

Tesis Doctoral

Alteraciones neuroinmunes inducidas por exposición a estrés prenatal. Participación de citoquinas y neurotrofinas. Influencia del sexo de la cría

Pascuan, Cecilia Gabriela

2015-03-30

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Pascuan, Cecilia Gabriela. (2015-03-30). Alteraciones neuroinmunes inducidas por exposición a estrés prenatal. Participación de citoquinas y neurotrofinas. Influencia del sexo de la cría. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Pascuan, Cecilia Gabriela. "Alteraciones neuroinmunes inducidas por exposición a estrés prenatal. Participación de citoquinas y neurotrofinas. Influencia del sexo de la cría". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-03-30.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Alteraciones neuroinmunes inducidas por exposición a estrés prenatal. Participación de citoquinas y neurotrofinas. Influencia del sexo de la cría

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad
de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Lic. Cecilia Gabriela Pascuan

Directora de tesis: Dra. Ana María Genaro

Consejero de estudios: Dr. Eduardo Artz

Lugar de Trabajo:

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-

Primera Cátedra de Farmacología. CONICET-UBA

Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED)-UCA-CONICET

Buenos Aires

30 de marzo 2015

Alteraciones neuroinmunes inducidas por exposición a estrés prenatal. Participación de citoquinas y neurotrofinas. Influencia del sexo de la cría.

En el presente trabajo estudiamos el efecto del estrés prenatal (EP) en la respuesta neuroinmune en animales adultos. Observamos que machos y hembras respondieron diferente ante el EP, tanto a nivel inmunológico como comportamental. Los machos presentan una mayor respuesta inmune innata en relación a una mayor secreción de IFN- γ . Las hembras presentan algunos trastornos conductuales asociados posiblemente a una disminución de BDNF así como también a un aumento central y periférico de IL-4 y a una disminución periférica de IFN- γ . Ante nuevas situaciones de estrés en la adultez observamos que, las hembras EP tienen una respuesta inmune desmejorada ante situaciones de estrés agudo y un peor desempeño en aquellas pruebas que evalúan la memoria espacial al ser expuestas a estrés crónico. Las alteraciones inmunológicas podrían estar relacionadas con una disminución del balance Th1/Th2 y un mayor efecto inhibitorio de los glucocorticoides. Los trastornos conductuales podrían estar asociados a una disminución del BDNF y a un aumento de los receptores a GC en hipocampo inducidos por EP. Los machos EP expuestos a estrés en la adultez presentan un aumento en la respuesta inmune innata que estaría relacionado con un aumento en los niveles de IFN- γ . Sin embargo, tienen una disminución en la inmunidad adaptativa, que al igual que las hembras, tendría relación con el mayor efecto inhibitorio ejercido por la corticosterona. Por otro lado, en los machos tanto controles como EP, la exposición a estrés agudo o crónico no indujo alteraciones importantes en las pruebas comportamentales realizadas.

Los resultados encontrados nos permiten concluir que el estrés materno induce cambios neuroinmunes en las crías que se pondrían especialmente en evidencia cuando estos individuos deben enfrentarse a nuevas situaciones de estrés en la adultez, siendo las hembras más sensibles que los machos. Además, hallamos que los cambios inducidos por exposición a EP se dan paralelamente en el hipocampo y en las células del sistema inmune. Podría entonces sugerirse que estas células pueden ser indicadores periféricos de una mayor susceptibilidad a padecer trastornos al ser expuestos a nuevas situaciones de estrés en la adultez.

Palabras claves: estrés prenatal, estrés agudo y crónico, citoquinas, neurotrofinas, glucocorticoides, catecolaminas, respuesta inmune, trastornos conductuales.

Neuroimmune alterations induced by prenatal stress exposure. Involvement of cytokines and neurotrophins. Influence of offspring gender.

In the present work we studied the effect of prenatal stress (PS) in the neuroimmune response in adult animals. We observed a different response to PS between male and female, regarding immune and behaviour parameters. Male mice showed higher innate immune response evidenced by the increase in NK activity, possibly because of a higher release of IFN- γ . Female mice presented some behavioural disorders associated to a decrease in BDNF, as well as to an increase in central and peripheric IL-4 and to a peripheral decrease of IFN- γ . In a new stressful situation in adult life, female PS present a reduced immune response caused by acute stress and a worse performance in spatial memory test caused by chronic stress. Immunologic alterations could be related to a decrease in the Th1/Th2 balance and to a higher inhibitory effect of glucocorticoids. Behavioural disorders could be associated to a decrease in BDNF and to a increase of hippocampal GC receptors induced by PS. PS male mice exposed to adult stress showed an increase in innate immune response which could be related to an increase in IFN- γ levels. However, they have a reduction in adaptative immune response, which as in the female, could be related to the higher corticosterone inhibitory effect. Also, in control and PS males no changes in behaviour tasks were caused by acute or chronic stress.

In conclusion, prenatal stress induce neuroimmune changes in the offspring that could be evidenced specially when the individuals are exposed to a new stressful situation in the adult life, being female more vulnerable than male mice. Furthermore, we found that changes induced by PS exposure occur simultaneously in hippocampus and in immune cells. We could suggest that these cells could be peripheral markers of susceptibility to deleterious effects of stress exposure in the adult life.

Key Words: prenatal stress; acute and chronic stress, cytokines, neurotrophins, glucocorticoids, catecholamines, immune response, Behavioural disorders.

Los resultados presentados en esta tesis han sido parcialmente publicados en:

“Prenatal stress induces up-regulation of glucocorticoid receptors on lymphoid cells modifying the T-cell response after acute stress exposure in the adult life.” **Pascuan CG**, Rubinstein MR, Palumbo ML, Genaro AM (2014). *Physiol Behav.* 128:141-147.

Involvement of nitric oxide, neurotrophins and HPA axis in neurobehavioural alterations induced by prenatal stress”. Maur Damian G, **Pascuan Cecilia G**, Genaro Ana M; Zorrilla-Zubilete María A (2015). *Adv Neurobiol.* 10:61-74.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a Ana por haberme dado un lugar en donde iniciarme en esto de ser una científica, por toda su ayuda y consejos en estos años, por permitirme crecer y darme la libertad para desenvolverme en el laboratorio siendo yo misma. Y en particular por su apoyo y dedicación en esta última etapa de escritura.

A Emi y María Rosa por toda la ayuda y compañía en mis experimentos maratónicos y en los momentos de locura, por el esfuerzo de llegar temprano en cada cultivo siempre con buena onda. Y Emi mil gracias por tu ayuda con los esquemas.

A Lenki, Edu, Bere, Dami, Flor y Joy Yami, Rocio, Elias , por tantos momentos lindos compartidos entre mates, pipetas y salidas, por su ayuda siempre por que cada uno en mayor o menos medida contribuyo un poquito en esta tesis. Y un especial agradecimiento a Lenki por su ayuda con el índice (todavía estaría haciéndolo sin su ayuda).

A toda la gente del labo y del otro labo (que también lo siento un poquito mi labo), Laurita, Miriam, Gra, Ale, Ali, María Laura y Celeste, por su buena onda y predisposición y ayuda en todo momento.

Un especial agradecimiento a María por toda su ayuda en estos años, por su buena onda diaria, siempre dispuesta a ayudarme cuando lo necesite y por los animalitos prestados a último momento.

A Daniel, el técnico del bioterio, que con tanta dedicación, cuido y mantuvo mis animales en las mejores condiciones posibles.

Al CEFyBO y a toda su gente, por el lindo ambiente de trabajo.

Al BIOMED- UCA y su gente, por la cálida recibida, en mi breve paso por él.

A la gente de la Primera Catedra de Farmacología de la UBA, en especial a Eva, Pato, Alfredo, y Eze que siempre me recibieron con una sonrisa y con buena onda.

AL CONICET y a la UBA por darme los recursos necesarios para poder llevar a cabo mi doctorado.

A la UBA y en particular a la FCEN de la UBA, en donde pase tantos momentos lindos, tantas clases, tantos conocimientos, tanto amigos, tantos mates.

A Ro, mi diario íntimo, mi apoyo incondicional en toda mi locura, el oído que me escucho en cada alegría y cada tristeza, cuando quería largar todo y volar y cuando volvía a tierra. Gracias Gracias Gracias.

A Sol gracias por tu ayuda en mi re-descubrimiento, en la vuelta a las raíces de lo que realmente soy.

A Mer, Dai, Mica, Belu y Caro, mis amigas de la facu, mis compañeras de la vida, de tantos mates y charlas entre apuntes, de salidas, por embarcarnos juntas en este

mundo del doctorado, compartir las mismas alegrías, las mismas frustraciones, los mismos nervios que el “señor Doctorado” implica.

A Ceci, Denise y Cintia, mis queridas amigas de siempre, que están siempre presentes y aunque pasen los años y aunque estemos lejos puedo contar con ellas cuando las necesito.

A mi familia, a mi mamá y a mi papa, por su apoyo incondicional siempre, en cada uno de mis emprendimientos e ideas, por darme las alas y las herramientas para volar alto y creer que todo es posible con solo propórmelo, por darme libertad de pensamiento y por enseñarme a cuestionar todo y no dar nada por sentado, por mostrarme un mundo en donde lo que importa es ser feliz y no seguir los estándares que la sociedad marca, a mis hermanos Markis, Lea y a los peques de mi vida: Mirki, Solcito, Leon (en camino) y mi princesita Ambarita, que tan feliz me hacen con sus sonrisas y su alegría. Los Amo.

A mi abuela, que siempre va a estar en mi corazón.

Al baile, mi escape, mi desenchufe, mis alas.

Simplemente Muchas Gracias!!!!

“Siempre he mantenido la misma convicción que tenía a los siete años de que la vida de las células que estudiaba tenía un propósito.”

-Bruce H. Lipton

“Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.”

-Marie Curie.

Ac: anticuerpo	LTP: potenciación a largo tiempo
ACTH: hormona adrenocorticotrófica	MHC: complejo mayor de histocompatibilidad
Ag: antígeno	MR: receptor de mineralocorticoides
APC: células presentadora de antígeno	NA: noradrenalina
AVP: arginina vasopresina	NGF: factor de crecimiento nervioso
BCR: receptor de linfocitos B	NK: células asesinas naturales
β2-AR: receptor beta adrenérgico	NTs: neurotrofinas
BDNF: Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro	NT-3: neurotrofina-3
CQs: citoquinas	NT-4/5: neurotrofina-4/5
CMS: modelo de estrés crónico moderado	NT-6: neurotrofina 6
Con A: concanavalina A	ON: óxido nítrico
CRH: factor liberador de corticotrofina	ROS: especies reactivas del oxígeno
DTH: respuesta de hipersensibilidad retardada	SI: sistema inmune
EA: estrés agudo en la vida adulta	SE: sistema endocrino
EC: estrés crónico en la vida adulta	SFB: suero fetal bovino
EIA: enzima –inmuno- ensayo	SN: sistema nervioso
EP: estrés prenatal	SNC: sistema nervioso central
EPA: estrés prenatal y estrés agudo en la vida adulta	SNP: sistema nervioso periférico
EPC: estrés prenatal y estrés crónico en la vida adulta	PHA: fitohemaglutinina
GCs: glucocorticoides	PIBF: factor bloqueador inducido por progesterona
GR: receptor de Glucocorticoides	PMN: polimorfonucleares
GM-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos-macrofagos	TCR: receptor de linfocitos T
GRC: glóbulos rojo de carnero	TGF: factor de crecimiento tumoral
Ig: Inmunoglobulinas	Th: LT colaborador o helper
IFN: interferón	Th1: LT helper 1
IL: interleuquina	Th2: LT helper 2
LB: linfocitos B	Th7: LT helper 7
LIF: factor inhibidor de leucemia	Th9: LT helper 9
LPS: lipopolisacárido de membrana	Th22: LT helper 22
LT: linfocitos T	Treg: LT regulador
	TKr: receptor de tirosin kinasas
	Tfh: LT helper folicular
	TLR: receptor tipo Toll
	TLRs: receptores tipo Toll

TNF: factor de necrosis tumoral

T_{MC}: linfocitos t de memoria central

T_{ME}: linfocitos t de memoria efectores

1-INTRODUCCIÓN	15
1-1. SISTEMA INMUNE	16
1-1-1. INMUNIDAD INNATA Y ADQUIRIDA	16
1-1-2. CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE	17
1-1-2-1. Macrófagos	17
1-1-2-2. Células natural killer (NK)	18
1-1-2-3. Linfocitos B	19
1-1-2-4. Linfocitos T	20
1-1-3. MEMORIA INMUNITARIA. RESPUESTA PRIMARIA Y SECUNDARIA	23
1-2. SISTEMA NERVIOSO	25
1-2-1. EL HIPOCAMPO	25
1-2-2. APRENDIZAJE Y LA MEMORIA	26
1-3. EJE HIPOTALÁMICO-HIPOFISARIO-ADRENAL	27
1-4. INTERACCIÓN ENTRE EL SISTEMA INMUNE, EL SISTEMA NERVIOSO Y EL EJE HPA	29
1-4-1. ACCIÓN DE LAS CITOQUINAS EN EL SISTEMA NERVIOSO	32
1-5. FACTORES NEUROTRÓFICOS	33
1-5-1. NEUROTROFINAS	33
1-5-2. NEUROTROFINAS Y SISTEMA NERVIOSO	34
1-5-2. NEUROTROFINAS Y SISTEMA INMUNE	35
1-6. ESTRÉS	36
1-6-1. ESTRÉS PRENATAL	39
2-HIPOTESIS Y OBJETIVOS	42
2-1. HIPÓTESIS	43
2-2. OBJETIVOS	44
2-2-1. OBJETIVO GENERAL	44
2-2-2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
3-MATERIALES Y MÉTODOS	46
3-1. ANIMALES	47
3-2. MODELOS DE ESTRÉS	48
	10

3-2-1. MODELO DE ESTRÉS PRENATAL	48
3-2-3. MODELO DE ESTRÉS CRÓNICO	49
3-3. EVALUACIÓN DE CAMBIOS INMUNOLÓGICOS	50
3-3-1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE MACRÓFAGOS.	50
3-3-2. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE CÉLULAS NK	51
3-3-3. EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN LINFOCITARIA	51
3-3-4. ANÁLISIS DEL EFECTO DE CORTICOSTERONA Y CATECOLAMINAS SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR	52
3-3-5. DETERMINACIÓN DE LAS POBLACIONES CD4+ Y CD8+ POR CITOMETRÍA DE FLUJO	53
3-3-6. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A UN DESAFÍO ANTIGÉNICO	53
3-4. DETERMINACIÓN DE NIVELES DE CATECOLAMINAS	55
3-5. DETERMINACIÓN DE NIVELES DE CORTICOSTERONA	56
3-6. DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS EN SOBRENADANTE DE GANGLIO	57
3-7. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE NEUROTROFINAS, CITOQUINAS Y RECEPTORES EN HIPOCAMPO Y EN LINFOCITOS	57
3-8. WESTERN BLOT	59
3-9. PRUEBAS CONDUCTUALES	61
3-9-1. PRUEBA DE ALTERNANCIA	61
3-9-2. ACTIVIDAD LOCOMOTORA EN UN CAMPO ABIERTO Y HABITUACIÓN	62
3-9-3. PRUEBA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS	63
3-9-4. RECONOCIMIENTO ESPACIAL DE OBJETOS	64
3-9-5. PRUEBA DE LABERINTO ELEVADO EN CRUZ	65
3-9-6. PRUEBA DE EVITACIÓN PASIVA	66
3-10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	67
4-RESULTADOS	68
<hr/>	
PRIMERA PARTE: EFECTOS DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE EL SISTEMA INMUNE Y PARÁMETROS CONDUCTUALES DE CRÍAS ADULTAS	69
<hr/>	
4-1. PARÁMETROS GESTACIONALES DE LA HEMBRA PREÑADA Y DE LAS CRÍAS	69
4-2. EFECTOS DEL EP SOBRE EL SISTEMA INMUNE	71
4-2-1. INMUNIDAD INNATA	71
4-2-1-1. Actividad de NK	71
4-2-1-2. Actividad fagocítica de macrófagos	72
	11

4-2-2. RESPUESTA ADAPTATIVA	73
4-2-2-1. Respuesta proliferativa en linfocitos T estimulados con Con A	73
4-2-2-2. Distribución de subpoblaciones linfocitarias	73
4-2-2-3. Respuesta Inmune mediada por linfocitos B <i>in vitro</i>	74
4-2-2-4. Evaluación de la respuesta inmune <i>in vivo</i>	75
4-2-3. DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS	77
4-3. INFLUENCIA DE CORTICOSTERONA Y CATECOLAMINAS SOBRE LA RESPUESTA INMUNE	81
4-3-1. NIVELES DE CORTICOSTERONA	82
4-3-2. NIVELES DE CATECOLAMINAS	82
4-3-3. PESO DE LAS GLÁNDULAS ADRENALES	83
4-3-4. EFECTO DE CORTICOSTERONA Y EPINEFRINA EN LA RESPUESTA PROLIFERATIVA	84
4-3-5. NIVELES DEL RECEPTOR PARA GLUCOCORTICOIDES (GR) Y DEL RECEPTOR B ₂ -ADRENÉRGICO	85
4-4. NIVELES DE NEUROTROFINAS EN LINFOCITOS	88
4-5. EFECTOS DEL EP SOBRE EL COMPORTAMIENTO. ANÁLISIS DE GENES RELACIONADOS	91
4-5-1. EVALUACIÓN DE LA CONDUCTA	91
4-5-1-1. Prueba de alternancia	91
4-5-1-2. Actividad locomotora en campo abierto	92
4-5-1-3. Prueba de habituación	93
4-5-1-4. Prueba de ansiedad. Laberinto elevado en cruz	95
4-5-1-5. Test de evitación pasiva	96
4-5-1-1. Reconocimiento de objetos	97
4-5-1-7. Reconocimiento espacial de objetos	98
4-5-2. NIVELES DE NEUROTROFINAS EN HIPOCAMPO	99
4-5-3. NIVELES DE CITOQUINAS EN HIPOCAMPO	102
4-5-4. NIVELES DEL RECEPTOR PARA GLUCOCORTICOIDES (GR) Y DEL RECEPTOR B ₂ -ADRENÉRGICO EN HIPOCAMPO	104
4-6. RESUMEN DE RESULTADOS PRIMERA PARTE	106
<u>SEGUNDA PARTE: EFECTOS DEL EP SOBRE PARÁMETROS NEUROIMUNES Y CONDUCTUALES EN ANIMALES A UNA SITUACIÓN DE ESTRÉS EN LA VIDA ADULTA</u>	<u>108</u>
<u>A - EFECTOS DEL EP EN ANIMALES EXPUESTOS A ESTRÉS AGUDO</u>	<u>108</u>
4-7. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE	108

4-7-1. INMUNIDAD INNATA	108
4-7-1-1. Actividad citotóxica de células NK	108
4-7-1-2. Actividad Fagocítica de macrófagos	110
4-7-2. RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA	110
4-7-2-1. Respuesta proliferativa en linfocitos T estimulados con Con A	110
4-7-2-2. Distribución de subpoblaciones linfocitarias	111
4-7-2-3. Respuesta inmune mediada por linfocitos B <i>in vitro</i>	112
4-7-2-4. Evaluación de la respuesta inmune <i>in vivo</i>	113
4-7-2. EFECTO DEL ESTRÉS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS	115
4-8. EFECTOS DE LAS HORMONAS DEL ESTRÉS	117
4-8-1. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CORTICOSTERONA	117
4-8-2. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CATECOLAMINAS	118
4-8-3. EFECTO DE LAS HORMONAS DEL ESTRÉS SOBRE LA PROLIFERACIÓN	119
4-9. EFECTOS DEL EP SOBRE EL COMPORTAMIENTO EN ANIMALES EXPUESTOS A ESTRÉS AGUDO	122
4-9-1. PRUEBAS CONDUCTUALES	122
4-9-1-1. Prueba de alternancia	122
4-9-1-2. Actividad locomotora en campo abierto	122
4-9-1-3. Prueba de habituación	124
4-9-1-4. Prueba de ansiedad. Laberinto elevado en cruz	126
<u>B- EFECTOS DEL EP EN ANIMALES EXPUESTOS A ESTRÉS CRÓNICO</u>	<u>128</u>
4-10. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE	128
4-10-1. INMUNIDAD INNATA	128
4-10-1-1. Actividad citotóxica de células NK	128
4-10-1-2. Actividad fagocítica de macrófagos	129
4-10-2. INMUNIDAD ADAPTATIVA	130
4-10-2-1. Respuesta proliferativa en linfocitos T estimulados con Con A	130
4-10-2-2. Distribución de subpoblaciones linfocitarias	131
4-10-2-3. Respuesta mediada por linfocitos B	132
4-10-2-4. Producción de anticuerpos frente a un desafío antigénico	133
4-10-3. EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN GANGLIOS	135
4-11. INFLUENCIA DE CORTICOSTERONA Y CATECOLAMINAS SOBRE LA RESPUESTA INMUNE	141
4-11-1. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CORTICOSTERONA Y CATECOLAMINAS	141

4-11-2. PESO DE LAS GLÁNDULAS ADRENALES	142
4-11-3. EFECTO DE LAS HORMONAS DEL ESTRÉS SOBRE PROLIFERACIÓN	142
4-11-4. NIVELES DEL RECEPTOR PARA GLUCOCORTICOIDES (GR) Y DEL RECEPTOR β_2 -ADRENÉRGICO	144
4-12. EXPRESIÓN DE NEUROTROFINAS EN GANGLIOS LINFÁTICOS	147
4-13. EFECTOS DEL EP SOBRE EL COMPORTAMIENTO EN ANIMALES EXPUESTOS A ESTRÉS CRÓNICO. ANÁLISIS DE GENES RELACIONADOS	152
4-13-1. PRUEBAS CONDUCTUALES	152
4-13-1-1. Prueba de alternancia	152
4-13-1-2. Actividad locomotora en campo abierto	153
4-13-1-3. Prueba de habituación	154
4-13-1-4. Prueba de ansiedad. Laberinto elevado en cruz	156
4-13-1-5. Prueba de evitación pasiva	157
4-13-1-6. Reconocimiento de objetos	158
4-13-1-7. Reconocimiento espacial de objetos	159
4-13-2. EXPRESIÓN DE NEUROTROFINAS EN HIPOCAMPO	160
4-13-3. NIVELES DEL RECEPTOR PARA GLUCOCORTICOIDES (GR) Y DEL RECEPTOR β_2 -ADRENÉRGICO	164
4-13-4. NIVELES DE CITOQUINAS EN HIPOCAMPO	167
4-14. RESUMEN DE RESULTADOS	170
5-DISCUSIÓN	173
6-BIBLIOGRAFÍA	192

1-Introducción

1-1. Sistema inmune

El Sistema inmune (SI) está conformado por una serie de órganos, tejidos y células que se encuentran distribuidos de manera amplia por todo el cuerpo. Estructuralmente el SI está formado por órganos macizos como el timo, el bazo y los ganglios linfáticos y estructuras tubulares como los vasos linfáticos que se encuentran intercomunicando algunos de los órganos mencionados anteriormente. Teniendo en cuenta las funciones que realizan estos órganos se pueden clasificar en primarios y secundarios. En los órganos primarios, el timo y la médula ósea, se generan las células que conforman al SI (linfopoyesis) y además en éstos los linfocitos adquieren su repertorio de receptores específicos para cada tipo de antígeno (Ag). Los órganos secundarios hospedan las células capacitadas funcionalmente para interactuar con microorganismos o Ag, atrapados por estos órganos, en un microambiente adecuado para que las mismas interactúen con dichos agentes extraños al organismo y los eliminen. Los órganos linfoides secundarios incluyen el bazo, los ganglios linfáticos y el tejido linfoide asociado a las mucosas, como las amígdalas y las placas de Peyer del intestino.

El rol primario del SI es entonces proteger al organismo de agentes perjudiciales externos. Juega además un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis antigénica del organismo eliminando clones autoreactivos, es decir que reconozcan Ag propios (Fainboim y Geffner, 2005).

1-1-1. Inmunidad Innata y Adquirida

Existen dos tipos de inmunidad, la innata y la adquirida o adaptativa. La inmunidad innata es la primera línea de defensa ante una infección o un agente tóxico (Medzhitov y Janeway, 2000), forman parte de ésta la piel y los epitelios de los tractos digestivo, respiratorio y genitourinarios, así como también diversos tipos de células, como mastocitos, macrófagos, células natural killer, neutrófilos entre otras. Además involucra el sistema del complemento y proteínas de fase aguda.

El SI adaptativo evolucionó en los vertebrados primitivos y permite una respuesta inmunitaria mayor, así como el establecimiento de la denominada memoria inmunológica que proporciona una respuesta mejorada a encuentros secundarios con ese mismo patógeno específico. La inmunidad adaptativa puede clasificarse en dos tipos la inmunidad celular, mediada por Linfocitos T (LT) y la inmunidad humoral mediada por Linfocitos B (LB).

Los LB y LT reconocen motivos particulares presentes en los patógenos. El linfocito B o T que reconoce su Ag se activa y sufre un proceso de expansión clonal generando así una progenie de idéntica especificidad antigénica compuesta por miles de células. En la figura 1 se muestra un esquema representativo de las células que componen la inmunidad innata y adaptativa.

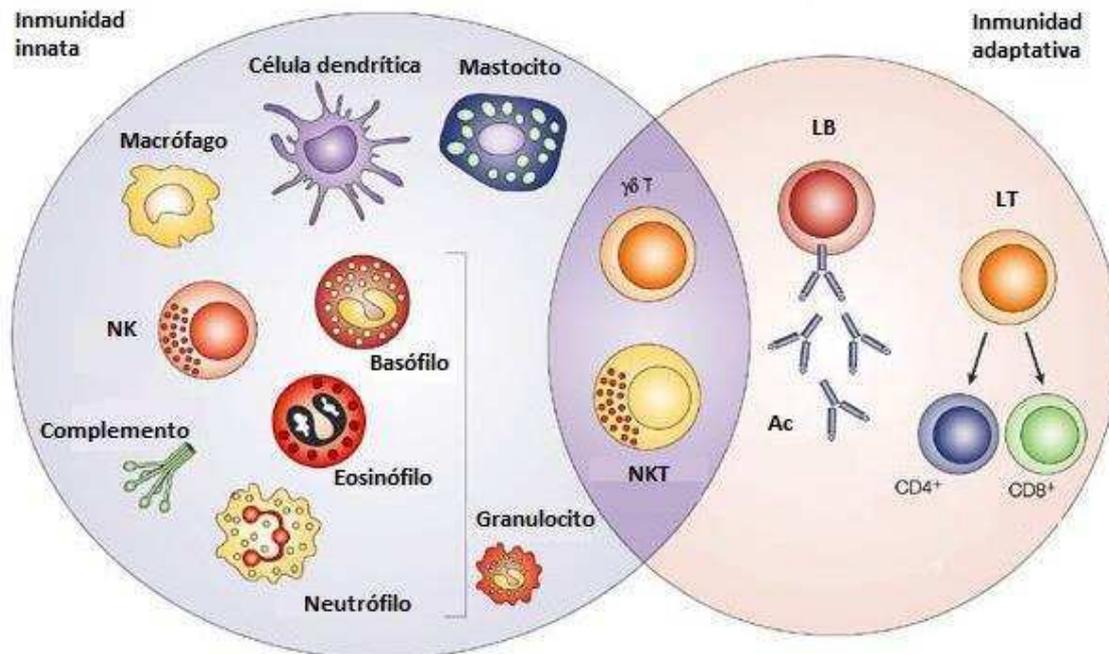


Figura 1: Inmunidad Innata y adquirida. Se muestra un esquema representativo de las células de la inmunidad innata y adquirida (modificado de Dranoff 2004).

1-1-2. Células del Sistema inmune

1-1-2-1. Macrófagos

Los macrófagos se describieron originalmente hace 150 años por Slavjanski y Metchnikoff. Poseen una notable plasticidad y pueden cambiar su fisiología en respuesta a factores ambientales.

La mayoría de los macrófagos derivan de precursores de la médula ósea que se desarrollan en monocitos. Estos se forman en la médula ósea de células madres del linaje granulocítico–monocítico expuestos a citoquinas como el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) e interleuquina 3 (IL-3). La diferenciación está asociada con la expresión de receptores de membrana específicos para citoquinas. Los monocitos permanecen en la médula ósea por 24 horas y luego van al torrente sanguíneo y circulan por el cuerpo. Luego de pasar al tejido conectivo los monocitos se diferencian en macrófagos, este proceso involucra muchos cambios

en la célula como el aumento de tamaño desde 5 a 10 veces, aumento del número y complejidad de las organelas, aumento de la capacidad fagocítica, etc (Arango Duque y Descoteaux, 2014)

Los macrófagos son células fagocíticas profesionales, que mantienen la homeostasis de los tejidos, por ejemplo, fagocitan aproximadamente 2×10^{11} eritrocitos por día. Este proceso de limpieza es clave para la supervivencia del organismo. Los macrófagos también están involucrados en la eliminación de los detritos celulares que se generan durante la remodelación de tejidos y rápidamente eliminan células apoptóticas (Mosser y Edwards 2008). Como células del SI, reconocen microorganismos y los eliminan por fagocitosis, poseen gran capacidad microbostática y microbicida, mediada por mecanismo oxígeno-dependiente y oxígeno independiente. Otra de sus características es ser células presentadoras de antígenos. Además producen citoquinas y quimioquinas proinflamatorias.

La actividad de los macrófagos puede ser aumentada por citoquinas secretadas por células T helper, entre las cuales el interferón gamma (IFN- γ) es uno de los más potentes activadores. Existen dos tipos de vías de activación de macrófagos, la clásica (M1) y la alternativa (M2). La polarización M1-M2 es un proceso estrechamente controlado que involucra transducción de señales y regulaciones transcripcionales y post transcripcionales. El fenotipo M1 es estimulado por productos microbianos y citoquinas pro-inflamatorias como IFN- γ , factor de necrosis tumoral (TNF), o ligandos del receptor tipo toll (TLR). Las características típicas de estos macrófagos incluyen presentación de Ag, alta producción de IL-13 e IL-23 y alta producción de óxido nítrico (NO) y especies reactivas del oxígeno (ROS). En contraste, los macrófagos tipo M2 son el fenotipo de “descanso” y se observan en situaciones normales sin infecciones. Este tipo de respuesta puede ser también amplificado por IL-4, IL-10 o IL-13 (Wang y col., 2014).

1-1-2-2. Células natural killer (NK)

Las células NK son linfocitos que funcionan en la interfaz entre la inmunidad innata y adquirida. Contribuyen directamente en la defensa a través de sus funciones efectoras, como su actividad citotóxica y la secreción de citoquinas, e indirectamente por la regulación de APC y de la respuesta adaptativa de células T (Long y col. 2013)

Las células NK fueron originalmente definidas como linfocitos con reactividad espontánea ante ciertas células tumorales. Ahora sabemos que éstas proveen una importante primera línea de defensa frente a parásitos, virus y cáncer.

Las células NK no solo contienen la replicación viral matando células infectadas durante las etapas tempranas de la infección antes del desarrollo de la inmunidad adaptativa, sino que también juegan un papel inmuno-regulador crítico durante el desarrollo de la misma (Jost y Altfeld, 2013).

Estas células derivan del progenitor linfoide común, pero son independientes del timo y poseen un receptor de superficie que no se somete a recombinación somática.

Las células NK eliminan preferentemente células con bajo o nulo complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo 1, son estimuladas por diferentes receptores de activación que reconocen una variedad de ligandos en las potenciales células diana (Moretta y col., 2001). Los receptores pueden disparar las funciones de las células NK por diferentes vías de señalización. Además, receptores inhibitorios pueden controlar efectivamente la activación celular. Por lo tanto la actividad de las células NK está estrechamente regulada por interacción entre receptores de superficie de activación y de inhibición. Además de la regulación por los receptores, existen otros niveles en donde la actividad de estas células puede ser controlada (Watzl y col., 2014).

Pueden ser activadas por varias citoquinas incluidas IFN tipo 1, IL-2, IL-15, IL-12 e IL-18. Una vez activada ejercen su acción a través de la secreción de citoquinas fundamentalmente IFN- γ y la activación de su potencialidad citotóxica por medio de la exocitosis o secreción de sus gránulos y la activación de receptores de muerte.

1-1-2-3. Linfocitos B

En los mamíferos el desarrollo de los linfocitos B ocurre en el hígado fetal durante el desarrollo embrionario, luego migran hacia la médula ósea en el período perinatal, en donde los linfocitos son generados continuamente a lo largo de la vida.

El correcto desarrollo del precursor linfoide en LB que expresa el receptor de superficie específico, requiere señales del microambiente especializado constituido por células estromales no linfoides que interactúan íntimamente con el linfocito en desarrollo, aportando apoyo parácrino por producción de factores humorales como citoquinas y factores de crecimiento, y apoyo físico por interacciones moleculares de superficie de membrana (Panaroni y Wu, 2013).

Los linfocitos B cumplen la función de generar anticuerpos (Ac), función que llevan a cabo una vez diferenciados. Además de la producción de Ac, los linfocitos B pueden actuar como eficientes células presentadoras de Ag estimulando células T y permitiendo un desarrollo óptimo de memoria en la población de células T CD4+. También producen citoquinas como IL-4, IL-6 e IL-10, TNF- α , las cuales poseen efectos

regulatorios sobre las células dendríticas presentadores de Ag y en la supervivencia de otras células mononucleares. Los linfocitos B pueden responder y generar factores quimiotácticos responsables de la migración de linfocitos y además tienen un rol en los procesos de infiltración celular mediada por inflamación. Además pueden sintetizar moléculas asociadas a membrana que ayudan y dan soporte a linfocitos T adyacentes (Carter, 2006).

Los LB responden a dos tipos distintos de Ag los Ag timo-independientes (T-independientes), como por ejemplo las estructuras poliméricas presentes en la pared de las bacterias Gram-negativas (lipopolisacárido de membrana, LPS), que inducen una respuesta sin necesidad de la colaboración de los LT y los Ag timo-dependientes (T-dependientes), como los glóbulos rojos de carnero (GRC) que necesitan de las células T para producir una óptima producción de Ac. La interacción de los Ag con sus receptores produce la activación del LB, que prolifera y se diferencia en célula plasmática, que es la célula efectora, y secreta activamente Ac específicos contra el Ag que las activó.

Los LB reconocen a su Ag a través de receptores de membrana. Para los Ag T-dependientes los receptores son inmunoglobulinas (Ig) de membrana de tipo IgD e IgM (BCR). El procesamiento y presentación de Ags T-dependientes a células T efectoras estimula la producción de citoquinas y la expresión en superficie de CD40, que actúa sobre las células B para inducir la progresión y diferenciación del ciclo celular. Existen dos tipos de Ag T-independientes, los Ag TI-1 que no estimulan las células B a través del BCR si no a través de receptores de tipo Toll (TLRs), como por ejemplo el LPS que estimula al LB a través del TLR-4 (Medzhitov y Janeway, 2000) y los Ags TI-2 que reaccionan de forma cruzada con BCR (Fainboim y Geffner, 2005).

1-1-2-4. Linfocitos T

La respuesta inmune de tipo celular cumple una importante función como mecanismo inmunológico de defensa, actuando principalmente frente a bacterias y virus, así como evitando la aparición y desarrollo de células tumorales. Los LT reconocen el Ag mediante un receptor de membrana (TCR), pero a diferencia de los LB, que reconocen antígenos nativos, los LT lo hacen sólo cuando el Ag es degradado y procesado en el interior de las APC o de células infectadas y sus determinantes antigénicos son expuestos en la superficie de estas células en el contexto de una molécula del MHC.

Existen diversos tipos de linfocitos T. En función de la expresión de moléculas de superficies CD4 y CD8 se clasifican en dos grupos; las células T CD4⁺ y células T CD8⁺.

Los linfocitos T CD4⁺ reconocen Ag procesados proteolíticamente y expuestos en el contexto de moléculas del MHC de clase II de las APC. Por otra parte, los linfocitos citotóxicos CD8⁺ reconocen a los Ag que han sido procesados endógenamente en el citosol de la célula infectada y presentados en superficie por moléculas MHC de clase I (Fainboim y Geffner, 2005).

Las células CD4⁺ a su vez se dividen en T helper 1 (Th1), T helper 2 (Th2), T helper 9 (Th9), T helper 17, T helper 22 (Th22), T reguladores (T_{Reg}) y T helper folicular (T_{fh}) de acuerdo con su perfil funcional, determinado fundamentalmente por el patrón de citoquinas producido.

Las Th9 se desarrollan a partir de las células T virgen en presencia del factor transformador del crecimiento β (TGF- β) e IL-4. Producen IL-9 y también IL-10 e IL-21, aunque la producción de estas dos últimas no está regulada en coordinación con la producción de IL-9, y su rol en la función de las células Th9 no es conocida aún. La función de las Th9 está asociada a una amplia variedad de enfermedades inflamatorias (Kaplan, 2013).

Las células Th17 constituyen una población celular productora de IL-17A, IL-17F, TNF- α , IL-22 y GM-CSF. Están involucradas en procesos inflamatorios como artritis reumatoidea, asma, lupus y rechazo de aloinjertos. Una función importante de la IL-17 es promover la inflamación de tejidos a través de una regulación positiva sobre citoquinas inflamatorias y quimioquinas (Chang y col., 2014; Chung y col., 2005).

Las células Th22 secretan IL-22, no expresan IL-17, IL-4 o IFN- γ , y ejercen sus efectos a través del receptor IL22R, el cual es un complejo de receptores transmembrana que consiste en IL22R1 e IL-10R2. Juegan un papel clave en la injuria de tejidos, incluyendo autoinmunidad órgano específica (Duhon y col., 2009; Guo y col., 2014).

Las células T_{fh} son células especializadas en ayudar a los linfocitos B, dependen de la expresión del factor de transcripción Bcl6. Estas son importantes en la formación del centro germinal, y una vez formado éste son importantes en el mantenimiento y la regulación de la diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas y de memoria. Expresan IL-21, CXCR5, PD-1, SAP (SH2D1A), IL-21, e ICOS (Crotty, 2011).

Las células Treg expresan el factor de transcripción Foxp3 y poseen un rol en el mantenimiento de la tolerancia inmune. Las Treg se desarrollan en el timo a partir de células CD4 simples positivas inmaduras que posean TCR con una aumentada afinidad para el acoplamiento de Ag. Como consecuencia de esto las células Treg

exportadas a la periferia exhiben un repertorio de TCR orientados al reconocimiento propio (Levine y col., 2014).

Las células Th1 secretan INF- γ , IL-2 y TNF. Se generan a partir de células T vírgenes activadas por células detriticas especializadas que producen IL-6. Las células Th1 son inducidas en infecciones con patógenos intracelulares como bacterias y virus, y pueden activar macrófagos (Geginat y col., 2014). Las células Th1 están involucradas en la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) que es la responsable del reclutamiento de otras células inflamatorias en los tejidos periféricos infectados y la diferenciación de células CD8+ en células citotóxicas maduras. Un ejemplo de respuesta DTH mediada por células Th1 es la prueba de tuberculina cutánea.

Las células Th2 secretan IL-4, IL-10, IL-5, IL-13 y TGF- β . Se generan a partir de células T vírgenes estimuladas con IL-4. Cumplen un papel principal en la inmunidad frente a bacterias y parásitos extracelulares (Fainboim y Geffner, 2005). También están implicadas en reacciones alérgicas: la IL-4 activa la producción de IgE por los linfocitos B y la IL-5 activa a los eosinófilos (Elenkov, 2004).

La generación de respuesta Th1 y Th2 suele ser mutuamente excluyente. Existe una regulación cruzada entre Th1 y Th2. El IFN- γ secretado por las Th1 inhibe la proliferación de las Th2. Por su lado, la IL-10 y la IL-4 secretadas por las Th2 inhiben la secreción de IL-2 e IFN- γ por parte de las Th1. La inhibición ejercida por la IL-10 no es directa, ésta reduce el número de moléculas de MHC-II de las APC por lo cual éstas disminuyen su capacidad de activar a las Th1. El predominio de una u otra de las dos subpoblaciones de linfocitos Th depende a su vez del microambiente de citoquinas en que ocurre la activación y maduración inicial a partir de linfocitos en reposo (Fainboim y Geffner, 2005). Recientemente se observó que las células Th1 y Th2 pueden adquirir la capacidad de producir citoquinas y propiedades funcionales diferentes tras la re-estimulación antigénica bajo la influencia de ciertas citoquinas, por lo tanto son mucho más flexibles de lo que se pensaba (Geginat y col., 2014). En la figura 2 puede verse un esquema general de la respuesta inmune.

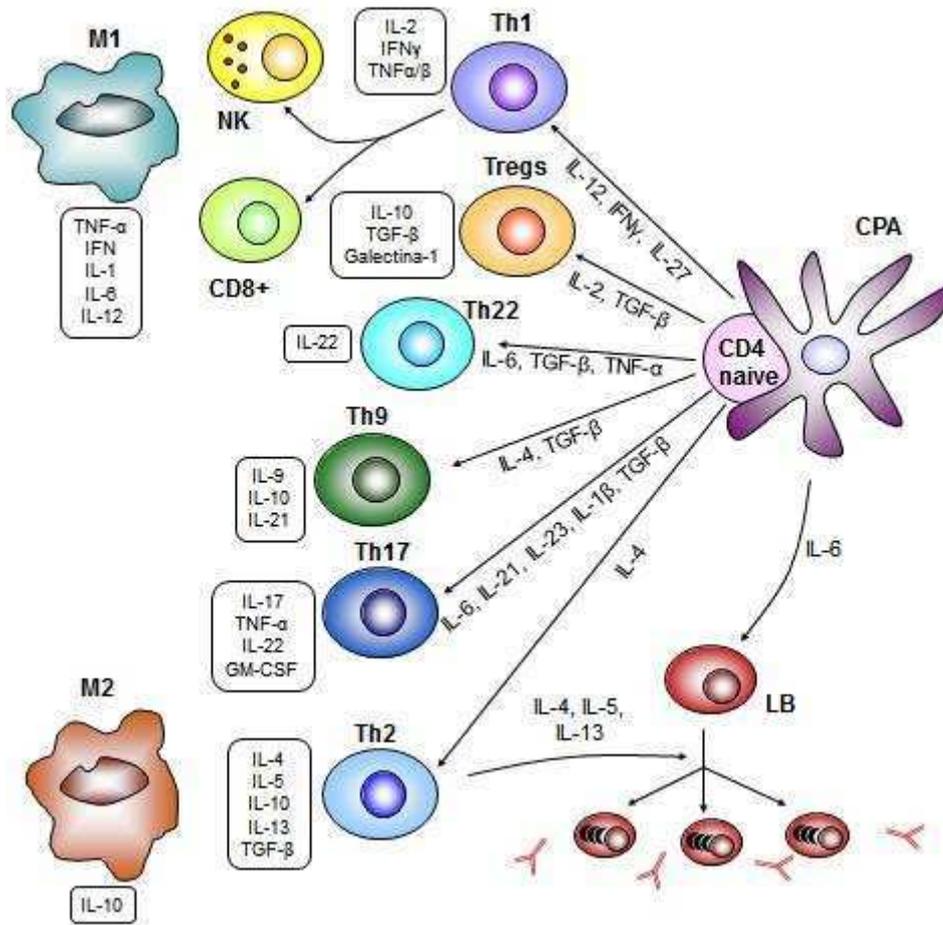


Figura 2: Respuesta Inmune. La figura representa un esquema general de la respuesta inmune. Se muestran las principales células del SI y las citoquinas que liberan y/o estimulan su diferenciación.

1-1-3. Memoria inmunitaria. Respuesta primaria y secundaria

Cuando un linfocito reconoce a su Ag, se activa y se produce una expansión clonal del mismo. Algunos de esos clones actuarán como células efectoras en la defensa contra el patógeno que despertó la respuesta, otras se diferenciarán en células de memoria que perdurarán en el organismo y podrán actuar frente a una reexposición al mismo patógeno, garantizando una respuesta más rápida y eficiente.

Los LT CD4⁺ generan células de memoria que se pueden dividir en dos subpoblaciones: los linfocitos T de memoria efectoras (T_{ME}) y los linfocitos T de memoria centrales (T_{MC}). Las T_{ME} expresan determinadas moléculas de adhesión y receptores para quimioquinas que les permiten ingresar a los tejidos periféricos, y al ser activados secretan rápidamente las citoquinas efectoras. Los T_{MC} expresan moléculas de adhesión que les permiten entrar a los órganos linfáticos secundarios.

Poseen mayor capacidad de proliferación frente a la re-estimulación antigénica en relación con los T_{ME} (Fainboim y Geffner, 2005). Los $LT\ CD8^+$ también poseen la capacidad de generar células de memoria.

En la inmunidad humoral deben distinguirse la respuesta inmune primaria de la secundaria. La respuesta inmune primaria se produce cuando el organismo se pone en contacto con un Ag por primera vez. Es lenta, alcanza los niveles máximos de Ig tras un largo período de latencia (fase lag o de retardo), que es el tiempo requerido para la selección de un clon específico de células B y la producción de células plasmáticas secretoras de Ac y de células B de memoria. Luego se produce un aumento exponencial (hasta alcanzar un pico máximo) seguido de una meseta y un posterior declive. En total la respuesta puede durar desde unos días a varias semanas, dependiendo de la persistencia del Ag. Para Ags T-dependientes, se produce primero IgM, y luego IgG, siendo la contribución global de la IgM más importante en el primer contacto con el Ag. Para este tipo de Ag, la respuesta secundaria posee diferencias importantes respecto a la respuesta primaria. Se inicia más rápidamente (menor fase lag), alcanza más intensidad (100 a 1000 veces mayor), dura más tiempo y se produce preferentemente IgG, aunque también IgA e IgE, en lugar de IgM (Figura 3 A). Para Ags T-independientes, tanto en la respuesta primaria como en la secundaria, el Ac producido es de tipo IgM (Figura 3 B). Por último cabe destacar que la memoria inmunitaria de los LB suele ser de mayor duración que la generada por LT.

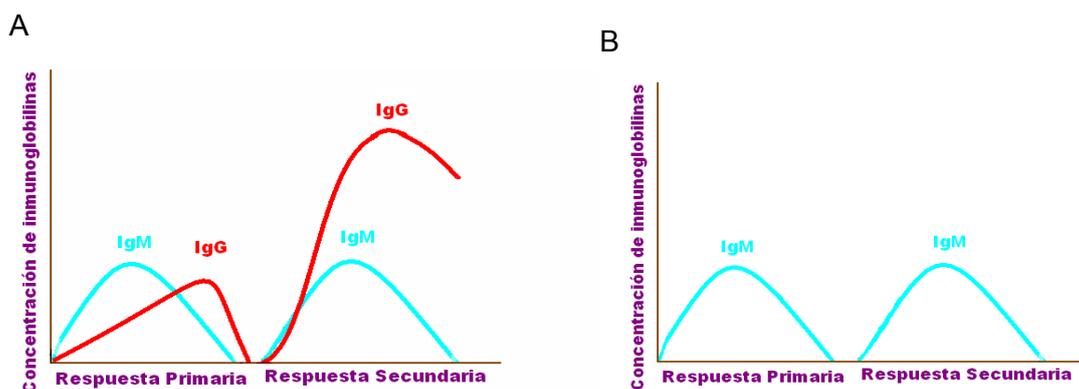


Figura 3: Respuesta primaria y secundaria. (A) Respuesta inmune inducida por un antígeno T-dependiente. (B) Respuesta inmune inducida por un antígeno T-independiente.

1-2. Sistema Nervioso

EL sistema nervioso (SN) es el sistema de percepción, pensamiento y control de nuestro organismo. Se divide en sistema nervioso central (SNC), que comprende a su vez el encéfalo y la médula espinal, y en sistema nervioso periférico (SNP) (Guyton, 1994).

El encéfalo o cerebro de los mamíferos está compuesto de tres partes principales, el rombencéfalo, filogenéticamente "viejo", que da lugar al puente troncoencefálico, cerebelo y médula; el mesencéfalo que forma el cerebro medio; y el filogenéticamente "nuevo" prosencéfalo que se desarrolla en el telencéfalo y diencefalo. El primero da lugar a los hemisferios cerebrales y los ganglios basales, y el segundo al tálamo e hipotálamo (Erecinska y col., 2004).

En los mamíferos, las etapas tempranas de la vida constituyen un período vulnerable para la adecuada maduración de las capacidades cognitivas y emocionales de los individuos. La etapa neonatal constituye un período sensible capaz de responder a factores ambientales externos debido a su mayor plasticidad, comparado con etapas adultas (Wang, 2004). Cada región del cerebro experimenta una maduración temporal independiente y cada una posee distintas ventanas de vulnerabilidad, tanto pre como postnatal (Rice y Barone, 2000).

1-2-1. El Hipocampo

El hipocampo, junto con la amígdala, forma el eje central del sistema límbico. Es una estructura cerebral derivada de la corteza, filogenéticamente muy antigua, y de estructura simple y ordenada. Es un objeto de estudio de sumo interés, dado que está involucrado en la formación de diversos tipos de aprendizaje y memoria (Fellini y col., 2009), es una región de neurogénesis en la adultez (Abrous y col., 2005) y está conectado con muchas otras regiones cerebrales, cumpliendo una función integradora. El hipocampo consta de capas de células morfológicamente y/o funcionalmente diferenciadas: giro dentado, CA1, CA2 y CA3. Presenta un circuito tri-sináptico que recibe aferencias de la corteza entorrinal (integrador sensorial multimodal) y proyecta eferencias hacia la corteza entorrinal, al subiculum y otras estructuras subcorticales. Además, se conecta con el hipotálamo y el núcleo supraquiasmático. Entre los neurotransmisores involucrados en su funcionamiento están el glutamato, GABA, Ach, DA, 5-HT, NA, neuropéptidos y endocannabinoides. El hipocampo presenta receptores

de hormonas esteroideas adrenales, gonadales y de la tiroides. Además, neurotrofinas como el BDNF y el NGF son abundantes.

El hipocampo se desarrolla durante la vida intrauterina, pero en roedores, continúa desarrollándose postnatalmente. La secuencia de desarrollo cerebral de roedores y seres humanos es semejante, sin embargo el desarrollo cerebral de los roedores en el nacimiento equivale, en grado de avance, al desarrollo de humanos en el segundo trimestre de gestación (Weinstock, 2001). El desarrollo de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo de roedores ocurre mayoritariamente durante la tercera semana de preñez, lo que equivale, aproximadamente, a comienzos del segundo trimestre de embarazo en humanos.

1-2-2. Aprendizaje y la Memoria

Podemos describir al aprendizaje como el proceso a través del cual una experiencia comportamental se codifica espacio-temporalmente en circuitos neuronales, expresándose como un cambio comportamental. Memoria es la representación interna de dicha experiencia.

El aprendizaje y la memoria están dados por diferentes mecanismos neurales distribuidos en diferentes regiones del cerebro. La potenciación de largo termino (LTP) es un aumento de larga duración de la eficacia sináptica, que se cree que es un importante mecanismo subyacente del aprendizaje y formación de la memoria (Arisi, 2014).

El hipocampo es importante para la formación de memoria que es distribuida en áreas corticales (Arisi, 2014). A lo largo de los años se han realizado diversos estudios para elucidar el rol del hipocampo en la memoria. El estudio de pacientes con amnesia luego de un daño hipocampal muestra un patrón complicado de deterioro en las funciones de la memoria (Watson y col., 2013). Existen diversos estudios realizados en animales con lesiones hipocampales que demuestran la relevancia del hipocampo en la capacidad de aprendizaje y memoria (Broadbent y col., 2004; Florian y Roullet, 2004). Fundamentalmente, el hipocampo está involucrado en los procesos de adquisición de la memoria y en su almacenamiento a corto plazo, aunque su conexión con otras áreas es necesaria para la consolidación sistémica y el almacenamiento a largo plazo (Lynch, 2004). El hipocampo funcionaría entonces como una estación de almacenamiento temporal de la memoria. Podemos referirnos a dos tipos de memoria, la memoria explícita y la implícita, dependiendo la primera del procesamiento

hipocampal. La memoria explícita, también llamada declarativa, está relacionada con procesos conscientes, e incluye a la memoria episódica, semántica y contextual.

Se han diseñado distintos paradigmas comportamentales con la finalidad de estudiar la memoria en roedores. Éstos tienen en cuenta las características propias de los roedores, tales como su elevada actividad exploratoria. Existen distintos ensayos que son empleados para evaluar distintos tipos de memorias. Cada memoria implica un procesamiento diferente y depende de regiones cerebrales más o menos caracterizadas. Los ensayos se basan, generalmente, en un pre-entrenamiento, un entrenamiento y un testeo. Entre las memorias estudiadas se encuentra la memoria espacial, que es memoria de contexto construida a partir de la elaboración de estrategias de navegación, tales como la construcción de mapas cognitivos a partir de claves espaciales. Este tipo de memoria está fuertemente vinculada a la función hipocampal (Florian y Rouillet, 2004). Por otro lado, se estudia también la memoria asociativa, en la cual la respuesta evocada condicionada se da frente a un estímulo condicionado por la asociación a uno incondicionado, en cuya formación también se encuentra involucrado el hipocampo (Cutsuridis y Wennekens, 2009). Otra de las memorias estudiadas es la memoria de habituación, muy compleja a pesar de responder a un único estímulo, que involucra procesamientos todavía no del todo elucidados. También se estudia la memoria de reconocimiento, que se presenta como una memoria primitiva e involucra a diversas áreas del cerebro y parece depender parcialmente del hipocampo (Broadbent y col., 2004).

Además existen otros ensayos que permiten estudiar otras características comportamentales en roedores distintas del aprendizaje y la memoria como, por ejemplo, la ansiedad (Sudakov y col., 2013) y la actividad locomotora (Lynch y col., 2011).

1-3. Eje hipotalámico-hipofisario-adrenal

El eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (Eje HPA) está formado por el hipotálamo, parte ventral del diencefalo, la hipófisis, una estructura localizada bajo el hipotálamo y la glándula adrenal, localizada en la parte superior de los riñones.

Las interacciones homeostáticas finas entre estos tres órganos constituyen el eje HPA, una parte esencial del sistema neuroendocrino que controla las reacciones al estrés y regula varios procesos del organismo como la digestión, el sistema inmune, las emociones, la conducta sexual y el metabolismo energético (Berthon y col., 2014; Goldstein, 2010) (Figura 4).

Las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo secretan el factor liberador de corticotrofina (CRH) que induce la liberación de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) por la hipófisis. La ACTH a su vez causa liberación de glucocorticoides (GCs) (cortisol en los primates y corticosterona en la mayoría de los roedores) por parte de la corteza adrenal. Los GCs generan una retroalimentación negativa sobre la hipófisis anterior y el hipotálamo, a través de receptores de glucocorticoides (GR), lo cual normalmente mantiene los niveles de GCs dentro del rango esperado (Webster y col., 2002). Los GCs tienen muchas funciones importantes, incluyendo la modulación de las reacciones ante el estrés.

El eje HPA también puede ser regulado por otros factores como el SNS, citoquinas y otros neuropéptidos como arginina vasopresina (AVP) (Gądek-Michalska y col., 2013; Ma y Morilak, 2005).

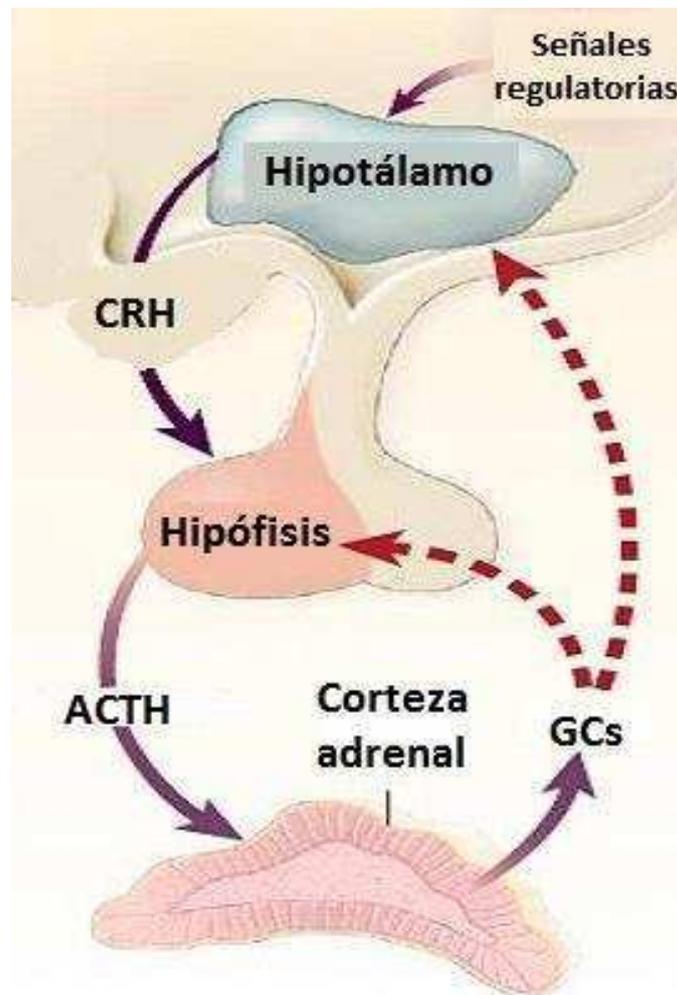


Figura 4: Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. **ACTH:** hormona adrenocorticotrófica, **CRH:** factor liberador de corticotrofina. **GCs:** glucocorticoides (Modificado de VITAE Academia Biomédica Digital)

1-4. Interacción entre el Sistema inmune, el Sistema Nervioso y el eje HPA

El sistema nervioso, el sistema endocrino y el sistema inmune están anatómicamente y funcionalmente conectados. Estos sistemas de órganos expresan y responden a un gran número de moléculas regulatorias compartidas, como los esteroides, neuropéptidos, citoquinas y neurotransmisores, que proporcionan la base molecular para una respuesta neuroendocrina-inmune bidireccional y coordinada en respuesta a perturbaciones de la homeostasis del organismo (Chesnokova y col., 2010).

Existen dos vías principales a través de las cuales el SN regula al SI. La primera es por medio de la respuesta hormonal dada principalmente por el eje HPA, y la segunda vía de regulación es a través de la liberación de norepinefrina y acetilcolina desde los nervios simpáticos y parasimpáticos (Dantzer y Wollman, 2003).

El SNS, inerva extensamente los órganos linfoides estableciendo conexiones anatómicas entre los sistemas nervioso e inmune (Felten y col., 1987; Madden y col., 1994). Regula la función del SI principalmente por la vía de neurotransmisores adrenérgicos liberados a través de circuitos neuronales (Webster y col., 2002).

Las células del SI poseen receptores de membrana para la mayoría de los neuropéptidos y neurotransmisores por lo que poseen la capacidad de responder a estos factores. Estos receptores son funcionales y su activación induce cambios en las funciones inmunes como la proliferación celular, y las respuestas inmunes específicas (Eskandari y col., 2003).

La noradrenalina (NA) liberada por las terminales nerviosas ejerce su función a través de receptores adrenérgicos presentes tanto en LT como en LB. El principal subtipo de receptor adrenérgico descrito en los linfocitos es el β_2 (β_2 -AR) (McAlees y col., 2011; Sanders, 2012).

El eje HPA regula al SI principalmente por la liberación de GCs. Los GCs ejercen una variedad de efectos a través de mecanismos de señalización de hormonas esteroideas. Los GCs pueden unirse al receptor de mineralocorticoides (MR) o al receptor de glucocorticoides (GR). El MR tiene mayor afinidad por los GCs que el GR, y esta diferencia es en parte responsable por los diferentes efectos dependientes de la concentración. A niveles basales, los GCs se unen principalmente a MR y solo ocupan una pequeña porción de GR. Cuando los niveles de GCs son altos como en el caso de una situación de estrés, se ocupan también los GR (Sorrells y Sapolsky, 2007).

Las células del SI poseen receptores para GCs y el principal receptor en estas células es el GR, por lo cual la influencia de estas hormonas sobre la función inmune es mediada a través de este receptor (Marchetti y col., 2001).

Los GCs pueden ejercer su acción regulatoria sobre el SI por varias vías. Por ejemplo pueden modular la expresión de citoquinas, moléculas de adhesión, quimioattractantes y otros factores inflamatorios (Adcock y Ito, 2000), y pueden bloquear la maduración linfocitaria (Wisniewska y col., 2004). En algunas especies pueden expulsar a los linfocitos de la circulación (Milad y col., 1994) y en algunas ocasiones pueden destruirlos mediante mecanismos apoptóticos (Bishop y col., 2000).

Durante muchos años se pensó que los GCs eran inmunosupresores, sin embargo los estudios que llevan a estas conclusiones se realizaron utilizando dosis farmacológicas de éstos y moléculas sintéticas. Es importante reconocer que los GCs en dosis farmacológicas ejercen diferentes funciones que las fisiológicas. En concentraciones fisiológicas resultan en una modulación de la transcripción de genes involucrados en la respuesta inflamatoria, mientras que en las dosis farmacológicas, mucho mayores que las fisiológicas, resultan en una supresión total de la respuesta inflamatoria (Webster y col., 2002).

Hoy en día se acepta que los GCs a concentraciones fisiológicas son inmunomoduladores. Se vio por ejemplo que causan una supresión selectiva de la inmunidad celular Th1 y un cambio hacia la inmunidad celular Th2, más que una inmunosupresión generalizada (Elenkov, 2004). De hecho los GCs a nivel fisiológico estimularían varios aspectos de la función inmune. Por ejemplo, varios procesos relacionados a la función de células T son facilitados (Almawi y col. 1999). También estimulan agudamente las reacciones de hipersensibilidad de tipo retardada, mientras que a concentraciones farmacológicas la suprimen (Dhabhar y McEwen, 1997).

A su vez, el SI a través de las citoquinas producidas por las células inmunes en la periferia o localmente en el SNC, puede regular las funciones del SN y la secreción hormonal de las glándulas endocrinas (Turrin y Rivest, 2004). Estas citoquinas pueden actuar sobre el cerebro por varias vías: una vía humoral, por transporte activo a través de la barrera hematoencefálica, o en aquellas áreas del cerebro que están desprovistas de una barrera hematoencefálica funcional, las áreas circunventriculares, que se encuentran en varios sitios entre las paredes de los ventrículos cerebrales; y una vía neural, representada por los nervios aferentes que inervan los sitios corporales de infección y daño. En ambos casos, las citoquinas producidas periféricamente inducen la expresión de citoquinas cerebrales que son producidas por macrófagos residentes y células microgliales y astrocitos, estas células pueden producir IFN- α , IFN- γ , IL-1; IL-2; IL-6 y TNF- α . Además el hipotálamo y/o la hipófisis pueden producir IL-1, IL-6, TGF- β , factor inhibidor de leucemia (LIF), factor inhibidor de macrófagos,

IL10 e IL-18 (Silverman y col., 2005). En la figura 5 se muestra un esquema de la interacción entre el SI y el SN.

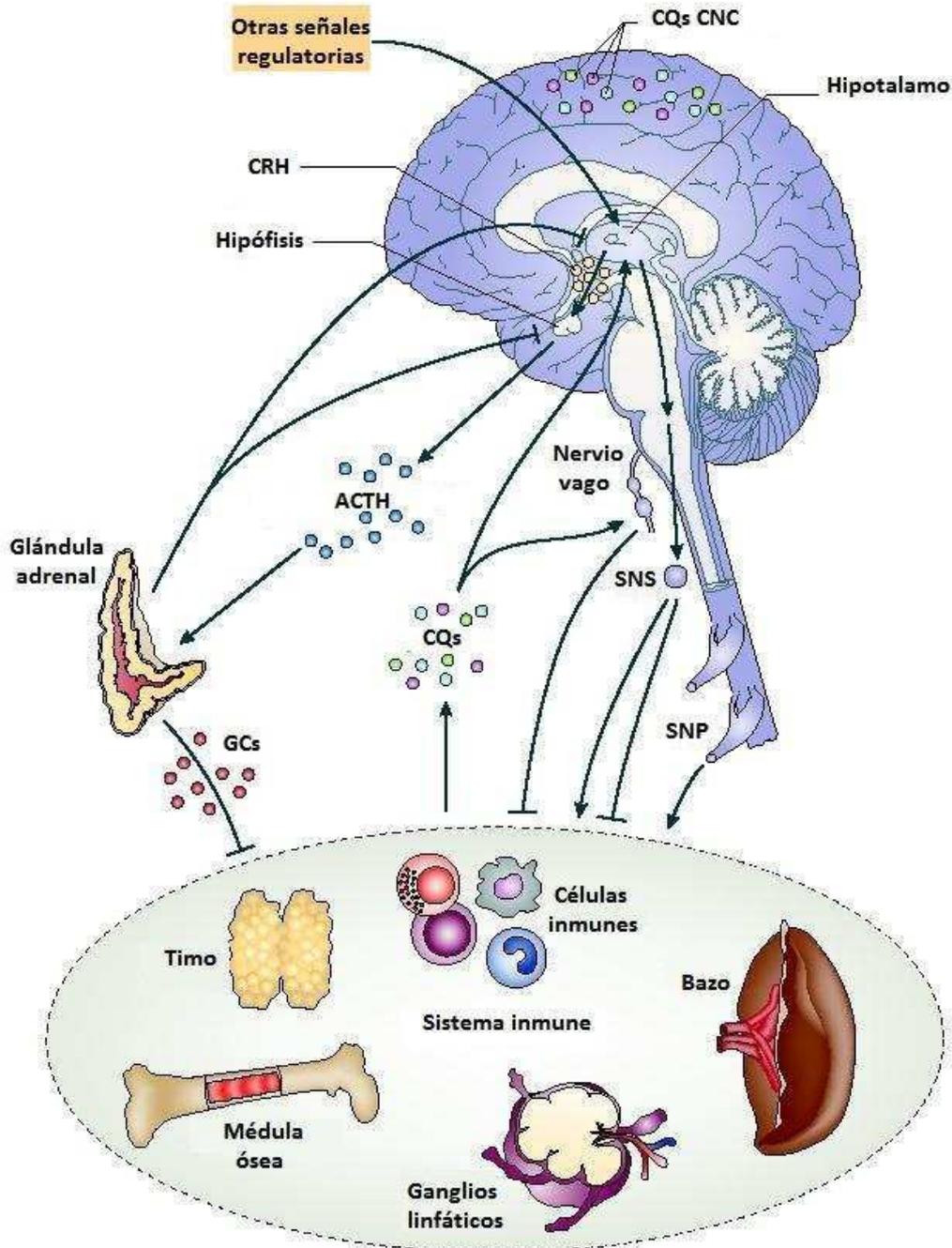


Figura 5: Interacción entre el SN y el SI. ACTH: hormona adrenocorticotrófica, CQs: citoquinas, CRH: factor liberador de corticotrofina, GCs: glucocorticoides, SNC: sistema nervioso central, SNS: sistema nervioso simpático, SNP: sistema nervioso parasimpático.

