from 9:00 a. m. to 12:00 p.m.; the pups were placed in boxes with controlled temperatures of 32–35 °C and a sawdust bed. Boxes were divided into 8 compartments, one for each pup. The control groups remained undisturbed in the maternal nest until weaning.

2.3. LPS administration

Lipopolysaccharide (LPS, 0.5 mg/kg; *Escherichia coli* 055: B5; Sigma Aldrich) were dissolved in 0.9% saline solution and administered intraperitoneally to the allocated pups at PN14.

2.4. Experimental strategy

Male and female Sprague Dawley rats were divided into 4 groups: (1)

control + vehicle; (2) MS (3 h/day on PN1–14) + vehicle; (3) control+LPS (0.5 mg/kg, PN14); (4) MS+LPS. The behavioral tests for the males started on PN120. They were first subjected to the elevated plus-maze test, followed by the open field test and were euthanized at PN140 for immunohistological analysis. Once the behavioral analysis was completed in the males, the same tests were performed with the groups of females starting at PN150, and they were euthanized at PN170. Eight days before beginning, vaginal smears were taken daily for all the females. Only female rats in diestrous were selected after daily visual inspection of their vaginal smears 90 min before the start of the tests. Additional groups of male and female rats were subjected to the forced swimming test, but their brains were not considered for the histological analysis (Fig. 1).

2.5. Elevated plus-maze

The elevated plus-maze consisted of 2 open arms (50 cm long × 10 cm wide) and 2 closed arms (50 cm long × 10 cm wide × 40 cm high). The entire maze was raised 50 cm from the floor. In this test, the animal was allowed to freely explore the arms of the maze for 5 min. The parameters evaluated were the percentage (%) of entries in the open arm and the percentage of time in the open arm, considered as the percentage of entries or time in the open arms / the sum of entries or time in both the open and closed arms. In addition, the number of full entries into the open arms was scored (not shown). The numbers of rats used were as follows: males, n = 10 per group; females, control+vehicle: n = 11, control+LPS: n = 9, MS+vehicle: n = 8, MS + LPS: n = 8.

2.6. Open field test

The animals were placed in a rectangular arena (80 cm × 60 cm × 30 cm) divided into 9 quadrants for 10 min. The central quadrant had a light intensity of 48 lux. We evaluated the total time spent in the central area (TCA) and the percentage of crosses to the center (NRC), corresponding to the sum of the crosses to all quadrants. We evaluated the number of crosses to all quadrants (not shown). The numbers of animals used were as follows: males n = 10 per group; females, control+vehicle: n = 11, control + LPS: n = 9, MS+vehicle: n = 8, MS+LPS: n = 8.

2.7. Forced swim test

Forced swimming is considered an ethologically relevant stressor for rats, as it combines physical and emotional stress. This test tries to simulate symptoms similar to depression in humans through the observation of passive coping behavior in rodents. The rats were subjected to swim for 10 min in a cylinder approximately 35 cm in diameter × 50 cm long, filled with 30 cm of water at 21 °C. The parameters evaluated were the escalating time and floating time in seconds as well as the latency of time to start floating. Floating was defined as the animal making the least possible movements with their paws, just to keep the head above the water. The numbers of animals used were as follows: males, control+vehicle: n = 8, control+LPS: n = 7, MS+vehicle: n = 8, MS+LPS: n = 8; females, n = 10 per group.

2.8. Tissue processing for immunohistochemistry

The animals were deeply anesthetized with an intraperitoneal overdose of pentobarbital (Sedalphorte 100 mg/kg body weight; animal health and welfare) and were perfused through the left ventricle of the heart with a saline solution (NaCl 0.9%), followed by a 4% paraformaldehyde (PFA) solution in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.45). Brains were collected and placed in PFA for post-fixation for 24 h. Later, they were placed sequentially in a 20% sucrose solution and a 30% sucrose solution and stored at 4 °C until use. For histological analysis, the number of animals used was as follows: males, n = 8; females, n = 8 per group.

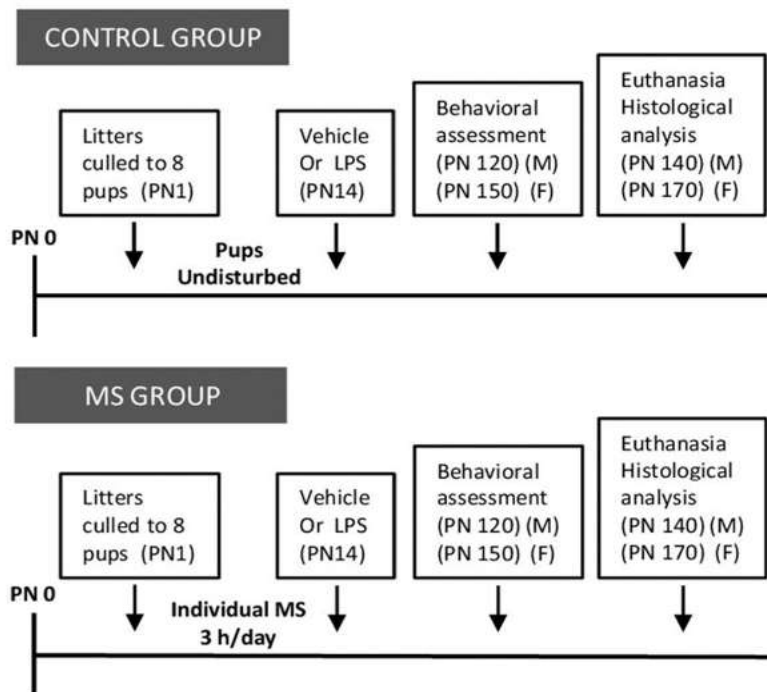


Fig. 1. Experimental schematic. Timeline of the initial procedures, behavioral assessment, and immunohistological analysis of Control and MS groups. Day of birth designated as PN0; on PN1 the litters were culled to eight pups. From PN1 to PN14, pups were subjected to individual MS 3 h/day or remained undisturbed in the mother's nest. On PN14, injections of LPS or vehicle was applied to all the pups. Behavioral assessment started at PN120 in males and PN150 in diestrous females. Male rats were euthanized at PN140, female rats at 170 and their brains were extracted for immunohistological analysis. LPS, lipopolysaccharide; MS, maternal separation; PN, postnatal.

2.9. Immunohistochemistry

Brains were cut into 40- μm coronal sections using a cryostat (Minotome Plus; Triangle Biomedical Sciences, Durham, NC, USA). The sections were incubated with 10% H_2O_2 in methanol and subsequently 10% H_2O_2 in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) with Triton X100 at 4% (PB-T; St Louis). Sections were then incubated with primary antibody anti-ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1) at a dilution of 1:30,000 (Wako), or rabbit polyclonal anti-gliial fibrillary protein (GFAP) at a dilution of 1:30,000 (Abcam) for 48 h. After 3 \times 5-min phosphate buffer washes, tissue was incubated with the second biotinylated IgG antibody (1:750) for 2 h (rabbit IgG from Vector Laboratories). Subsequently, the tissue was placed in a solution with avidin-biotin peroxidase (ABC Elite Kit; Vector Laboratories). Finally, the antigens were revealed by a solution containing diaminobenzidine (DAB Kit; Vector Laboratories) and mounted on a 1% gelatinized slide.

2.10. Morphological analysis

The tissues were analyzed for cell density in the CA3 and hilus areas of the dorsal hippocampus. Two fields per section were analyzed with a total of 5 sections per brain. Histological analysis was performed in the region comprised within (-2.80 to -4.15 mm bregma); the reference frame consisted of a total of 15,000 μm^2 for the inspection of both microglial cells and astrocytes. The stained cells (Iba1⁺ or GFAP⁺) inside the reference frame were counted at 20 \times magnification and expressed as number of cells / area (transformed in mm^2). Activated microglial cells were counted and referred to as percentage of the total microglial number in the selected area. Microglia were classified following previous descriptions (Diz-Chaves et al., 2012) as ramified microglia (small soma and few to numerous processes, type I-III) or activated microglia (large soma or amoeboid body, and thicker and short processes, type IV-V). We used a light field microscope with a 20 \times magnification

objective (AxioCam MRC; Karl Zeiss). The entire count was performed by an examiner blinded to the experimental conditions. The morphological details of astrocytes were also evaluated using Sholl Analysis in ImageJ. For the analysis five cells were randomly selected in each brain; these were drawn and digitalized. We used 5 brains per group and a camera lucida at 100 \times magnification.

2.11. Statistical analysis

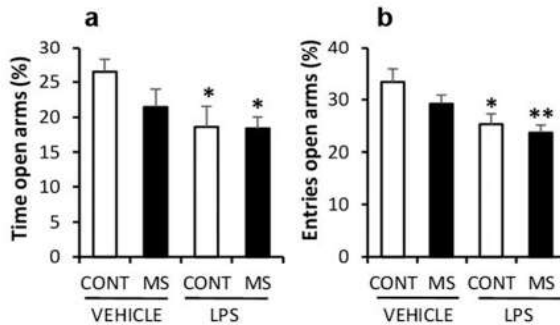
All our results were calculated as the group mean \pm SEM. Two-way ANOVA was applied to analyze the elevated plus maze, open field, forced swimming, recognition and placement of objects tests, and histological analysis of cell density and activation of glia. Two factors and two levels were used: Factor A, maternal separation, two levels (Control, MS); Factor B, LPS, two levels (Vehicle, LPS); the interaction between factor A and B (A \times B) was analyzed. Data from male and female rats were analyzed separately. We performed the Newman-Keuls post hoc test, where applicable, to analyze the differences between groups. Separate statistics were performed between some groups in pairs using Student's *t*-test, as indicated in parentheses in the text. We used GB-stat V6.0 software (Dynamic Microsystems) as a statistical program.

3. Results

3.1. Lipopolysaccharide increases anxiety-like behavior in male and female rats while maternal separation only affects females

In the elevated plus-maze (EPM), we observed that LPS was responsible for an increase in anxiety-related behavior. Specifically, the control+LPS and MS+LPS groups of male rats showed a significant decrease in the total time spent in the open arms (LPS: $F_{1,36} = 5.87$, $P < 0.05$) and in the percentage of open arm entries (LPS: $F_{1,36} = 11.98$, $P < 0.05$), compared with the control+vehicle group (Fig. 2a,b); no

MALES



FEMALES

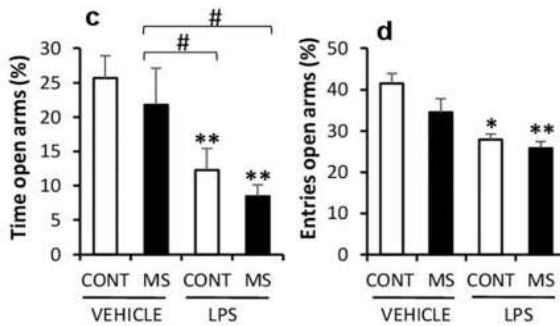
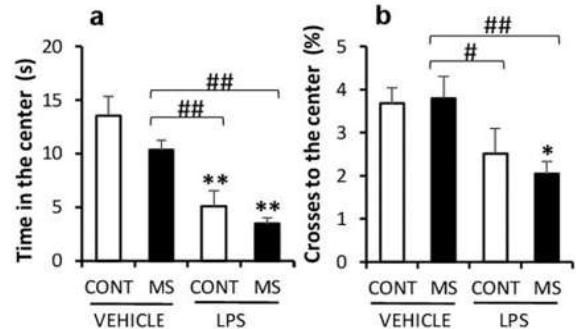


Fig. 2. Evaluation of the anxiety-related behavior in the elevated plus-maze. The control+LPS and MS+LPS groups of male rats presented a reduced percentage of time in the open arms (a) and of entries into the open arms (b). In female rats, LPS also reduced the percentage of time in the open arms (c) and of entries into the open arms (d). Two-way ANOVA, followed by Newman Keuls post hoc tests. Comparison against respective control+vehicle groups: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; comparison between the groups # $P < 0.05$, as depicted in the figure. Males, $n = 10$; females, $n = 8-11$ per treatment group. CONT, control; LPS, lipopolysaccharide; MS, maternal separation.

significant interaction was observed. In female rats, we observed a similar response to LPS treatment, as they displayed reduced exploration of the open arms of the maze. This was reflected in a significant decrease in the total time spent in the open arms (LPS: $F_{1,46} = 15.61$, $P < 0.001$), and a decreased percentage of entries in the open arms (LPS: $F_{1,35} = 12.77$, $P = 0.01$; Fig. 2c, d). These results indicate that there were no sex differences observed in this test.

In the open field test, we observed that LPS induced higher anxiety in male rats; this is reflected in the significant reduction in the time spent in the center (LPS: $F_{1,36} = 37.4$, $P < 0.001$) and in the number of crosses to the central area (LPS: $F_{1,36} = 10.6$, $P < 0.05$; Fig. 3a, b). The MS group showed a trend to reduce the time spent in the central area (MS: $F_{1,36} = 3.72$, $P = 0.06$) and the MS+LPS group also displayed reduced time ($P < 0.01$) and number of crosses ($P < 0.05$) in the center, according to post hoc tests. In females, both stressors exerted a significant increase in anxiety, since LPS and MS reduced the time spent in the central area (interaction: $F_{1,39} = 20.3$, $P < 0.001$) and the percentage of entrances they perform to the center ($F_{1,39} = 10.1$, $P < 0.05$; Fig. 3c, d), the combined stressors MS and LPS also increased anxiety. These results together suggest that females are more vulnerable than males to suffer alterations in anxiety-like behavior due to different types of challenges.

MALES



FEMALES

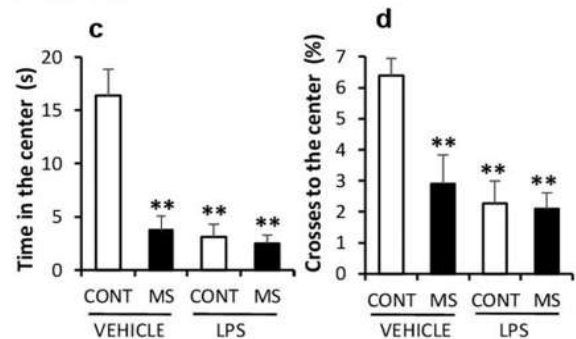


Fig. 3. Effects of MS and LPS on the anxiety-like behavior of adult rats in the open-field test. The control+LPS and MS+LPS groups of male rats displayed a short time in the center (a) and only the MS+LPS group presented a low number of crosses to the center (b) ($n = 10$ per treatment group). Female rats subjected to MS and/or LPS treatment displayed a shorter time in the center (c) and a lower percentage of crosses to the center, (d) ($n = 10$ per treatment group). Two-way ANOVA, followed by Newman Keuls post hoc tests. Comparison against respective control+vehicle groups: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; comparison between the groups # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ as depicted in the figure (males $n = 10$; females $n = 8-11$ per treatment group). CONT, control; LPS, lipopolysaccharide; MS, maternal separation.

3.2. Maternal separation, but not lipopolysaccharide, increased depression-like behavior in male and female rats

We observed that MS, but not LPS treatment, increased the floating time (MS: $F_{1,24} = 19.3$, $P < 0.001$) and decreased the latency to float (MS: $F_{1,24} = 20.4$, $P < 0.001$) in the forced swim test in males (Fig. 4a, b). A tendency for a significant interaction was observed in the latency to float ($F_{1,27} = 3.42$, $P = 0.07$) in male rats. Similarly, MS increases the floating time (MS: $F_{1,36} = 36.2$, $P < 0.001$) and the latency to float (MS: $F_{1,36} = 15.8$, $P < 0.001$) of the female rats, as shown in Fig. 4c, d.

3.3. Higher percentage of activated microglial cells in the CA3 and hilus areas of the hippocampus of male rats in response to all stressors

Maternal separation induced a mild increase in microglial cell density in the CA3 area, but this was only significant between the control+LPS and MS+LPS groups, as depicted in Fig. 5a (MS: $F_{1,28} = 7.36$, $P < 0.05$). By contrast, in the area of the hilus, we observed a decrease in the microglial density (according to post hoc tests) in response to all the stressors, alone or in combination, with LPS being the most significant factor (LPS: $F_{1,28} = 19.0$, $P < 0.001$; as well as the interaction MS \times LPS:

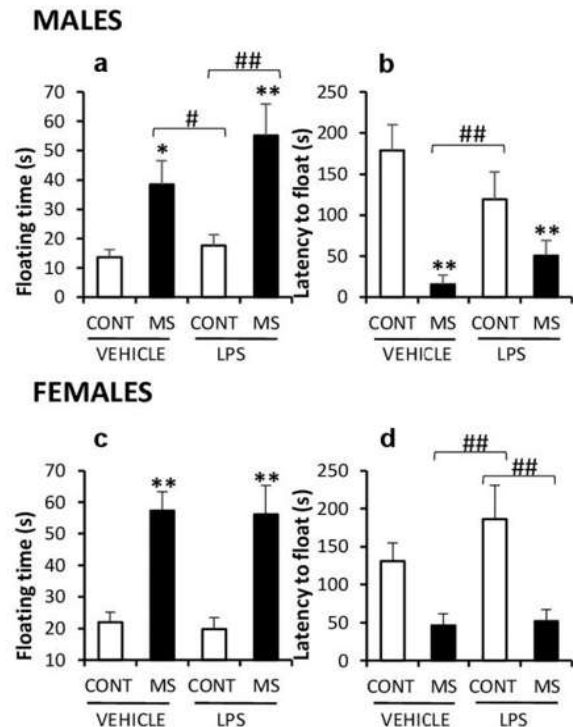


Fig. 4. Effects of MS and LPS on depressive-like behavior of adult rats in the forced swim test. The MS+vehicle and MS+LPS groups of males and females displayed a longer time floating (a, c) and shorter latency to float (b, d) (males $n = 7-8$ and females $n = 10$ per treatment group). Two-way ANOVA, followed by Newman Keuls post hoc tests. Comparison against respective control+vehicle groups: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; comparison between the groups # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ as depicted in the figure. CONT, control; LPS, lipopolysaccharide; MS, maternal separation.

