



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN  
PSICOLOGÍA**  
NEUROCIENCIAS DE LA CONDUCTA

EFFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL O POSTNATAL  
SOBRE EL DESARROLLO DE LA BARRERA  
HEMATOENCEFÁLICA EN LA RATA (*Rattus norvegicus*)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTORA EN PSICOLOGÍA**

P R E S E N T A

**BEATRIZ GÓMEZ GONZÁLEZ**

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Director: DR. ALFONSO ESCOBAR

Comité: DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES

DRA. GABRIELA MORALÍ DE LA BRENA

DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ

ECHEAGARAY

DR. FRUCTUOSO AYALA GUERRERO

DRA. MAGDALENA GIORDANO LOYOLA

DR. JAVIER VELÁZQUEZ-MOCTEZUMA

MEXICO D.F.

Noviembre 2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**A Jorge**

**A mis padres Beatriz E. González y Armando Gómez**

**A mis hermanas Ada, Nadia y mi sobrina Mildred**

## AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM por el apoyo económico brindado al presente proyecto de investigación, que forma parte del proyecto titulado Efectos del estrés sobre el desarrollo de la barrera hematoencefálica en la rata (PAPIIT IN219407) a cargo del Dr. Alfonso Escobar.

A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado para realizar los estudios de Doctorado en Psicología en el campo Neurociencias de la Conducta (becario 188838).

Al Dr. Alfonso Escobar por la valiosa contribución a mi formación académica, por brindarme la oportunidad de aprender sobre la labor de investigación, y por inculcarme con el ejemplo la pasión por la investigación científica.

A las Doctoras Carolina Escobar Briones y Gabriela Morali de la Brena por su valiosa contribución a mi formación académica durante cinco años de tutorías rigurosas y productivas.

A los miembros del Jurado de Examen de Grado, cuyos comentarios y sugerencias contribuyeron a mejorar la Tesis.

A la Dra. Carolina Escobar Briones por proveer generosamente el kit de corticosterona en rata Coat-A Count y por su valiosa ayuda técnica y guía en la realización de la técnica de radioinmunoensayo.

Al Dr. Horacio Merchant Larios por proveer generosamente de los reactivos y equipo necesarios para la técnica de microscopía electrónica y por su valiosa ayuda en la obtención de las microfotografías al microscopio electrónico.

Al Dr. Roberto Salgado por su valiosa ayuda técnica y guía en la realización de la técnica de radioinmunoensayo.

Al Sr. José Guadalupe Baltazar y al Mtro. Alejandro Marmolejo por su valiosa ayuda técnica en el procesamiento de los tejidos y de las placas para microscopía electrónica.

A María Guadalupe Flores Cruz por la lectura crítica de la versión final del manuscrito, por su valiosa colaboración durante los experimentos del proyecto de investigación y por las atinadas discusiones y preguntas de curiosidad que me permitieron conocer más sobre lo que me era desconocido.

A Jorge Alberto Ruiz Vázquez por su valiosa ayuda y guía en el análisis estadístico de los datos y por su inapreciable apoyo y atenta escucha ante los devenires de mi proyecto de investigación.

## TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
Definición de estrés.....	3
Sustrato neurobiológico de la respuesta de estrés.....	5
Estrés durante la gestación y el período postnatal temprano.....	9
Funciones de las hormonas del estrés durante el desarrollo embrionario y fetal..	9
Respuesta de estrés materna durante la gestación.....	10
Respuesta de estrés fetal.....	12
Respuesta de estrés durante el período postnatal temprano.....	15
Estructura y función de la barrera hematoencefálica.....	17
Células endoteliales.....	18
Glicocalix.....	22
Pericitos.....	23
Astroglia.....	23
Microglia.....	25
Lámina o membrana basal.....	26
Desarrollo de la barrera hematoencefálica.....	27
Efectos de las hormonas del estrés sobre los componentes celulares de la barrera hematoencefálica.....	32
Efectos del estrés sobre el funcionamiento de la barrera hematoencefálica en animales adultos.....	34
Efectos del estrés sobre el desarrollo de la barrera hematoencefálica.....	35
JUSTIFICACIÓN.....	37
Consecuencias funcionales del desarrollo alterado de la barrera hematoencefálica.....	37
OBJETIVO GENERAL.....	39
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
HIPÓTESIS.....	39
MÉTODO.....	40

Sujetos.....	40
Diseño del experimento.....	40
Materiales.....	41
Procedimiento.....	42
Habitación a las condiciones experimentales.....	42
Estrés Prenatal.....	42
Estrés Postnatal.....	42
Estudio del efecto del estrés prenatal o postnatal sobre el desarrollo de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.....	43
Estudio del mecanismo por el que el estrés prenatal o postnatal altera el desarrollo funcional de la barrera hematoencefálica (estudio ultraestructural).....	45
Estudio del efecto del estrés prenatal o postnatal sobre el desarrollo y distribución de la microglia.....	47
Cuantificación de corticosterona en plasma.....	50
Análisis estadístico.....	51
RESULTADOS.....	52
Efecto del estrés prenatal o postnatal sobre el peso corporal y el peso cerebral.....	52
Concentración de corticosterona en plasma.....	53
Efecto del estrés prenatal o postnatal sobre el desarrollo funcional de la barrera hematoencefálica.....	55
Efecto del procedimiento de administración del colorante azul de Evans (intracardiaca versus intraperitoneal) sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en el grupo control.....	68
Mecanismo por el que el estrés prenatal o postnatal altera el desarrollo funcional de la barrera hematoencefálica (estudio ultraestructural).....	68
Desarrollo anatómico de la barrera hematoencefálica en el grupo control.....	71
Efectos del estrés crónico perinatal sobre el desarrollo anatómico de la barrera hematoencefálica.....	73
Efecto del estrés prenatal o postnatal sobre el desarrollo y distribución de la microglia.....	82
Desarrollo de la microglia en el grupo control.....	82
Efecto del estrés prenatal o postnatal sobre el desarrollo y distribución de la microglia.....	89
DISCUSIÓN.....	103

Respuesta de estrés durante la gestación y etapa postnatal temprana.....	105
Desarrollo de la barrera hematoencefálica en el grupo control.....	109
Desarrollo de la microglia en el grupo control.....	110
Efecto del estrés sobre el desarrollo anatómico y funcional de la barrera hematoencefálica.....	112
Efecto del estrés sobre el desarrollo y patrón de distribución de la microglia.....	116
Consecuencias funcionales del desarrollo alterado de la barrera hematoencefálica.....	119
CONCLUSIÓN.....	120
REFERENCIAS.....	122
ANEXO 1: CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DEL COLORANTE AZUL DE EVANS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	143

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### FIGURAS

Figura 1. Eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales en la rata.....	7
Figura 2. Componentes de la barrera hematoencefálica en los mamíferos.....	18
Figura 3. Complejo de unión entre las células endoteliales de la barrera hematoencefálica.....	20
Figura 4. Diseño experimental del proyecto.....	40
Figura 5. Estadios del desarrollo de las uniones ocluyentes entre las células endoteliales que forman la barrera hematoencefálica.....	47
Figura 6. Estadios de desarrollo de la microglia en la rata.....	49
Figura 7. Desarrollo de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al colorante azul de Evans en el grupo control.....	57
Figura 8. Desarrollo de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al colorante azul de Evans en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal (cortes coronales).....	59
Figura 9. Desarrollo de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al colorante azul de Evans en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal (cortes sagitales).	60
Figura 10. Permeabilidad de la barrera hematoencefálica en la neocorteza de los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal.....	61
Figura 11. Permeabilidad de la barrera hematoencefálica en varias regiones encefálicas de los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal.....	62
Figura 12. Concentración del colorante azul de Evans (M) en las distintas regiones de neocorteza en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en los días postnatales 10, 20 y 30.....	65
Figura 13. Concentración del colorante azul de Evans (M) en otras regiones encefálicas en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en los días postnatales 10, 20 y 30.....	66
Figura 14. Distribución del colorante azul de Evans en el hipocampo de crías control, expuestas a estrés prenatal y estrés postnatal.....	67
Figura 15. Efecto del procedimiento de administración del colorante azul de Evans sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en el grupo control en los días postnatales 1, 10, 20 y 30.....	69



Figura 16. Densidad vascular en la formación hipocámpica en las crías control y expuestas a estrés prenatal o postnatal.....	70
Figura 17. Desarrollo del glicocalix en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal.....	75
Figura 18. Transporte de la WGA-peroxidasa mediado por vesículas pinocíticas en los capilares hipocámpicos de los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal.....	77
Figura 19. Cuerpos multivesiculares en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en los días postnatales 1, 10, 20 y 30.....	78
Figura 20. Difusión paracelular de la WGA-peroxidasa en los capilares hipocámpicos del grupo control y expuesto a estrés prenatal.....	80
Figura 21. Hendiduras intercelulares en los capilares hipocámpicos de la cría expuesta a estrés prenatal y de la cría control de un mes de edad.....	81
Figura 22. Desarrollo de la microglia en los reservorios gliales del grupo control.....	84
Figura 23. Patrón de desarrollo de la microglia ramificada tipo 3 en el grupo control en los días postnatales 1 a 30.....	86
Figura 24. Patrón de desarrollo de la microglia ramificada tipo 4 en el grupo control en los días postnatales 1 a 30.....	87
Figura 25. Densidad total de microglia en el grupo control en los días postnatales 1 a 30.....	88
Figura 26. Desarrollo de la microglia en los reservorios gliales en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en los días postnatales 1 y 10.....	90
Figura 27. Efecto del estrés sobre el patrón de desarrollo de la microglia en el día postnatal 1.....	91
Figura 28. Desarrollo de la microglia en los reservorios gliales en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en los días postnatales 20 y 30.....	92
Figura 29. Densidad total de microglia en la neocorteza en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en los días postnatales 1 a 30.....	93
Figura 30. Densidad total de microglia en el hipocampo, cerebelo y núcleos grises subcorticales en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en los días postnatales 1, 10, 20 y 30.....	94