1-4-1. Acción de las citoquinas en el sistema nervioso

Las citoquinas producen una serie de efectos sobre el comportamiento luego de su administración central o periférica. El animal que sufre una infección presenta un comportamiento denominado "*sickness behavior*". Este término se refiere a una serie de cambios comportamentales coordinados que se desarrollan durante el curso de la inflamación sistémica. Estos comportamientos incluyen una disminución en su alimentación, actividad locomotora y exploratoria, interacción social y actividad sexual, entre otras. El estado de somnolencia aumenta y las funciones cognitivas están disminuídas (Holmes y col., 2011). Este comportamiento ha sido asociado a la activación del SI y a la liberación de citoquinas (Dantzer, 2009). Entre las principales citoquinas podemos nombrar el TNF- α , la IL-1 α/β y la IL-6 como las candidatas más firmes para mediar estos efectos. Se demostró experimentalmente que la administración central o periférica de IL-1 β produce efectos sobre las funciones cognitivas, particularmente la IL-1 β influye la consolidación de las memorias dependientes del hipocampo (Gonzalez y col., 2013).

La IL-6 está implicada en la patogénesis de varios desórdenes neuroinflamatorios y neurodegenerativos que afectan el CNS, como la esclerosis múltiple, el Parkinson y Alzheimer. Además se observó que está involucrada en múltiples procesos fisiológicos como la homeostasis neuronal, astrogliogenesis y la diferenciación neuronal (Spooren y col., 2011). El TNF- α se vio implicado en muchas enfermedades autoinmunes (Klinkert y col., 1997; Lin y col., 2006).

Asimismo, la IL-2 es capaz de inducir un efecto soporífero al ser inyectada en el locus cerúleo en ratones (Nisticò y De Sarro, 1991). Por otro lado, se ha observado un aumento en la actividad locomotora y exploratoria luego de la administración de IL-2 en el hipocampo e hipotálamo y también luego de su administración periférica (Nisticò y De Sarro, 1991).

Originalmente se pensó que las hormonas producidas en la periferia podían atravesar directamente la barrera hematoencefálica, ya que se vio que varios factores inmunoregulatorios, incluyendo la IL-1, IL-2, IL-6 y TNF α/β producían efectos sobre las funciones neuroendocrinas. Sin embargo, como el tamaño de estas sustancias era muy grande como para penetrar la barrera hematoencefálica, se sugirió la producción local de las citoquinas en el tejido neuroendocrino (Vankelecom y col., 1989). Ahora se conocen varios tipos celulares del SN que pueden producir citoquinas como la astrogliá y la microgliá (Motoyoshi-Yamashiro y col., 2013; Tatro y col., 2014).

Además, las citoquinas periféricas pueden influenciar al SNC. Se proponen varios mecanismos para su acción. Uno de los mecanismos propuestos sostiene que las

citoquinas actúan a nivel de un órgano circunventricular, vagal u otro nervio aferente, liberando sustancias que estimulan la liberación de citoquinas dentro del SNC. Las células de la microglía serían las principales productoras de las mismas. Otros mecanismos postulan la existencia de transportadores específicos de tal manera que las citoquinas ingresan a través de los mismos desde la sangre al SNC. Muchos de estos transportadores han sido identificados, aunque aún no está claro si la actividad de estos transportadores alcanza para obtener los niveles de citoquinas adecuados dentro del SNC para producir los efectos encontrados. Las citoquinas en el cerebro, en particular el hipocampo, están asociadas con la modulación de la neurogénesis y el aprendizaje (Arisi, 2014).

1-5. Factores neurotróficos

Los factores neurotróficos son péptidos necesarios para el crecimiento y mantenimiento del SN, y promueven el desarrollo y la diferenciación neuronal (Vega y col., 2003). Estos factores se expresan en una región y en un período particular (Korsching, 1993). Los tejidos del SN dependen de ellos para su supervivencia y funcionamiento dado que participan en los procesos de remodelación, adaptación y plasticidad neuronal.

Los factores neurotróficos actúan de manera autócrina o parácrina, pudiendo ser secretados por neuronas, tejidos blanco que ellas inervan o células gliales (Korsching, 1993).

1-5-1. Neurotrofinas

Las neurotrofinas (NTs) son una familia de polipéptidos. Esta familia incluye al factor de crecimiento nervioso (NGF) (Levi-Montalcini, 1987), al factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) (Barde y col., 1982), a la neurotrofina-3 (NT-3) (Ernfors y col., 1990), a la neurotrofina-4/5 (NT-4/5) (Hallböök y col., 1991), y a la neurotrofina 6 (NT-6) (Gotz y col., 1994). Son sintetizadas como moléculas precursoras que luego son clivadas para dar la proteína madura.

Las NTs poseen dos tipos de receptores: p75 NTR, de baja afinidad, que pertenece a la superfamilia TNFR; y la familia TKr (receptores de tirosin kinasas), al cual se unen con alta afinidad. NGF se une a TKrA, BDNF y NT-4/5 se unen a TKrB y NT-3 a TKrC y puede unirse con menor afinidad a TKrA y TKrB en algunos ambientes celulares (Tessarollo, 1998). Todas las NT poseen la capacidad de unirse a p75 NTR.

1-5-2. Neurotrofinas y Sistema Nervioso

En general, todas las neurotrofinas cumplen una función en la supervivencia, desarrollo y diferenciación de las neuronas. Además, en el crecimiento de neuritas, influyen en la expresión de proteínas esenciales para el funcionamiento normal de las neuronas.

La función de las neurotrofinas en el SNC no está limitada a la plasticidad anatómica, Se las señaló como factores importantes que interaccionan con varias vías de señalización e inducen la regulación de las formaciones sináptica, la modulación de la plasticidad sináptica y la eficiencia de la transmisión sináptica en el cerebro del mamífero (Arvanian, 2013).

Se propusieron varios mecanismos, como el control espacio temporal de la expresión de las isoformas de las neurotrofinas y sus receptores, para explicar las acciones específicas de las neurotrofinas y sus receptores (Tessarollo, 1998). La mayoría de los cambios dependientes de actividad en el SNC son el resultado de modificaciones en los niveles intracelulares de calcio. Cambios a largo plazo en la funcionalidad neuronal son el resultado de la expresión de genes mediada por calcio, y se piensa que estos genes son críticos en el desarrollo y la formación de las bases del aprendizaje y la memoria. Uno de estos genes es el BDNF.

El BDNF modula la fuerza de las conexiones sinápticas existentes y actúa en la formación de nuevos contactos sinápticos. Por lo tanto, una alteración en la función del BDNF, ya sea a través de la síntesis o liberación, podría afectar el comportamiento (Zhu y col., 2009).

Varias líneas de evidencia sugieren que alteraciones de la señalización de NTs en el cerebro adulto podrían estar implicadas en la patofisiología de desórdenes psiquiátricos, como la depresión, ya que juegan un importante papel en traducir la actividad neuronal en plasticidad estructural y bioquímica (Calabrese y col., 2009).

Diversos estudios han demostrado que el NGF y BDNF son esenciales durante la adultez para el mantenimiento de múltiples funciones, tales como la adquisición y retención de la memoria, la potenciación a largo plazo y la inervación colinérgica (Aloe y col., 2012; Leal y col., 2014).

Durante el desarrollo del sistema nervioso las NTs regulan la muerte celular, la conectividad sináptica, la orientación de las fibras y la morfología dendrítica. Además contribuyen a la plasticidad cerebral y están involucradas en la función neural dependiente de actividad.

La expresión de las NTs y de sus receptores está regulada durante el desarrollo. Su máxima expresión se da en el tiempo del crecimiento, diferenciación y sinaptogénesis neuronal. Estímulos fisiológicos, como un evento de estrés, pueden afectar la expresión de NTs (Russo-Neustadt y col., 2001). Si se producen cambios en la expresión de NTs, en tiempos críticos durante el desarrollo, pueden promover una cascada de eventos que interfieren con la maduración de ciertas regiones, determinando un estado de respuesta alterada al estrés en la vida adulta (Cirulli y col., 2009).

La expresión de NT3 es particularmente alta durante la embriogénesis, y puede influir en el desarrollo del hipocampo.

El NGF fue identificado como un actor principal en los procesos de desarrollo. Una vez liberado, es recibido por las neuronas mediante endocitosis mediada por receptor y transportado al cuerpo celular en donde ejerce su acción trófica y de diferenciación (Allewa y Santucci, 2001).

Se vio que la disminución de los niveles de BDNF hipocampal, tras la administración central de lipopolisacárido (LPS), podría ser un mediador en los comportamientos de tipo ansioso generados en respuesta al LPS (Hritcu y Gorgan, 2014).

1-5-2. Neurotrofinas y Sistema inmune

Se han hecho numerosos estudios para elucidar la función de las NTs en otros sistemas, además del SN, incluyendo el SI (Aloe y col., 2012; Tessarollo, 1998).

Las neurotrofinas son producidas por órganos inmunes y células inmunocompetentes incluyendo linfocitos T, linfocitos B y macrófagos, y se cree que juegan un rol en varias funciones del SI incluyendo la proliferación de linfocitos (Bronzetti y col., 2006). Es interesante notar que en todas las especies de vertebrados examinados hasta ahora, desde humanos hasta peces, las NTs y/o sus receptores se han detectado en los órganos linfoides (Ciriaco y col., 1996; Hannestad y col., 1997, 2000; Vega y col., 2003). Los linfocitos, además, poseen receptores para las NTs (Vega y col., 2003). Se demostró que las neurotrofinas podían actuar sobre linfocitos y que la expresión de las mismas y de sus receptores es dependiente frecuentemente de la activación celular (Kerschensteiner y col., 1999; Moalem y col., 2000).

El receptor de NGF se expresa en los órganos y las células del SI inmune, permitiendo al NGF modular la diferenciación celular y regulando la respuesta inmune. El NGF afecta la supervivencia y/o la diferenciación de las células madres hematopoyéticas, granulocitos, linfocitos y monocitos. El NGF y su receptor TfkA y posiblemente otras

NT y sus receptores, parecen tener un rol en la fisiología de linfocitos T y B. Además cada población de linfocitos parece expresar distintos patrones de NTS y sus receptores (Vega y col., 2003).

1-6. Estrés

Los organismos vivos tienen la capacidad de ajustarse a una cantidad, variedad e intensidad de estímulos siempre y cuando estos oscilen dentro de un rango que no altere la homeostasis del organismo. Si la cantidad y calidad de estos estímulos está por debajo o por encima de ese rango, el equilibrio se ve perturbado y esta deficiencia o exceso puede ser considerado como estrés, el cual es generalmente multifactorial.

El estrés produce la liberación de una serie de mediadores, entre ellos hormonas y neurotransmisores capaces de modular el SI (O'Callaghan, 2002).

El estrés se define, entonces, como cualquier situación capaz de perturbar fisiológicamente o psicológicamente la homeostasis. La exposición a situaciones adversas afecta a un importante número de aspectos de nuestra vida diaria. La respuesta al estrés se define entonces como "alostasis", queriendo decir "mantener la estabilidad a través del cambio" (McEwen, 1998).

El impacto de la exposición a estrés en el desarrollo de una respuesta inmune depende de una variedad de factores como la duración y el tipo de estresor. La clásica respuesta al estrés involucra la activación del eje HPA. Su actividad está regulada por retroalimentación negativa por el hipocampo y el hipotálamo mismo cuando el exceso de GCs llega a él. Durante una condición de estrés agudo, la retroalimentación negativa mantiene la homeostasis del eje HPA. Sin embargo, después de una exposición a estrés crónico existiría una ruptura de la retroalimentación negativa (Zhu y col., 2014).

Se conoce que el estrés suprime las funciones inmunes y aumenta la susceptibilidad a infecciones y cáncer. Paradójicamente, también se conoce que el estrés puede exacerbar algunos tipos de alergia, autoinmunidad y enfermedades inflamatorias, lo que sugiere que el estrés puede aumentar las funciones inmunes bajo ciertas condiciones. Se describió que mientras el estrés crónico suprime o desregula las funciones del sistema inmune, el estrés agudo a menudo tiene efectos estimuladores del mismo (Dhabhar, 2009)

Se ha sugerido que el estrés agudo induce aumento de la función inmune y que este aumento puede ser una respuesta adaptativa que prepara al organismo para un potencial desafío inmunológico, para el cual la percepción del estrés por el cerebro y la

subsiguiente liberación de hormonas y neurotransmisores serviría como una advertencia temprana (Dhabhar y McEwen, 1999).

Hay una variedad de mecanismos potenciales por los cuales un estresor puede alterar la función inmune, uno de estos mecanismos sería la alteración del SE que modularía al SI (Bonneau, 2007).

Previamente, observamos en nuestro laboratorio que ratones BALB/c sometidos al modelo de estrés crónico moderado (CMS) presentan una alteración en la respuesta proliferativa, específicamente una menor respuesta a mitógenos selectivos para LT y una mayor respuesta proliferativa de LB. Estos cambios en la respuesta inmune se correlacionan con una alterada reactividad a las hormonas típicas del estrés (catecolaminas y corticosteroides) (Silberman y col., 2004). Asimismo se encontró una menor producción de Ac para Ag T dependientes, no estando alterada la respuesta T independiente (Silberman y col., 2004; Silberman y col., 2003). Esta deficiencia en la respuesta de LT fue debida a alteraciones en las señales intracelulares que se desencadenan tras la unión del Ag al receptor presente en los LT (Silberman y col., 2005). Por otra parte, se observó el desarrollo de un estado anhedónico en animales expuestos a CMS, un aumento de la actividad locomotora y un déficit en la capacidad de aprendizaje y memoria asociado a un desbalance en la relación Th1/Th2 (Palumbo y col., 2007; Palumbo y col., 2010). Es decir, que el estrés crónico induciría cambios inmunológicos que participarían en los cambios conductuales y estructurales que acompañan a patologías íntimamente asociadas al estrés.

Bajo condiciones de estrés agudo, la activación del SNS conduce a una liberación de NA de las terminaciones nerviosas simpáticas postganglionares. La adrenalina y la NA, a través de interacciones con receptores α y β adrenérgicos, median los efectos metabólicos y cardiovasculares adaptativos que se dan bajo condiciones de estrés. Sin embargo, en condiciones de estrés crónico o prolongado, las acciones excesivas de los productos del eje HPA y del SNS pueden conducir a alteraciones patofisiológicas en muchos sitios del cuerpo incluyendo al SI.

Las catecolaminas son otra parte integral de la respuesta fisiológica a los estresores y son los efectores principales de la clásica respuesta de "huída o lucha". Frente a una situación de estrés se induce la activación de las células cromafines de la médula adrenal que liberan adrenalina a la circulación. Las elevaciones en plasma de adrenalina están estrechamente relacionadas con las elevaciones en plasma de GCs que sigue a la activación del eje HPA (Hucklebridge y col., 1998).

Los glucocorticoides constituyen el principal efector y señal del sistema neuroendocrino. A través del GR, ejercen efectos múltiples sobre las moléculas y las

células inmunes, como se describió anteriormente. Las fases de la respuesta a estrés (estrés, recuperación, adaptación) son fundamentales al proceso de almacenamiento de memoria. Se postuló que los GCs promueven la consolidación de la memoria a través de las acciones mediadas por GR (Oitzl y col., 2010).

Se ha descrito que el estrés puede afectar la plasticidad sináptica, la morfología dendrítica y la neurogénesis en hipocampo (Yoon, 1998). El hipocampo y la amígdala tienen un rol clave en la regulación de la respuesta al estrés ya que estas regiones forman parte de un sistema integrador involucrado en el control neuroendocrino.

Además, el estrés crónico induce una reducción de volumen hipocampal (Blix y col., 2013) un impedimento de la memoria (Palumbo y col., 2007), disminuye el LTP en el hipocampo, aumenta los niveles hipocampales de glutamato y disminuye los de GABA (Cui y col., 2009).

Un estrés crónico o incontrolable puede llevar al deterioro de los mecanismos regulatorios en el eje HPA, en el cual la expresión y función de los receptores de GCs en el hipotálamo y en el hipocampo se ven alterados, conduce a una reducción en la retroalimentación negativa que es la responsable del aumento en los niveles de GCs en los individuos afectados.

Los dos tipos de receptores de glucocorticoides GR y MR difieren en la afinidad y en la distribución en el cerebro. Ambos están expresados en abundancia y colocarían en las neuronas de varias áreas del sistema límbico incluido el hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal (McEwen, 2007). Estos receptores producen la respuesta neuroendocrina y de comportamiento que promueve la adaptación al estrés desde el encuentro con la nueva experiencia hasta el almacenamiento de la memoria y los procesos de evocación (Herman y col., 2003). Ambos receptores interactúan como dímeros en la maquinaria de transcripción, pero el GR más que el MR puede modular la acción de otros factores de transcripción que se activan en el inicio de una situación de estrés (Oitzl y col., 2010). En el cerebro, el GR previene la reacción inicial del estrés del desbordamiento, "overshooting", lleva a las células diana de nuevo condiciones basales, y facilita la recuperación a través de la promoción de energía metabólica.

Las alteraciones en la expresión de neurotrofinas por situaciones de estrés, podrían estar involucradas en la patofisiología de los desórdenes asociados con estrés, ya que juegan un rol importante en la traducción de la actividad neuronal en plasticidad bioquímica y estructural (Amador-Arjona y col., 2010). Se ha visto que el estrés puede alterar la expresión de neurotrofinas en el cerebro. Específicamente, estímulos estresantes como una inmovilización aguda o crónica puede reducir los niveles de BDNF (Murakami y col., 2005).

1-6-1. Estrés prenatal

Se ha sugerido que la exposición a estrés prenatal, el estrés que se le ejerce a la madre durante la preñez, causa cambios estables de larga duración en los sistemas de respuesta centrales y periféricos, además se vio una posterior vulnerabilidad a exposiciones a estrés subsecuentes (Chung y col., 2005; Maccari y col., 2003).

Algunos autores observaron que el estrés prenatal social disminuye el conteo total de linfocitos periféricos en ratas, particularmente una disminución en LT CD4+ y una menor proliferación inducida por mitógenos (Götz y Stefanski, 2007). Se encontró también una disminución en el número de LT CD8+ (Llorente y col., 2002). Además se describió una disminución de la proliferación inducida por mitógenos, y una disminución en la actividad citotóxica en ratas estresadas prenatalmente por ruido. (Kay y col., 1998).

El efecto de estrés materno sobre la inmunidad innata de la cría es generalmente inhibitorio (Merlot y col., 2008). Se ha descrito que el estrés fisiológico durante la tercer semana de gestación disminuye la función de los macrófagos y los neutrófilos, la citotoxicidad de NK de sangre y bazo, y la resistencia a inducción de tumores en la cría. (Palermo Neto y col., 2001).

En contraposición, la modulación del sistema fisiológico por estímulos del medio ambiente durante la ontogenia fue propuesto como un mecanismo que favorece la adaptación de la cría en desarrollo al ambiente post parto (Fowden y col., 2006). Se ha propuesto que el feto durante su vida intrauterina se adaptaría a los estímulos que recibe, de tal forma que adaptaría su fisiología para responder convenientemente a ese estímulo en su vida adulta. En este sentido se ha demostrado que el estrés prenatal atenúa los cambios morfológicos inducidos por exposición a estrés crónico en animales adultos (Michelsen y col., 2007). Así se encontró que el estrés prenatal incrementa la actividad del SI celular en ratas macho de 6 meses de edad, evidenciado por un aumento en los porcentajes de linfocitos CD8+ y NK en sangre, y una mayor proliferación en respuesta a PHA *in vitro*, en correspondencia con un aumento en la secreción de IFN- γ (Vanbesien-Mailliot y col., 2007). Además se ha observado un aumento en la citotoxicidad de NK en machos y hembras adultas y una mayor producción de anticuerpos (Klein y Rager, 1995).

Por otra parte, se ha investigado el efecto de una nueva exposición a estrés en ratas estresadas prenatalmente y se encontró que los controles recuperan luego de 5 días las alteraciones inducidas por la situación de estrés, no así los animales sometidos a

estrés prenatal (Götz y Stefanski, 2007). Esta evidencia demostraría que los individuos expuestos prenatalmente al estrés responderían con desventajas frente a una nueva situación de estrés.

También se ha encontrado que el estrés prenatal induce cambios aumentando el perfil de comportamiento de tipo miedoso y desregula los ejes noradrenérgicos y HPA después de una exposición a estrés en la adultez (Green y col., 2011; Huizink y col., 2004; Jarvis y col., 2006; Otten y col., 2010).

El eje HPA es altamente susceptible a los efectos de los factores ambientales y puede ser modulado durante la vida intrauterina. En este sentido algunos autores observaron que animales estresados prenatalmente a menudo muestran mayor secreción de corticosterona basal en comparación con animales control (Weinstock y col., 1998) mientras que otros autores no observan diferencias (Klein y Rager, 1995). En otro trabajo se vio una disminución de la concentración de corticosterona en animales estresados prenatalmente por un modelo de conflicto social. Los autores señalan que una menor concentración de corticosterona en ratas estresadas prenatalmente con respecto a las controles se debería a una menor actividad del eje HPA (Götz y Stefanski, 2007).

Se ha observado también una secreción prolongada de corticosterona en ratas estresadas prenatalmente sometidas a estrés agudo por restricción (Maccari y col., 1995) Sin embargo, en otro trabajo no se encontraron diferencias en los niveles de corticosterona en animales estresados prenatalmente en comparación con animales control cuando fueron sometidos a una situación de estrés agudo en la vida adulta, pero sí cuando los animales fueron sometidos a estrés crónico (Llorente y col., 2002).

También se han visto alteraciones en el hipocampo inducidas por el estrés prenatal, como disminución de la neurogénesis (Lemaire y col., 2000), y una menor inducción de LTP acompañada de una disminución del receptor de NMDA en hipocampo (Son y col., 2006). Se ha reportado además que los animales estresados prenatalmente muestran niveles altos de ansiedad (Chung y col., 2005; Fride y Weinstock, 1988). Se observó también un aumento en la actividad locomotora en animales juveniles (Fonseca y col., 2002). La exposición prenatal a GCs lleva a un aumento en los niveles de CRH en la amígdala, una región clave en la regulación del miedo y la ansiedad (Cratty y col., 1995). La exposición a estrés prenatal produce deficiencias cognitivas especialmente en ratas mayores y un aumento en los comportamientos relacionados con ansiedad y depresión (Vallée y col., 1997; Vallée y col., 1996).

Debido a la controversia en los resultados y a los distintos tipos de estresores y tiempos utilizados, se postula que la naturaleza del estresor juega un importante rol en

los efectos del estrés prenatal en la fisiología y el comportamiento de la cría en la vida adulta.

2-Hipotesis y objetivos

2-1. Hipótesis

Postulamos que la exposición en etapas tempranas del desarrollo a una situación de estrés, conlleva a una respuesta diferente en la interacción neuroinmune inducidos por la exposición a estrés agudo o crónico en la vida adulta. En esta respuesta diferencial participarían los mediadores biológicos de la respuesta al estrés.

En este contexto proponemos que el estrés prenatal alteraría la respuesta inmune y la capacidad de aprendizaje y memoria. Estas alteraciones se relacionarían con cambios en la expresión de neurotrofinas y/o citoquinas en el hipocampo y en los linfocitos. Estos cambios podrían manifestarse basalmente o al enfrentarse a una nueva situación de estrés en su vida adulta. Este hallazgo podría constituir un marcador periférico de susceptibilidad a los trastornos inducidos por la exposición a estrés. Finalmente, postulamos que existiría una respuesta diferencial de la exposición a estrés prenatal entre hembras y machos.

2-2. Objetivos

2-2-1. Objetivo general

Investigar si la exposición durante el período prenatal a estrés (estrés prenatal-EP) induce cambios inmunológicos, que condicionen (favorable o desfavorablemente) la respuesta inmune de ratones Balb/c al someterlos a estrés crónico o agudo en su etapa adulta. Asimismo, relacionar estos hallazgos con la aparición de trastornos cognitivos, con la expresión y secreción de neurotrofinas y citoquinas a nivel linfocitario y en el hipocampo. Por último, evaluar si machos y hembras poseen una respuesta diferente a los efectos del estrés.

2-2-2. Objetivos específicos

a- Analizar el efecto del EP sobre la secreción de mediadores biológicos en respuesta al estrés agudo y crónico en la etapa adulta. Los mediadores biológicos clásicos de la respuesta alostática al estrés son GCs, catecolaminas y citoquinas. Estos mediadores activados en defecto o en exceso conducen a una respuesta inadecuada con las consecuentes alteraciones fisiológicas.

b- Analizar si la exposición a EP altera la respuesta inmunológica tanto in vivo (desafío antigénico) como in vitro (reactividad linfocitaria).

c- Analizar si el EP modifica la sensibilidad de los linfocitos a las hormonas clásicamente asociados al estrés glucocorticoides y catecolaminas. Determinar además si el EP modifica el número de receptores de estos mediadores.

d- Analizar si la exposición a EP altera la capacidad de aprendizaje y memoria. Investigar si esta alteración se correlaciona la expresión de genes involucrados en este proceso en el hipocampo. Teniendo en cuenta que se ha destacado el papel de las neurotrofinas, especialmente del factor de crecimiento nervioso (NGF), neurotrofina 3 (NT3) y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), como promotoras del crecimiento y diferenciación neuronal, es de interés analizar si la exposición a estrés prenatal induce cambios en la expresión de estos factores.

e- Analizar si la exposición a EP induce cambios en la secreción de neurotrofinas por parte de las células T. Considerando que se ha descrito la síntesis de algunas neurotrofinas en linfocitos, es de interés determinar el nivel de expresión de ARNm de NGF, NT3 y BDNF en linfocitos y evaluar si se inducen cambios similares a los observados en el hipocampo.

f- Analizar si la exposición a EP induce cambios en el perfil de citoquinas por parte de las células T y si estos cambios ocurren también en el hipocampo. En la actualidad las citoquinas se perfilan como los mediadores de los efectos del SI sobre SNC produciendo importantes cambios conductuales y participando en procesos de inflamación y degeneración neuronal. Por lo tanto, es de interés determinar el nivel de expresión de ARNm de NGF, NT3 y BDNF en linfocitos.

g- Analizar si la exposición a EP condiciona los trastornos neuroinmunes inducidos por exposición a estrés crónico y agudo en la adultez.

h- Analizar si existe una respuesta diferencial al estrés en machos y hembras.

3-Materiales y Métodos

3-1. Animales

Se utilizaron hembras BALB/c provenientes de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires, todos los animales se mantuvieron en un ciclo de 12 horas de luz/ 12 horas de oscuridad a temperaturas controladas entre 18 y 22 °C en el bioterio del Instituto. El agua y la comida fue de libre acceso.

Un grupo de hembras adultas fueron colocadas a aparear, distribuidas en distintas jaulas, con un macho sexualmente maduro. Para detectar el día 1 de preñez, se monitoreó la presencia o ausencia de tapón mucoso, y en los casos en los que estuvo presente, la hembra fue separada y alojada individualmente. Un grupo de madres fue sometido a estrés durante la última semana de preñez. Las crías permanecieron junto a las madres hasta el destete (21 días), cuando fueron separadas por sexo y alojadas de a grupos de 3-5 animales por jaula. Y mantenidas sin disturbios hasta la adultez (60 días). Todos los animales fueron utilizados y sacrificados de acuerdo al Comité Institucional para el Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio (CICUAL, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires) El protocolo experimental fue aprobado por este comité (resolución 2962/10). El CICUAL adhiere a las reglas de la Guía para el Cuidado y Uso de animales de laboratorio (NIH, revisión del 2011) y a la Directiva EC 86/609/EEC (revisión del 2010) para la experimentación con animales.

Para cumplir con los objetivos propuestos se trabajó con los siguientes grupos experimentales:

1. Animales adultos que no han sido sometidos a estrés en ninguna etapa del desarrollo (control).
2. Animales adultos sometidos a estrés crónico (EC).
3. Animales adultos sometidos a estrés agudo (EA).
4. Animales adultos sometidos a estrés Prenatal (EP).
5. Animales adultos sometidos a EP y sometidos a estrés crónico (EPC).
6. Animales adultos sometidos a EP y sometidos a estrés agudo (EPA).

A continuación se muestra el esquema experimental de los grupos en estudio (figura 6). Cabe aclarar que todos los animales de los distintos grupos experimentales fueron utilizados a la misma edad (3 meses \pm 1 semana).

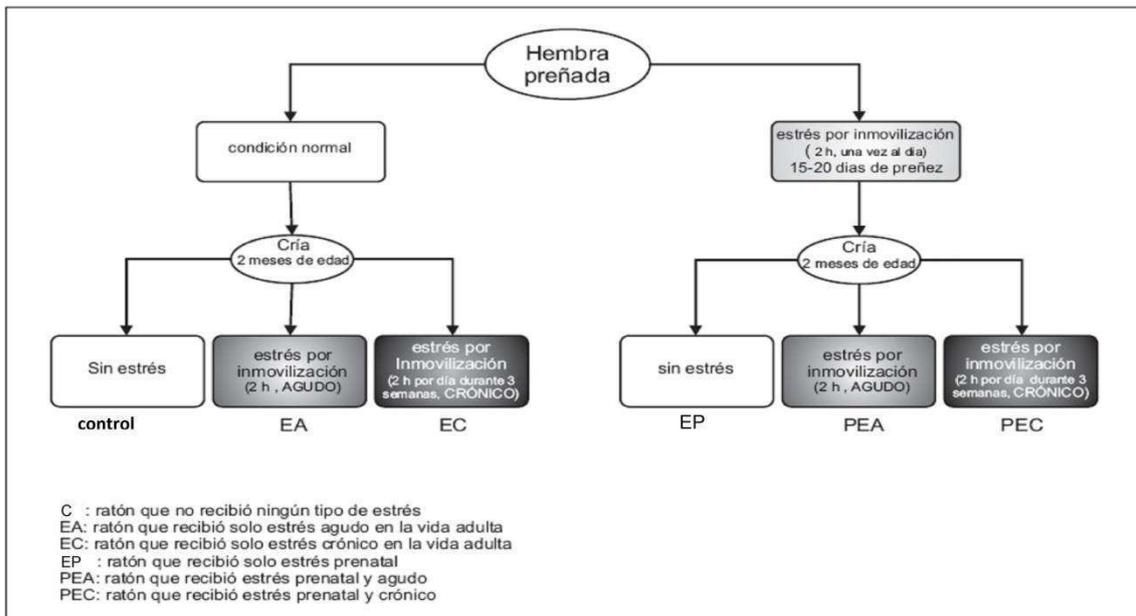


Figura 6: Esquema de los grupos experimentales

3-2. Modelos de estrés

3-2-1. Modelo de estrés prenatal

Se sometieron hembras BALB/c preñadas a estrés por inmovilización durante la última semana de gestación (del día 14 al 21) durante 2 h diarias, entre las 10 y las 12 horas, en envases de polipropileno de 4 cm diámetros por 10 cm de largo (figura 7), con la ventilación apropiada, de acuerdo a lo descrito por Wang y col (Wang y col., 2006). Los animales no se comprimen físicamente y no manifiestan experimentar algún tipo de dolor. Un grupo de hembras preñadas de la misma edad gestacional fueron dejadas en sus jaulas en condiciones normales, sin alteración.



Figura 7: Modelo de estrés prenatal. Dispositivo utilizado para el estrés por inmovilización de la hembra preñada.

3-2-2. Modelo de estrés agudo

Un grupo de ratones BALB/c adultos provenientes de madres estresadas o sin estresar, se sometieron a estrés por inmovilización en tubos de polipropileno de 2,8 cm de diámetro por 11 de largo (figura 8), durante 2 h entre las 10 y las 12 horas en una única sesión.

3-2-3. Modelo de estrés crónico

Un grupo de ratones BALB/c adultos provenientes de madres estresadas o sin estresar, se sometieron a estrés por inmovilización (figura 8), durante 2 h diarias por 21 días consecutivas entre las 10 y las 12 horas.

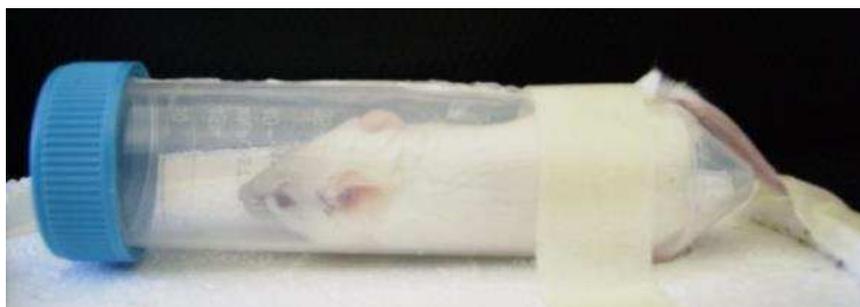


Figura 8: Modelo de estrés por inmovilización. Dispositivo utilizado para el estrés en la adultez

3-3. Evaluación de cambios inmunológicos

3-3-1. Determinación de la actividad de macrófagos.

Obtención de macrófagos: Se sacrificaron los ratones, se separó la piel y se despejó el peritoneo usando pinza y tijera estériles, se inoculó en el peritoneo con jeringa estéril 5 ml de PBS. Se masajé el abdomen del ratón para distribuir bien el líquido. Posteriormente se levantó el peritoneo con otra pinza y se hizo un ojal con otra tijera. Sin soltar la pinza que sujeta el ojal del peritoneo, se absorbió con pipeta Pasteur estéril el líquido inyectado en el mismo. Luego se colocó el líquido en tubos de plástico estériles.

A continuación se centrifugó a 200 x g durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 8 ml de PBS para lavar las células. Se centrifugó nuevamente y resuspendió en 1 ml de PBS. Se determinó el número de células por conteo en cámara de Neubauer.

Opsonización de Eritrocitos de carnero: Se lavaron dos veces los GRC (Laboratorio Alfredo C. Gutierrez) con PBS por centrifugación a 200 x g y se resuspendieron en PBS estéril al 0,5 %. Luego se mezcló con suero anti-GRC v/v e incubó por 30 min a 37 °C. Se centrifugó 2 veces a 200 x g por 10 min (Centrifuge 5417R, Eppendorf), y resuspendió en RPMI.

Ensayo de actividad fagocítica: Se determinó la actividad fagocítica de macrófagos de acuerdo a la técnica de Lima (2014). A tal fin, se colocaron 1×10^6 células en 1 ml de RPMI en una placa de 24 pocillos (Greiner Bi-one) con un cubreobjetos previamente colocado en el pocillo. Se incubó 30 minutos a 37 °C en estufa en una atmósfera con 5 % CO₂. Se lavó el pocillo con PBS e incubó con 100 µl de la solución de eritrocitos opsonizados y 900 µl de RPMI por 40 min a 37 °C en estufa en atmósfera con 5 % CO₂. Posteriormente se fijó el cubreobjetos con alcohol metílico (Metanol, Biopak). Luego, se sumergió en una solución de 1:9 de Giemsa (MERK) en PBS, durante 15 minutos. Se lavó el cubreobjetos con agua destilada y se dejó secar. Se colocó sobre un portaobjetos y se observó al microscopio con un aumento de 100X (con aceite de inmersión Biopur). Se contaron 50 células, se consideraron positivas aquellas con más de 3 eritrocitos fagocitados.

3-3-2. Ensayo de actividad de células NK

Para realizar estos ensayos se utilizaron las células YAC-1 provistas por la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia, USA). Se utiliza esta línea celular porque no posee complejo Mayor de histocompatibilidad por lo que puede ser reconocida por las células NK que ejercerán su actividad lítica sobre estas. Las células YAC-1 fueron mantenidas en cultivo en medio RPMI 1640 suplementado con 10 % de SFB, glutamina 2 mM y 100 µg/ml de estreptomicina. La citotoxicidad de las células NK de los animales de los distintos grupos experimentales contra las células YAC-1 fue evaluada de acuerdo con el método de fragmentación de ADN (Ayres y col., 2003). Brevemente, las células YAC-1 fueron marcadas con 5 µCi de [3H]-Timidina durante 3 h, antes de llevar a cabo los ensayos de citotoxicidad. Las suspensiones celulares de bazo se obtuvieron como se describió arriba. Se colocaron 1 x 10⁵ células YAC-1 en microplacas de 96 pocillos y se agregaron entre 2 x 10⁶ y 6 x 10⁶ células de bazo en un volumen de 200 µl para obtener diferentes relaciones de células dianas y efectoras (entre 1:20 y 1:60). Luego se incubó durante 3,5 h a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %. Las placas fueron cosechadas sin congelar. El porcentaje de actividad citotóxica se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Actividad citotóxica} = 100 \times \frac{(\text{SR} - \text{ER})}{\text{SR}}$$

donde SR es la lisis espontánea y ER es la lisis específica.

3-3-3. Evaluación de la proliferación linfocitaria

Obtención de linfocitos: Se sacrificaron los ratones por dislocación cervical y se extrajeron asépticamente los órganos linfáticos (bazo o ganglio). Seguidamente se disgregaron a través de una malla de metal de 1 mm con RPMI 1640 (Gibco). Se realizaron tres lavados con RPMI 1640 por centrifugación a 200 x g a temperatura ambiente durante 10 minutos. Por último, las células fueron resuspendidas en RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Internegocios S.A.) y antibióticos (Glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina; 100 µg/ml Streptomicina; Gibco). El conteo de células se realizó en una cámara de Neubauer observadas con microscopio a 400x de aumento. La viabilidad celular se estimó de acuerdo al criterio de exclusión de Azul tripán (Sigma-.Aldrich Co).

Estimulación con mitógenos: Se cultivaron 3×10^5 células por pocillo en 100 μ l de medio suplementado por triplicado, en placas de 96 pocillos. Se añadió 100 μ l de los mitógenos en medio RPMI suplementado o sólo medio de cultivo. Se utilizaron las lectinas mitogénicas Concanavalina A (Con A, Sigma-Aldrich Co), como mitógeno selectivo de linfocitos T, para cultivos de linfocitos provenientes de ganglios linfáticos y LPS (Sigma-Aldrich Co), como mitógeno selectivo de linfocitos B, para cultivos de células de bazo. Se determinó la concentración óptima de los mitógenos realizando curva dosis-respuesta en el rango: 0,5 a 2 para la Con A y 20 a 50 para el LPS. Las concentraciones óptimas de trabajo fueron de 1 μ g/ml para la Con A y de 30 μ g/ml para el LPS. Se cultivaron a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂. La proliferación se determinó añadiendo 1 μ Ci de [³H]-timidina (S= 20 Ci/ mmol, Perkin Elmer Inc.) durante las últimas 24 h de cultivo. Finalizado este periodo se retuvo la fase macromolecular insoluble en ácido en papeles de filtro GF/C .Se colocaron los filtros en solución centelladora (Optiphase "Hisafe" 1-PerkinElmer) y se calculó la actividad (dpm) en un contador de centelleo líquido (Tri-Carb 2800 TR). Para cada concentración de las lectinas se calculó la media de los triplicados.

3-3-4. Análisis del efecto de corticosterona y catecolaminas sobre la proliferación celular

Para evaluar la acción de corticoides y catecolaminas sobre la reactividad linfocitaria se realizaron curvas dosis-respuesta, determinando la proliferación inducida mitogenicamente, en presencia de concentraciones crecientes de epinefrina (Sigma-Aldrich Co) y corticosterona (Sigma-Aldrich Co). Para ello se co-cultivaron linfocitos provenientes de ganglios linfáticos (100 μ l) con Con A (50 μ l) y corticosterona o epinefrina (50 μ l). Se utilizó un rango de concentraciones de 10^{-5} a 10^{-11} M. A tal fin se prepararon soluciones madres frescas de corticosterona (4×10^{-2} M) en dimetil sulfóxido y de epinefrina (10^{-2} M) en medio de cultivo. Cabe aclarar que cuando se trataron las células con corticosterona la concentración final de dimetil sulfóxido en el medio fue menor de 0,25 %, no afectando ni la viabilidad celular ni la respuesta proliferativa.

3-3-5. Determinación de las poblaciones CD4+ y CD8+ por citometría de flujo

Los órganos linfáticos (bazo o ganglio) fueron removidos asepticamente, disgregados a través de una malla de metal de 1 mm y lavados en PBS (Sigma-Aldrich Co), tal como se indicó anteriormente. Las suspensiones celulares obtenidas fueron lavadas con PBS, centrifugadas 5 min a 400 x g (Centrifuge 5417R, Eppendorf). y resuspendidas en buffer de citometría (SFB al 1% y azida al 0,02 % en PBS).

Para la detección de marcadores de membrana, 1×10^6 células provenientes de las suspensiones celulares de bazos o ganglios fueron incubadas durante 30 min a 4°C en oscuridad, con los anticuerpos correspondientes a cada subpoblación (tabla 1), en un volumen final de 30 μ l por tubo.

Anticuerpo	Conjugado a	Fabricante	Dilución
CD4	FITC	eBioscience	1:30
CD8	PE	eBioscience	1:30

Tabla 1: Anticuerpos utilizados para los ensayos de citometría. Se indica el fluorocromo al que está unido el anticuerpo, el proveedor, y la dilución en la que fue utilizado en estos ensayos.

Luego de la incubación, las muestras fueron lavadas 2 veces con buffer de citometría por centrifugación a 400 x g y fueron fijadas en formaldehído al 1% en PBS. Los distintos subtipos de células inmunes fueron identificados mediante análisis citométrico usando el citómetro de flujo Accuri (BD Biosciences). Se construyeron los histogramas o *dot plots* correspondientes y se calcularon los porcentajes de cada subpoblación. Para determinar las marcas inespecíficas se usaron los correspondientes controles de isotipo, que nunca superaron el 1 %.

3-3-6. Producción de anticuerpos frente a un desafío antigénico

Inmunización: Se inmunizaron los ratones BALB/c con 200 μ l de una solución de glóbulos rojos de carnero, (GRC, Laboratorio Alfredo C. Gutierrez) al 4 % en solución fisiológica de acuerdo al siguiente esquema (figura 9):

Día 0 → inyección intraperitoneal.

Día 10 → toma de muestra por punción retro-orbital.

Día 11 → refuerzo.

Día 18 → toma de muestra por punción retro-orbital.

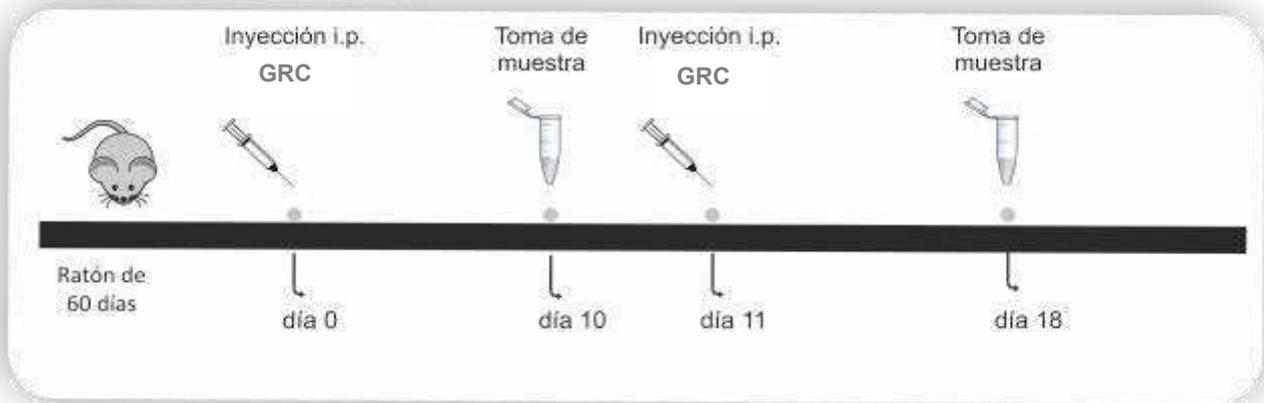


Figura 9: Esquema experimental de inmunización con GRC.

A otro grupo de animales se los inmunizó con LPS (10 µg por ratón; Sigma-Aldrich Co) mediante el siguiente esquema (figura 10):

Día 0 → inyección intraperitoneal.

Día 10 → toma de muestra por punción retro-orbital.

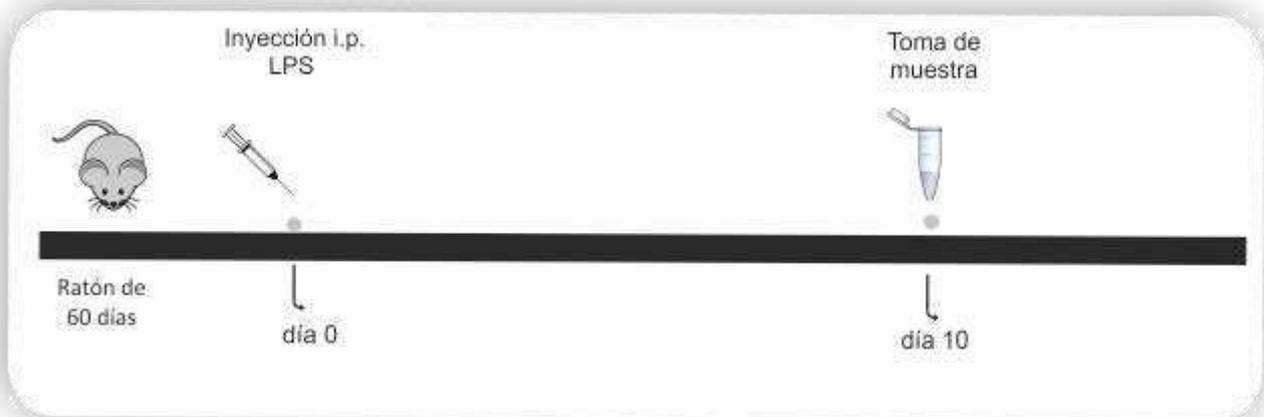


Figura 10: Esquema de inmunización con LPS.

Los sueros obtenidos se guardaron a -20 °C hasta la medición de anticuerpos.

Dosaje de Ac anti-GRC y Ac anti-LPS: La valoración del título de los anticuerpos presentes en los sueros se determinó mediante la técnica de enzimoimmunoensayo (ELISA), como se detalla a continuación.

Preparación de membranas: Se tomaron GRC, se realizaron tres lavados con PBS (buffer fosfato salino), por centrifugación durante 10 minutos a 300 x g, se congelaron a -70 °C. Posteriormente se descongelaron y se resuspendieron en agua destilada, se centrifugaron por 30 min a 12000 x g a 4 °C. Luego se realizaron 3 lavados con buffer bicarbonato de sodio (CO₃Na₂) pH: 11-12, 100 mM por centrifugación durante 30 min a 12000 x g a 4 °C. Se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Bradford y se guardaron a -70 °C hasta el momento de usarse.

Ensayo: Se sensibilizaron las placas de ELISA (Greiner Bi-one) de 96 pocillos con 7,5 µg de proteínas de GRc por pocillo o con 1 µg de LPS por pocillo disueltos en 50 µl de buffer CO₃Na₂ 100 mM, pH: 11-12. Se incubaron toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS, y se incubaron con PBS-Albúmina al 2,5 % a temperatura ambiente por 1 h, a fin de bloquear sitios de unión inespecíficos. Luego se realizaron 3 lavados con PBS y se incubaron con 50µl de diluciones seriadas al ½ de los sueros anti-GRC o anti-LPS en PBS-albumina 1 % durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 4 lavados con PBS-Tween 0,05 % y se incubaron por 1 h a temperatura ambiente con Ac de cabra anti-IgM o anti-IgG conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich Co). Se lavaron 4 veces con PBS-Tween 0,05 %, se incubaron con 1 mg/ml de paranitrofenilfosfato (PNPP, Sigma-Aldrich Co) en 100 µl de buffer CO₃Na₂ pH: 11-12 100 mM durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Se detuvo el desarrollo de color con 100 µl de NaOH 3N y se leyó a 405 nm en un lector de placas de ELISA (Biorad 3550).

El título de Ac se estimó como la máxima dilución del suero a analizar capaz de dar una reacción positiva que fuera estadísticamente diferente del valor control (suero proveniente de animal sin inmunizar).

3-4. Determinación de niveles de catecolaminas

Se determinaron los niveles de catecolaminas en bazo por el método fluorimétrico de Laverty y Taylor (1968) Se homogenizaron los bazos en una solución de sulfato

alcalino 12.5 %, EDTA 10 % y ácido perclórico 0,4 N. Se incubaron 24 h a 4 °C y se centrifugaron a 7000 g por 10 min a 4 °C. Los sobrenadantes fueron llevados a pH 8.2 y colocados en columnas de alumina pre-lavadas. Se eluyeron con ácido perclórico. El eluato fue oxidado con iodo en medio alcalino. Se determinó la fluorescencia a 375 nm en un espectrofluorómetro (JAZCO FP 770), con una longitud de excitación de 325 nm. La recuperación fue del 86 ± 4 and 77 ± 4 % para norepinefrina y epinefrina respectivamente. El rango del ensayo fue de 10–100 µg/µl. Dentro del mismo de coeficiente de correlación fue mayor de 0.9995, indicando una adecuada linealidad.

3-5. Determinación de niveles de corticosterona

Para evitar las fluctuaciones en los niveles de corticosterona debido a el ritmo circadiano, los ratones fueron sangrados a las 12:00 PM. Las muestras de sangre fueron recolectadas en hielo en tubos con 30 µl EDTA 0,25 M y se centrifugaron 10 minutos a 500 x g en centrifuga refrigerada a 4 °C, se separó el plasma y se mantuvo a -80 °C hasta el momento del ensayo. Se determinaron los niveles de corticosterona por medio de un radioinmunoensayo convencional.

Purificación: Primero se realizó una purificación de la muestra con diclorometano. Brevemente, se incubó la muestra (30 µl) con diclorometano (300 µl), se lo dejó reposar y se transfirió la fase orgánica a tubos nuevos. Se repitió el proceso y posteriormente los extractos fueron secados en una centrifuga de evaporación SpeedVac (Thermo Scientific) a temperatura ambiente. Se resuspendió la muestra en 100 µl de buffer B (Tris.CIHI 0,05 M, NaCl 0,1 M BSA 0,1).

Ensayo: Se realizó una curva standard de corticosterona (62,5 pg a 2000 pg / tubo). Se incubaron las muestras y la curva con 500 ul de anticuerpo anti-corticosterona (Sigma) por 1 h a temperatura ambiente. Se le agregó 100 µl de corticosterona marcada (0,080 pmoles en 100 µl [1, 2, 6, 7-³H(N)-corticosterone [(S= 62,2 Ci/mmol) Perkin Elmer Inc.]. Se incubó 1 h a 4°C, posteriormente se incubó con 200 µl de carbón- dextran (Sigma-Aldrich Co) a 4 °C durante 10 min y se centrifugó a 2000 x g por 15 min. Se transfirió el sobrenadante a tubos limpios se le agregó 1 ml de solución centelladora (Optiphase “Hisafe” 1-PerkinElmer) y se calculó la actividad (dpm) en un contador de centelleo líquido (Tri-Carb 2800 TR).

La reacción cruzada del anticuerpo con otros esteroides relevantes fue de 4,5 % para cortisol, 20 % para deoxy-corticosterona y 7,9% para testosterona. La sensibilidad de

la ensayo fue de 300 pg/ml y los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron 5.4 ± 1.7 and $8.9 \pm 0.7\%$ respectivamente.

3-6. Determinación de citoquinas en sobrenadante de ganglio

Células linfoides (1×10^6 /ml) fueron estimuladas con la óptima concentración de Con A ($1 \mu\text{g/ml}$) por 24 horas a 37°C en una atmósfera 5 % de CO_2 en placas de 24 pocillos. Después de la incubación, los sobrenadantes del cultivo celular fueron recolectados y guardados a -80°C . (Palumbo y col., 2010; Takeno y col., 2004). Se determinó la expresión de las citoquinas IL-2, IL-4; IL-10 e IFN- γ por medio un kit de ELISA comercial (Affimetrix eBiocience). Se diluyeron las muestras a fin de entrar en el rango de detección de las diferentes citoquinas, a saber: 15-2000 pg/ml para INF- γ , 2-200 pg/ml para IL-2, 500 pg/ml para IL-4, 30-4000 pg/ml para IL-10.

3-7. Determinación de la expresión de neurotrofinas, citoquinas y receptores en hipocampo y en linfocitos

Obtención de Muestra- Extracción de ARN: Se sacrificaron los animales, se extrajeron los hipocampos y ganglios y se colocaron en 500 μl de trizol (tri-reagent[®]-Molecular Research Center, Inc.). Luego se sonicaron y se colocaron los homogenatos en hielo dejándose a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente se le agregó cloroformo (CHCl_3), se agitaron vigorosamente los tubos, se colocaron en hielo y luego 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 4°C por 15 min a 12000 x g (centrifuge 5417R, Eppendorf). Luego se transfirió la fase acuosa a tubos estériles y se agregó isopropanol (Biopack), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Pasado ese tiempo se centrifugaron con refrigeración por 15 min a 12000 x g (centrifuge 5417R, Eppendorf). Posteriormente se removió el sobrenadante, el pellet se lavó con etanol al 75%.(Dorwil). Luego se agitó en vortex y centrifugó con refrigeración a 7500 x g durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y se secó el pelly col aire por 10 min y se resuspendió en agua estéril. Se cuantificó el ARN en un espectrofluorometro UV-visible (Nanodrop).

Transcripción Reversa: Se realizó una retrotranscripción del ARN para obtener el cDNA. Para ello en cada reacción se colocó muestra, H_2O y mix 1 (primers al azar, dNTPs, Invitrogen) y se incubaron por 5 min a 65°C . Se colocaron en hielo y se agregó mix 2: Buffer Fiers Stand, DTT, e inhibidor de RNasa (Rnasa sin,

Genbiotech),. Se colocaron en el termociclador (Biometría modelo T Personal) por 2min a 37°C. Luego se sacaron las muestras y se colocaron en hielo y se le agregó M-MLV transcriptasa reversa (Invitrogen)

Se colocó nuevamente en el termociclador, con el siguiente programa:

- 25°C 10 min
- 37 °C 50 min
- 70 ° C 15 min

PCR: Se realizaron las PCRs con el cADN obtenido para los distintas citoquinas (IL-2, IL-4; IL-6, IL-10, IFN- γ) y neurotrofinas (BDNF, NT3, NGF), se utilizó como control Actina- β . En cada reacción se colocó cADN, agua estéril (Promega), primer sentido y antisentido específicos para cada molécula estudiada (Invitrogen o IDT) (tabla 2) y Taq polimerasa (Go-Taq Promega). Se colocaron en el termociclador (Biometría modelo T Personal). Se realizaron los siguientes ciclos:

- 94 °C 45 seg.
- 60 °C 30 seg.
- 72 °C, 30 seg.

El número de ciclos varió de acuerdo al producto de interés. El producto fue corrido electroforéticamente junto con marcadores de peso molecular de cADN en geles de agarosa al 1% con DSView Nuclec Acid Stain (Dongsheng Biotech). Se registraron las bandas obtenidas en un documentador de geles (ImageQuant, GE). La expresión relativa de los genes fue cuantificada por densitometría mediante el software Gel-Pro Analyzer System (Versión 3.1.00.00, Media Cybernetics, Inc. Rockville, MD 20850, USA). La expresión de los genes de interés fueron normalizados a la expresión de β -actina.

Gen	Sentido (5'-3')	Antisentido (5'-3')	producto (pb)	T° annealing (°C)	N° de ciclos
-----	-----------------	---------------------	---------------	-------------------	--------------

BDNF	GGTTCGAGAGGTC TGACGAC	GCTCCAAAGGCAA CTTGACTG	183	60	34
NT3	GATCCAGGCGGAT ATCTTGA	AGCGTCTCTGTTG CCGTAGT	182	60	40
NGF	CATGGGGGAGTTC TCAGTGT	GCACCCACTCTCA AGAGGAT	181	60	38
IL-2	CCTGAGCAGGATG GAGAATTACA	TCCAGAACATGCC GCAGAG	141	57	39
IL-4	GGCATTGTTGAACG GGTCAC	ATCGAAAAGCCCG AAAGAGT	212	60	39
IL-6	CCGGCGCGGCGA CTTCACAG	TTCTGCAAGTGCA TCATCGT	166	61	39
IL-10	CCAAGCCTATTCG GAAATGA	TTTTACAGGGGA GAAATCG	162	60	39
IFN-γ	TGCTGATGGGAGG AGATGTCTAC	ACCTGACACATTC GAGTGCTGT	76	58	34
GR	CCAAGGGTCTGGA GAGGAC	CTGGACGGAGGA GAACTCAC	123	57	36
B₂-AR	TCGAGCGACTAC AAA CCG TC	CCAGAACTCGCAC CAGAAGT	146	57	36
β-actina	CAACTTGATGTAT GAAGGCTTTGGT	ACTTTTATTGGTCT CAAGTCAGTGTAC AG	97	61	30

Tabla 2: Secuencias de los primers utilizados para las RT-PCR. Los primers se diseñaron sobre las secuencias de los mRNA de los distintos genes de la base de datos The Entrez Nucleotide database (pubmed), usando el programa IDT primerQuest.

3-8. Western Blot

Se extrajeron los hipocampos y los ganglios de los animales en estudio. Se colocaron en 300 μ l de buffer homogenato (20 mM HEPES, 1 mM DTT, 1 μ M Leupeptina, 1 μ M PSMF, 0.2 μ M L-Valina, Sigma-Aldrich Co) inmediatamente después de la extracción. Se homogenizaron manualmente con homogenizador y

se centrifugaron a 12000 x g a 4 °C 10 min (Centrifuge 5417R, Eppendorf), Se extrajo el sobrenadante. Se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Sigma-Aldrich Co). Se adicionó buffer muestra (Tris-HCl 50 mM pH 6.8, 2% de SDS, 10% (V/V) de glicerol, 0.2% azul de bromofenol y 2-β-mercaptoetanol 10 mmol/L) y luego se hirvió a baño maría durante tres minutos.

Las muestras se separaron en geles de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturizantes (SDS). Los geles de poliacrilamida se equilibraron con buffer de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, metanol 20% v/v). Se activaron membranas de PVDF (Amersham Biosciences) en metanol y se equilibraron en buffer de transferencia. Se electrotransfirieron las muestras utilizando una minicuba Mini-protean II Biorad, a 100V durante una hora con sistema de refrigeración, según indicaciones del fabricante.

Una vez terminada la transferencia, las membranas se colorearon con Rojo Ponceau (Sigma-Aldrich Co), visualizándose las proteínas transferidas, y se lavaron con agua. Se bloquearon los sitios inespecificos durante 2 h a temperatura ambiente con solución al 2,5 % de leche descremada en TBS (Tris Buffer Salino). Seguidamente, luego de tres lavados con buffer TTBS (0,1 % Tween en TBS), se expuso la membrana al anticuerpo primario (ver tabla 3), el tiempo de incubación dependió del anticuerpo utilizado. Luego de esto se retiró el anticuerpo y se lavó 3 veces con TTBS. A continuación se incubó la membrana con anticuerpo anti-inmunoglobulina G de conejo como anticuerpo secundario (1:2000; Santa Cruz Biotechnology) conjugado con peroxidasa durante 2 h, y finalmente se lavó 3 veces con TTBS. Las membranas fueron analizadas por quimioluminiscencia, siendo expuestas a una solución de revelado (250 mM luminol, ácido cumárico 1,1 mg/ml, buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8,6; 30 µl de peróxido de hidrógeno en 10 ml de solución). Se utilizó el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards (Bio-Rad). Se tomaron imágenes por medio de un sistema de procesamiento de imagen computarizado (ImageQuant TL 7.0, GE Healthcare). La densidad óptica (DO) fue determinada por densitometría cuantitativa usando el programa Gel-Pro Analyzer Sistem (Version 3.1.00.00, Media Cybernetics, Inc. Rockville, MD 20850, USA). La DO de β-actina fue usada como factor de normalización.

Anticuerpo	Fabricante	Origen	Dilución	PM (KDa)
------------	------------	--------	----------	----------

BDNF	Santa Cruz Biotechnology	Conejo	1:200	14-33
NT3	Abcam	Conejo	1:100	27
NGF	Abcam	Conejo	1:500	27
GR	Santa Cruz Biotechnology	Conejo	1:200	90-95
B₂-AR	Santa Cruz Biotechnology	Conejo	1:200	56-85
β-actina	Santa Cruz Biotechnology	Conejo	1:200	55

Tabla 3: Anticuerpos utilizados para los ensayos de Western Blot. Se indica el fabricante, la especie donde se originó el anticuerpo y la dilución en la que fue utilizado en estos ensayos.

3-9. Pruebas Conductuales

3-9-1. Prueba de alternancia

Esta prueba permite evaluar la memoria espacial. Se colocó a los ratones en el centro de un dispositivo en forma de Y (medidas: 30 cm brazo largo, 25 cm brazos cortos). Se colocaron claves espaciales alrededor del dispositivo (figura 11). Se registró durante 6 minutos las entradas a cada brazo y se determinó el número de alternancias. Una alternancia se define como una entrada a cada uno de los brazos sin repetir ninguno. Se calculó el porcentaje de alternancias con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de alternancias} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de alternancias}}{(\text{n}^\circ \text{ de entradas totales}-2)} \times 100$$



Figura 11: Dispositivo utilizado para la prueba de alternancia.

3-9-2. Actividad locomotora en un campo abierto y habituación

La observación de la actividad exploratoria en un campo abierto permite conocer si un determinado tratamiento tiene algún efecto en la respuesta a un entorno novedoso evaluando la actividad motora (Cummins y Walsh, 1976). Si se repite el ensayo exponiendo al animal al mismo ambiente varias veces y en las mismas condiciones, se espera observar una disminución de la conducta exploratoria ya que el entorno deja de ser novedoso. Este mecanismo se denomina **habituación**.

Se colocaron los ratones en el centro de una caja acrílica rectangular (42 x 35 x 15 cm) dividida uniformemente en 30 cuadrados de 7 x 7 cm con sus paredes laterales opacas para evitar el contacto con el exterior (Figura 12). Mediante una cámara de video (SONY DCB-DVD810) se grabaron los patrones de comportamiento de los animales durante 5 min.

Luego del análisis de los videos tomados se determinó:

- N° de líneas cruzadas.
- Posiciones verticales sobre las patas traseras (rearing).
- Tiempo que permanece inmóvil.

Para evaluar la habituación se repite este test a la hora y a las 24 h después de realizado el primer ensayo bajo idénticas condiciones y se registran los parámetros antes mencionados.

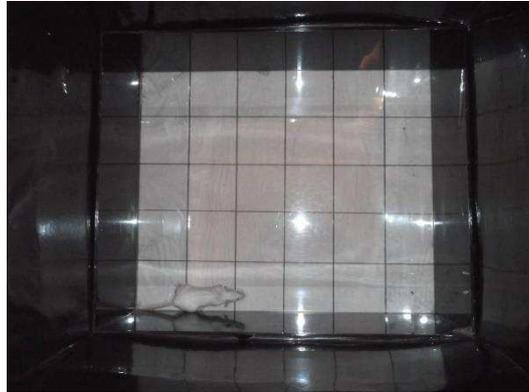


Figura 12: Campo abierto. Dispositivo utilizado para la prueba de habituación.

3-9-3. Prueba de Reconocimiento de Objetos

Esta prueba evalúa la memoria episódica (no espacial).