$F_{1,31} = 15.2, P < 0.001$; Fig. 5c). In the CA3 zone (Fig. 5b), we observed an increased percentage of activated microglia in all the groups, where the Control+LPS group presented the highest percentage (LPS: $F_{1,28} = 66, P < 0.001$; interaction: $F_{1,31} = 34.8, P < 0.001$). Since the analyses with ANOVA showed significance of MS only in the post hoc tests, we performed separate statistics using Student's *t*-tests, which revealed significant differences between the control+vehicle and MS+vehicle groups ($P < 0.001$). A similar activation pattern was also observed in the hilus (MS: $F_{1,28} = 3.5, P = 0.06$; LPS: $F_{1,28} = 199, P < 0.001$; interaction: $F_{1,31} = 65.5, P < 0.001$, Fig. 5d). A separate statistical analysis using Student's *t*-test between the control+vehicle and MS+vehicle groups also confirmed a significant activation by MS ($P < 0.001$).

3.4. Higher percentage of activated microglial cells in the CA3 and hilus areas of the hippocampus of female rats in response to all stressors

While maternal separation did not affect total microglial density in the CA3 area of the female hippocampus (although with a trend to be significant MS: $F_{1,28} = 3.11, P = 0.08$), the LPS challenge resulted in a significant decrease (LPS: $F_{1,28} = 13.68, P < 0.001$), as depicted in Fig. 5e. Similarly, in the area of the hilus we observed a decrease in the microglial cell density in response to LPS (Fig. 5g), but not to MS (LPS: $F_{1,28} = 34.2, P < 0.001$). Here, the MS+LPS group had a milder decrease in microglial density ($P < 0.01$) compared to the control+LPS group. With respect to the activation of microglial cells, we observed in the CA3

zone (Fig. 5f), an increased percentage of activated microglia in all the groups, but the control+LPS group presented the highest percent rise (MS: $F_{1,28} = 10.5, P < 0.05$; LPS: $F_{1,28} = 42.8, P < 0.001$; and a tendency for a significant interaction: $F_{1,31} = 3.72, P = 0.06$). A similar activation pattern by all stressors was also observed in hilus (Fig. 5h) (MS: $F_{1,28} = 9.8, P < 0.05$; LPS: $F_{1,28} = 89.8, P < 0.001$; interaction: $F_{1,31} = 20.7, P < 0.001$).

To corroborate the morphological changes of microglial cells, we employed the Sholl analysis from ImageJ, (<https://imagej.nih.gov/ij/download>) and additionally measured the size of the microglial cells until of the hilus from all the groups. This analysis revealed an increase in the soma size of the microglial cells in response to most of the challenges, (LPS: $F_{1,96} = 144, p < 0.001$, interaction: $F_{1,99} = 38, p < 0.001$) and no differences between the sex (MS: $F_{1,96} = 3.25, p = 0.07$, LPS: $F_{1,96} = 130, p < 0.001$, interaction: $F_{1,99} = 23.3, p < 0.001$). In the females, the number of processes of the LPS group was reduced, while it was increased in the MS group (MS: $F_{1,96} = 48.6, p < 0.001$ LPS: $F_{1,96} = 39.3, p < 0.001$, interaction: $F_{1,99} = 8.6, p < 0.001$). In males, the number of processes was reduced in both the LPS and MS+LPS group (MS: $F_{1,96} = 24.8, p < 0.001$ LPS: $F_{1,96} = 67.6, p < 0.001$, interaction: $F_{1,99} = 10.6, p < 0.001$). (Complementary figure 7).

3.5. MS and LPS increase astrocytic density in the hilus and/or CA3 area of the hippocampus of male rats

The analysis with ANOVA showed significant differences in astrocytic density of CA3 by both MS and LPS, as well as a significant interaction. LPS treatment resulted in an increase in astrocytic density, while MS prevented it (group MS+LPS) as shown in Fig. 6a (MS: $F_{1,28} = 30.9, P < 0.001$; LPS: $F_{1,28} = 41.8, P < 0.001$; interaction: $F_{1,31} = 42.9, P < 0.001$). Treatment with MS induced a mild decrease in the number of processes (Fig. 6b; MS: $F_{1,16} = 15.3, P < 0.001$). Concerning the size of the soma, the LPS challenge significantly increased the size, whereas MS prevented the increase in size induced by LPS (Fig. 6c; LPS: $F_{1,96} = 39.92, P < 0.001$; interaction: $F_{1,99} = 12, P < 0.001$).

In the hilus, both MS and LPS challenges induced an increase in the total astroglial density. MS reduced the increase in astroglial density in the combined MS+LPS group, as depicted in Fig. 6d (MS: $F_{1,28} = 10.7, P < 0.05$; LPS: $F_{1,28} = 137.3, P < 0.001$; interaction: $F_{1,31} = 70.3, P < 0.001$). Sholl analysis of this area revealed a significant effect of LPS, reflected in an increased number of processes (Fig. 6e) and a tendency of MS to reduce the processes ($F_{1,16} = 3.5, P = 0.07$; LPS: $F_{1,16} = 11.2, P < 0.01$). The soma increased in size in response to both MS and LPS. However, LPS induced the largest soma size, whereas MS reduced this increase in response to LPS (Fig. 6f; LPS: $F_{1,96} = 83.4, P < 0.001$; interaction: $F_{1,99} = 36, P < 0.001$). A separate statistic using Student's *t*-test confirmed that MS exposure resulted in a mild increase in the soma ($P < 0.01$) compared with the control+vehicle group.

3.6. MS decreases astrocytic density in the hilus and CA3 area of the hippocampus of female rats

In contrast to males, in female rats, we found a decrease in the population of astrocytes produced by MS, but not LPS, in the CA3 (Fig. 6g; MS: $F_{1,27} = 52.4, P < 0.001$). MS showed a tendency to decrease the number of processes, but only LPS treatment induced a significant increase in astrocytic processes, as revealed by Sholl analysis (Fig. 6h; MS: $F_{1,16} = 3.4, P = 0.08$; LPS: $F_{1,16} = 4.9, P < 0.05$). LPS significantly increased the size of the soma, whereas MS reduced this response to LPS treatment (Fig. 6i; LPS: $F_{1,96} = 23, P < 0.001$; interaction: $F_{1,99} = 3.5, P = 0.06$).

In the hilus, we observed a decrease in the population of astrocytes by MS (Fig. 6j; MS: $F_{1,28} = 145, P < 0.001$; interaction: $F_{1,31} = 5.51, P < 0.05$). LPS, but not MS, increased the number of processes according to the Sholl analysis (Fig. 6k; LPS: $F_{1,16} = 48, P < 0.001$). Finally, the

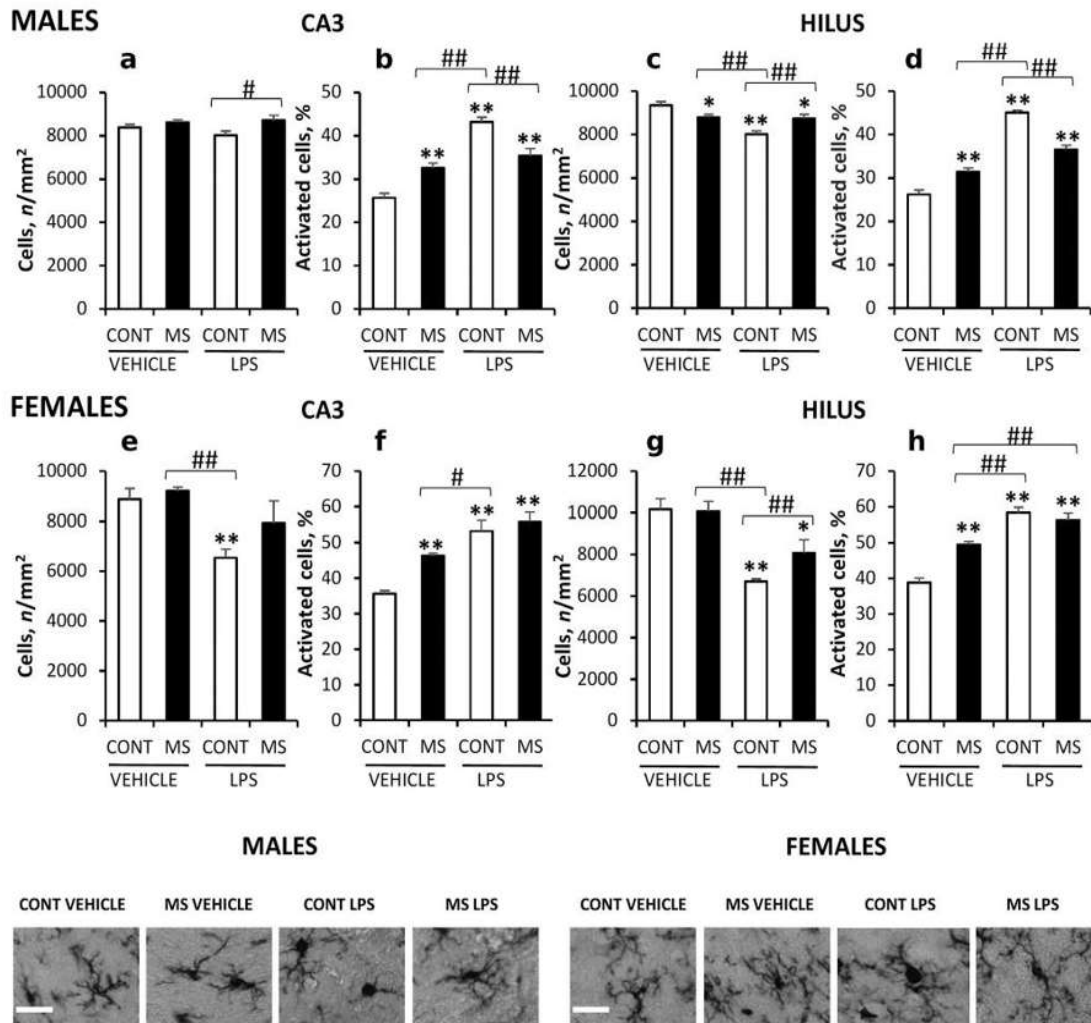


Fig. 5. Microglial cell changes in the CA3 area and the hilus of the hippocampus of male and female rats. In males, in the CA3 area, only the control+LPS group presented a mild decrease in microglial cell density (a), but the groups subjected to MS and/or LPS treatment presented an increased percentage of activated microglial cells (b). In the hilus area, all stressors (MS and/or LPS) induced a decrease in microglial density (c) and an increased percentage of activated microglia (d). However, the groups subjected to MS and/or LPS treatment presented an increased percentage of activated microglial cells (f). In the hilus, the control+LPS and MS+LPS groups presented a decreased population of microglial cells (g); groups subjected to MS and/or LPS treatment presented an increased percentage of activated microglia (h) ($n = 8$ per treatment group). Representative photomicrographs of microglial cells of the hilus area in males (i) and females (j). Two-way ANOVA, followed by Newman Keuls post hoc tests. Comparison against respective control+vehicle groups: $*P < 0.05$, $**P < 0.01$; comparison between the groups $\# P < 0.05$, $\#\# P < 0.01$ as depicted in the figure. Scale bar 10 μm . CONT, control; LPS, lipopolysaccharide; MS, maternal separation.

soma size was increased by the effect of both MS and LPS. LPS treatment induced a greater response than MS (Fig. 6l; LPS: $F_{1,96} = 99$, $P < 0.001$; interaction: $F_{1,99} = 42.1$, $P < 0.001$). A separate statistic using Student's t -test confirmed that MS exposure significantly increased the soma ($P < 0.01$) compared with the control+vehicle group.

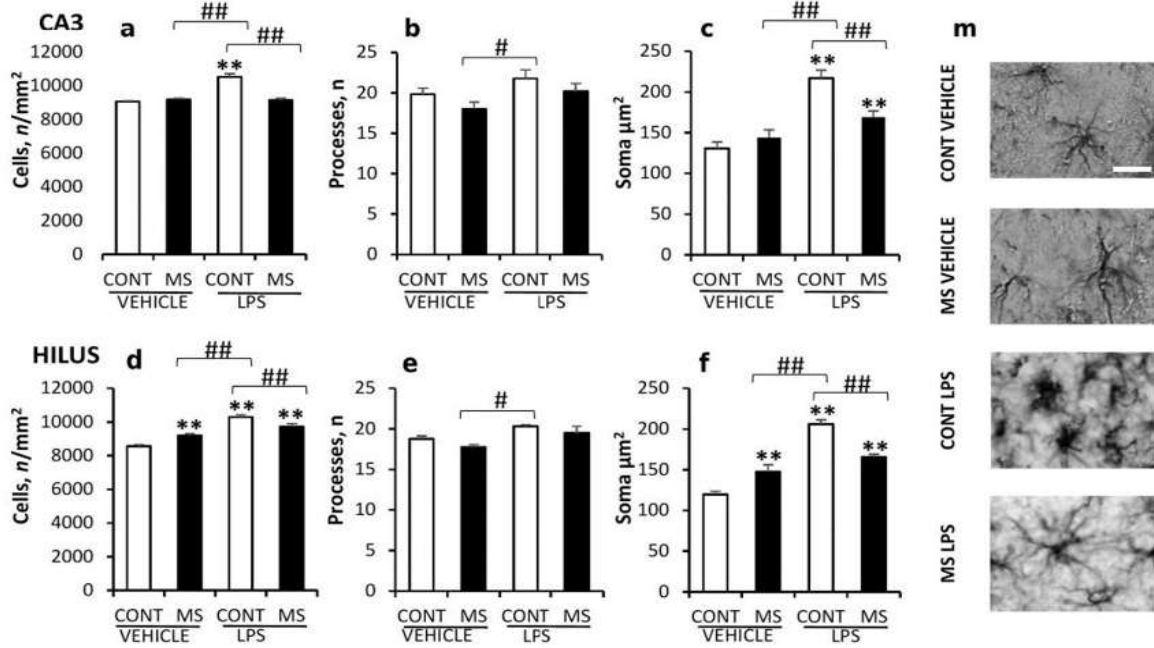
4. Discussion

We evaluated the long-term effects of ELS on emotional behavior and the glial cell response. Specifically, we investigated changes in the glial cells within the CA3 and hilus regions of male and female rat hippocampi. We used maternal separation (PN1–PN14) and/or LPS (via single injection at PN14) as stressors. Altogether, we observed that exposure to stressors in the neonatal period produced long-term effects on emotional

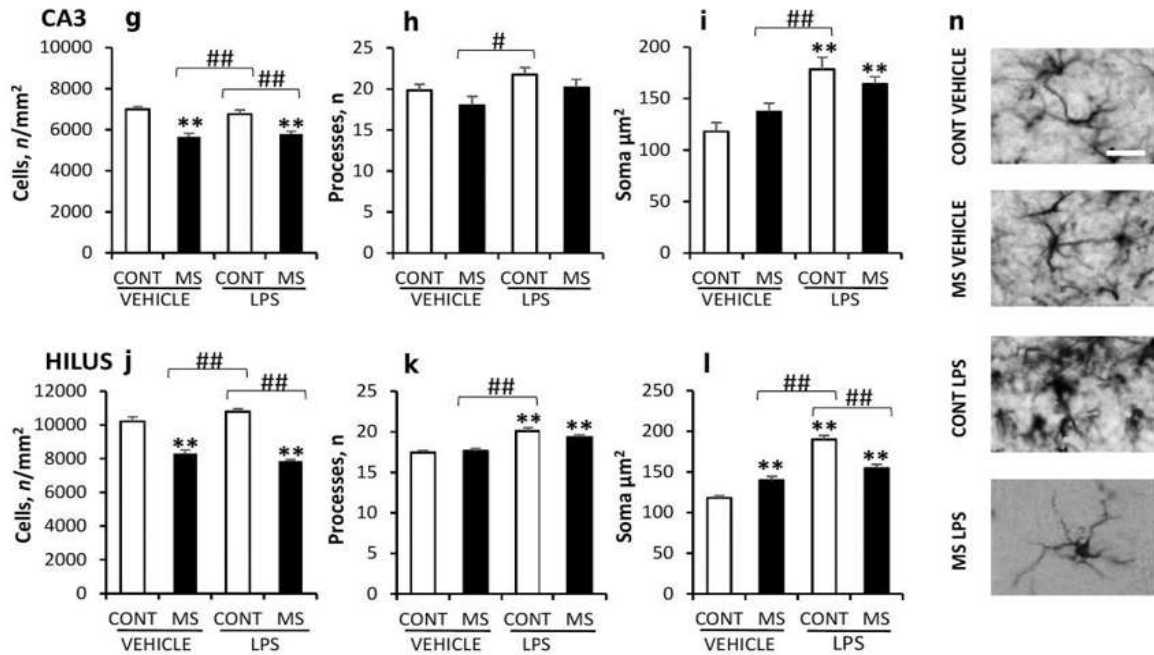
behavior, with the changes depending on the challenge and sex. This is accompanied with differences in activation of the neuroimmune system in the hippocampus.