Figura 31. Densidad de microglia tipo 3 en la neocorteza en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en los días postnatales 1 a 30.....	97
Figura 32. Densidad de microglia tipo 3 en el hipocampo, cerebelo y núcleos grises subcorticales en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en los días P1 a P30.....	98
Figura 33. Densidad de microglia tipo 4 en la neocorteza en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en los días postnatales 1 a 30.....	99
Figura 34. Densidad de microglia tipo 4 en el hipocampo, cerebelo y núcleos grises subcorticales en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en los días P1 a P30.....	100
Figura 35. Características morfológicas de la microglia ramificada en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal de 20 días de edad.....	101

## **TABLAS**

Tabla 1. Peso corporal y peso cerebral en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en los días postnatales 1, 10, 20 y 30.....	53
Tabla 2. Concentración de corticosterona en plasma en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal.....	54
Tabla 3. Cantidad administrada de azul de Evans por vía ic. a los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en cada una de las edades estudiadas.....	56
Tabla 4. Concentración de azul de Evans en distintas estructuras nerviosas de los grupos control y estrés prenatal en el día postnatal 1.....	63
Tabla 5. Densidad de capilares hipocámpicos en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en todas las edades estudiadas.....	71
Tabla 6. Desarrollo de las características ultraestructurales de la barrera hematoencefálica en el grupo control.....	72
Tabla 7. Desarrollo de las uniones ocluyentes en los capilares hipocámpicos del grupo control.....	73
Tabla 8. Características ultraestructurales de la barrera hematoencefálica en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal.....	74
Tabla 9. Características ultraestructurales de las uniones ocluyentes en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en los días postnatales 1, 10, 20 y 30.....	79

Tabla 10. Densidad de microglia encefálica en el grupo control en los días postnatales 1 a 30.....	83
--	----

Tabla 11. Densidad de microglia encefálica en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en los días postnatales 1 a 30.....	102
--	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS

A	Amígdala
ACTH	Hormona Adrenocorticotrofa
BO	Bulbo olfativo
BR	Bulbo raquídeo
Cer	Cerebelo
CRH	Hormona Liberadora de Corticotrofina
CS	Corteza de la glándula suprarrenal
CxA	Corteza auditiva
CxC	Corteza del cíngulo
CxF	Corteza frontal
CxI	Corteza de la ínsula
CxE	Corteza entorrinal
CxM	Corteza motora
CxO	Corteza orbitofrontal
CxS	Corteza somatosensorial
CxV	Corteza visual
D	Diencéfalo
E	Día de la gestación
GB	Ganglios basales
H	Hipotálamo
Hip	Hipocampo
ic.	Intracardiaca
ip.	Intraperitoneal
M	Mesencéfalo
N	Neocorteza
NPVH	Núcleo Paraventricular del Hipotálamo
P	Puente
P1-P30	Días postnatales 1-30
S	Septum
T	Tálamo
TC	Tallo cerebral

## **RESUMEN**

En el adulto el estrés modifica la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a moléculas circulantes en la sangre; sin embargo se desconoce el efecto que ejerce durante fases tempranas de la vida sobre la barrera hematoencefálica inmadura. En el presente proyecto se buscó elucidar el efecto del estrés crónico prenatal o postnatal sobre el desarrollo anatómico y funcional de la barrera hematoencefálica en la rata Wistar.

El procedimiento de estrés prenatal consistió en nado forzado de la rata madre en los días 10-20 de la gestación. La exposición a estrés postnatal se llevó a cabo entre los días postnatales 2-20 y consistió en la separación diaria madre-cría durante 3hrs. El grupo control permaneció libre de toda manipulación de estrés durante los períodos prenatal y postnatal temprano. El desarrollo de la barrera hematoencefálica se estudió mediante la administración de los trazadores azul de Evans y la lectina del grano de trigo acoplada a peroxidasa de rábano, seguida de la determinación de su acceso al parénquima cerebral en los días postnatales 1-30. Adicionalmente se estudió el desarrollo y distribución de la microglia.

El estrés crónico perinatal aumentó la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al azul de Evans, el aumento estuvo asociado a incremento en el transporte transendotelial mediado por caveolas y a la mayor difusión paracelular de macromoléculas circulantes en la sangre. Paralelamente, el estrés *in utero* y el estrés postnatal promovieron microgliosis reactiva en todo el encéfalo de las crías de 20 días postnatales. El estrés perinatal también aceleró el desarrollo anatómico de los capilares que conforman la barrera hematoencefálica y de la microglia.

La activación prolongada del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales durante la gestación y etapa postnatal temprana pudo haber afectado el desarrollo de la barrera hematoencefálica y promover la microgliosis reactiva; ambos hallazgos indican daño probable en distintas regiones nerviosas.

## **ABSTRACT**

Acute stress increases blood-brain barrier permeability to circulating tracers in the adult mammal; however it is unknown whether early-life stress might alter blood-brain barrier development. This study investigated the effect of perinatal stress on blood-brain barrier development in the Wistar rat. Forced swimming between gestational days 10-20 was used as a stress procedure in pregnant rats. After delivery, half of the control litters underwent 3hr maternal separation from postnatal day 2-20. Controls were kept without any stress manipulations. At sacrifice between postnatal days 1-30 subjects were given intracardiac Evans blue or the lectin wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase to study blood-brain barrier development. Additionally, microglial development and distribution were studied at the same ages.

Chronic perinatal stress increased Evans blue entry to the whole brain. Prenatal stress increased caveolae-mediated transport and promoted higher paracellular diffusion of the electrodense marker throughout brain endothelial cells as compared to control pups; meanwhile postnatal stress only increased caveolae-mediated transport in brain endothelial cells. Both stress procedures produced reactive microgliosis at the age of the higher blood-brain barrier permeability. Prenatal and postnatal stress also accelerated microvascular development as compared to controls. In addition, *in utero* stress promoted an accelerated microglial development previous to the age of maximal tracer blood-brain barrier permeability.

In conclusion chronic perinatal stress altered blood-brain barrier development by increasing caveolae-mediated transport in brain endothelial cells. The increased blood-brain barrier permeability in the stress groups might have promoted reactive microgliosis; both findings suggest probable damage to the nervous system. The underlying mechanism may be related to the chronic activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis.

## Definición de estrés

*The concept of stress is not unlike many other life events;  
it is difficult to live with but impossible to live without.*

*Levine y Ursin, 1991.*

El vocablo inglés más antiguo del cual deriva el término *stress* es *stresse*; empleado durante la Edad Media para hacer referencia a las dificultades de la vida. *Stresse* tiene su origen en las voces del francés antiguo *destresse* y *estrece*, ambas con significados de opresión y sufrimiento. Los dos vocablos franceses se originan a su vez de *strictia*, vulgata de *strictus*. En latín, el término *strictus* es el pasado participio de *stringere*, que denotaba oprimir, apretar o atar (Webster's New World Dictionary, 1980; American Heritage Dictionary, 1992). En el idioma español se usa el término *estrés*, que es la adaptación gráfica de la voz inglesa *stress* (Diccionario Panhispánico de Dudas, 2005). A pesar de su connotación original, el término *estrés* se usó inicialmente en el campo de la Ingeniería para hacer referencia a la fuerza o sistema de fuerzas que, aplicadas sobre una estructura o un metal, conducen a la deformación (Merriam-Webster's Collegiate Dictionary, 1998). En 1936 Hans Selye introdujo el término *estrés* al campo de las ciencias biológicas para denotar un síndrome producido por diversos agentes nocivos que promovía la adaptación del organismo a su medio cambiante.

Desde su introducción a las ciencias biológicas, el término *estrés* se ha usado con distintos significados (Levine y Ursin, 1991). La mayoría de las definiciones de *estrés* se agrupan en tres clases:

1. Estrés como estímulo (*estresores*)
2. Estrés como sistemas de procesamiento (p. ej. experiencia subjetiva de estrés)
3. Estrés como respuesta

Las definiciones que consideran al *estrés* como estímulo se basan únicamente en la presencia y características de los estímulos externos o internos percibidos como aversivos, que demandan del organismo algún tipo de respuesta adaptativa (Gerrig y Zimbardo, 2005). Los *estresores* o estímulos de *estrés* pueden ser estímulos físicos (p. ej. descargas eléctricas) o psicológicos (p. ej. separación materna), que tienen la propiedad de alterar el equilibrio

interno del organismo (alostasis<sup>1</sup>) (Levine y Ursin, 1991). Los estresores se caracterizan con base en cinco dimensiones: intensidad, duración, frecuencia, controlabilidad y predictabilidad (Anisman y Merali, 1999; Gerrig y Zimbardo, 2005). Por ejemplo, en cuanto a la intensidad, al igual que ocurre con estímulos neutros y reforzadores, la presencia continua de estresores percibidos como de baja intensidad produce habituación; mientras que la exposición intermitente a estímulos aversivos de gran intensidad produce hiper-reactividad fisiológica y conductual. En cuanto a la frecuencia, los estresores pueden presentarse de manera puntual durante períodos reducidos (estrés agudo) o bien durante períodos prolongados (estrés crónico). El efecto de los estresores también varía en función del grado de control y predicción que pueda tener el organismo sobre la presentación de los mismos; la falta de percepción de control sobre la presencia del estresor y la imposibilidad para predecir el inicio del mismo promueven un estado de activación en el que las demandas se perciben como superiores a los recursos para lidiar con ellas (Levine y Ursin, 1991; Anisman y Merali, 1999; Gerrig y Zimbardo, 2005).

Desde la perspectiva de la definición de estrés como sistema de procesamiento, se considera que el filtraje de la información y las diferencias individuales producto del desarrollo, de la experiencia durante la etapa adulta, de la genética y de las interacciones sociales, constituyen el eje determinante de la experiencia de estrés. Así, el estrés varía en función de la expectativa que el individuo tiene del estímulo y de la expectativa de las consecuencias de la respuesta (filtraje de la información). Los estímulos que generan estrés generalmente se presentan asociados con otros estímulos que por sí mismos no producen carga psicológica, pero, dada su asociación con el estímulo aversivo, sirven como estímulos discriminativos; la malinterpretación de tales estímulos discriminativos modifica la expectativa del estímulo, y propicia el uso de mecanismos de defensa (p. ej. negación). Por otro lado, la expectativa de las consecuencias de la respuesta influye sobre la respuesta fisiológica o conductual que el organismo presente ante el evento aversivo. Existen tres clases de expectativas de las consecuencias de la respuesta; afrontamiento exitoso, indefensión y desesperanza (Levine y Ursin, 1991).