La prueba consta de 3 fases:

- Habituación: Se colocó al ratón en un campo abierto vacío y se lo dejó explorar 5 min. Esto se realizó 2 días consecutivos a la misma hora.
- Entrenamiento: El tercer día, a la misma hora, se colocaron 2 objetos idénticos en el campo, equidistantes a las paredes. Se colocó al ratón y se lo dejó explorar 5 min.
- Testeo: 1 h luego del entrenamiento, uno de los objetos fue cambiado por otro diferente en forma, color y material (Figura 13). El ratón fue colocado en el campo y se lo dejó explorar 5 min.

Se registró el tiempo que permanece olfateando cada objeto y luego se calculó un índice de elección (Costa y col., 2008)

$$\text{Índice} = \frac{\text{tpo}(\text{obj 1}) - \text{tpo}(\text{obj2})}{\text{tpo}(\text{obj1}) + \text{tpo}(\text{obj2})}$$

donde tpo (obj) = tiempo que pasa explorando el objeto.

Previo al experimento los objetos fueron elegidos siendo evaluados en un test de preferencia, exponiendo ratones controles a 2 objetos distintos, buscando objetos para los cuales el índice de elección fuese el mismo.



Figura 13: Dispositivo utilizado para la prueba de reconocimiento de objetos.

3-9-4. Reconocimiento espacial de objetos

Los ratones presentan un comportamiento espontáneo a explorar objetos novedosos. Este tipo de prueba evalúa la memoria espacial a corto plazo. El aparato consiste en una caja de 100 cm² con tres paredes de color negro, una de color marrón, el piso es de color blanco y de un material de fácil limpieza.

Esta prueba consiste en una fase de habituación y una de evaluación. La fase de habituación es una sesión diaria de diez minutos durante tres días, donde al ratón se lo coloca en el centro de la caja sin objetos y se lo deja explorar libremente.

El cuarto día de evaluación se colocan cuatro objetos en cada esquina de la caja a cinco centímetros de cada pared y se le permite al ratón explorar los objetos durante diez minutos (figura 14; esquema I), se lo saca de la caja a la hora se cambia dos objetos de posición y se coloca al ratón nuevamente en la caja (figura 14; esquema II). La evaluación de la memoria se realiza calculando el índice de discriminación (ID) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$ID = \frac{\text{Tpo explorando objetos en posición novedosa} - \text{tpo explorando objetos en igual posición}}{\text{Tpo total de exploración}}$$

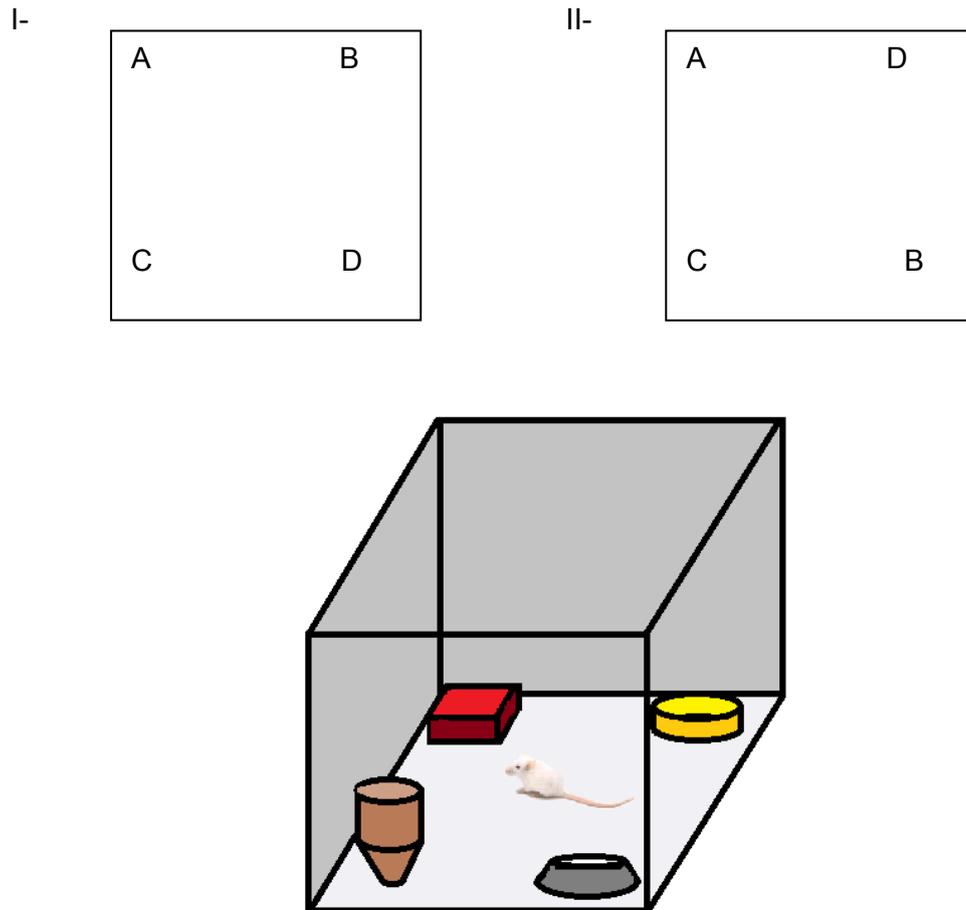


Figura 14: Representación gráfica de test de campo abierto con juguetes.

3-9-5. Prueba de laberinto elevado en cruz

El test de EPM es utilizado para cuantificar las conductas relacionadas a la ansiedad, ya que está basado en el conflicto natural del ratón a explorar un nuevo ambiente y la tendencia a evitar áreas potencialmente peligrosas (Pellow y col., 1985). El comportamiento que demuestra ansiedad es evitar los brazos abiertos y pasar la mayoría del tiempo en los brazos cerrados.

El laberinto elevado en cruz consiste en una cruz con 2 brazos abiertos y 2 brazos cerrados por paredes oscuras, la cual está elevada 70 cm del suelo (Figura 15).

Se coloca al ratón en el centro y se lo deja explorar 5 min. Se registra el número de visitas y el tiempo de permanencia en brazos abiertos y cerrados, y se expresa como proporción del total.



Figura 15: dispositivo utilizado para la prueba de laberinto elevado en

3-9-6. Prueba de evitación pasiva

La prueba de evitación pasiva permite evaluar el recuerdo de una experiencia aversiva mediante la simple evitación de un ambiente en el cual ocurrió dicha experiencia (Delacour, 1988; Izquierdo y Medina, 1997). Esta prueba evalúa la memoria asociativa. El aparato utilizado en esta prueba consiste en dos compartimentos de iguales dimensiones, uno iluminado por una lámpara de 60 W y otro oscuro, divididos por una abertura (80 x 80 mm). El piso está conformado por una grilla de varillas metálicas y las del compartimento oscuro están electrificadas. El aparato está conectado a una computadora que permite regular la duración e intensidad del shock eléctrico (Figura 16).

La conducta instintiva de los roedores, animales con hábitos nocturnos, hace que prefieran los ambientes oscuros o poco iluminados. Por lo tanto, si el animal es colocado en el compartimento iluminado tenderá a pasar a la zona oscura. Cuando el animal entra con sus 4 patas al compartimento oscuro recibe una descarga de 0,5 mA durante 3 segundos. El estímulo aversivo produce una modificación en la conducta exploratoria y contribuye al aprendizaje, ya que si el animal es expuesto nuevamente a la situación, se espera que permanezca más tiempo en el área iluminada para evitar el shock eléctrico asociado con el área oscura. Esta prueba supone una situación de conflicto: ambos compartimentos tienen características aversivas. Sin embargo, el shock eléctrico es considerado un estímulo más aversivo que la luz por lo que se espera que, bajo condiciones normales, el animal tienda a inhibir su tendencia innata a permanecer en lugares oscuros.

En la primera fase, los animales fueron colocados en el compartimiento iluminado y se registró el tiempo que transcurrió hasta que el animal ingresó con sus 4 patas al área oscura (latencia de entrada) donde se aplicó la descarga eléctrica. El animal puede

escapar del shock volviendo al compartimiento iluminado. Los animales permanecieron en sus jaulas hasta que se realizó el segundo ensayo.

Luego de 24 horas, se repitió el procedimiento. El ratón fue colocado nuevamente en la zona iluminada del aparato y se registró el tiempo en que tardó en entrar en la zona oscura. La latencia del animal que no entró en el compartimiento oscuro por más de 10 minutos fue calculada como de 600 segundos.



Figura 16: Dispositivo Utilizado para la prueba de evitación inhibitoria.

3-10 Análisis estadístico

Las diferencias entre dos grupos fueron analizadas por el tests de T con o sin medidas repetidas y con o sin corrección de Welch.

Las diferencias entre tres o más grupos de datos fueron evaluadas por análisis de varianza (ANOVA) de un factor o de dos factores, seguido de una comparación múltiple utilizando el método de Bonferroni. Para los ANOVA de dos factores, cuando la interacción resultó significativa se realizó un análisis de efectos simples.

Cuando los datos no resultaron normales se utilizaron los métodos no paramétricos de Kruskal Wallis.

Los datos fueron expresados como los valores medios \pm error estándar de la media ($X \pm SEM$). Las diferencias entre las medias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico Infostat.

4-Resultados

Primera parte

Efectos del Estrés prenatal sobre el sistema inmune y parámetros conductuales de crías adultas

4-1. Parámetros gestacionales de la hembra preñada y de las crías

En primer lugar se determinó el tiempo de gestación y la ganancia de peso durante la preñez. Además se determinó el número de crías, el número de machos y hembras nacidas; y el peso de las crías en los días 1, 7 y 21 postnatal (PND) (tabla 4). Ninguno de los parámetros estudiados se vio afectado por el estrés prenatal [Gestación (días): prueba t de Student: $t(18)=0.40$, NS; Ganancia de peso: prueba t de Student: $t(18)=0.80$, NS; Número de Crías: ANOVA de 2 vías : Interacción: $F(1,48)=0,01$, NS; Efectos principales: Estrés: $F(1,48)=0,07$, NS, Sexo: $F(1,48)=0,65$, NS. Pesos: Prueba t de Student: PND 1: $t(24)=0,91$, NS; PND 7: $t(24)=0,81$, NS; PND21: $t(24)=0,85$, NS].

Parámetros	Control	EP
Hembras Preñadas		
tiempo de gestación (días)	20,38 ± 0,26	20,25 ± 0,25
ganancia de peso (% de aumento con respecto al día 14 de preñez)	119,32 ± 1,92	117,18 ± 1,86
Crías		
número de crías	5,23 ± 0,55	5,38 ± 0,55
Machos	2,46±0,4	2,54±0,33
Hembras	2,77±0,50	2,92±0,47
Pesos Crías (g)		
PND 1	1,66 ± 0,08	1,74 ± 0,05
PND 7	4,89 ± 0,36	5,19 ± 0,39
PND 21	10,24 ± 0,32	11,04 ± 0,28

Tabla 4: Parámetros gestacionales y de las crías. Se representa la media ± el error estándar de 10 hembras preñadas por grupo.

4-2. Efectos del EP sobre el sistema inmune

A fin de determinar si el EP influye sobre el sistema inmune de la descendencia se evaluaron distintos parámetros inmunológicos en machos y hembras provenientes de madres control y estresadas.

4-2-1. Inmunidad Innata

4-2-1-1. Actividad de NK

Se analizó la actividad citotóxica de las células NK sobre la línea celular YAC-1 previamente marcada con [3H]-Timidina como se describió en materiales y métodos.

Se realizaron co-cultivos *in vitro* con la línea celular previamente cargada con [3H]-Timidina y esplenocitos en distintas concentraciones.

Se observó un aumento en el porcentaje de lisis dependiente de la dosis tanto para machos como para hembras. No se encontraron diferencias en la actividad de NK en las hembras [ANOVA de dos vías; interacción concentración por estrés: $F(2,18) = 0,75$, NS; efectos principales: concentración: $F(2,18) = 348,06$, $p < 0,001$; estrés: $F(1,18) = 0,79$, NS] (Figura 17 A).

En cambio en los machos se observó un aumento en la actividad lítica en animales EP en la relación 1:25 comparado con animales control [ANOVA de dos vías: interacción concentración x estrés: $F(2,18) = 2,49$, NS, efectos principales: concentración: $F(2,18) = 44,96$, $p < 0,001$; estrés: $F(1,18) = 9,42$, $p < 0,01$] (Figura 17 B).

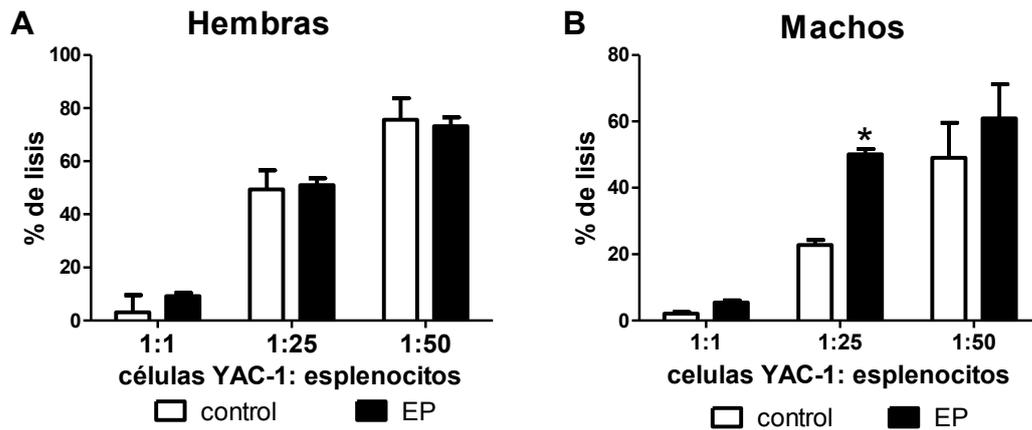


Figura 17: Ensayo de citotoxicidad por liberación de [3H]-Timidina. Los valores expresan la media \pm ES del porcentaje de lisis para diferentes relaciones de célula blanco: efectora, luego de ser cultivadas durante 3,5 horas para hembras (A) y machos (B), $n=4$ por grupo, * $p<0,05$ con respecto al control.

4-2-1-2. Actividad fagocítica de macrófagos

Se evaluó la capacidad fagocítica de macrófagos con eritrocitos opsonizados como se describió en materiales y métodos.

No se observaron cambios en la capacidad fagocítica ni en hembras ni en machos [Prueba t de Student; Hembras $t(10) = -0,91$, NS; Machos $t(10) = -1,53$, NS] (Figura 18).

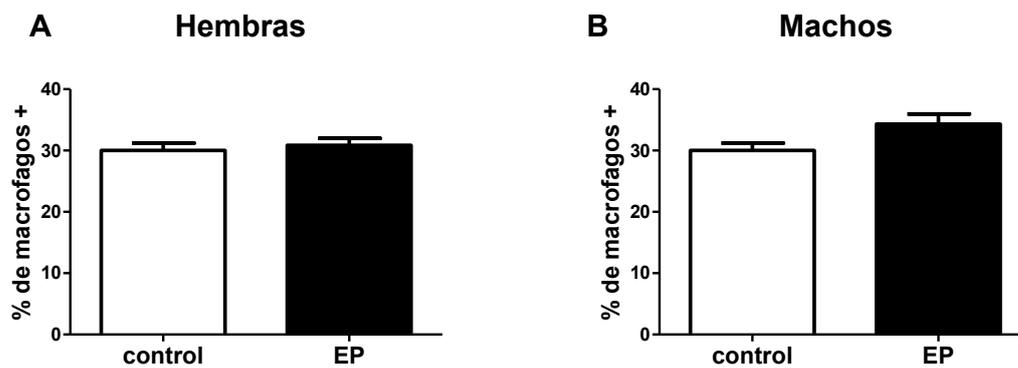


Figura 18: Capacidad fagocítica de macrófagos. Se cultivaron macrófagos peritoneales con eritrocitos opsonizados y se determinó la capacidad fagocítica. Se grafica el porcentaje de macrófagos positivos para hembras (A) y machos (B). Se tomó como positivo el macrófago con más de tres eritrocitos fagocitados, $n=6$ por grupo.

4-2-2. Respuesta Adaptativa

4-2-2-1. Respuesta proliferativa en linfocitos T estimulados con Con A

El análisis de la proliferación es una prueba de la reactividad linfocitaria que examina con que eficacia se dividen las células estimuladas mitogénicamente. Se asume que una mayor proliferación indica una función celular más efectiva. Para evaluar la funcionalidad de LT se utilizó como mitógeno selectivo concanavalina A (Con A).

Se realizaron cultivos *in vitro* de linfocitos provenientes de ganglios de animales controles y EP estimulados con la concentración óptima de Con A (1µg/ml).

Como puede verse en la figura 19, el EP no modificó la proliferación con respecto al control, tanto en machos como en hembras [Prueba t de Student: Hembras $t(20)=0.56$, NS; Machos $t(28)=0.58$; NS].

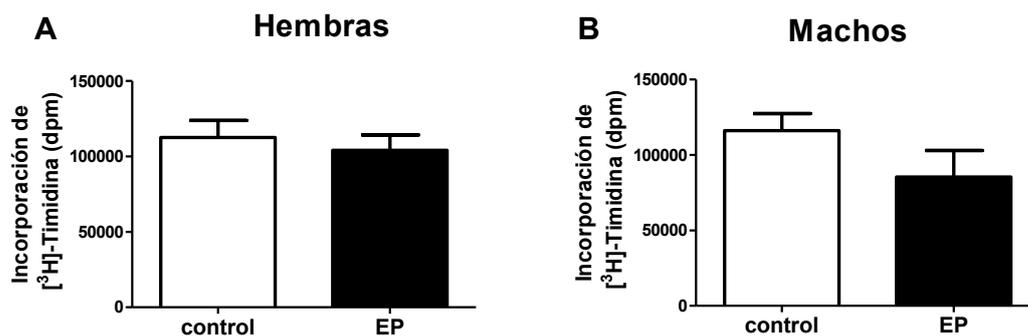


Figura 19: Proliferación de linfocitos T inducida por Con A

Linfocitos provenientes de ganglios linfáticos fueron cultivados en presencia de Con A (1µg/ml). Se determinó la proliferación celular por incorporación de ^3H -timidina para hembras (A) y machos (B). Los resultados expresan la media \pm ES. Proliferación basal (dpm): Hembras: control= 950 ± 180 ; EP= 839 ± 162 . Machos: control= 843 ± 123 ; EP= 899 ± 176 . Hembras: n= 11 por grupo, Machos n= 15 por grupo.

4-2-2-2. Distribución de subpoblaciones linfocitarias

Se determinó el porcentaje de linfocitos CD4^+ y CD8^+ mediante citometría de flujo. No se encontraron diferencias en ninguno de los grupos estudiados tanto en machos como en hembras [Prueba t de student: CD4^+ Hembras: $t(6)=0.79$, NS; CD8^+ Hembras $t(6)=1.11$, NS; CD4^+ Machos: $t(6)=0.98$, NS; CD8^+ Machos: $t(6)=2.29$, NS] (Tabla 5).

Grupo	Hembras		Machos	
	Subpoblaciones linfocitarias (% de linfocitos totales)		Subpoblaciones linfocitarias (% de linfocitos totales)	
	CD4+	CD8+	CD4+	CD8+
control	60,10± 2,50	20,00±1,80	55,2±1,30	21,3±1,01
EP	58,95±1,04	19,95±1,65	53,7±1,40	19,05±1,02

Tabla 5: Distribución de subpoblaciones linfocitarias

4-2-2-3. Respuesta Inmune mediada por linfocitos B *in vitro*

Para evaluar la funcionalidad de Linfocitos B se utilizó el mitógeno selectivo lipopolisacárido (LPS). Se realizaron cultivos con linfocitos provenientes de bazo animales controles y EP estimulados con la concentración óptima de LPS (30 µg/ ml).

Puede verse en la figura 20 que el EP no produjo cambios en la proliferación B con respecto al control ni en machos ni en hembras [Prueba t de Student: Hembras: $t(25) = 0,24$, NS; Machos: $t(16) = -0,84$, NS].

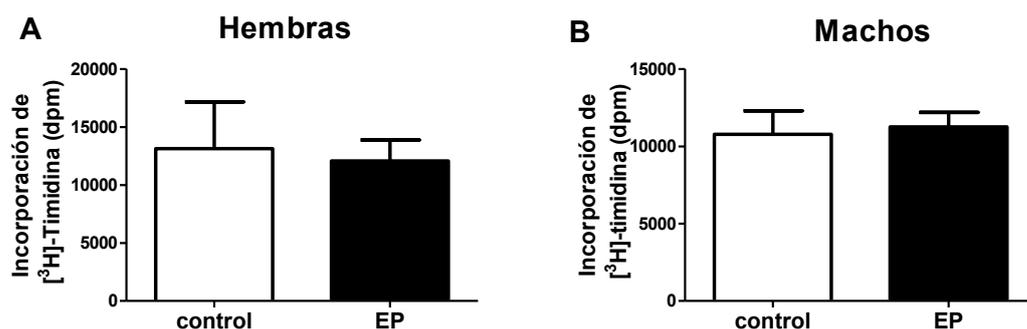


Figura 20: Proliferación de linfocitos B inducida por LPS.

Linfocitos provenientes de bazo fueron cultivados en presencia LPS (30µg/ml). Se determinó la proliferación celular por incorporación de ^3H -timidina para hembras (A) y machos (B). Los resultados expresan la media ± ES. Proliferación basal (dpm) Hembras: control= 2290±230; EP= 2049±24; Machos: control: 2102±123; EP= 2059±203, Hembras: n= 11 por grupo. Machos n= 15 por grupo.

4-2-2-4. Evaluación de la respuesta inmune *in vivo*

Se analizó la respuesta inmune humoral frente a un antígeno T-dependiente como son los GRC y a un Ag T-independiente, el LPS. Frente a Ags T-dependientes, se genera primero IgM y luego se produce IgG, siendo la contribución de la IgM mayor. Tras una segunda inoculación el Ac predominante es de tipo IgG, para que se generen Ac de tipo IgG se necesita de la colaboración de linfocitos Th2. Frente a Ags T-independientes, ya sea en la primera o segunda inoculación (respuesta primaria o secundaria), se produce siempre IgM y no es necesaria la colaboración de LT.

Por ello se determinó la generación de Ac tipo IgM para el desafío con LPS, y la generación de Ac tipo IgM para la respuesta primaria frente a GRC y IgG para la respuesta secundaria.

Como puede verse en la figura 20 A y C no se encontraron diferencias en el título de anticuerpo tipo IgM y IgG anti-GRC en las hembras estresadas con respecto al control [Prueba de Kruskal Wallis, IgM: $H(8)= 0,47$, NS; IgG: $H(8)= 0,80$, NS].

Un resultado similar fue encontrado en machos. [Prueba de Kruskal Wallis, IgM: $H(8)= 3,19$, NS; IgG: $H(8)= 0,40$, NS] (Figura 21 B y D).

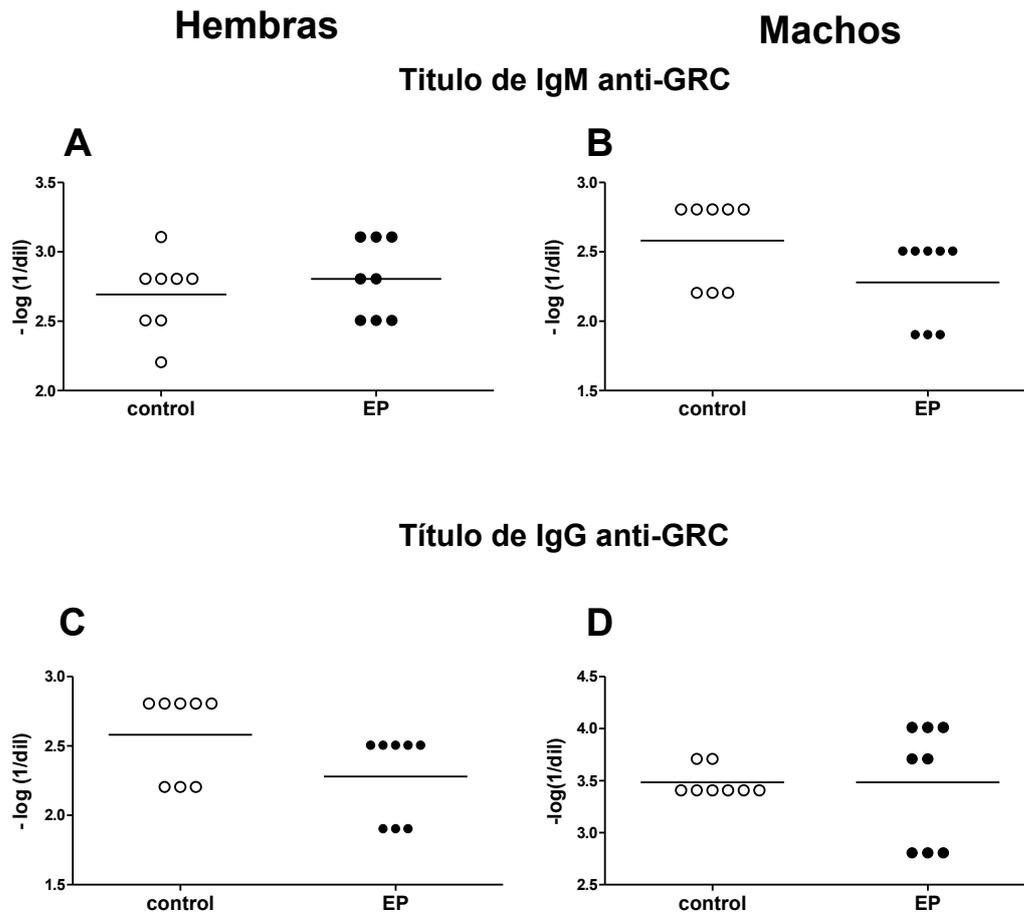


Figura 21: Producción de Ac, frente a un desafío antigénico T-dependiente Se determinaron los títulos de Ac en suero de animales control o EP inmunizados con GRC. Título de IgM anti-GRC (**A** y **B**). Título de IgG anti-GRC (**C** y **D**). En machos y hembras. Se grafica el título de anticuerpos de 8 animales por grupo. La barra horizontal representa la media de cada grupo.

En cuanto al título de anticuerpos IgM anti-LPS, tampoco se observaron cambios ni en machos ni en hembras [Prueba de Kruskal Wallis: Hembras IgM: $H(8) = 0,2$, NS; Machos IgM: $H(8) = 3,00$, NS] (Figura 22).

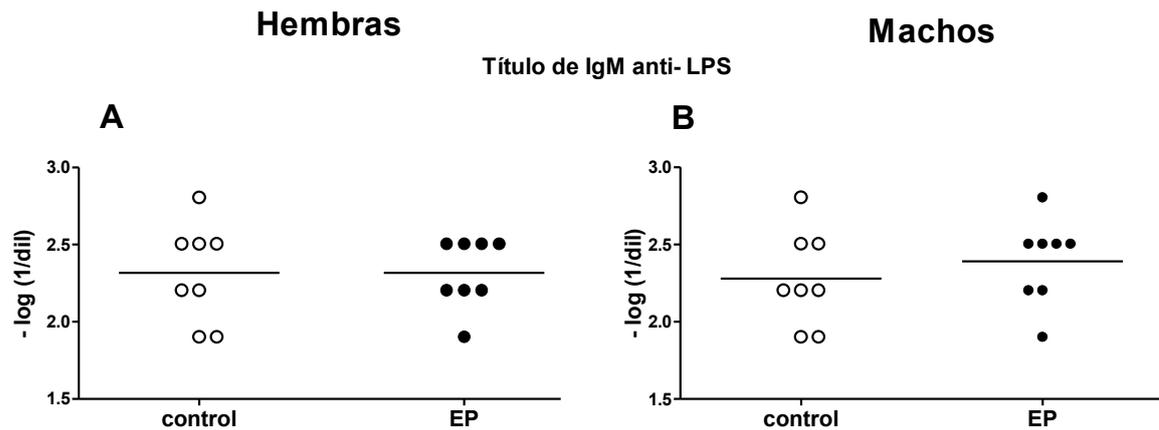


Figura 22: producción de Ac, frente a un desafío antigénico T-Independiente Se determinaron los títulos de Ac en suero de animales control o EP inmunizados con LPS en hembras (A) y machos (B); Se grafica el título IgM anti-LPS de anticuerpos de 8 animales por grupo. La barra horizontal representa la media de cada grupo.

4-2-3. Determinación de Citoquinas

Se sugirió que el estrés puede alterar el balance de citoquinas en especial el balance Th1/th2, Por lo que fue de interés determinar la expresión de citoquinas en los linfocitos de los grupos experimentales. Se determinó la producción de ARNm de IL-2, IL-4, IL-6 IL-10 e IFN- γ por medio de RT-PCR.

Puede verse en la figura 23 que en las hembras el EP produjo un aumento de los niveles de ARNm de IL-4 [Prueba t de Student: $t(6)=-4,96$, $p<0,01$]; y una disminución en los niveles de ARNm de IFN- γ [Prueba t de Student: $t(6)=5,55$, $p<0,01$] en comparación con animales control. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de ARNm para IL-6, IL-10 e IL-2 con respecto a los controles [Prueba t de Student: $t(6)= 0,37$, NS; $t(6)= 0,28$, NS; $t(6)= -0,44$, NS respectivamente] (Figura 23 B, C y E).

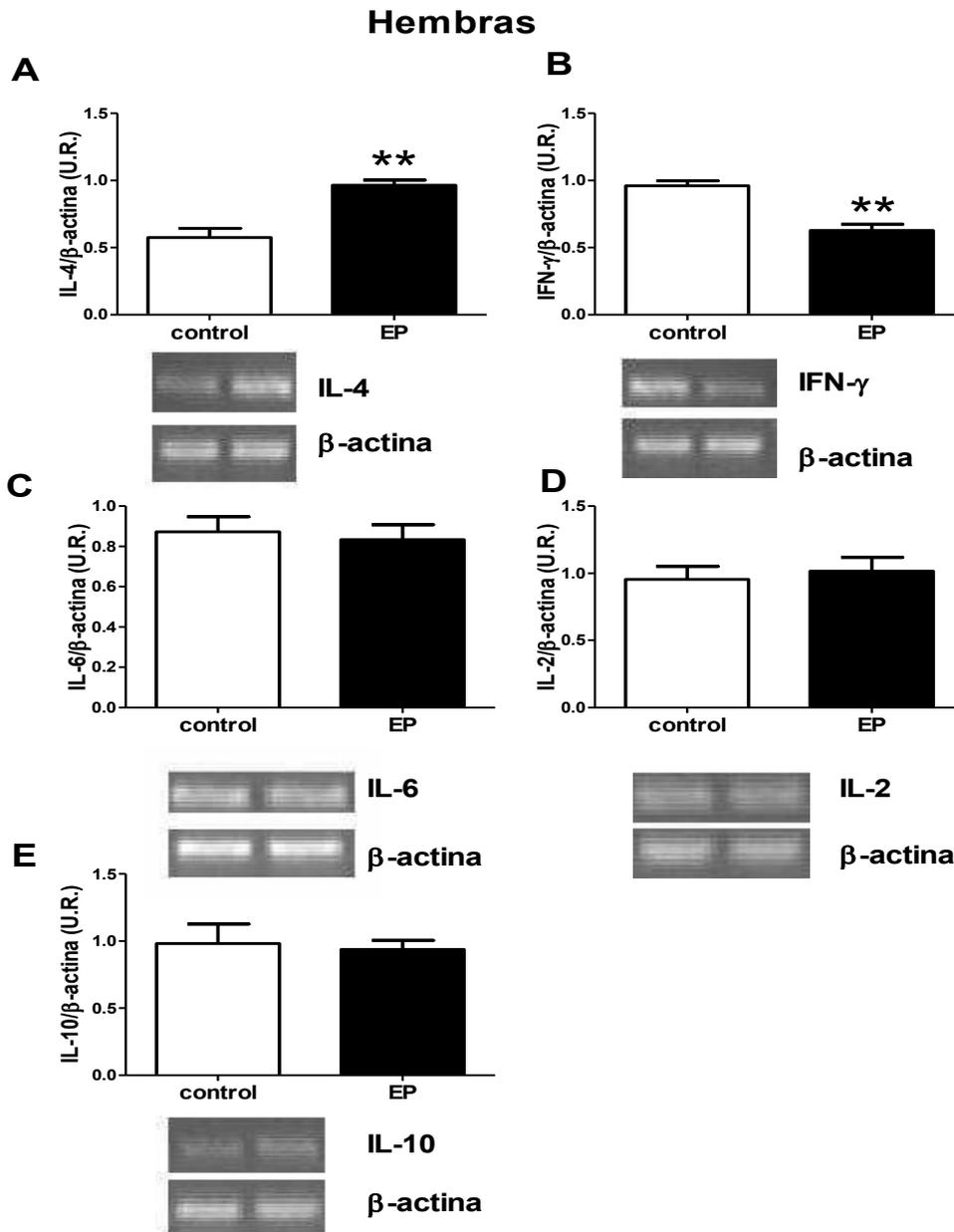


Figura 23: Expresión de citoquinas en ganglios de hembras.

Se determinaron los niveles ARNm de citoquinas IL-4 (A), IFN- γ (B) IL-6 (C), IL-2 (D) e IL-10 (E) por medio de RT-PCR. Los datos se expresan en relación a los niveles de ARNm de actina. Los resultados representan la media \pm ES de 4 muestras cada uno. ** $p < 0,01$.

Además se determinaron los niveles de citoquinas en sobrenadante de cultivos de linfocitos provenientes de ganglios linfáticos estimulados con Con A por medio de un equipo de ELISA.

Para las hembras, se observó un aumento en los niveles de IL4 [Prueba t de Student: $t(6) = -8,32$, $p < 0,001$] y una disminución en los niveles de IFN- γ [Prueba t de Student: $t(8) = 3,70$, $p < 0,01$]. No se observaron diferencias en los niveles de IL-10 e IL-2 [Prueba t de Student: $t(8) = -1,05$, NS; $t(10) = 0,54$, NS respectivamente] (Figura 24).

Hembras

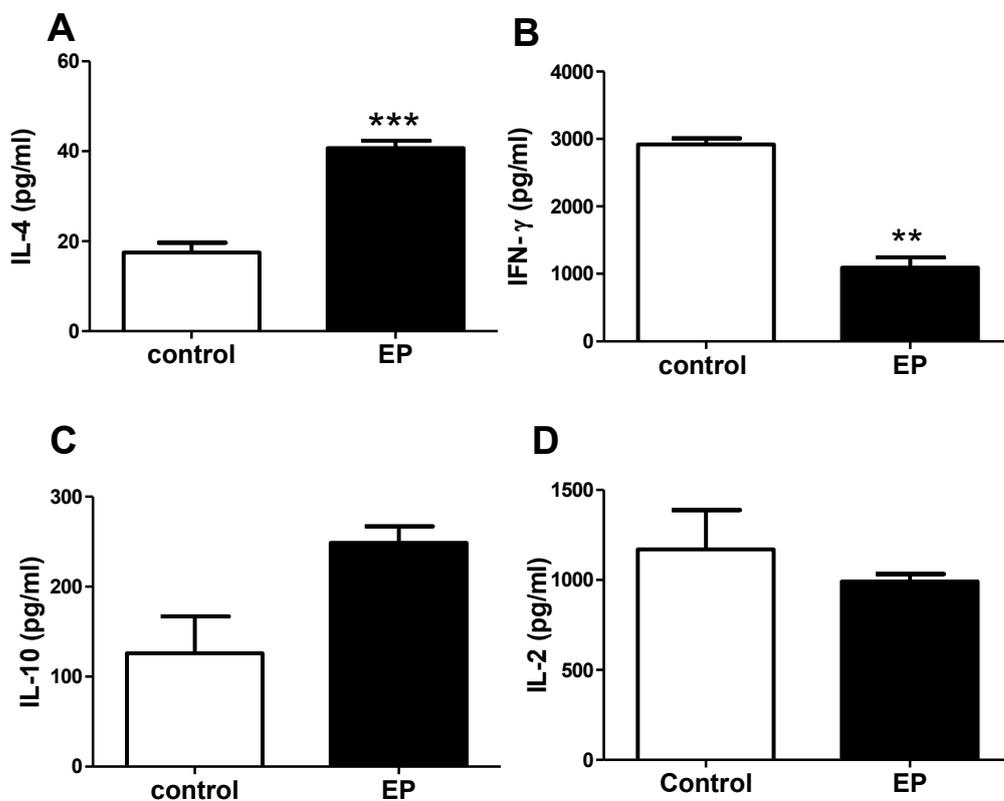


Figura 24: Liberación de citoquinas en hembras.

Se determinaron los niveles de IL-4 (A), IFN- γ (B), IL-10(C) e IL-2 (D) por medio de un ELISA en sobrenadante de linfocitos estimulados con Con A (1 $\mu\text{g/ml}$). Los resultados representan la media \pm ES, n entre 4 y 6 por grupo. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$.

En los machos, el EP no modificó los niveles de ARNm de las citoquinas estudiadas [Prueba t de Student: IL-4: $t(13) = -0,23$ NS; IFN γ : $t(12) = -1,17$, NS; IL-6: $t(10) = -0,03$, NS; IL-2 $t(10) = -0,22$, NS; IL-10: $t(13) = 0,50$, NS] (Figura 25).

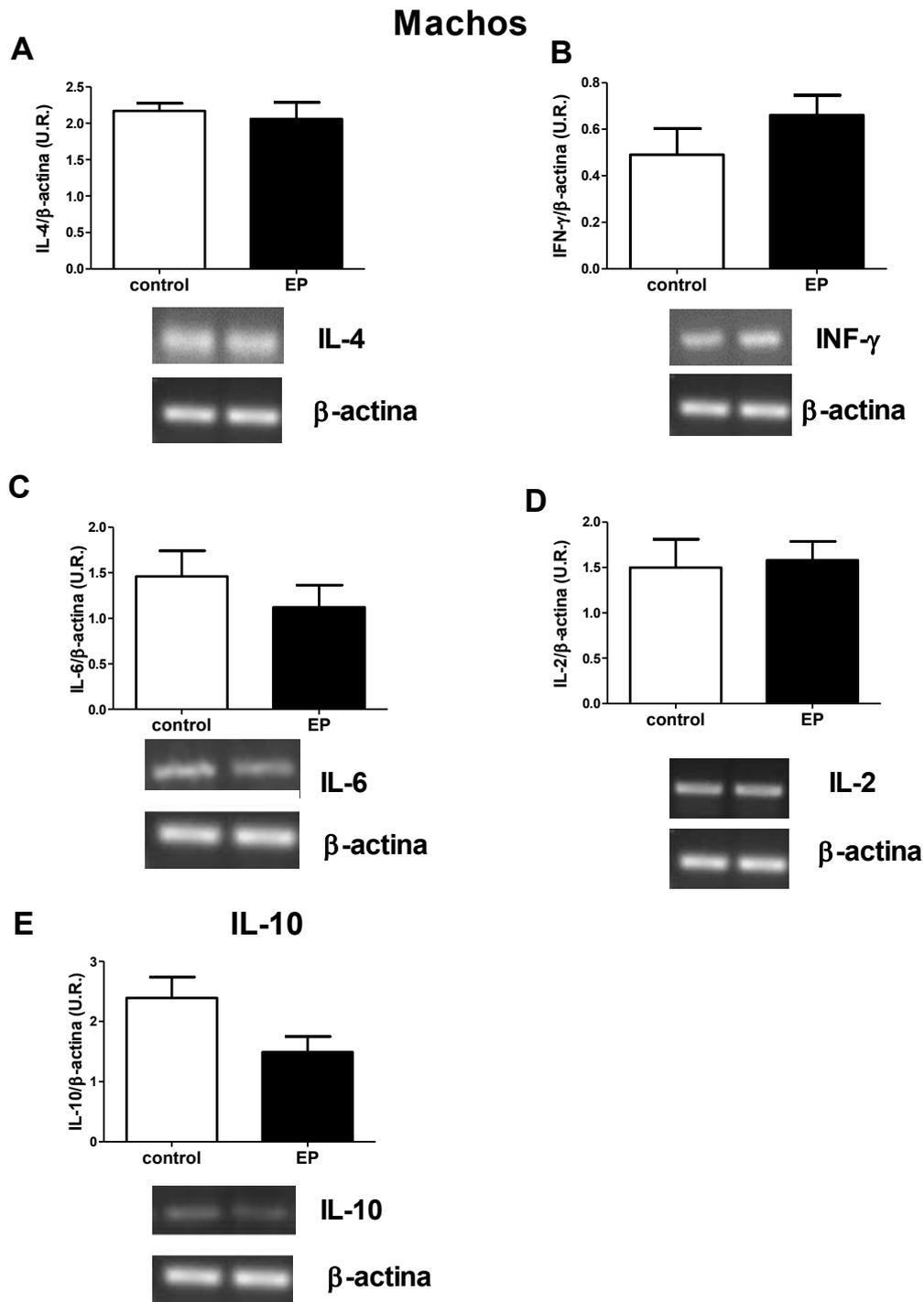


Figura 25: Expresión de citoquinas en ganglios de machos.

Se determinaron los niveles ARNm de IL-4 (A), IFN-γ (B), IL-6 (C), IL-2 (D) e IL-10 (E) por medio de RT-PCR. Los datos se expresan en relación a los niveles de ARNm de actina. Los resultados representan la media \pm ES, n entre 5 y 8 por grupo.

En cuanto a los niveles de citoquinas en sobrenadante de linfocitos provenientes de ganglios linfáticos estimulados con Con A, tampoco se encontraron diferencias [Prueba t de Student: IL-4: $t(6) = -0,57$, NS; IFN γ : $t(8) = -0,13$, NS; IL-10: $t(6) = -0,16$, NS; IL-2: $t(10) = -0,89$, NS] (Figura 26).

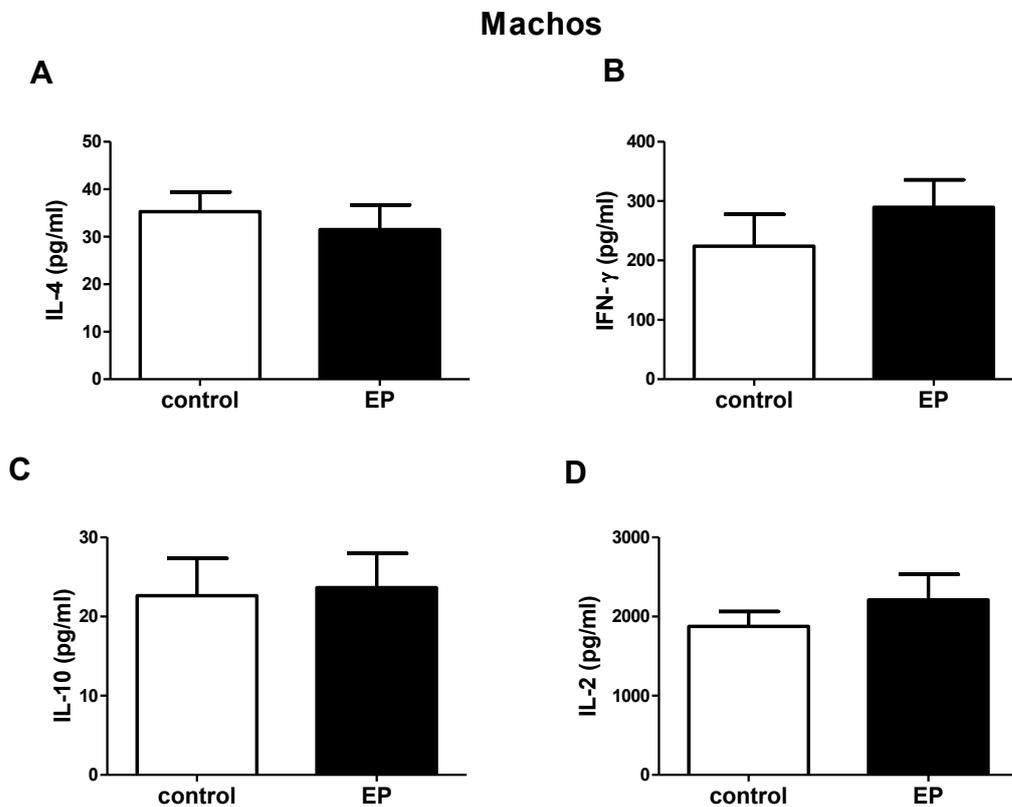


Figura 26: Liberación de citoquinas en machos

Se determinaron los niveles de IL-4 (A), IFN- γ (B), IL-10 (C) e IL-2 (D) por medio de un ELISA en sobrenadante de linfocitos estimulados con Con A. Los resultados representan la media \pm ES, n entre 4 y 6 por grupo.

4-3. Influencia de corticosterona y catecolaminas sobre la respuesta inmune

Las catecolaminas y los glucocorticoides, son las hormonas clásicamente asociadas a las situaciones de estrés y como ya se mencionó, pueden modular la respuesta inmune. Se sabe que los linfocitos poseen receptores para ambas hormonas, por lo que pueden responder a ellas.

A fin de analizar la influencia de estas hormonas sobre la respuesta inmune se analizaron sus niveles en los distintos grupos experimentales así como su efecto sobre

la reactividad linfocitaria en cultivos *in vitro*. Asimismo, la expresión de sus receptores en células de ganglio linfáticos.

4-3-1. Niveles de corticosterona

Se determinaron los niveles de corticosterona en plasma proveniente de los distintos grupos experimentales mediante radio inmuno ensayo.

Los animales EP no mostraron diferencias basales en los niveles de corticosterona con respecto a los animales control, tanto para hembras [Prueba t de Student: $t(24) = -0,13$, NS] como para machos [$t(10) = -1,00$, NS] (Figura 27).

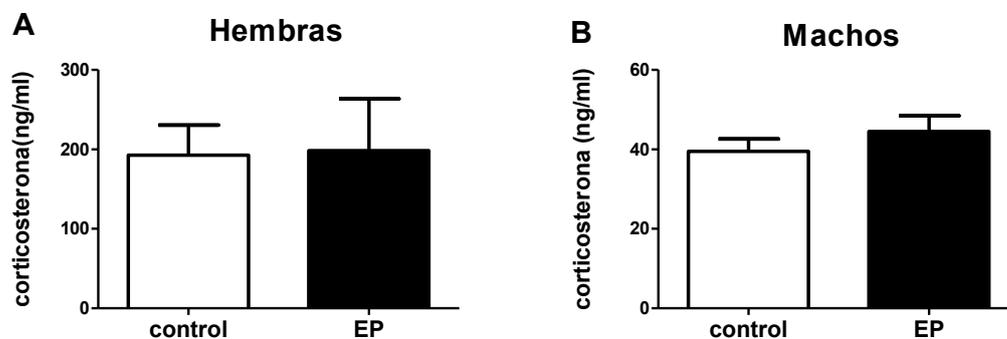


Figura 27: Niveles de corticosterona

Se determinaron los niveles de corticosterona en plasma por medio de RIA para hembras (A) y machos (B). Los resultados expresan la media \pm ES. Hembras $n = 13$ Machos $n = 6$.

4-3-2. Niveles de catecolaminas

Se determinaron los niveles de catecolaminas en bazo de los distintos grupos experimentales por el método fluorimétrico de Laverti y Taylor (1968).

Puede verse en la figura 28 que los animales EP no presentaron diferencias en los niveles de catecolaminas con respecto a los controles en condiciones basales [Prueba t de Student: Hembras $t(24) = -0,67$, NS; Machos $t(18) = 0,19$, NS]

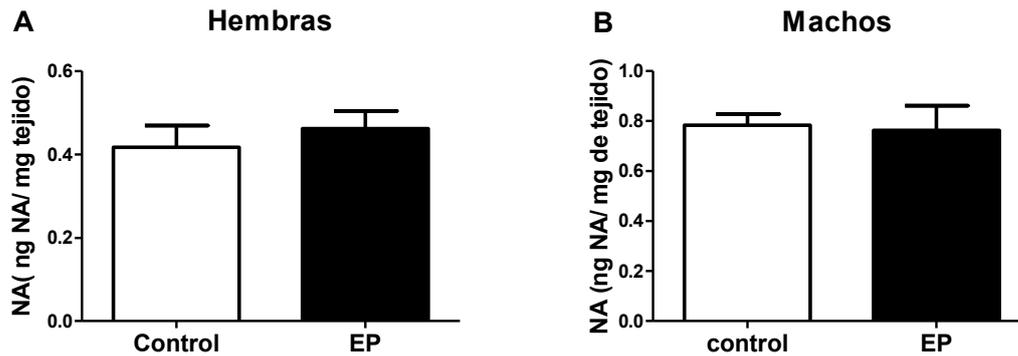


Figura 28: Niveles de catecolaminas

Se determinaron los niveles de catecolaminas en bazo por medio del método fluorimétrico de Laverti y Taylor para hembras (A) y machos (B). Los resultados expresan la media \pm ES. Hembras: n= 13; Machos n= 10.

4-3-3. Peso de las glándulas adrenales

Se extrajeron las glándulas adrenales de los animales y se determinó el peso así como el peso corporal, se calculó la relación del peso de la glándula sobre el peso corporal total (Figura 29). No se observaron diferencias en la relación entre animales control y estresados tanto para hembras [Prueba t de Student: $t(14)= 0,51$, NS] como para machos [Prueba t de Student: $t(14)= -0,39$, NS].

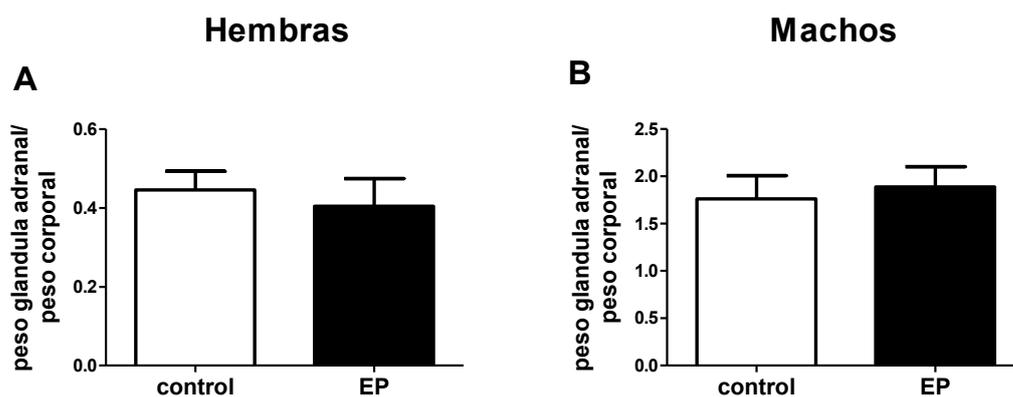


Figura 29: Relación entre el peso corporal y el peso de la glándula adrenal.

Se grafica el peso de la glándula adrenal sobre el peso corporal para hembras (A) y machos (B). El gráfico muestra el promedio \pm SEM. n= 8 por grupo.

4-3-4. Efecto de corticosterona y epinefrina en la respuesta proliferativa

La respuesta linfocitaria puede verse afectada no sólo por cambios en los niveles de hormonas sino que además, los linfocitos de animales estresados podrían tener alterada la sensibilidad a las hormonas del estrés. Debido a ello, se analizó si el estrés prenatal podría afectar la sensibilidad de los linfocitos a estas hormonas. A tal fin, se determinó la proliferación de linfocitos provenientes de animales y no a estrés prenatal estimulados con Con A, en presencia de concentraciones crecientes de corticosterona (Figura 30 A y C) o epinefrina (Figura 30 B y D).

En hembras, la adición de corticosterona indujo una modulación de la respuesta proliferativa que es dependiente de la dosis (Figura 30 A). Concentraciones bajas de corticosterona indujeron un efecto estimulador y altas concentraciones tuvieron un efecto inhibitorio sobre la respuesta proliferativa de animales control. Sin embargo el efecto estimulador no se observó en la respuesta proliferativa de linfocitos provenientes de hembras EP. Además altas concentraciones de corticosterona mostraron una mayor inhibición en la respuesta proliferativa de animales EP en comparación con animales controles (figura 29 A) [ANOVA de dos vías con medidas repetidas, interacción droga x estrés: $F(3,14)=1,15$ NS; droga: $F(3,14) = 19,51$, $p < 0,001$; estrés: $F(1,14)=14,3$ $p < 0,01$].

La adición de epinefrina, en hembras, modula significativamente la proliferación de células T dependiendo de la concentración, pero no se observaron cambios entre hembras EP y controles (Figura 30 B) [ANOVA de dos vías con medidas repetidas: Interacción: concentración x droga: $F(3,14)=2,23$ NS; droga: $F(14,3)= 63,34$, $p < 0,001$ estrés: $F(3,14)=0,02$ NS].

En los machos, también se observó una modulación de la respuesta proliferativa dependiente de la dosis de corticosterona. En la cual bajas dosis producen un efecto estimulador y altas dosis un efecto inhibitorio. Si bien tanto en animales EP como controles se observó esto. El efecto estimulador fue menor en animales EP que en animales control, pero el efecto inhibitorio fue igual para ambos grupos [ANOVA de dos vías con medidas repetidas: interacción droga x estrés: $F(2,14)= 1,44$ NS, droga: $F(2,14)= 15,34$ $p < 0,001$; estrés $F(1,14)= 13,1$ $p < 0,001$] (Figura 30 C).

En los machos la adición de epinefrina produjo una estimulación a dosis bajas y una inhibición a dosis altas. No se encontraron diferencias entre animales EP y controles

[ANOVA de dos vías con medidas repetidas: Interacción droga x estrés: $F(2,14)=1,1$ NS; droga: $F(3,14)= 43,34$, $p < 0,001$; estrés: $F(1,14)=0,12$] (Figura 30 D).

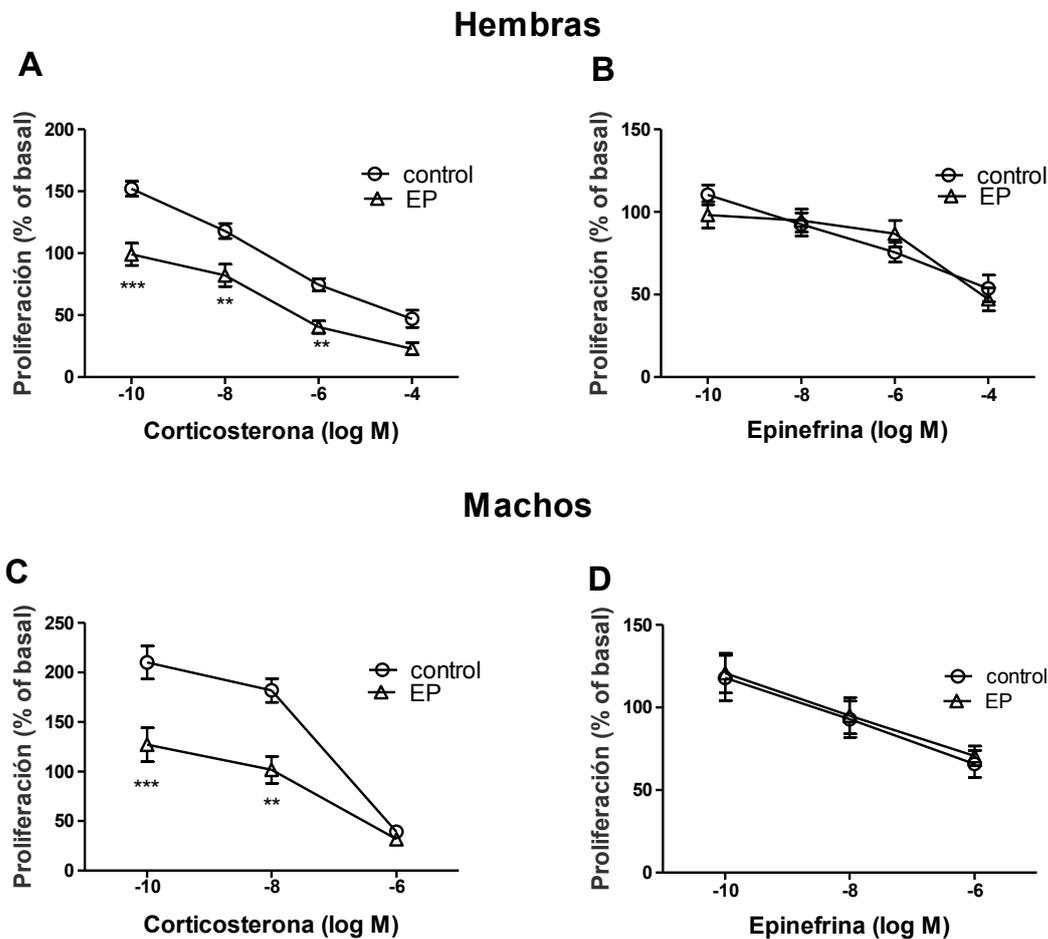


Figura 30: Efecto de corticosterona y epinefrina sobre la respuesta proliferativa de linfocitos T inducida por Con A.

Linfocitos provenientes de ganglios linfáticos estimuladas con Con A (1 μ g/ml) fueron co-incubadas con concentraciones crecientes de corticosterona (**A** y **C**) o epinefrina (**B** y **D**). Se determinó la proliferación celular por incorporación de ^3H -timidina. Los resultados se expresan como porcentaje de proliferación en ausencia de droga (proliferación basal). Los datos representan la media \pm ES, $n = 8$ por grupo. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4-3-5. Niveles del receptor para glucocorticoides (GR) y del receptor β_2 - adrenérgico

Los efectos encontrados a nivel linfocitos podrían deberse a un desbalance en el número de receptores para glucocorticoides y del receptor β_2 -adrenérgico, para ello se determinaron los niveles tanto de ARNm como de proteína.

En las hembras, la expresión del ARNm y el nivel de proteínas para GR fue mayor en linfocitos provenientes de hembras EP con respecto a los controles [Prueba t de Student: $t(10) = 3.860$, $p < 0.01$ y $t(8) = 3.565$, $p < 0.01$, respectivamente] (Figura 31 A y B).

Por otro lado la expresión de ARNm y los niveles de proteínas del receptor β_2 -adrenérgico fueron similares en ambos grupos. [Prueba t de Student: $t(10) = 0.360$, NS y $t(8) = 0.317$, NS, respectivamente] (Figura 31 C y D).

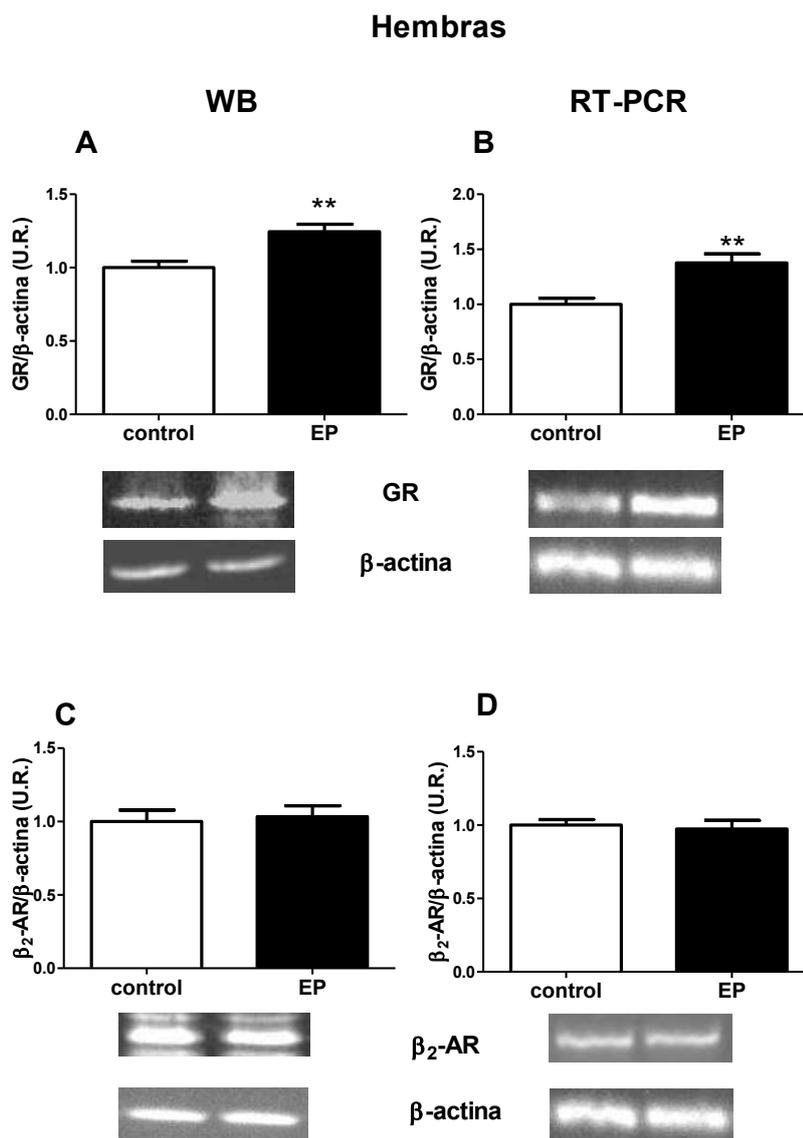


Figura 31: Niveles de ARNm y proteínas del receptor de glucocorticoides y del receptor β_2 -adrenérgico en ganglios de hembras.

Western blot (A y C) y PCR (B y D) de homogenatos de ganglios linfáticos provenientes de hembras EP y controles. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de la Intensidad relativa de cada receptor con respecto a la intensidad de β -actina, $n = 8$ para PCR y $n = 6$ para WB. ** $p < 0.01$.

En los machos no se observaron diferencias significativas en los niveles de ARNm del GR entre animales EP y controles [Prueba t de Student: $t(10)=-1,21$ NS]; pero si observamos un aumento en el nivel proteico del mismo [Prueba t de Student: $t(10): -3,02$; $p<0,05$] (Figura 32 A y B respectivamente).

Además no vimos diferencias en los niveles del ARNm del receptor β_2 -AR [Prueba t de Student: $t(10)= 0,78$, NS] ni de los niveles proteicos del mismo [Prueba t de Student: $t(10)= -1,54$, NS] (Figura 32 C y D).

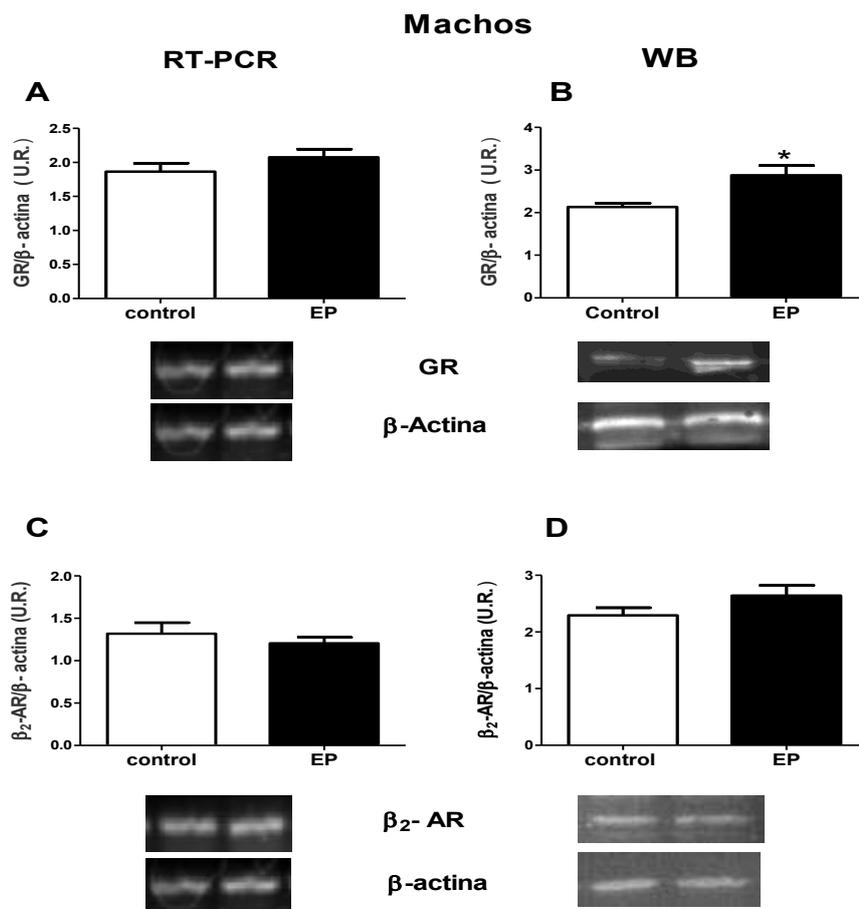


Figura 32: Niveles de ARNm y proteínas del receptor de glucocorticoides y del receptor β_2 -adrenérgico en ganglios machos.

PCR (A y C) y Western blot (B y D) y de homogenatos de ganglios linfáticos provenientes de machos EP y controles. El grafico muestra la media \pm SEM de la Intensidad relativa de cada receptor con respecto a la intensidad de β -actina. $n=6$ por grupo. * $p< 0.05$.

4-4. Niveles de neurotrofinas en linfocitos

Se sabe que las células inmunes pueden expresar neurotrofinas. En los últimos años se ha demostrado que las neurotrofinas pueden producir cambios en la proliferación de linfocitos por eso fue de interés estudiar si el estrés prenatal afectaba los niveles de neurotrofinas en linfocitos. Se determinó la expresión del ARNm de BDNF, NGF y NT3 mediante RT-PCR y los niveles de proteínas por western blot en ganglios linfáticos.