We confirmed that LPS treatment increased anxiety-like behavior in both male and female rats. Our findings agree with several reports of neonatal LPS administration, independent of differences in the dose of LPS and/or the day of administration (Sominsky et al., 2013; Tishkina et al., 2016; Benmhammed et al., 2019). Effects of MS on anxiety-related behavior remain controversial. Many studies showed increased anxiety when males (Ryu et al., 2009) or male and female rats were screened in the EPM (Wigger and Neumann, 1999; Eiland and McEwen, 2012; De Lima et al., 2020). By contrast, other groups did not observe changes including ours (Lajud et al., 2012). Studies using OF to analyze anxiety have shown no effect in males (Shalev and Kafkafi, 2002), or males and

MALES



FEMALES



(caption on next page)

Fig. 6. Astrocytic cell density and Sholl analysis in the CA3 area and the hilus of the hippocampus of male and female rats. In males, in the CA3 area, only the control+LPS group increased the astrocytic cell density (a). This group presented a mild increase in the number of processes (b) and groups control+LPS and MS+LPS showed an increased size of the soma (c). In the Hilus area, the groups subjected to MS and/or LPS treatment presented an increased population of astrocytes (d), and an increase in the size of soma (f) but only the control+LPS group presented a mild increase in the number of processes (e) ($n = 8$ per treatment group). In female rats, in the CA3 area, MS+vehicle and MS+LPS presented a decrease in astrocytic density (g). The control+LPS group presented an increased number of processes (h) and both control+LPS and MS+LPS groups presented an increased size of the soma (i). In the hilus area, MS+vehicle and MS+LPS presented a decreased astrocytic cell density (j). Control+LPS and MS+LPS showed an increased number of processes (k) and all groups except control+vehicle presented an increased size of the soma (l) ($n = 8$ per treatment group). Representative photomicrographs of astrocytic cells of the hilus area in males (m) and females (j). Two-way ANOVA, followed by Newman Keuls post hoc tests. Comparison against respective control+vehicle groups: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; comparison between the groups # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ as depicted in the figure. Scale bar 10 μm . CONT, control; LPS, lipopolysaccharide; MS, maternal separation.

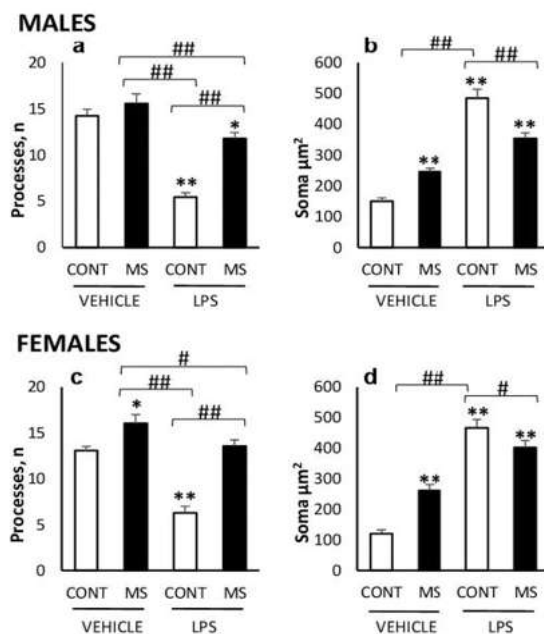


Fig. 7. (complementary). - Sholl analysis and soma size of microglial cells in the hilus of the hippocampus of male and female rats. The control+LPS and MS+LPS groups presented a decreased number of processes in male and female rats, but the MS+vehicle group showed an increase in the number of processes in females (a,c). All the groups presented an increased size of the microglial soma in both males and females (b,d). Comparison against respective control+vehicle groups: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; comparison between the groups # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ as depicted in the figure. CONT, control; LPS, lipopolysaccharide; MS, maternal separation.

females (Markostamou et al., 2016; Aya-Ramos et al., 2017). One study reported increased anxiety in males only (Melo et al., 2018). We found that only maternally separated females displayed anxious behaviors. We also confirmed the absence of MS-mediated effects in male rats. Thus, there appears to be a dimorphic anxiety response to MS. A similar study to ours that combined maternal deprivation and LPS found that male and female rats presented with higher anxiety levels than controls (Benmhammed et al., 2019). Our results confirmed this. However, the increase in anxiety we observed was due to the effects of LPS, rather than MS.

MS exposure induces a depressive state in adulthood. Specifically, MS has been proposed as a translational model of human depression (Belzung and Lemoine, 2011; Vetulani, 2013). Several studies have shown depressive-like behaviors in males with MS or in female adults (Martisova et al., 2012), and this seems to be more severe in middle-aged rats (Ruiz et al., 2018). Our results confirm these studies. By contrast,

very few studies have reported the incidence of depressive-like behaviors after neonatal LPS treatment in rodents using the forced swimming test (Tishkina et al., 2016; Berkiks et al., 2019). In our study, LPS failed to induce depressive-like behaviors in either sex. The combined exposure of maternal deprivation and LPS has been reported to increase depressive-like behavior in male and female Wistar rats (Benmhammed et al., 2019); our results agree with this report.

The hippocampus helps modulate emotional behaviors and regulate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (Herman et al., 2016). Although several reports associate microglial activation in the hippocampus and other areas with chronic stress in the adult (Calcina et al., 2016), few studies have documented the lasting changes in microglial cells after MS procedures. A single study reported increased immunoreactivity of microglial cells in CA3, but not in the CA1, of the hippocampus and the dorsal striatum and the nucleus accumbens of MS adult male rats (Banqueri et al., 2019). In our study, MS resulted in a higher percentage of activated microglial cells in the CA3 region and the hilus of both male and female adult rats, as observed with other chronic stress procedures (Calcina et al., 2016). Various studies in adult mice have investigated changes in microglial activation in response to LPS administration (O'Callaghan et al., 2012). Berkiks et al. (2019) reported increased activation of microglial cells in the hippocampus of adult male and female rats after neonatal LPS treatment. Accordingly, studies that injected LPS or enterobacteria (*E. coli*) into male rat pups also showed increased microglial activation within the hippocampus 24 h later (Schwarz and Bilbo, 2011) or in adulthood (Williamson et al., 2011). Our findings agree with these reports and demonstrate that neonatal LPS treatment resulted in a lasting increase in the number of activated microglia in the hippocampus of both male and female adult rats. Effects of combined MS and LPS resulted in an increased percentage of activated microglial cells in both CA3 and hilus in both sexes. However, in males, MS attenuates the activation induced by LPS, whereas in females this effect was not observed, suggesting a dimorphic response. The increase in microglial activation may disrupt normal brain functions, such as synaptic pruning, neural monitoring, neural response to damage, cell communication, and neurogenesis (Ekdahl, 2012). Such alterations are relevant to several psychopathologies including anxiety and depressive disorders. In our study, both MS and/or LPS challenges resulted in the activation of microglial cells in both hippocampal areas of males and females and was accompanied by changes in emotionality. However, the behavioral responses were selective depending on the insult suffered. Further, MS reduced the total microglial density in male but not in female hippocampi, suggesting a dimorphic response, but this was apparently not associated with the behavioral responses. This suggests that areas other than the hippocampus also contribute to the behavioral changes observed. Indeed, other studies have shown that MS affects other brain areas besides the hippocampus, such as the prefrontal cortex and striatal areas, increasing the activation of microglial cells (Banqueri et al., 2019). In adult male mice, LPS has been shown to activate microglial cells in several areas such as the cortex, hippocampus, thalamus, and caudate nucleus (Hoogland et al., 2018). As the brain areas of these studies are not all similar, it is difficult to associate which areas with activated microglia result specifically in increased anxiety or in depressive behavior. However, the hippocampus is a target area where microglial activation is consistently observed.

Very few groups have documented the effects of MS on hippocampal astrocytic density. Our study showed that astrocytic density increased in the male hippocampal hilus, but decreased in CA3 and hilus of females subjected to MS. Increases in soma size were observed in the hilus of adult males and females, independent of the astrocytic density. A decrease of astrocytes within the prefrontal cortex, striatal areas, and dorsal hippocampus in male and female adult rats subjected to MS was recently reported (Banqueri et al., 2019). An increase in GFAP-positive cells was shown in the hippocampus of male, but not female rats several days or weeks after maternal deprivation (Llorente et al., 2009; Réus et al., 2018). Together, these results indicate that astrocytic cells produce a dimorphic response to MS, which includes areas other than the hippocampus. The long-term effects of neonatal LPS on astrocytic populations have also been poorly documented. Berkikis et al. (2019) found increased astrocytic density in the dorsal hippocampi of male and female adult rats. Here, we confirmed increases in the astrocytic density of hippocampal CA3 and hilus of male rats in response to LPS, but not in that of females. Increases in soma size in response to LPS were associated with changes in astrocytic density in males but not in females, pointing to a dimorphic response. Altogether these changes in astrocytes may influence synaptic plasticity and neuronal communication, thereby contributing to an abnormal brain function. However, we found no correlation between astrocytic changes and behavioral outcomes.

The occurrence of infections is common in infants, regardless of the presence of ELS. Thus, we designed an animal model where the first insult programming the Central Nervous System would be stress exposure such as MS, and in the second insult, an immune challenge to mimic a severe infection. For this, we choose to inject LPS at PN14, the last day of MS. A previous study from our group showed that MS, LPS, or its combination resulted in maximal activation of microglial cells (Saavedra et al., 2017). Comparing that study with our present results, we find that some of the immediate changes remained, but others were recovered. To complement our study, we also analyzed the female neuroimmune system. This is the first study that allowed comparisons between immediate and long-term effects of ELS on glial cell response using the same animal models. Further, sex differences could be observed in glial cells—according to the hippocampal zone—in response to specific neonatal challenges. In general, all the neonatal challenges resulted in long-term increased activation of microglial cells, increases in the soma size of astrocytes, and were associated with changes in emotional behavior. However, the behavioral response is affected depending on the type of neonatal insult suffered. As mentioned above, MS and LPS affect several structures besides the hippocampus, increasing microglial activation, increasing or decreasing astrocytic density or inducing other neuronal changes, which could result in the behavioral differences described here.

Different hypotheses have been formulated to address the possibility that multiple hits during early life predispose an individual to disease later in life (cumulative stress), or that there is a mismatch between early and adult environments (Nederhof and Schmidt, 2012). The combination of two challenges during the neonatal period suggested an immediate addition of the individual responses, as previously reported (Saavedra et al., 2017), implying initial cumulative stress. Interestingly, the long-term effects observed here illustrate attenuation in some of the hippocampal glial cell responses (microglial activation and astrocytic changes), in males but not in females. This likely confers a higher vulnerability to the female brain to subsequent stressors. However, there was no correspondence with its behavioral responses as there was a cumulative effect of the stressors in both sexes. Thus, an individual's future adaptation toward hostile environments seems to depend partially on the response of the neuroimmune system to earlier stressors according to the sex of the individual and the amount of insults or stressors they were exposed to early in life.

We used two stressors of a different nature. LPS acts by primarily activating monocytes/macrophages through TLR4 receptors (Li et al., 2019), whereas MS activates monocytes via the sympathetic nervous

system (Wohleb et al., 2015). Activated monocytes enter the brain and interact with endothelial cells and microglia, activating inflammatory pathways.

It is likely that the greater activation of glial cells is accompanied by greater production of pro-inflammatory cytokines. In general, this would transform the nervous system into a pro-inflammatory state, consequently affecting the emotional response. In this regard, our previous studies showed that ELS immediately induced a pro-inflammatory state in the hippocampus (Roque et al., 2016, Saavedra et al., 2017). This state was greatly increased in response to subsequent exposure to stress (Roque et al., 2016). Thus, the persistence of a larger population of activated cells would translate into higher basal production of pro-inflammatory cytokines and an exacerbated inflammatory response to new stress events.

In conclusion, the behavioral response to early life stressors depends on the type of challenge as well as sex. Further, all challenges increased the activation of glial cells in the hippocampus over the long term; however, the specific response of the glial cells depends on the cell type (microglia, astrocytes) in the hippocampal zone and the sex of the individual. The glial responses to a double insult might be part of an adaptive response mechanism. The glial and behavioral long-term responses to different ELS may allow a better understanding of the development of psychiatric illnesses.

Funding Sources

This work was supported by grants to L.T. from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (grant number CB 2014-243419-2014, FIS/IMSS/PROT/1386) and Instituto Mexicano del Seguro social (IMSS) (grant number FIS/IMSS/PROT/PRI0/19/109). The CONACyT and the IMSS had no further role in the study design, in the collection, analysis, and interpretation of the data, in the writing of this report, or in the decision to submit this paper for publication.

Conflicts of interest

All authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

We thank Dr. Esperanza Meléndez (Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo) for providing the camera lucida used to perform the Sholl analysis. We also thank Mr. Edel Pineda López for his assistance in the animal facilities. L.M.S. received fellowships from CONACyT (No. 461485) and IMSS. We would like to thank Editage (www.editage.com) for English language editing.

References

- Abbnk, M.R., van Deijk, A.F., Heine, V.M., Verheijen, M.H., Korosi, A., 2019. The involvement of astrocytes in early-life adversity induced programming of the brain. *Glia* 67 (9), 1637–1653. <https://doi.org/10.1002/glia.23625>.
- Aya-Ramos, L., Contreras-Vargas, C., Rico, J.L., Dueñas, Z., 2017. Early maternal separation induces preference for sucrose and aspartame associated with increased blood glucose and hyperactivity. *Food Funct.* 8 (7), 2592–2600. <https://doi.org/10.1039/c7fo00408g>.
- Banqueri, M., Méndez, M., Gómez-Lázaro, E., Arias, J.L., 2019. Early life stress by repeated maternal separation induces long-term neuroinflammatory response in glial cells of male rats. *Stress* 22 (5), 563–570. <https://doi.org/10.1080/10253890.2019.1604666>.
- Bartsch, T., Wulff, P., 2015. The hippocampus in aging and disease: from plasticity to vulnerability. *Nov 19 Neuroscience* 309, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.084>.
- Belzung, C., Lemoine, M., 2011. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biol. Mood Anxiety Disord.* 1, 9. <https://doi.org/10.1186/2045-5300-1-9>.
- Benhammad, H., El Hayek, S., Nassiri, A., Bousalham, R., Mesfoui, A., Ouichou, A., El Hessni, A., 2019. Effects of lipopolysaccharide administration and maternal deprivation on anxiety and depressive symptoms in male and female Wistar rats. *Behav. Brain Res* 362, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.01.005>.