---

<sup>1</sup> Alostasis: literalmente significa mantener estabilidad (homeostasis) a través del cambio. Se refiere al mantenimiento del equilibrio fisiológico y conductual ante situaciones cambiantes (Sterling y Eyer, 1988; McEwen, 1998).



Finalmente, el término estrés también se ha definido con base únicamente en las características de la respuesta del organismo ante situaciones aversivas; así, estrés es el patrón de respuestas específicas o inespecíficas de un organismo ante estímulos adversos que alteran su equilibrio y sobrepasan su capacidad para lidiar con el evento (Levine y Ursin, 1991; Anisman y Merali, 1999; Gerrig y Zimbardo, 2005; American Psychological Association, 2008). El estrés comprende múltiples cambios fisiológicos y conductuales que promueven un estado de activación generalizada (Levine y Ursin, 1991). Como se deduce de las definiciones previas, estrés es un concepto compuesto y multidimensional, los tres tipos de definiciones del término estrés comparten algunos componentes y de hecho se complementan (Levine y Ursin, 1991); sin embargo, por separado no denotan todo el fenómeno de estrés.

Desde el punto de vista de la Psicología (Keller y Schoenfeld, 1950; Sidman, 1960) y de la Fisiología (Bernard, 1930) una definición completa de cualquier fenómeno implica la descripción de los cambios fisiológicos o conductuales que tuvieron lugar en el organismo y los eventos o estímulos que antecedieron a los cambios observados; por lo que, para definir el término estrés es necesario incluir la descripción del estímulo, el sistema de procesamiento y la respuesta (Levine y Ursin, 1991). En ese contexto, en el presente trabajo se considera que el concepto estrés denota la relación que existe entre estímulos aversivos que perturban gravemente la homeostasis del organismo y las respuestas, fisiológicas o conductuales, ante la estimulación aversiva (definición adaptada de Levine y Ursin, 1991; Kim y Diamond, 2002).

### **Sustrato neurobiológico de la respuesta de estrés**

Durante la exposición del organismo a estímulos adversos que alteran la homeostasis ocurren múltiples cambios fisiológicos y conductuales que varían en magnitud y especificidad en función de la intensidad, duración, controlabilidad, predictabilidad y frecuencia del estresor (Chrousos, 1998). Los principales componentes de la respuesta fisiológica de estrés son las hormonas suprarrenales, adrenalina y glucocorticoides. La adrenalina, liberada por las células cromafines de la médula de la glándula suprarrenal, activa los componentes inmediatos e inespecíficos de la respuesta de estrés. La adrenalina aumenta las tasas cardíaca y respiratoria, la presión arterial y los niveles de glucosa en la sangre, produce

vasoconstricción en la piel y el tracto gastrointestinal y vasodilatación en la musculatura estriada (Nelson, 2000). Por otro lado, los glucocorticoides liberados por la corteza de la glándula suprarrenal, alteran el balance de fluidos y electrolitos, aumentan el tono vascular, y promueven lipólisis, gluconeogénesis y catabolismo del glucógeno hepático, con lo que aumenta aún más la energía disponible para que el organismo haga frente a la situación aversiva (Chrousos, 1998; Owen et al., 2005). También como parte de la respuesta inmediata ante el evento adverso, los glucocorticoides inhiben el funcionamiento de sistemas considerados prescindibles durante la fase aguda de exposición al estresor, como el sistema inmune y el digestivo; además, detienen el crecimiento corporal al suprimir la secreción de la hormona de crecimiento y su acción sobre los tejidos blanco, y al disminuir la producción de la hormona estimulante de la tiroides, con la consecuente reducción en la secreción de las hormonas tiroideas (tri-iodo tironina y tiroxina) (Chrousos, 1998).

Además de la adrenalina y los glucocorticoides, la respuesta fisiológica de estrés incluye aumento en la concentración sanguínea de vasopresina, que junto con la adrenalina aumenta la presión arterial; liberación de prolactina por parte de la glándula hipófisis, que suprime temporalmente al sistema reproductivo; aumento en la liberación de glucagón por parte de las células  $\alpha$  del páncreas, con lo que aumenta aún más la disponibilidad de glucosa; y la liberación de endorfinas y encefalinas, cuya función es producir analgesia (Nelson, 2000). Conductualmente la respuesta de estrés incluye activación generalizada, alerta, vocalización, conductas agresivas y alteraciones en el procesamiento de la información (Chrousos, 1998).

La respuesta de estrés está controlada por el sistema nervioso central y la coordinación que ejerce sobre los sistemas que mantienen la homeostasis, el sistema nervioso autónomo, el endócrino y el inmune (Gómez-González y Escobar, 2002). En las zonas sensoriales primarias del encéfalo (corteza sensoriales primarias y núcleos subcorticales) se procesan inicialmente los diversos estímulos aversivos que alteran la homeostasis. Desde las zonas sensoriales primarias, la información de los estímulos aversivos pasa a zonas de asociación unimodal y heteromodal, y desde allí llega a las estructuras del sistema límbico, circunvolución del cíngulo, corteza prefrontal y orbitofrontal, amígdala e hipocampo. Las estructuras límbicas están ampliamente interconectadas con las zonas del encéfalo que mantienen la homeostasis, el hipotálamo y los núcleos autónomos del tallo cerebral, y con las

regiones corticales motoras (Truex y Carpenter, 1971), lo que permite el control de la respuesta conductual de estrés.

En los mamíferos el principal efector de la respuesta de estrés es el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales (Selye, 1950, Figura 1). Las neuronas de la porción parvicelular del núcleo paraventricular hipotalámico secretan hormona liberadora de corticotrofina (CRH) y vasopresina en la capa externa de la eminencia media. Ambas neurohormonas entran a la circulación porta hipofisiaria; la hormona liberadora de corticotrofina estimula la secreción de hormona adrenocorticotrofa (ACTH) por las células corticotrofas de la adenohipófisis, y la vasopresina potencia el efecto estimulador de la CRH sobre la producción de ACTH. La ACTH entra a la circulación sistémica y tiene como órgano blanco la corteza de las glándulas suprarrenales. Las células de la zona fasciculada de la corteza suprarrenal secretan glucocorticoides subsecuente a la estimulación con la ACTH; en el ser humano el principal glucocorticoide es el cortisol, mientras que en roedores como la rata y el ratón, es la corticosterona (Nelson, 2000).

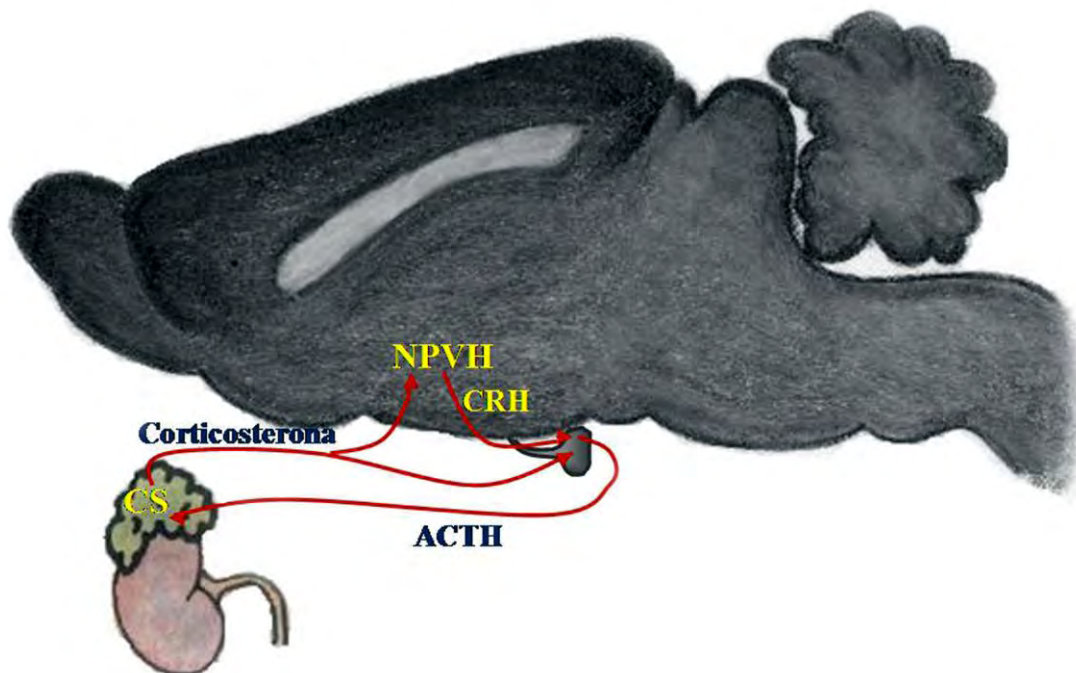


Figura 1. Eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales en la rata.

Los glucocorticoides son los efectores finales del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales y los principales reguladores del mismo. Los glucocorticoides cruzan la barrera hematoencefálica gracias a sus propiedades lipofílicas (Pardridge y Mietus, 1979) y se acoplan a sus receptores localizados en la adenohipófisis, en las neuronas y neuroglia del núcleo paraventricular del hipotálamo y de otras regiones del sistema límbico, como el hipocampo, la amígdala, el septum lateral y la corteza prefrontal (McEwen et al., 1969). En la adenohipófisis y núcleo paraventricular del hipotálamo los glucocorticoides ejercen retroalimentación negativa sobre la síntesis y liberación de ACTH y CRH, respectivamente; de igual forma, los glucocorticoides reducen la expresión de los receptores a CRH y vasopresina en las células corticotrofas hipofisarias (Tasker et al., 2006). Otra importante vía de inhibición del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales secundaria al aumento en la concentración plasmática de glucocorticoides es a través de la formación hipocámpica. Los glucocorticoides aumentan la excitabilidad de las neuronas piramidales del sector CA1 del hipocampo y con ello propician la activación de neuronas GABAérgicas localizadas en la región perifornical alrededor del núcleo paraventricular del hipotálamo; la activación de esas interneuronas perifornicales inhibe la secreción de CRH y vasopresina de las neuronas parvicelulares del NPVH en la capa externa de la eminencia media (Tasker et al., 2006; de Kloet et al., 2008).