En las hembras se observó una disminución en niveles de ARNm y de los niveles proteicos de BDNF en los animales estresados prenatalmente [Prueba t de Student: $t(6) = 8,33$, $p < 0,001$; $t(10) = 5,05$, $p < 0,001$, respectivamente]. También observamos una disminución en los niveles de NT3 [Prueba t de Student: NT3-PCR: $t(6) = 4,23$, $p < 0,01$; NT3-WB: $t(10) = 4,43$, $p < 0,05$]. No hubo variaciones en los niveles de NGF [PCR: $t(6) = 1,73$, NS; WB: $t(10) = 0,64$, NS] (Figura 33).

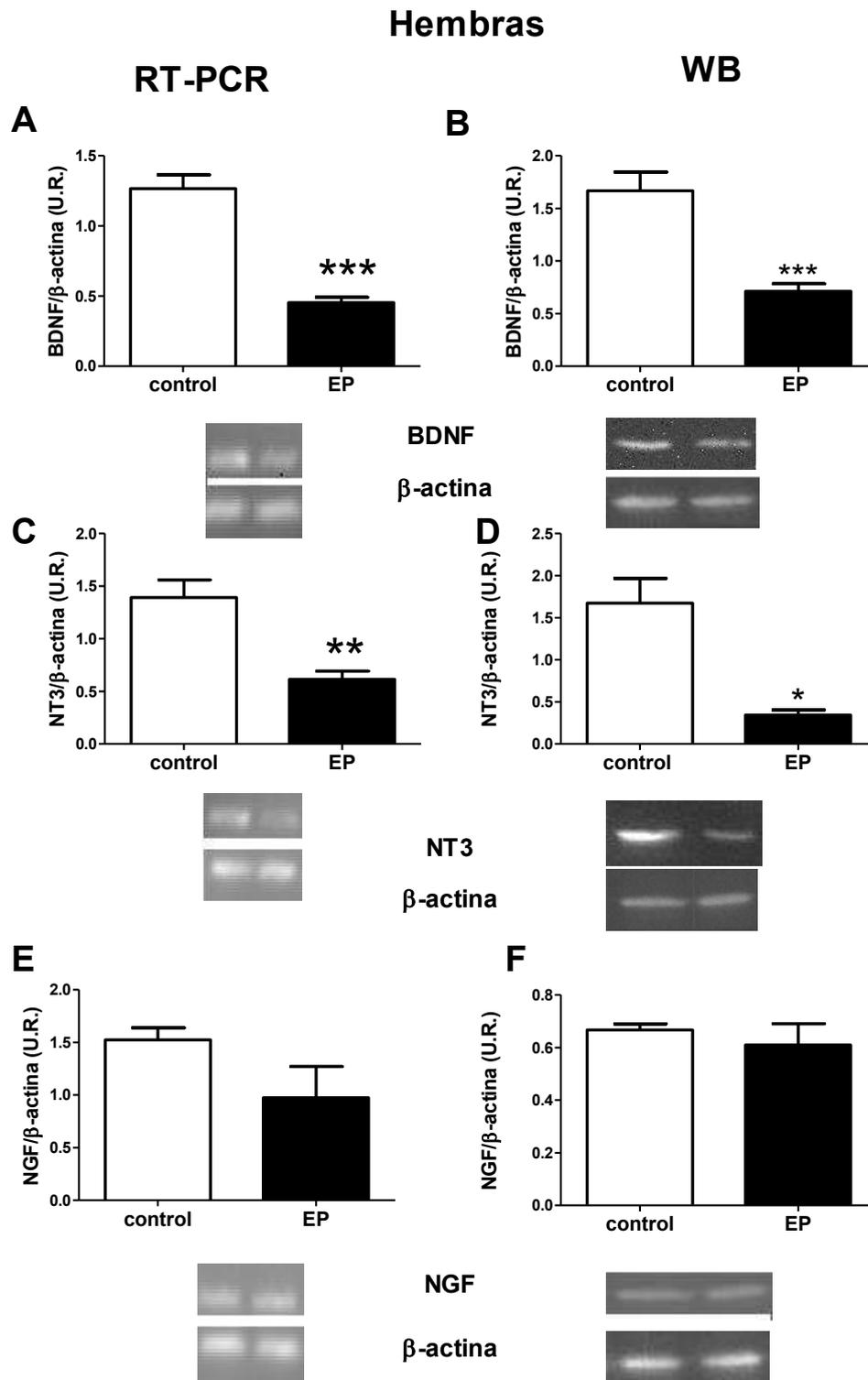


Figura 33: Expresión de neurotrofinas en ganglios de hembras.

Se realizó RT-PCR y western blot para BDNF (A y B), NT3 (C y D) y NGF (E y F). Los datos se expresan en relación a los niveles de ARNm de actina. Los resultados expresan la media \pm ES. PCR n= 4; WB n= 6. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

En los machos no se observaron diferencias en los niveles de neurotrofinas entre animales control y EP ni a nivel de ARNm, ni a nivel proteico [Prueba t de Student: BDNF-PCR: $t(10)= 0,93$, NS; BDNF-WB: $t(6)= 1,49$, NS; NT3-PCR: $t(10)= -1,58$, NS; NT3-WB: $t(6)= 1,66$, NS; NGF-PCR: $t(10)= -0,91$, NS; NGF-WB: $t(6)= 1,56$, NS] (Figura 34).

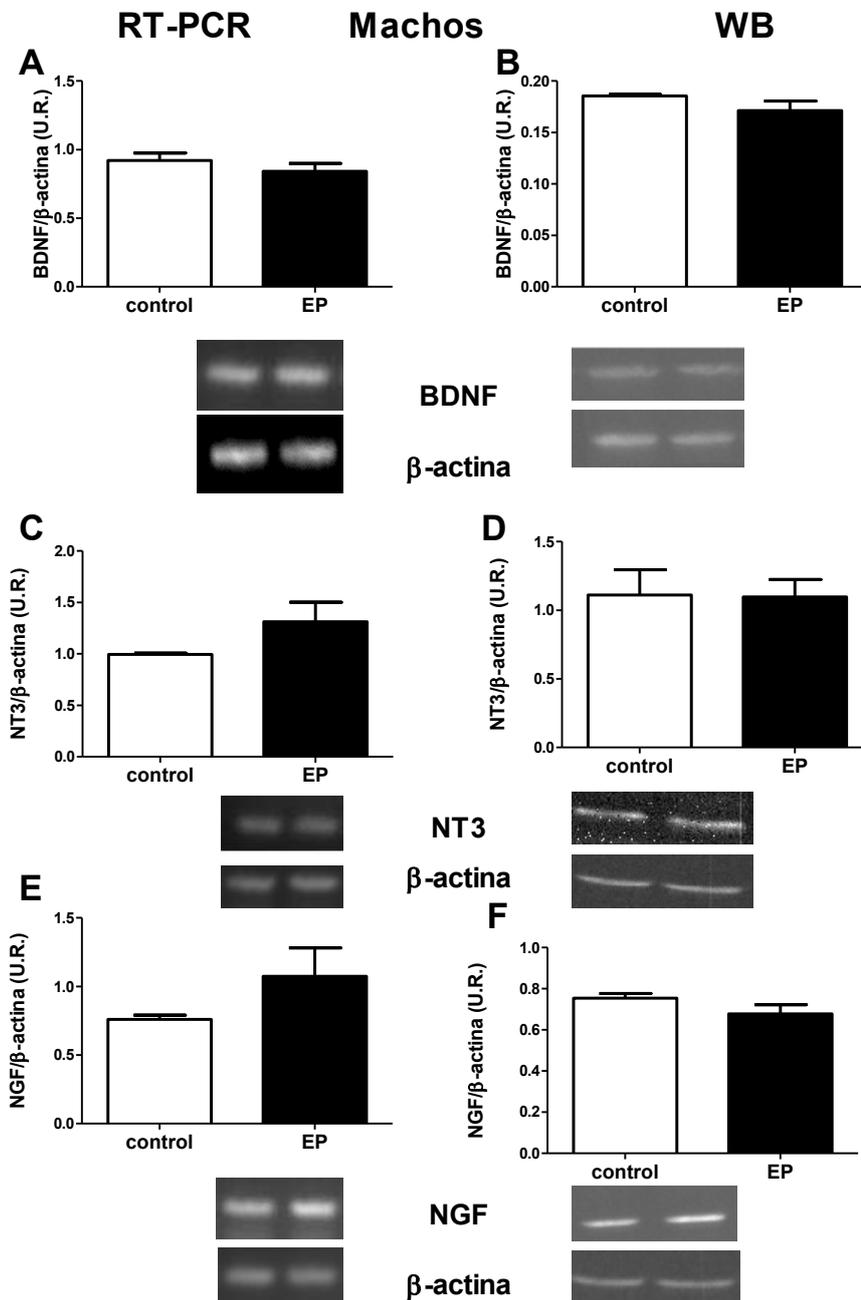


Figura 34: Expresión de neurotrofinas en ganglios de machos.

Se realizó RT-PCR y western blot para BDNF (A y B), NT3 (C y D) y NGF (E y F). Los datos se expresan en relación a los niveles de ARNm de actina. Los resultados expresan la media \pm ES de 8 muestras cada uno. PCR $n= 6$, WB $n= 4$.

4-5. Efectos del EP sobre el comportamiento. Análisis de genes relacionados

La exposición a estrés durante la preñez puede inducir alteraciones en el sistema neuroendocrino, y en el comportamiento de la descendencia, por lo que fue de interés evaluar la conducta de los animales expuestos a estrés prenatal, así como la expresión de neurotrofinas, citoquinas y receptores para glucocorticoides en hipocampo, que podrían estar involucrados en los cambios conductuales.

4-5-1. Evaluación de la conducta

4-5-1-1. Prueba de alternancia

Se colocó al animal en el centro de un laberinto en Y y se determinó el porcentaje de alternancia como se describe en materiales y métodos. Esta prueba permite evaluar la memoria espacial.

Como puede verse en la figura 35, no se observaron diferencias en el porcentaje de alternancia en los animales EP en comparación con los animales control, tanto en hembras como en machos [Prueba t de Student: Hembras: $t(14) = -0,87$, NS; Machos: $t(14) = -0,14$, NS].

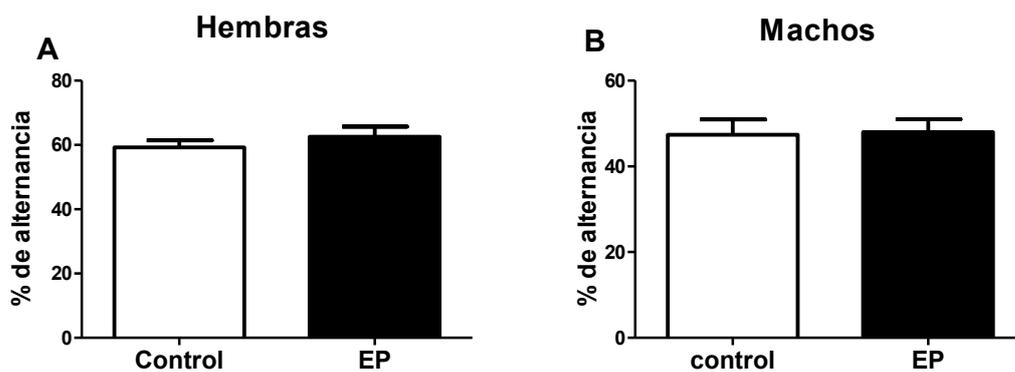


Figura 35: Prueba de alternancia

Se colocaron los animales de a uno por vez en el centro del laberinto en Y. Se registraron las entradas a los distintos brazos por 6 minutos y se determinó el porcentaje de alternancia para hembras (A) y machos (B). Los resultados expresan la media \pm ES, n= 8 por grupo.

4-5-1-2. Actividad locomotora en campo abierto

Se colocaron los animales a un campo abierto por 5 minutos y se los dejó explorar libremente. Se registró el número de líneas cruzadas, el número de exploraciones verticales (*rearing*) y el tiempo que el animal se quedó quieto.

En las hembras EP se observó una disminución en las líneas cruzadas en comparación con los animales control [Prueba t de Student: $t(14) = 3,23$, $p < 0,05$]. No se observaron diferencias en los otros parámetros estudiados [Prueba t de Student: rearing: $t(14) = -1,74$, NS. Tiempo: $t(14) = 0,88$, NS] (Figura 36).

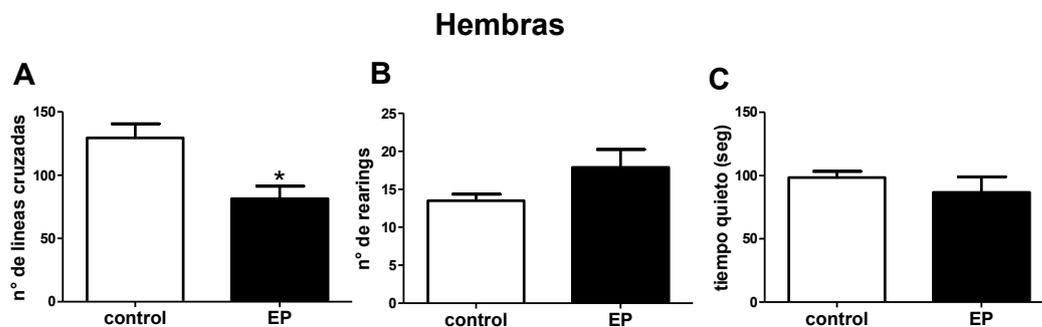


Figura 36: Actividad locomotora.

Se colocó el animal en un campo abierto y se lo dejó explorar libremente durante 5 minutos. Se grafica el número de líneas cruzadas (A), el número de rearings (B) y el tiempo que permanece quieto (C). Los resultados expresan la media \pm ES; * $p < 0,05$ respecto al animal control,

En los machos no se observaron diferencias entre controles y EP en los parámetros estudiados [Prueba t de Student: líneas: $t(14) = 0,73$, NS; rearing: $t(14) = -0,35$, NS.; tiempo: $t(14) = -1,55$, NS] (Figura 37).

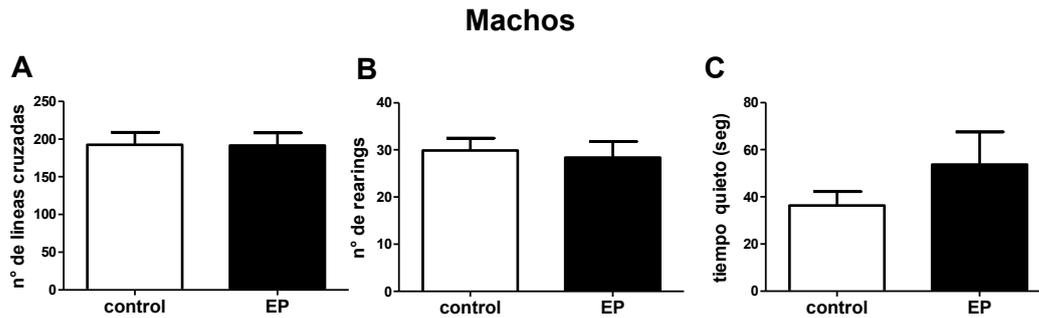


Figura 37: actividad locomotora.

Se colocó el animal en un campo abierto y se lo dejó explorar libremente durante 5 minutos. Se grafica el número de líneas cruzadas (A), el número de rearings (B) y el tiempo que permanece quieto (C). Los resultados expresan la media \pm ES, $n=8$.

4-5-1-3. Prueba de habituación

Si un animal es expuesto en forma repetida al mismo estímulo, y este no representa un elemento aversivo, se espera que la respuesta (ej: la actividad exploratoria) a este estímulo disminuya. Este proceso se denomina habituación a la exposición repetida. La prueba de habituación permite evaluar la memoria no asociativa.

Se sometieron a la prueba de campo abierto animales control y EP, durante 5 minutos (fase de entrenamiento) y fueron nuevamente al ambiente novedoso a las 24 horas. Se registró el número de líneas cruzadas, el número de exploraciones verticales (*rearing*) y el tiempo que el animal se quedó quieto.

En las hembras se observó que tanto las hembras control como las EP mostraron una disminución significativa en el número de líneas cruzadas en la fase de testeo en comparación con el entrenamiento [ANOVA con medidas repetidas: interacción tiempo x estrés: $F(1,14)= 0,45$, NS; tiempo: $F(1,14)= 24,42$, $p<0,001$; estrés $F(1,14)= 0,61$, NS] (Figura 38 A).

El número de exploraciones verticales (*rearings*) fue menor en la fase de testeo en comparación con el entrenamiento para animales control. Sin embargo no se observaron diferencias significativas en hembras EP [ANOVA con medidas repetidas: interacción tiempo x estrés: $F(1,14)= 0,04$, NS, droga: $F(14,1)= 35,43$, $p<0,001$; estrés: $F(1,14)= 3,82$, $p<0,05$] (Figura 38 B).

Tanto las hembras control como las EP mostraron un aumento significativo del tiempo que permanecieron quietos respecto al entrenamiento [ANOVA con medidas repetidas:

interacción tiempo x estrés: $F(1,14)= 0,05$, NS, tiempo: $F(1,14)= 65,46$, $p<0,001$; estrés: $F(1,14)= 1,18$, NS] (Figura 38 C).

Estos resultados indicarían que el EP no produce alteraciones significativas en el desempeño en la prueba de habituación en un campo abierto en hembras.

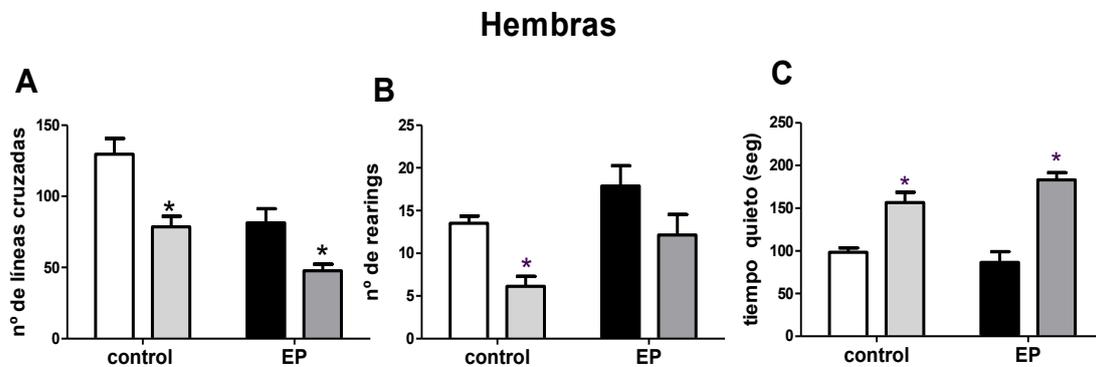


Figura 38: Prueba de habituación.

Se grafica el número de líneas cruzadas (**A**), el número de rearings (**B**) y el tiempo que permanece quieto (**C**) para el entrenamiento (barras lisas) y para el testeo a las 24 horas (barras rayadas) Los resultados expresan la media \pm ES, $n=8$ por grupo. * $p<0,05$ respecto a la fase de entrenamiento.

En los machos se observó que en la fase de testeo los animales EP mostraron una disminución en el número de líneas cruzadas (Figura 39 A) y en el número de exploraciones verticales (Figura 39 B), no así los animales control [ANOVA con medidas repetidas: Líneas: Interacción droga x estrés: $F(1,14)= 2,36$, NS; tiempo: $F(1,14)=9,65$ $p<0,05$, estrés $F(1,14)=9,60$ $p<0,05$. Rearings: interacción tiempo x estrés: $F(1,14)= 1,34$, NS; tiempo: $F(1,14)= 25,45$, $p<0,01$; estrés $F(1,14)=4,69$ $p<0,05$] Tanto para animales control como en EP no hubo cambios en el tiempo que permanecieron quietos entre la fase de entrenamiento y la fase de testeo [ANOVA con medidas repetidas: interacción tiempo x estrés: $F(1,14)= 0,64$ NS, tiempo: $F(1,14)$ $F(1,14)= 3,33$, NS; estrés: $F(1,14)= 2,24$ NS] (Figura 39 C). Estos resultados indican que los machos EP mostraron un mejor desempeño en la prueba de habituación que los animales control.

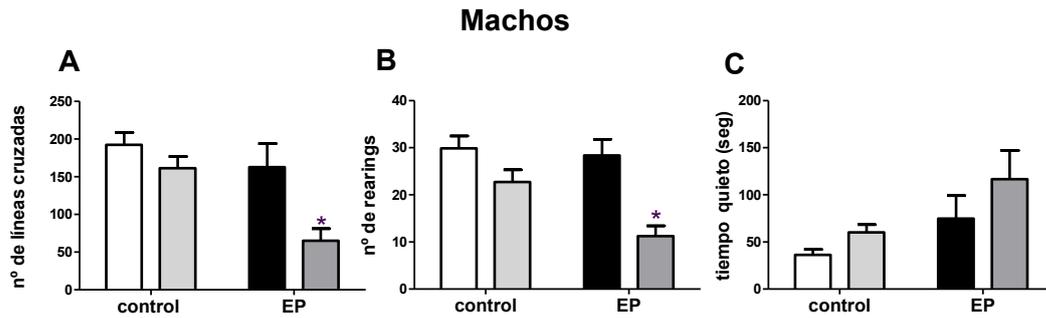


Figura 39: Prueba de habituación.

Se grafica el número de líneas cruzadas (A), el número de rearings (B) y el tiempo que permanece quieto (C) para el entrenamiento (barras lisas) y para el testeo a las 24 horas (barras rayadas) Los resultados expresan la media \pm ES * $p < 0,05$ respecto a la fase de entrenamiento, $n = 8$ por grupo.

4-5-1-4. Prueba de ansiedad. Laberinto elevado en cruz

El laberinto elevado en cruz se utiliza como parámetro de ansiedad. El comportamiento que demuestra ansiedad es evitar los brazos abiertos y pasar la mayoría del tiempo en los brazos cerrados.

Las hembras estresadas prenatalmente pasaron menos tiempo en los brazos abiertos que las hembras control, mostrando un comportamiento de tipo ansioso [Prueba t de Student: $t(18) = 3,21$, $p < 0,01$] (Figura 40 A).

En cambio en machos no se observaron cambios en el tiempo que pasaron en cada brazo [Prueba t de Student: $t(18) = -1,37$, NS] (Figura 40 B).

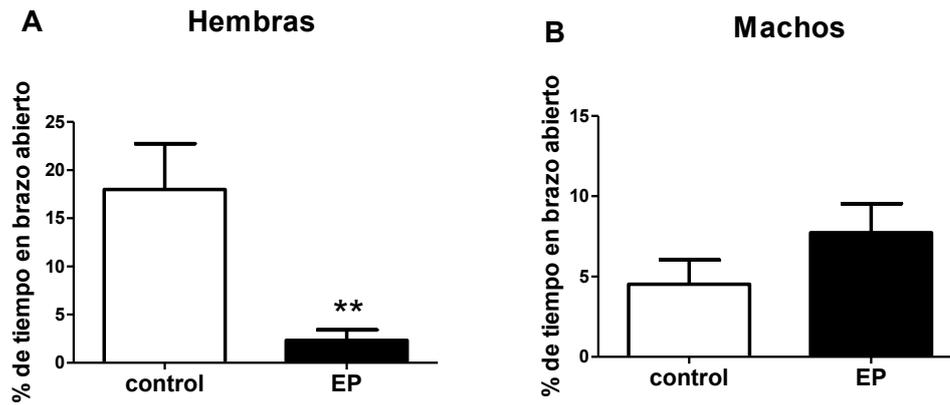


Figura 40: Laberinto elevado en cruz.

Se colocó al animal en el centro de un laberinto elevado en cruz y se lo deja explorar por 5 minutos. Se grafica el porcentaje de tiempo en brazo abierto con respecto al tiempo total de actividad para hembras (A) y machos (B), $n=10$ animales por grupo, ** $p < 0,01$.

4-5-1-5. Test de evitación pasiva

Como se ve en figura 41, tanto en machos como en hembras, se observó un aumento en la latencia a entrar al compartimento oscuro en la fase de testeo en comparación con el entrenamiento, sin observarse cambios entre controles y EP [Prueba de Kruskal Wallis: Hembras $H(8)=24,91$, $p < 0,001$; Macho $H(8)=23,98$, $p < 0,001$].

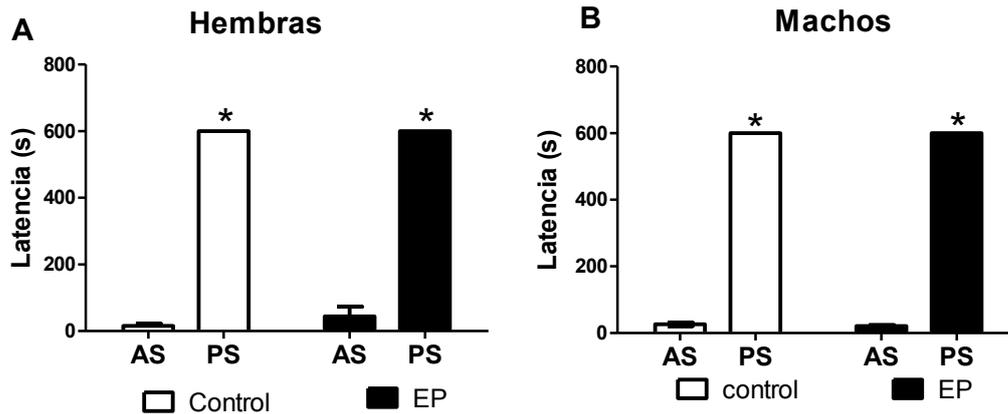


Figura 41: Prueba de evitación pasiva.

Los animales fueron puestos en una cámara iluminada y se registró el tiempo de entrada a la cámara oscura para hembras (**A**) y machos (**B**). En todos los casos el máximo registrado fue de 10 minutos. Se grafica la media \pm SEM de la latencia a entrar al compartimiento oscuro en el entrenamiento (antes del shock) y en el testeo a las 24 hs .de hembras y machos, $n= 8$ por grupo. AS: antes del shock; PS: post shock (testeo). * $p<0,05$ con respecto al entrenamiento.

4-5-1-1. Reconocimiento de objetos

El comportamiento normal de un ratón es explorar. En condiciones normales un ratón va a pasar más tiempo explorando un objeto novedoso que un objeto ya conocido. Esta prueba evalúa la memoria de reconocimiento.

Se observó que tanto los controles como los ratones EP pasaron más tiempo explorando el objeto novedoso. No hubo diferencias entre ambos grupos en el índice de discriminación [Prueba t de Student: Hembras: $t(14)= -0,40$, NS. Machos: $t(14)= -0,22$, NS]. Cabe aclarar que en la primera exposición a los objetos los animales pasaron el mismo tiempo explorando cada uno (Figura 42).

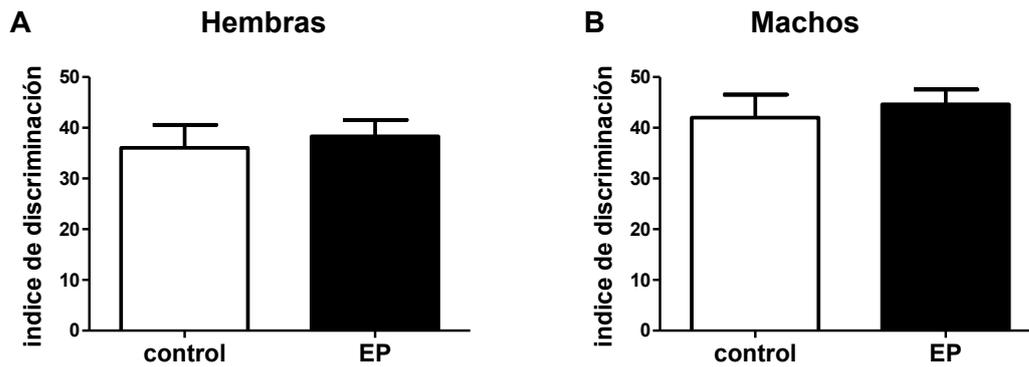


Figura 42: Prueba de reconocimiento de objetos.

Se evaluó la capacidad de reconocer objetos novedosos en un campo abierto. Se calculó el índice de discriminación teniendo en cuenta el tiempo que pasa explorando el objeto novedoso y el ya conocido para hembras (A) y machos (B). Se muestra el promedio \pm ES del índice de discriminación para 8 animales de cada grupo.

4-5-1-7. Reconocimiento espacial de objetos

Este tipo de prueba permite evaluar la memoria espacial a corto plazo. Como ya se mencionó un animal en condiciones normales tiende a pasar más tiempo explorando aquello que le resulta novedoso, en este caso la nueva posición de objetos ya conocidos. Se espera que si el animal tiene trastornos conductuales a nivel espacial no reconozca el cambio de posición y pasa el mismo tiempo en todos los objetos.

Las hembras control pasaron más tiempo en los objetos cambiados, en cambio las hembras EP pasaron igual cantidad de tiempo en ambos, evidenciado por una disminución en el índice de discriminación [Prueba t de Student: $t(8) = 4,44$, $p < 0,01$] (Figura 43 A).

Tanto los machos control como los EP pasaron más tiempo en los objetos en posición novedosa, no se encontraron cambios en el índice de discriminación [Prueba t de Student: $t(8) = -1,29$, NS] (Figura 43 B).

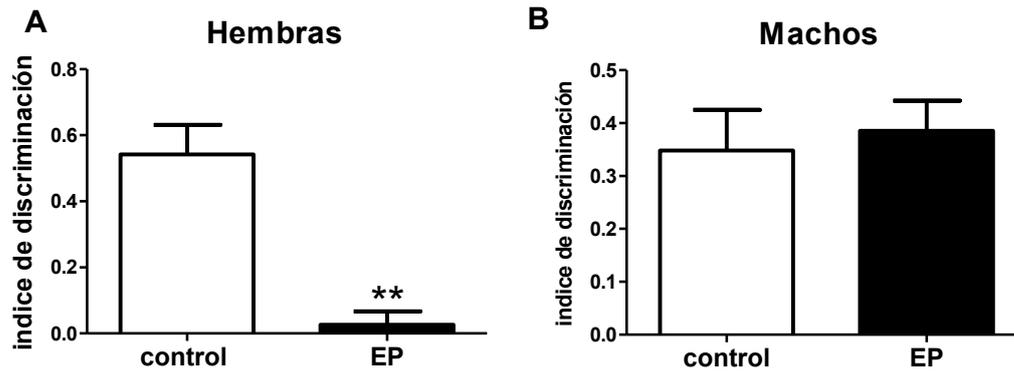


Figura 43: Prueba de reconocimiento espacial de objetos.

Se colocó al animal en un campo abierto con 4 objetos y se lo dejó explorar libremente por 10 min. Luego de una hora se lo expuso nuevamente al campo abierto intercambiando de lugar dos de los objetos. El gráfico muestra la capacidad de discriminación de los objetos cambiados de posición respecto a los no cambiados para hembras (A) y machos (B). Se grafica el promedio \pm ES del índice de discriminación para un $n=5$ por grupo. ** $p<0,01$ con respecto al control.

4-5-2. Niveles de neurotrofinas en hipocampo

Se determinó la expresión de ARNm y proteínas de BDNF, NGF y NT3 en hipocampo. Como se observa en la figura 21 las hembras EP mostraron una disminución significativa en los niveles de ARNm y de proteínas de BDNF [Prueba t de Student: RT-PCR: $t(6)= 4,72$, $p<0,05$; WB: $t(6)= 3,46$, $p<0,05$] (Figura 44 A).

No se observaron diferencias en los niveles de ARNm y proteínas de NT3 [Prueba t de Student: RT-PCR: $t(6)= -0,24$, NS; WB: $t(6)= 1,11$, NS]. Tampoco encontramos diferencias en los niveles de NGF [Prueba t de Student: RT-PCR: $t(6)= -0,34$, NS ; WB: $t(6)= 0,30$, NS] (Figura 44 B y C).

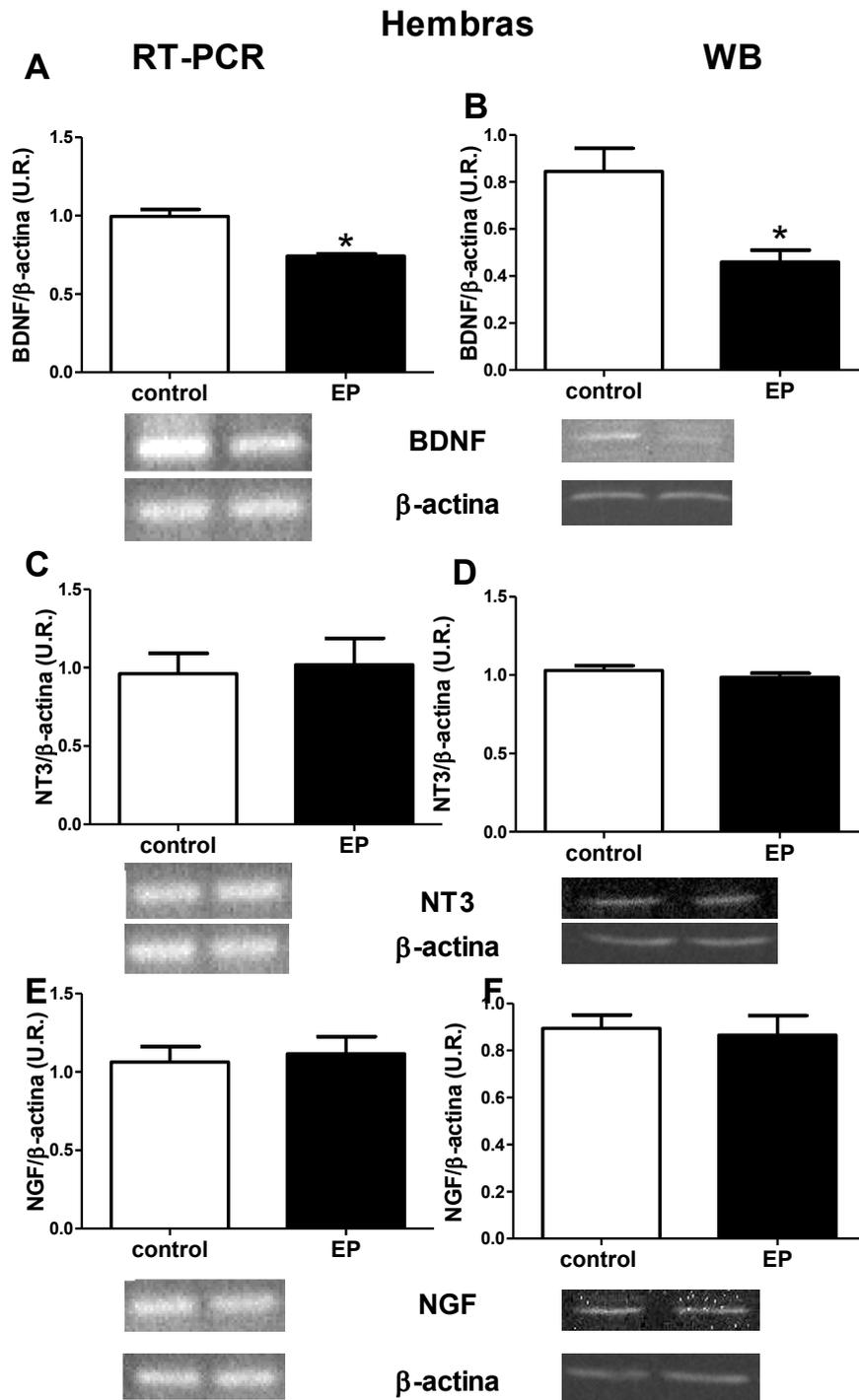


Figura 44: Niveles de neurotrofinas en el hipocampo de hembras

Se realizó RT-PCR y WB para BDNF(A y D), NT3 (B y E) y NGF(C y F). Los datos se expresan en relación a los niveles de de β-actina. Los resultados expresan la media ± ES, n=4 por grupo. *p<0,05 con respecto al control.

En los machos no se observaron diferencias en los niveles de ARNm o de proteínas de las neurotrofinas en estudio entre controles y EP [Prueba t de Student: BDNF-PCR: $t(10) = -0,75$, NS; BDNF-WB: $t(10) = 0,67$, NS; NT3-PCR: $t(10) = -0,04$, NS; NT3-WB: $t(10) = 0,47$, NS; NGF-PCR: $t(10) = 0,04$, NS; NGF-WB: $t(10) = 0,19$, NS] (Figura 45).

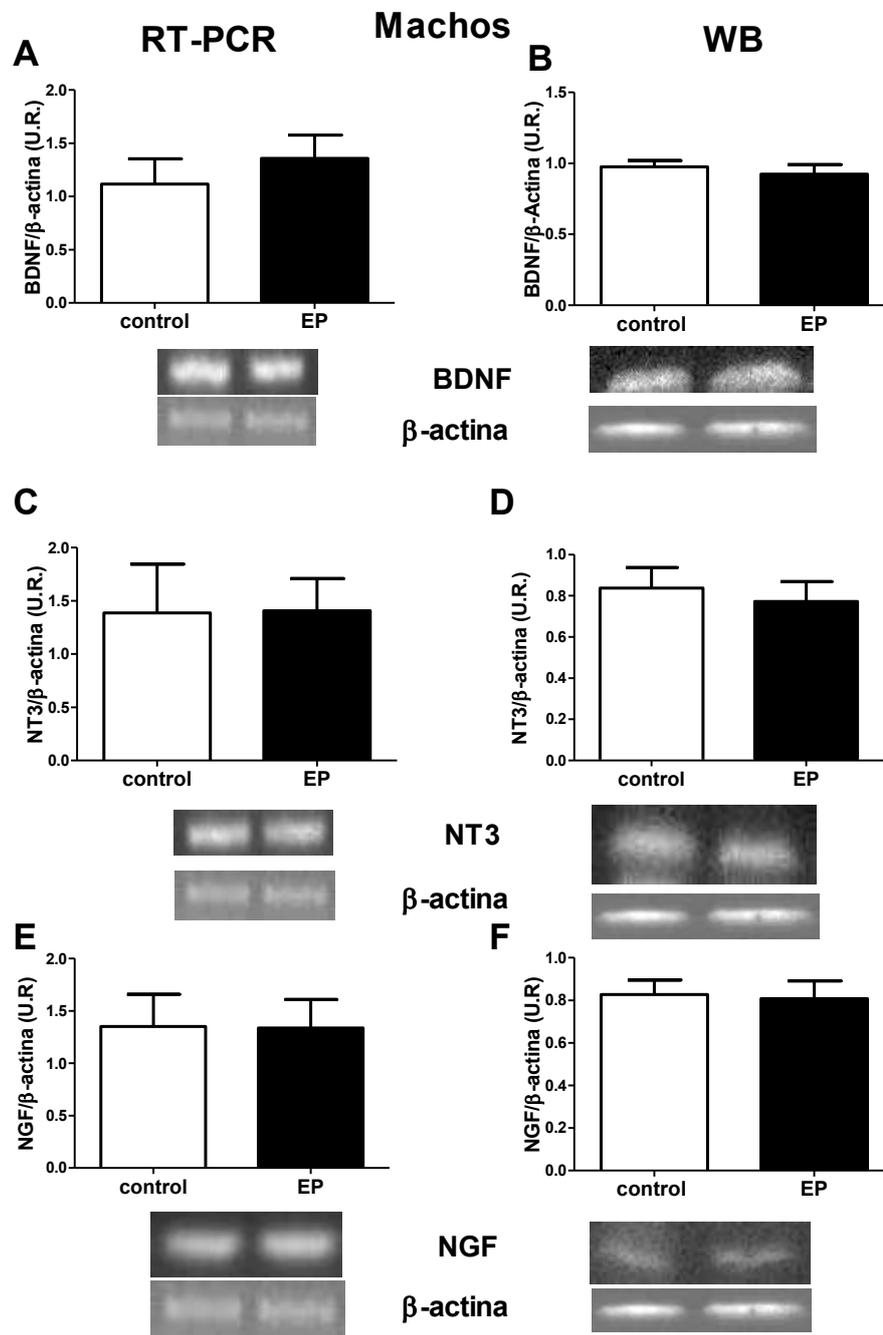


Figura 45: Niveles de neurotrofinas en el hipocampo de machos.

Se realizó RT-PCR y WB para BDNF (A y B), NT3 (C y D) y NGF (E y F). Los datos se expresan en relación a los niveles de de actina. Los resultados expresan la media \pm ES, $n=4$ por grupo.

4-5-3. Niveles de citoquinas en hipocampo

Se determinó la expresión del ARNm de las citoquinas en hipocampos de animales control y animales EP por medio de RT-PCR como se describe en materiales y métodos.

En las hembras se encontró un aumento en los niveles de IL-4 en animales EP en comparación con los controles [Prueba t de Student: $t(10) = -2,91$, $p < 0,05$]. No se encontraron diferencias en las otras citoquinas estudiadas [Prueba t de Student: IL-2: $t(10) = 1,16$, NS ; IL-6: $t(10) = -0,61$, NS; IL-10: $t(10) = 0,30$, NS e IFN- γ : $t(10) = 1,43$, NS] (Figura 46).

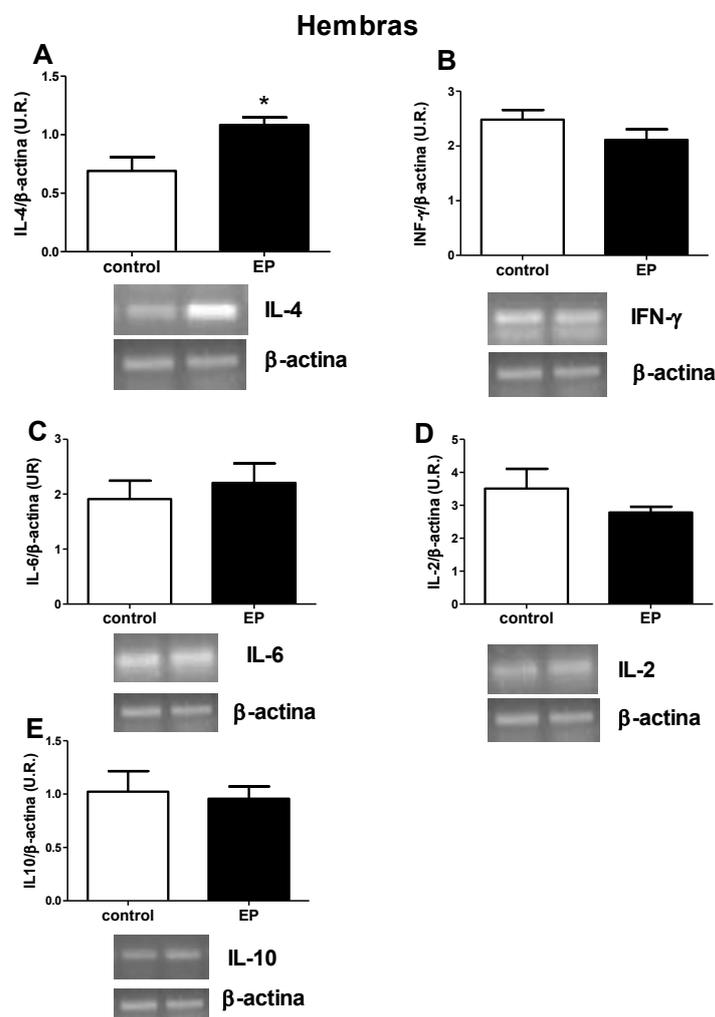


Figura 46: Niveles de citoquinas en hipocampo de hembras

Se determinaron los niveles ARNm de citoquinas IL-4 (A) INF γ (B) IL-6 (C), IL-2 (D) y IL-10 (E) por medio de RT-PCR. Los datos se expresan en relación a los niveles de ARNm de actina. Los resultados representan la media \pm ES, n=6 por grupo, * $p < 0,05$

En los machos no se observaron diferencias significativas en ninguna de las citoquinas estudiadas [Prueba t de Student: IL-2: $t(8) = 1,90$, NS; IL-4: $t(8) = -0,22$, NS; IL-6 $t(8) = -0,54$, NS ; IL-10: $t(8) = -1,90$, NS] (Figura 47).

No se pudieron determinar los niveles de IFN- γ debido posiblemente a condiciones experimentales y de expresión de esta citoquina en los hipocampos de los machos.

Machos

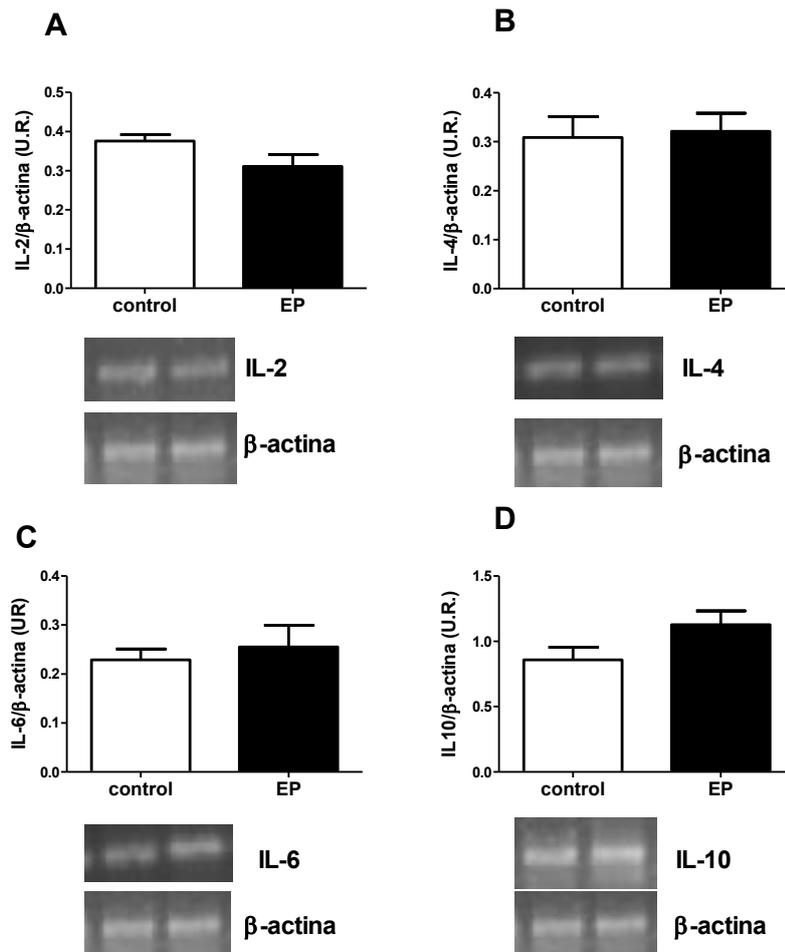


Figura 47: Niveles de citoquinas en hipocampo de machos. Se determinaron los niveles ARNm de citoquinas IL-2 (A) IL-4 (B), IL-6 (C) y IL-10 (D) por medio de RT-PCR. Los datos se expresan en relación a los niveles de ARNm de actina. Los resultados representan la media \pm ES, n=4 por grupo.

4-5-4. Niveles del receptor para glucocorticoides (GR) y del receptor β_2 -adrenérgico en Hipocampo

Se determinaron los niveles de ARNm por RT-PCR y de proteínas por western blot en hipocampo, del receptor para glucocorticoides y para el receptor β_2 -adrenérgico como se describió en materiales y métodos.

En las hembras se observó un aumento en los niveles de ARNm y de proteínas de GR en animales EP en comparación con los controles [Prueba t de Student: PCR: $t(6) = -2,95$, $p < 0,05$; WB: $t(6) = 3,91$, $p < 0,05$] (Figura 48 A y B).

Sin embargo, no se observaron cambios en los niveles de ARNm y proteínas del receptor β_2 -adrenérgico [Prueba t de Student: PCR: $t(6) = -0,97$, NS; WB: $t(6) = -2,42$, NS] (Figura 48 C y D).

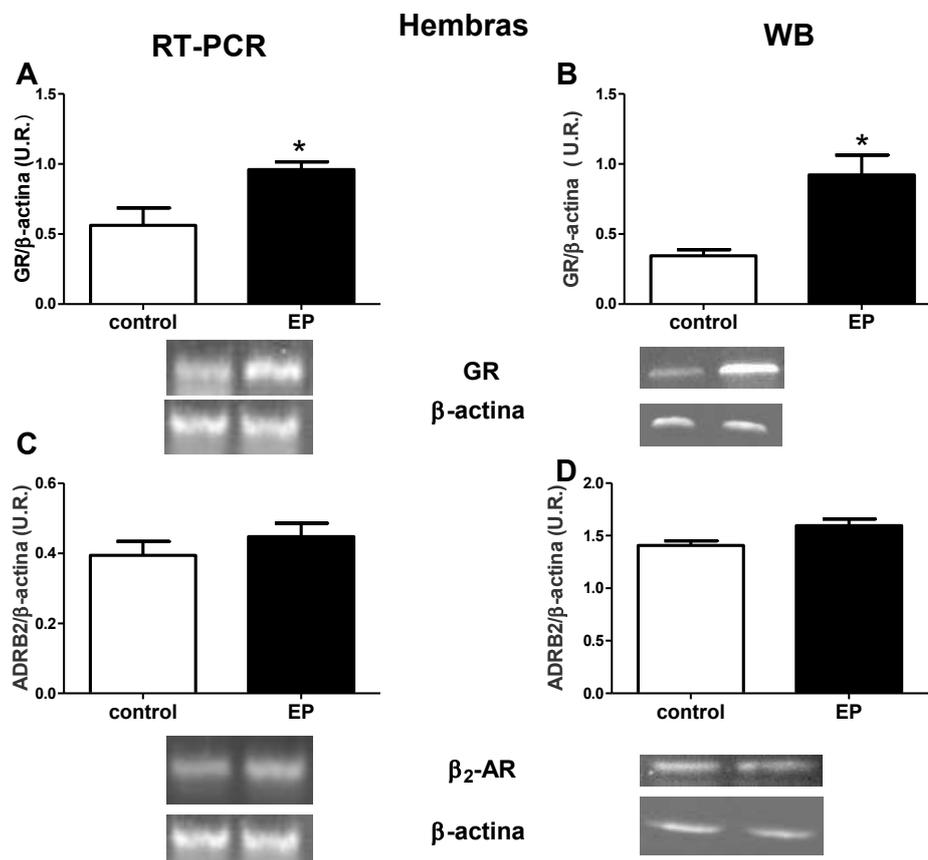


Figura 48: Niveles de ARNm y proteínas del receptor de glucocorticoides y del receptor β_2 -adrenérgico en hipocampo de hembras.

PCR (A y C) y Western blot (B y D) de homogenatos de hipocampo provenientes de hembras EP y controles. El grafico muestra la media \pm SEM de la Intensidad relativa de cada receptor con respecto a la intensidad de β - actina. N= 4 por grupo. * $p < 0,05$ respecto al control.

En los machos se observó un aumento en los niveles del ARNm y proteínas del receptor para glucocorticoides en animales EP comparados con los controles [Prueba t de Student: $t(8) = -11,75$, $p < 0,001$; $t(10) = 2,51$, $p < 0,05$; respectivamente] (figura 49 A y B respectivamente), No se observaron cambios en los niveles del receptor β_2 -adrenérgico [Prueba t de Student: $t(8) = 0,97$, NS; $t(10) = 0,96$, NS respectivamente] (figura 49 C y D).

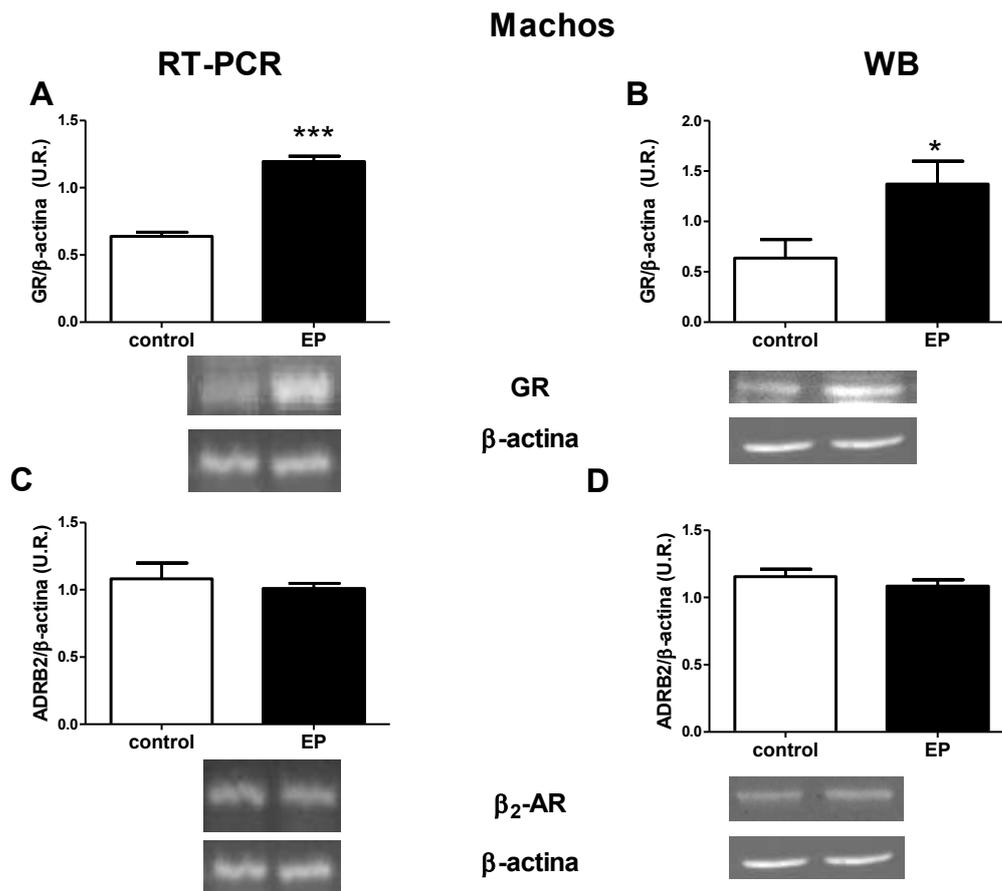


Figura 49: Niveles de ARNm y proteínas del receptor de glucocorticoides y del receptor β_2 -adrenérgico en hipocampo de machos.

PCR (A y C) y Western blot (B y D) de homogenatos de hipocampo provenientes de machos EP y controles. El grafico muestra la media \pm SEM de la Intensidad relativa de cada receptor con respecto a la intensidad de β - actina, $n=6$ por grupo. * $p < 0,05$, *** $p < 0,01$ respecto al control.

4-6. Resumen de resultados primera parte

En la tabla 6 se muestra un resumen de los resultados obtenidos en esta primera parte, se muestran los resultados como cambio respecto del grupo control.

Parámetro	Hembras	Machos
Sistema Inmune		
Actividad de NK	=	↑
Fagocitosis Mφ	=	=
Proliferación T	=	=
CD4+/CD8+	=	=
Proliferación B	=	=
Título IgM	=	=
Título IgG	=	=
Hormonas		
Corticosterona	=	=
Peso adrenal	=	=
Catecolaminas	=	=
Sensibilidad a GCs	↑ efecto inhibitorio	↑ efecto inhibitorio
Sensibilidad a Epi	=	=
Linfocitos		
CQs	↑IL-4; ↓IFN-γ	=
GR	↑	↑
B ₂ -AR	=	=
NTs	↓NT3; ↓BDNF	=
Comportamiento		
Alternancia	=	=
Act. Locomotora	↓	=
Habitación	=	↑
Ansiedad	↑	=
Evitación Pasiva	=	=
RO	=	=
REO	↓	=
Hipocampo		
NTs	↓BDNF	=
CQs	↑IL-4	=
GR	↑	↑
B ₂ -AR	=	=

Tabla 6: Resumen de resultados primera parte, = sin cambios; ↑ = aumento; ↓: disminución. RO: reconocimiento de objetos, REO: reconocimiento espacial de objetos

Segunda Parte

Efectos del EP sobre parámetros neuroinmunes y conductuales en animales a una situación de estrés en la vida adulta

Se ha postulado que si bien los animales EP y controles mostrarían ciertas diferencias en condiciones normales las mayores diferencias se pondrían en evidencia cuando los individuos se exponen a nuevas situaciones de estrés. Por lo que fue de interés estudiar la respuesta inmune y conductual en individuos EP expuestos a situaciones tanto de estrés agudo como crónico en la adultez.

A - Efectos del EP en animales expuestos a estrés agudo

4-7. Evaluación de la respuesta inmune

4-7-1. Inmunidad Innata

4-7-1-1. Actividad citotóxica de células NK

Se determinó la actividad lítica de las células NK mediante un ensayo de citotoxicidad empleando como blanco células YAC-1, previamente marcadas con [3H]-Timidina, que fueron enfrentadas con diferentes cantidades de esplenocitos de los distintos grupos. En las hembras se observó un aumento en el porcentaje de lisis dependiente de la concentración para todos los grupos experimentales, sin embargo no hubo diferencias entre los grupos estudiados. [ANOVA de tres vías; interacción: $F(2,36) = 1,68$, NS; Efectos principales: prenatal: $F(1,36) = 0,43$, NS; postnatal $F(1,36) = 0,86$, NS; concentración: $F(2,36) = 244$ $p < 0,001$] (Figura 50).

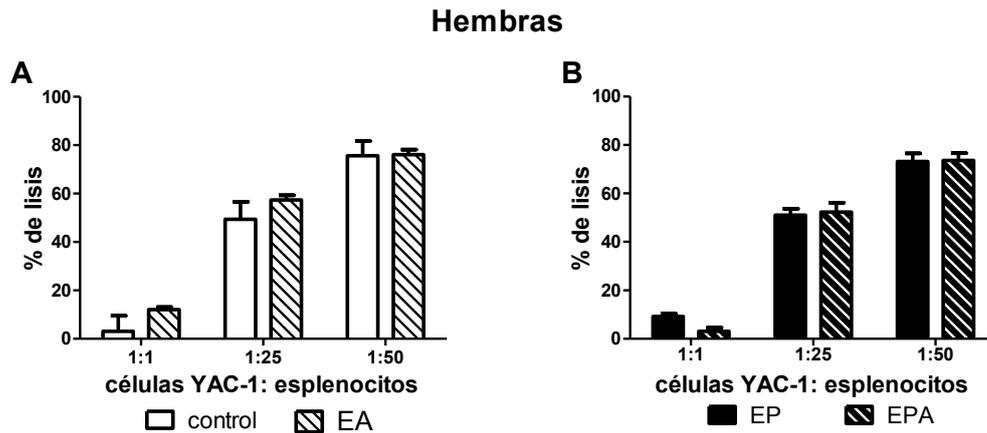


Figura 50: Ensayo de citotoxicidad por liberación de [3H]-Timidina. Los valores expresan la media \pm ES del porcentaje de lisis para diferentes relaciones de célula blanco: efectora, luego de ser cultivadas durante 3,5 horas en Hembras (A) y Machos (B), $n=4$ por grupo.

Para los machos también se observó un aumento en el porcentaje de lisis dependiente de la concentración. Además se encontró un aumento del porcentaje de lisis tanto para animales control como EP cuando fueron expuestos a estrés agudo en comparación con los no expuestos [ANOVA de tres vías; interacción $F(2,36)= 0,85$, NS; prenatal $F(1,36)= 0,13$, NS; postnatal $F(1,36)= 25$, $p<0,001$; concentración $F(2,36)= 198$, $p<0,001$] (Figura 51).

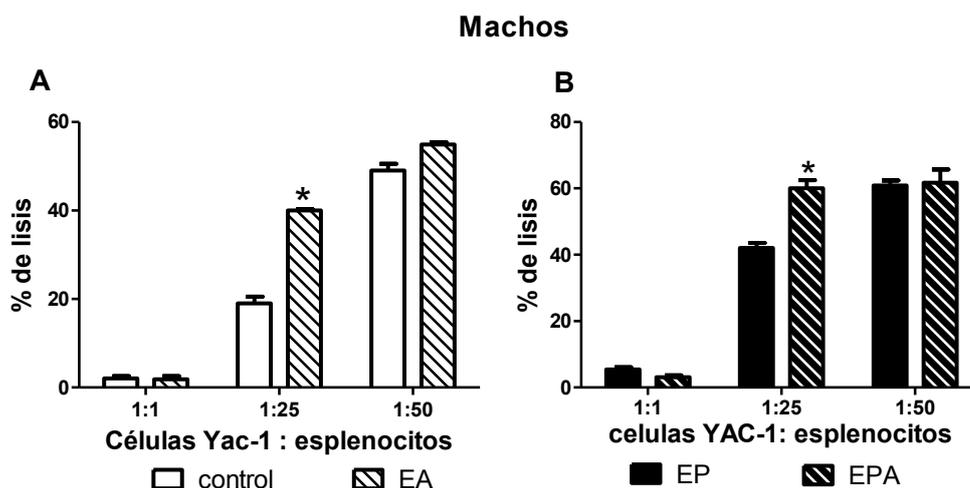


Figura 51: Ensayo de citotoxicidad por liberación de [3H]-Timidina. Los valores expresan la media \pm ES del porcentaje de lisis para diferentes relaciones de célula blanco: efectora, luego de ser cultivadas durante 3,5 horas en Hembras (A) y Machos (B), $n=4$ por grupo. * $p<0,05$ con respecto al correspondiente grupo sin estrés en la adultez.

4-7-1-2. Actividad Fagocítica de macrófagos

Se determinó la capacidad de fagocitosis de los macrófagos por medio del ensayo de fagocitosis de eritrocitos opsonizados.

En las hembras no se encontraron diferencias significativas entre los grupos estudiados [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,20)=0,79$ NS; efectos principales: prenatal: $F(1,20)= 0,15$, NS; postnatal: $F(1,20)= 0,79$, NS] (Figura 52 A). En cambio, en los machos se observó un aumento tanto en animales control como EP cuando fueron expuestos a estrés agudo en comparación con los no expuesto. Sin embargo no se observaron diferencias entre controles y EP [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,20)= 0,01$, NS; efectos principales: prenatal: $F(1,20)= 5,12$, NS; postnatal: $F(1,20)= 86,9$, $p<0,05$] (Figura 52 B).

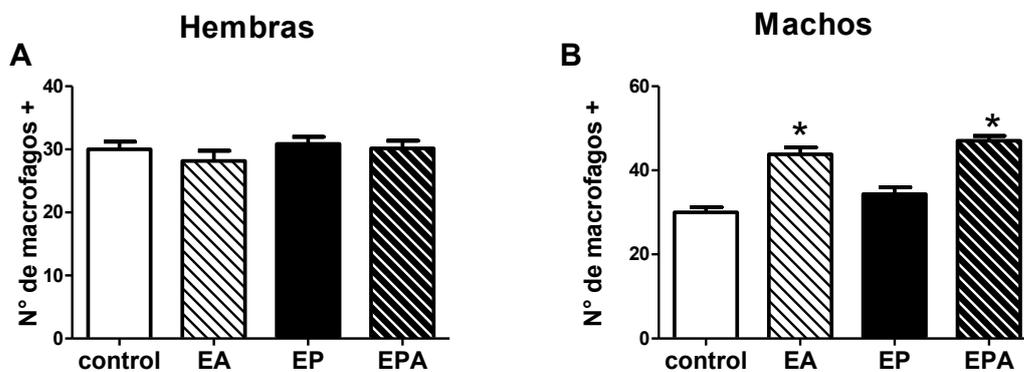


Figura 52: Capacidad fagocítica de macrófagos. Se cultivaron macrófagos peritoneales con eritrocitos opsonizados y se determinó la capacidad fagocítica en Hembras (A) y Machos (B). Se tomó como positivo el macrófago con más de tres eritrocitos fagocitados, $n= 6$ por grupo. * $p<0,05$ con respecto al correspondiente grupo sin estrés en la adultez.

4-7-2. Respuesta inmune adaptativa

4-7-2-1. Respuesta proliferativa en linfocitos T estimulados con Con A

Como ya se mencionó el análisis de la proliferación es una prueba de la reactividad linfocitaria. Se determinó la proliferación de linfocitos de ganglios estimulados Con A (1 $\mu\text{g/ml}$), mitógeno T.

Cuando fueron expuestas a estrés agudo, las hembras control respondieron con un aumento significativo en la proliferación T, no siendo así en las hembras EP [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1;37)= 8,65$ $p<0,01$; efectos simples

(exposición a estrés agudo): control, $F(1,37)= 17,68$, $p<0,001$; EP, $F(1;37)= 0,002$, NS] (Figura 53 A).

Los machos control cuando fueron expuestos a estrés agudo mostraron un aumento significativo de la proliferación T. En cambio, los machos EP a estrés agudo no mostraron cambios con respecto a los no expuestos [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1;37)= 8,45$, $p<0,01$; efectos simples (exposición a estrés agudo): control, $F(1;37)= 10,07$, $p<0,01$; EP, $F(1;37)= 0,85$, NS] (Figura 53 B).