- Berkils, I., Garcia-Segura, L.M., Nassiri, A., Mesfioui, A., Ouichou, A., Boulbaroud, S., Bahbiti, Y., Lopez-Rodriguez, A.B., Hasnaoui, E., El Hessni, A., 2019. The sex differences of the behavior response to early life immune stimulation: microglia and astrocytes involvement. *Physiol. Behav.* 199, 386–394. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.11.037>.
- Bilbo, S.D., Schwarz, J.M., 2009. Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system. *Front. Behav. Neurosci.* 3 (14), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2009.0014.2009>.
- Calcina, M.A., Bonsall, D.R., Bloomfield, P.S., Selvaraj, S., Baricello, T., Howes, O.D., 2016. Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness. *Psychopharmacology* 233 (9), 1637–1650. <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4218-9>.
- Dantzer, R., O'Connor, J.C., Freund, G.G., Johnson, R.W., Kelley, K.W., 2008. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 9 (1), 46–56. <https://doi.org/10.1038/nrn2297>.
- De Lima, R.M.S., Dos Santos, Bento, L.V., di Marcello, V.L.M., Barauna, V.G., Bittencourt, A.S., Dalmaiz, C., de Vasconcelos, B.A.P.S., 2020. Early life stress and the programming of eating behavior and anxiety: sex-specific relationships with serotonergic activity and hypothalamic neuropeptides. *Behav. Brain Res.* 379, 112399. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112399>.
- Diz-Chaves, Y., Pernia, O., Carro, R., Garcia-Segura, L.M., 2012. Prenatal stress causes alterations in the morphology of microglia and the inflammatory response of the hippocampus of adult female mice. *J. Neuroinflamm.* 9, 580. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-71>.
- Eiland, L., McEwen, B.S., 2012. Early life stress followed by subsequent adult chronic stress potentiates anxiety and blunts hippocampal structural remodeling. *Hippocampus* 22 (1), 82–91. <https://doi.org/10.1002/hipo.20862>.
- Ekdahl, C.T., 2012. Microglial activation - tuning and pruning adult neurogenesis. *Front. Pharmacol.* 3, 41. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00041>.
- Gilbert, R., Widom, C.S., Browne, K., Ferguson, D., Webb, E., Janson, S., 2009. Burden and consequences of child maltreatment in high-income countries. *Lancet* 373, 68–81. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61706-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61706-7).
- Heim, C., Nemeroff, C.B., 2002. Neurobiology of early life stress: clinical studies (<https://doi.org/10.1016/j.scpn.2002.33127>). *Semin. Clin. Neuroendocrinol.* 7 (2), 147–159. <https://doi.org/10.1053/scpn.2002.33127>.
- 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>.
- Hoogland, I.C.M., Westhoff, D., Engelen-Lee, J.Y., Melief, J., Valls Serón, M., Houben-Weerts, J.H.M.P., Huitinga, L., van Westerloo, D.J., van der Poll, T., van Gool, W.A., van de Beek, D., 2018. Microglial activation after systemic stimulation with lipopolysaccharide and *Escherichia coli*. *Front. Cell Neurosci.* 12, 110. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00110>.
- Kaufman, J., Charney, D., 2001. Effects of early stress on brain structure and function: implications for understanding the relationship between child maltreatment and depression. *Dev. Psychopathol.* 13, 451–471. <https://doi.org/10.1017/S0954579401003030>.
- Lajud, N., Roque, A., Cajero, M., Gutiérrez-Ospina, G., Torner, L., 2012. Periodic maternal separation decreases hippocampal neurogenesis without affecting basal corticosterone during the stress hyporesponsive period, but alters HPA axis and coping behavior in adulthood. *Psychoneuroendocrinology* 37 (3), 410–420. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.07.011>.
- Li, P., Wu, Y.H., Zhu, Y.T., Li, M.X., Pei, H.H., 2019. Requirement of Rab21 in LPS-induced TLR4 signaling and pro-inflammatory responses in macrophages and monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 508 (1), 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.11.074>.
- Llorente, R., Gallardo, M.L.P., Berzal, A.L., Prada, C., Garcia Segura, L.M., Viveros, M.A.P., 2009. Early maternal deprivation in rats induces gender-dependent effects on developing hippocampal and cerebellar cells. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27 (3), 233–241. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2009.01.002>.
- Lucassen, P.J., Pruessner, J., Sousa, N., Almeida, O.F., Van Dam, A.M., Rajkowska, G., Swaab, D.F., Czeh, B., 2014. Neuropathology of stress. *Acta Neuropathol.* 127 (1), 109–135. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1223-5>.
- Lupien, S.J., McEwen, B.S., Gunnar, M.R., Heim, C., 2009. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat. Rev. Neurosci.* 10 (6), 434–445. <https://doi.org/10.1038/nrn2639>.
- Markostamou, I., Ioannidis, A., Dandi, E., Mandyla, M.A., Nousiopolou, E., Simeonidou, C., Spandou, E., Tata, D.A., 2016. Maternal separation prior to neonatal hypoxia-ischemia: impact on emotional aspects of behavior and markers of synaptic plasticity in hippocampus. *Int. J. Dev. Neurosci.* 52, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.04.002>.
- Martisova, E., Solas, M., Horrillo, I., Ortega, J.E., Meana, J.J., Tordera, R.M., Ramirez, 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>.
- McEwen, B.S., Stress, adaptation, and disease, 1998. Allostasis and allostatic load. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 840, 33–44. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09546.x>.
- Melo, C., Vizin, R.C.L., Silva, U., N., Ishikawa, D.T., Echeverry, M.B., Carretiero, D.C., Almeida, M.C., 2018. Early maternal separation promotes alterations in the thermoregulatory profile of adult Wistar rats. *J. Therm. Biol.* 78, 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.09.013>.
- Nederhof, E., Schmidt, M.V., 2012. Mismatch or cumulative stress: toward an integrated hypothesis of programming effects. *Physiol. Behav.* 106 (5), 691–700. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.12.008>.
- O'Callaghan, E.K., Anderson, S.T., Moynagh, P.N., Coogan, A.N., 2012. Long-lasting effects of sepsis on circadian rhythms in the mouse. *PLoS One* 7 (10), e47087. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047087>.
- Pluciński, M.M., Ngonghala, C.N., Getz, W.M., Bonds, M.H., 2013. Clusters of poverty and disease emerge from feedbacks on an epidemiological network. *J. R. Soc. Interface* 10 (80), 20120656. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0656>.
- Rajkowska, G., Miguel-Hidalgo, J.J., 2007. Gliogenesis and glial pathology in depression. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 6 (3), 219–233. <https://doi.org/10.2174/187152707780619326>.
- Réus, G.Z., Silva, R.H., Moura, A.B., Presa, J.F., Abelaira, H.M., Abatti, M., Vieira, A., Pescador, B., Michels, M., Ignácio, Z.M., Dal-Pizzol, F., Quevedo, J., 2018. Early maternal deprivation induces microglial activation, alters glial fibrillary acidic protein immunoreactivity and indoleamine 2,3-dioxygenase during the development of offspring rats. *Mol. Neurobiol.* 10, 1096–1108. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1161-2>.
- Roque, A., Ochoa-Zarzosa, A., Torner, L., 2016. Maternal separation activates microglial cells and induces an inflammatory response in the hippocampus of male rat pups, independently of hypothalamic and peripheral cytokine levels. *Brain Behav. Immun.* 55, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.jbbi.2015.09.017>.
- Ruiz, R., Roque, A., Pineda, E., Licoña-Limón, P., Valdez-Alarcón, J.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>.
- 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 Res.* 1295, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.08.006>.
- Saavedra, L.M., Fenton-Navarro, B., Torner, L., 2017. Early life stress activates glial cells in the hippocampus but attenuates cytokine secretion in response to an immune challenge in rat pups. *Neuroimmunomodulation* 24 (4–5), 242–255. <https://doi.org/10.1159/000485383>.
- Salazar, A., Gonzalez-Rivera, B.L., Redus, L., Parrott, J.M., O'Connor, J.C., 2012. Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates anhedonia and anxiety-like behaviors caused by peripheral lipopolysaccharide immune challenge. *Horm. Behav.* 62 (3), 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.03.010>.
- Schwarz, J.M., Bilbo, S.D., 2011. LPS elicits a much larger and broader inflammatory response than *Escherichia coli* infection within the hippocampus of neonatal rats. *Neurosci. Lett.* 497 (2), 110–115.
- Shalev, U., Kafkafi, N., 2002. Repeated maternal separation does not alter sucrose-reinforced and open-field behaviors. *Pharm. Biochem. Behav.* 73 (1), 115–122. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(02\)00756-6](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(02)00756-6).
- Sominsky, L., Fuller, E.A., Bondarenko, E., Ong, L.K., Averell, L., Nalivaiko, E., Dunkley, P.R., Dickson, P.W., Hodgson, D.M., 2013. Functional programming of the autonomic nervous system by early life immune exposure: implications for anxiety. *PLoS One* 8 (3), e57700. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057700>.
- Tishkina, A., Stepanichev, M., Kudryashova, I., Freiman, S., Onufriev, M., Lazareva, N., Gulyaeva, N., 2016. Neonatal proinflammatory challenge in male Wistar rats: effects on behavior, synaptic plasticity, and adrenocortical stress response. *Behav. Brain Res.* 304, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.02.001>.
- Vetulani, J., 2013. Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition. *Pharm. Rep.* 65 (6), 1451–1461. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(13\)71505-6](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(13)71505-6).
- Wigger, A., Neumann, I.D., 1999. Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. *Physiol. Behav.* 66 (2), 293–302. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00300-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00300-X).
- Williamson, L.L., Sholar, P.W., Mistry, R.S., Smith, S.H., Bilbo, S.D., 2011. Microglia and memory: modulation by early-life infection. *J. Neurosci.* 31 (43), 15511–15521. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3688-11.2011>.
- Wohleb, E.S., McKim, D.B., Sheridan, J.F., Godbout, J.P., 2015. Monocyte trafficking to the brain with stress and inflammation: a novel axis of immune-to-brain communication that influences mood and behavior. *Front. Neurosci.* 8, 447. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00447>.
- Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates (No. WHO/MSD/MER/2017.2), 2017. World Health Organization. https://www.who.int/mental_health/management/depression/prevalence_global_health_estimates/en/.
- Yirmiya, R., Rimmerman, N., Reshef, R., 2015. Depression as a microglial disease. *Trends Neurosci.* 38 (10), 637–658. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.08.001>.

10. CAPÍTULO II

Evaluation of pro-inflammatory (TNF- α , IL-1 β and IL-6) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines in hippocampi of adult male and female rats after different neonatal stressors.

Evaluación de las citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) y anti-inflamatorias (IL-10) en hipocampos de ratas adultas macho y hembra después de diferentes estresores neonatales.

10.1. RESUMEN

El proceso inflamatorio generado por la exposición a estrés en etapas tempranas de la vida e infecciones severas se caracteriza por una compleja liberación en cadena de diferentes mediadores celulares, tales como las citocinas que incrementan el riesgo de desarrollar enfermedades psiquiátricas en la edad adulta. Comparamos los efectos a largo plazo de los retos inmune y estrés neonatal, únicos o combinados sobre la expresión de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en el hipocampo. Se asignaron aleatoriamente ratas machos Sprague Dawley bajo cuatro condiciones: (1) control + vehículo; (2) separación materna (SM, 3 h / día en los días postnatales [PN] 1-14) + vehículo; (3) control + lipopolisacárido (LPS, 0,5 mg / kg, PN14); (4) SM + LPS. La evaluación de la expresión de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias se llevó a cabo al PN140; en términos biológicos ningún reto solo o combinado modificó la expresión de TNF - α en estado basal y estrés. La SM incrementó la expresión de IL-1 β en condiciones basales; sin embargo, este incremento fue atenuado por el LPS. Por otro lado, en condiciones de estrés los grupos CONT + VEH, CONT + LPS y SM + VEH mostraron un incremento significativo en la expresión de esta citocina; la máxima expresión fue originada por la SM y atenuada en conjunto por el LPS. La expresión de IL-10 se incrementó en el estado basal únicamente en el grupo SM + VEH, mientras en condiciones de estrés los grupos CONT + VEH y SM + VEH presentaron una mayor expresión. Estos resultados indican que la expresión de citocinas pro-inflamatorias y antiinflamatorias permanecen elevadas por un largo periodo de tiempo, sin

embargo, el sistema puede reaccionar de una manera más activa frente a cada estresor agudo que se presente demostrando una programación del sistema.

Palabras clave:

Separación materna, Lipopolisacárido, Citocinas, Pro-inflamatorias, Anti-inflamatorias

10.2. INTRODUCCIÓN CAPÍTULO II

El estrés que se sufre en etapas tempranas de la vida (ELS) está asociado con un incremento de citocinas de tipo pro-inflamatorio de manera inmediata (Roque et al., 2016, Saavedra et al., 2017). Se conoce que ELS involucra a los sistemas endocrino e inmune (Gdek-Michalska, y Bugajski, 2010). Las numerosas interacciones que existen entre las células de los sistemas nervioso, endocrino e inmune han sido comparadas con una “red”. Ese entrecruzamiento de señales puede explicar que un exceso en la producción de algunas citocinas por parte de las células del sistema inmune sea estimulante para células de la glía (Brown et al., 1994). Las citocinas son las moléculas moduladoras e inductoras que utilizan las células del sistema inmune para comunicarse entre sí, por lo general tienen funciones pleiotrópicas. El sistema neuroinmune está conformado por células de la glía especialmente microglía y astrocitos los cuales durante el periodo perinatal son sensibles a ELS y responden incrementando los niveles de citocinas pro-inflamatorias (Calcina et al., 2016). Las células microgliales participan en los procesos inflamatorios del sistema nervioso incrementando mediadores inflamatorios como las citocinas, (IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10) entre otras (Calcina et al., 2016). El sistema nervioso central expresa citocinas de forma constitutiva. Las citocinas ejercen acciones como factores neurotróficos que promueven la proliferación y diferenciación celular. Sin embargo, también se ha observado que modulan la respuesta vascular de las reacciones inflamatorias. Investigaciones previas han señalado que la producción excesiva de moléculas pro-inflamatorias destinadas a la defensa o la reparación de un tejido dañado, por lo general se acompaña de cambios importantes en la conducta sin que haya un compromiso aparente del sistema nervioso central (Dantzer, 2001). Se ha descrito que el estrés crónico incrementa las citocinas de tipo pro-inflamatorio las cuales se asocian con varias alteraciones bioquímicas en algunas regiones del cerebro y estas elevaciones se les ha relacionado con síntomas depresivos (Peng y Wang et al., 2013). En este estudio evaluamos la expresión de citocinas de tipo pro-inflamatorio (IL-1 β , TNF- α , IL-6) y anti-inflamatorio (IL-10) en el hipocampo de ratas macho adultas sometidas a SM y a LPS en condiciones basales y posteriores a un evento de estrés agudo durante la etapa adulta.

10.3. MATERIAL Y MÉTODOS

10.3.1. EXTRACCIÓN DE RNA DE TEJIDO

Los cerebros de las ratas de todos los grupos en condiciones basales se obtuvieron de manera inmediata a los 140 días en machos. En todos los grupos en condiciones de estrés, las ratas fueron sometidas a la prueba de nado forzado (como estresor agudo) y sacrificadas a las 3 h posteriores a la prueba. Se extrajo el cerebro y se disecó el hipocampo, se colocó en tubos Eppendorf con Trizol (Invitrogen) y se congeló a -20 °C para posteriormente ser procesado. La extracción del RNA se llevó a cabo con Trizol de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante, posteriormente se analizó mediante un espectrofotómetro (Varioskan) para determinar su integridad y pureza.

10.3.2. SÍNTESIS DE cDNA

Se utilizó 1 µg de la muestra de RNA, con 1 µL de buffer de DNasa I 10 x (Invitrogen) con DEPC 0.1% (agua tratada con dietil pirocarbonato) en tubos libres de RNAsas. Se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente, se inactivó la DNasa I agregando 1 µL de solución EDTA 25mM (Invitrogen) y se cuantificó el mRNA. En un nuevo tubo se agregó 1 µg de mRNA, 1 µL de oligo dT 12-18 (500 µg/ mL) 1 µg de dNTP MIX 10 mM agua libre de RNAsas, y se llevó a un volumen final de 20 µL, se agregó 4 µL de First-strand buffer 5X (Invitrogen), 2 µL de DTT 0.1M, (Invitrogen) y 1 µL de RNasa out 40 U/µL (Invitrogen), posteriormente se adicionó 1ul de M-MLV RT 200 U (Invitrogen) y se incubó 50 min a 37 °C, se inactivó por calor a 70 °C por 15 minutos. Finalmente se verificó la pureza y cantidad del cDNA mediante espectrofotómetro (Varioskan).

10.3.3. PCR PUNTO FINAL

Las secuencias de los oligonucleótidos a utilizar fueron diseñadas en trabajos previos de nuestro laboratorio (Roque et al., 2016), las cuales nuevamente se validaron por medio de la técnica de PCR punto final, para la cual se utilizaron; 2 μ L de buffer PCR 10x, 2 μ L de dNTPs 2 mM, 0.6 μ L de cloruro de magnesio 50 mM, 1 μ L de oligo directo (10 pM/ μ L), 1 μ L de oligo inverso (10 pM/ μ L), 1 μ L de Taq polimerasa, 1 μ L de cDNA, se llevó a 20 μ L. La mezcla se colocó en un termociclador de gradiente de temperaturas (Thermo), donde la temperatura de desnaturalización fue de 95 °C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos con 15 s de desnaturalización a 94 °C; 30 s de alineamiento a 59 °C para IL 6 e IL-10, 60 °C para IL-1 β y GAPDH, y 62 °C para TNF- α , y 30 segundos de extensión a 72 °C seguidos de 7 minutos a 72 °C y enfriamiento a 4 °C. Finalmente se verificó que el producto de amplificación correspondiera con el tamaño esperado, en el gel de agarosa al 1.5%.