Los glucocorticoides se acoplan a dos tipos de receptores intracelulares: receptor tipo I o mineralocorticoide, que posee alta afinidad para aldosterona y progesterona *in vivo* y para los glucocorticoides corticosterona y cortisol *in vitro*; y receptor tipo II o glucocorticoide, con alta afinidad para los glucocorticoides endógenos (corticosterona y cortisol) y sintéticos (dexametasona) (Joëls, 2006; de Kloet et al., 2008). Los receptores intracelulares tipo I (receptor mineralocorticoide) se saturan en condiciones basales de glucocorticoides circulantes; mientras que, la ocupación de los receptores tipo II (receptor glucocorticoide) ocurre cuando aumenta la concentración plasmática de cortisol o corticosterona en el momento del pico máximo del ritmo circadiano de liberación de glucocorticoides, por exposición del organismo a estresores, o por administración exógena de glucocorticoides naturales o sintéticos (Duman, 1995, Joëls, 2006; Joëls et al., 2007).

Los otros efectores de la respuesta de estrés, el sistema nervioso autónomo y el sistema motor, están controlados parcialmente por el núcleo paraventricular hipotalámico y por el sistema límbico. Las neuronas parvicelulares del núcleo paraventricular envían proyecciones que forman parte del fascículo longitudinal dorsal a núcleos autónomos del tallo cerebral, a neuronas preganglionares del sistema nervioso simpático y a motoneuronas del asta ventral de la médula espinal. Los blancos del núcleo paraventricular en el tallo cerebral son el núcleo motor dorsal del vago, implicado en la generación de los cambios cardiovasculares observados durante estrés, la sustancia gris periacueductal, relacionada con la producción de analgesia asociada a estrés, el núcleo dorsal del rafe y el locus coeruleus, ambos relacionados con el alertamiento y el estado de talante. En la médula espinal, los blancos de las proyecciones del núcleo paraventricular son las neuronas preganglionares simpáticas ubicadas en el núcleo intermediolateral de los segmentos torácico 1 a lumbar 2, y las motoneuronas  $\alpha$  del asta ventral de la médula espinal implicadas en el control de la respuesta motora de estrés (pelear o huir) (Cullinan et al., 1995).

### **Estrés durante la gestación y el período postnatal temprano**

#### *Funciones de las hormonas de estrés durante el desarrollo embrionario y fetal*

Durante la gestación, los glucocorticoides y la hormona liberadora de corticotrofina ejercen funciones tróficas que promueven el desarrollo embrionario y fetal normal, así como el inicio del parto (Kitraki et al., 1997; Challis et al., 2000; Kalantaridou et al., 2007). La hormona liberadora de corticotrofina se libera también de forma parácrina por las glándulas endometriales, el estroma endometrial decidualizado y la placenta (Kalantaridou et al., 2007). La hormona liberadora de corticotrofina promueve la implantación del blastocisto y la tolerancia inmunológica del embrión durante la gestación temprana; en la rata, los sitios de implantación en el endometrio presentan concentraciones de hormona liberadora de corticotrofina 3.5 veces superiores a las observadas en los sitios inter-implantación durante los primeros cinco días post-fertilización. La hormona liberadora de corticotrofina induce la expresión del receptor de muerte FasL en el trofoblasto y las células de la decidua placentaria materna, con lo que se induce apoptosis de los linfocitos T activados que llegan al útero, a través de la interacción Fas-FasL (Makrigiannakis et al., 2001).

Los glucocorticoides en niveles fisiológicos promueven la diferenciación y maduración de diversos tejidos embrionarios durante el período de organogénesis (Kitraki et al., 1997). Los glucocorticoides ejercen sus funciones tróficas a través de sus receptores intracelulares localizados en casi todas las células del organismo desde etapas fetales tempranas (Kitraki et al., 1997; Ghosh et al., 2000). En la rata, el ARNm para el receptor tipo II de glucocorticoides aparece alrededor del día embrionario 12 (E12) en el primordio del hígado; posteriormente, a partir de E13, el ARNm para el receptor glucocorticoide se expresa en los tejidos derivados de las tres capas embrionarias conforme inicia el desarrollo de cada órgano. Así, en el sistema nervioso central el ARNm para el receptor tipo II comienza a expresarse a partir de E13 y en la glándula suprarrenal en E15 (Kitraki et al., 1997). La expresión del ARNm para el receptor glucocorticoide coincide con la terminación de la organogénesis básica, en E13 en la rata, y el inicio de la etapa de diferenciación fetal. Una vez que el tejido se diferenció, disminuye la expresión del ARNm para el receptor glucocorticoide tipo II hasta los niveles característicos observados en el adulto (Kitraki et al., 1997).

#### *Respuesta de estrés materna durante la gestación*

Al inicio de la gestación se presenta reducción en los niveles basales de corticosterona circulante que alcanza su punto mínimo en el día 10 de la gestación en la rata (Brunton y Russel, 2008). A partir de la segunda semana de gestación, los niveles plasmáticos basales de corticosterona aumentan progresivamente hasta el momento del parto (Dupouy et al., 1975; Neumann et al., 1998; Takahashi et al., 1998; Slattery y Neumann, 2008). En los mamíferos placentarios, la exposición a estresores durante la gestación induce menor magnitud en la liberación de corticosterona y de hormona liberadora de corticotrofina en comparación con hembras vírgenes expuestas a la misma situación adversa (Neumann et al., 1998; Brunton y Russel, 2008; Slattery y Neumann, 2008). A pesar de la hiporrespuesta de estrés, la exposición a estresores al final de la gestación puede inducir hasta 100% de aumento en la concentración plasmática de corticosterona materna (Neumann et al., 1998; Takahashi et al., 1998). Adicionalmente, la exposición a estresores durante la gestación promueve que disminuya la concentración plasmática materna de globulina

transportadora de corticosteroides; con lo que aumenta la cantidad de glucocorticoides libres en plasma (Takahashi et al., 1998).

La hipo-respuesta de estrés durante la gestación es producto de la baja reactividad de las células corticotrofas de la adenohipófisis a los efectos estimulantes de la hormona liberadora de corticotrofina (Neumann et al., 1998). Al final de la gestación en la rata también ocurre disminución en los niveles del ARNm para la hormona liberadora de corticotrofina en el núcleo paraventricular hipotalámico, con la reducción concomitante en la liberación de esa neurohormona en la capa externa de la eminencia media. Adicionalmente, en el núcleo paraventricular hipotalámico se presenta aumento en la expresión de la enzima 11 $\beta$ -deshidrogenasa hidroxisteroidea tipo 1, que convierte glucocorticoides inactivos (11-ceto) en fisiológicamente activos; así, hay mayor concentración de corticosterona en la porción parvicelular del núcleo paraventricular hipotalámico y con ello se promueve que los glucocorticoides ejerzan mayor retroalimentación negativa sobre la activación del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales (Brunton y Russell, 2008).

En los mamíferos placentarios, la exposición fetal a las hormonas de estrés ocurre por incremento en la concentración plasmática de las mismas en la madre antes del período de organogénesis y, posteriormente por la activación conjunta del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales fetal y materno (Dupouy et al., 1975; Takahashi et al., 1998). El paso de glucocorticoides a través de la placenta está limitado por la enzima 11 $\beta$ -deshidrogenasa hidroxisteroidea tipo 2; que cataliza el metabolismo de los glucocorticoides maternos y/o fetales en esteroides 11-ceto fisiológicamente inactivos, como la cortisona y la 11-dehidrocorticosterona (Brown et al., 1996; Seckl, 1997). En la rata, la 11 $\beta$ -deshidrogenasa hidroxisteroidea tipo 2 presenta niveles bajos de expresión placentaria en comparación con la placenta humana (Mulder et al., 2002); además, los niveles placentarios de la enzima y de su ARNm varían en función del avance de la gestación (Burton et al., 1996; Staud et al., 2006). A partir de E16 en la rata y hasta el momento del parto, se presenta 90% de reducción en los niveles de la enzima 11 $\beta$ -deshidrogenasa hidroxisteroidea tipo 2 en la zona laberíntica placentaria, el principal sitio de recambio fetal/materno; paralelamente, a partir del mismo día de la gestación, aumenta la expresión placentaria del ARNm y de la enzima 11 $\beta$ -deshidrogenasa hidroxisteroidea

tipo 1 (Burton et al., 1996; Staud et al., 2006). Tal covariación en la expresión de ambas enzimas,  $11\beta$ -deshidrogenasa hidroxisteroidea tipo 1 y 2, permite que aproximadamente el 70% de la corticosterona circulante en la madre gestante en condiciones basales pueda entrar a la circulación fetal (Zarrow et al., 1970). Adicionalmente, la exposición crónica a estrés materno durante el período de organogénesis y diferenciación fetal, reduce la expresión de la enzima  $11\beta$ -deshidrogenasa hidroxisteroidea tipo 2 en la placenta, con lo que aumenta la transferencia de corticosterona de la circulación materna a la fetal (Mairesse et al., 2007). Así, la exposición materna a estresores crónicos puede aumentar hasta en 36% la concentración plasmática de corticosterona fetal (Takahashi et al., 1998).

Además de los glucocorticoides, durante toda la gestación continúa la liberación de hormona liberadora de corticotrofina por las glándulas endometriales, el estroma endometrial decidualizado y la placenta (Kalantaridou et al., 2007) y, al igual que ocurre con la corticosterona, los niveles uterinos de la CRH aumentan hacia el final de la gestación (Avishai-Eliner et al., 2002). A diferencia de la retroalimentación negativa que ejercen los glucocorticoides sobre el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales, en la placenta la corticosterona incrementa la liberación de hormona liberadora de corticotrofina a la circulación materna y fetal; de modo que tanto la hormona liberadora de corticotrofina como los glucocorticoides maternos pueden entrar a la circulación fetal y estimular al eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales en desarrollo (Avishai-Eliner et al., 2002).