Cabe destacar que no se observan diferencias en la proliferación basal (sin estimular) entre los distintos grupos experimentales (leyenda Figura 53)

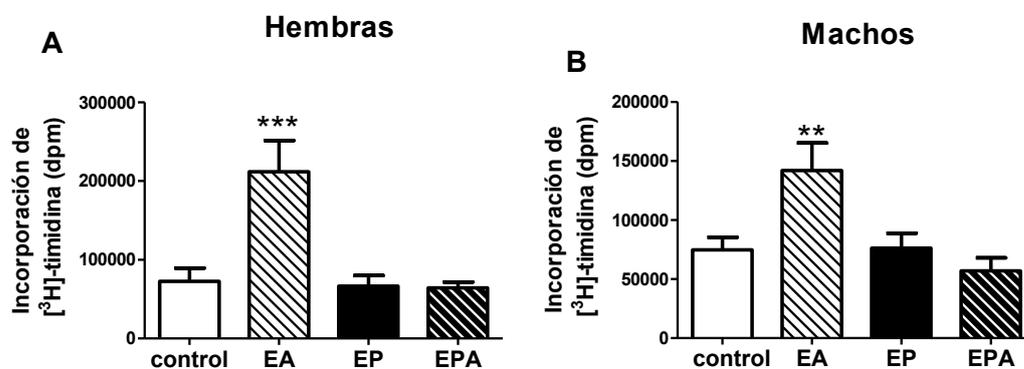


Figura 53: Respuesta proliferativa inducida por mitógenos

Linfocitos provenientes de ganglios linfáticos fueron cultivados en presencia Con A (1ug/ml). Se determinó la proliferación celular por incorporación de ³H-timidina en Hembras (A) y Machos (B). Los resultados expresan la media \pm ES. Basales (dpm); Hembras, control= 921 ± 143 ; EP= 899 ± 212 ; EA= 902 ± 123 ; EPA= 865 ± 192 ; n entre 10 y 11 por grupo Machos, control= 854 ± 143 ; EA= 891 ± 201 ; EP= 802 ± 132 ; EPA= 823 ± 212 ; n ente 12 y 13 por grupo. ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ con respecto al correspondiente grupo sin estrés en la adultez.

4-7-2.2. Distribución de subpoblaciones linfocitarias

Se determinó el porcentaje de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ mediante citometría de flujo. No se encontraron diferencias en ninguno de los grupos estudiados tanto en machos como en hembras [ANOVA de dos vías; Hembras, CD4⁺, interacción $F(1,12)= 0,68$, NS; efectos principales: prenatal: $F(1,12)= 2,88$, NS; postnatal: $F(1;12)= 1,86$, NS; CD8⁺, interacción $F(1,12)= 0,25$, NS; efectos principales: prenatal: $F(1,12)= 2,82$, NS; postnatal: $F(1;12)= 0,16$, NS; Machos; CD4⁺, Interacción $F(1,12)= 0,45$, NS; efectos principales: prenatal: $F(1,12)= 0,32$, NS; postnatal: $F(1,12)= 1,09$, NS; CD8⁺, interacción $F(1,12)= 0,01$, NS; efectos principales: prenatal: $F(1,12)= 3,26$, NS; postnatal: $F(1,12)= 0,25$, NS] (Tabla 7)

Grupo	Hembras		Machos	
	Subpoblaciones linfocitarias (% de linfocitos totales)		Subpoblaciones linfocitarias (% de linfocitos totales)	
	CD4+	CD8+	CD4+	CD8+
control	60,10± 2,50	20,00±0,80	55,2±1,30	21,3±1,01
EA	59,35±1,60	19,05±1,25	52,05±2,35	19,15±2,85
EP	58,95±1,04	19,95±1,65	53,7±1,40	19,05±1,02
EPA	58,15±1,05	19,75±1,35	51,1±2,6	18,95±1,55

Tabla 7: Distribución de las subpoblaciones linfocitarias.

4-7-2-3. Respuesta inmune mediada por linfocitos B *in vitro*

Se realizaron cultivos *in vitro* con linfocitos provenientes de bazo, estimulados con LPS (30 µg/ml), mitógeno selectivo de linfocitos B.

No se encontraron diferencias significativas de la proliferación B en ninguno de los grupos estudiados tanto para machos como para hembras [ANOVA de dos vías: Hembras; interacción prenatal x postnatal: $F(1,25)= 0,30$, NS; efectos principales: prenatal $F(1,25)= 0,76$, NS; postnatal: $F(1,25)= 0,11$, NS. Machos; interacción prenatal x postnatal: $F(1,25)= 0,26$, NS; efectos principales prenatal $F(1,25)= 1,68$, NS; postnatal: $F(1,25)= 0,60$, NS] (Figura 54).

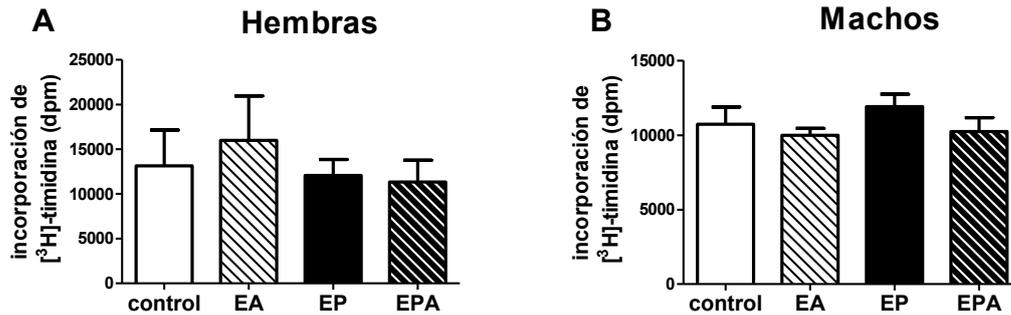


Figura 54: Proliferación de linfocitos B inducida por LPS.

Linfocitos provenientes de bazo fueron cultivados en presencia LPS (30ug/ml). Se determinó la proliferación celular por incorporación de ^3H -timidina en Hembras (**A**) y Machos (**B**). Los resultados expresan la media \pm ES, n entre 8 y 9 por grupo. Proliferación basal (dpm); Hembras; control= 2290 ± 230 ; EP= 2049 ± 246 ; EA= 1975 ± 235 ; EPA= 2100 ± 245 . Machos; control= 2032 ± 241 ; EP= 2102 ± 231 ; EA= 2043 ± 215 ; EPA= 2053 ± 231 .

4-7-2-4. Evaluación de la respuesta inmune *in vivo*

Como se mencionó anteriormente se evaluó la respuesta humoral en los distintos grupos experimentales. Para ello se inmunizaron los animales con GRC y se determinó la producción de anticuerpos, como se detalla en materiales y métodos.

En las hembras se observó que la respuesta primaria de IgM anti-GRC no fue significativamente diferente entre grupos [Prueba de Kruskal Wallis: $H(8) = 0,89$, NS] (figura 55 A). En contraste el título de IgG anti-GRC fue significativamente diferente entre los grupos en estudio [Prueba de Kruskal Wallis: $H(8) = 8,40$, $p < 0,05$]. El test post-hoc indicó un aumento significativo en el título de anticuerpos en animales control que recibieron estrés agudo en comparación con los controles sin estrés agudo en la adultez [$p < 0,05$]. Por el contrario los animales EP expuestos a estrés agudo mostraron una disminución en el título de IgG en comparación con los EP no expuestos a estrés agudo [$p < 0,01$] (figura 55 B).

En los machos se encontraron resultados similares, el título de IgM no fue significativamente diferente [Prueba de Kruskal Wallis: $H(8) = 6,46$, NS], mientras que el título de IgG anti-GRC fue significativamente diferente entre los grupos en estudio [Prueba de Kruskal Wallis: $H(8) = 10,40$, $p < 0,05$]. Los animales EP expuestos a estrés agudo mostraron una disminución en el título de IgG [$p < 0,05$]. No se observaron cambios en los animales control expuestos a estrés agudo (Figura 55 C y D).

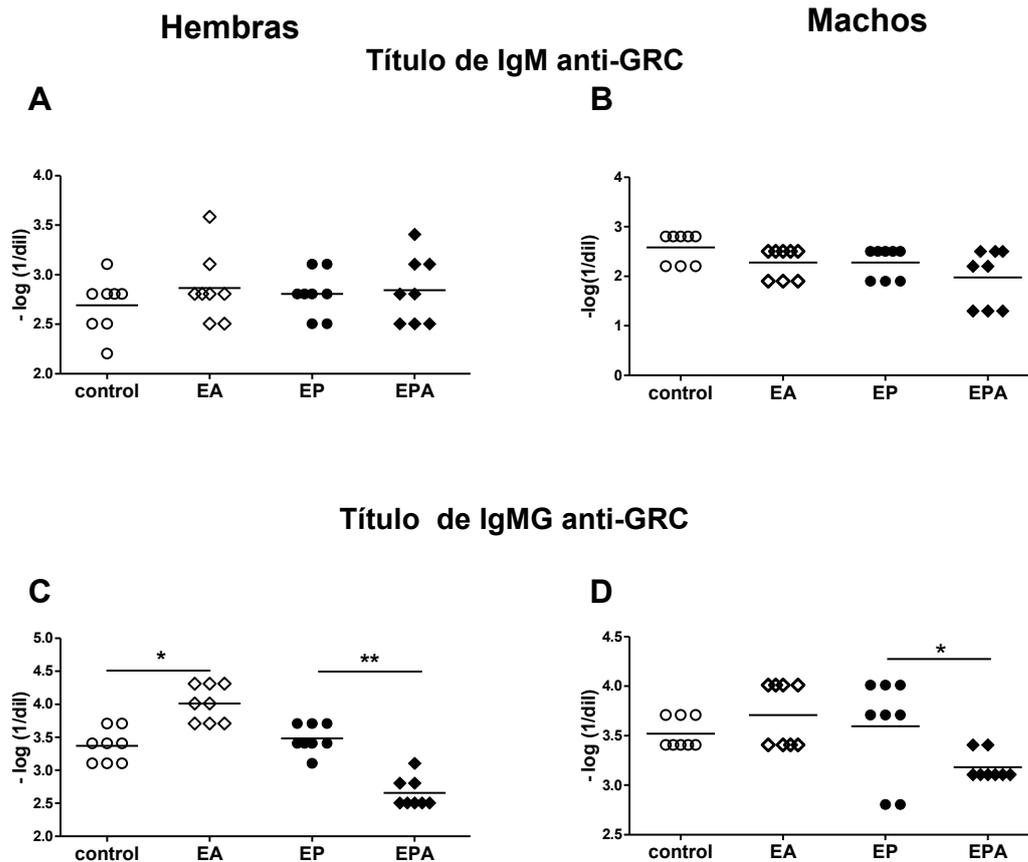


Figura 55: producción de Ac, frente a un desafío antigénico T-dependiente Se determinaron los títulos de Ac en suero de animales control o EP expuestos o no a EA en la adultez, inmunizados con GRC. Título de IgM anti-GRC (**A** y **B**). Título de IgG anti-GRC (**C** y **D**). En hembras (**A** y **C**) y machos (**B** y **D**). Se grafica el título de anticuerpos de 8 animales por grupo. La barra horizontal representa la media de cada grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ con respecto al correspondiente grupo sin estrés en la adultez.

En cuanto al título de IgM anti- LPS, no observamos diferencias entre los grupos experimentales ni en machos ni en hembras [Prueba de Kruskal Wallis; Hembras, $H(8) = 0,14$, NS. Machos, $H(8) = 0,69$, NS] (Figura 56).

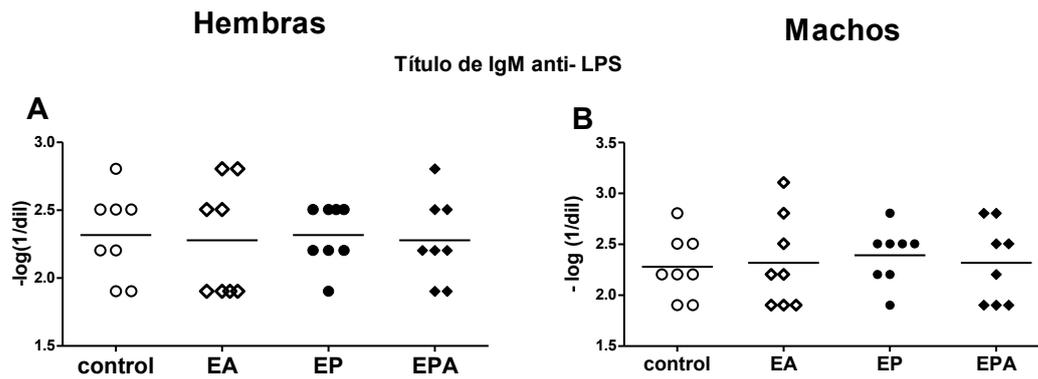


Figura 56: producción de Ac, frente a un desafío antigénico T-independiente

Se determinaron los títulos de Ac en suero de animales control o EP expuestos o no a EA en la adultez, inmunizados con LPS para Hembras (A) y Machos (B). Se grafica el título de IgM anti-LPS de 8 animales por grupo. La barra horizontal representa la media de cada grupo.

4-7-2. Efecto del estrés sobre la producción de citoquinas

Se determinó la liberación de citoquinas en sobrenadante de linfocitos de ganglio estimulados con Con A (1 µg/ml) por medio de un ELISA.

Como puede verse en la figura 57, en las hembras se observó un aumento en los niveles de IL-4 en animales control expuestos a estrés agudo, sin observarse un aumento adicional en los EP expuestos a estrés agudo [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,17)= 5,92$, $p<0,05$; efectos simples (exposición a estrés agudo), control: $F(1,17)= 20,68$, $p<0,001$; EP: $F(1,17)= 0,58$, NS].

Por otro lado se observó una disminución en los niveles de IFN-γ en animales control expuestos a estrés agudo, sin embargo no se observó una disminución adicional en animales EP expuestos a estrés agudo [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,11)= 5,73$, $p<0,05$; efectos simples, exposición a estrés agudo: control: $F(1,17)= 28,15$, $p<0,001$; EP: $F(1,17)= 4,53$, NS].

No se observaron diferencias en los niveles de IL-2 [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,16)= 0,03$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,16)= 0,35$, NS; EP: $F(1,16)= 0,46$, NS]. Así tampoco en los niveles de IL-10. [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,10)= 0,05$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,10)= 1,05$, NS; postnatal: $F(1,10)= 0,14$, NS].

Hembras

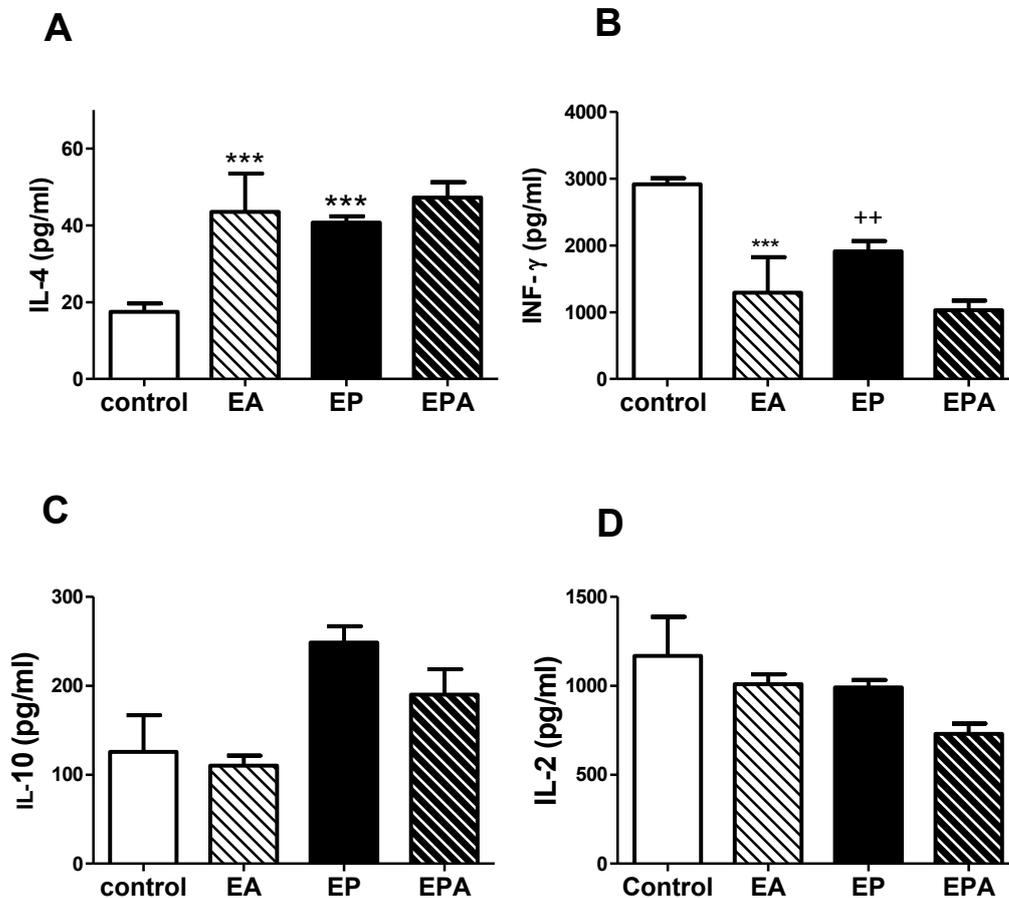


Figura 57: Liberación de citoquinas en sobrenadante de ganglio de hembras.

Se determinaron los niveles de citoquinas IL-4 (A), IFN- γ (B) IL-10 (C) 3 IL-2 (D) por medio de un ELISA en sobrenadante de linfocitos estimulados con con A. Los resultados representan la media \pm ES, n entre 4 y 7 por grupo. *** $p < 0,001$ con respecto al correspondiente grupo sin estrés en la adultez; ++ $p < 0,01$ comparado con el grupo control.

Por otra parte, en los machos se observó que la exposición a estrés agudo produjo un aumento en la liberación de IFN- γ tanto en machos control como en EP [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x posnatal: $F(1,21) = 0,07$, NS; efectos principales, postnatal: $F(1,21) = 21.18$, $p < 0,001$; prenatal: $F(1,21) = 0,05$, NS] (Figura 58 B).

No se observaron diferencias en los niveles de las otras citoquinas estudiadas. [ANOVA de dos vías; IL-4, interacción prenatal x posnatal: $F(1,16) = 0,004$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,16) = 0,24$, NS; postnatal: $F(1,16) = 1,81$, NS. IL-2, interacción

prenatal x postnatal: $F(1,16)= 0,13$, NS; Efectos principales: prenatal $F(1,16)= 0,46$, NS; postnatal: $F(1,16)= 4,72$, NS. IL-10, interacción prenatal x postnatal: $F(1,12)= 0,12$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,12)= 0,04$ NS; postnatal: $F(1,12)= 0,02$, NS] (Figura 58 A, C y D).

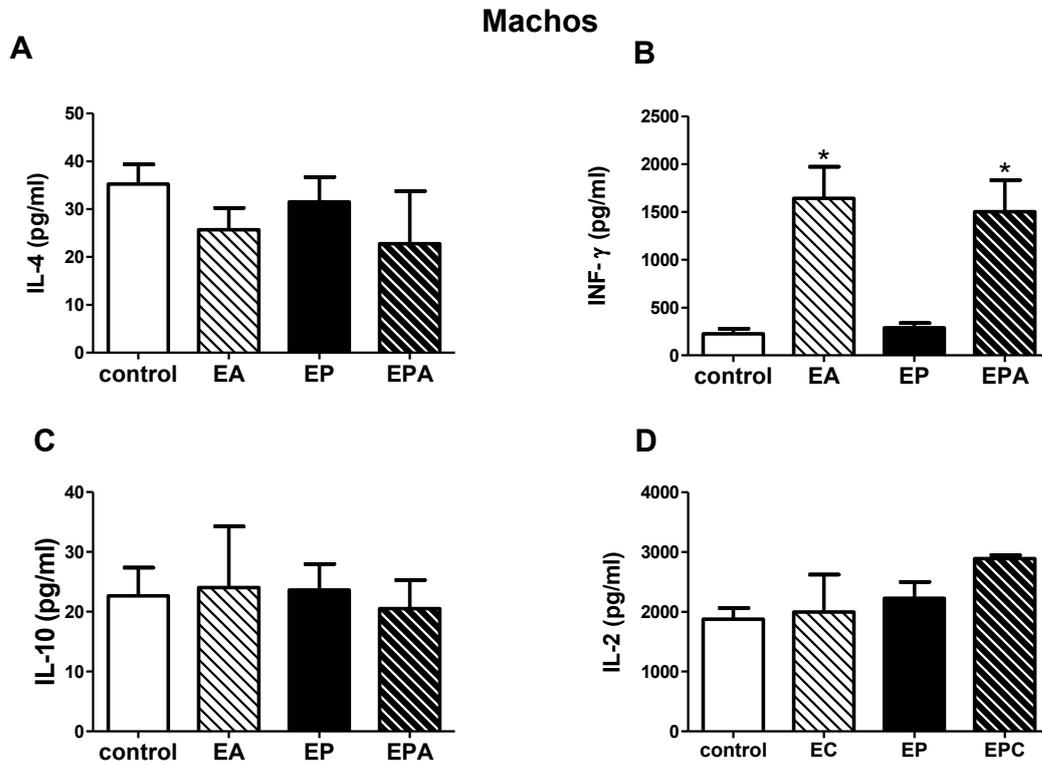


Figura 58: Liberación de citoquinas

Se determinaron los niveles de las citoquinas IL-4 (A) INF- γ (B), IL-10 (C) e IL-2 (D) por medio de un ELISA en sobrenadante de linfocitos estimulados con Con A. Los resultados representan la media \pm ES, n entre 4 y 6 por grupo. * $p < 0,05$ con respecto al correspondiente grupo sin estrés en la adultez.

4-8. Efectos de las hormonas del estrés

4-8-1. Determinación de los niveles de corticosterona

Se determinaron los niveles de corticosterona como se describió previamente.

Tanto las hembras control como EP respondieron al estrés agudo con un aumento en los niveles de corticosterona, siendo este aumento mayor en hembras control [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,24)= 4,38$, $p < 0,05$; efectos simples

exposición a estrés agudo, control: $F(1,24)= 20,4, p<0,001$; EP: $F(1,24)= 8,33, p<0,01$] (Figura 59 A).

En los machos se observaron resultados similares [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,24)= 15,63, p<0,01$; efectos simples, exposición a estrés agudo, control: $F(1,24)= 72,9, p<0,001$; EP: $F(1,24)= 8,69, p<0,01$]. (Figura 59 B).

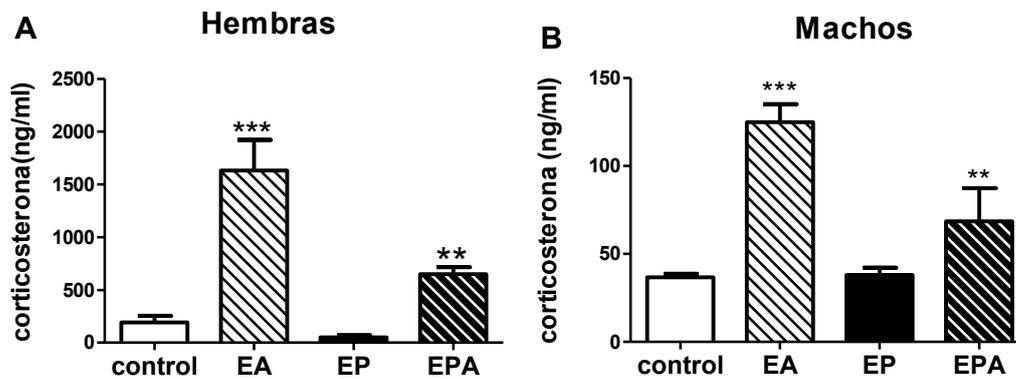


Figura 59: Niveles de corticosterona

Se determinaron los niveles de corticosterona en plasma de hembra (A) y machos (B). Los resultados expresan la media \pm ES de las determinaciones realizadas con 6 a 8 animales de cada grupo. ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ con respecto al correspondiente grupo sin estrés en la adultez.

4-8-2. Determinación de los niveles de catecolaminas

En cuanto a los niveles de catecolaminas en las hembras, se observó un aumento tanto para animales control como para EP cuando fueron expuestos a estrés agudo [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,28)= 0,12, NS$; efectos principales, postnatal $F(1,28)= 23,74, p<0,001$; prenatal $F(1,28)= 0,53, NS$] (Figura 60 A).

De igual modo, tanto los machos control como los EP respondieron con un aumento en los niveles de catecolaminas cuando fueron expuestos a estrés agudo [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,26)= 0,004, NS$; efectos principales, postnatal $F(1,36)= 37,12, p<0,001$; prenatal $F(2,36)= 0,26, NS$] (Figura 60 B).

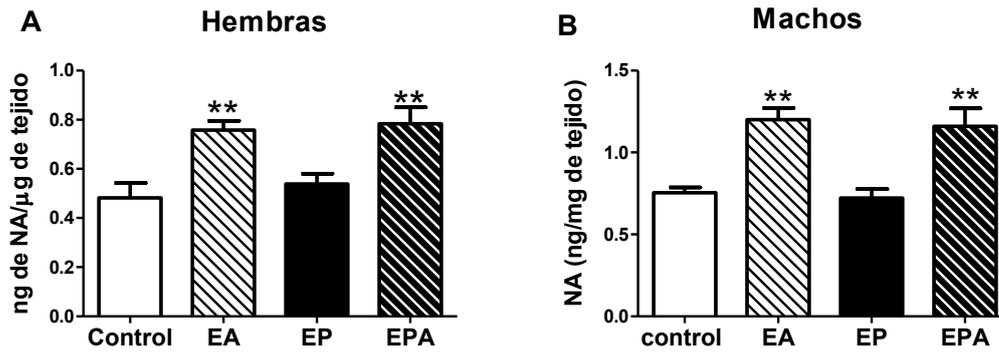


Figura 60: Niveles de catecolaminas

Se determinaron los niveles de catecolaminas en bazo de hembra (A) y machos (B). Los resultados expresan la media \pm ES, Hembras n=8 Macho n=10; ** $p < 0,01$ con respecto al correspondiente grupo sin estrés en la adultez,

4-8-3. Efecto de las hormonas del estrés sobre la proliferación

A fin de evaluar si el estrés agudo afectó diferencialmente la sensibilidad de animales EP y controles, se realizaron curvas dosis respuesta en cultivos de linfocitos estimulados con Con A y concentraciones crecientes de corticosterona y epinefrina, como se describió previamente.

En hembras se observó un aumento del efecto estimulador de corticosterona ante el estrés agudo en animales control (Figura 61 A). Sin embargo no se encontraron diferencias en el efecto de corticosterona sobre linfocitos de animales EP expuestos a estrés agudo en la adultez (EPA) en comparación con los no expuestos (EP) (Figura 61 B) [ANOVA con medidas repetidas: Interacción $F(3,28) = 1,23$, NS; droga: $F(3,28) = 36,32$, $p < 0,001$; estrés: $F(3,28) = 12,2$ $p < 0,05$].

Además se observaron un aumento en el efecto estimulador de epinefrina en animales control expuestos a estrés agudo (EA) (Figura 61 C), sin embargo este efecto no fue observado en animales EP expuestos a estrés agudo en la adultez (EPA) (Figura 61 D) [ANOVA con medidas repetidas: interacción $F(3,28) = 1,12$, NS; droga: $F(3,28) = 54,32$, $p < 0,001$; estrés: $F(3,28) = 14,1$ $p < 0,05$].

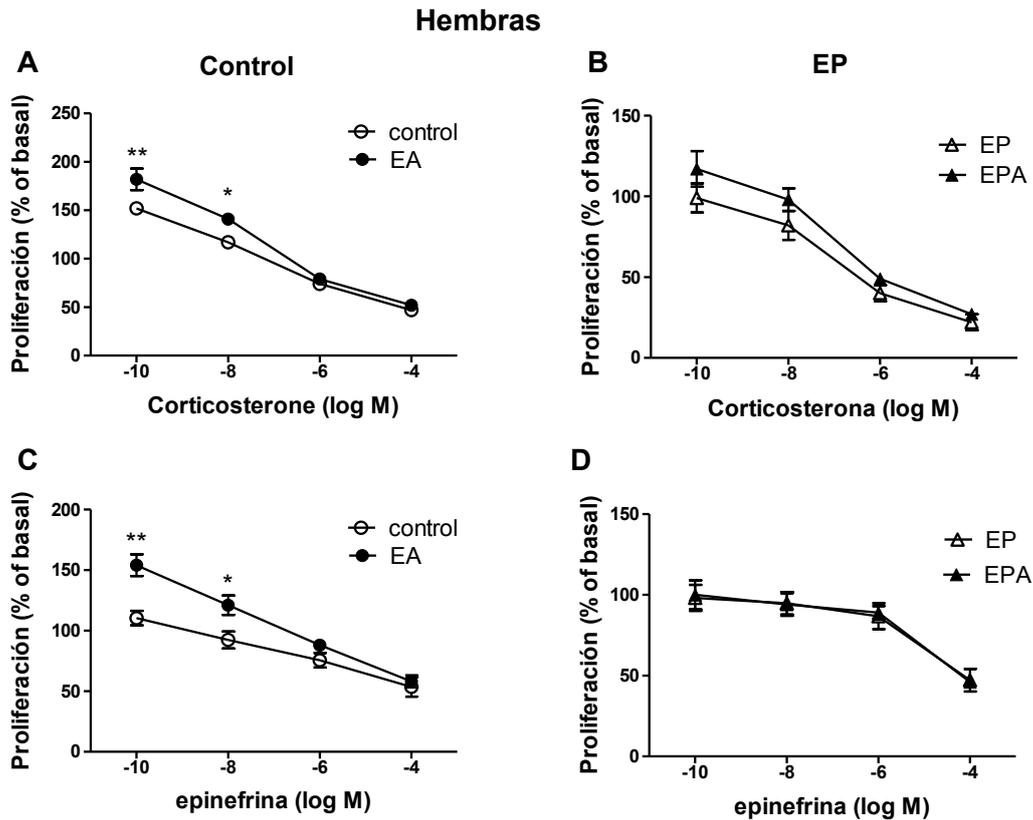


Figura 61: Efecto de corticosterona y epinefrina sobre la respuesta proliferativa de linfocitos T proveniente de hembras inducida por Concanavalina A

Linfocitos provenientes de ganglios linfáticos estimuladas con Con A (1ug/ml) fueron co-incubadas con concentraciones crecientes de corticosterona (**A Y B**) o epinefrina (**C y D**). Se determinó la proliferación celular por incorporación de ^3H -timidina. Los resultados se expresan como porcentaje de proliferación en ausencia de corticosterona (proliferación basal). Los datos representan la media \pm ES, n=8

En los machos se observó un aumento en el efecto estimulador de corticosterona (bajas dosis) en linfocitos provenientes de animales control expuestos a estrés agudo en la adultez (EA) en comparación con los no expuestos (control) (figura 62 A). Sin embargo en linfocitos de machos EP expuestos a estrés agudo (EPA) no se observaron diferencias con respecto a los no expuestos (figura 62 B) [ANOVA con medidas repetidas: Interacción: $F(3,28)= 0,98$ NS; droga: $F(3,28)= 45,22$, $p<0,001$; estrés: $F(3,28)=15,3$ $p<0,05$].

En cuanto al efecto de epinefrina, se observó un aumento del efecto estimulador en animales control y EP expuestos a estrés agudo con respecto a los no expuestos

[ANOVA con medidas repetidas: Interacción: $F(3,28)= 1,93$, NS; droga: $F(3,28)= 45,23$, $p<0,001$; estrés: $F(3,28)= 17,3$ $p<0,05$] (Figura 62).

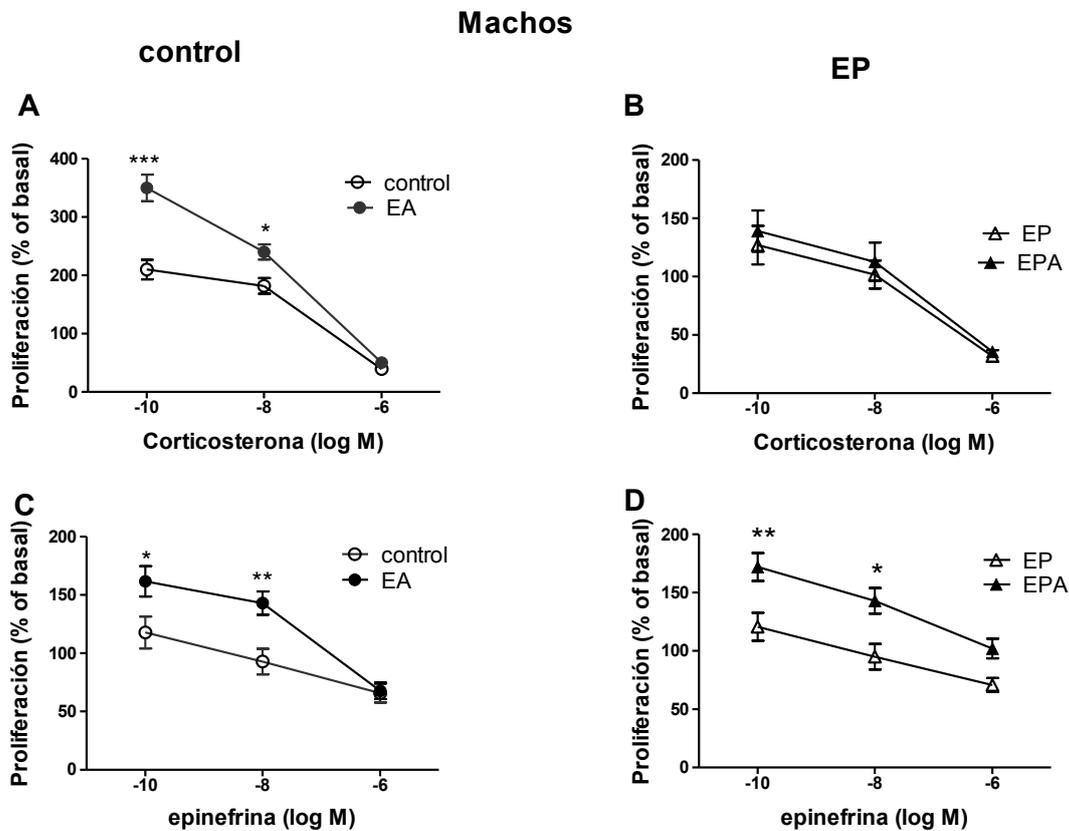


Figura 62: Efecto de corticosterona y epinefrina sobre la respuesta proliferativa de linfocitos T proveniente de machos inducida por Concanavalina A

Linfocitos provenientes de ganglios linfáticos estimulados con Con A (1 μ g/ml) fueron co-incubados con concentraciones crecientes de corticosterona (A Y B) o epinefrina (C y D). Se determinó la proliferación celular por incorporación de 3 H-timidina. Los resultados se expresan como porcentaje de proliferación en ausencia de corticosterona (proliferación basal). Los datos representan la media \pm ES, n=8 por grupo; * $p< 0,05$, ** $p< 0,01$.

4-9. Efectos del EP sobre el comportamiento en animales expuestos a estrés agudo

4-9-1. Pruebas conductuales

4-9-1-1. Prueba de alternancia

Se determinó el porcentaje de alternancia para los distintos grupos experimentales. No se observaron diferencias en la alternancia en ninguno de los grupos experimentales, ni en machos ni en hembras [ANOVA de dos vías; Hembras, interacción prenatal x postnatal, $F(1,23)= 0,02$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,12)= 0,89$, NS; postnatal: $F(1,23)=0,11$, NS. Machos, interacción prenatal x postnatal, $F(1,23)= 0,01$ NS; efectos principales, prenatal: $F(1,23)= 0,01$, NS; postnatal: $F(1,23)= 3,38$, NS] (Figura 63).

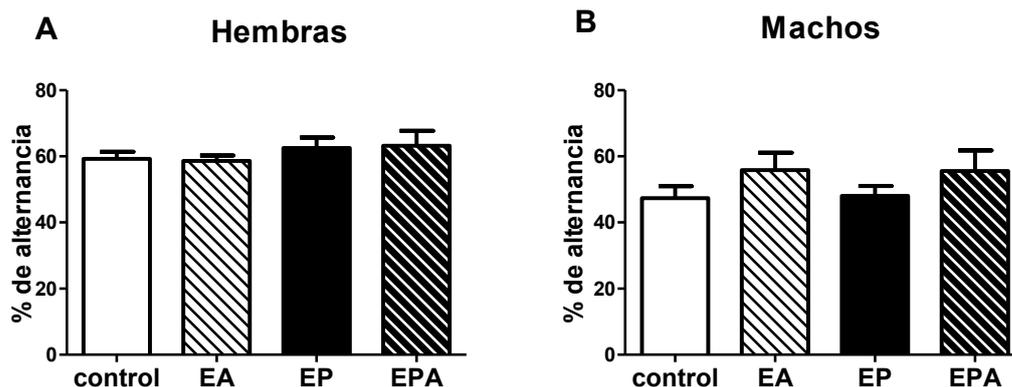


Figura 63: Prueba de alternancia

Se colocaron los animales de a uno por vez en el centro del laberinto en Y. Se registraron las entradas a los distintos brazos por 6 minutos y se determinó el porcentaje de alternancia en Hembras (A) y Machos (B). Los resultados expresan la media \pm ES; n entre 6 y 8 por grupo.

4-9-1-2. Actividad locomotora en campo abierto

Se expuso al animal a un campo abierto durante 5 minutos como se mencionó previamente.

Al ser expuestas a un estrés agudo durante la adultez, tanto las hembras control como EP mostraron un aumento en las líneas cruzadas, siendo este aumento mayor en

animales EP [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,24)= 5,61$, $p<0,05$; efectos simples, exposición a estrés agudo, Control $F(1,24)= 7$, $p<0,05$; EP $F(1,24)= 35,94$, $p<0,001$] (Figura 64 A). Se vió también que tanto las hembras control como EP mostraron un aumento en el número de rearing [ANOVA de dos vías: interacción prenatal x postnatal; $F(1,24)= 0,03$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,24)= 1,65$, NS; postnatal: $F(1,24)= 87,43$, $p<0,01$]. Así como también mostraron una disminución en el tiempo que permanecieron quietas [ANOVA de dos vías, interacción prenatal x postnatal: $F(1,24)= 0,15$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,24)= 1,17$, NS; postnatal: $F(1,24)= 91,69$, $p<0,001$] (Figura 64 B y C)

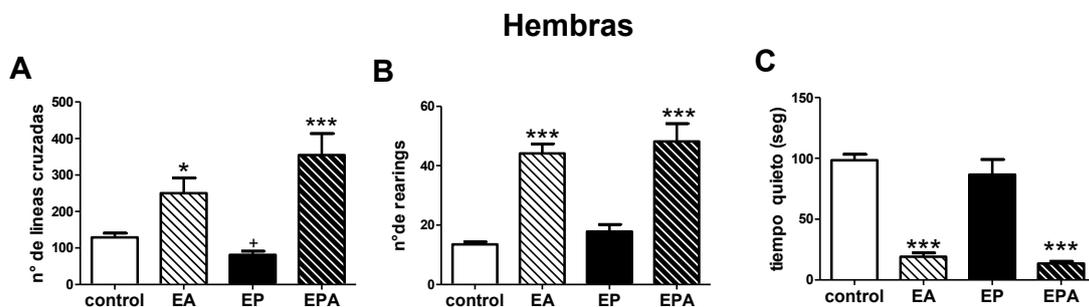


Figura 64: Actividad locomotora.

Se colocó el animal en un campo abierto y se lo dejó explorar libremente durante 5 minutos. Se grafica el número de líneas cruzadas (A), el número de rearings (B) y el tiempo que permanece quieto (C). Los resultados expresan la media \pm ES. * $p<0,05$, n 6 u 8 por grupo. *** $p<0,001$ con respecto a su correspondiente control sin EA. + $p<0,05$ con respecto al animal control.

Para los machos no se observó diferencias en ninguno de los parámetros estudiados entre los grupos en estudio [ANOVA de dos vías: Líneas; Interacción prenatal x postnatal: $F(1,24)= 0,05$, NS; efectos principales, prenatal $F(1,24)= 1,25$, NS; postnatal: $F(1,24)= 1,23$, NS. Rearings: Interacción prenatal x postnatal: $F(1,24)= 0,01$, NS; efectos principales; prenatal $F(1,24)= 0,01$, NS; postnatal: $F(1,24)= 3,66$, NS. Tiempo: Interacción prenatal x postnatal: $F(1,24)= 0,03$, NS; efectos principales: prenatal $F(1,24)= 3,67$, NS; postnatal: $F(1,24)= 2,45$, NS] (Figura 65).

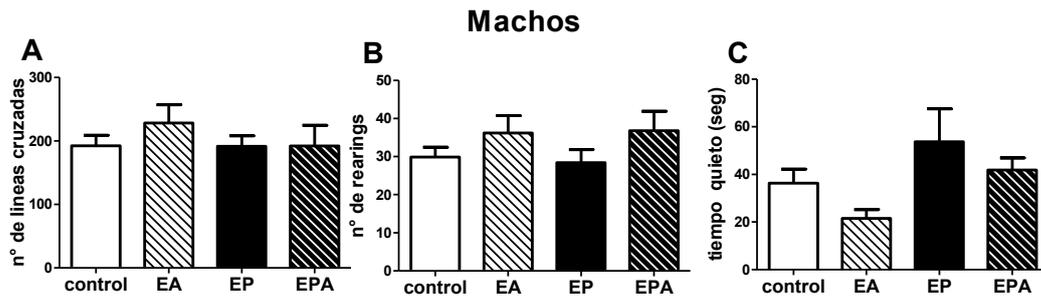


Figura 65: Actividad locomotora.

Se colocó el animal en un campo abierto y se lo dejó explorar libremente durante 5 minutos. Se grafica el número de líneas cruzadas (**A**), el número de rearings (**B**) y el tiempo que permanece quieto (**C**). Los resultados expresan la media \pm ES, n 6 u 8 por grupo.

4-9-1-3. Prueba de habituación

Como se observa en la Figura 66, tanto las hembras control como las hembras EP al ser expuestas a estrés agudo no mostraron diferencias significativas en los parámetros evaluados en la fase de testeo en comparación con el entrenamiento a diferencia de los no expuestas [ANOVA con medidas repetidas: Líneas: interacción $F(3,28) = 2,23$, NS; efectos principales: tiempo: $F(1,28) = 4,47$, $p < 0,05$; estrés: $F(3,28) = 5,45$, $p < 0,05$. Rearings: interacción: $F(3,28) = 0,22$, NS; efectos principales: tiempo: $F(1,28) = 6,81$, $p < 0,05$; estrés: $F(3,28) = 3,24$, $p < 0,05$; Tiempo quieto: Interacción $F(3,28) = 1,24$, NS; efectos principales: tiempo: $F(1,28) = 67,20$, $p < 0,01$, estrés: $F(3,28) = 15,43$, $p < 0,01$].

Estos resultados indican que la exposición a estrés agudo induce un peor desempeño en la prueba de habituación tanto para hembras control como estresadas prenatalmente.

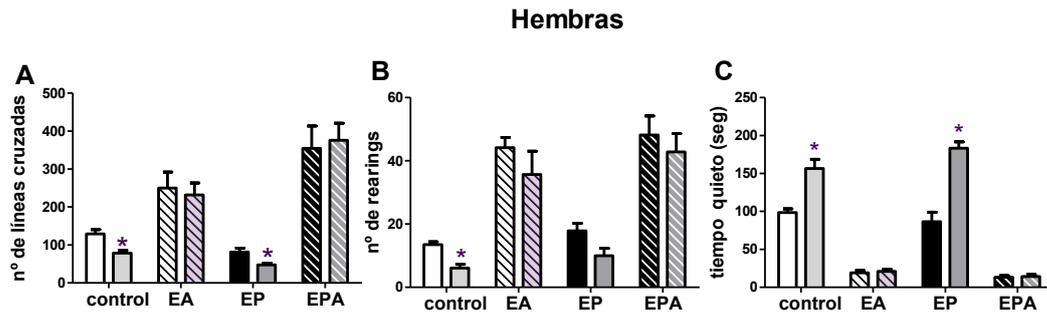


Figura 66: Prueba de Habitación.

Se grafica el número de líneas cruzadas (**A**), el número de rearings (**B**) y el tiempo que permanece quieto (**C**) para el entrenamiento y para el testeo a las 24 horas. Los resultados expresan la media \pm ES, $n = 6$ u 8 por grupo. * $p < 0,05$ respecto a la fase de entrenamiento.

En los machos no se encontraron diferencias en el número de líneas cruzadas, o en el número de exploraciones verticales, entre la fase de testeo y el entrenamiento ni en machos control expuestos a estrés agudo ni en machos estresados prenatalmente expuestos a estrés agudo. Como se mostró previamente, los machos EP no expuestos a estrés agudo mostraron una disminución en estos parámetros (Figura 67 A y B) a diferencia de los controles. [ANOVA con medidas repetidas: Líneas: interacción: $F(3,28) = 2,4$, NS; Efectos principales: tiempo: $F(1,28) = 3,45$, $p < 0,05$; estrés: $F(3,28) = 9,96$, $p < 0,05$. Rearings: interacción: $F(1,28) = 1,19$, NS; efectos principales: tiempo: $F(1,28) = 16,7$, $p < 0,001$; estrés: $F(3,28) = 4,87$, $p < 0,01$].

En ninguno de los grupos estudiados se encontraron diferencias en el tiempo que permanecen quietos entre la fase de entrenamiento y la fase de testeo [ANOVA con medidas repetidas: interacción $F(3,28) = 2,84$, NS; efectos principales: tiempo: $F(1,28) = 2,12$, NS; estrés: $F(3,28) = 1,14$, NS] (Figura 67 C).

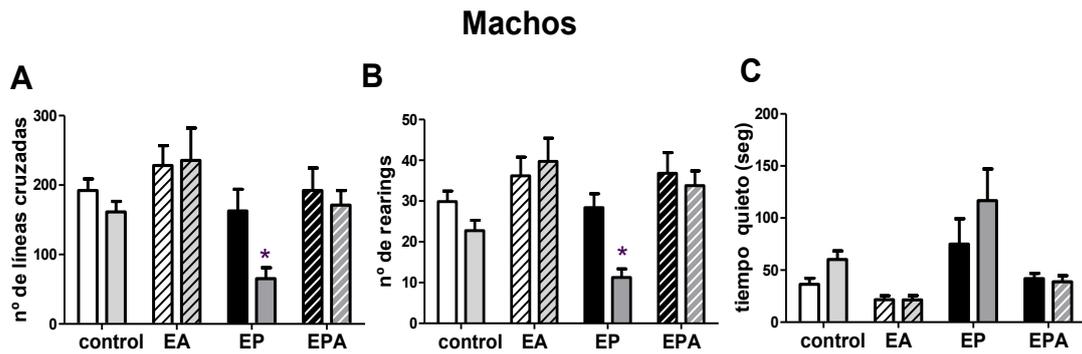


Figura 67: Prueba de Habitación.

Se grafica el número de líneas cruzadas (A), el número de rearings (B) y el tiempo que permanece quieto (C) para el entrenamiento y para el testeo a las 24 horas. Los resultados expresan la media \pm ES, $n = 6$ u 8 por grupo. * $p < 0,05$ respecto a la fase de entrenamiento.

4-9-1-4. Prueba de ansiedad. Laberinto elevado en cruz

Se realizó la prueba de ansiedad como se describió previamente.

En las hembras se observó una disminución en el tiempo en los brazos abiertos en animales controles expuestos a estrés agudo en la adultez en comparación con los no expuestos, que se relaciona con un aumento del comportamiento de tipo ansioso. No se encontraron cambios en animales EP expuestos a estrés agudo en comparación con los no expuestos [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,36) = 9,29$, $p < 0,05$; efectos simples, exposición a estrés agudo, control: $F(1,36) = 12,84$, $p < 0,001$, EP: $F(1,36) = 0,53$, NS] (Figura 68 A).

En los machos no se encontraron cambios en ninguno de los grupos estudiados [ANOVA de dos vías: interacción prenatal x postnatal $F(1,36) = 0,9$, NS; efectos principales: prenatal: $F(1,36) = 2,23$, NS; postnatal: $F(1,36) = 0,28$, NS] (Figura 68 B).

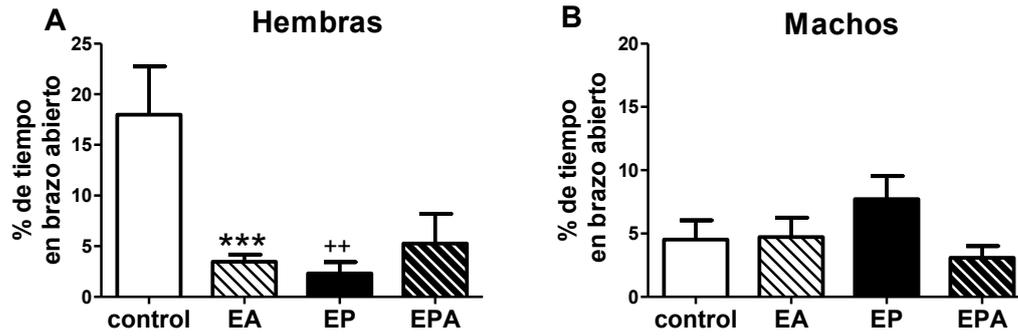


Figura 68: Laberinto elevado en cruz.

Se colocó al animal en el centro de un laberinto elevado en cruz y se lo deja explorar por 5 minutos. Se grafica el porcentaje de tiempo en brazo abierto con respecto al tiempo total de actividad para Hembras (A) y Machos (B), $n=10$ animales por grupo; *** $p<0,01$ con respecto a su correspondiente control sin estrés en la adultez. ++ $p<0,01$ con respecto al animal control.

B- Efectos del EP en animales expuestos a estrés crónico

4-10. Evaluación de la respuesta inmune

Se evaluaron los efectos del estrés prenatal sobre el sistema inmune de ratones expuestos o no a estrés crónico en la adultez.

4-10-1. Inmunidad innata

4-10-1-1. Actividad citotóxica de células NK

Se evaluó la actividad lítica de NK como se describió previamente.

En las hembras se observó un aumento en el porcentaje de lisis en función de la relación célula blanco: efectora para todos los grupos experimentales, sin embargo no se observaron diferencias entre de los grupos estudiados [ANOVA de tres vías, interacción: $F(2,36)= 1,46$, NS; efectos principales: prenatal: $F(2,36)=0,05$, NS; postnatal: $F(2,36)= 3,26$, NS; concentración: $F(2,36)= 234$ $p<0,001$] (Figura 69).

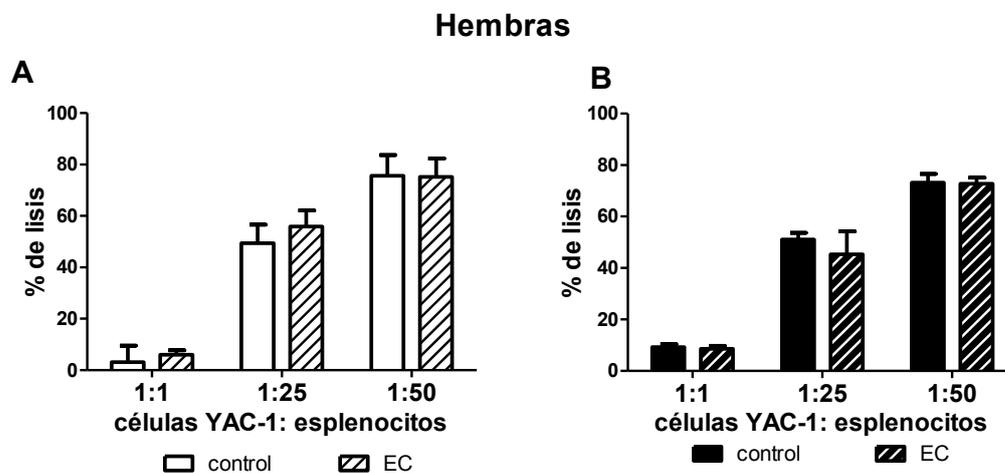


Figura 69: Ensayo de citotoxicidad por liberación de [3H]-Timidina. Los valores expresan la media \pm ES del porcentaje de lisis para diferentes relaciones de célula blanco: efectora, luego de ser cultivadas durante 3,5 horas; $n=4$ por grupo.

En machos se observó un aumento de la actividad citotóxica de NK en función de la concentración para todos los grupos experimentales. Los animales EP expuestos a

estrés crónico mostraron un aumento de porcentaje de lisis en comparación con los no expuestos, no siendo así en los animales control [interacción: $F(1,36) = 1,56$, NS; efectos principales: prenatal $F(1,36) = 2,39$, NS; postnatal $F(1,36) = 11,12$, $p < 0,05$; concentración $F(1,36) = 160$, $p < 0,001$] (Figura 70).

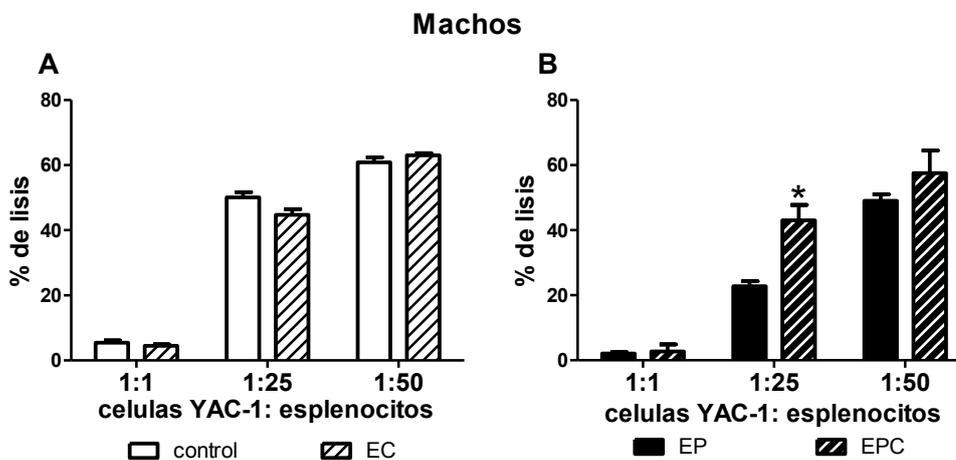


Figura 70: Ensayo de citotoxicidad por liberación de [3H]-Timidina. Los valores expresan la media \pm ES del porcentaje de lisis para diferentes relaciones de célula blanco: efectora, luego de ser cultivadas durante 3,5 horas, $n = 4$ por grupo.. * $p < 0,05$.

4-10-1-2. Actividad fagocítica de macrófagos

Se determinó la capacidad de los macrófagos peritoneales de fagocitar eritrocitos opsonizados como se describió previamente.

En las hembras no se observó diferencias en la capacidad fagocítica entre los grupos experimentales [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,20) = 0,79$, NS; efectos principales: prenatal $F(1,20) = 0,15$, NS; postnatal $F(1,20) = 0,79$, NS] (Figura 71 A)

En cambio en los machos el análisis de efectos simples reveló un aumento en la capacidad fagocítica en machos EP expuestos a estrés crónico (EPC) no siendo así en los machos control expuestos a estrés crónico (EC) [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,20) = 19,92$, $p < 0,001$; efectos simple, exposición a estrés crónico, control: $F(1,20) = 0,08$, NS; EP: $F(1,20) = 43,49$, $p < 0,001$] (Figura 71 B)

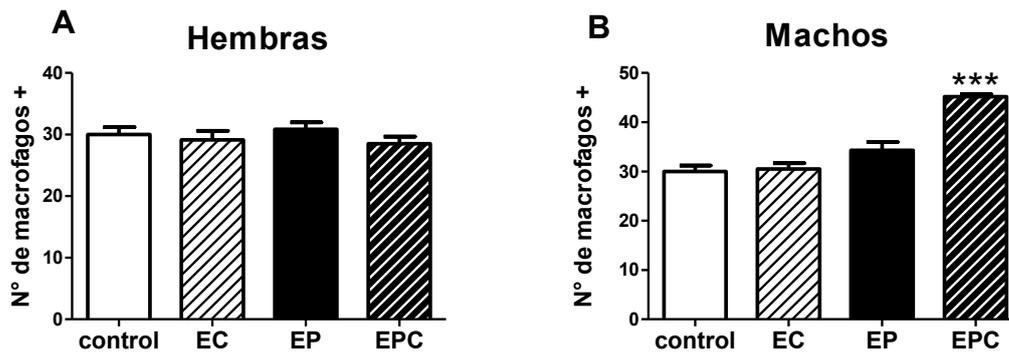


Figura 71: Capacidad fagocítica de macrófagos.

Se cultivaron macrófagos peritoneales con eritrocitos opsonizados y se determinó la capacidad fagocítica para Hembras (A) y Machos (B). Se tomó como positivo el macrófago con más de tres eritrocitos fagocitados. Se grafica el % de macrófagos positivos como la media \pm ES, $n=6$ por grupo. *** $p<0,001$.

4-10-2. Inmunidad Adaptativa

4-10-2-1. Respuesta proliferativa en linfocitos T estimulados con Con A

Se determinó la proliferación de linfocitos de ganglios estimulados con Con A, mitógeno T, y de linfocitos provenientes de bazo con LPS, mitógeno B.

Las hembras EP respondieron con una disminución significativa en la proliferación T en comparación con las hembras control cuando fueron expuestas a estrés crónico [ANOVA de dos vías: interacción prenatal x postnatal: $F(1,37)= 2,60$, NS; efectos principales: prenatal: $F(1,37)= 6,14$, $p<0,05$; postnatal: $F(1,37)= 5,84$, $p<0,05$] (Figura 72 A). Cabe aclarar que no se observan diferencias en la proliferación basal (sin estimular) entre los distintos grupos experimentales.

Los machos control expuestos a estrés crónico mostraron una disminución de la proliferación inducida con concanavalina A en comparación con los no expuestos, en cambio los machos EP expuestos a estrés crónico (EPC) no mostraron diferencias con respecto a los no expuestos a estrés crónico [ANOVA de dos vías: interacción prenatal x postnatal: $F(1,52)= 2,97$, NS; efectos principales: prenatal: $F(1,52)= 0,94$, NS; postnatal: $F(1,52)= 4,51$, $p<0,05$] (Figura 72 B).

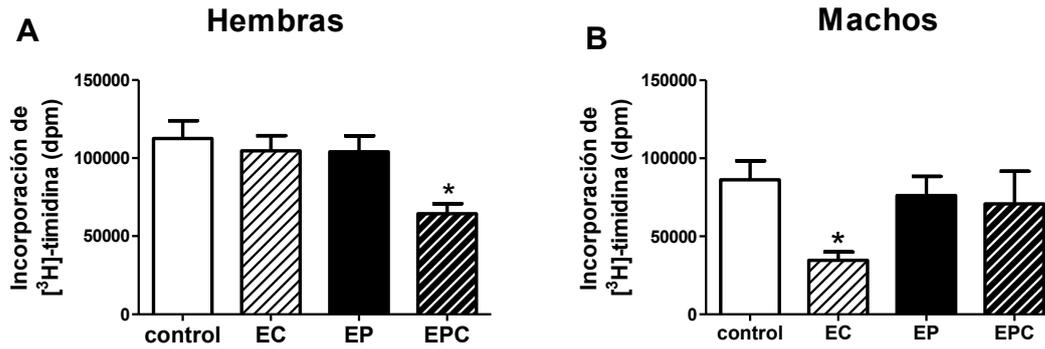


Figura 72: Respuesta proliferativa inducida por mitógenos

Linfocitos provenientes de ganglios linfáticos fueron cultivados en presencia de Con A (1 µg/ml); Se determinó la proliferación celular por incorporación de ³H-timidina en Hembras (A) y Machos (B). Los resultados expresan la media ± ES, n entre 10 y 15 por grupo..Proliferación basal (dpm), Hembras: control= 854±134; EP= 895±201; EC= 902±178; EPC= 820±210; Machos: control= 897±124; EP= 910±139; EC= 912±153; EPC= 864±193. * $p < 0,05$ con respecto a su correspondiente grupo sin estrés en la adultez.

4-10-2-2. Distribución de subpoblaciones linfocitarias

Se determinó el porcentaje de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ mediante citometría de flujo. No se encontraron diferencias en ninguno de los grupos estudiados tanto en machos como en hembras [ANOVA de dos vías; Hembras: CD4⁺, interacción F(1,12)= 0,3, NS; efectos principales, prenatal: F(1,12)= 0,69, NS; postnatal: F(1,12)= 0,25, NS. CD8⁺, interacción F(1,12)=0,02, NS; efectos principales: prenatal: F(1,12)= 1,34, NS; postnatal: F(1,12)=0,5, NS; Machos: CD4⁺, interacción F(1,12)= 0,39, NS; efectos principales: prenatal: F(1,12)= 0,20, NS; postnatal: F(1,12)= 1,08, NS; CD8⁺: interacción F(1,12)= 0,87, NS; efectos principales: prenatal: F(1,12)= 1,07, NS; postnatal: F(1,12)= 0,86, NS] (Tabla 8).

Grupo	Hembras		Machos	
	Subpoblaciones linfocitarias (% de linfocitos totales)		Subpoblaciones linfocitarias (% de linfocitos totales)	
	CD4+	CD8+	CD4+	CD8+
control	60,10± 2,50	20,00±0,80	55,2±1,30	21,3±1,01
EC	59,4± 1,17	19,95±0,65	51,17±1,35	22,9±2,85
EP	58,95±1,04	19,95±1,65	53,7±1,40	19,05±1,02
EPC	58,95±0,25	18,80±1,20	51,17±1,65	18,5±1,87

Tabla 8: Distribución de las poblaciones linfocitarias

4-10-2-3. Respuesta mediada por linfocitos B

Se realizaron cultivos *in vitro* con linfocitos provenientes de bazo, estimulados con LPS, mitógeno selectivo de linfocitos B.

No se encontraron diferencias significativas de la proliferación B en ninguno de los grupos estudiados tanto para machos como para hembras [ANOVA de dos vías: Hembras, interacción prenatal x postnatal: $F(1,46)= 0,18$, NS; efectos principales: prenatal $F(1,46)= 0,004$, NS; postnatal: $F(1,46)=0,84$, NS. Machos, interacción prenatal x postnatal: $F(1,28)= 0,17$, NS; efectos principales: prenatal $F(1,28)= 2,25$, NS; postnatal: $F(1,28)= 0,16$, NS] (Figura 73).

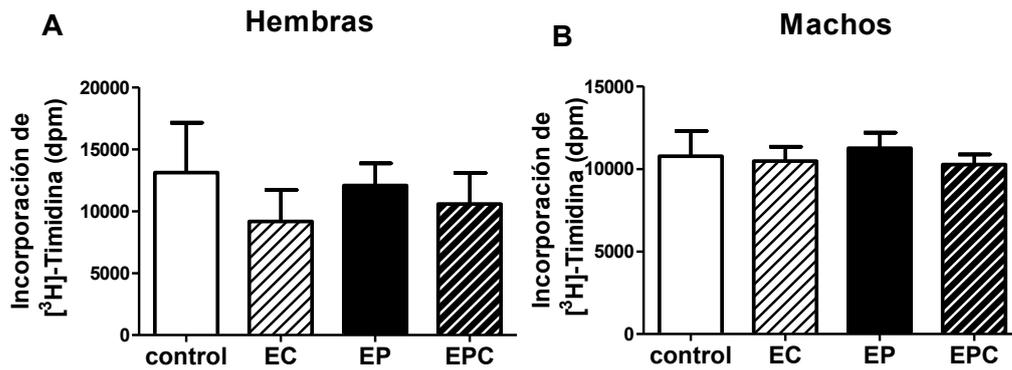


Figura 73: Proliferación de linfocitos B inducida por LPS.

Linfocitos provenientes de bazo fueron cultivados en presencia LPS (30ug/ml). Se determinó la proliferación celular por incorporación de ^3H -timidina para Hembras (A) y Machos (B). Los resultados expresan la media \pm ES. n entre 8 y 12 por grupo. Basales (dpm), Hembras: control= 2290 \pm 230; EP= 2049 \pm 246; EC= 2101 \pm 245; EPC= 2020 \pm 278, Machos: control= 2032 \pm 241; EP= 2102 \pm 231; EC= 2113 \pm 243; EPC= 2003 \pm 201.

4-10-2-4. Producción de anticuerpos frente a un desafío antigénico

Para las hembras no se observaron cambios en el título de IgM anti-GRC en ninguno de los grupos estudiados [Prueba de Kruskal Wallis: $H(8)= 1,03$, NS] (figura 74 A). El título de IgG anti-GRC fue menor en animales control expuestos a estrés crónico en comparación de los no expuestos, en cambio las hembras EP expuestas a estrés crónico (EPC) no mostraron cambios con respecto a las no expuestos. [Prueba de Kruskal wallis $H(8)= 13,88$, $p<0,00$]. (Figura 74 C).

En machos se obtuvieron resultados similares [Prueba de Kruskal Wallis: IgM: $H(8)= 6,03$, NS ; IgG: $H(8)= 12,93$, $p<0,01$] (figura 74 B y D).