10.3.4. PCR TIEMPO REAL

Se utilizaron 500 ng de cDNA, 5 μ L de Veriquest Fast Sybr Green Master mix (USB Affymetrix Inc.) 1 μ L de oligo directo (10 pM/ μ L) 1 μ L de oligo inverso (10 pM/ μ L), y 0.2 μ L de agua grado biología molecular, se obtuvo un volumen final de 10 μ L por reacción, se utilizó un termociclador tiempo real (Bio Rad CFX96). La temperatura inicial de desnaturalización fue de 95 °C, durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos con 15 s de desnaturalización a 94 °C; 30 s de alineamiento a 59 °C para IL 6 e IL-10, 60 °C para IL 1 β y GAPDH, y 62 °C para TNF- α , y 30 segundos de extensión a 72 °C seguidos de 7 minutos a 72 °C y enfriamiento a 4 °C se normalizaron los datos y se analizaron por el método delta-delta CT. El gen endógeno utilizado fue GAPDH, se analizaron los resultados mediante las pruebas estadísticas ANOVA de dos vías y mediante la prueba post hoc de Newman-Keuls, en su caso, se realizaron duplicados de cada muestra. Las secuencias de oligonucleótidos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1.- Secuencias de oligonucleótidos. Temperatura media y producto de amplificación.

GEN	SECUENCIA 5'-3'	TM	Producto de amplificación (pb)
TNF - α	Directo: TGGCGTGTTTCATCGTTCTCTACC Reverso: CCCGCAATCCAGGCCACTACTT	62 C°	215
IL-1 β	Directo: TGAGGCTGACAGACCCCAAAAGAT Reverso: GCTCCACGGGCAAGACATAGGTAG	60 C°	181
IL-6	Directo: AGCCACTGCCTTCCCTACTTCA Reverso: GCCATTGCACAACCTCTTTTCTCA	59 C°	154
IL-10	Directo: TGCTACGAGGTGGGCTACG Indirecto: TGCAGTCCAGTAGATGCCGGG	59 C°	205
GAPDH	Directo: ATCACTGCCACCCAGAAGAC Indirecto: GCACGTCAGATCCACAACAG	60 C°	201

10.4. RESULTADOS

10.4.10. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TNF- α EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHO ADULTAS

En la figura 4 no se encontraron diferencias significativas en la expresión de TNF- α entre los grupos CONT VEH BASAL vs CONT VEH ESTRESADO (a). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos en condiciones basales (b). En los animales sometidos a un evento de estrés agudo en la etapa adulta (nado forzado), el grupo SM VEH fue el único donde se observó un incremento en la expresión de TNF- α *P<0.05 vs CONT VEH (c).

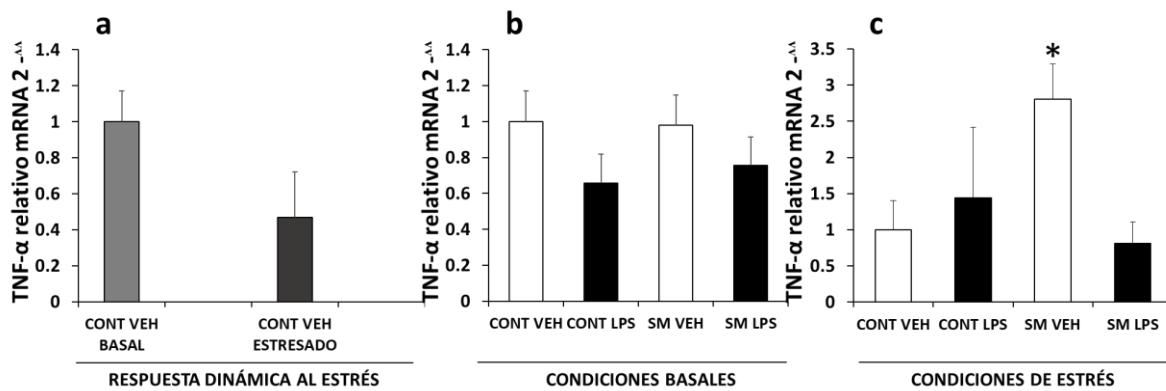


Figura 4.- Respuesta dinámica al estrés de TNF- α en el hipocampo de ratas macho adulto en condiciones basales y de estrés. (a) Muestra la expresión de TNF- α en los grupos CONT VEH BASAL vs CONT VEH ESTRESADO, no se observan diferencias significativas. **(b)** Muestra la expresión de TNF- α en condiciones basales de los diferentes grupos, no se observaron diferencias significativas. **(c)** Muestra la expresión de TNF- α en animales sometidos a un episodio de estrés agudo (nado forzado) en la etapa adulta. SM VEH mostró un incremento en la expresión de TNF- α . * P < 0.05 respecto a CONT VEH. N= 8 animales/grupo. Cada muestra se analizó por duplicado.

10.4.2. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE IL-1 β EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHO ADULTAS

En la figura 5 se realizó una comparación entre los grupos CONT VEH BASAL vs CONT VEH ESTRESADO, se observó un incremento en la expresión de IL-1 β en los animales sometidos al estresor $**P < 0.01$ (a). La expresión de IL-1 β en condiciones basales se incrementó únicamente en el grupo SM VEH, comparado contra su respectivo control $**P < 0.01$ (b). Los animales sometidos a un evento de estrés agudo en la etapa adulta únicamente el grupo SM VEH mostró un incremento en la expresión de IL-1 β $*P < 0.05$ (c).

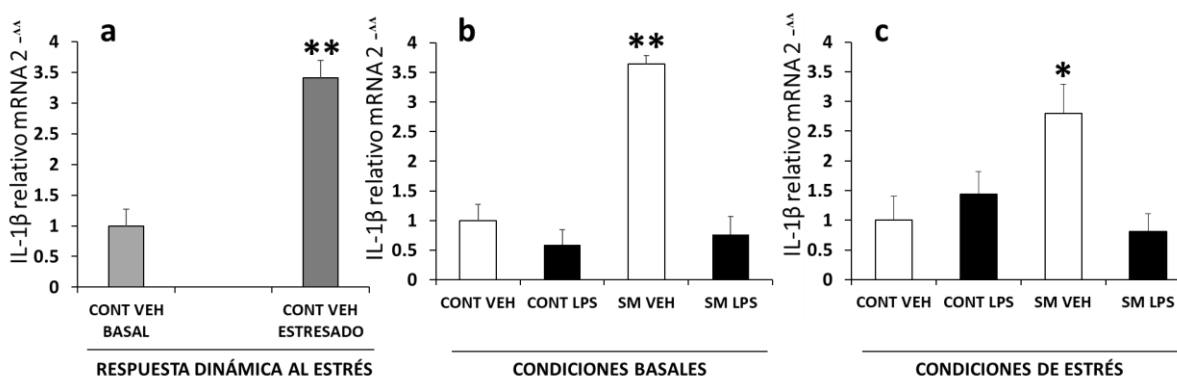


Figura 5. Respuesta dinámica al estrés de IL-1 β en el hipocampo de ratas macho adulto en condiciones basales y de estrés. (a) Muestra la expresión de IL-1 β en los grupos CONT VEH BASAL vs CONT VEH ESTRESADO, el grupo CONT VEH ESTRESADO muestra un incremento de la expresión de IL-1 β significativo $** P < 0.01$. (b) Muestra la expresión de IL-1 β en condiciones basales de los diferentes grupos, El grupo SM VEH mostró un incremento significativo respecto al CONT VEH $** P < 0.01$ (c) Muestra la expresión de IL-1 β en animales sometidos a un episodio de estrés agudo (nado forzado) en la etapa adulta. SM VEH mostró un incremento en la expresión de IL-1 β $* P < 0.05$ respecto a CONT VEH. N= 8 animales/grupo. Cada muestra se analizó por duplicado.

10.4.3. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE IL-6 EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHO ADULTAS

En la figura 6 se realizó una comparación entre los grupos CONT VEH BASAL vs CONT VEH ESTRESADO, se observó un incremento en la expresión de IL-6 en los animales sometidos al estresor $***P < 0.001$ (a). La expresión de IL-6 en condiciones basales se incrementó únicamente en el grupo SM VEH, comparado contra su respectivo control $*P < 0.05$ (b). Los animales sometidos a un evento de estrés agudo en la etapa adulta únicamente el grupo SM VEH mostró un incremento en la expresión de IL-6 $***P < 0.001$ (c).

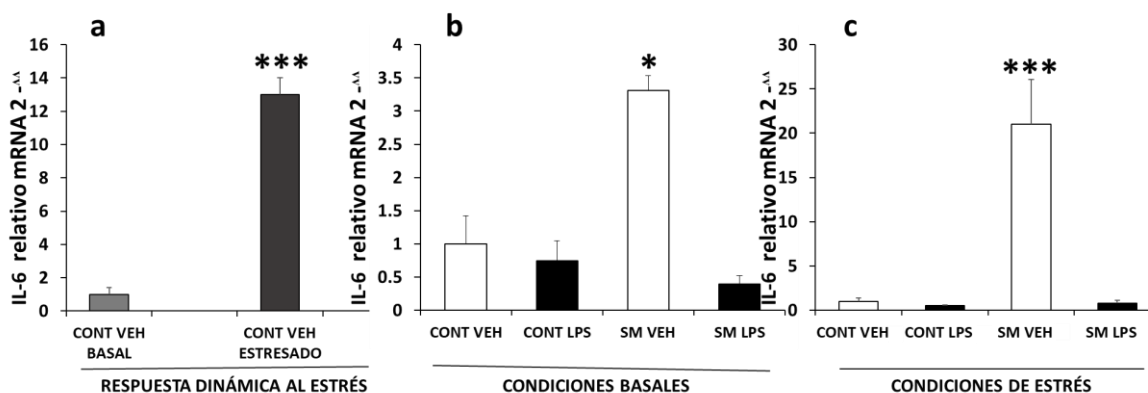


Figura 6.- Respuesta dinámica al estrés de IL-6 en el hipocampo de ratas macho adulto en condiciones basales y de estrés. (a) Muestra la expresión de IL-6 en los grupos CONT VEH BASAL vs CONT VEH ESTRESADO, el grupo CONT VEH ESTRESADO mostró un incremento de la expresión de IL-6 significativo $*** P < 0.001$. (b) Muestra la expresión de IL-6 en condiciones basales de los diferentes grupos, el grupo SM VEH mostró un incremento significativo respecto al CONT VEH $*P < 0.05$ (c) Muestra la expresión de IL-6 en animales sometidos a un episodio de estrés agudo (nado forzado) en la etapa adulta. SM VEH mostró un incremento en la expresión de IL-6 $*** P < 0.001$ respecto a CONT VEH. N= 8 animales/grupo. Cada muestra se analizó por duplicado.

10.4.4. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE IL-10 EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHO ADULTAS

En la figura 7 se realizó una comparación entre los grupos CONT VEH BASAL vs CONT VEH ESTRESADO, se observó un incremento en la expresión de IL-10 en los animales sometidos al estresor *P<0.05 (a). La expresión de IL-10 en condiciones basales se incrementó únicamente en el grupo SM VEH, comparado contra su respectivo control **P<0.01 (b). Los animales sometidos a un evento de estrés agudo en la etapa adulta únicamente el grupo SM LPS mostró una disminución en la expresión de IL-10 *P<0.05 (c).

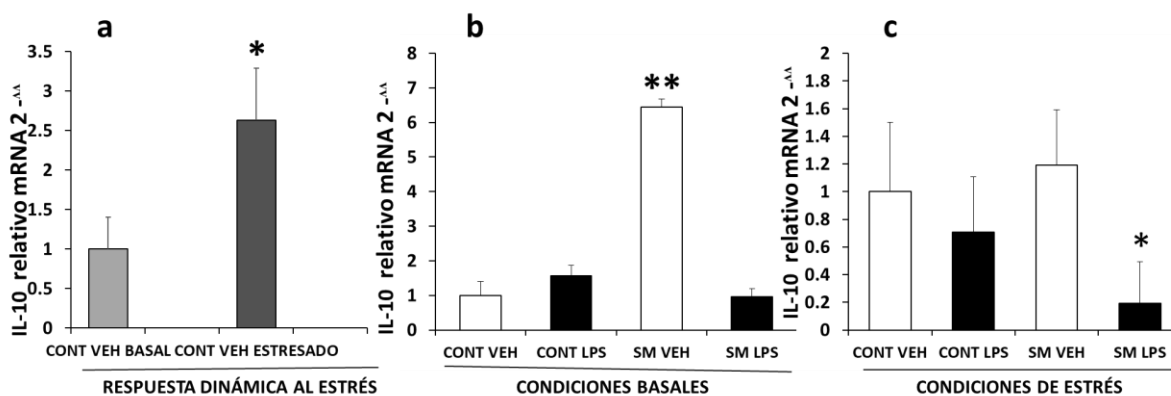


Figura 7.- Respuesta dinámica al estrés de IL-10 en el hipocampo de ratas macho adulto en condiciones basales y de estrés. (a) Muestra la expresión de IL-10 en los grupos CONT VEH BASAL vs CONT VEH ESTRESADO, el grupo CONT VEH ESTRESADO muestra un incremento de la expresión de IL-10 significativo * P <0.05. (b) Muestra la expresión de IL-10 en condiciones basales de los diferentes grupos, el grupo SM VEH mostró un incremento significativo respecto al CONT VEH **P <0.01 (c) Muestra la expresión de IL-10 en animales sometidos a un episodio de estrés agudo (nado forzado) en la etapa adulta. SM LPS mostró una disminución en la expresión de IL-10. * P <0.05 respecto a CONT VEH. N= 8 animales/grupo. Cada muestra se analizó por duplicado.

11. DISCUSIÓN

Si bien muchos estudios han examinado los efectos del ELS en el sistema neuroinmune, los resultados son inconsistentes. Por ejemplo, dentro de los mismos tejidos, como el hipocampo, hay muchos reportes de expresión aumentada, disminuida o inalterada de citocinas específicas (Dutcher et al., 2020). Existen 2 hipótesis sobre la variabilidad de los resultados; la primera indica que los resultados pueden variar dependiendo de la edad, si se realiza durante la etapa temprana, adolescencia o etapa adulta, segunda si los animales presentan un segundo estresor, posterior al estrés temprano, durante la etapa adulta (Dutcher et al., 2020). Se ha reportado que la SM aumenta los niveles de mRNA de IL-1 β del hipocampo en aproximadamente 20 veces en comparación con los animales no estresados al PN15 (Roque et al., 2016). Posterior a un episodio de estrés agudo la expresión de IL-1 β se observó elevada, pero se redujo de 2 a 2.5 veces el nivel comparado con los animales no estresados (Roque et al., 2016). En nuestro estudio la IL-1 β incrementó su expresión en el hipocampo alrededor de 4 veces en animales adultos sometidos a SM, lo cual correlaciona con el estudio previo y nos indica un perfil inflamatorio que perdura hasta la etapa adulta provocado por un estresor crónico temprano. De igual manera la expresión de IL-1 β se elevó 3 veces más en aquellos animales sometidos a SM y además a un estresor agudo durante la etapa adulta. Otro estudio que utilizó un protocolo de Deprivación Materna (DM) de 24 horas y evaluó la proteína de IL-1 β en el hipocampo no encontró ninguna alteración (Giridharan et al., 2019). Estos resultados indican que la IL-1 β puede tener un pico de elevación diario volviendo a su normalidad en unas horas, sin embargo, cuando el estrés es crónico, no se logra ese equilibrio y permanece elevada durante toda la vida, como se observa en nuestro estudio. La SM provocó un aumento modesto en la expresión del TNF- α del hipocampo en ratas macho al PN15 (Roque et al., 2016), también en un estudio la DM indujo un incremento leve en la expresión de TNF- α (Giridharan et al., 2019). Este efecto, al contrario de lo que pasa con IL-1 β puede ser modesto o nulo, como en el presente estudio donde la SM no incrementó la expresión de TNF- α en la zona del hipocampo estudiada, ni posterior a un evento de estrés agudo en ratas macho en la etapa adulta. El único tejido no sanguíneo en

el que se ha informado que IL-6 no se ve afectado por SM es el hipocampo, incluso en animales sacrificados inmediatamente después del episodio final de SM (Giridharan et al., 2019; Roque et al., 2016). Sin embargo, en estos estudios no se evaluó la expresión en la etapa adulta; en nuestro estudio al evaluar en la etapa adulta se encontró un incremento significativo tanto de manera basal como posterior a un estresor agudo. Los estudios que investigan los efectos a corto plazo de la SM sobre la expresión de IL-10 generalmente han encontrado un aumento o ningún cambio en los animales con SM (Giridharan et al., 2019; Moya-Pérez et al., 2017). En nuestro estudio encontramos un incremento en la expresión de IL-10 en ratas macho sometidas a SM y evaluadas de manera basal en la etapa adulta, en animales sometidos al estresor agudo y evaluados a las 3 h posteriores, se observó una tendencia hacia el incremento. Este incremento puede estar conteniendo contra la respuesta de tipo pro-inflamatoria originando en el sistema una respuesta de tipo anti-inflamatoria.