#### *Respuesta de estrés fetal*

En la rata el hipotálamo surge entre E12 a E13 (Uylings et al., 1990); el núcleo paraventricular se genera junto con otros núcleos hipotalámicos mediales entre E13 a E15 (Ifft, 1972). Las neuronas de la porción parvocelular del núcleo paraventricular de hipotálamo surgen en E15; mientras que las neuronas de la porción magnocelular se originan más tempranamente, en E13 en la rata (Ifft, 1972). A partir de E17 inicia la expresión del ARNm para la hormona liberadora de corticotrofina en las neuronas parvicelulares del núcleo paraventricular hipotalámico y ya en E18 los axones de las neuronas parvicelulares secretan hormona liberadora de corticotrofina en la capa externa de la eminencia media (Korosi y Baram, 2008). La expresión del ARNm para la hormona liberadora de corticotrofina es intensa durante E18 y E19, disminuye durante el período perinatal y alcanza los niveles observados en el adulto al final de la primera semana



postnatal en la rata. A pesar que el ARNm para el receptor glucocorticoide comienza a expresarse en el núcleo paraventricular hipotalámico en E16 en la rata, los glucocorticoides no influyen sobre la síntesis y liberación de la hormona liberadora de corticotrofina hipotalámica hasta el final de la primera semana postnatal (Korosi y Baram, 2008).

El desarrollo anatómico y funcional de la glándula hipófisis inicia desde etapas tempranas del desarrollo embrionario. La neurohipófisis deriva del neuroectodermo y se forma producto de la extensión del piso del tercer ventrículo. En los mamíferos el origen de la adenohipófisis es el techo de la cavidad oral, formada probablemente por células derivadas de las crestas neurales (Dubois et al., 1997). En E11 en la rata se forma el precursor de la adenohipófisis, el saco de Rathke; a partir de ese momento inicia la diferenciación de los distintos tipos celulares que constituyen la hipófisis anterior. Las células corticotrofas son las primeras en diferenciarse de un precursor diferente del resto de los linajes celulares de la adenohipófisis (Dubois et al., 1997). Las células corticotrofas se diferencian morfológica y funcionalmente entre E15 y E16 en la rata (Dubois et al., 1997; Taniguchi et al., 2002); desde E15, la transcripción del precursor de la ACTH es sensible a los efectos de la hormona liberadora de corticotrofina placentaria y de los glucocorticoides maternos (Dubois et al., 1997).

Las células de la glándula suprarrenal derivan de dos capas embrionarias, ectodermo y mesodermo; las células cromafines de la médula suprarrenal derivan de las crestas neurales y los distintos tipos celulares de la corteza suprarrenal derivan de células epiteliales celómicas presentes en la cresta urogenital (Mitani et al., 1999; Keegan y Hammer, 2002; Gilbert, 2003). El primordio adrenogonadal es el precursor embrionario de la corteza de la glándula suprarrenal y de las gónadas, aparece en la cresta urogenital en E11.5 en la rata (Morohashi, 1997). Propiamente, el primordio de la glándula suprarrenal se forma a partir de la condensación de células celómicas en E12; entre E12 a E14 inicia la migración de los precursores de las células cromafines desde las crestas neurales. Hacia E15 en la rata ocurre la encapsulación de la glándula suprarrenal por células capsulares mesenquimatosas (Keegan y Hammer, 2002). En E18, la glándula suprarrenal fetal presenta las características histológicas de la etapa madura, con zonas corticales y médula bien definidas (Roos, 1957). La ACTH es el principal factor trófico que regula el crecimiento y diferenciación de la corteza de la glándula suprarrenal fetal (Keegan y Hammer, 2002). La

diferenciación funcional de la corteza suprarrenal sucede a la diferenciación morfológica (Mitani et al., 1999); la zona fasciculada comienza a sintetizar glucocorticoides a partir de E17 en la rata (Dupoy et al., 1975; Mitani et al., 1999). Después del nacimiento en roedores aparece la zona X adyacente a la médula suprarrenal. La zona X contiene células esteroidogénicas e involuciona en el día postnatal 38, edad de maduración sexual en los machos, y durante la primera gestación en las hembras (Keegan y Hammer, 2002). Al final de la primera semana postnatal, la estructura histológica de la glándula suprarrenal y la zonación funcional de la misma están completamente establecidas (Mitani et al., 1999; Keegan y Hammer, 2002).

Los glucocorticoides sintetizados y liberados por la glándula suprarrenal fetal también atraviesan la barrera placentaria y pueden influir sobre la fisiología materna al final de la gestación; en la rata entre E19 a E21, más del 70% de la corticosterona circulante en la madre proviene de la corteza suprarrenal fetal. Además, en condiciones libres de estrés, el nivel plasmático de corticosterona es mayor en los fetos que en la madre durante E17 a E20 (Dupoy et al., 1975). Al final de la gestación en la rata aumenta progresivamente la concentración de corticosterona circulante en la madre y en el feto, debido a hiperactivación de la corteza suprarrenal fetal (Dupouy et al., 1975); tal aumento en la concentración de glucocorticoides fetales desencadena las cascadas hormonales que propician el parto en los mamíferos (Wada, 2008).

En condiciones de aumento en la concentración de corticosterona en el plasma materno por exposición a estrés crónico desde el inicio de la gestación, la concentración plasmática de corticosterona fetal al final de la gestación aumenta más del 30% respecto al nivel basal (Takahashi et al., 1998). En el feto, a pesar de la expresión temprana del receptor glucocorticoide y de su ARNm en el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales y en las estructuras límbicas que participan en la modulación de la respuesta de estrés (a partir de E15), los glucocorticoides no ejercen retroalimentación negativa sobre la activación del eje HPA (Ghosh et al., 2000); por lo que ante la exposición a estrés materno, la corteza suprarrenal fetal también aumenta la síntesis y liberación de glucocorticoides (Wada, 2008).

Dentro de la circulación fetal, los glucocorticoides penetran rápidamente la barrera hematoencefálica aún inmadura y alcanzan al sistema nervioso en desarrollo (Ayra et al.,

2006); en el parénquima nervioso, los glucocorticoides se acoplan a sus receptores intracelulares, localizados en las células madre neurales, en las neuronas (Clayton et al., 1977), en la neuroglia y otros tipos celulares que constituyen la barrera hematoencefálica (Bohn et al., 1991; Wolff et al., 1992; Tanaka et al., 1997). El aumento en los niveles de glucocorticoides durante la gestación retrasa el desarrollo fetal y neonatal, y ejerce efectos teratogénos (Ghosh et al., 2000). La presencia de efectos dismorfogénicos y funcionales fetales por exposición a estrés crónico materno depende de los glucocorticoides liberados por la corteza suprarrenal materna; la adrenalectomía materna previa a la exposición crónica a estresores abole los efectos adversos, fisiológicos y conductuales, del estrés *in utero* (Barbazanges et al., 1996; Zagron y Weinstock, 2006).

Adicionalmente, el aumento en la concentración de glucocorticoides subyace a los efectos dismorfogénicos ejercidos por una gran variedad de factores teratogénos (p. ej. diazepam y fenitoína). Algunas de las alteraciones morfológicas producidas o agravadas por exposición a niveles elevados de glucocorticoides durante el período de organogénesis son el paladar hendido, labio leporino, inducción de costillas supernumerarias y dismorfogénesis encefálica (Ghosh et al., 2000). La exposición crónica a niveles elevados de glucocorticoides durante la gestación también induce programación fisiológica dependiente de hormonas<sup>2</sup> en el hígado y el sistema vascular. Así, el estrés prenatal aumenta la susceptibilidad a padecer hipertensión arterial y síndrome metabólico (síndrome X o dismetabólico) (Seckl, 2001; Owen et al., 2005).

#### *Respuesta de estrés durante el período postnatal temprano*

En la rata, después del nacimiento y hasta la tercera semana postnatal, la corteza suprarrenal del neonato presenta hipoactividad, con disminución en la cantidad de glucocorticoides sintetizados y liberados (Sapolsky y Meaney, 1986). En las primeras 36 horas posteriores al nacimiento, los niveles basales de corticosterona circulante se reducen drásticamente en comparación con los niveles plasmáticos fetales observados durante la gestación tardía (Sapolsky y Meaney, 1986; Levine et al., 2000). De manera concomitante, ante la exposición a estresores, la liberación de corticosterona por la corteza suprarrenal es de menor magnitud en los recién nacidos en comparación con individuos adultos de la

---

<sup>2</sup> Programación dependiente de hormonas: inducción de cambios perdurables en la fisiología de órganos y sistemas por la exposición durante fases tempranas del desarrollo a hormonas como los glucocorticoides.

misma especie; en la rata entre los días postnatales 2 a 15, la magnitud del cambio en la concentración plasmática de corticosterona ante la exposición a estrés es de sólo 50-80% (Sapolsky y Meaney, 1986). Así, esa etapa del desarrollo en los roedores, recibe el nombre de período de hipo-respuesta de estrés (Sapolsky y Meaney, 1986; Levine et al., 2000). Al final de la segunda semana postnatal y durante la tercera semana postnatal, los niveles basales de corticosterona plasmática en las crías de rata se aproximan en magnitud a los niveles observados en el adulto; además, ocurre aumento de 200-400% en la concentración plasmática de corticosterona ante la exposición a estresores (Sapolsky y Meaney, 1986).

Durante el período de hipo-respuesta de estrés también se observa baja reactividad de la zona fasciculada a los efectos esteroideogénicos de la ACTH. En la adenohipófisis, el contenido de la ACTH es bajo durante los primeros 5 días postnatales y a partir del inicio de la segunda semana postnatal comienza a incrementarse. Asimismo, durante la primera semana postnatal el contenido de la hormona liberadora de corticotrofina en la eminencia media es 80% menor al observado en la rata a los 21 días postnatales (Sapolsky y Meaney, 1986). A pesar de la magnitud reducida en la liberación de corticosterona por la corteza suprarrenal durante las primeras dos semanas postnatales, la vida media de la corticosterona plasmática en el neonato es 3 veces superior a la observada en el adulto (Sapolsky y Meaney, 1986; Levine et al., 2000). Adicionalmente, la concentración de globulina transportadora de corticosteroides es muy reducida durante la lactancia, por lo que la cantidad de corticosterona libre en plasma puede ser superior en el neonato en comparación con roedores adultos (Levine et al., 2000).