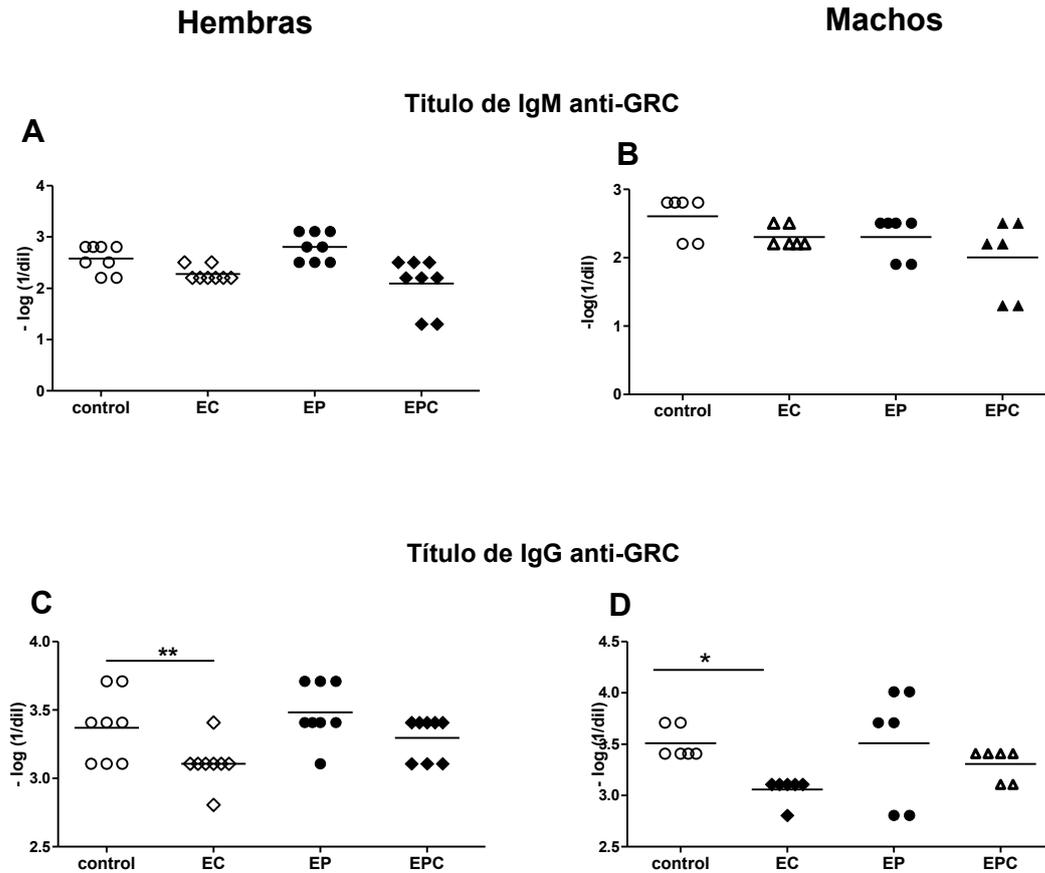


Figura 74: producción de Ac, frente a un desafío antigénico T-dependiente

Se determinaron los títulos de Ac en suero de animales control o EP expuestos o no a EC en la adultez, inmunizados con GRC. Título de IgM anti-SRBC (A y B). Título de IgG anti-SRBC (C y D). En Hembras (A y C) y Machos (B y D). Se grafica el título de anticuerpos de 8 animales por grupo. La barra horizontal representa la media de cada grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ con respecto a su correspondiente grupo sin estrés en la adultez.

En cuanto al título de IgM anti-LPS, no observamos diferencias entre los grupos experimentales ni en machos ni en hembras [Prueba de Kruskal Wallis: Hembras: $H(8) = 0,41$ NS. Machos $H(8) = 1,28$ NS] (Figura 75).

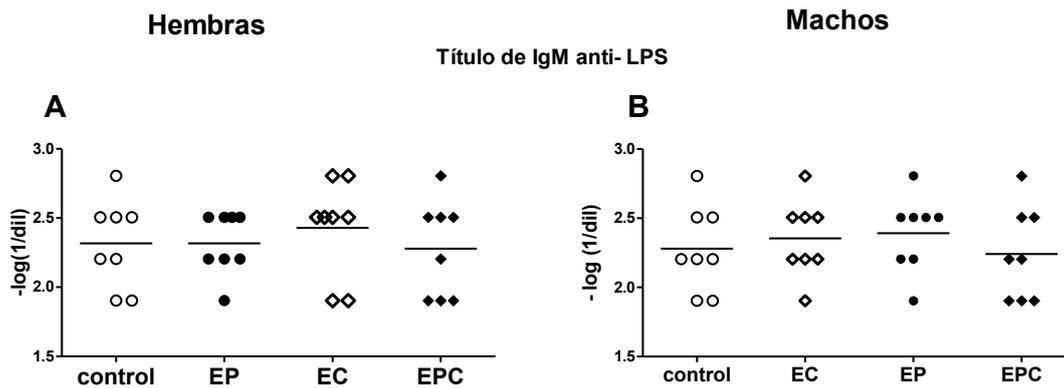


Figura 75: producción de Ac, frente a un desafío antigénico T-independiente

Se determinaron los títulos de Ac en suero de animales control o EP expuestos o no a EA en la adultez, inmunizados con LPS para Hembras (A) y Machos (B). Se grafica el título de IgM anti-LPS de 8 animales por grupo. La barra horizontal representa la media de cada grupo.

4-10-3. Expresión de citoquinas en ganglios

Se determinó la expresión de ARNm de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IFN- γ como se describió previamente.

Como puede verse en la figura 76 A, tanto las hembras control como las EP respondieron al estrés crónico con un aumento en los niveles de ARNm de IL-4 [ANOVA de dos vías: interacción prenatal x posnatal: $F(1,20)= 0,08$, NS; efectos principales, prenatal $F(1,20)= 18,03$, $p<0,001$; postnatal $F(1,20)= 26,39$ $p<0,001$].

Las hembras control expuestas a estrés crónico mostraron una disminución de los niveles de ARNm de IFN- γ . En los animales EP expuestos a estrés crónico si bien no fue significativa se observó una disminución adicional de los niveles de ARNm de IFN γ [ANOVA de dos vías: interacción prenatal x posnatal: $F(1,20)= 4,05$, NS; efectos simples, prenatal $F(1,20)= 18,92$, $p<0,001$; postnatal $F(1,20)= 29,08$, $p<0,001$] (figura 76 D).

No se encontraron diferencias en los niveles de ARNm de IL-6, IL-10 e IL-2 en ninguno de los grupos experimentales en hembras [ANOVA de dos vías; IL-6: interacción prenatal x posnatal: $F(1,20)= 3,05$, NS; efectos principales: prenatal $F(1,20)= 0,34$, NS; postnatal $F(1,20)= 5,03$, NS; IL-10: interacción prenatal x posnatal: $F(1,20)= 0,51$, NS; efectos principales: prenatal $F(1,20)= 0,003$, NS; postnatal $F(1,20)= 0,54$, NS; IL-2: interacción prenatal x posnatal: $F(1,20)= 1,63$, NS; efectos principales: prenatal $F(1,20)= 1,62$, NS; postnatal $F(1,20)= 0,18$, NS] (figura 76 B,C y E).

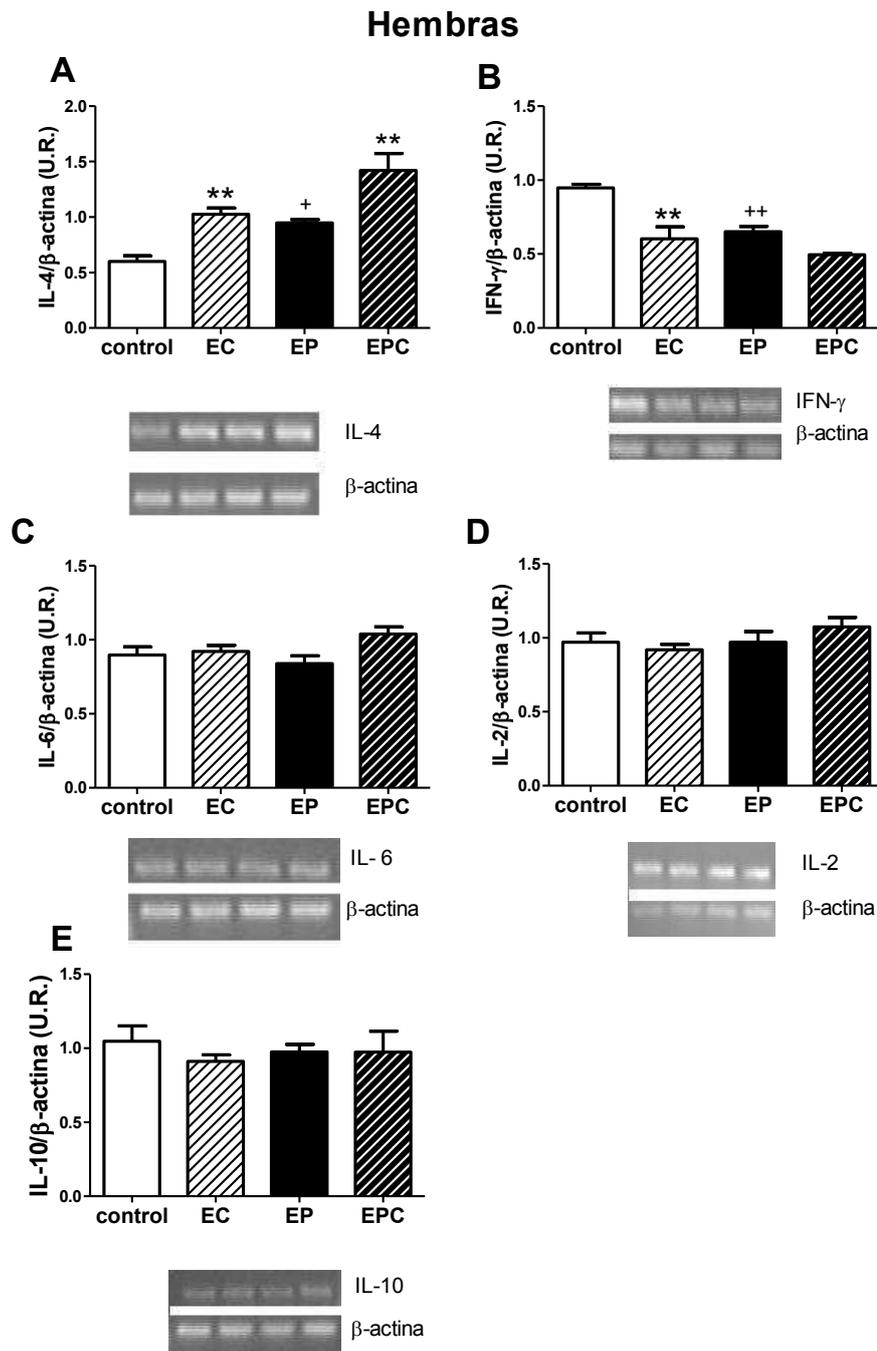


Figura 76: Expresión de citoquinas en ganglios de hembras.

Se determinaron los niveles de ARNm de IL-4 (A), IFN- γ (B), IL-6 (C), IL-2 (D) e IL-10 (E) por medio de RT-PCR. Los datos se expresan en relación a los niveles de ARNm de actina. Los resultados expresan la media \pm ES, n= 6 por grupo. ** $p < 0,01$ con respecto al correspondiente grupo sin estrés en la adultez. + $p < 0,05$ ++

Se determinó además la liberación de citoquinas en sobrenadante de ganglio como se describió previamente.

En las hembras se observó un aumento en los niveles de IL-4 tanto en animales control como en EP expuestos a estrés crónico [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x posnatal: $F(1,18)= 1,86$, NS; efectos principales, prenatal $F(1,18)= 7,24$, $p<0,05$; postnatal $F(1,18)= 21,75$, $p<0,001$] (Figura 77 A).

Se observó, además, una disminución significativa de los niveles de IFN- γ tanto en animales control como EP expuestos a estrés crónico [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x posnatal: $F(1,16)= 4,48$, NS; efectos principales, prenatal $F(1,16)= 9,54$, $p<0,01$; postnatal $F(1,16)= 54,09$, $p<0,001$] (Figura 77 B).

No se observaron cambios en los niveles de IL-10 e IL-2 [ANOVA de dos vías; IL-10: interacción prenatal x posnatal: $F(1,12)= 0,37$, NS; efectos principales, prenatal $F(1,12)= 0,59$, NS; postnatal $F(1,12)= 0,53$, NS. IL-2: interacción prenatal x posnatal: $F(1,16)= 1,1$ NS; efectos principales, prenatal $F(1,16)= 1,44$, NS; postnatal $F(1,16)= 3,54$, NS].(Figura 77 C y D).

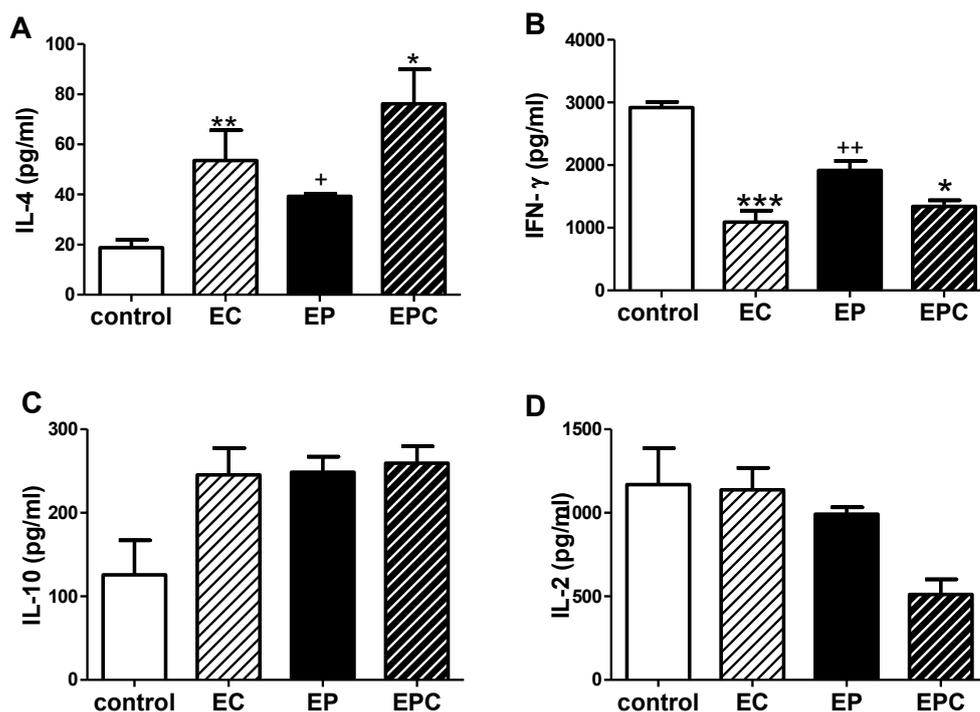


Figura 77: Liberación de citoquinas en hembras.

Se determinaron los niveles de IL-4 (A), IFN- γ (B), IL-10 (C) e IL-2 (D) por medio de un ELISA en sobrenadante de linfocitos estimulados con Con A. Los resultados representan la media \pm ES, n entre 4 y 6 por grupo. * $p<0,05$ ** $p<0,01$. *** $p<0,001$ respecto al correspondiente grupo sin estrés en la adultez; + $p<0,05$, ++ $p<0,01$ con respecto al grupo control,.

Se determinó la expresión de ARNm de citoquinas en ganglios de machos de los diferentes grupos experimentales como se describió previamente.

En los machos no se observó diferencias en los niveles de ARNm de ninguna de las citoquinas estudiadas [ANOVA de dos vías; IL-4: Interacción prenatal x posnatal: $F(1,27)=2,84$, NS; efectos principales, prenatal $F(1,27)=1,98$ NS; posnatal $F(1,27)=0,38$, NS. IFN- γ Interacción prenatal x posnatal: $F(1,25)=0,96$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,25)=0,004$, NS, posnatal $F(1,25)=0,47$, NS. IL-6: interacción prenatal x posnatal: $F(1,18)=0,02$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,18)=0,02$, NS, posnatal: $F(1,18)=0,17$, NS. IL-2: interacción prenatal x posnatal: $F(1,19)=0,04$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,16)=0,01$, NS; posnatal: $F(1,19)=0,39$ NS. IL-10: interacción prenatal x posnatal: $F(1,24)=0,67$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,24)=2,42$, NS, posnatal: $F(1,24)=0,96$, NS] (Figura 78).

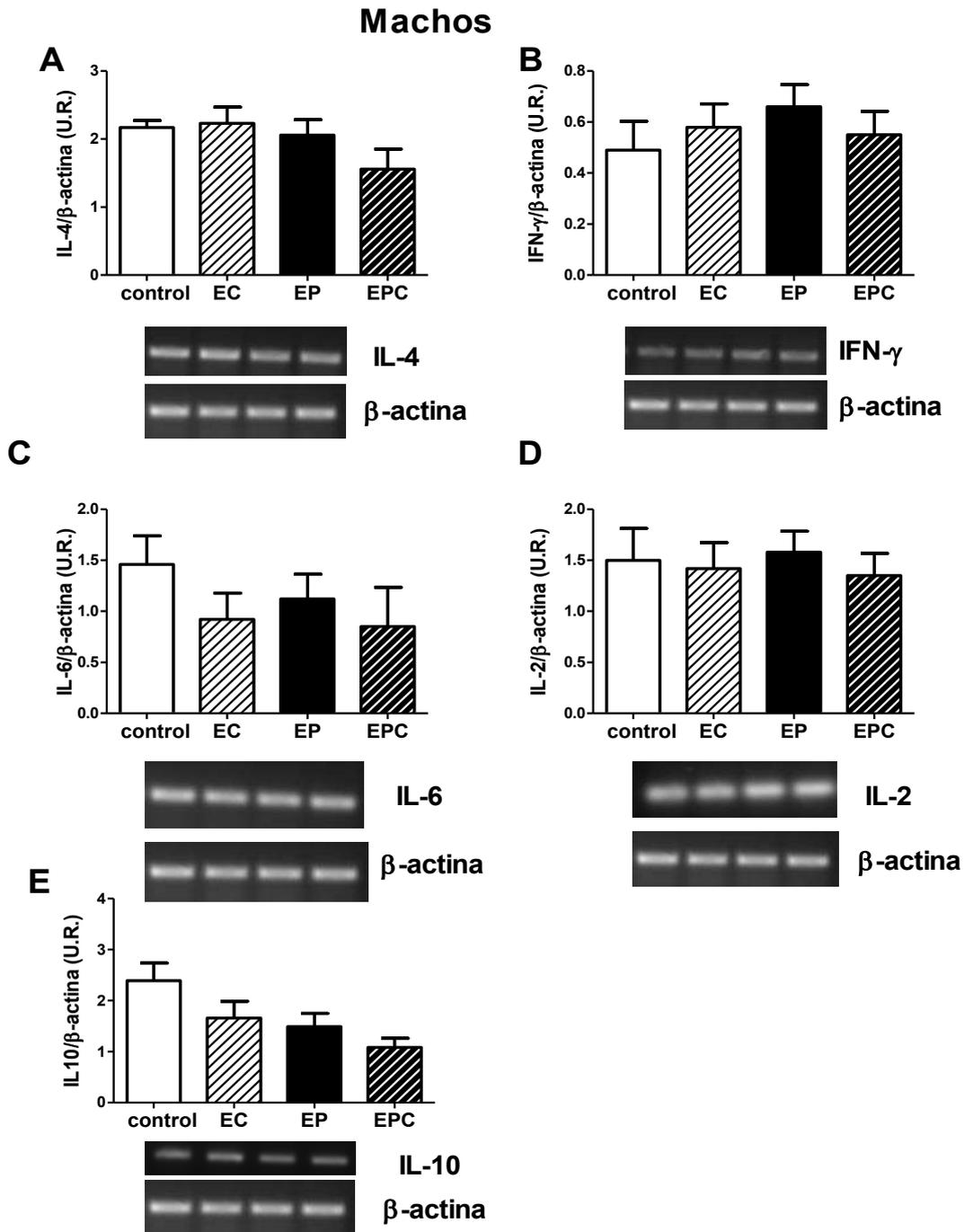


Figura 78 Expresión de citoquinas en ganglios de machos.

Se determinaron los niveles de ARNm de IL-4 (A) IFN- γ (B), IL-6 (C), IL-2 (D) e IL-10 (E) por medio de RT-PCR. Los datos se expresan en relación a los niveles de ARNm de actina. Los resultados expresan la media \pm ES, n entre 5 y 8 por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ con respecto al correspondiente grupo sin estrés en la adultez, + $p < 0,05$ con respecto al grupo control.

Se determinó además la liberación de citoquinas en sobrenadante de ganglio estimulados con Con A como se describió previamente.

En machos se observó un aumento significativo en los niveles de IFN- γ en animales EP expuestos a estrés crónico, en cambio no se observaron cambios en animales control expuestos a estrés crónico [ANOVA de dos vías: interacción prenatal x postnatal: $F(1,14)=16,11$ $p<0,01$; efectos simples (exposición a estrés crónico): control : $F(1,14)=0,31$ NS; EP: $F(1,14)=35,31$ $p<0,001$] (Figura 79 B).

No se encontraron diferencias en las otras citoquinas estudiadas [IL-4: interacción prenatal x posnatal: $F(1,12)=1,20$ NS; efectos principales, prenatal $F(1,12)=0,21$ NS; postnatal $F(1,12)=1,22$ NS. IL-10: Interacción prenatal x posnatal: $F(1,12)=0,37$ NS; efectos principales: prenatal $F(1,12)=0,59$ NS; postnatal $F(1,12)=0,53$ NS. IL-2: interacción prenatal x posnatal: $F(1,12)=1,11$ NS; efectos principales, prenatal: $F(1,12)=1,44$ NS; postnatal: $F(1,12)=3,54$ NS] (Figura 79 A, C y D)

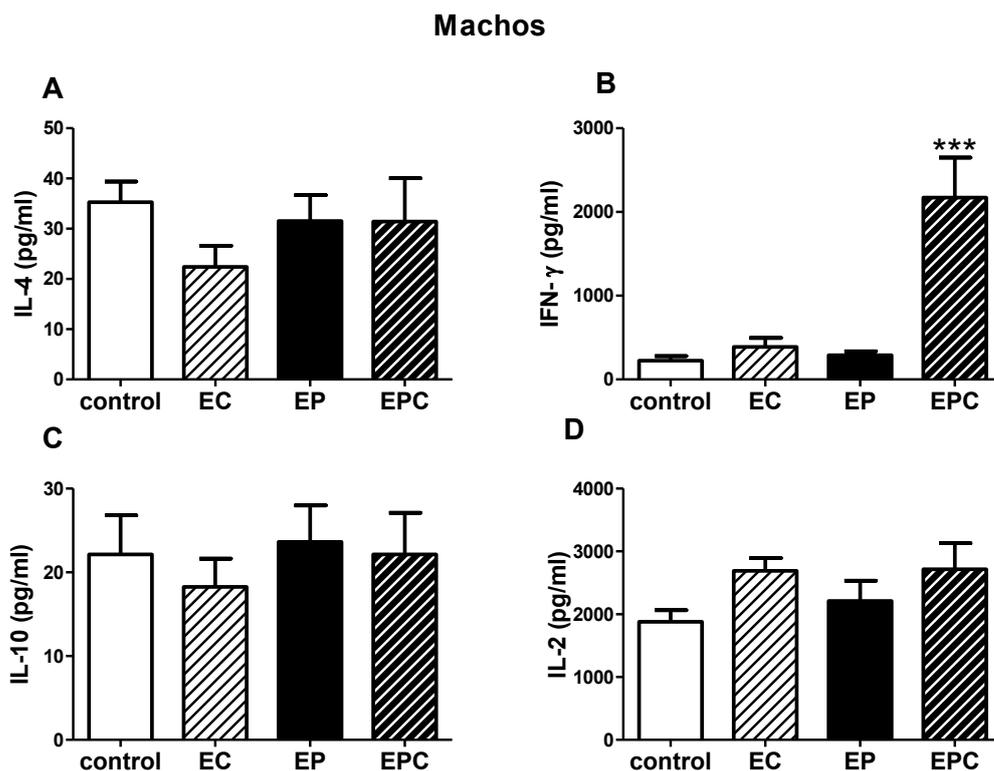


Figura 79: Liberación de citoquinas en macho.

Se determinaron los niveles de IL-4 (A), IFN- γ (B), IL-10 (C) e IL-2 (D) por medio de un ELISA en sobrenadante de linfocitos estimulados con Con A. Los resultados representan la media \pm ES, $n=4$ por grupo. *** $p < 0,001$ con respecto al correspondiente grupo sin estrés en la adultez.

4-11. Influencia de corticosterona y catecolaminas sobre la respuesta inmune

4-11-1. Determinación de los niveles de corticosterona y catecolaminas

Se determinaron los niveles de corticosterona y catecolaminas como se describió previamente.

El estrés crónico no produjo cambios significativos en los niveles de corticosterona o en los niveles de catecolaminas ni en animales control ni en animales EP tanto para machos como para hembras [ANOVA de dos vías: Hembras, Corticosterona: interacción prenatal x posnatal: $F(1,28)=0,52$, NS; efectos principales, prenatal $F(1,28)=1,48$; NS postnatal $F(1,28)=0,19$, NS. Catecolaminas: interacción prenatal x posnatal: $F(1,20)=0,60$ NS; efectos principales, prenatal $F(1,20)=0,001$, NS; postnatal $F(1,20)=0,52$, NS. Machos, Corticosterona: interacción prenatal x posnatal: $F(1,20)=0,65$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,20)=0,02$, NS; postnatal $F(1,20)=0,33$, NS. Catecolaminas: interacción prenatal x posnatal: $F(1,32)=1,17$, NS; efectos principales, prenatal $F(1,32)=0,67$, NS; postnatal $F(1,32)=0,001$, NS] (Figura 80).

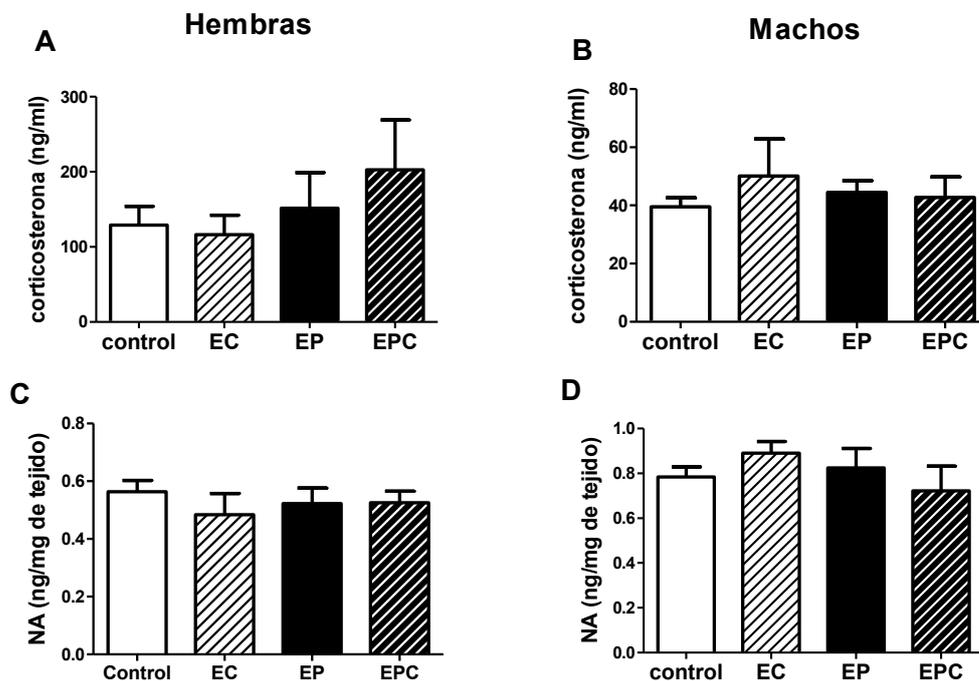


Figura 80: Niveles de corticosterona y catecolaminas

Se determinaron los niveles de corticosterona en plasma (A y B) y catecolaminas en bazo (C y D) provenientes de los distintos grupos experimentales de Hembras (A y C) y Machos (B y D) Los resultados expresan la media \pm ES de las determinaciones realizadas con 8 animales de cada grupo.

4-11-2. Peso de las glándulas adrenales

En hembras se observó un aumento en el tamaño de las glándulas adrenales tanto en animales control como EP expuestos a estrés crónico en comparación con los no expuestos, siendo mayor el aumento en animales EPC [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x posnatal: $F(1,28)= 4,20$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,28)= 5,42$, $p<0,05$, postnatal: $F(1,28)= 62,31$, $p<0,001$] (Figura 81 A),

En los machos no se observaron cambios en el peso de las glándulas adrenales en los grupos estudiados [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x posnatal: $F(1,28)= 0,81$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,28)= 1,50$, NS; postnatal: $F(1,28)= 0,72$, NS] (Figura 81 B).

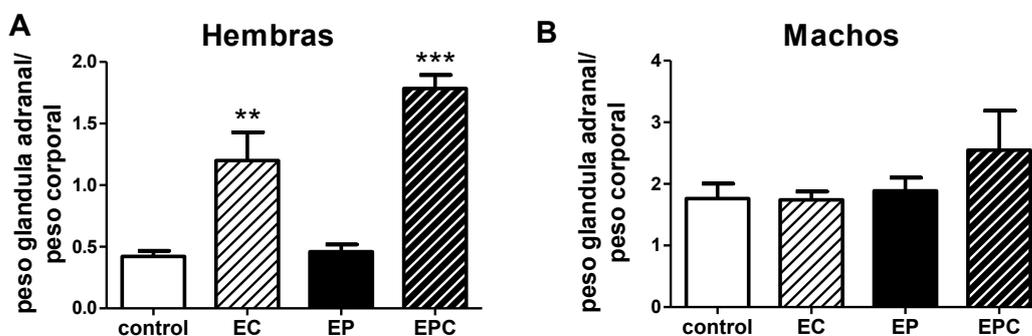


Figura 81: Peso de la glándula adrenal. Se grafica el peso de la glándula adrenal sobre el peso corpora de Hembras (A) y Machos (B). El grafico muestra el promedio \pm ES. Hembras $n=10$, Machos $n=8$. ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ con respecto al su correspondiente grupo sin estrés en la adultez.

4-11-3. Efecto de las hormonas del estrés sobre proliferación

Se determinó la proliferación de linfocitos provenientes de ganglios linfáticos en co-cultivos con Con A y distintas concentraciones de corticosterona o epinefrina como se describe en materiales y métodos.

Se observó una modulación de la proliferación dependiente de la concentración tanto para corticosterona como para epinefrina.

Se encontró una disminución de la proliferación con corticosterona en los animales control expuestos a estrés crónico en comparación con los no expuestos, no siendo

así en los animales EP [ANOVA con medidas repetidas: Interacción $F(23,26)= 0,9$ NS; efectos principales: droga: $F(3,28)= 54,32$, $p<0,01$, estrés: $F(3,28)= 5,2$ $p<0,05$] (Figura 82 A y B).

Resultados similares se encontraron para epinefrina [ANOVA con medidas repetidas; interacción: $F(3,28)= 0,76$ NS; estrés: $F(28,3)= 24,32$ $p<0,01$] (Figura 82 C y D).

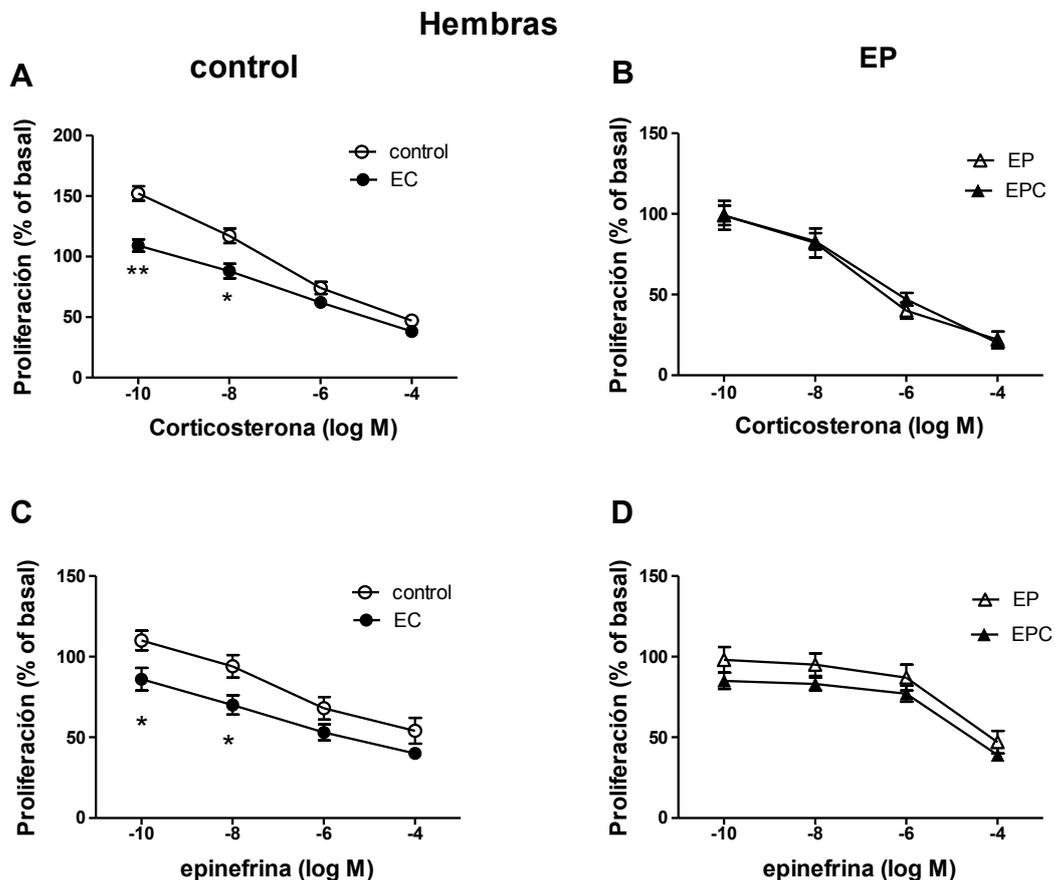


Figura 82: Efecto de corticosterona y epinefrina sobre la respuesta proliferativa de linfocitos T inducida por Concanavalina A en hembras

Linfocitos provenientes de ganglios linfáticos estimulados con Con A (1 μ g/ml) fueron co-incubados con concentraciones crecientes de corticosterona (A y B) o epinefrina (C y D). Se determinó la proliferación celular por incorporación de 3 H-timidina. Los resultados se expresan como porcentaje de proliferación en ausencia de corticosterona (proliferación basal). Los datos representan la media \pm ES, $n= 8$ por grupo. * $p<0,05$ ** $p<0,01$.

En los machos se encontró una modulación de la proliferación dependiente de la concentración tanto para corticosterona como para epinefrina. Sin embargo, no se observaron diferencias entre los grupos experimentales [ANOVA con medidas

repetidas: Corticosterona: interacción. $F(3,28)= 1,1$, NS; droga: $F(28,3)= 23,41$, $p<0,01$; estrés: $F(3,28)=0,4$, NS; Epinefrina: interacción: $F(3,28)= 0,2$, NS; droga: $F(28,3)= 13,41$, $p<0,01$; estrés: $F(3,28)=0,03$ NS] (Figura 83).

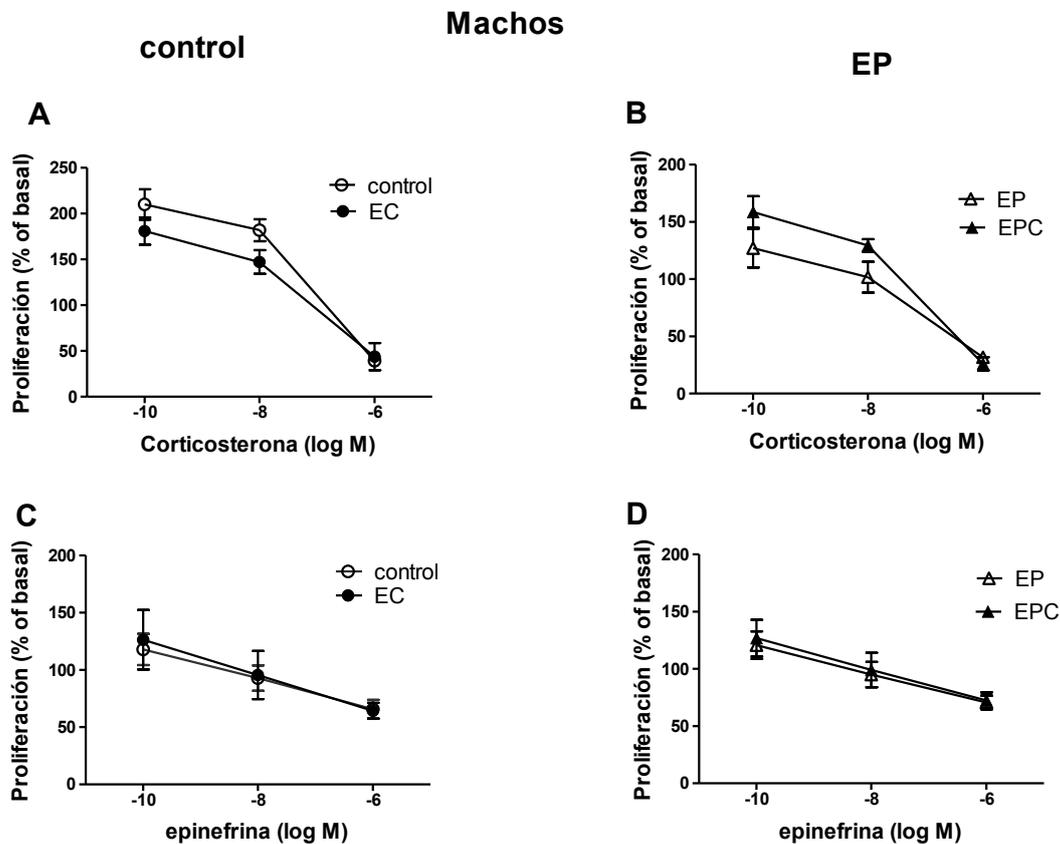


Figura 83: Efecto de corticosterona y epinefrina sobre la respuesta proliferativa de linfocitos T inducida por Concanavalina A en machos

Linfocitos provenientes de ganglios linfáticos estimuladas con Con A (1ug/ml) fueron co-incubadas con concentraciones crecientes de corticosterona (A y B) o epinefrina (C y D). Se determinó la proliferación celular por incorporación de ^3H -timidina. Los resultados se expresan como porcentaje de proliferación en ausencia de corticosterona (proliferación basal). Los datos representan la media \pm ES de 5 experimentos independientes realizados con dos animales de cada grupo.

4-11-4. Niveles del receptor para glucocorticoides (GR) y del receptor β_2 – adrenérgico

En las hembras se observó un aumento de los niveles de ARNm del receptor de glucocorticoides en animales control expuestos a estrés crónico (EC) no se observó un

aumento adicional en los animales EP expuestos a estrés crónico (EPC) [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,20)= 5,88$, $p<0,05$; efectos simples, exposición a estrés crónico: Control: $F(1,20)= 10,20$, $p<0,05$; EP: $F(1,20)= 0,02$, NS] (Figura 84 A).

Se observó además un aumento en los niveles proteicos del receptor de glucocorticoides tanto en hembras control como EP expuestos a estrés crónico en adultez, siendo este aumento mayor en animales control [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,20)= 3,74$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,20)= 0,92$, NS, postnatal $F(1,20)= 34,98$, $p<0,001$] (Figura 84 B).

No se encontraron diferencias en los niveles de ARNm [ANOVA de dos vías; Interacción prenatal x postnatal: $F(1,20)= 0,46$, NS; efectos principales: prenatal $F(1,20)= 0,06$, NS; postnatal $F(1,20)= 0,01$, NS] ni de proteínas del receptor β -adrenérgico en los grupos estudiados [ANOVA de dos vías: interacción prenatal x postnatal: $F(1,20)=0,23$, NS; efectos principales, prenatal $F(1,20)=0,01$, NS, postnatal: $F(1,20)= 0,14$ NS] (Figura 84 C y D).

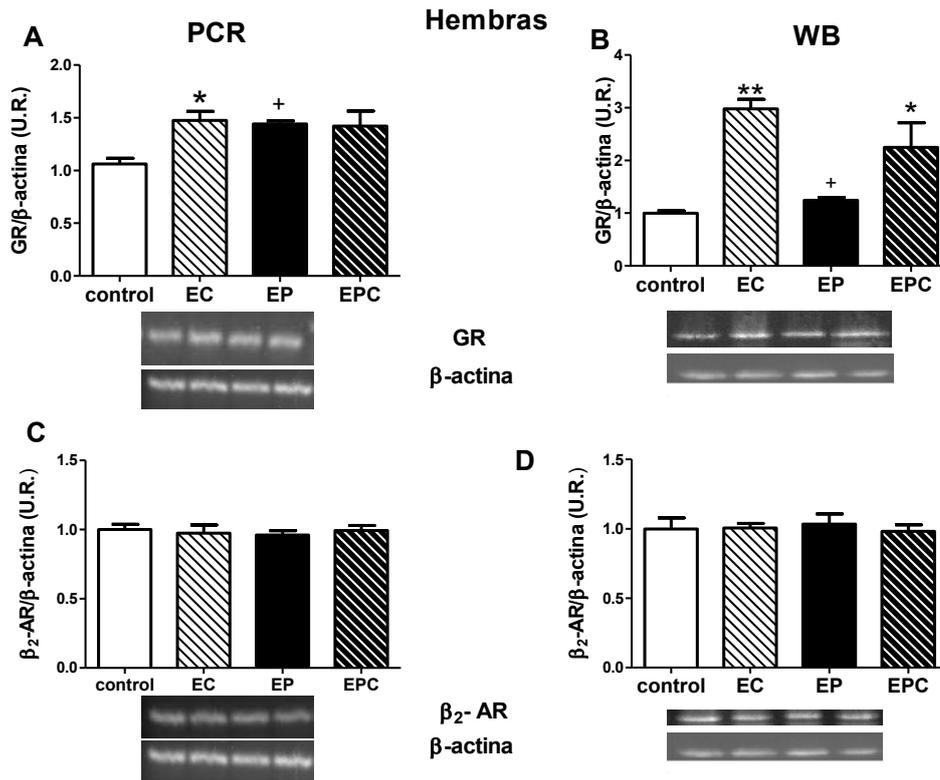


Figura 84: Niveles de ARNm y proteínas del receptor de glucocorticoides y del receptor β_2 -adrenergico en ganglio de hembras.

PCR (A y C) y Western blot (B y D) de homogenatos de ganglios linfáticos provenientes de los distintos grupos experimentales. El grafico muestra la media \pm SEM de la Intensidad relativa de cada receptor con respecto a la intensidad de β -actina, n=6 por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ con relación al correspondiente grupo sin estrés crónico, + $p < 0,05$ en relación al grupo control.

En los machos, no se encontraron diferencias en los niveles de ARNm del receptor de glucocorticoides en ninguno de los grupos experimentales. [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,20) = 0,533$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,20) = 0,343$, NS, postnatal: $F(1,20) = 0,514$, NS] (Figura 85 A).

Pero si se observó un aumento en los niveles proteicos de GR en animales control expuestos a estrés crónico, no observándose un aumento adicional en animales EP expuestos a estrés crónico (EPC) [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,20) = 6,31$, $p < 0,05$; efectos simples, exposición a estrés crónico: Control: $F(1,20) = 22,69$, $p < 0,001$; EP: $F(1,20) = 1,50$, NS] (Figura 85 B).

No se encontraron diferencias en los niveles de ARNm [ANOVA de dos vías: interacción prenatal x postnatal: $F(1,20) = 0,07$, NS; efectos principales; prenatal $F(1,20) = 1,38$, NS; postnatal $F(1,20) = 0,56$, NS] ni de proteínas del receptor β -

adrenérgico en los grupos estudiados [interacción prenatal x postnatal: $F(1,20)= 0,16$, NS; prenatal: $F(1,20)= 4,58$, NS; postnatal $F(1,20)= 1,64$, NS] (Figura 85 C y D).

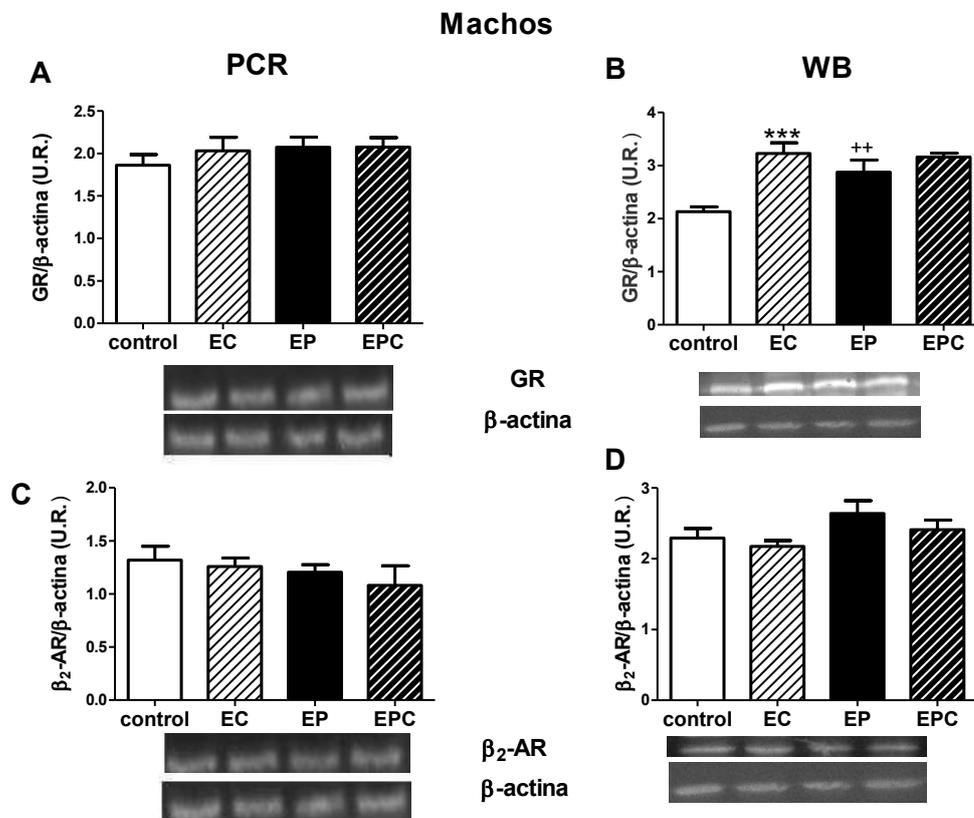


Figura 85: Niveles de ARNm y proteínas del receptor de glucocorticoides y del receptor β_2 -adrenérgico en ganglios de Machos.

PCR (A y B) y WB (C y D) de homogenatos de ganglios linfáticos provenientes de machos de los distintos grupos experimentales. El gráfico muestra la media \pm SEM de la intensidad relativa de cada receptor con respecto a la intensidad de β -actina. $n=5$. ++ $p < 0,01$ con respecto a control; *** $p < 0,001$ con respecto al grupo sin estrés crónico.

4-12. Expresión de neurotrofinas en ganglios linfáticos

En cuanto a la expresión de las NTs en ganglio en las hembras, puede verse en la figura 86 A que las hembras control expuestas a estrés crónico mostraron una disminución de los niveles de ARNm de BDNF en comparación con las no expuestas. Sin embargo, las hembras EP no mostraron una disminución adicional al exponerlas a estrés crónico [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,20)= 93,23$, $p < 0,001$; efectos simples, exposición a estrés crónico: control: $F(1,20)= 224,00$,

$p < 0,001$; EP: $F(1,20) = 1,00$, NS]. Resultados similares se encontraron en los niveles de proteínas [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,20) = 21,12$, $p < 0,001$; efectos simples (exposición a estrés crónico): control: $F(1,20) = 42,29$, $p < 0,001$; EP: $F(1,20) = 0,02$, NS] (Figura 86 B).

En las hembras control expuestas a estrés crónico se observó, además, una disminución de los niveles de ARNm de NT3 en comparación con las hembras no expuestas. Sin embargo no se observó una disminución adicional de los niveles de este ARNm en animales EP estresados crónicamente en comparación con los no estresados [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,20) = 11,61$, $p < 0,01$; efectos simples, exposición a estrés crónico, control: $F(1,20) = 30,60$, $p < 0,001$; EP: $F(1,20) = 0,6$, NS] (Figura 86 C). Resultados similares se encontraron en los niveles proteicos de NT3 [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,20) = 43,95$, $p < 0,001$; efectos simples, exposición a estrés crónico: control: $F(1,20) = 83,25$ $p < 0,001$; EP: $F(1,20) = 0,13$, NS] (Figura 86 D).

Tanto para animales control como para animales EP expuestos a estrés crónico no se observaron diferencias en los niveles de ARNm y de proteína de NGF en comparación con sus controles no estresados [ANOVA de dos vías; PCR: interacción prenatal x postnatal: $F(1,20) = 1,73$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,20) = 2,02$, NS; postnatal: $F(1,20) = 1,13$, NS. WB: interacción prenatal x postnatal: $F(1,20) = 0,01$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,20) = 0,87$, NS; postnatal: $F(20,1) = 0,23$, NS] (Figura 86 E y F).

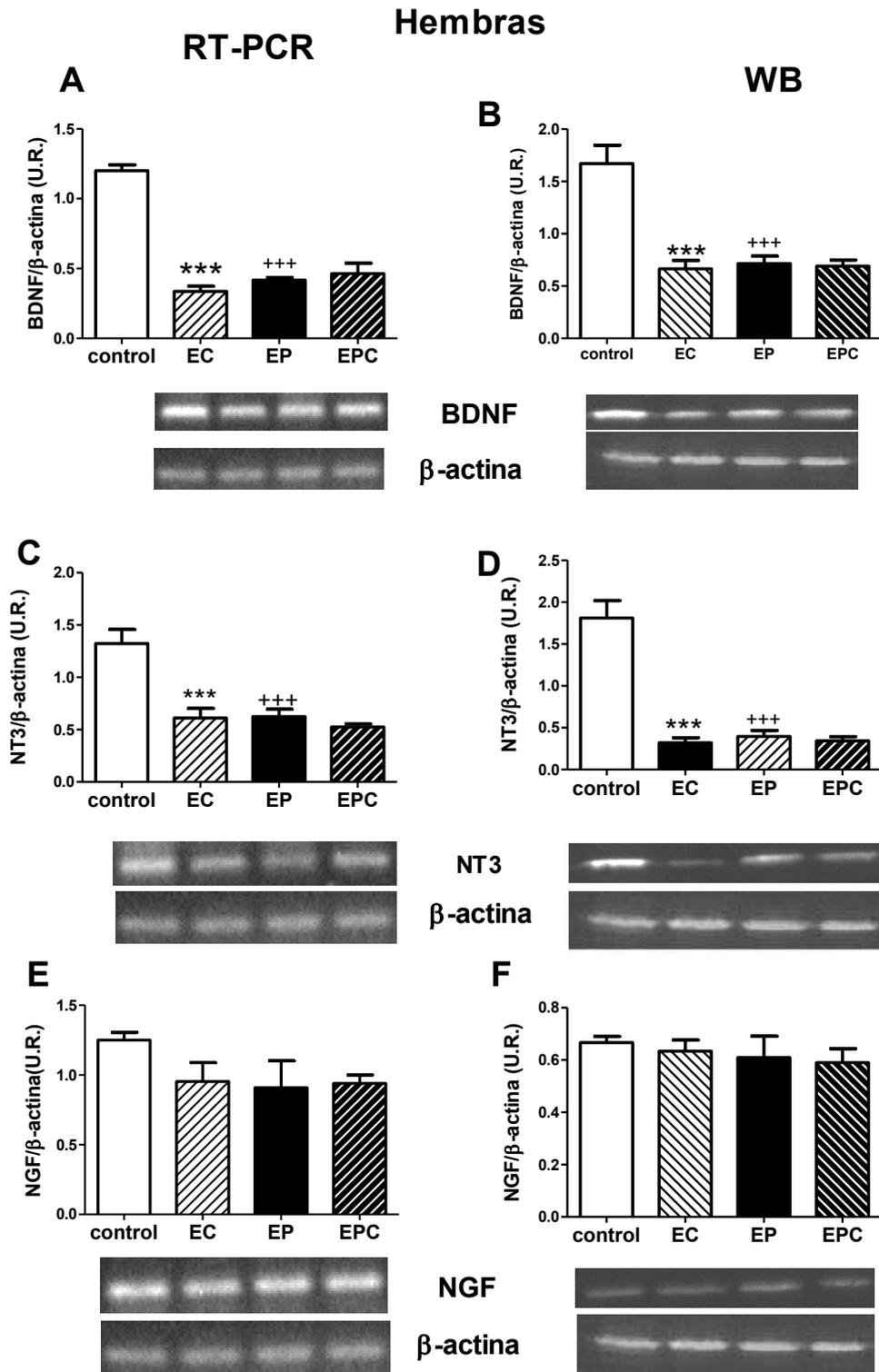


Figura 86: Expresión de neurotrofinas en ganglios de Hembras.

Se realizó RT-PCR y WB para BDNF (A y B), NT3 (C y D) y NGF (E y F). Los datos se expresan en relación a los niveles de actina. Los resultados expresan la media \pm ES, $n=6$ por grupo; *** $p<0,001$ con respecto al grupo sin estresar. +++ $p<0,001$ con respecto al animal control.

En los machos no se encontraron diferencias en los niveles de ARNm de BDNF, NT3 y NGF en ninguno de los grupos estudiados [ANOVA de dos vías; BDNF-PCR: interacción prenatal x postnatal: $F(1,20)= 2,18$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,20)= 0,25$, NS; postnatal $F(1,20)= 0,91$, NS. NT3- PCR: interacción prenatal x postnatal: $F(1,20)= 2,53$, NS; efectos principales: prenatal: $F(1,20)= 0,3$, NS, postnatal: $F(1,20)= 1,37$, NS. NGF-PCR: interacción prenatal x postnatal: $F(1,20)= 3,54$, NS; efectos principales: prenatal: $F(1,20)= 0,24$, NS; postnatal $F(1,20)= 1,57$, NS] (Figura 87 A, C y E).

Tampoco se observaron diferencias en los niveles proteicos de las neurotrofinas estudiadas [ANOVA de dos vías; BDNF-WB: interacción prenatal x postnatal: $F(1,12)=1,99$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,12)= 0,17$, NS; postnatal: $F(1,12)= 0,16$, NS. NT3-WB: interacción prenatal x postnatal: $F(1,12)= 0,002$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,12)= 0,02$, NS; postnatal $F(1,12)=0,54$, NS. NGF-WB: interacción prenatal x postnatal: $F(1,12)= 2,22$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,12)= 0,08$, NS; postnatal $F(1,12)= 0,45$, NS] (Figura 87 B, D y F).

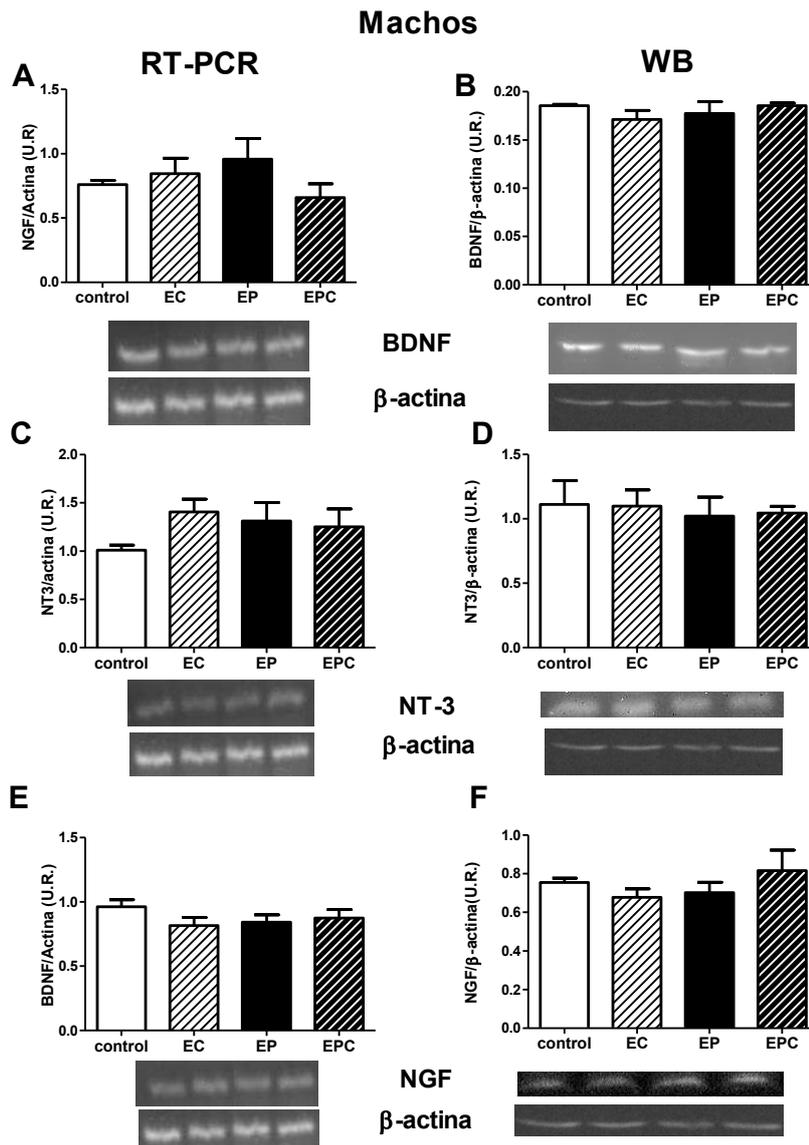


Figura 87: Expresión de neurotrofinas en ganglios de Machos.

Se realizó RT-PCR y WB para BDNF (A y B), NT3 (C y D) y NGF (E y F). Los datos se expresan en relación a los niveles de actina. Los resultados expresan la media \pm ES, n entre 4 y 6 por grupo; * $p < 0,05$; con respecto a su control sin estresar.

4-13. Efectos del EP sobre el comportamiento en animales expuestos a estrés crónico. Análisis de genes relacionados

4-13-1. Pruebas conductuales

4-13-1-1. Prueba de alternancia

Se realizó la prueba de alternancia como se describió previamente. Las hembras EP expuestas a estrés crónico mostraron una disminución en el porcentaje de alternancia en comparación con las no expuestas, mientras que en las hembras controles expuestas a estrés crónico en la adultez no se observaron cambios en la alternancia en comparación con las no expuestas a estrés crónico [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,28) = 8,07$, $p < 0,01$; efectos simples, exposición a estrés crónico: control: $F(1,28) = 2,40$, NS; EP: $F(1,28) = 31$, $p < 0,001$] (figura 86 A).

En machos no se encontraron diferencias en el porcentaje de alternancias en ninguno de los grupos experimentales [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,28) = 0,02$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,28) = 0,08$, NS; postnatal: $F(1,28) = 1,12$, NS] (Figura 88 B).

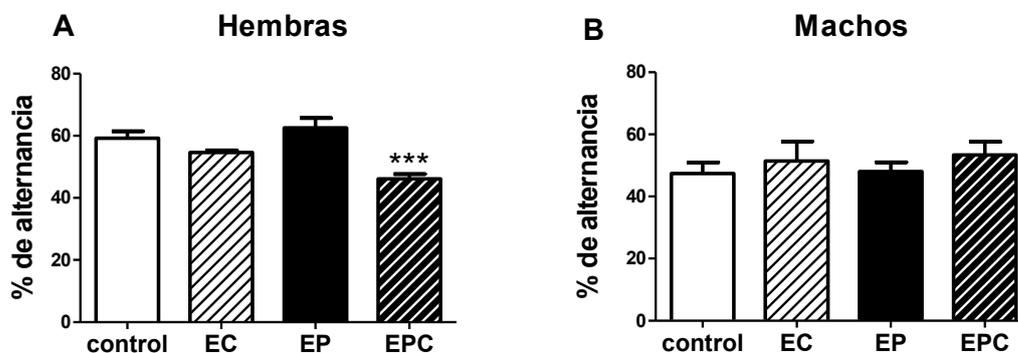


Figura 88: Prueba de alternancia

Se colocaron los animales de a uno por vez en el centro del laberinto en Y. Se registraron las entradas a los distintos brazos por 6 minutos y se determinó el porcentaje de alternancia. Los resultados expresan la media \pm ES, $n=8$. * $p < 0,05$ con respecto a su control sin EC.

4-13-1-2. Actividad locomotora en campo abierto

En las hembras se observó que los animales EP expuestos a estrés crónico (EPC) mostraron un aumento en el número de líneas cruzadas en comparación con animales EP no expuestos a estrés crónico (EP), lo que no se observó para animales control (EC) [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,28)= 8,67$, $p<0,01$; efectos simples (exposición a estrés crónico): control: $F(1,28)= 0,50$, NS; EP: $F(1,28)= 23,72$, $p<0,001$] (Figura 89 A).

Las exploraciones verticales fueron mayores tanto en animales control expuestos a estrés crónico (EC) como en animales EP expuestos a estrés crónico (EPC) en comparación con animales no estresados. Siendo este aumento mayor en animales EP [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,28)= 0,08$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,28)= 1,81$, NS; postnatal: $F(1,28)= 21,14$, $p<0,001$] (Figura 89 B)

Además se observó una disminución en el tiempo que permanecen quietos tanto en animales control expuestos a estrés crónico como en animales EP expuestos a estrés crónico. [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,28)= 0,51$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,28)= 0,66$, NS; postnatal: $F(1,28)= 37,52$, $p<0,001$] (Figura 89 C).

Estos resultados indican que la exposición a estrés crónico produce en los animales EP aumento en la actividad locomotora tanto horizontal como vertical.

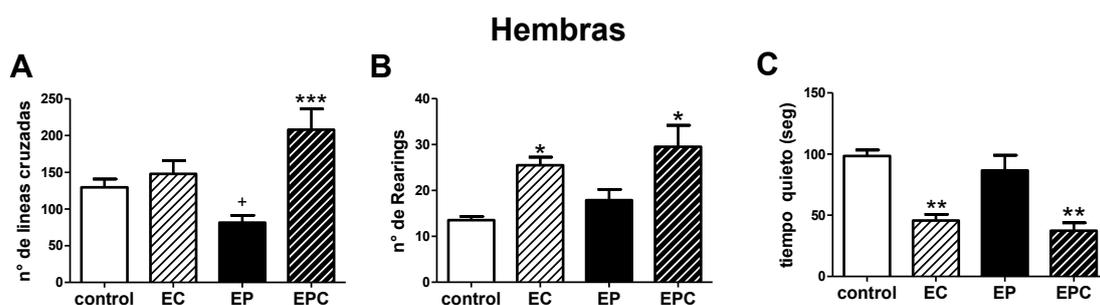


Figura 89: actividad locomotora en Hembras.

Se colocó el animal en un campo abierto y se lo dejó explorar libremente durante 5 minutos. Se grafica el número de líneas cruzadas (A), el número de rearings (B) y el tiempo que permanece quieto (C). Los resultados expresan la media \pm ES, $n=8$ por grupo. * $p<0,05$, *** $p<0,001$ con respecto a su correspondiente control sin EC + $p<0,05$ con respecto al animal control.

Para los machos no se observaron diferencias en ninguno de los parámetros estudiados entre los grupos en estudio [ANOVA de dos vías; líneas: interacción prenatal x postnatal: $F(1,28)= 1,52$, NS; efectos principales, prenatal $F(1,28)= 0,01$, NS; postnatal: $F(1,28)= 1,42$, NS. Rearings: interacción prenatal x postnatal: $F(1,28)= 0,83$, NS; efectos principales, prenatal $F(1,28)=1,84$, NS; postnatal: $F(1,28)= 2,27$, NS. Tiempo: interacción prenatal x postnatal: $F(1,28)= 1,18$, NS; efectos principales: prenatal $F(1,28)= 2,95$, NS; postnatal: $F(1,28)= 3,01$, NS] (Figura 90)

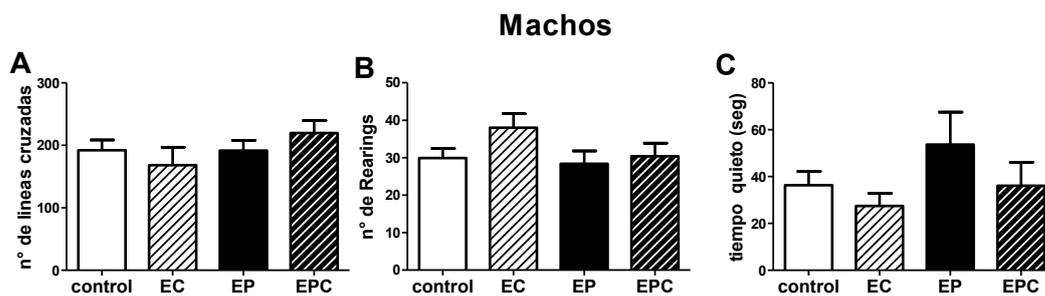


Figura 90: actividad locomotora en Machos.