En animales expuestos a LPS administrado al PN14, y evaluados de manera inmediata (3 h después) se observó un incremento significativo en la expresión de las citocinas TNF- α , IL 1 β , e IL-10 a nivel hipocampal (Dinel et al., 2014). Previamente demostramos que el LPS incrementa la secreción de IL-1 β en animales a los que se les administró 1 mg/kg/día (Saavedra et al., 2017). Se ha reportado que el LPS incrementa la secreción de IL-1 β de manera dosis respuesta en el hipocampo (Nguyen et al., 1998). En un estudio reciente se demostró que la SM por 21 días incrementa la expresión de IL-6 en el hipocampo en la vida adulta de manera basal (Banqueri et al., 2019). En nuestro estudio encontramos el mismo resultado al PN140 de manera basal; sin embargo, esta expresión se ve incrementada frente a un estímulo agudo posterior. Y con respecto al TNF- α un estudio reporta un incremento en su expresión en el estado basal durante la etapa adulta (Banqueri et al., 2019). En nuestro estudio no se observó un incremento en la expresión de esta citocina en animales en estado basal ni posterior a un evento de estrés agudo, probablemente debido a que se observó hasta la etapa adulta. También se demostró que TNF- α se ve incrementado en el área hipocampal y no en el hipotálamo (Roque et al., 2016), este efecto también fue observado en el

hipocampo, pero no en la corteza o área estriatal (Banqueri et al., 2019). El incremento en estas citocinas específicamente en el área del hipocampo puede tener efectos negativos sobre el aprendizaje, memoria y conducta emocional (Tancredi, et al., 2000). En nuestro estudio no se observaron cambios en la expresión de citocinas debido al LPS. Sin embargo, revierte los efectos de la SM. Finalmente podemos concluir que la exposición a estresores diversos en etapas tempranas de la vida da como resultado una sensibilización duradera de la respuesta neuroinmune al estrés y, en consecuencia, incrementa la vulnerabilidad a sufrir de inflamación crónica en respuesta al estrés a largo plazo. Además, para que ELS produzca una inflamación elevada en la etapa adulta, los sujetos generalmente deben estar expuestos a eventos de estrés posteriores, lo que sugiere que las intervenciones no farmacológicas dirigidas a reducir la exposición al estrés y las intervenciones farmacológicas dirigidas a disminuir la inflamación pueden ser particularmente benéficas para reducir la inflamación en personas con historia de ELS. En este estudio no se observó una asociación entre los cambios morfológicos y los cambios conductuales. Finalmente, estos hallazgos pueden ser utilizados en el futuro para implementar estrategias diversas y reducir la inflamación en etapas tempranas de la vida inducidas por ELS, y de esta manera reducir como factor de riesgo la neuro inflamación para enfermedades tales como la depresión y ansiedad.

12. CONCLUSIÓN

La exposición a estresores diversos en etapas tempranas de la vida da como resultado una sensibilización duradera de la respuesta neuroinmune al estrés y, en consecuencia, incrementa la vulnerabilidad a sufrir de inflamación crónica en respuesta al estrés a lo largo de la vida.

13. REFERENCIAS

1. Banqueri, M., Mendez, M., Gomez-Lazaro, E., Arias, J.L. 2019. Early life stress by repeated maternal separation induces long-term neuroinflammatory response in glial cells of male rats. *Stress* 22 (5), 563–570. doi.org/10.1080/10253890.2019.1604666.
2. Brown, R. 1994. Cytokines and the interaction between the neuroendocrine and immune system. En: Brown R. *An introduction to neuroendocrinology*. Cambridge University Press. USA. p 302-45.
3. Calcia, M.A., Bonsall, D.R., Bloomfield, P.S., Selvaraj, S., Barichello, T., & Howes, O.D. 2016. Stress and neuroinflammation: A systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness. *Psychopharm. (Berl)*, 233, 1637–1650. doi: 10.1007/s00213-016-4218-9.
4. Dantzer, R. 2001. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain Behav Immun*. Mar;15(1):7-24. doi: 10.1006/brbi.2000.0613.
5. Dinel, A.L., Joffre, C., Trifilieff, P., Aubert, A., Foury, A., Le, Ruyet, P., Layé, S. 2014. Inflammation early in life is a vulnerability factor for emotional behavior at adolescence and for lipopolysaccharide-induced spatial memory and neurogenesis alteration at adulthood. *J Neuroinflammation*. Sep 17; 11:155. doi: 10.1186/s12974-014-0155-x.
6. Dutcher, E.G., Pama, E.A.C., Lynall, M.E., Khan, S., Clatworthy, M.R., Robbins, T.W., Bullmore, E.T., Dalley, J.W. 2020. Early-life stress and inflammation: A systematic review of a key experimental approach in rodents. *Brain Neurosci Adv*. Dec 28; 4:2398212820978049. doi: 10.1177/2398212820978049.
7. Gdek-Michalska, A., & Bugajski, J. 2010. Interleukin-1 (IL-1) in stress-induced activation of limbic-hypothalamic-pituitary adrenal axis. *Pharmacol. Rep.* 969–982. doi:10.1016/S1734-1140(10)70359-5
8. Giridharan, V.V., Réus, G.Z., Selvaraj, S., Scaini, G., Barichello, T., Quevedo, J. 2019. Maternal deprivation increases microglial activation and neuroinflammatory markers in the prefrontal cortex and hippocampus of infant rats. *J Psychiatr Res*. Aug; 115:13-20. doi: 10.1016/j.jpsychires.2019.05.001.

9. Moya-Pérez, A., Perez-Villalba, A., Benítez-Páez, A., Campillo, I., Sanz, Y. 2017. Bifidobacterium CECT 7765 modulates early stress-induced immune, neuroendocrine and behavioral alterations in mice. *Brain Behav Immun.* Oct; 65:43-56. doi: 10.1016/j.bbi.2017.05.011.
10. Nguyen, K.T., Deak, T., Owens, S.M., Kohno, T., Fleshner, M., Watkins, L.R., Maier, S.F. 1998. Exposure to acute stress induces brain interleukin-1beta protein in the rat. *J Neurosci.* Mar 15;18(6):2239-46. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-06-02239.1998.
11. Roque, A., Ochoa-Zarzosa, A., Torner, L. 2016. Maternal separation activates microglial cells and induces an inflammatory response in the hippocampus of male rat pups, independently of hypothalamic and peripheral cytokine levels. *Brain Behav. Immun.* 55, 39–48. doi.org/10.1016/j.bbi.2015.09.017.
12. Saavedra, L.M., Fenton-Navarro, B., Torner, L. 2017. Early life stress activates glial cells in the hippocampus but attenuates cytokine secretion in response to an immune challenge in rat pups. *Neuroimmuno.* 24 (4–5), 242–255. doi.org/10.1159/000485383.
13. 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. *Psychoneuroendocrino.* Apr; 126:105164. doi: 10.1016/j.psyneuen.2021.105164
14. Tancredi, V., Antuono, M.D., Cafe, C., Giovedi, S., Bue, M.C., Arcangelo, G.D. Benfenati, F. 2000. The inhibitory effects of interleukin-6 on synaptic plasticity in the rat hippocampus are associated with an inhibition of mitogen-activated protein kinase ERK. *J. Neurochemistry,* 75, 634–643. doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0750634.x
15. Peng, Y.L., Wang, W.Y., Jiang, C.L., Wang, Y.X. 2013. [Roles of cytokines in stress-induced depression]. *Sheng Li Xue Bao.* Apr 25;65(2):229-36. Chinese. PMID: 23598881.

14. DISCUSIÓN GENERAL

En el presente estudio evaluamos los efectos a largo plazo de ELS sobre la conducta emocional, la respuesta de las células gliales y la expresión de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en el hipocampo de ratas machos y hembras. Usamos la SM (PN1-PN14) y / o LPS (mediante inyección única en PN14) como factores estresantes. En conjunto, observamos que la exposición a factores estresantes en el período neonatal produce efectos a largo plazo sobre la conducta, morfología celular de la glía y la expresión de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias. Confirmamos que el tratamiento con LPS aumentó la conducta de ansiedad en ratas machos y hembras, como se observó en otros estudios (Benmhammed et al., 2019). Por otro lado, los efectos de la SM sobre la conducta de ansiedad siguen siendo controvertidos. Muchos estudios muestran un aumento en la conducta de ansiedad en machos y hembras (De Lima et al., 2020). En contraste, otros estudios no encuentran cambios entre machos y hembras incluido el nuestro (Aya-Ramos et al., 2017). Un solo estudio reportó un incremento en la conducta de ansiedad en machos (Melo et al., 2018). En el presente estudio se encontró que solo las hembras sometidas a SM mostraron una conducta de ansiedad, los machos no presentaron esta conducta. Por tanto, parece haber una respuesta de ansiedad dimórfica a la SM. Un estudio similar al nuestro combinó la DM y LPS encontró que las ratas machos y hembras presentaron conducta de ansiedad (Benmhammed et al., 2019).

La exposición a la SM induce un estado depresivo en la etapa adulta. Específicamente, la SM se ha propuesto como modelo traslacional de la depresión humana (Vetulani et al., 2013). Varios estudios han mostrado un incremento en la conducta tipo depresiva en ratas machos y hembras adultas que fueron sometidas a SM (Martisova et al., 2012). Nuestros resultados confirman este estudio. Por otro lado, muy pocos estudios han demostrado una conducta tipo depresiva debido a la administración de LPS neonatal y evaluada mediante la prueba de nado forzado (Berkiks et al., 2019). En nuestro estudio, el LPS no logró inducir una conducta tipo depresiva en ninguno de los dos sexos. Se ha reportado que la exposición

combinada de DM y LPS aumenta la conducta tipo depresiva en ratas Wistar machos y hembras (Benmhammed et al., 2019); nuestros resultados concuerdan con este informe.

Se conoce que el hipocampo está involucrado en la modulación de las conductas emocionales y en la regulación del eje HPA (Calcia et al., 2016), algunos estudios han relacionado el estrés crónico con la activación microglial en el hipocampo (Calcia et al., 2016). Pocos estudios han documentado cambios duraderos de la microglía en animales sometidos a SM, solo un estudio reportó un incremento en la inmunorreactividad de las células microgliales en CA3, pero no en CA1, del hipocampo, el cuerpo estriado dorsal y el núcleo accumbens de ratas machos adultas sometidas a SM (Banqueri et al., 2019). En nuestro estudio, la SM resultó en un mayor porcentaje de células microgliales activadas en la región CA3 y el *Hilus* de ratas adultas tanto machos como hembras, como se observó con otros procedimientos de estrés crónico (Calcia et al., 2016). Un estudio reportó una mayor activación de las células microgliales en el hipocampo de ratas machos y hembras adultas después del tratamiento con LPS neonatal (Berkiks et al., 2019). Nuestros resultados concuerdan con estos informes y demuestran que el tratamiento con LPS neonatal resultó en un incremento duradero en el número de microglia activada en el hipocampo de ratas adultas machos y hembras. Los efectos de la combinación de SM y LPS dieron como resultado un mayor porcentaje de células microgliales activadas en CA3 como en el *Hilus* en ambos sexos. Sin embargo, en los machos, la SM atenúo la activación inducida por LPS, mientras que en las hembras no se observó este efecto, lo que sugiere una respuesta dimórfica. En nuestro estudio, los retos SM y / o LPS dieron como resultado la activación de células microgliales en ambas áreas del hipocampo de machos y hembras lo cual se acompañó con cambios conductuales. Sin embargo, las respuestas conductuales fueron selectivas dependientes del reto sufrido. Además, la SM redujo la densidad microglial total en el hipocampo de los machos, pero no de las hembras, lo que sugiere nuevamente una respuesta dimórfica.

Muy pocos estudios han documentado los efectos de la SM sobre la densidad astrocítica del hipocampo. Nuestro estudio mostró que la densidad astrocítica aumentó en el *Hilus* del hipocampo en machos, pero disminuyó en CA3 y el *Hilus* del hipocampo en hembras sometidas a SM. Se observó incrementado el tamaño del soma en el *Hilus* de machos y hembras adultas, independientemente de la densidad astrocítica. Recientemente se informó de una disminución de los astrocitos dentro de la corteza prefrontal, las áreas estriatales y el hipocampo dorsal en ratas adultas machos y hembras sometidas a SM (Banqueri et al., 2019). Otros estudios han reportado un aumento de células positivas para GFAP en el hipocampo de ratas machos, pero no hembras, varios días o semanas después de ser sometidos a DM (Llorente et al., 2009). Berkiks et al., (2019) encontraron una mayor densidad astrocítica en el hipocampo dorsal de ratas adultas machos y hembras. En este estudio, confirmamos un incremento en la densidad astrocítica de las áreas CA3 e *Hilus* del hipocampo de ratas machos en respuesta a LPS, pero no en las hembras. Los incrementos en el tamaño del soma en respuesta al LPS se asociaron con cambios en la densidad astrocítica en los machos, pero no en las hembras, lo que sugiere una respuesta dimórfica. En conjunto, estos cambios en los astrocitos pueden influir en la plasticidad sináptica y la comunicación neuronal, contribuyendo así a una función cerebral anormal. Sin embargo, no encontramos correlación entre los cambios astrocíticos y los resultados conductuales.

Si bien muchos estudios han examinado los efectos del ELS en el sistema neuroinmune, los resultados son inconsistentes. Por ejemplo, dentro de los mismos tejidos, como el hipocampo, hay muchos reportes de expresión aumentada, disminuida o inalterada de citocinas específicas (Dutcher et al., 2020). Se ha reportado que la SM aumenta los niveles de mRNA de IL-1 β del hipocampo en aproximadamente 20 veces en comparación con los animales no estresados al PN15 (Roque et al., 2016). Posterior a un episodio de estrés agudo la expresión de IL-1 β se observó elevada, pero se redujo de 2 a 2.5 veces el nivel comparado con los animales no estresados (Roque et al., 2016). En nuestro estudio la IL-1 β incrementó su expresión en el hipocampo alrededor de 4 veces en animales adultos sometidos a SM, lo cual correlaciona con el estudio previo y nos indica un perfil

inflamatorio que perdura hasta la etapa adulta provocada por un estresor crónico temprano. Estos resultados indican que la IL-1 β puede tener un pico de elevación diario volviendo a su normalidad en unas horas, sin embargo, cuando el estrés es crónico, no se logra ese equilibrio y permanece elevada durante toda la vida, como se observa en nuestro estudio. La SM provocó un aumento modesto en la expresión del TNF- α del hipocampo en ratas macho al PN15 (Roque et al., 2016), también en un estudio la (DM) indujo un incremento leve en la expresión de TNF- α (Giridharan et al., 2019). Este efecto, al contrario de lo que pasa con IL-1 β puede ser modesto o nulo, como en el presente estudio donde la SM no incrementó la expresión de TNF- α en la zona del hipocampo, ni posterior a un evento de estrés agudo en la etapa adulta.

El único tejido no sanguíneo en el que se ha informado que IL-6 no se ve modificado por la SM es el hipocampo, incluso en animales sacrificados inmediatamente después del episodio final de SM (Giridharan et al., 2019; Roque et al., 2016). En nuestro estudio se evaluó en la etapa adulta y se encontró un incremento significativo tanto de manera basal como posterior a un estresor agudo. Los estudios que investigan los efectos de la SM sobre la expresión de IL-10 generalmente han encontrado un aumento o ningún cambio en los animales con SM (Giridharan et al., 2019; Moya-Pérez et al., 2017). En nuestro estudio encontramos un incremento en la expresión de IL-10 en animales sometidos a SM. En animales expuestos a LPS se observó un incremento significativo en la expresión de citocinas TNF- α , IL 1 β , e IL-10 a nivel hipocampal (Dinel et al., 2014). Previamente demostramos que el LPS incrementa la secreción de IL-1 β a los animales que se les administró LPS (Saavedra et al., 2017). En un estudio reciente se demostró que la SM por 21 días incrementó la expresión de IL-6 en el hipocampo en la etapa adulta de manera basal (Banqueri et al., 2019).

En nuestro estudio encontramos el mismo resultado al PN140 de manera basal; sin embargo, esta expresión incrementó frente a un estímulo agudo posterior. Con respecto al TNF- α un estudio reportó un incremento en su expresión en el estado basal durante la etapa adulta (Banqueri et al., 2019). En nuestro estudio no se

observó un incremento en la expresión de esta citocina en animales basales ni posterior a un evento de estrés agudo eso quizás porque se observó hasta la etapa adulta.

15. CONCLUSIÓN GENERAL

En conclusión, la respuesta conductual a los factores estresantes en la vida temprana depende del tipo de desafío y del sexo. Además, todos los desafíos aumentaron la activación de las células gliales en el hipocampo a largo plazo; sin embargo, la respuesta específica de las células gliales depende del tipo de célula (microglía, astrocitos) en la zona del hipocampo y del sexo del individuo. Las respuestas gliales a un doble insulto pueden ser parte de un mecanismo de respuesta adaptativa. Las respuestas gliales y conductuales a largo plazo a diferentes ELS pueden permitir una mejor comprensión del desarrollo de enfermedades psiquiátricas. ELS da como resultado una sensibilización duradera de la respuesta neuroinmune al estrés y, en consecuencia, incrementa la vulnerabilidad de sufrir de inflamación crónica en respuesta al estrés a lo largo de la vida. Además, para que ELS produzca una inflamación elevada en la etapa adulta, los sujetos generalmente deben estar expuestos a eventos de estrés posteriores, lo que sugiere que las intervenciones no farmacológicas dirigidas a reducir la exposición al estrés y las intervenciones farmacológicas dirigidas a disminuir la inflamación pueden ser particularmente benéficas para reducir la inflamación en personas con historia de ELS. Finalmente, estos hallazgos pueden ser utilizados en el futuro para implementar estrategias diversas y reducir la inflamación en etapas tempranas de la vida inducidas por ELS, y de esta manera reducir como factor de riesgo la neuro inflamación para enfermedades tales como depresión y ansiedad.