El concepto de hipo-respuesta de estrés solo se restringe a la corteza de la glándula suprarrenal del neonato, puesto que los otros componentes del eje hipotálamo-hipófisis-glándula suprarrenal, presentan cambios significativos de actividad ante la exposición del neonato a estresores (Levine et al., 2000). En la rata, el núcleo paraventricular hipotalámico y la adenohipófisis son capaces de aumentar la secreción de las hormonas CRH y ACTH, respectivamente, ante la exposición del neonato a estresores durante las primeras dos semanas postnatales (Levine et al., 2000; Korosi y Baram, 2008). Ambas respuestas ante la exposición a estresores se caracterizan por mantenerse por períodos prolongados aún cuando el estresor ya no esté presente (Levine et al., 2000), debido a que la retroalimentación negativa de los glucocorticoides sobre el eje hipotálamo-hipófisis-

glándula suprarrenal aparece hasta después del día postnatal 10 en la rata (Ghosh et al., 2000; Levine et al., 2000).

La hipoactivación de la corteza suprarrenal durante las primeras semanas postnatales en mamíferos altricios evita los efectos teratógenos que tales hormonas pudieran ejercer sobre el desarrollo del sistema nervioso central (Sapolsky y Meaney, 1986). Sin embargo, la exposición a estresores con el aumento concomitante en la concentración de corticosteroides y de hormona liberadora de corticotrofina durante la lactancia puede alterar los procesos del desarrollo del sistema nervioso central que se están llevando a cabo, como neurogénesis de interneuronas (Bohn y Lauder, 1978; Bohn, 1980; Gould et al., 1991a), muerte neuronal (Gould et al., 1991b) mielinización (Bohn y Friedrich, 1982), formación de la barrera hematoencefálica (Bär y Wolff, 1976; Krause et al., 2002) y gliogénesis (Bohn y Friedrich, 1982).

### **Estructura y función de la barrera hematoencefálica**

La barrera hematoencefálica es el sistema que mantiene la homeostasis del microambiente en el sistema nervioso central; entre sus funciones están la protección encefálica de los agentes potencialmente neurotóxicos circulantes en la sangre, el transporte activo y difusión de sustancias de los capilares al parénquima nervioso y el metabolismo de sustancias provenientes del encéfalo o de la sangre (Fishman, 1990). La barrera hematoencefálica se localiza en el 99% del endotelio capilar del encéfalo, excepto en el plexo coroideo y regiones encefálicas que rodean los ventrículos, denominadas órganos circunventriculares, que incluyen la eminencia media, la glándula pineal, la neurohipófisis, el área postrema y los órganos vasculares de la lámina terminal, subfornical, subcomisural y paraventricular (Patcher et al., 2003; Joly et al., 2007). La barrera hematoencefálica es una estructura celular compleja constituida por células endoteliales, pericitos, astrocitos, microglia perivascular, lámina basal y glicocalix (Figura 2) (Risau, 1991; Ballabh et al., 2004; Ueno, 2007). Todos esos tipos celulares son indispensables para el desarrollo y mantenimiento de las funciones de la barrera hematoencefálica; aunque, estrictamente, el tipo celular que provee de la función de barrera física a la barrera hematoencefálica son las células endoteliales (Risau, 1991; Abbott et al., 2006).

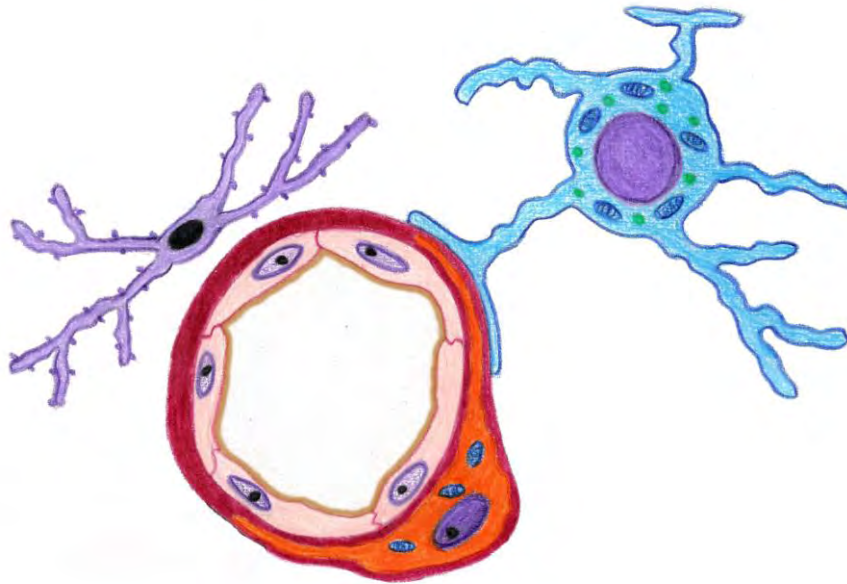


Figura 2. Componentes de la barrera hematoencefálica en los mamíferos. Células endoteliales (rosa), pericito (naranja), astroglia (azul), microglia perivascular (morado), lámina o membrana basal (rojo) y glicocalix (café). Modificada de Escobar y Gómez-González (2008).

### *Células endoteliales*

La pared de los capilares está constituida por una monocapa de células endoteliales (Peters et al., 1991; Ueno, 2007); los capilares del sistema nervioso central derivan de las dos arterias carótidas y de las arterias vertebrales (Truex y Carpenter, 1971). Al entrar por la leptomeninge las arterias ramifican en arteriolas (10-60 $\mu$ m de diámetro en la rata) y posteriormente en capilares (<10 $\mu$ m de diámetro en la rata) dentro de la corteza y estructuras subcorticales en el cerebro y cerebelo, así como en el tallo cerebral (Truex y Carpenter, 1971; Peters et al., 1991). Los capilares encefálicos se distribuyen más densamente en la sustancia gris que en la sustancia blanca y diferencialmente de una región nerviosa a otra en función de la densidad sináptica; en la rata, la densidad capilar es mayor en las regiones nerviosas con mayor densidad sináptica (Peters et al., 1991). Los capilares de la barrera hematoencefálica se caracterizan por ser continuos (no presentar fenestraciones<sup>3</sup>) y estar constituidos por una sola capa delgada de células endoteliales (0.2-

<sup>3</sup> Fenestración: especialización de la célula endotelial en la que las membranas luminal y abluminal se colapsan formando un diafragma de 40-60nm de ancho que posee poros que permiten la difusión de moléculas hidrofílicas <5.5nm (Peters et al., 1991).

0.3 $\mu$ m de espesor) que establecen uniones que impiden la difusión paracelular de moléculas hidrofílicas circulantes en la sangre (Abbott et al., 2006; Zlokovic, 2008).

Las células endoteliales encefálicas establecen uniones estrechas u ocluyentes, localizadas en la porción apical de la célula endotelial, y uniones adherentes, localizadas en la porción basolateral de la célula endotelial (Figura 3) (Abbott et al., 2006, Zlokovic, 2008). Las uniones ocluyentes o *zonulae occludentes* entre las células endoteliales dejan espacios entre una célula y otra de 12Å; se caracterizan ultraestructuralmente por la fusión aparente de la cara externa de la membrana de las células endoteliales adyacentes (Figura 3A) (Peters et al., 1991; Ueno, 2007). En la barrera hematoencefálica, la unión estrecha/ocluyente se forma por las interacciones homofílicas de las fosfoproteínas transmembranales claudinas 5, 3 y 12, que impiden la difusión paracelular de moléculas de distintos pesos moleculares; p. ej. en los roedores, la claudina-5 impide la difusión de moléculas cuyo peso sea menor a 800kDa (Zlokovic, 2008). La ocludina es otra fosfoproteína transmembranal presente en las uniones ocluyentes de los capilares que forman la barrera hematoencefálica; la ocludina contribuye a la alta resistencia eléctrica de la barrera hematoencefálica (4-8M $\Omega$ /cm<sup>2</sup> versus 0.1-0.2M $\Omega$ /cm<sup>2</sup> en capilares periféricos) y a la reducida permeabilidad paracelular. Las proteínas transmembranales de la unión ocluyente, claudinas y ocludina, se anclan al citoesqueleto de la célula endotelial a través de las proteínas accesorias *zónula occludens* 1, 2 y 3 (ZO-1, -2, -3), cingulina y 7H6 (Figura 3B). Adicionalmente, la unión ocluyente requiere para su mantenimiento de la presencia de las inmunoglobulinas denominadas moléculas de adhesión de la unión (*junctional adhesion molecules* JAM-A, -B y -C) (Abbott et al., 2006; Zlokovic, 2008). Por otro lado, las uniones adherentes entre las células endoteliales están conformadas por las interacciones homotípicas de las glicoproteínas transmembranales cadherinas (E-, P-, N-, y VE-Cadherina), que se anclan al citoesqueleto de la célula endotelial a través de las cateninas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (Figura 3B). Las uniones adherentes son indispensables para la formación de las uniones ocluyentes entre las células endoteliales y para el mantenimiento de la función de barrera física de la unión ocluyente (Abbott et al., 2006; Zlokovic, 2008).

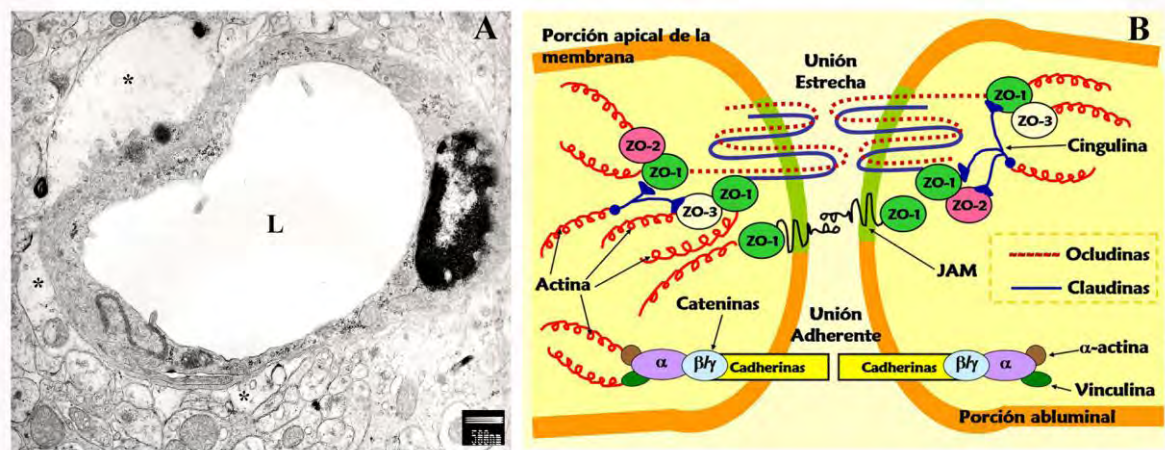


Figura 3. Complejo de unión entre las células endoteliales de la barrera hematoencefálica. A) Unión estrecha/ocluyente en un capilar del hipocampo de la rata, \* indican pies perivascuales de astrocitos. B) Proteínas que forman el complejo de unión entre las células endoteliales de la barrera hematoencefálica (unión estrecha/ocluyente y unión adherente). Tomada de Escobar y Gómez-González (2008).