Se colocó el animal en un campo abierto y se lo dejó explorar libremente durante 5 minutos. Se grafica el número de líneas cruzadas (A), el número de rearings (B) y el tiempo que permanece quieto (C) Los resultados expresan la media \pm ES, $n=8$ por grupo. * $p<0,05$, *** $p<0,001$ con respecto a su correspondiente control sin EC. + $p< 0,05$ con respecto al animal control.

4-13-1-3. Prueba de habituación

Como se describió previamente la prueba de habituación permite evaluar la memoria no asociativa. Se sometieron a la prueba de campo abierto animales control y EP, expuestos o no a estrés crónico.

Se observó que, tanto las hembras control expuestas a estrés crónico como las hembras EP expuestas a estrés crónico, no mostraron diferencias significativas en el número de líneas cruzadas entre la fase de entrenamiento y la fase de testeo, como si se observó para los animales no expuestos a estrés crónico [ANOVA con medidas repetidas: interacción $F(3,28)=2,21$, NS; efectos principales: tiempo: $F(1,28)= 6,32$, $p<0,05$; estrés: $F(3,28)= 5,45$, $p<0,05$] (Figura 91A).

Además tanto los animales control estresados crónicamente como los EP estresados prenatalmente no mostraron una disminución en las exploraciones verticales en la fase de testeo en comparación con el entrenamiento, como sucedió en animales no

estresados crónicamente. En cambio los animales EP expuestos a estrés crónico mostraron una disminución significativa de las exploraciones verticales, no así los animales EP no estresados [ANOVA con medidas repetidas: interacción: $F(3,28)=0,55$, NS; Efectos principales: tiempo: $F(1,28)=5,32$ $p<0,05$; estrés $F(3,28)=5,32$ $p<0,05$] (Figura 91 B).

Tanto los animales control como los EP expuestos a estrés crónico mostraron un aumento en el tiempo que permanecen quietos al igual que los animales no expuestos a estrés crónico. [ANOVA con medidas repetidas: interacción: $F(3,28)=0,04$ NS; Efectos principales: tiempo: $F(28,1)=20,32$, $p<0,001$; estrés: $F(3,28)=1,02$ NS] (Figura 91 C).

Por la tanto tanto las hembras control como EP mostraron un peor desempeño en la prueba de habituación cuando fueron expuestas a estrés crónico en la adultez.

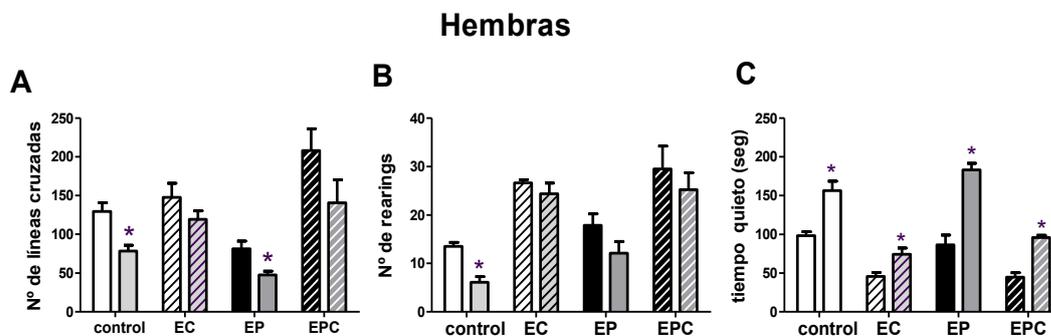


Figura 91: Prueba de Habitación en Hembras.

Se grafica el número de líneas cruzadas (A), el número de rearings (B) y el tiempo que permanece quieto (C) para el entrenamiento y para el testeo a las 24 horas. Los resultados expresan la media \pm ES, $n=8$ por grupo. * $p<0,05$ respecto a la fase de entrenamiento.

Por otra parte, no se encontraron diferencias ni en el número de líneas cruzadas ni en las exploraciones verticales en la fase de testeo en comparación con la fase de entrenamiento ni en machos control expuestos a estrés crónico ni en machos EP expuestos a estrés crónico. Como se mostró previamente los machos EP no expuestos a estrés crónico mostraron una disminución en estos parámetros, no así los animales control [ANOVA con medidas repetidas; Líneas: interacción $F(3,28)=2,23$ NS; efectos principales: tiempo: $F(1,28)=5,15$, $p<0,05$; estrés: $F(3,28)=5,23$ $p<0,05$. Rearings: Interacción $F(3,28)=1,56$, NS; efectos principales: tiempo: $F(1,28)=17,7$ $p<0,001$; estrés: $F(3,28)=7,5$ $p<0,01$] (Figura 92 A y B). En ninguno de los grupos estudiados se encontraron diferencias en el tiempo que permanecen quietos [ANOVA

de medidas repetidas: Interacción: $F(3,28)= 0,87$, NS; efectos principales: tiempo $F(1,28)= 1,83$, NS; estrés: $F(3,28)=2,12$ NS] (Figura 92 C).

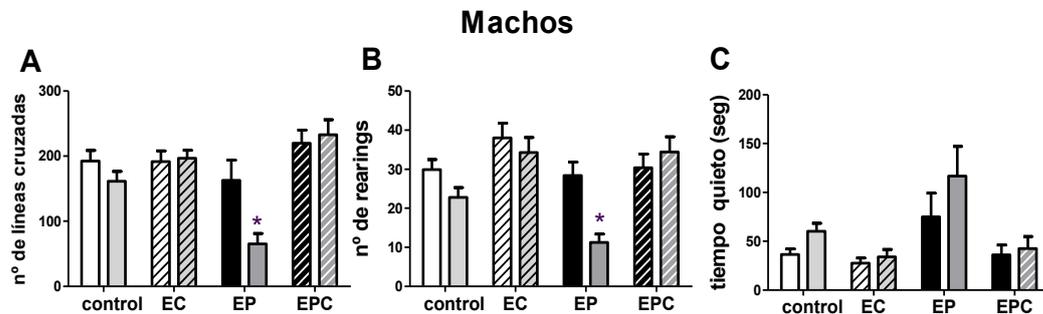


Figura 92: Prueba de Habitación en Machos.

Se grafica el número de líneas cruzadas (A), el número de rearings (B) y el tiempo que permanece quieto (C) para el entrenamiento y para el testeo a las 24 horas. Los resultados expresan la media \pm ES, $n= 8$ por grupo. * $p<0,05$ respecto a la fase de entrenamiento.

4-13-1-4. Prueba de ansiedad. Laberinto elevado en cruz

En las hembras control expuestas a estrés crónico se observó una disminución del tiempo que permanecen en los brazos abiertos en comparación con los controles no expuestos, lo que evidenciaría un comportamiento de tipo ansioso. En cambio en animales EP expuestos a estrés crónico se observó un aumento en el tiempo que permanece en los brazos abiertos en comparación con los no expuestos a estrés crónico, lo que evidenciaría una disminución en la ansiedad en estos animales [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,36)= 21,39$, $p<0,001$; efectos simples, exposición a estrés crónico: controles $F(1,36)= 5,34$, $p<0,05$; EP: $F(1,36)= 17,9$, $p<0,01$] (Figura 93 A).

Los machos controles expuestos a estrés crónico mostraron un aumento en el tiempo que permanecen en los brazos abiertos en comparación con los controles no expuestos. En cambio los machos EP expuestos a estrés crónico no mostraron cambios [ANOVA de dos vías: interacción prenatal x postnatal; $F(1,36)= 11,16$ $p<0,01$; efectos simples, exposición a estrés crónico: controles $F(1,36): 14,92$, $p<0,01$; EP:

F(1,36): 0,74, NS] (Figura 93 B). Por lo tanto los machos EC mostrarían una disminución en la ansiedad, que no se evidencia en los machos EPC.

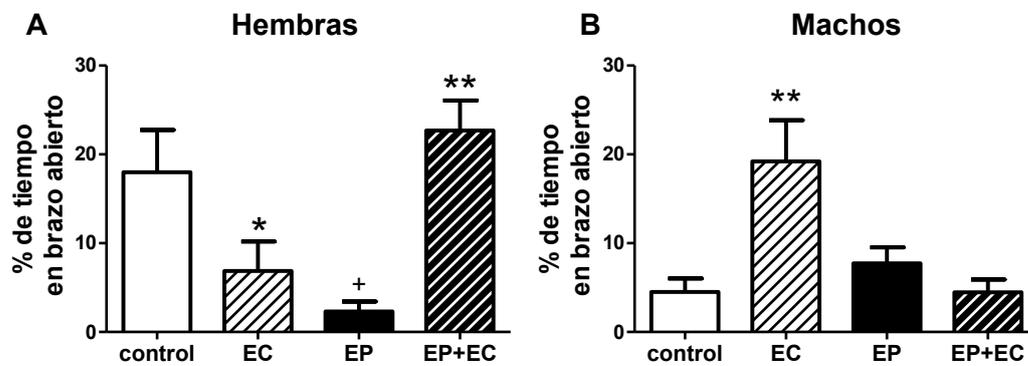


Figura 93: Laberinto elevado en cruz.

Se colocó al animal en el centro de un laberinto elevado en cruz y se lo deja explorar por 5 minutos. Se grafica porcentaje de tiempo en brazo abierto con respecto al tiempo total de actividad expresado como la media \pm ES para Hembras (A) y Machos (B), n=10 animales por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ con respecto a su correspondiente control sin estrés en la adultez.

4-13-1-5. Prueba de evitación pasiva

Como se ve en figura 94, tanto en machos como en hembras, se observó un aumento en la latencia a entrar al compartimento oscuro en la fase de testeo en comparación con el entrenamiento, sin observarse cambios entre los grupos experimentales [Prueba de Kruskal Wallis: Hembras $H(8) = 50,77$, $p < 0,001$; Macho $H(8) = 49,35$, $p < 0,001$].

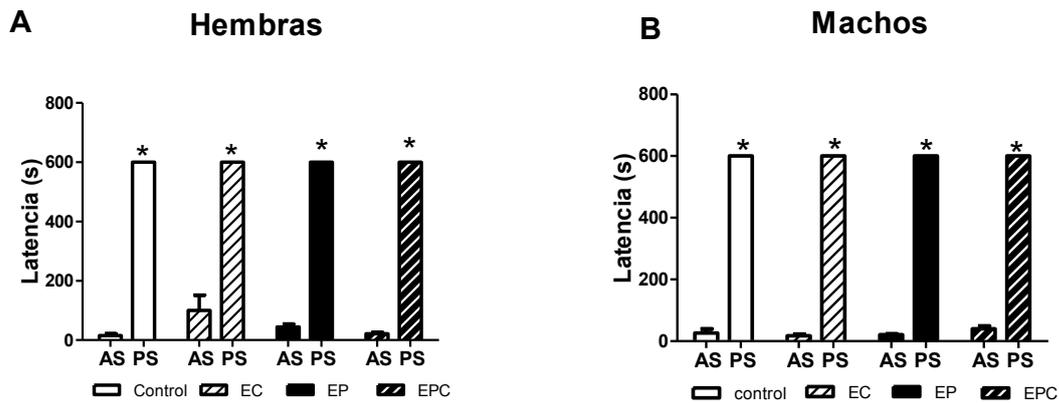


Figura 94: Prueba de evitación pasiva.

Los animales fueron puestos en una cámara iluminada y se registró el tiempo de entrada a la cámara oscura. En todos los casos el máximo registrado fue de 10 minutos. Se grafica la media \pm SEM de la latencia a entrar al compartimiento oscuro en el entrenamiento (antes del shock) y en el testeo a las 24 hs de hembras (A) y machos (B), $n=8$ por grupo. AS: antes del shock; PS: post shock (testeo). * $p < 0,05$ con respecto al entrenamiento.

4-13-1-6. Reconocimiento de objetos

Como ya se mencionó, esta prueba evalúa la memoria de reconocimiento. En condiciones normales un ratón va a pasar más tiempo explorando un objeto novedoso que un objeto ya conocido.

En todos los grupos estudiados se observó un aumento en el tiempo de exploración del objeto novedoso, no se encontraron diferencias en el índice de discriminación entre los grupos en estudios tanto en machos como en hembras [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,28)=0,02$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,28)=0,10$, NS; postnatal: $F(1,28)=0,05$, NS] como para machos [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,28)=0,02$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,28)=0,22$, NS; postnatal: $F(1,28)=0,04$, NS] (Figura 95).

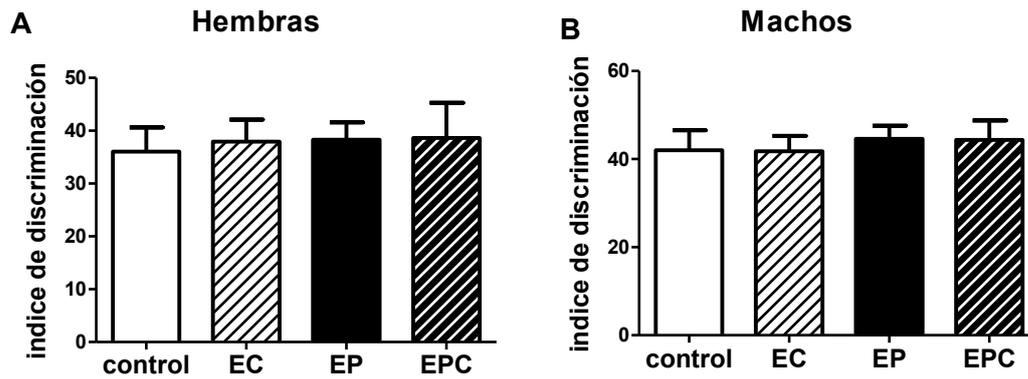


Figura 95: Prueba de reconocimiento de objetos.

Se colocó al animal en un campo abierto con dos objetos iguales y se los dejó explorar libremente por 5 min. Luego de una hora se los expuso nuevamente al campo abierto cambiando uno de los objetos por otro de igual índice de preferencia (previamente testeado). Se grafica la media \pm ES del índice de discriminación para Hembras (A) y Machos (B), $n=8$ por grupo.

4-13-1-7. Reconocimiento espacial de objetos

Como ya se mencionó, este tipo de prueba permite evaluar la memoria espacial a corto plazo.

En las hembras control expuestas a estrés crónico se observó una disminución en el índice de discriminación con respecto a las no expuestas. Las hembras EP expuestas a estrés crónico no pudieron discriminar entre los objetos fijos y los que se movieron, al igual que las no expuestas a estrés crónico [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,16)= 2,38$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,16)= 36,60$, $p<0,001$; postnatal: $F(1,16)= 5,31$, $p<0,05$] (figura 96 A).

En los machos todos los grupos pasaron más tiempo explorando la posición novedosa, no se encontraron diferencias en el índice de discriminación entre los grupos estudiados [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,14)= 0,60$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,14)= 0,40$, NS; postnatal: $F(1,14)= 0,41$, NS] (figura 96 B)

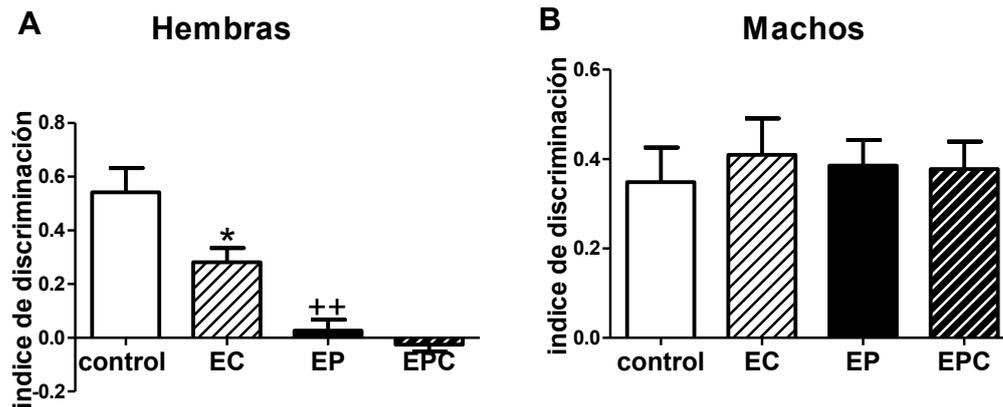


Figura 96: Prueba de reconocimiento espacial de objetos.

Se colocó al animal en un campo abierto con 4 objetos y se lo dejó explorar libremente por 10 min. Luego de una hora se lo expuso nuevamente al campo abierto intercambiando de lugar dos de los objetos. El gráfico muestra la capacidad de discriminación de los objetos cambiados de posición respecto a los no cambiados. Se graficó el promedio \pm ES del índice de discriminación, para hembras (A) y machos (B), $n=5$ por grupo. * $p<0,05$ con respecto al animal sin EC. ++ $p<0,01$ con respecto al control.

4-13-2. Expresión de neurotrofinas en hipocampo

Se determinó la expresión de BDNF, NGF y NT3 en hipocampo de machos y hembras mediante RT-PCR y western blot.

En las hembras se observó una disminución significativa en los niveles de ARNm de BDNF en animales control expuestos a estrés crónico no observándose una disminución adicional en los animales EP expuestos a estrés crónico (EPC) en comparación con los no estresados [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,12)= 10,31$, $p<0,01$; efectos simples, exposición a estrés crónico: control: $F(1,12)= 13$, $p<0,01$; EP: $F(1,12)= 0,02$, NS]. Un resultado similar se encontró en los niveles proteicos de BDNF [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,12)= 11,51$, $p<0,01$; efectos simples, exposición a estrés crónico: control: $F(1,12)= 30$, $p<0,001$, EP: $F(1,12)= 0,08$, NS] (Figura 97 A y B)

Tanto para animales control como para animales EP expuestos a estrés crónico no se encontraron diferencias significativas en los niveles de ARNm y proteínas de NT3 (Figura 97 C y D) y NGF (Figura 97 E y F) en el hipocampo, en comparación con animales no expuestos a estrés crónico. [ANOVA de dos vías: NT3- PCR: interacción prenatal x postnatal: $F(1,12)= 0,73$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,12)= 0,31$, NS; postnatal $F(1,12)= 0,04$, NS. NT3-WB: interacción prenatal x postnatal: $F(1,12)=$

2,03, NS; efectos principales: prenatal: $F(1,12)=0,01$, NS; postnatal $F(1,12)=1,01$, NS. NGF-PCR: interacción prenatal x postnatal: $F(1,12)=1,03$, NS; efectos principales: prenatal: $F(1,12)=0,35$, NS; postnatal $F(1,12)=0,76$, NS. NGF-WB: interacción prenatal x postnatal: $F(1,12)=0,11$, NS; efectos principales: prenatal: $F(1,12)=0,01$, NS, postnatal $F(1,12)=0,02$, NS].

En los machos no se obtuvieron diferencias en los niveles de ARNm de BDNF, NT3 y NGF en ninguno de los grupos estudiados [ANOVA de dos vías: BDNF-PCR: interacción prenatal x postnatal: $F(1,20)=0,81$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,20)=0,10$, NS; postnatal $F(1,20)=0,03$, NS. NT3- PCR: interacción prenatal x postnatal: $F(1,20)=0,09$, NS; efectos principales: prenatal: $F(1,20)=0,06$, NS, postnatal: $F(1,20)=0,01$, NS. NGF-PCR: interacción prenatal x postnatal: $F(1,20)=0,003$, NS; efectos principales: prenatal: $F(1,20)=0,01$, NS; postnatal $F(1,20)=0,001$ NS] (Figura 98 A, C y E).

Tampoco se vieron diferencias en los niveles proteicos de las neurotrofinas estudiadas [ANOVA de dos vías; BDNF-WB: interacción prenatal x postnatal: $F(1,12)=0,2$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,12)=0,24$, NS; postnatal $F(1,12)=0,33$, NS. NT3-WB: interacción prenatal x postnatal: $F(1,12)=0,12$, NS; efectos principales: prenatal: $F(1,12)=0,10$, NS; postnatal $F(1,12)=0,31$, NS. NGF-WB: interacción prenatal x postnatal: $F(1,12)=0,001$, NS; efectos principales: prenatal: $F(1,12)=0,06$, NS; postnatal $F(1,12)=0,27$, NS] (Figura 98 B, D y F).

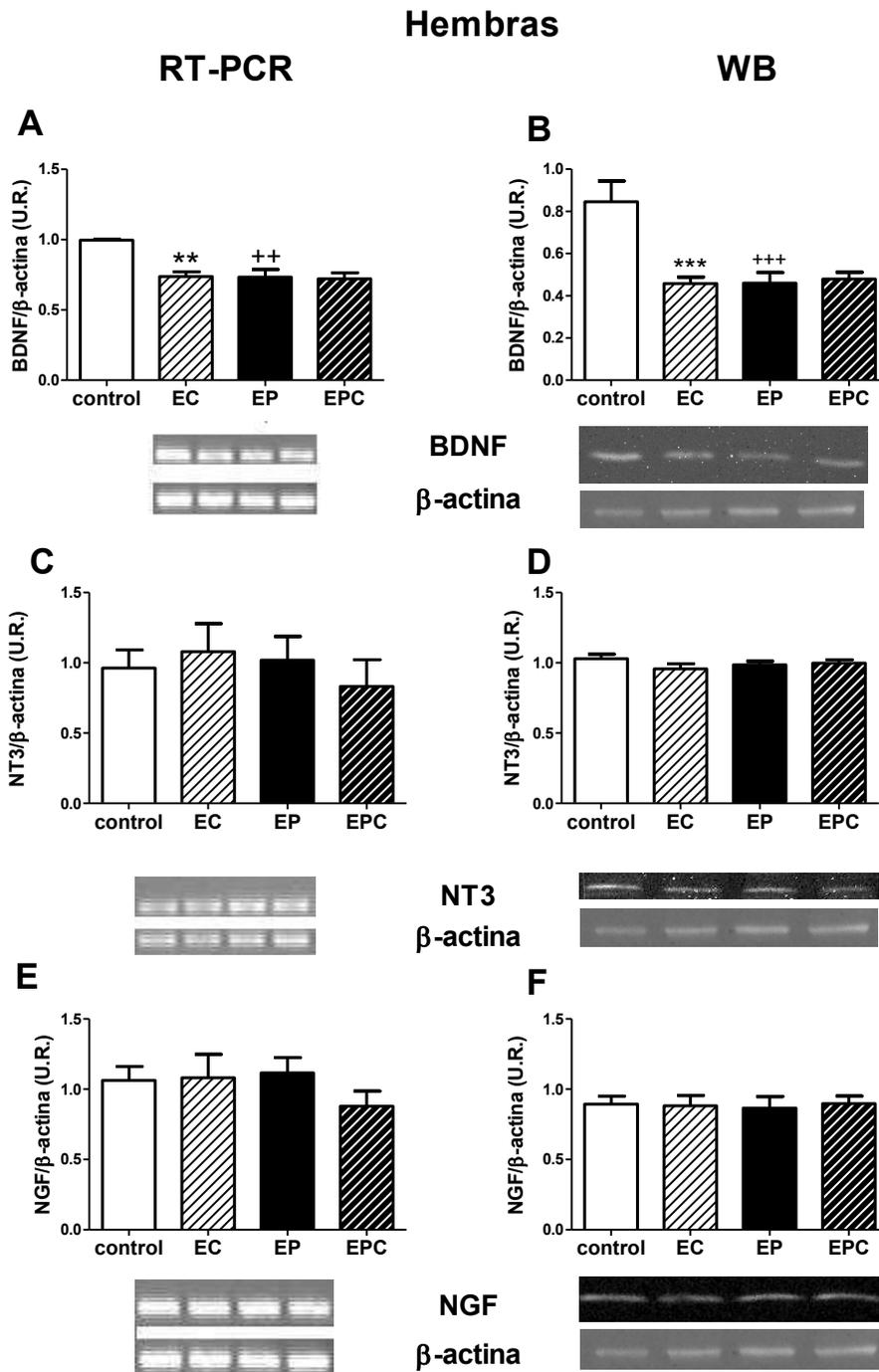


Figura 97: Expresión de neurotrofinas en Hipocampo de hembras.

Se realizó RT-PCR y WB para BDNF (A y B), NT3 (C y D) y NGF (E y F). Los datos se expresan en relación a los niveles de de actina. Los resultados expresan la media \pm ES de 4 muestras cada uno. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ en relación al correspondiente grupo sin estrés crónico; ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ con respecto al animal control.

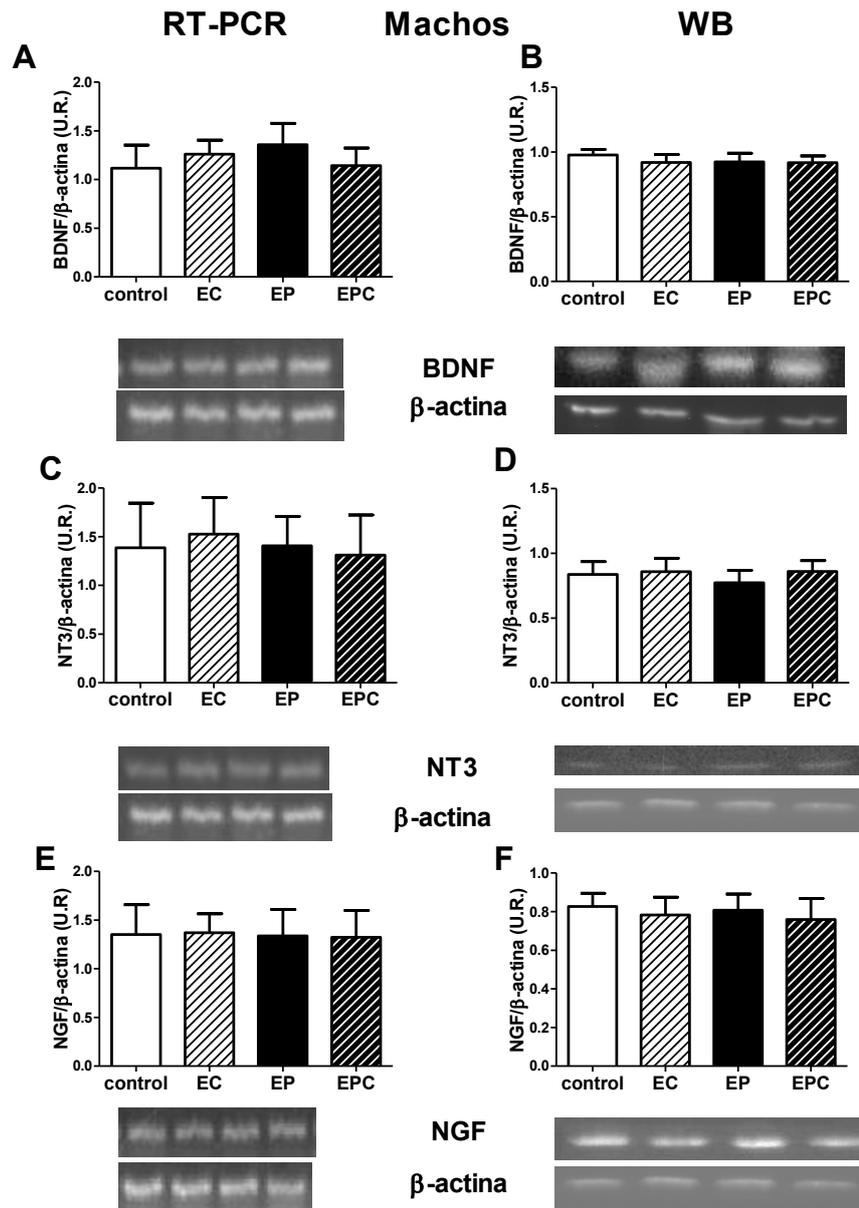


Figura 98: Expresión de neurotrofinas en hipocampo de machos.

Se realizó RT-PCR y WB para BDNF (A y B) NT3 (C y D) y NGF (E y F). Los datos se expresan en relación a los niveles de actina. Los resultados expresan la media \pm ES. PCR n=6; WB n=4.

4-13-3. Niveles del receptor para glucocorticoides (GR) y del receptor β_2 – adrenérgico

Se analizaron los niveles de ARNm y proteínas de los receptores para glucocorticoides (GR) y del receptor β_2 –adrenérgico como se describió previamente.

En las hembras se observó un aumento en los niveles de ARNm y de proteínas de GR en animales control expuestos a estrés crónico sin observarse una variación adicional en animales EP expuestos a estrés crónico (EPC) [ANOVA de dos vías; PCR: interacción prenatal x postnatal: $F(1,12)= 0,95$, NS, efectos principales, prenatal: $F(1,12)= 6,43$, $p<0,05$, postnatal $F(1,12)= 5,87$, $p<0,05$. WB: interacción prenatal x postnatal: $F(1,12)= 1,97$, NS; efectos principales: prenatal: $F(1,12)= 14,62$, $p<0,01$; postnatal $F(1,12)= 6,91$, $p<0,05$.] (Figura 99 A y B).

No se obtuvieron diferencias significativas en los niveles de ARNm y proteínas del receptor β_2 –adrenérgico [ANOVA de dos vías; PCR: interacción prenatal x postnatal: $F(1,12)= 0,17$, NS; efectos principales: prenatal: $F(1,12)= 3,43$, NS; postnatal $F(1,12)= 1,52$, NS. WB: interacción prenatal x postnatal: $F(1,12)= 0,005$, NS; efectos principales: prenatal: $F(1,12)= 3,99$, NS; postnatal $F(1,12)= 0,69$, NS] (Figura 99 C y D).

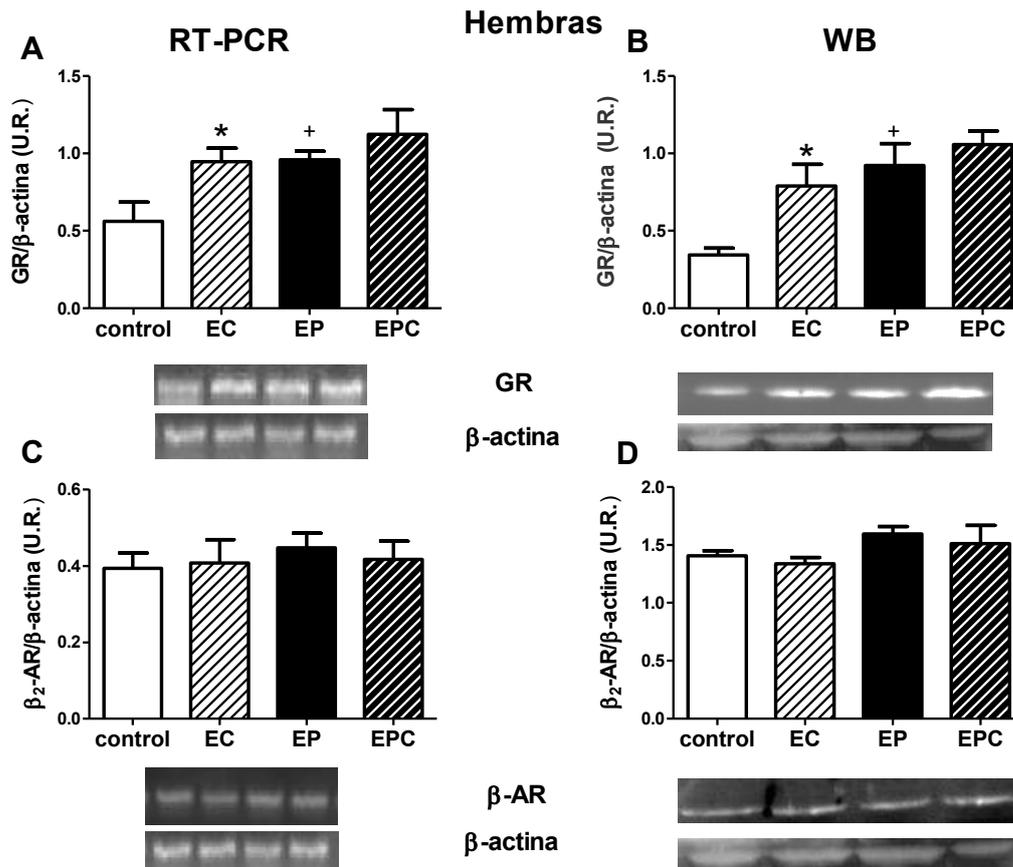


Figura 99: Niveles de ARNm y proteínas del receptor de glucocorticoides y del receptor β₂-adrenergico en hipocampos de hembras.

PCR (A y C) y WB (B y D) de homogenatos de hipocampos provenientes de hembras EP y controles expuestos a no a EC en la adultez. El grafico muestra la media ± ES de la intensidad relativa de cada receptor con respecto a la intensidad de β-actina, n=4 por grupo. * $p < 0.05$ en relación al correspondiente animal sin estrés en la adultez, + $p < 0,05$ respecto al control.

En los machos se observó un aumento en los niveles del ARNm de GR en animales control expuestos a EC en comparación con los no expuestos a EC, no se observó un cambio adicional en los animales EP expuestos a estrés crónico en la adultez [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,20) = 22,39$, $p < 0,001$; efectos simples, exposición a estrés crónico: control, $F(1,20) = 35,00$, $p < 0,001$; EP, $F(1,20) = 3$, NS] (Figura 100 A).

En cuanto a los niveles proteicos, en machos se vio un aumento en los niveles de GR en animales control expuestos a estrés crónico pero no se observaron variaciones adicionales en los niveles proteicos de GR en animales EP expuestos a estrés crónico (EPC) [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,12) = 1,74$, NS;

efectos principales, prenatal: $F(1,12)= 19,82$, $p<0,001$, postnatal $F(1,12)= 9,17$, $p<0,01$] (Figura 100 B).

Los niveles del receptor β_2 -adrenérgico no se vieron modificados en ninguno de los grupos experimentales en estudio (figura 53 C y D) [ANOVA de dos vías; PCR: interacción prenatal x postnatal: $F(1,12)= 0,16$, NS, efectos principales, prenatal: $F(1,12)= 4,21$, NS, postnatal $F(1,12)= 0,35$, NS. WB: interacción prenatal x postnatal: $F(1,12)= 0,001$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,12)= 0,96$, NS , postnatal $F(1,12)= 0,01$, NS] (Figura 100 C y D).

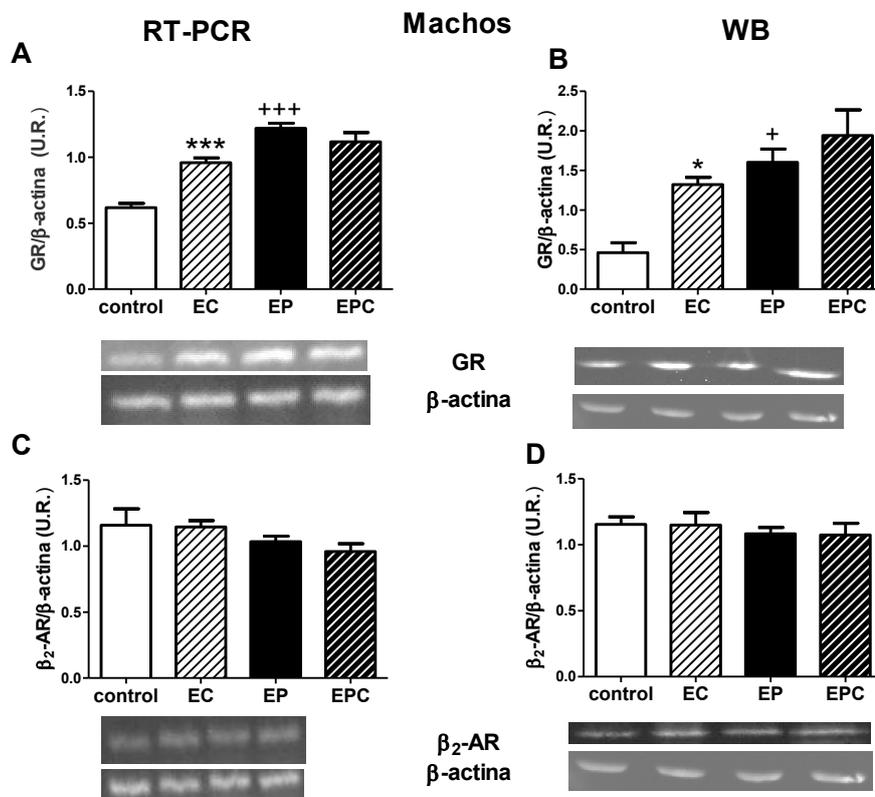


Figura 100: Niveles de ARNm y proteínas del receptor de glucocorticoides y del receptor β_2 -adrenérgico en hipocampus de machos.

PCR (A y C) y WB (B y D) de homogenatos de hipocampus provenientes de machos EP y controles expuestos a no a EC en la adultez. El grafico muestra la media \pm ES de la intensidad relativa de cada receptor con respecto a la intensidad de β -actina, $n=4$ por grupo. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ en relación al correspondiente animal sin estrés en la adultez, + $p < 0,05$ ++, $p < 0,001$ respecto al control.

4-13-4. Niveles de citoquinas en hipocampo

Se analizó la expresión de ARNm de IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10 en hipocampo provenientes de hembras (figura 99) y machos (figura 100) de las distintas condiciones experimentales, como se describió previamente.

En las hembras el estrés crónico no modificó los valores de IL-4 en animales control ni EP [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(20,1)= 0,002$, NS; efectos principales: prenatal: $F(1,20)=15,16$, $p<0,001$; postnatal $F(1,20)= 4,80$, $p<0,05$] (Figura 101 A).

Se observó además una disminución de los niveles de ARNm de IFN- γ en los animales controles expuestos a estrés crónico no siendo así en los animales EP expuestos a estrés crónico [ANOVA de dos vías: Interacción prenatal x postnatal: $F(1,20)= 7,83$, $p<0,05$; efectos simples, exposición a estrés crónico, control: $F(1,20)= 18,86$, $p<0,01$; EP: $F(1,20)= 0,14$, NS] (Figura 101 B).

También se vio una disminución del ARNm de IL-2 en los animales controles expuestos a estrés crónico no siendo así en los animales EP expuestos a estrés crónico [ANOVA de dos vías; interacción prenatal x postnatal: $F(1,20)= 5,25$, $p<0,05$; efectos simples, exposición a estrés crónico: control: $F(1,20)= 8,82$, $p<0,01$; EP: $F(1,20)= 0,07$, NS] (Figura 101 D).

No se encontraron cambios en las otras citoquinas estudiadas [ANOVA de dos vías; IL-6: interacción prenatal x postnatal: $F(1,20)= 0,61$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,20)= 0,01$, NS; postnatal $F(1,20)= 0,08$, NS. IL-10: interacción prenatal x postnatal: $F(1,20)= 0,43$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,20)= 0,01$, NS; postnatal $F(1,20)= 0,08$, NS] (Figura 101 B,C y E).

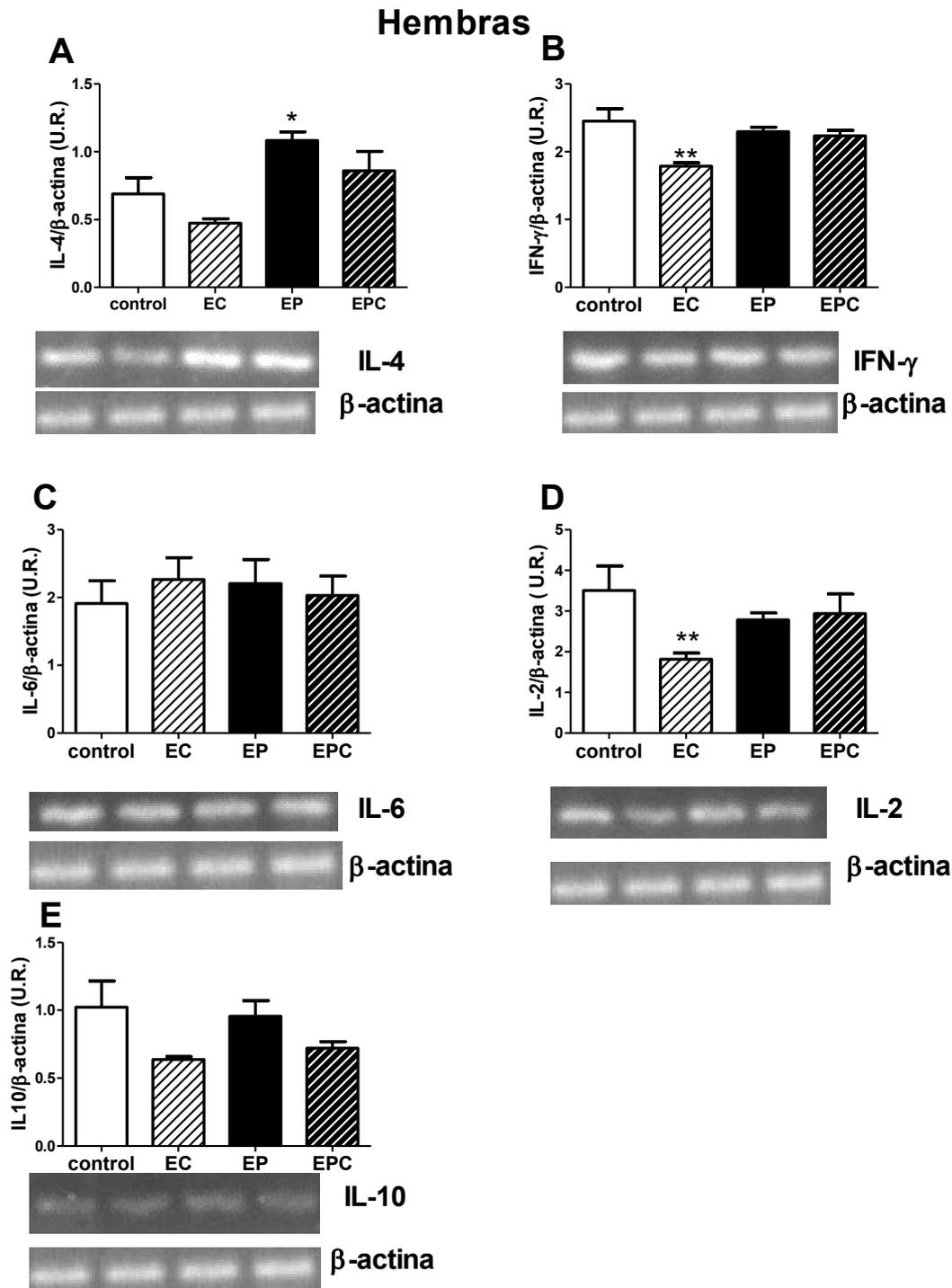


Figura 101: Niveles de citoquinas en hipocampo de hembras.

Se determinaron los niveles de ARNm para las citoquinas IL-4 (A), INF-γ (B), IL-6 (C), IL-2 (D) e IL-10 (E) por medio de RT-PCR. Los datos se expresan en relación a los niveles de ARNm de actina. Los resultados expresan la media ± ES, n=6. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

En los machos no se encontraron diferencias en los niveles de las citoquinas estudiadas. [ANOVA de dos vías; IL-4, interacción prenatal x postnatal: $F(1,16)= 0,67$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,16)= 1,20$, NS; postnatal: $F(1,16)= 5,61$, NS. IL-2, interacción prenatal x postnatal: $F(1,16)= 0,3$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,16)= 2,64$, NS; postnatal $F(1,16)= 2,37$, NS. IL-6, interacción prenatal x postnatal: $F(1,16)= 0,7$, NS; efectos principales: prenatal: $F(1,16)= 0,06$, NS; postnatal: $F(1,16)= 0,67$, NS. IL-10, interacción prenatal x postnatal: $F(1,12)= 0,36$, NS; efectos principales, prenatal: $F(1,12)= 2,56$, NS; postnatal: $F(1,12)= 2,54$, NS] (Figura 102) No se pudieron determinar los niveles de IFN- γ debido posiblemente a condiciones experimentales y/o de expresión de esta citoquina en los hipocampos de los machos.

Machos

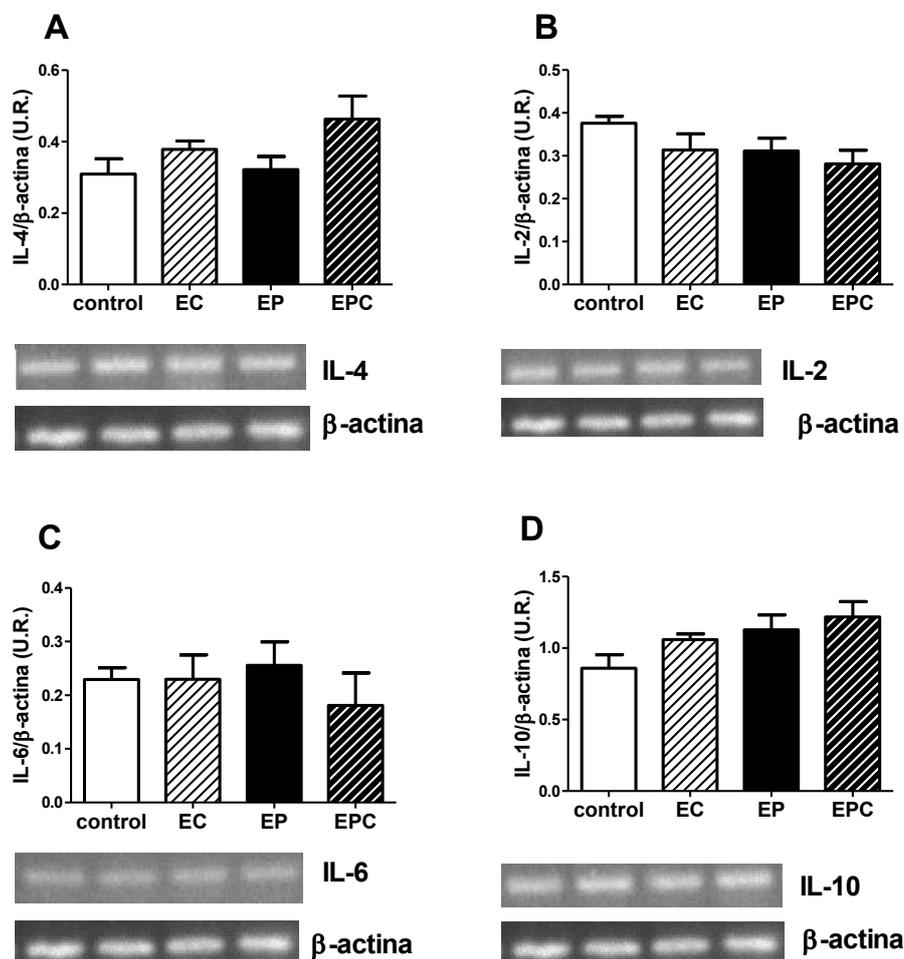


Figura 102: Expresión de citoquinas en hipocampo de machos.

Se determinaron los niveles de ARNm para las citoquinas IL-4 (A), IL-2 (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) por medio de RT-PCR. Los datos se expresan en relación a los niveles de ARNm de actina. Los resultados expresan la media \pm ES, $n=4$ o 5 .

4-14. Resumen de resultados

En la tabla 9 y 10 se muestra un resumen de los resultados obtenidos para hembras y machos respectivamente. El esquema representa los resultados obtenidos como aumento o disminución respecto del grupo control. (ND: no determinado; SCA: sin cambio adicional. EE: efecto estimulador; EI: efecto inhibitorio, ↑ aumento; ↓ Disminución; = sin cambio; Mφ: Macrófagos).

Parámetro	EA	EC	EPA	EPC
Sistema Inmune				
Actividad de NK	=	=	=	=
Fagocitosis Mφ	=	=	=	=
Proliferación T	↑	=	=	↓
CD4+/CD8+	=	=	=	=
Proliferación B	=	=	=	=
Título IgM	=	=	=	=
Título IgG	↑	↓	↓	=
Hormonas				
Corticosterona	↑↑	=	↑	=
Peso adrenal	ND	↑	ND	↑↑
Catecolaminas	↑	=	↑	=
Sensibilidad a GCs	↑ EE	↑ EI	SCA	SCA
Sensibilidad a Epi	↑ EE	↑ EI	=	=
Linfocitos				
CQs	↑IL-4;↓INF-γ	↑IL-4;↓INF-γ	SCA	↑IL-4;↓INF-γ
GR	ND	↑	ND	↑
B ₂ -AR	ND	=	ND	=
NTs	ND	↓NT3;↓BDNF	ND	SCA
Comportamiento				
Alternancia	=	=	=	↓
Act. Locomotora	↑	=	↑	↑↑
Habitación	NO	NO	NO	NO
Ansiedad	↑	↑	SCA	↓
Evitación Pasiva	ND	=	ND	=
RO	ND	=	ND	=
REO	ND	↓	ND	↓↓
Hipocampo				
NTs	ND	↓BDNF	ND	SCA
CQs	ND	↓INF-γ;↓IL-2	ND	SCA
GR	ND	↑	ND	SCA
B ₂ -AR	ND	=	ND	=

Tabla 9. Resumen de resultados Hembras.

Parámetro	EA	EC	EPA	EPC
Sistema Inmune				
Actividad de NK	↑	=	↑	↑
Fagocitosis Mφ	↑	=	↑	↑
Proliferación T	↑	↓	=	=
CD4+/CD8+	=	=	=	=
Proliferación B	=	=	=	=
Título IgM	=	=	=	=
Título IgG	=	↓	↓	=
Hormonas				
Corticosterona	↑↑	=	↑	=
Peso adrenal	=	=	=	=
Catecolaminas	↑	=	↑	=
Sensibilidad a GCs	↑EE	=	SCA	SCA
Sensibilidad a Epi	↑EE	=	↑EE	=
Linfocitos				
CQs	↑IFN-γ	=	↑IFN-γ	↑IFN-γ
GR	ND	↑	ND	SCA
B ₂ -AR	ND	=	ND	=
NTs	ND	=	ND	=
Comportamiento				
Alternancia	=	=	=	=
Actividad Locomotora	=	=	=	=
Habitación	NO	NO	NO	NO
Ansiedad	=	↓	=	=
Evitación Pasiva	ND	=	ND	=
RO	ND	=	ND	=
REO	ND	=	ND	=
Hipocampo				
NTs	ND	=	ND	=
CQs	ND	=	ND	=
GR	ND	↑	ND	SCA
B ₂ -AR	ND	=	ND	=

Tabla 10: Resumen de resultados Machos.

5-Discusión

En las últimas décadas se han realizado numerosos estudios que investigan la relación entre el sistema inmune y el sistema neuroendocrino. Ambos sistemas están interconectados y se regulan mutuamente. El SN puede regular la función inmune por inervación directa de los tejidos del sistema inmune o mediante el eje HPA por la vía hormonal. A su vez el SI secreta citoquinas y otras moléculas que pueden regular la función del SN. Esta interacción es muy importante para mantener la homeostasis del organismo. Entre los factores que pueden alterar esta interacción se encuentra el estrés. El estrés se define como la respuesta desencadenada por un estímulo (estresor) que es percibido por el cerebro y desencadena una respuesta fisiológica. La respuesta al estrés es adaptativa a corto plazo y preserva la homeostasis, sin embargo si el estresor persiste en el tiempo puede traer consecuencias deletéreas para el organismo.

El estrés inducido en la vida intrauterina sin duda tiene un efecto en el desarrollo y ese efecto podría determinar cambios permanentes en la adultez (Michelsen y col., 2007), ya sean alteraciones basales o modificaciones evidenciadas frente a nuevos estímulos en la vida adulta. Los estudios disponibles en la literatura analizan, en general, el efecto del estrés prenatal sobre el sistema inmune y el neuroendocrino de manera independiente. No se encuentran prácticamente estudios que analicen de manera integral la disrupción neuroinmune inducida por exposición a estrés durante la etapa prenatal y sus consecuencias a nivel inmunológico y conductual en la vida adulta.

Dentro de este contexto, en el presente trabajo estudiamos el efecto del EP en la respuesta neuroinmune en animales adultos. Para ello sometimos a estrés por inmovilización a hembras preñadas en la última semana de gestación y evaluamos la respuesta inmune, la respuesta neuroendocrina y el comportamiento, en las crías adultas machos y hembras provenientes de madres estresadas y sin estresar. Además estudiamos los efectos de la exposición a una nueva situación de estrés en la adultez. El estrés físico por inmovilización es ampliamente usado como un modelo de estrés para estudiar las alteraciones inducidas por estrés en el estatus fisiológico, inmunológico y neurobiológico en mamíferos (Glavin y col., 1994), por lo cual este fue el modelo de estrés elegido tanto para estresar a las madres como para estresar a las crías en la etapa adulta.

Se ha observado que eventos estresantes durante la preñez temprana pueden producir abortos y malformaciones en la cría (Parker y Douglas, 2010) debido

posiblemente a altos niveles de GCs, baja de progesterona, bajos niveles del factor bloqueador inducido por progesterona (PIBF), y/o baja producción de citoquinas tipo Th2. En nuestro modelo de estudio el estrés se aplica en la última semana de gestación correspondiente con el último trimestre en humanos, por lo cual estaríamos fuera del periodo ventana en donde las consecuencias del estrés llevan a cambios morfológicos importantes, y los efectos serían más sutiles que si el estresor se aplicara tempranamente en la preñez. Es importante señalar que en nuestro modelo de estrés no observamos diferencias en el número, el porcentaje de hembras y machos y en el peso de las crías provenientes de madres estresadas en comparación con las controles, así como tampoco observamos cambios en la ganancia de pesos de las madres preñadas, o en el tiempo de gestación. Si bien el período *in utero* fue posiblemente más relevante para nuestro modelo de estudio, no hay que descartar el cuidado materno como uno de los factores que podría afectar los parámetros en estudio, debido a que las madres estresadas podrían tener un comportamiento diferente y por tal razón descuidar a la cría, esta falta de cuidado materno podría influir en el sistema inmune y endocrino de la cría. Cabe aclarar que no observamos cambios en el cuidado materno durante el período de lactancia. Sin embargo, es necesario en un futuro realizar estudios de intercambio de crías entre animales EP y controles.

En lo referente a la respuesta inmune, observamos que el estrés prenatal no modificó la capacidad fagocítica de macrófagos. Asimismo, no modificó la respuesta proliferativa *in vitro* de linfocitos T y B, ni la producción de Ac tras la inoculación de un Ag T-dependiente (GRC) o un Ag T-independiente (LPS). Sin embargo en los machos encontramos que el estrés prenatal produjo un aumento de la actividad citotóxica de células NK, no siendo así en las hembras. De manera similar, Klein y Rager (1995) observaron un aumento en la actividad citotóxica de NK y no observaron diferencias en la respuesta proliferativa T en ratas adultas estresadas prenatalmente tanto en macho como en hembras. Sin embargo, en ratas juveniles machos encontraron una disminución de la actividad de NK. Asimismo Kay y col (1998) tampoco encontraron diferencias en la proliferación T, pero sí un aumento en la proliferación B y una disminución en la actividad citotóxica de NK tanto en machos como en hembras adultas. Por otro lado se ha encontrado una disminución en la proliferación T y un aumento en la proliferación B en crías de 14 días pero no en crías de 21 días (Sobrian y col., 1997). Interesantemente, otros autores encuentran que las alteraciones inmunes inducidas por EP se manifiesta en ratas de 6 meses pero no en ratas jóvenes

(Vanbesien-Mailliot y col., 2007) De manera similar, respecto a la respuesta inmune humoral no encuentran efecto del EP en ratas jóvenes (Bakker y col., 1998). Si bien no se conocen los motivos por los cuales las alteraciones inmunológicas se manifiestan a diferentes edades, podría postularse que el EP constituye un factor de vulnerabilidad que se manifiesta cuando el sistema inmune no es totalmente eficiente como ocurriría en los extremos de la vida (infancia y vejez). Además otros factores que influyen en el tipo de efecto encontrado son: la especie animal, la naturaleza del estresor, su duración e intensidad. Así, en nuestro modelo de estrés gestacional por inmovilización no encontramos diferencias en los porcentajes de células CD4+ y CD8+. De igual forma Kay y col (1998) tampoco observan una disminución en el porcentaje de estas poblaciones utilizando como estresor luz y sonido. En cambio Götz y col (2007) observan una disminución en el porcentaje CD4+ sin cambios en el CD8+ utilizando un modelo de estrés social.

Se describió que el estrés puede alterar el perfil de citoquinas. Por ello fue de interés estudiar la expresión de citoquinas tipo Th1 y Th2. Encontramos en hembras EP en condiciones basales una disminución en IFN- γ y un aumento el IL-4, por lo tanto el EP produciría un desbalance hacia un perfil tipo Th2. Si bien en machos no encontramos diferencias en los niveles de las citoquinas estudiadas se observaría un leve aumento de IFN- γ y una disminución de IL-6 e IL-10 por lo tanto podrían llegar a tener un desbalance hacia un perfil tipo Th1. También observamos un patrón similar en la liberación de citoquinas en cultivos estimulados con Con A, es decir un aumento en la secreción de IL-4 y una disminución en IFN- γ en hembras, sin encontrarse cambios significativos en machos. No obstante hay un aumento tanto en la expresión como en la liberación de IFN- γ , aunque debido a la dispersión de los datos no resultó significativa. Similarmente, Klein y Rager (1995) encontraron un aumento en la actividad citotóxica de NK y un aumento en la secreción de IFN- γ .

Se describió que las hormonas del estrés pueden influenciar la respuesta inmune, por lo que fue de interés determinar los niveles de las hormonas del estrés, GCs y catecolaminas. No encontramos diferencias en los niveles basales de corticosterona entre animales EP y controles tanto para machos como para hembras. Así como tampoco en el tamaño de las glándulas adrenales. Estos datos están de acuerdo a los encontrados por otros grupos (Chung y col., 2005; Kay y col., 1998).

Los linfocitos pueden responder diferencialmente a una misma concentración de GCs dependiendo del número de receptores que posean y de la intensidad de las respuestas desencadenadas por estos. Por lo tanto, estudiamos la sensibilidad de LT a corticosterona encontrando, tanto en machos como en hembras EP, un cambio en la sensibilidad a esta hormona, disminuyendo significativamente el efecto estimulador observado a bajas dosis para animales controles y en el caso de las hembras, aumentando del efecto inhibitorio inducido a altas dosis. Por otro lado estudiamos la expresión del receptor de glucocorticoides (GR) en linfocitos, se observó que las hembras EP poseen mayores niveles de GR tanto a nivel ARNm como proteínas, en los machos sólo encontramos un aumento a nivel proteico del GR. Además, nuestros resultados muestran que la respuesta de los linfocitos a corticosterona en ratones EP está alterada ya que en linfocitos ratones EP la corticosterona induce una mayor efecto inhibitorio y un menor efecto estimulador y las mismas estarían relacionadas con un aumento en el número de receptores de GCs.

El sistema inmune también es influido por el sistema nervioso simpático por medio de neurotransmisores como la NA, por ello evaluamos sus niveles en bazo (órgano ricamente innervado por el SNA). Observamos que el estrés prenatal no modificó los niveles de catecolaminas basalmente ni para machos ni para hembras. Estudiamos, además, la sensibilidad de los linfocitos a epinefrina, no encontramos diferencias significativas en animales EP en comparación con los controles. En cuanto a la expresión del receptor β_2 - adrenérgico, no encontramos diferencias en los niveles de ARNm o proteicos de este receptor. Por lo tanto, podríamos decir que esta hormona no estaría participando de forma directa en los cambios inducidos por EP observados a nivel inmune.

Las neurotrofinas se descubrieron por su rol en el desarrollo neuronal, pertenecen a una familia de factores de crecimiento que fueron extensamente estudiados por su rol en la proliferación, supervivencia y diferenciación de células del sistema nervioso central (Tessarollo, 1998) Sin embargo en los últimos años se han llevado a cabo estudios para establecer su acción en otros sistemas. Se han detectado la expresión de las NTs y sus receptores en varios tejidos incluyendo a las células del sistema inmune (Labouyrie y col., 1997; Shibayama y Koizumi, 1996). Recientemente se ha sugerido que las NTs juegan un papel como factores etiológico o predisponentes en trastornos relacionados al estrés (Monteggia, 2006; Gratacòs y col., 2007). Por lo tanto fue de interés analizar su expresión en linfocitos, encontramos disminución de los

niveles de BDNF y NT-3 en hembras EP en comparación con las controles. En machos no se encontraron diferencias en los niveles de NTs. Se describió que NGF puede estimular la proliferación de linfocitos. Respecto al NT-3, se ha descrito que tanto los LT como los LB expresan el receptor de alta afinidad para NT-3 TrkC (Vega y col., 2003). Sin embargo, no se han hecho estudios sobre la acción de NT-3 en la proliferación celular de linfocitos. Futuros estudios son necesarios para evaluar si los cambios observados en la expresión de esta NT tienen alguna repercusión a nivel inmune.

Se ha propuesto que eventos estresantes durante la preñez pueden traer consecuencias en el comportamiento de la descendencia, se ha encontrado que el EP produce deficiencias cognitivas, así como también un aumento en comportamientos relacionados a la ansiedad (Maccari y Morley-Fletcher, 2007; Vallée y col., 1997). Por lo tanto, fue de interés estudiar los efectos del estrés prenatal sobre trastornos cognitivos en nuestro modelo. En hembras EP, no encontramos diferencias en el comportamiento de alternancia, en la capacidad de habituación, en la prueba de evitación inhibitoria ni en la prueba de reconocimiento de objetos respecto a los controles. Sin embargo, observamos una disminución en la actividad locomotora, un aumento del comportamiento de tipo ansioso y una disminución en el índice de discriminación en la prueba de reconocimiento espacial de objetos. Por otra parte, en machos el EP no indujo cambios a excepción de un mejor desempeño en la prueba de habituación en comparación con los animales control.

Es importante señalar que en la prueba de habituación tendría un papel importante en contexto o lugar, por lo que el hipocampo estaría participando en el aprendizaje de dicho test (O'Keefe y Nadel, 1978). Cuando un animal explora un ambiente novedoso, construye una representación interna del ambiente en el hipocampo, como el mapa se vuelve cada vez más completo, la exploración se reduce (Bolívar, 2009).

La prueba de reconocimiento de objetos es dependiente de la corteza perirhinal e independiente del hipocampo (Kim y col., 2014), en cambio la prueba de reconocimiento espacial de objetos sería independiente de la corteza y dependiente del hipocampo (Barker y col., 2007). Asimismo, el hipocampo ventral tendría un papel preferencial en los procesos cerebrales asociados con comportamientos relacionados a la ansiedad (Bannerman y col., 2004).

Teniendo en cuenta entonces que los trastornos conductuales observados en hembras podrían tener relación con alteraciones en el hipocampo fue de interés estudiar la expresión de citoquinas, neurotrofinas y receptores de GCs en hipocampo.

En hembras, encontramos una disminución en los niveles de ARNm de BDNF en hipocampo de animales EP en comparación con los controles, no hallamos diferencias en los niveles de NGF y NT3. Fumagalli y Col. (Fumagalli y col., 2004) encontraron una disminución en los niveles de BDNF en la corteza prefrontal inducida por estrés prenatal en animales adultos. En machos no encontramos cambios en los niveles de neurotrofinas en hipocampo. Se sugirió que el estrés puede disminuir la síntesis de BDNF en hipocampo (Smith y col., 1995). Además, bajos niveles de BDNF han sido asociados con desórdenes psiquiátricos como la esquizofrenia (Takahashi y col., 2000) y trastornos conductuales como la ansiedad (Hritcu y Gorgan, 2014). Como ya mencionamos cambios en los niveles de BDNF podrían afectar el comportamiento, ya que el BDNF modula la fuerza de las conexiones sinápticas existentes. En nuestro caso, entonces, en las hembras podría existir una relación entre la baja de los niveles de BDNF en el hipocampo y la aparición de trastornos comportamentales como la disminución en la memoria espacial de objetos y un aumento en la ansiedad.

Por otra parte, se postuló que las citoquinas también pueden producir cambios en el desarrollo del sistema nervioso así como cambios conductuales. En un estudio reciente, se ha demostrado que la activación de la microglía con IL-4 puede inducir oligodendrogenesis y la activación con IFN- γ promueve la diferenciación neuronal y el crecimiento de neuritas (Johansson y col., 2008), además se observó que la expresión de IFN- γ en oligodendrocitos es suficiente para promover la neurogénesis adulta (Baron y col., 2008). En este trabajo encontramos un aumento en los niveles de IL-4 en hipocampo de hembras, en cambio en machos no observamos diferencias en las citoquinas estudiadas. Este aumento en IL-4 en el hipocampo de hembras podría contribuir probablemente a los trastornos cognitivos observados en estas.

Respecto a la expresión del GR en el hipocampo, encontramos un aumento en tanto en machos como en hembras EP. Durante el desarrollo intrauterino se observan diferentes patrones de expresión del GR en distintas áreas del cerebro. En el hipocampo se observa presencia de GR a partir del día 13 de gestación en adelante, además el MR se expresa desde el día 16 en adelante, ambos receptores tiene una expresión baja durante la gestación y aumento en el parto y los primeros días

postnatales (Kapoor y col., 2006). El estrés prenatal, que produciría un aumento en los GCs maternos podría llevar a desbalances en la expresión de los receptores con cambios permanentes en la cría (Kapoor y col., 2006).