16. REFERENCIAS GENERALES

1. Abbink, M.R., van Deijk, A.F., Heine, V.M., Verheijen, M.H., Korosi, A., 2019. The involvement of astrocytes in early-life adversity induced programming of the brain. *Glia* 67 (9), 1637–1653. doi.org/10.1002/glia.23625.
2. Adam, Samuels. B., Leonardo, E.D., Hen, R. 2015. Hippocampal subfields and major depressive disorder. *Biol Psychiatry*. Feb 1;77(3):210-211. doi: 10.1016/j.biopsych.2014.11.007.
3. Amaral, D.G., Scharfman, H.E., Lavenex, P. 2007. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res*; 163:3-22. doi: 10.1016/S0079-6123(07)63001-5.
4. Andersen, P. Morris, M. Amaral, DG. Bliss, T. O'Keefe, J. 2007. The hippocampal formation. In the *Hippocampus book*. (pp.3-8).
5. Andersen, S.L., Tomada, A., Vinchow, E.S., Valente, E., Polcari, A., Teicher, M.H. 2008. Preliminary evidence for sensitive periods in the effect of childhood sexual abuse on regional brain development. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*; 20:292–301. doi: 10.1176/appi.neuropsych.20.3.292.
6. Araujo, D.M., Cotman, C.W. 1992. Basic FGF in astroglial, microglial, and neuronal cultures: characterization of binding sites and modulation of release by lymphokines and trophic factors. *J Neurosci* May;12(5):1668-78. doi: 10.1523/JNEUROSCI.12-05-01668.1992.
7. Aya-Ramos, L., Contreras-Vargas, C., Rico, J.L., Duenas, Z., 2017. Early maternal separation induces preference for sucrose and aspartame associated with increased blood glucose and hyperactivity. *Food Funct*. 8 (7), 2592–2600. doi.org/ 10.1039/c7fo00408g.
8. Baldessarini, R.J., Frankenburg, F.R. 1991. Clozapine. A novel antipsychotic agent. *N Engl J Med*. Mar 14;324(11):746-54. doi: 10.1056/NEJM199103143241107.
9. Banqueri, M., Mendez, M., Gomez-Lazaro, E., Arias, J.L., 2019. Early life stress by repeated maternal separation induces long-term neuroinflammatory response in glial cells of male rats. *Stress* 22 (5), 563–570. doi.org/10.1080/10253890.2019.1604666.

10. Benmhammed, H., Hayek, S., Berkik, I., Elmostafi, H., Bousalham, R., Mesfioui, A., Ouichou, A., Hessni, A. 2019. Animal Models of Early-Life Adversity. *Methods Mol Biol*; 2011:143-161. doi: 10.1007/978-1-4939-9554-7_10.
11. Bhargava, S.K. 2008. Stress and its prevention. Retrieved from <http://site.ebrary.com.libproxy2.usouthal.edu/lib/usouthal/docDetail.action?docID=10416632>
12. Berkiks, I., Garcia-Segura, L.M., Nassiri, A., Mesfioui, A., Ouichou, A., Boulbaroud, S., Bahbiti, Y., Lopez-Rodriguez, A.B., Hasnaoui, E., El Hessni, A., 2019. The sex differences of the behavior response to early Life immune stimulation: microglia and astrocytes involvement. *Physiol. Behav.* 199, 386–394. doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.11.037.
13. Bilbo, S.D., Schwarz, J.M. 2009. Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system. *Front. Behav. Neurosci.* 3 (14), 1–14. doi.org/10.3389/neuro.08.014.2009.
14. Bock, J., Gruss, M., Becker, S., Braun, K. 2005. Experience-induced changes of dendritic spine densities in the prefrontal and sensory cortex: correlation with developmental time windows. *Cereb Cortex.* Jun;15(6):802-8. doi: 10.1093/cercor/bhh181.
15. Borges-Aguiar, A.C., Schauffer, L.Z., De Kloet, E.R., Schenberg, L.C. 2018. Daily maternal separations during stress hyporesponsive period decrease the thresholds of panic-like behaviors to electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray of the adult rat. *Behav. Brain Res*; 344:132–144. doi: 10.1016/j.bbr.2018.02.020.
16. Brown, R. 1994. Cytokines and the interaction between the neuroendocrine and immune system. En: Brown R. *An introduction to neuroendocrinology.* Cambridge University Press. USA. p 302-45.
17. Brown, T.M., Fee, E. 2002. Walter Bradford Cannon Pioneer Physiologist of Human Emotions. *Am J Public Health.* October; 92(10): 1594–1595.
18. Buzsáki, G. 2002. Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron.* Jan 31;33(3):325-40. doi: 10.1016/s0896-6273(02)00586-x.

19. Calcia, M.A., Bonsall, D.R., Bloomfield, P.S., Selvaraj, S., Barichello, T., & Howes, O.D. 2016. Stress and neuroinflammation: A systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness. *Psychopharmacol. (Berl)*, 233, 1637–1650. doi: 10.1007/s00213-016-4218-9.
20. Çalıřkan, G., Müller, A., Albrecht, A. 2020. Long-Term Impact of Early-Life Stress on Hippocampal Plasticity: Spotlight on Astrocytes. *Int J Mol Sci*. Jul 15;21(14):4999. doi: 10.3390/ijms21144999.
21. Carlyle, B.C, Duque, A., Kitchen, R.R., Bordner, K.A., Coman, D., Doolittle, E., Papademetris, X., Hyder, F., Taylor, J.R., Simen, A.A. 2012. Maternal separation with early weaning: a rodent model providing novel insights into neglect associated developmental deficits. *Dev Psychopathol*; 24:1401–1416. doi.org/10.1017/S095457941200079X.
22. Cartmell, T., Ball, C., Bristow, A.F., Mitchell, D., Poole, S. 2003. Endogenous interleukin-10 is required for the defervescence of fever evoked by local lipopolysaccharide-induced and *Staphylococcus aureus*-induced inflammation in rats. *J Physiol*. Jun 1;549(Pt 2):653-64. doi: 10.1113/jphysiol.2002.037291.
23. Cassidy, E.M., Manning, D., Byrne, S., Bolger, E., Murray, F., Sharifi, N., Wallace, E., Keogan, M., O'Keane, V. 2002. Acute effects of low-dose interferon-alpha on serum cortisol and plasma interleukin-6. *J Psychopharmacol*. Sep;16(3):230-4. doi: 10.1177/026988110201600307.
24. Chicurel, M.E., Harris, K.M. 1992. Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *J Comp Neurol*. Nov 8;325(2):169-82. doi: 10.1002/cne.903250204.
25. Cigolani, H., Houssay., B. 2000. *Fisiología Humana*, 7ª Edición. Buenos Aires El Ateneo.
26. Dantzer, R. 2001. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain Behav Immun*. Mar;15(1):7-24. doi: 10.1006/brbi.2000.0613.
27. Dantzer, R., O'Connor, J.C., Freund, G.G., Johnson, R.W., Kelley, K.W., 2008. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat. Rev. Neurosci*. 9 (1), 46–56. doi.org/10.1038/nrn2297.

28. De Lima, R.M.S., Dos Santos, Bento, L.V., di Marcello, V.L.M., Barauna, V.G., Bittencourt, A.S., Dalmaz, C., de Vasconcellos, B.A.P.S., 2020. Early life stress and the programming of eating behavior and anxiety: sex-specific relationships with serotonergic activity and hypothalamic neuropeptides. *Behav. Brain Res.* 379, 112399. doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112399
29. Domínguez-Punaro, M.C., Segura, M., Plante, M.M., Lacouture, S., Rivest, S., Gottschalk, M. 2007. *Streptococcus suis* serotype 2, an important swine and human pathogen, induces strong systemic and cerebral inflammatory responses in a mouse model of infection. *J Immunol.* Aug 1;179(3):1842-54. doi: 10.4049/jimmunol.179.3.1842.
30. Eglitis, M.A., Mezey, E. 1997. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 15;94(8):4080-5. doi: 10.1073/pnas.94.8.4080.
31. Ekdahl, C.T., Claasen, J.H., Bonde, S., Kokaia, Z., Lindvall, O. 2003. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov 11;100(23):13632-7. doi: 10.1073/pnas.2234031100.
32. Elenkov, I.A., Wilder, R.L., Chrousos, G.P., Vizi, S., 2000. The sympathetic nerve-an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev*, 52: 595-638.
33. Ellis, S., Mouihate, A., Pittman, Q.J. 2005. Early life immune challenge alters innate immune responses to lipopolysaccharide: implications for host defense as adults. *FASEB J.* Sep;19(11):1519-21. doi: 10.1096/fj.04-3569fje.
34. Eng, Ghirnikar, Lee. 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res.* Oct;25(9-10):1439-51. doi:10.1023/a:1007677003387.
35. Erridge, C. 2010. Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? *J Leukoc Biol.* Jun;87(6):989-99. doi: 10.1189/jlb.1209775.
36. Frank, D., Zlotnik, A., Kofman, O., Grinshpun, J., Severynovska, O., Brotfain, E., Kuts, R., Natanel, D., Melamed, I., Boyko M. 2019. Early life stress induces submissive behavior in adult rats. *Behav. Brain Res*; 372:112025. doi: 10.1016/j.bbr.2019.112025.

37. Freund, T.F., Buzsáki, G. 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*;6(4):347-470. doi: 10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:4<347: AID-HIPO1>3.0.CO;2-I.
38. Frick, L.R., Williams, K., Pittenger, C. 2013. Microglial dysregulation in psychiatric disease. *Clin Dev Immunol*; 2013:608654. doi: 10.1155/2013/608654.
39. Fullana, M.N., Ruiz-Bronchal, E., Ferrés-Coy, A., Juárez-Escoto, E., Artigas, F., Bortolozzi, A. 2018. Regionally Selective Knockdown of Astroglial Glutamate Transporters in Infralimbic Cortex Induces a Depressive Phenotype in Mice. *Glia*. 2019 Jan 11. doi: 10.1002/glia.23593.
40. Gdek-Michalska, A., & Bugajski, J. 2010. Interleukin-1 (IL-1) in stress-induced activation of limbic-hypothalamic-pituitary adrenal axis. *Pharmacol. Rep.*, 969–982. doi:10.1016/S1734-1140(10)70359-5
41. Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., Samokhvalov, I.M., Merad, M. 2010. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. Nov 5;330(6005):841-5. doi: 10.1126/science.1194637
42. Gracia-Rubio, I., Moscoso-Castro, M., Pozo, O.J., Marcos, J., Nadal, R., Valverde, O. 2016. Maternal separation induces neuroinflammation and long-lasting emotional alterations in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. Feb 4; 65:104-17. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.09.003.
43. Guillamón-Vivancos, Gómez-Pinedo, Matías-Guiu. 2015. Astrocitos en las enfermedades neurodegenerativas: función y caracterización molecular, *Neurología*, 30; 2: 119-129. doi.org/10.1016/j.nrl.2012.12.007.
44. Haapakoski, R., Mathieu, J., Ebmeier, KP., Alenius, H., Kivimäki, M. 2015. Cumulative meta-analysis of interleukins 6 and 1 β , tumour necrosis factor α and C-reactive protein in patients with major depressive disorder. *Brain Behav Immun*. Oct; 49:206-15. doi: 10.1016/j.bbi.2015.06.001.
45. Heim, C., Nemeroff, C.B., 2002. Neurobiology of early life stress: clinical studies *Semin Clin. Neuropsychiatry* 7 (2), 147–159. doi.org/10.1053/scnp.2002.33127.

-
-
46. Heim, C., Binder, E.B. 2012. Current research trends in early life stress and depression: Review of human studies on sensitive periods, gene–environment interactions, and epigenetics. *Exp Neurol*, Special Issue: Stress and neurological disease; 233:102–111. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.10.032.
 47. Herman, J.P., Cullinan, W.E. 1997. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* feb;20(2):78-84. doi: 10.1016/s0166-2236(96)10069-2.
 48. Hickey, W.F, Kimura, H. 1988. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science.* Jan 15;239(4837):290-2. doi: 10.1126/science.3276004.
 49. Hill, R.A., Klug, M., Kiss Von Soly, S., Binder, M.D., Hannan, A.J., van den Buuse, M. 2014. Sex-specific disruptions in spatial memory and anhedonia in a “two hit” rat model correspond with alterations in hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression and signaling. *Hippocampus*; 24:1197–1211. doi: 10.1002/hipo.22302.
 50. Hoffmann, O., Mahrhofer, C., Rueter, N., Freyer, D., Bert, B., Fink, H., Weber, J.R. 2007. Pneumococcal cell wall-induced meningitis impairs adult hippocampal neurogenesis. *Infect Immun Sep*;75(9):4289-97. doi: 10.1128/IAI.01679-06.
 51. Hoogland, I.C., Houbolt, C., van Westerlo, D.J., van Gool WA., van de Beek D. 2015. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. *J Neuroinflammation.* Jun 6; 12:114. doi: 10.1186/s12974-015-0332-6.
 52. Ishizuka, N., Weber, J., Amaral, D.G. 1990. Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol.* May 22;295(4):580-623. doi: 10.1002/cne.902950407.
 53. Kaplan, Sadock. 1991. *Synopsis of Psychiatry.* Sexta Edición. Williams & Wilkins, pp.389-394. Baltimore.
 54. Kendler, K.S., Neale, M.C., Kessler, R.C., Heath, A.C., Eaves, L.J. 1992. Childhood Parental Loss and Adult Psychopathology in Women. *Arch. Gen. Psychiatry*; 49:109–116. doi: 10.1001/archpsyc.1992.01820020029004.

-
-
55. Kentner, A.C., McLeod, S.A., Field, E.F., Pittman, Q.J. 2010. Sex-dependent effects of neonatal inflammation on adult inflammatory markers and behavior. *Endocrinology*. Jun;151(6):2689-99. doi: 10.1210/en.2009-1101.
 56. Khalaf-Nazzal, R., Francis, F. 2013. Hippocampal development - old and new findings. *Neuroscience*. Sep 17; 248:225-42. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.05.061.
 57. Kim, J.J., Diamond, D.M. 2002. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci* Jun;3(6):453-62. doi: 10.1038/nrn849.
 58. Kim, S.M, Ganguli, S., Frank, L.M. 2012. Spatial information outflow from the hippocampal circuit: distributed spatial coding and phase precession in the subiculum. *J Neurosci*. Aug 22;32(34):11539-58. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5942-11.2012.
 59. Kubera, M., Simbirtsev, A., Mathison, R., Maes, M. 2000. Effects of repeated fluoxetine and citalopram administration on cytokine release in C57BL/6 mice. *Psychiatry Res*. Nov 20;96(3):255-66. doi: 10.1016/s0165-1781(00)00184-0.
 60. Lavenex, P., Banta Lavenex, P. Amaral, D.G. 2007. Postnatal development of the primate hippocampal formation. *Dev Neurosci*; 29(1-2):179-92. doi: 10.1159/000096222.
 61. Lazarus, R. S. 2006. Stress and emotion: A new synthesis. Retrieved from <http://site.ebrary.com.libproxy2.usouthal.edu/lib/usouthal/docDetail.action?docID=10265585>
 62. Liddelow, S.A., Barres, B.A. 2017. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity* Jun 20;46(6):957-967. doi: 10.1016/j.immuni.2017.06.006.
 63. Llorente, R., Gallardo, M.L.P., Berzal, A.L., Prada, C., Garcia Segura, L.M., Viveros, M.A. P. 2009. Early maternal deprivation in rats induces gender-dependent effects on developing hippocampal and cerebellar cells. *Int. J. Dev. Neurosci*. 27 (3), 233–241. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2009.01.002>.
 64. Lucassen, P.J., Pruessner, J., Sousa, N., Almeida, O.F., Van Dam, A.M., Rajkowska, G., Swaab, D.F., Czéh, B., 2014. Neuropath. of stress. *Acta Neuropathol*. 127 (1), 109–135. doi.org/10.1007/s00401-013-1223-5.