Además de la reducida difusión paracelular de moléculas hidrofílicas, las células endoteliales que forman la pared de los capilares del sistema nervioso central poseen otras características especializadas que dan la función de barrera física a la barrera hematoencefálica. Las células endoteliales de la barrera hematoencefálica presentan limitado transporte mediado por caveolas (vesículas pinocíticas) en comparación con los capilares presentes en otros órganos y tejidos; en la rata adulta, la densidad de caveolas en los capilares que forman la barrera hematoencefálica es 5-10 vesículas/ $\mu\text{m}^2$  en comparación con  $>100$  vesículas/ $\mu\text{m}^2$  en otros órganos y tejidos (Peters et al., 1991; Nag, 2003a). Las caveolas son vesículas de 50-100nm de diámetro formadas a partir de invaginaciones de la membrana endotelial, típicamente con forma de omega ( $\Omega$ ). Dentro del citoplasma endotelial, las caveolas se encuentran agrupadas en estructuras similares a racimos de uva y rosetones, o bien fusionadas con otras vesículas formando túbulos o canales transcelulares (Razani et al., 2002; Frank et al., 2003). Las caveolas realizan transporte transcitótico de macromoléculas desde la superficie luminal del capilar hasta el espacio subendotelial. La membrana de las caveolas expresa receptores para transferrina, insulina, albúmina, lipoproteína de alta y baja densidad (LDL, HDL, por sus siglas en inglés), e interleucina 1



(IL1) entre otras moléculas (Zlokovic, 2008); la especificidad del material transportado por las caveolas varía en función del tamaño de la vesícula y de los receptores presentes en la porción de membrana endotelial desde la cual se forma la caveola (Frank et al., 2003).

Adicionalmente, las células endoteliales que forman la barrera hematoencefálica poseen mecanismos especializados para el transporte de glucosa y otros nutrientes indispensables para el adecuado funcionamiento neuronal, así como sistemas de extrusión de metabolitos neuronales y moléculas potencialmente neurotóxicas. En las membranas luminal y abluminal de las células endoteliales se localizan sistemas bidireccionales de transporte de glucosa, denominado transportador GLUT1 de 55kDa; el transportador de aminoácidos L1, que transporta aminoácidos neutros grandes como la tirosina, triptófano, leucina, isoleucina y fenilalanina; el transportador de aminoácidos y<sup>+</sup>, que transporta aminoácidos catiónicos como la lisina, arginina y ornitina; y el transportador de ácidos monocarboxílicos MCT1, que transporta lactato, piruvato y cuerpos cetónicos requeridos como fuentes de energía en el sistema nervioso central. En la célula endotelial también existen sistemas de transporte para nucleósidos, amins endógenas (p. ej. colina) y vitaminas (Zlokovic, 2008).

Los mecanismos de extrusión en las células endoteliales se encargan de transportar moléculas desde el líquido intersticial del sistema nervioso central y desde el interior de la célula endotelial hacia el lumen de los capilares. Los sistemas de extrusión de las células endoteliales incluyen los transportadores de aminoácidos ácidos excitadores (sistemas EAAT y X<sub>G</sub><sup>-</sup>), que transportan aminoácidos como el glutamato y aspartato; la glicoproteína P (P-gp), que extrude moléculas hidrofóbicas como antibióticos, analgésicos opioides y fármacos antiepilépticos; las proteínas asociadas a resistencia multidroga (MDRP-1, -2, -4, y -5), que transportan fármacos conjugados con glutatión, glucoronato o sulfato; y el sistema de transporte de iones orgánicos (OATP), que extrude compuestos con carga como los conjugados de estrógenos, prostaglandinas y nucleótidos cíclicos (Ueno, 2007; Zlokovic, 2008). Así, las características responsables de la función de barrera física y química de la barrera hematoencefálica se localizan a nivel del endotelio capilar; sin embargo, la formación y mantenimiento de las uniones ocluyentes, el número reducido de caveolas y la permeabilidad selectiva a moléculas circulantes en la sangre dependen de la presencia de los otros componentes celulares y acelulares de la barrera hematoencefálica (Risau, 1991; Abbott et al., 2006).

### *Glicocalix*

Glicocalix literalmente significa “cobertura de azúcar”. El glicocalix es una cubierta de polisacáridos que se forma en la superficie de distintos tipos celulares como células epiteliales, endoteliales y bacterias (Wikipedia, 2009). En las células endoteliales, el glicocalix se presenta en la membrana luminal y está constituido por proteoglicanos, glicosilaminoglicanos y proteínas plasmáticas captadas (Ueno, 2007). El espesor del glicocalix varía en función del diámetro del vaso sanguíneo; en los capilares el glicocalix es una capa de 0.2 a 0.5 $\mu$ m de espesor, en las pequeñas arterias el espesor varía entre 2 a 3 $\mu$ m, y en las grandes arterias (p. ej. las carótidas) puede llegar a medir 4.5 $\mu$ m (Reitsma et al., 2007). Los proteoglicanos constituyen las moléculas de anclaje del glicocalix a la membrana luminal de la célula endotelial; acoplados a los proteoglicanos están varias cadenas de glicosilaminoglicanos, constituidas por sulfato de heparan, sulfato de condroitina, sulfato de dermatan, sulfato de keratan y ácido hialurónico. Las proteínas plasmáticas captadas en la red de glicosilaminoglicanos y proteoglicanos, así como la sulfación de los glicosilaminoglicanos son los responsables de la carga eléctrica negativa característica del glicocalix (Reitsma et al., 2007).

El glicocalix contribuye a la función de barrera de la barrera hematoencefálica al modular la permeabilidad de las células endoteliales; la presencia de glicocalix en el lumen de los capilares encefálicos limita el acceso de moléculas circulantes en la sangre a la membrana de las células endoteliales y con ello disminuye potencialmente el transporte transendotelial mediado por caveolas. Adicional a la barrera física que constituye el glicocalix, la carga negativa del mismo repele tanto a elementos celulares de la sangre (p. ej. eritrocitos), como a proteínas plasmáticas con carga negativa (p. ej. albúmina e inmunoglobulinas); con lo que se evita la extravasación de elementos sanguíneos al líquido intersticial del sistema nervioso central (Noble et al., 1996; Reitsma et al., 2007). De hecho, la neutralización del glicocalix o su degradación aumenta la permeabilidad endotelial a albúmina y la diapédesis de eritrocitos y leucocitos (Noble et al., 1996; Reitsma et al., 2007; Ueno, 2007). Los sitios de formación de caveolas en la membrana de las células endoteliales presentan glicocalix neutralizado y aumento en la expresión de residuos de galactosil y N-acetilglucosamina (Noble et al., 1996).

### *Pericitos*

En la pared abluminal de los capilares y embebidos en la lámina basal se localizan los pericitos (peri- alrededor y cito- célula) (Balanov y Dore-Duffy, 1998). Los pericitos forman parte del linaje de células de músculo liso perivascular en el sistema nervioso central (Sims, 1986; Balanov y Dore-Duffy, 1998; Zlokovic, 2008). Además de la expresión de microfilamentos específicos de músculo liso, los pericitos extienden procesos citoplasmáticos (300-800 nm de espesor) con propiedades contráctiles alrededor de los vasos sanguíneos cerebrales (Sims, 1986; Balanov y Dore-Duffy, 1998); por lo que participan directamente en la regulación del flujo sanguíneo cerebral a través de la vasoconstricción o vasodilatación (Pappiatt et al., 2006). Los pericitos cubren entre el 20 y 30% de la superficie total de los vasos sanguíneos cerebrales en la rata; se distribuyen en arteriolas, capilares y vénulas, con mayor densidad en las vénulas (Balanov y Dore-Duffy, 1998; Lai y Kuo, 2005). En la microvasculatura cerebral existe un pericito por cada cinco células endoteliales (Balanov y Dore-Duffy, 1998; Nag, 2003a).

Se distinguen dos tipos de pericitos con base en sus características ultraestructurales: pericitos granulares y pericitos agranulares. Los pericitos granulares poseen gran cantidad de lisosomas y endosomas en su citoplasma; mientras que, los pericitos agranulares presentan escasos lisosomas (Nag, 2003a). Los pericitos establecen numerosos puntos de contacto con la célula endotelial; presentan uniones especializadas similares a las establecidas entre las células endoteliales (uniones ocluyentes y adherentes) y, además, establecen uniones comunicantes con las células endoteliales (Nag, 2003a; Zlokovic, 2008). Entre las funciones de los pericitos adicionales a la vasomotora, están la regulación de la proliferación y diferenciación de las células endoteliales (Sims, 1986; Shepro y Morel, 1993), el mantenimiento de la integridad de los capilares cerebrales (Sims, 1986; Nag, 2003a) y de las uniones ocluyentes entre las células endoteliales (Lai y Kuo, 2005), y el transporte o fagocitosis de sustancias que atravesaron la célula endotelial (Sims, 1986).