Por lo tanto, en conclusión de esta primera parte machos y hembras parecerían responder diferente ante el estrés prenatal, tanto a nivel inmunológico como comportamental. Los machos presentan una mayor respuesta inmune innata evidenciada por el aumento en la actividad NK, posiblemente debido a una mayor secreción de IFN- γ . Las hembras presentan trastornos conductuales asociados posiblemente a una disminución de BDNF así como también a un aumento central y periférico de IL-4 y a disminución periférica de IFN- γ . Además tanto los machos como las hembras tienen una mayor sensibilidad de los linfocitos a los glucocorticoides debido principalmente a un aumento en los receptores de corticosterona en las células de los ganglios linfáticos. Este aumento en los GR se evidenciaría también en el hipocampo.

Es importante resaltar que todos los cambios a nivel de citoquinas, neurotrofinas y receptor para corticosterona se dan simultáneamente en hipocampo y linfocitos, constituyéndose las células del sistema inmune en potenciales marcadores periféricos de susceptibilidad al estrés. Por lo cual en una segunda parte, estudiamos las alteraciones inducidas por exposición a una nueva situación de estrés en la vida adulta.

Se ha propuesto que a pesar de que crías provenientes de madres estresadas o no estresadas poseen diferencias en algunos aspectos endocrinos y comportamentales, las mayores diferencias se verían cuando los animales son expuestos a condiciones estresantes (Götz y Stefanski, 2007). Así, algunos trabajos sostienen que el estrés prenatal tiene efectos deletéreos (Chung y col., 2005) y otros sostienen que el estrés prenatal prepara al individuo a responder más adaptativamente en la adultez (Darnaudéry y Maccari, 2008). Por esta razón fue de interés analizar si animales EP y controles respondían diferencialmente a nuevas situaciones de estrés en la adultez.

Se describió que mientras el estrés crónico suprime o desregula las funciones del sistema inmune, el estrés agudo a menudo tiene efectos estimuladores del mismo (Dhabhar, 2009). En trabajos previos, realizados en nuestro laboratorio, observamos que linfocitos T provenientes de hembras BALB/c adultas expuestas a estrés agudo

tienen una mayor respuesta proliferativa. En cambio los provenientes de animales expuestos a estrés crónico presentan una menor proliferación respecto de los controles (Silberman y col., 2003). Por lo cual fue de interés analizar la respuesta a estos dos tipos diferentes de estrés.

En el presente trabajo observamos que las hembras EP expuestas tanto a estrés agudo como crónico, no muestran cambios en la actividad citotóxica de NK, así como tampoco en la capacidad fagocítica de macrófagos, por lo tanto la respuesta inmune innata en nuestro modelo de estudio no parecería estar afectada por el estrés en las hembras. En cuanto a la respuesta inmune adaptativa observamos que las hembras EP expuestas a estrés agudo no respondieron con un aumento en la proliferación T *in vitro*, inducida por mitógenos, como sucedió con los animales control. Además cuando las hembras EP fueron expuestas a estrés crónico respondieron con una mayor disminución en la proliferación que la observada en los animales controles. Götz y col. (2007) encontraron resultados similares en ratas provenientes de madres socialmente estresadas, cuando fueron expuestas en la etapa adulta a estrés crónico social. Por otro lado, no observamos diferencias en la proliferación de LB en los grupos en estudio. En cuanto a la producción de anticuerpos observamos que las hembras control expuestas a estrés agudo mostraron un aumento en el título de anticuerpos mientras que las hembras EP mostraron una disminución. Por lo tanto, si bien en condiciones basales las hembras no parecen tener particularmente afectada la respuesta inmune cuando son expuestas a estrés agudo en la adultez tendrían una respuesta alterada en comparación a las controles. Respecto a la producción de citoquinas tanto el estrés agudo como el crónico indujo en los controles un aumento de IL-4 y una disminución de IFN- γ . Las hembras EP expuestas a estrés agudo mantienen su perfil Th2 y tras exposición a estrés crónico se observa un aumento aún mayor del ARNm y de la liberación de IL-4, así como una disminución aún mayor de la liberación de IFN- γ , es decir, muestran un desbalance hacia Th2 aún mayor.

Si bien basalmente no encontramos diferencias en los niveles de corticosterona, cuando fueron expuestas a estrés agudo las hembras EP respondieron con un menor aumento en la producción de corticosterona. Cuando fueron expuestas a estrés crónico, aunque no hubo diferencias significativas, las hembras EP mostraron una tendencia a tener menores niveles de corticosterona. Además encontramos un aumento en el peso de las glándulas adrenales en hembras control y EP estresadas crónicamente que fue mayor en hembras EP. Estos resultados concuerdan con los de

Chung y col. (2005) que encuentran un aumento en el peso de la glándula adrenal y una disminución en la secreción de corticosterona en ratones EP, por inmovilización, al ser expuestos a estrés crónico en la adultez. Las diferencias encontradas entre este trabajo y el presente en la secreción de corticosterona podrían deberse a la diferencia en el tiempo de exposición al estrés, ya que el nuestro es de 2 horas y el tiempo del otro trabajo es de 6 horas de exposición. Chung y col (2005) atribuyen la baja en los GCs a problemas en la síntesis de GCs o a un agotamiento de la glándula adrenal como resultado de una secreción prolongada durante la inmovilización repetida.

Como ya mencionamos los linfocitos de hembras EP poseen una sensibilidad mayor a al efecto inhibitorio de la corticosterona sobre la proliferación celular. Los linfocitos provenientes de ratones EP al ser expuestos a estrés agudo o crónico no presentan cambios adicionales en la sensibilidad a esta hormona. En cambio, en los linfocitos provenientes de hembras control el estrés agudo induce una mejor respuesta al efecto estimulador de la corticosterona y contrariamente, el estrés crónico un incremento del efecto inhibitorio.

Si tomamos en consideración el aumento en los niveles de GR, observado en los individuos EP, es posible que al ser expuestos a estrés agudo lleve a una prevalencia del efecto inhibitorio de la corticosterona y por ende la respuesta inmune sea menor. Por otra parte, los linfocitos de hembras controles expuestas a estrés crónico presentan un aumento del número de GR, no existiendo un aumento adicional en las EP. Esto justificaría que la disminución en la respuesta inmune observada frente al estrés crónico sea prácticamente la misma para las hembras control y las expuestas a EP.

Por otra lado, no se encontraron diferencias en los niveles de catecolaminas, ante una situación de estrés agudo tanto las hembras control como las EP respondieron con aumento en los niveles de ésta, no existiendo diferencias entre ambos grupos. Cuando fueron expuestas a EC tampoco encontramos diferencias entre grupos. Por lo cual el estrés prenatal no afectaría los niveles de catecolaminas basalmente, así como tampoco la liberación de ésta ante situaciones de estrés. Estudiamos, además, la sensibilidad de los linfocitos a la epinefrina. Observamos en hembras control un aumento del efecto estimulador a epinefrina cuando fueron expuestas a estrés agudo y del efecto inhibitorio cuando fueron expuestas a estrés crónico, no siendo así en hembras EP. Esta diferencia en la sensibilidad no estaría dada por diferencias en los

niveles de receptores β 2-adrenergicos, seria de interés estudiar si el EP modifica la afinidad o la actividad de estos receptores.

Tomados en su conjunto estos resultados indican que estrés prenatal en hembras altera en linfocitos la respuesta a las hormonas del estrés (catecolaminas y corticosterona) antes situaciones de estrés en la adultez, lo que llevaría a cambios en la respuesta inmune especialmente bajo situaciones de estrés agudo.

Por otra parte, evidenciamos una disminución en ganglios linfáticos de la expresión de ARNm de NT3 y BDNF en animales control estresados crónicamente. En animales EP expuestos a estrés crónico no se encontró una disminución adicional a la ya existente.

Estudiamos el efecto de nuevas situaciones de estrés en la adultez sobre el comportamiento de las hembras. En general, la exposición a estrés agudo no indujo respuestas diferentes en EP respecto a los controles en las distintas pruebas utilizadas. Así, no se observaron cambios en el comportamiento de alternancia, se evidenció para ambos grupos un aumento en la actividad locomotora y un peor desempeño en la prueba de habituación. Sin embargo, el comportamiento de tipo ansioso fue similar para los controles expuestos a estrés agudo y los EP, no existiendo un cambio en estos últimos por exposición a estrés agudo. De manera contraria, la exposición a estrés crónico afectó en mayor medida a las hembras EP en aquellas pruebas que evalúan la memoria espacial. Así, observamos que si bien el EP no produjo modificaciones en la alternancia en condiciones basales, cuando fueron expuestos a estrés crónico se observó una disminución en el desempeño en la prueba de alternancia, no así en los controles. Por otro lado las hembras EP expuestas a estrés crónico mostraron un menor índice de discriminación en la prueba de reconocimiento espacial de objetos. Sin embargo, en la prueba de habituación tanto controles como EP mostraron un peor desempeño. En la prueba de laberinto elevado en cruz, el estrés crónico produciría un aumento en la ansiedad en animales control y una disminución de la ansiedad, aumentada basalmente, en animales EP.

Los resultados referentes a la expresión de neurotrofinas en el hipocampo, indicaron una disminución en los niveles de BDNF en animales control expuestos a estrés crónico, pero no encontramos una disminución adicional en animales EP expuestos a estrés crónico. La disminución de los niveles de BDNF está de acuerdo con los resultados encontrados por otros autores (Smith y col., 1995). El mecanismo por el

cual el estrés crónico regula los niveles de BDNF no se conoce, algunos autores consideren el efecto de neurotransmisores y del sistema endocrino. No encontramos diferencias en la expresión de las otras neurotrofinas analizadas.

Encontramos una disminución en los niveles de IFN- γ y de IL-2 en animales control expuestos a estrés crónico, estos cambios no se observaron en animales EP como así tampoco un aumento adicional de IL-4 al ser expuestos a estrés crónico.

Finalmente, observamos un aumento en GR en hembras controles expuestos a estrés crónico sin cambios adicionales en hembras EP.

En conclusión las hembras EP presentan una respuesta inmune desmejorada ante situaciones de estrés agudo y un peor desempeño en aquellas pruebas que evalúan la memoria espacial al ser expuestas a estrés crónico. Las alteraciones inmunológicas podrían estar relacionadas con una disminución del balance Th1/Th2 y un aumento en los receptores de GR a nivel linfocitario inducidos por el estrés prenatal. Sin embargo, bajo situaciones de estrés agudo lo que estaría diferencialmente desbalanceado es la respuesta linfocitaria a los glucocorticoides. Los trastornos conductuales podrían estar asociados a una disminución del BDNF y a un aumento de los receptores a GC en hipocampo inducidos por estrés prenatal. Sin embargo, bajo situaciones de estrés crónico lo único que es diferencial el nivel aumentado de IL-4 en los controles presente basalmente en los EP y la disminución en IFN- γ , e IL-4 presente en los controles tras exposición a estrés crónico ausente en los EP.

En este sentido, se ha demostrado que tanto el excesivo aumento como la disminución de los niveles fisiológicos de IFN- γ , han sido asociados a una disminución en la capacidad de aprendizaje y memoria (Baron y col., 2008). Por otra parte se ha demostrado que la normalización de niveles aumentados de IL-2 a nivel del SNC conduciría a un mejoramiento de las funciones cognitivas en un modelo de adicción a metanfetamina (Loftis y col., 2013). Quizás lo más relevante de nuestros resultados sea el persistente aumento de IL-4, ya que ha sido reportado que un aumento prologado de esta citoquina induce efectos pro-apotóticos en la microglia (Soria y col., 2011). Además, hay un consenso actual en que la persistente elevación de IL-4 impediría la función de la inmunidad innata a nivel de SNC, necesaria para la

eliminación de restos celulares evitando la reparación celular con el consecuente deterioro de la capacidad cognitiva (Chakrabarty y col., 2012).

En lo referente a los machos, tanto los EP como los controles respondieron al estrés agudo con un aumento en la actividad citotóxica de NK, así como también con un aumento en la capacidad fagocítica de macrófagos. Cuando fueron expuestos a estrés crónico los animales EP mostraron un aumento en estos dos parámetros no así los animales control. Probablemente en relación al aumento en los niveles de IFN y en estos grupos experimentales (Klein y Rager, 1995).

Respecto a la inmunidad adaptativa, cuando los machos EP fueron expuestos a estrés agudo presentaron una respuesta deficiente respecto a la observada para animales controles, semejante a lo encontrado para las hembras. Sin embargo, tal como ocurrió con las hembras, no se observaron diferencias en situación de estrés crónico.

Cuando fueron expuestos a EA los machos EP respondieron con un menor aumento en los niveles de corticosterona y cuando fueron expuestos a estrés crónico no hubo diferencias significativas. El peso de las glándulas adrenales no fue diferente entre los grupos. En cuanto a la sensibilidad de los linfocitos a corticosterona encontramos que los machos control mostraron un aumento en el efecto estimulador a bajas dosis cuando fueron expuestos a EA, en cambio en los machos EP el efecto estimulador fue menor. Cuando fueron expuestos a EC, si bien no se encontraron diferencias significativas podría verse una tendencia similar. En lo referente a las catecolaminas, el EP no indujo diferencias en cuanto a los niveles bajo estrés agudo o crónico, ni tampoco diferencias en la sensibilidad de los linfocitos a esta hormona. Es decir, que en los machos, al igual que en las hembras, existiría una alteración en la respuesta a los glucocorticoides pero no a las catecolaminas.

Además no observamos cambios en la expresión de neurotrofinas en ganglio en ninguno de los grupos experimentales utilizados.

En líneas generales los machos EP expuestos a estrés agudo o crónico en la adultez no mostraron cambios en los parámetros conductuales analizados con respecto a los no expuestos. En los machos control tampoco se encontraron grandes diferencias salvo una disminución en el comportamiento tipo ansioso en los controles estresados crónicamente. Además, no encontramos diferencias en las neurotrofinas, ni cambios

en las citoquinas en los hipocampos de los grupos estudiados. Llamativamente, observamos un aumento en el nivel de los GR en machos control estresados crónicamente, sin encontrar un aumento adicional en los machos EP estresados crónicamente.

En conclusión, los machos EP expuestos a estrés en la adultez tienen un aumento en la respuesta inmune innata que estaría relacionado con un aumento en los niveles de IFN- γ . Sin embargo, presentan una disminución en la inmunidad adaptativa que fundamentalmente tendría relación con el mayor efecto inhibitorio ejercido por la corticosterona. Por otro lado, en los machos tanto controles como EP, la exposición a estrés agudo o crónico no indujo alteraciones importantes en las pruebas comportamentales realizadas.

Se han realizado varios estudios para elucidar las diferencias en la respuesta al estrés entre machos y hembras. Las hembras en condiciones basales poseen niveles mayores de corticosterona que los machos, además tras la exposición a estrés las hembras producen mayores niveles de ACTH (Weinstock y col., 1998). Se ha visto que la hembras en proestro, cuando los niveles de estrógeno y progesterona son altos, tienen niveles de corticosterona más altos que en diestro, cuando los niveles de estrógeno y progesterona son bajos (Carey y col., 1995). Además se encontró que los estrógenos aumentan la expresión de CRH mientras que los andrógenos la suprimen (Iwasaki-Sekino y col., 2009). Las distintas regiones del eje HPA poseen receptores para estrógenos y andrógenos, por lo tanto, es de esperar diferente regulación del eje por estas hormonas en machos y hembras que podrían llevar a diferente respuesta ante una situación de estrés. Se observó que las hembras poseerían menos receptores de GR en hipotálamo e hipófisis, además se encontró que el tratamiento con estrógenos reduce la expresión de GR en hipocampo, hipotálamo y la hipófisis. Esto llevaría a una retroalimentación menor en las hembras que en los machos (Bangasser y Valentino, 2014). En concordancia con estos hallazgos, en el presente trabajo encontramos que las hembras tienen un nivel de corticosterona basal de tres a cinco veces mayor que los machos y que el aumento inducido por estrés agudo es de aproximadamente ocho veces en las hembras y de tres veces en los machos. Además, los niveles de GR en hipocampo tienen un aumento mayor para los machos que para las hembras bajo condiciones de EP respecto a sus correspondientes controles, siendo su expresión prácticamente el doble en los machos que en las hembras EP.

Además de los niveles del receptor, otro punto de regulación sería la translocación de GR, el proceso por el cual el receptor se transloca al núcleo para inhibir la transcripción de ciertos genes como respuesta al estrés. Se ha observado que el estrés modula diferentemente este mecanismo en machos y hembras (Bourke y col., 2012). Por lo tanto con iguales niveles de GR la respuesta podría ser diferencial dependiendo de la eficacia en la translocación.

Recientemente, se ha visto que el estrés crónico induce un aumento de los niveles de GR y una disminución en de los niveles de MR, asociado con una disminución del volumen hipocampal, de las espinas dendríticas y de la neurogénesis (Orlovsky y col., 2014), debido a las diferencias de afinidad de ambos receptores, el GR participa en los procesos inducidos por estrés en cambio el MR actuaría en condiciones normales, se ha visto que MR es necesario para mantener la estructura del hipocampo, mientras que se vio que GR induciría la apoptosis de las células hipocampales (Almeida y col., 2000). Sería de interés, determinar entonces en nuestro modelo los niveles de MR, en especial si existen diferencias entre machos y hembras y si estos cambios se correlacionan con trastornos conductuales. Además, también sería de interés evaluar la actividad de estos receptores.

Por último, cabe destacar que este primer estudio acerca del efecto del EP sobre el comportamiento de las hembras no determinamos la fase del ciclo en las hembras. En los últimos años se ha considerado que el hecho de no estar exactamente en la misma fase del ciclo estral puede disminuir la homogeneidad de la población en estudio y llevar a efectos diferentes durante la manipulación experimental. La mayoría de estudios analizan el papel de las hormonas sexuales sobre diferentes parámetros usan el clásico paradigma de la ovariectomía y remplazo de estradiol y hembras preñadas. Pero, hay muy pocos estudios que analizan la influencia hormonal relacionada con la fase del ciclo estral relativo al comportamiento y la respuesta inmune. Los hallazgos más sólidos son que durante el proestro y el estro las ratas y ratones muestran menos comportamiento de ansiedad que durante el diestro (Meziane y col., 2007). Sin embargo en una reciente e interesante revisión (Beery y Zucker, 2011) analizan el sesgo del sexo en la investigación biomédica y enfatizan que muchos de los estudios que se han realizado en los últimos 90 años dan resultados replicables independientemente de que se hayan realizado bajo control del ciclo estral. No obstante, consideramos que sería interesante completar nuestros estudios realizando

una correlación entre la vulnerabilidad frente a situaciones de estrés y la fase del ciclo estral.

Finalmente, nuestros resultados demuestran que la exposición a estrés prenatal produce una respuesta inmunológica deficiente tras exposición a estrés agudo en la vida adulta tanto para machos como para hembras. Este hallazgo de que la exposición a estrés prenatal induce una respuesta disminuída tras inoculación de un antígeno T dependiente es de crucial importancia. Ha sido propuesto (Dhabhar, 2009) que la respuesta al estrés y sus efectos sobre la función inmune puede ser vista dentro de un espectro. Una región de ese espectro es caracterizada por condiciones de un estrés de corta duración (estrés agudo), que resultaría en una condición fisiológica que llevaría a un aumento de la respuesta inmunológica. El otro lado del espectro estaría caracterizado por repetida o prolongada exposición a estrés (estrés crónico), que puede resultar en la desregulación o supresión de la respuesta inmune. En este marco, ha sido sugerido que la exposición a estrés agudo podría aumentar selectivamente las condiciones del individuo para responder más eficientemente a una vacuna o a una infección, entre otros desafíos. Sin embargo, nuestros resultados mostrando que la exposición a estrés prenatal disminuye la respuesta humoral tras exposición a un estrés agudo sería un factor muy importante a tener en cuenta.

Por otra parte, como ya mencionamos, muchos de los cambios inducidos por exposición a estrés prenatal, se dan paralelamente en hipocampo y linfocitos. El contar con marcadores periféricos de susceptibilidad a estrés es importante para implementar terapias tempranas, como una mayor estimulación sensorial, motora y social (denominada ambiente enriquecido) que puede contrarestar esa aumentada susceptibilidad (Vazquez-Sanroman y col., 2013).

Conclusión:

Los resultados encontrados nos permiten concluir que el estrés materno induce cambios neuroinmunes en las crías. Estos cambios no producirían trastornos importantes en la respuesta inmune en situaciones basales. A nivel conductual, las hembras manifiestan algunas alteraciones, no así los machos. Sin embargo, cuando estos individuos deben enfrentarse a nuevas situaciones de estrés en la adultez, presentarían una sensibilidad mayor a los efectos deletéreos del estrés tanto a nivel inmunológico como conductual. Observamos además un efecto diferencial del estrés prenatal, en machos y hembras. Siendo las hembras más sensibles a los efectos del estrés cuando son expuestas a nuevas condiciones de estrés en la adultez.

Además, consideramos importante que los cambios producidos en el hipocampo se reflejan en las células del sistema inmune y si bien falta muchísima experimentación es posible que cambios en la expresión de NT3, BDNF y aumento de IL-4 y disminución de INF- γ puedan ser indicadores periféricos de una mayor susceptibilidad a padecer trastornos en el aprendizaje y memoria tras situaciones de estrés crónico como observamos en hembras expuestas a estrés prenatal. Por otra parte, el aumento de receptores para GCs podría indicar una peor respuesta adaptativa especialmente bajo un estrés agudo como encontramos para machos y hembras estresados prenatalmente.

A continuación se muestra un esquema de los resultados encontrados en esta tesis:

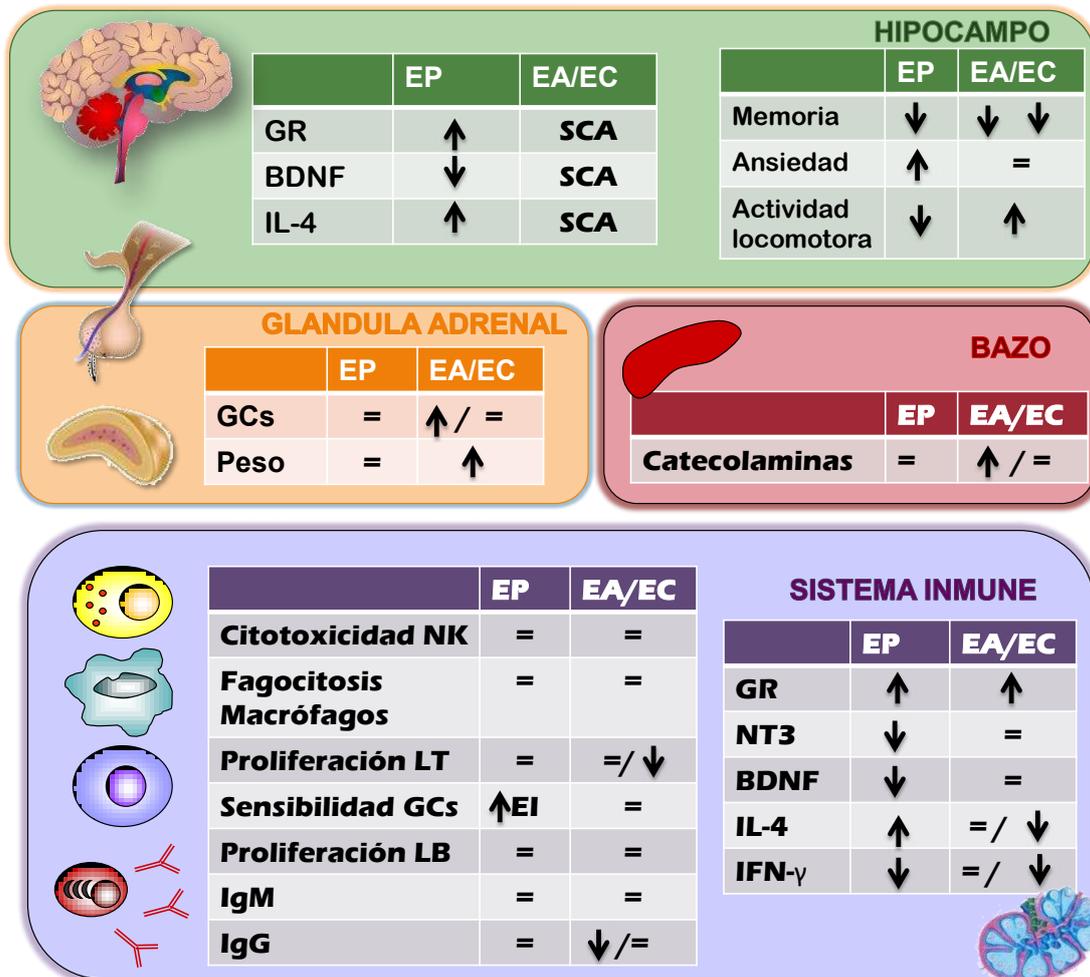


Figura 103: Esquema general del efecto del EP en hembras. SCA: sin cambios adicionales; =: sin cambios; ↑: aumento; ↓: disminución; EI: efecto inhibitorio.

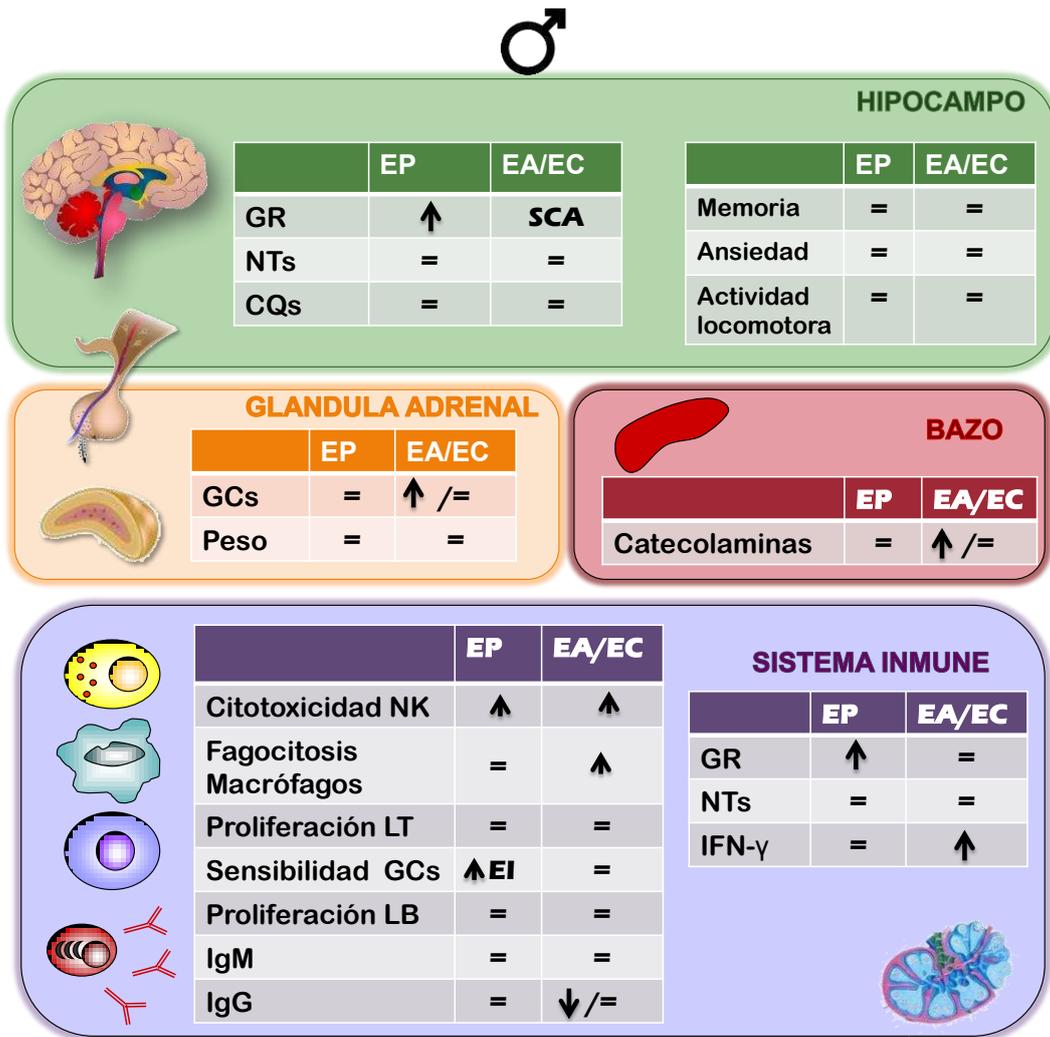


Figura 104: Esquema general del efecto del EP en machos. SCA: sin cambios adicionales; = sin cambios; ↑: aumento; ↓: disminución; EI: efecto inhibitorio.

6-Bibliografía

- Abrous, D. N., Koehl, M., & Le Moal, M. (2005). Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiological Reviews*, *85*(2), 523–69.
- Adcock, I. M., & Ito, K. (2000). Molecular mechanisms of corticosteroid actions. *Monaldi Archives for Chest Disease = Archivio Monaldi per Le Malattie Del Torace / Fondazione Clinica Del Lavoro, IRCCS [and] Istituto Di Clinica Tisiologica E Malattie Apparato Respiratorio, Università Di Napoli, Secondo Ateneo*, *55*(3), 256–66.
- Alleva, E., & Santucci, D. (2001). Psychosocial vs. “physical” stress situations in rodents and humans. *Physiology & Behavior*, *73*(3), 313–320.
- Almawi, W. Y., Hess, D. A., Assi, J. W., Chudzik, D. M., & Rieder, M. J. (1999). Pretreatment with glucocorticoids enhances T-cell effector function: Possible implication for immune rebound accompanying glucocorticoid withdrawal. *Cell Transplantation*, *8*(6), 637–647.
- Almeida, O. F., Condé, G. L., Crochemore, C., Demeneix, B. A., Fischer, D., Hassan, A. H., Michaelidis, T. M. (2000). Subtle shifts in the ratio between pro- and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *14*(5), 779–90.
- Aloe, L., Rocco, M. L., Bianchi, P., & Manni, L. (2012). Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use. *Journal of Translational Medicine*, *10*, 239.
- Amador-Arjona, A., Delgado-Morales, R., Belda, X., Gagliano, H., Gallego, X., Keck, M. E., Dierssen, M. (2010). Susceptibility to stress in transgenic mice overexpressing TrkC, a model of panic disorder. *Journal of Psychiatric Research*, *44*(3), 157–67.
- Arango Duque, G., & Descoteaux, A. (2014). Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in Immunology*, *5*, 491.
- Arisi, G. M. (2014). Nervous and immune systems signals and connections: Cytokines in hippocampus physiology and pathology. *Epilepsy & Behavior: E&B*, 1–5.
- Arvanian, V. (2013). Role of neurotrophins in spinal plasticity and locomotion. *Current Pharmaceutical Design*, *19*(24), 4509–16.

- Ayres, F. M., Narita, M., Takahashi, M., Alldawi, L., Liu, A., Osman, Y., Aizawa, Y. (2003). A comparative study of the JAM test and 51Cr-release assay to assess the cytotoxicity of dendritic cells on hematopoietic tumor cells. *Immunological Investigations*, 32(4), 219–27.
- Bakker, J. M., van den Dobbelsteen, G. P. J. ., Kroes, H., Kavelaars, A., Heijnen, C. J., Tilders, F. J. ., & van Rees, E. P. (1998). Long-term gender-specific effects of manipulation during pregnancy on immune and endocrine responsiveness in rat offspring. *Journal of Neuroimmunology*, 82(1), 56–63.
- Bangasser, D. A., & Valentino, R. J. (2014). Frontiers in Neuroendocrinology Sex differences in stress-related psychiatric disorders: Neurobiological perspectives. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 35(3), 303–319.
- Bannerman, D. M., Rawlins, J. N. P., McHugh, S. B., Deacon, R. M. J., Yee, B. K., Bast, T., Feldon, J. (2004). Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28(3), 273–83.
- Barde, Y., Edgar, D., & Thoenen, H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *The EMBO Journal*, 1(5), 549–553.
- Barker, G. R. I., Bird, F., Alexander, V., & Warburton, E. C. (2007). Recognition memory for objects, place, and temporal order: a disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(11), 2948–57.
- Baron, R., Nemirovsky, A., Harpaz, I., Cohen, H., Owens, T., & Monsonego, A. (2008). IFN-gamma enhances neurogenesis in wild-type mice and in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(8), 2843–52.
- Beery, A., & Zucker, I. (2011). Sex Bias in Neuroscience and Biomedical Research. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 99(2), 116–129.
- Berthon, B. S., MacDonald-Wicks, L. K., & Wood, L. G. (2014). A systematic review of the effect of oral glucocorticoids on energy intake, appetite, and body weight in humans. *Nutrition Research (New York, N.Y.)*, 34(3), 179–90.

- Bishop, G. R., Jaso-Friedmann, L., & Evans, D. L. (2000). Activation-induced programmed cell death of nonspecific cytotoxic cells and inhibition by apoptosis regulatory factors. *Cellular Immunology*, *199*(2), 126–37.
- Blix, E., Perski, A., Berglund, H., & Savic, I. (2013). Long-term occupational stress is associated with regional reductions in brain tissue volumes. *PLoS One*, *8*(6), e64065.
- Bolivar, V. J. (2009). Intrasession and intersession habituation in mice: from inbred strain variability to linkage analysis. *Neurobiology of Learning and Memory*, *92*(2), 206–14.
- Bonneau, R. H. (2007). Controlling immunopathology at the expense of critical immune functions--a tipping of the balance by neuroendocrine-immune interactions. *Brain, Behavior, and Immunity*, *21*(7), 888–9.
- Bourke, C. H., Harrell, C. S., & Neigh, G. N. (2012). Stress-induced sex differences: adaptations mediated by the glucocorticoid receptor. *Hormones and Behavior*, *62*(3), 210–8.
- Broadbent, N. J., Squire, L. R., & Clark, R. E. (2004). Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(40), 14515–20.
- Bronzetti, E., Artico, M., Pompili, E., Felici, L. M., Stringaro, A., Bosco, S., ... Fumagalli, L. (2006). Neurotrophins and neurotransmitters in human palatine tonsils: an immunohistochemical and RT-PCR analysis. *International Journal of Molecular Medicine*, *18*(1), 49–58.
- Calabrese, F., Molteni, R., Racagni, G., & Riva, M. a. (2009). Neuronal plasticity: a link between stress and mood disorders. *Psychoneuroendocrinology*, *34* Suppl 1, S208–16.
- Carey, M. P., Deterd, C. H., de Koning, J., Helmerhorst, F., & de Kloet, E. R. (1995). The influence of ovarian steroids on hypothalamic-pituitary-adrenal regulation in the female rat. *The Journal of Endocrinology*, *144*(2), 311–21.
- Carter, R. H. (2006). B cells in health and disease. *Mayo Clinic Proceedings*, *81*(3), 377–84. doi:10.4065/81.3.377

- Chakrabarty, P., Tianbai, L., Herring, A., Ceballos-Diaz, C., Das, P., & Golde, T. E. (2012). Hippocampal expression of murine IL-4 results in exacerbation of amyloid deposition. *Molecular Neurodegeneration*, 7, 36.
- Chang, S. H., Mirabolfathinejad, S. G., Katta, H., Cumpian, A. M., Gong, L., Caetano, M. S. Dong, C. (2014). T helper 17 cells play a critical pathogenic role in lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(15), 5664–9. doi:10.1073/pnas.1319051111
- Chesnokova, V., Melmed, S., Angeles, C. L., & Angeles, L. (2010). Minireview: Neuro-Immuno-Endocrine Modulation of the, 143(5), 1571–1574.
- Chung, S., Son, G. H., Park, S. H., Park, E., Lee, K. H., Geum, D., & Kim, K. (2005). Differential adaptive responses to chronic stress of maternally stressed male mice offspring. *Endocrinology*, 146(7), 3202–10.
- Ciriaco, E., Dall'Aglio, C., Hannestad, J., Huerta, J. J., Laurà, R., Germanà, G., & Vega, J. A. (1996). Localization of Trk neurotrophin receptor-like proteins in avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of Fabricius). *Journal of Neuroimmunology*, 69(1-2), 73–83.
- Cirulli, F., Francia, N., Berry, A., Aloe, L., Alleva, E., & Suomi, S. J. (2009). Early life stress as a risk factor for mental health: role of neurotrophins from rodents to non-human primates. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 33(4), 573–85.
- Costa, M. S., Botton, P. H., Mioranza, S., Ardais, A. P., Moreira, J. D., Souza, D. O., & Porciúncula, L. O. (2008). Caffeine improves adult mice performance in the object recognition task and increases BDNF and TrkB independent on phospho-CREB immunocontent in the hippocampus. *Neurochemistry International*, 53(3-4), 89–94.
- Cratty, M. S., Ward, H. E., Johnson, E. A., Azzaro, A. J., & Birkle, D. L. (1995). Prenatal stress increases corticotropin-releasing factor (CRF) content and release in rat amygdala minces. *Brain Research*, 675(1-2), 297–302
- Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annual Review of Immunology*, 29, 621–63.

- Cui, B., Wu, M., & She, X. (2009). Effects of chronic noise exposure on spatial learning and memory of rats in relation to neurotransmitters and NMDAR2B alteration in the hippocampus. *Journal of Occupational Health*, 51(2), 152–8.
- Cummins, R. A., & Walsh, R. N. (1976). The Open-Field, 482–504.
- Cutsuridis, V., & Wennekers, T. (2009). Hippocampus, microcircuits and associative memory. *Neural Networks: The Official Journal of the International Neural Network Society*, 22(8), 1120–8.
- Dantzer, R. (2009). Cytokine, sickness behavior, and depression. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 29(2), 247–64.
- Dantzer, R., & Wollman, E. E. (2003). Relationships between the brain and the immune system. *Journal de La Société de Biologie*, 197(2), 81–8.
- Darnaudéry, M., & Maccari, S. (2008). Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress. *Brain Research Reviews*, 57(2), 571–85.
- De Lima, T. M., Sampaio, S. C., Petroni, R., Brigatte, P., Velasco, I. T., & Soriano, F. G. (2014). Phagocytic activity of LPS tolerant macrophages. *Molecular Immunology*, 60(1), 8–13.
- Dhabhar, F. S. (2009). Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. *Neuroimmunomodulation*, 16(5), 300–17.
- Dhabhar, F. S., & McEwen, B. S. (1997). Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain, Behavior, and Immunity*, 11(4), 286–306.
- Dhabhar, F. S., & McEwen, B. S. (1999). Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(3), 1059–64.
- Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 4(1), 11–22

- Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nature Immunology*, *10*(8), 857–63.
- Duman, R. S., & Monteggia, L. M. (2006). A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biological Psychiatry*, *59*(12), 1116–27.
- Elenkov, I. J. (2004). Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1024*, 138–46.
- Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, *31*(1), 47–59.
- Erecinska, M., Cherian, S., & Silver, I. a. (2004). Energy metabolism in mammalian brain during development. *Progress in Neurobiology*, *73*(6), 397–445.
- Ernfors, P., Ibáñez, C. F., Ebendal, T., Olson, L., & Persson, H. (1990). Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to nerve growth factor: developmental and topographical expression in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*(14), 5454–8.
- Eskandari, F., Webster, J. I., & Sternberg, E. M. (2003). Neural immune pathways and their connection to inflammatory diseases. *Arthritis Research & Therapy*, *5*(6), 251–65.
- Fainboim, L., & Geffner, J. (2005). *Introducción a la Inmunología Humana*. (Editorial Medica Panamericana, Ed.)
- Fellini, L., Florian, C., Courtney, J., & Roulet, P. (2009). Pharmacological intervention of hippocampal CA3 NMDA receptors impairs acquisition and long-term memory retrieval of spatial pattern completion task. *Learning & Memory*, *16*(6), 387–94
- Felten, D. L., Felten, S. Y., Bellinger, D. L., Carlson, S. L., Ackerman, K. D., Madden, K. S., Livnat, S. (1987). Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. *Immunological Reviews*, *100*, 225–60.
- Florian, C., & Roulet, P. (2004). Hippocampal CA3-region is crucial for acquisition and memory consolidation in Morris water maze task in mice. *Behavioural Brain Research*, *154*(2), 365–74.

- Fonseca, E. S. M., Massoco, C. O., & Palermo-Neto, J. (2002). Effects of prenatal stress on stress-induced changes in behavior and macrophage activity of mice. *Physiology & Behavior*, *77*(2-3), 205–15.
- Fowden, A. L., Giussani, D. a., & Forhead, A. J. (2006). Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiology (Bethesda, Md.)*, *21*, 29–37.
- Fride, E., & Weinstock, M. (1988). Prenatal stress increases anxiety related behavior and alters cerebral lateralization of dopamine activity. *Life Sciences*, *42*(10), 1059–65.
- Fumagalli, F., Bedogni, F., Perez, J., Racagni, G., & Riva, M. A. (2004). Corticostriatal brain-derived neurotrophic factor dysregulation in adult rats following prenatal stress. *The European Journal of Neuroscience*, *20*(5), 1348–54.
- Gądek-Michalska, A., Tadeusz, J., Rachwalska, P., & Bugajski, J. (2013). Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems. *Pharmacological Reports : PR*, *65*(6), 1655–62.
- Geginat, J., Paroni, M., Maglie, S., Alfen, J. S., Kastirr, I., Guarin, P., Abrignani, S. (2014). Plasticity of human CD4 T cell subsets. *Frontiers in Immunology*, *5*, 630.
- Glavin, G. B., Paré, W. P., Sandbak, T., Bakke, H.-K., & Murison, R. (1994). Restraint stress in biomedical research: An update. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *18*(2), 223–249.
- Goldstein, D. S. (2010). Adrenal responses to stress. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *30*(8), 1433–40.
- Gonzalez, P., Machado, I., Vilcaes, A., Caruso, C., Roth, G. A., Schiöth, H., Scimonelli, T. (2013). Molecular mechanisms involved in interleukin 1-beta (IL-1 β)-induced memory impairment. Modulation by alpha-melanocyte-stimulating hormone (α -MSH). *Brain, Behavior, and Immunity*, *34*, 141–50.
- Götz, A. a., & Stefanski, V. (2007). Psychosocial maternal stress during pregnancy affects serum corticosterone, blood immune parameters and anxiety behaviour in adult male rat offspring. *Physiology & Behavior*, *90*(1), 108–15.

- Gotz, R., Koster, R., Winkler, C., Raulf, F., Lottspeich, F., Scharl, M., & Thoenen, H. (1994). Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature*, 372(6503), 266–269.
- Gratacòs, M., Sahún, I., Gallego, X., Amador-Arjona, a, Estivill, X., & Dierssen, M. (2007). Candidate genes for panic disorder: insight from human and mouse genetic studies. *Genes, Brain, and Behavior*, 6 Suppl 1, 2–23.
- Green, M. K., Rani, C. S. S., Joshi, A., Soto-Piña, A. E., Martinez, P. A., Frazer, A., ... Morilak, D. A. (2011). Prenatal stress induces long term stress vulnerability, compromising stress response systems in the brain and impairing extinction of conditioned fear after adult stress. *Neuroscience*, 192, 438–51.
- Guo, Y., Wu, W., Cen, Z., Li, X., Kong, Q., & Zhou, Q. (2014). IL-22-producing Th22 cells play a protective role in CVB3-induced chronic myocarditis and dilated cardiomyopathy by inhibiting myocardial fibrosis. *Virology Journal*, 11(1), 2511.
- Guyton, A. C. (1994). Anatomía Y Fisiología del Sistema Nervioso: Neurociencia Básica.
- Hallböök, F., Ibáñez, C. F., & Persson, H. (1991). Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in xenopus ovary. *Neuron*, 6(5), 845–858.
- Hannestad, J., García-Suárez, O., Huerta, J. J., Esteban, I., Naves, F. J., & Vega, J. A. (1997). TrkA neurotrophin receptor protein in the rat and human thymus. *The Anatomical Record*, 249(3), 373–9.
- Hannestad, J., Marino, F., Germanà, A., Catania, S., Abbate, F., Ciriaco, E., & Vega, J. A. (2000). Trk neurotrophin receptor-like proteins in the teleost *Dicentrarchus labrax*. *Cell and Tissue Research*, 300(1), 1–9.
- Herman, J. P., Figueiredo, H., Mueller, N. K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M. M., Choi, D. C., & Cullinan, W. E. (2003). Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 24(3), 151–80.

- Holmes, C., Cunningham, C., Zotova, E., Culliford, D., & Perry, V. H. (2011). Proinflammatory cytokines, sickness behavior, and Alzheimer disease. *Neurology*, 77(3), 212–8.
- Hritcu, L., & Gorgan, L. D. (2014). Intranigral lipopolysaccharide induced anxiety and depression by altered BDNF mRNA expression in rat hippocampus. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 51, 126–32.
- Hucklebridge, F., Sen, S., Evans, P. D., & Clow, A. (1998). The relationship between circadian patterns of salivary cortisol and endogenous inhibitor of monoamine oxidase A. *Life Sciences*, 62(25), 2321–8.
- Huizink, A. C., Mulder, E. J. H., & Buitelaar, J. K. (2004). Prenatal stress and risk for psychopathology: specific effects or induction of general susceptibility? *Psychological Bulletin*, 130(1), 115–42.
- Iwasaki-Sekino, A., Mano-Otagiri, A., Ohata, H., Yamauchi, N., & Shibasaki, T. (2009). Gender differences in corticotropin and corticosterone secretion and corticotropin-releasing factor mRNA expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and the central nucleus of the amygdala in response to footshock stress or psychological. *Psychoneuroendocrinology*, 34(2), 226–37.
- Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1997). Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of Learning and Memory*, 68(3), 285–316.
- Jarvis, S., Moinard, C., Robson, S. K., Baxter, E., Ormandy, E., Douglas, A. J., Lawrence, A. B. (2006). Programming the offspring of the pig by prenatal social stress: neuroendocrine activity and behaviour. *Hormones and Behavior*, 49(1), 68–80.
- Johansson, S., Price, J., & Modo, M. (2008). Effect of inflammatory cytokines on major histocompatibility complex expression and differentiation of human neural stem/progenitor cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 26(9), 2444–54.
- Jost, S., & Altfeld, M. (2013). Control of human viral infections by natural killer cells. *Annual Review of Immunology*, 31, 163–94.

- Kaplan, M. H. (2013). Th9 cells: differentiation and disease. *Immunological Reviews*, 252(1), 104–115.
- Kapoor, A., Dunn, E., Kostaki, A., Andrews, M. H., & Matthews, S. G. (2006). Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. *The Journal of Physiology*, 572(Pt 1), 31–44.
- Kay, G., Tarcic, N., Poltyrev, T., & Weinstock, M. (1998). Prenatal stress depresses immune function in rats. *Physiology & Behavior*, 63(3), 397–402.
- Kerschensteiner, M., Gallmeier, E., Behrens, L., Leal, V. V., Misgeld, T., Klinkert, W. E., Hohlfeld, R. (1999). Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *The Journal of Experimental Medicine*, 189(5), 865–870.
- Kim, J. J., & Yoon, K. S. (1998). Stress: metaplastic effects in the hippocampus. *Trends in Neurosciences*, 21(12), 505–9.
- Kim, J. M., Kim, D. H., Lee, Y., Park, S. J., & Ryu, J. H. (2014). Distinct roles of the hippocampus and perirhinal cortex in GABA receptor blockade-induced enhancement of object recognition memory. *Brain Research*, 1552, 17–25.
- Klein, S. L., & Rager, D. R. (1995). Prenatal stress alters immune function in the offspring of rats. *Developmental Psychobiology*, 28(6), 321–36.
- Klinkert, W. E., Kojima, K., Lesslauer, W., Rinner, W., Lassmann, H., & Wekerle, H. (1997). TNF-alpha receptor fusion protein prevents experimental auto-immune encephalomyelitis and demyelination in Lewis rats: an overview. *Journal of Neuroimmunology*, 72(2), 163–8.
- Korsching, S. (1993). The Neurotrophic Factor Concept: A Reexamination. *The Journal of Neuroscience*, 13(July), 2739–2748.
- Labouyrie, E., Parrens, M., de Mascarel, a, Bloch, B., & Merlio, J. P. (1997). Distribution of NGF receptors in normal and pathologic human lymphoid tissues. *Journal of Neuroimmunology*, 77(2), 161–73.

- Laverty, R., & Taylor, K. M. (1968). The fluorometric assay of catecholamines and related compounds: improvements and extensions to the hydroxyindole technique. *Analytical Biochemistry*, 22(2), 269–79.
- Leal, G., Comprido, D., & Duarte, C. B. (2014). BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology*, 76 Pt C, 639–56.
- Lemaire, V., Koehl, M., Le Moal, M., & Abrous, D. N. (2000). Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(20), 11032–7.
- Levi-Montalcini, R. (1987). The Nerve Growth Factor: thirty-five years later. *The EMBO Journal*, 6(9), 2856.
- Levine, A. G., Arvey, A., Jin, W., & Rudensky, A. Y. (2014). Continuous requirement for the TCR in regulatory T cell function. *Nature Immunology*, 15(11), 1070–1078.
- Lin, R., Liu, J., Peng, N., Gan, W., Wang, W., Han, C., & Ding, C. (2006). Lovastatin reduces apoptosis and downregulates the CD40 expression induced by TNF-alpha in cerebral vascular endothelial cells. *Current Neurovascular Research*, 3(1), 41–7.
- Llorente, E., Brito, M. L., Machado, P., & González, M. C. (2002). Effect of prenatal stress on the hormonal response to acute and chronic stress and on immune parameters in the offspring. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 58(3), 143–9.
- Loftis, J. M., Wilhelm, C. J., Vandenbark, A. A., & Huckans, M. (2013). Partial MHC/neuroantigen peptide constructs: a potential neuroimmune-based treatment for methamphetamine addiction. *PLoS One*, 8(2), e56306.
- Long, E. O., Kim, H. S., Liu, D., Peterson, M. E., & Rajagopalan, S. (2013). Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annual Review of Immunology*, 31, 227–58.
- Lynch, J. J., Castagné, V., Moser, P. C., & Mittelstadt, S. W. (2011). Comparison of methods for the assessment of locomotor activity in rodent safety pharmacology studies. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 64(1), 74–80.

- Lynch, M. A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiological Reviews*, *84*(1), 87–136. doi:10.1152/physrev.00014.2003
- Ma, S., & Morilak, D. A. (2005). Chronic intermittent cold stress sensitises the hypothalamic-pituitary-adrenal response to a novel acute stress by enhancing noradrenergic influence in the rat paraventricular nucleus. *Journal of Neuroendocrinology*, *17*(11), 761–9.
- Maccari, S., Darnaudery, M., Morley-Fletcher, S., Zuena, a. R., Cinque, C., & Van Reeth, O. (2003). Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *27*(1-2), 119–127.
- Maccari, S., & Morley-Fletcher, S. (2007). Effects of prenatal restraint stress on the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and related behavioural and neurobiological alterations. *Psychoneuroendocrinology*, *32 Suppl 1*, S10–5.
- Maccari, S., Piazza, P. V., Kabbaj, M., Barbazanges, A., Simon, H., & Le Moal, M. (1995). Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *15*(1 Pt 1), 110–6.
- Madden, K. S., Moynihan, J. A., Brenner, G. J., Felten, S. Y., Felten, D. L., & Livnat, S. (1994). Sympathetic nervous system modulation of the immune system. III. Alterations in T and B cell proliferation and differentiation in vitro following chemical sympathectomy. *Journal of Neuroimmunology*, *49*(1-2), 77–87.
- Marchetti, B., Morale, M. C., Testa, N., Tirolo, C., Caniglia, S., Amor, S., Barden, N. (2001). Stress, the immune system and vulnerability to degenerative disorders of the central nervous system in transgenic mice expressing glucocorticoid receptor antisense RNA. *Brain Research. Brain Research Reviews*, *37*(1-3), 259–72.
- McAlees, J. W., Smith, L. T., Erbe, R. S., Jarjoura, D., Ponzio, N. M., & Sanders, V. M. (2011). Epigenetic regulation of beta2-adrenergic receptor expression in T(H)1 and T(H)2 cells. *Brain, Behavior, and Immunity*, *25*(3), 408–15.
- McEwen, B. S. (1998). Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *840*, 33–44.

- McEwen, B. S. (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiological Reviews*, 87(3), 873–904.
- Medzhitov, R., & Janeway, C. (2000). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews*, 173, 89–97.
- Merlot, E., Couret, D., & Otten, W. (2008). Prenatal stress, fetal imprinting and immunity. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22(1), 42–51.
- Meziane, H., Ouagazzal, a-M., Aubert, L., Wietrych, M., & Krezel, W. (2007). Estrous cycle effects on behavior of C57BL/6J and BALB/cByJ female mice: implications for phenotyping strategies. *Genes, Brain, and Behavior*, 6(2), 192–200.
- Michelsen, K. a, van den Hove, D. L. a, Schmitz, C., Segers, O., Prickaerts, J., & Steinbusch, H. W. M. (2007). Prenatal stress and subsequent exposure to chronic mild stress influence dendritic spine density and morphology in the rat medial prefrontal cortex. *BMC Neuroscience*, 8, 107.
- Milad, M. A., Ludwig, E. A., Anné, S., Middleton, E., & Jusko, W. J. (1994). Pharmacodynamic model for joint exogenous and endogenous corticosteroid suppression of lymphocyte trafficking. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 22(6), 469–80.
- Miller, D. B., & O'Callaghan, J. P. (2002). Neuroendocrine aspects of the response to stress. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 51(6 Suppl 1), 5–10.
- Moalem, G., Gdalyahu, A., Shani, Y., Otten, U., Lazarovici, P., Cohen, I. R., & Schwartz, M. (2000). Production of neurotrophins by activated T cells: implications for neuroprotective autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, 15(3), 331–45.
- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M. C., ... Moretta, L. (2001). Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annual Review of Immunology*, 19, 197–223.
- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews. Immunology*, 8(12), 958–69.
- Motoyoshi-Yamashiro, A., Tamura, M., Moriyama, M., Takano, K., Kawabe, K., Nakajima, H., Nakamura, Y. (2013). Activation of cultured astrocytes by amphotericin B:

- stimulation of NO and cytokines production and changes in neurotrophic factors production. *Neurochemistry International*, 63(2), 93–100.
- Murakami, S., Imbe, H., Morikawa, Y., Kubo, C., & Senba, E. (2005). Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly. *Neuroscience Research*, 53(2), 129–39.
- Nisticò, G., & De Sarro, G. (1991). Is interleukin 2 a neuromodulator in the brain? *Trends in Neurosciences*, 14(4), 146–50.
- O'Keefe, J., & Nadel, L. (1978). *The Hippocampus as a Cognitive Map* (p. 600). Oxford: Clarendon Press.
- Oitzl, M. S., Champagne, D. L., van der Veen, R., & de Kloet, E. R. (2010). Brain development under stress: hypotheses of glucocorticoid actions revisited. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 34(6), 853–66.
- Orlovsky, M. a, Dosenko, V. E., Spiga, F., Skibo, G. G., & Lightman, S. L. (2014). Hippocampus remodeling by chronic stress accompanied by GR, proteasome and caspase-3 overexpression. *Brain Research*, 1593, 83–94.
- Otten, W., Kanitz, E., Couret, D., Veissier, I., Prunier, A., & Merlot, E. (2010). Maternal social stress during late pregnancy affects hypothalamic-pituitary-adrenal function and brain neurotransmitter systems in pig offspring. *Domestic Animal Endocrinology*, 38(3), 146–56.
- Palermo Neto, J., Massoco, C. O., & Fávare, R. C. (2001). Effects of maternal stress on anxiety levels, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. *Neurotoxicology and Teratology*, 23(5), 497–507.
- Palumbo, L., Rios, H., Zubilete, Z., Guelman, L. R., Cremaschi, G. A., & Mari, A. (2007). Loss of hippocampal neuronal nitric oxide synthase contributes to the stress-related deficit in learning and memory, 261–274.
- Palumbo, M. L., Canzobre, M. C., Pascuan, C. G., Ríos, H., Wald, M., & Genaro, A. M. (2010). Stress induced cognitive deficit is differentially modulated in BALB/c and C57Bl/6 mice: correlation with Th1/Th2 balance after stress exposure. *Journal of Neuroimmunology*, 218(1-2), 12–20.

- Panaroni, C., & Wu, J. Y. (2013). Interactions between B lymphocytes and the osteoblast lineage in bone marrow. *Calcified Tissue International*, 93(3), 261–8.
- Parker, V. J., & Douglas, A. J. (2010). Stress in early pregnancy: maternal neuroendocrine-immune responses and effects. *Journal of Reproductive Immunology*, 85(1), 86–92.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14(3), 149–67.
- Rice, D., & Barone, S. (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environmental Health Perspectives*, 108 Suppl , 511–33.
- Russo-Neustadt, A., Ha, T., Ramirez, R., & Kessler, J. P. (2001). Physical activity-antidepressant treatment combination: impact on brain-derived neurotrophic factor and behavior in an animal model. *Behavioural Brain Research*, 120(1), 87–95.
- Sanders, V. M. (2012). The beta2-adrenergic receptor on T and B lymphocytes: do we understand it yet? *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(2), 195–200.
- Shibayama, E., & Koizumi, H. (1996). Cellular localization of the Trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues. *The American Journal of Pathology*, 148(6), 1807–18.
- Silberman, D. M., Ayelli-Edgar, V., Zorrilla-Zubilete, M., Zieher, L. M., & Genaro, A. M. (2004). Impaired T-cell dependent humoral response and its relationship with T lymphocyte sensitivity to stress hormones in a chronic mild stress model of depression. *Brain, Behavior, and Immunity*, 18(1), 81–90.
- Silberman, D. M., Wald, M. R., & Genaro, A. M. (2003). Acute and chronic stress exert opposing effects on antibody responses associated with changes in stress hormone regulation of T-lymphocyte reactivity. *Journal of Neuroimmunology*, 144(1-2), 53–60.
- Silberman, D. M., Zorrilla-Zubilete, M., Cremaschi, G. A., & Genaro, A. M. (2005). Protein kinase C-dependent NF-kappaB activation is altered in T cells by chronic stress. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 62(15), 1744–54.

- Silverman, M. N., Pearce, B. D., Biron, C. A., & Miller, A. H. (2005). Immune modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during viral infection. *Viral Immunology*, *18*(1), 41–78.
- Smith, M. a, Makino, S., Kvetnanský, R., & Post, R. M. (1995). Effects of stress on neurotrophic factor expression in the rat brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *771*, 234–9.
- Sobrian, S. K., Vaughn, V. T., Ashe, W. K., Markovic, B., Djuric, V., & Jankovic, B. D. (1997). Gestational Exposure to Loud Noise Alters the Development and Postnatal Responsiveness of Humoral and Cellular Components of the Immune System in Offspring 1 , 2, *241*, 227–241.
- Son, G. H., Geum, D., Chung, S., Kim, E. J., Jo, J.-H., Kim, C.-M., ... Kim, K. (2006). Maternal stress produces learning deficits associated with impairment of NMDA receptor-mediated synaptic plasticity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *26*(12), 3309–18.
- Soria, J. A., Arroyo, D. S., Gaviglio, E. A., Rodriguez-Galan, M. C., Wang, J. M., & Iribarren, P. (2011). Interleukin 4 induces the apoptosis of mouse microglial cells by a caspase-dependent mechanism. *Neurobiology of Disease*, *43*(3), 616–24.
- Sorrells, S. F., & Sapolsky, R. M. (2007). An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain, Behavior, and Immunity*, *21*(3), 259–72.
- Spooren, A., Kolmus, K., Laureys, G., Clinckers, R., De Keyser, J., Haegeman, G., & Gerlo, S. (2011). Interleukin-6, a mental cytokine. *Brain Research Reviews*, *67*(1-2), 157–83.
- Sudakov, S. K., Nazarova, G. A., Alekseeva, E. V., & Bashkatova, V. G. (2013). Estimation of the level of anxiety in rats: differences in results of open-field test, elevated plus-maze test, and Vogel's conflict test. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, *155*(3), 295–7.
- Takahashi, M., Shirakawa, O., Toyooka, K., Kitamura, N., Hashimoto, T., Maeda, K., ... Nawa, H. (2000). Abnormal expression of brain-derived neurotrophic factor and its receptor in the corticolimbic system of schizophrenic patients. *Molecular Psychiatry*, *5*(3), 293–300.

- Takeo, M., Yoshikawa, H., Kurokawa, M., Takeba, Y., Kashiwakura, J.-I., Sakaguchi, M., Suzuki, N. (2004). Th1-dominant shift of T cell cytokine production, and subsequent reduction of serum immunoglobulin E response by administration in vivo of plasmid expressing Txk/RIk, a member of Tec family tyrosine kinases, in a mouse model. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 34(6), 965–70.
- Tatro, E. T., Soontornniyomkij, B., Letendre, S. L., & Achim, C. L. (2014). Cytokine secretion from brain macrophages infected with human immunodeficiency virus in vitro and treated with raltegravir. *BMC Infectious Diseases*, 14, 386.
- Tessarollo, L. (1998). Pleiotropic functions of neurotrophins in development. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 9(2), 125–37.
- Turrin, N. P., & Rivest, S. (2004). Unraveling the molecular details involved in the intimate link between the immune and neuroendocrine systems. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 229(10), 996–1006.
- Vallée, M., Mayo, W., Dellu, F., Le Moal, M., Simon, H., & Maccari, S. (1997). Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(7), 2626–36.
- Vallée, M., Mayo, W., Maccari, S., Le Moal, M., & Simon, H. (1996). Long-term effects of prenatal stress and handling on metabolic parameters: relationship to corticosterone secretion response. *Brain Research*, 712(2), 287–292.
- Vanbesien-Mailliot, C. C. a, Wolowczuk, I., Mairesse, J., Viltart, O., Delacre, M., Khalife, J., Maccari, S. (2007). Prenatal stress has pro-inflammatory consequences on the immune system in adult rats. *Psychoneuroendocrinology*, 32(2), 114–24.
- Vankelecom, H., Carmeliet, P., Van Damme, J., Billiau, A., & Deneef, C. (1989). Production of interleukin-6 by folliculo-stellate cells of the anterior pituitary gland in a histiotypic cell aggregate culture system. *Neuroendocrinology*, 49(1), 102–6.
- Vazquez-Sanroman, D., Sanchis-Segura, C., Toledo, R., Hernandez, M. E., Manzo, J., & Miquel, M. (2013). The effects of enriched environment on BDNF expression in the

- mouse cerebellum depending on the length of exposure. *Behavioural Brain Research*, 243, 118–28.
- Vega, J. a, García-Suárez, O., Hannestad, J., Pérez-Pérez, M., & Germanà, A. (2003). Neurotrophins and the immune system. *Journal of Anatomy*, 203(1), 1–19.
- Wang, C.-T., Shui, H.-A., Huang, R.-L., Tai, M.-Y., Peng, M.-T., & Tsai, Y.-F. (2006). Sexual motivation is demasculinized, but not feminized, in prenatally stressed male rats. *Neuroscience*, 138(2), 357–64.
- Wang, N., Liang, H., & Zen, K. (2014). Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Frontiers in Immunology*, 5, 614.
- Wang, X. (2004). The unexpected consequences of a noisy environment. *Trends in Neurosciences*, 27(7), 364–6.
- Watson, P. D., Voss, J. L., Warren, D. E., Tranel, D., & Cohen, N. J. (2013). Spatial reconstruction by patients with hippocampal damage is dominated by relational memory errors. *Hippocampus*, 23(7), 570–80.
- Watzl, C., Urlaub, D., Fasbender, F., & Claus, M. (2014). Natural killer cell regulation - beyond the receptors. *F1000prime Reports*, 6, 87.
- Webster, E. L., Barrientos, R. M., Contoreggi, C., Isaac, M. G., Ligier, S., Gabry, K. E., Sternberg, E. M. (2002). Corticotropin releasing hormone (CRH) antagonist attenuates adjuvant induced arthritis: role of CRH in peripheral inflammation. *The Journal of Rheumatology*, 29(6), 1252–61.
- Webster, J. I., Tonelli, L., & Sternberg, E. M. (2002). Neuroendocrine regulation of immunity. *Annual Review of Immunology*, 20, 125–63.
- Weinstock, M. (2001). Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Progress in Neurobiology*, 65(5), 427–51.
- Weinstock, M., Poltyrev, T., Schorer-Apelbaum, D., Men, D., & McCarty, R. (1998). Effect of prenatal stress on plasma corticosterone and catecholamines in response to footshock in rats. *Physiology & Behavior*, 64(4), 439–44.

- Weinstock, M., Razin, M., Schorer-apelbaum, D., Men, D., & Mccarty, R. (1998). Gender differences in sympathoadrenal activity in rats at rest and in response to footshock stress. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 16(3-4), 289–295.
- Wisniewska, M., Pyrzynska, B., & Kaminska, B. (2004). Impaired AP-1 dimers and NFAT complex formation in immature thymocytes during in vivo glucocorticoid-induced apoptosis. *Cell Biology International*, 28(11), 773–80.
- Zhu, L.-J., Liu, M.-Y., Li, H., Liu, X., Chen, C., Han, Z., Zhou, Q.-G. (2014). The different roles of glucocorticoids in the hippocampus and hypothalamus in chronic stress-induced HPA axis hyperactivity. *PloS One*, 9(5), e97689.
- Zhu, S.-W., Codita, A., Bogdanovic, N., Hjerling-Leffler, J., Ernfors, P., Winblad, B., Mohammed, A. H. (2009). Influence of environmental manipulation on exploratory behaviour in male BDNF knockout mice. *Behavioural Brain Research*, 197(2), 339–46.