-
-
65. Lutsik, B.D., Stekhnovich, I.V., Lutsik, A.D. 1991. Use of lectins in histochemical examination of microglia of the human brain in bacterial meningoencephalitis. *Zh. Nevropatol. Psikiatr. Im. S S Korsakova*; 91:41–44. [PubMed: 1647625]
 66. Martin, P. 1996. *Enfermar o curar por la mente*. Madrid: Pirámide
 67. 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. *Neuropharm.* 62 (5–6), 1944–1953 doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.12.019.
 68. McEwen, B.S. 1998. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 840, 33–44. doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09546.x.
 69. McEwen, B.S. 2007. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev.* Jul;87(3):873-904. doi: 10.1152/physrev.00041.2006.
 70. Melo, C., Vizin, R.C.L., Silva U., N., Ishikawa, D.T., Echeverry, M.B., Carrettiero, D.C., Almeida, M.C., 2018. Early maternal separation promotes alterations in the thermoregulatory profile of adult Wistar rats. *J. Therm. Biol.* 78, 151–160. doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.09.013
 71. Middeldorp, E.M. Hol. 2011. GFAP in health and disease *Prog Neurobiol*, 93, pp. 421-443.
 72. Moscoso, M.S. 1998. Estrés salud y emociones: estudio de la ansiedad, cólera y hostilidad. *Rev. de Psicol.* 3; 9-17
 73. Nakajima, K., Honda, S., Tohyama, Y., Imai, Y., Kohsaka, S., Kurihara, T. 2001. Neurotrophin secretion from cultured microglia. *J Neurosci Res.* Aug 15;65(4):322-31. doi: 10.1002/jnr.1157. PMID: 11494368.
 74. Naskar, S., Chattarji, S. 2019. Stress Elicits Contrasting Effects on the Structure and Number of Astrocytes in the Amygdala versus Hippocampus. *Enero*; 6 doi: 10.1523/ENEURO.0338-18.2019
 75. Nayak, D., Roth, T.L., McGavern, D.B. 2014. Microglia development and function. *Annu Rev Immunol*; 32:367-402. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120240.

-
-
76. Nelson, R.J. 2000. Stress en Nelson R.J. An introduction to Behavioral Endocrinology, Massachussets, Sinauer Associates; 557-591.
 77. Olson, J.K, Miller, S.D. 2004. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. J Immunol. Sep 15;173(6):3916-24. doi: 10.4049/jimmunol.173.6.3916.
 78. Palma-Gudiel, H. Fañanás, L. 2016. An integrative review of methylation at the serotonin transporter gene and its dialogue with environmental risk factors, psychopathology and 5-HTTLPR. Neurosci Biobehav Rev; 72:190–209. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.11.011.
 79. Pearlin, L.I., Lieberman, M.A., Menaghan, E.G., Mullan, J.T. 1981. The stress processes. J Health Soc Behav; 22: 337-56
 80. Pelkey, K.A., Chittajallu, R., Craig, M.T., Tricoire, L., Wester, J.C., McBain, C.J. 2017. Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons. Physiol Rev. Oct 1;97(4):1619-1747. doi: 10.1152/physrev.00007.2017.
 81. Raison, C.L., Capuron, L., Miller, A.H. 2006. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. Trends Immunol. Jan;27(1):24-31. doi: 10.1016/j.it.2005.11.006.
 82. Roque, A., Ochoa-Zarzosa, A., Torner, L. 2016. Maternal separation activates microglial cells and induces an inflammatory response in the hippocampus of male rat pups, independently of hypothalamic and peripheral cytokine levels. Brain Behav. Immun. 55, 39–48. doi.org/10.1016/j.bbi.2015.09.017
 83. Saavedra, L.M., Fenton–Navarro, B., Torner, L. 2017. Early life stress activates glial cells in the hippocampus but attenuates cytokine secretion in response to an immune challenge in rat pups. Neuroimmunomodulation 24 (4–5), 242–255. doi.org/ 10.1159/000485383.
 84. Salazar, A., Gonzalez-Rivera, B.L., Redus, L., Parrott, J.M., O'Connor, J.C., 2012. Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates anhedonia and anxiety-like behaviors caused by peripheral lipopolysaccharide immune challenge. Horm. Behav. 62 (3), 202–209. doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.03.010

-
-
85. Samuels, B.A., Hen, R., 2011. Neurogenesis and affective disorders. *Eur J Neurosci.* Mar;33(6):1152-9. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07614. x.
 86. Selye, H. 1936. A syndrome produced by diverse nocuous agents, *Nature*, 36: 32.
 87. Semple, B.D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D.M., Noble-Haeusslein, L.J. 2013. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol*; 0:1–16. doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.04.001
 88. Silver, J., Miller, J.H. 2004. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci.* feb;5(2):146-56. doi: 10.1038/nrn1326.
 89. Sofroniew, M.V. 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* 2009 Dec;32(12):638-47. doi: 10.1016/j.tins.2009.08.002
 90. Spencer, S.J., Martin, S., Mouihate, A., Pittman, Q.J. 2006. Early-life immune challenge: defining a critical window for effects on adult responses to immune challenge. *Neuropsychopharmacology.* Sep;31(9):1910-8. doi: 10.1038/sj.npp.1301004.
 91. Takano, T., Han, X., Deane, R., Zlokovic, B., Nedergaard, M. 2007. Two-photon imaging of astrocytic Ca²⁺ signaling and the microvasculature in experimental mice models of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* Feb; 1097:40-50. doi: 10.1196/annals.1379.004.
 92. Tower, D.B., Young, O.M. 1973. The activities of butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase, the rate of anaerobic glycolysis, and the question of a constant density of glial cells in cerebral cortices of various mammalian species from mouse to whale. *J Neurochem* Feb;20(2):269-78. doi: 10.1111/j.1471-4159.1973.tb12126. x.
 93. Trang, T., Beggs, S., Salter, M.W. 2011. Brain-derived neurotrophic factor from microglia: a molecular substrate for neuropathic pain. *Neuron Glia Biol.* Feb;7(1):99-108. doi: 10.1017/S1740925X12000087.
 94. Truex, R.C. Carpenter, M.B. 1971. *Neuroanatomia humana de Strong y Elwyn.* Tr.Mosovich a. Buenos Aires: El ateneo.

-
-
95. Ueno, M., Fujita, Y., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kikuta, J., Ishii, M., Yamashita T. 2013. Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nat Neurosci.* May;16(5):543-51. doi: 10.1038/nn.3358
 96. Vetulani, J., 2013. Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition. *Pharm. Rep.* 65 (6), 1451–1461 doi.org/10.1016/s1734-1140(13)71505-6.
 97. Walker, F.R., Hodyl, N.A., Krivanek, K.M., Hodgson, D.M. 2006. Early life host-bacteria relations and development: long-term individual differences in neuroimmune function following neonatal endotoxin challenge. *Physiol Behav.* Jan 30;87(1):126-34. doi: 10.1016/j.physbeh.2005.09.008.
 98. Walker, F.R., Beynon, S.B., Jones, K.A., Zhao, Z., Kongsui, R., Cairns, M., Nilsson, M. 2014. Dynamic structural remodelling of microglia in health and disease: a review of the models, the signals and the mechanisms. *Brain Behav Immun;* 37:1–14. doi: 10.1016/j.bbi.2013.12.010.
 99. Warr, P. 1994. A conceptual framework for the study of work and mental health. *Work & Stress;* 8: 84-97
 100. Wei, L., David, A., Duman, R.S., Anisman, H., Kaffman, A. 2010. Early life stress increases anxiety-like behavior in Balb c mice despite a compensatory increase in levels of postnatal maternal care. *Horm Behav.* Apr;57(4-5):396-404. doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.01.007.
 101. Weininger, J., Roman, E., Tierney, P., Barry, D., Gallagher, H., Murphy, P., Levins, K.J., O'Keane, V., O'Hanlon, E., Roddy, D.W. 2019. Papez's Forgotten Tract: 80 Years of Unreconciled Findings Concerning the Thalamocingulate Tract. *Front Neuroanat.* feb 18; 13:14. doi: 10.3389/fnana.2019.00014.
 102. Witter, M.P, Wouterlood, F.G., Naber, P.A., Van, T. 2000. Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network. *Ann N Y Acad Sci.* jun; 911:1-24. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06716. x.
 103. Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates (No. WHO/MSD/MER/2017.2), 2017. World Health Organization. https://www.who.int/mental_health/management/depression/prevalence_global_health_estimates/en/.

-
-
104. Yirmiya, R., Rimmerman, N., Reshef, R., 2015. Depression as a microglial disease. *Trends Neurosci.* 38 (10), 637–658. doi.org/10.1016/j.tins.2015.08.001.
 105. Zakharova, L.A. 2015. [Perinatal stress in brain programming and pathogenesis of psychoneurological disorders]. *Izv Akad Nauk Ser Biol.* Jan-Feb;(1):17-26. Russian. PMID: 25872396.
 106. Zárate, S., Cardenas, F., Acevedo, C., Sarmiento, M. León, L. 2014. “Efectos del estrés sobre los procesos de plasticidad y neurogenesis: una revisión”. *Universitas Psychologica* 13(3), 1181-1197.

17. CAPÍTULO III

17.1. ARTÍCULO DE DIVULGACIÓN

Luis Miguel Saavedra-Pimentel y Luz Torner. 2020. Depresión por maltrato infantil. Saber más, enero-febrero 9 (49):45-47.

ARTÍCULO

Depresión por maltrato infantil

Luis Miguel Saavedra Pimentel y Luz Torner



M.C. Luis Miguel Saavedra Pimentel, estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas Opción en Biotecnología Molecular Agropecuaria, en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. lmisp_603@hotmail.com

D.C. Luz Torner, Doctora Investigadora Titular B, Jefa del departamento de Neurociencias del Centro de Investigaciones Biomédicas de Michoacán del Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIMI). luz_torner@yahoo.com

El maltrato infantil es un problema de salud mundial debido a las repercusiones físicas y psicológicas que provoca. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que en el 2017, la mitad de los niños del mundo sufrieron algún tipo de violencia en sus diferentes vertientes. Esta organización define al maltrato infantil como los abusos y la desatención de que son objeto los menores de 18 años. De acuerdo a datos y cifras de esta organización, un 25 % de la población total adulta manifestó haber sufrido maltrato físico infantil, de los cuales un 20 % de las mujeres y un 7.6 % de hombres sufrieron abuso sexual durante la infancia.

Consecuencias del maltrato infantil

Las consecuencias del maltrato infantil a corto plazo son fracturas, abrasiones, traumas en vísceras y daño ocular; a mediano plazo muestran un menor desempeño escolar, comportamiento antisocial, retardo en el desarrollo y comportamiento agresivo; mientras que a largo plazo afecta las re-

laciones sociales y la percepción del entorno originando estrés crónico asociado con trastornos psiquiátricos y afectivos.

De manera similar se conoce que aquellas personas que sufrieron maltrato en la infancia, emplean las mismas prácticas disciplinarias que utilizaron con ellos, perpetuando de esta manera un fenómeno conocido como "transmisión intergeneracional de la violencia", en la cual los niños pueden aprender a utilizar la violencia para resolver conflictos. Sin embargo, no existe una condición lineal ya que no todos los que sufrieron de adversidades tempranas continúan con el ciclo de agresión.

Por otra parte, la salud mental y el bienestar de la madre juegan un papel crucial, pues es sabido que las madres que desarrollan cuadros depresivos durante el embarazo y/o en el periodo postparto, y no reciben atención médica, proporcionan menos cuidados maternos a sus hijos.

Existen periodos sensibles durante la vida, sobre todo en la etapa infantil, donde si ocurren situaciones adversas como maltrato, abandono parental, pobreza extrema, entre otras causas durante los primeros años de vida, la depresión y el incremento en el consumo de drogas será un resultado muy probable.

Diversos estudios han demostrado que adultos que sufrieron maltrato infantil tienen una

probabilidad incrementada de desarrollar diversas conductas de riesgo, además de la posibilidad de padecer depresión. Se sabe que las personas que experimentaron maltrato infantil muestran menos seguridad, baja autoestima, sentimientos de culpa y menor auto-eficiencia en la edad adulta. De igual manera se sabe que el maltrato infantil tiene una relación muy estrecha con enfermedades psiquiátricas como lo es la depresión.

Como ya se ha descrito, la depresión es un trastorno mental frecuente, que se caracteriza por la presencia de tristeza, pérdida de interés, sentimientos de culpa, falta de autoestima, trastornos del sueño o del apetito, sensación de cansancio y falta de concentración. Ocurre en casi en el 67 % de las personas que han sufrido maltrato durante los primeros años de vida; sin embargo, la depresión es una enfermedad multifactorial donde se pueden incluir diversos factores de riesgo como los ambientales, los genéticos, entre otros.

La relación causal entre el maltrato infantil y la depresión entre los seres humanos es difícil de demostrar, por lo cual se han utilizado diversos modelos animales para lograr replicar las situaciones que se han observado en los seres humanos.

Modelos animales de estrés en etapas tempranas de la vida

De acuerdo al *National Human Genome Research Institute* (NHGRI), un modelo animal es una especie no humana que se utiliza en la investiga-



Dentro de la sintomatología podemos encontrar:



1. Cambios en el estado de ánimo (tristeza, ansiedad, irritabilidad).
2. Pérdida de interés en cosas que en alguna etapa de la vida, fueron placenteras.
3. Fatiga.
4. Dificultad para concentrarse.
5. Cambios en el sueño (insomnio o sueño excesivo).
6. Cambios de apetito.
7. Pensamientos de suicidio.
8. Dolores de cabeza y musculares.

ción para extrapolar aspectos de una enfermedad humana, ya que los investigadores pueden realizar experimentos que serían muy complicados o poco éticos en seres humanos.

Se ha acuñado el término de "estrés en etapas tempranas de la vida", para indicar el estrés que se sufre en los primeros días de vida postnatal, si se trata de roedores, o meses si se trata de otras especies. Si bien este término podría también abarcar el periodo gestacional, en nuestro caso nos referiremos solamente al periodo postnatal (después de nacer).

El modelo de separación materna fue descrito a mediados de la década de los 60 por Levine, y éste ha sufrido modificaciones con el paso de los años, pudiendo encontrar modelos con separación materna por periodos de tres horas por la mañana y tres horas por la tarde desde el posnatal dos hasta el posnatal 20, o periodos de tres o cuatro horas durante la mañana desde el posnatal uno hasta el posnatal 14.

También existe una variación donde se separa de manera individual a las crías de sus hermanos. Otro tipo de estresor temprano es el destete precoz, el cual consiste en destetar a las crías de ratas al día posnatal 15, esto resulta ser un fuerte evento traumático durante la infancia ya que se rompe el vínculo entre la madre y la cría.

Estos modelos se basan en las observaciones sobre los roedores, ya que las crías de roedor nacen un tanto inmaduras y por lo tanto dependen grandemente del cuidado materno para su desarrollo. Al privar a las crías del contacto con la madre, se les priva de los estímulos sensoriales necesarios para el desarrollo y maduración adecuados del sistema nervioso del infante. Esto se hace más pronunciado al separar de forma individual a las crías, privándolos también del contacto sensorial (piel a piel) de los hermanos.

Esta carencia de estímulos, sumada a la percepción de estrés de la cría, resulta en el animal adulto en una mayor ansiedad y una respuesta fisiológica mayor —incluso exacerbada—, ante los estímulos estresantes que se le presentan en la vida adulta.

Los modelos animales además muestran que el estrés en etapas tempranas de la vida, puede inducir cambios en el material genético del individuo expuesto, es decir, que modifican la información genética heredada. Estos estudios corroboran las observaciones hechas en el ser humano, confirmando que la presencia de estrés en etapas tempranas



de la vida puede modificar la conducta del individuo y su respuesta fisiológica a eventos posteriores de estrés.

Estrategias para disminuir el maltrato infantil

Una de ellas es establecer guarderías para los hijos de aquellas madres en las que se detecte que sufren de depresión activa, y que por lo tanto, tienen un menor cuidado hacia los hijos. Asimismo, la detección de violencia intrafamiliar, ha llevado a proteger a los infantes retirándolos de la casa materna y poniéndolos en instituciones especializadas para su cuidado. Por otra parte, el conocimiento adquirido con los modelos animales de estrés en etapas tempranas, permitirá implementar nuevos programas de salud que se enfoquen en la disminución del maltrato infantil temprano, no solo mediante su prevención y detección, sino también utilizando agentes terapéuticos que contrarresten los efectos a largo plazo inducidos por el estrés. Esto permitirá que las intervenciones tempranas en los niños maltratados, tengan un impacto superior en la reducción de los síntomas relacionados a la depresión.

Agradecemos el apoyo recibido por el CONACyT, mediante el proyecto CB 2014-243419-M (Reg. en IMSS FIS/IMSS/PROT/1386) a LT, así como mediante la beca de doctorado otorgada a LMSP.



Andersen, S.L. (2015). Exposure to early adversity: Points of cross-species translation that can lead to improved understanding of depression. *Dev Psychopathol*, 27(2): 477–491.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25997766>

Ritcher, L., Black, M., *et al.* (2019). Early childhood development: an imperative for action and measurement at scale. *BMJ Glob Health*; 4 (Sup. 4).

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6590994/>

Organización Mundial de la Salud (2018). *Temas de salud, depresión*.
<https://www.who.int/topics/depression/es/>

M.C. Luis Miguel Saavedra Pimentel, estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas Opción en Biotecnología Molecular Agropecuaria, en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

lmsp_603@hotmail.com

D.C. Luz Torner, Doctora investigadora Titular B, jefa del departamento de Neurociencias del Centro de investigaciones Biomédicas de Michoacán del Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIMI).

luz_torner@yahoo.com