### *Astroglia*

La astroglia deriva del neuroectodermo y extiende procesos denominados pies perivascuales a los capilares del sistema nervioso central. Los pies perivascuales de los astrocitos cubren 85% de la superficie capilar total del encéfalo (Truex y Carpenter, 1971), se localizan en la pared abluminal de las células endoteliales, separados de ese tipo celular

por la lámina basal y ocasionalmente por pericitos y microglia perivascular (Risau, 1991). La astrogliia se distribuye en todas las regiones del encéfalo y médula espinal (Truex y Carpenter, 1971) formando microdominios de células individuales alrededor de la microvasculatura; tales microdominios parcelan al neuropilo en pequeñas unidades funcionales independientes que determinan la excitabilidad neuronal de la micro-región (cada dominio astrocítico abarca entre 20,000 a 120,000 sinapsis) (Nedergaard et al., 2003; Oberheim et al., 2009). En respuesta a la actividad nerviosa, los astrocitos presentan incremento en la concentración intracelular de  $Ca^{++}$ , que se extiende a varios microdominios de astrocitos adyacentes (Abbott et al., 2006; Fellin, 2009; Oberheim et al., 2009). Como un elemento celular de la barrera hematoencefálica, la astrogliia contribuye a mantener la alostasis del *milieu* nervioso; entre las funciones astrocitarias están controlar el equilibrio iónico y del pH en el tejido nervioso, y proporcionar glucosa y sustratos metabólicos a las neuronas (Ransom et al., 2003). Los astrocitos también participan en la modificación del flujo sanguíneo cerebral durante la actividad sináptica al liberar prostanoïdes e inducir vasodilatación (Zlokovic, 2008; Fellin, 2009). Adicionalmente, los astrocitos sintetizan los precursores y remueven de la sinapsis los neurotransmisores glutamato y ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA), regulan la neurogénesis y sinaptogénesis en el cerebro de mamíferos adultos (Ransom et al., 2003), y participan activamente en la estabilización sináptica, al liberar gliotransmisores que modifican la excitabilidad pre o postsináptica (sinapsis tripartita) (Fellin, 2009).

Los astrocitos típicamente poseen entre cinco y ocho ramificaciones principales, las cuales se dividen en múltiples ramas finas uniformemente distribuidas. Las ramificaciones principales son ricas en la proteína glial ácida fibrilar (GFAP), que es el principal componente de los filamentos intermedios de la astrogliia; mientras que las ramas secundarias no expresan la GFAP (Nedergaard et al., 2003). Morfológicamente se describen dos tipos de astrocitos en los roedores: astrocitos fibrosos y astrocitos protoplásmicos. Los astrocitos fibrosos están presentes en gran cantidad en la sustancia blanca del sistema nervioso central, poseen prolongaciones finas poco ramificadas que irradian del soma ( $\approx 85\mu\text{m}$  de diámetro) y extienden procesos perivasculares (Truex y Carpenter, 1971; Oberheim et al., 2009). Los astrocitos protoplásmicos se localizan en gran cantidad en la sustancia gris del sistema nervioso central, poseen numerosas

prolongaciones y ramificaciones ( $\approx 56\mu\text{m}$  de diámetro), están en la cercanía del soma y las dendritas neuronales y también extienden procesos perivasculares (Truex y Carpenter, 1971; Oberheim et al., 2009). A lo largo de todo el sistema nervioso central, los astrocitos forman un sincicio, pues establecen uniones comunicantes (*gap*) entre sus ramificaciones próximas y en las ramas distales forman uniones comunicantes con ramificaciones de astrocitos adyacentes; así, reducen las diferencias en las concentraciones citoplásmicas de moléculas menores a 1000kDa (Rose y Ransom, 1997) y facilitan la difusión de glucosa y otros sustratos metabólicos desde los vasos sanguíneos hacia las neuronas (Nedergaard, et al., 2003). La astroglia libera varios tipos de agentes neuro- y vaso-activos; entre los que se encuentran el glutamato, aspartato, taurina, eicosanoides, neuropéptidos (Martin, 1992), colesterol (Mauch et al., 2001) y factores de crecimiento como el factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF), el factor básico de crecimiento de fibroblastos (FGFb), la angiopoietina 1 y el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ); estos cuatro últimos implicados en el mantenimiento y formación de las uniones ocluyentes entre las células endoteliales (Abbott, 2002; Abbott et al., 2006).

### *Microglia*

La microglia es otro tipo de glia del sistema nervioso central que participa en la formación de la barrera hematoencefálica (Risau, 1991; Ballabh et al., 2004). Desde su descripción original por Pío del Río Hortega en 1932, el origen de la microglia constituye tema de controversia (Kaur et al., 2007). Existen varias hipótesis acerca del tejido embrionario del que derivan los precursores de la microglia. Una de las hipótesis sugiere que la microglia deriva del mesodermo; por el contrario, se atribuye también un origen neuroectodérmico a la microglia, al igual que el resto de la glia encefálica (astrocitos y oligodendrocitos) (Chan et al., 2007; Kaur et al., 2007). En la actualidad, la hipótesis más aceptada considera que la microglia deriva del mesodermo embrionario (Guillemin y Brew, 2004; Chan et al., 2007); particularmente, los precursores inmediatos son monocitos periféricos que infiltran el sistema nervioso central durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano (Tseng et al., 1983; Perry y Gordon, 1988; Ling y Wong, 1993). La microglia ejerce funciones fagocíticas (Risau y Wolburg, 1990), de presentación de antígenos (Hart y Fabry, 1995) y constituye la primera línea de defensa contra agentes patógenos invasores en el sistema nervioso central (Vildhardt, 2005).

La microglia comprende aproximadamente el 20% de la población glial total del encéfalo de los mamíferos (Vilhardt, 2005). Morfológicamente en el mamífero adulto se distinguen dos tipos de microglia, células microgliales ramificadas o en reposo y microglia reactiva (Nakajima y Kohsaka, 1993). La microglia en reposo posee un soma de pequeño diámetro, alargado con dos o más ramificaciones principales que irradian de ambos polos de la célula; tales ramificaciones primarias sucesivamente arborizan en delgadas y espinosas prolongaciones secundarias, terciarias o cuaternarias (Ling y Wong, 1993; Raivich, 2005; Vilhardt, 2005). Las prolongaciones de la microglia ramificada se extienden en un diámetro de 30-50µm sin traslape con las ramificaciones de las células microgliales adyacentes (Raivich, 2005) y son altamente dinámicas; continuamente se retraen o extienden, lo que permite detectar alteraciones en la alostasis del microambiente nervioso, sea por cambios en la composición bioquímica o en la organización estructural de la matriz extracelular (Nimmerjahn et al., 2005). La microglia reactiva del adulto se diferencia a partir de la microglia ramificada en respuesta a perturbación de la alostasis del microambiente nervioso. La microglia reactiva presenta soma redondo con escasas ramificaciones gruesas cercanas al soma (Streit et al., 1990; Sánchez-López et al., 2005). La microglia reactiva ejerce funciones fagocíticas; su distribución en el mamífero adulto se restringe a las regiones encefálicas con presencia de muerte celular (neuronal y glial) (Streit et al., 1990). En condiciones fisiológicas, la microglia se localiza en la proximidad de los vasos sanguíneos encefálicos (microglia perivascular) en la sustancia gris y con menor densidad en la sustancia blanca (Truex y Carpenter, 1971). La microglia libera factores de crecimiento nerviosos, vasculares y astrogiales; tales factores promueven la supervivencia neuronal, la angiogénesis y la maduración astrocítica (Nakajima y Kohsaka, 1993).

#### *Lámina o membrana basal*

La lámina o membrana basal, el último de los componentes de la barrera hematoencefálica (Risau, 1991; Ballabh et al., 2004), es matriz extracelular especializada que separa a las células endoteliales y pericitos del espacio extracelular circundante (Nag, 2003a). La membrana basal se forma por la fusión y engrosamiento de las *lamellae* de las células endoteliales, pericitos y astroglia. En los mamíferos adultos la membrana basal tiene aproximadamente 30-40nm de espesor, está constituida principalmente por las proteínas estructurales colágena y laminina (Nag, 2003a, Zlokovic, 2008). La lámina basal ejerce

funciones de barrera para pequeñas moléculas y solutos cargados negativamente y posee un reservorio de factores de crecimiento y proteasas, liberados durante los períodos de angiogénesis (Nag, 2003a).

### **Desarrollo de la barrera hematoencefálica en la rata**

Al igual que en otras especies de vertebrados, el sistema nervioso central de los roedores deriva del ectodermo embrionario (Jacobson, 1991). En la rata, la gestación dura aproximadamente 22 días; al nacimiento el sistema nervioso central de las crías de rata es inmaduro, por lo que, como el ser humano, pertenece al grupo de mamíferos altricios y requiere de cuidados maternos prolongados durante la vida postnatal temprana para lograr adecuada maduración cerebral. En la rata la neurulación o formación del tubo neural inicia alrededor de E10 y en E11.5 se forman las vesículas cerebrales primarias, prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo en la parte rostral del tubo neural (Witschi, 1962). Entre E12 y E13 las vesículas cerebrales primarias dan lugar a las cinco vesículas cerebrales secundarias; el prosencéfalo se divide en telencéfalo y diencefalo, el mesencéfalo se mantiene indivisible y el rombencéfalo se divide en mielencéfalo y metencéfalo. Es de las vesículas cerebrales secundarias que surgen las estructuras del sistema nervioso adulto (Uylings et al., 1990).

La barrera hematoencefálica comienza su desarrollo de forma paralela al del sistema nervioso central (Bär, 1980; Risau, 1991; Krause et al., 2002); sus componentes celulares surgen durante las etapas prenatal y postnatal temprana y se completa su diferenciación y adquisición de función hasta las primeras semanas de vida postnatal (Risau, 1991). Los precursores de las células endoteliales que formarán los vasos sanguíneos del sistema nervioso central se originan en la placa de mesodermo lateral del embrión (Gilbert, 2003). El primer evento en el desarrollo de la barrera hematoencefálica implica la formación de vasos sanguíneos mediante el proceso de vasculogénesis, es decir, la génesis de vasos sanguíneos a partir de la proliferación de los angioblastos y diferenciación subsiguiente en células endoteliales (Risau, 1997; Engelhardt, 2003). En la rata, angioblastos y pericitos invaden la región cefálica del embrión entre E10-E11 y forman el plexo vascular perineural (Bär, 1980; Bauer et al., 1993). Los capilares del plexo vascular perineural son fenestrados y se localizan en la pared externa del tubo neural (Risau, 1991; Krause et al., 2002). Los

vasos sanguíneos subsecuentes al plexo vascular perineural surgen a través de angiogénesis, es decir, la formación de nuevos vasos a partir de vasos sanguíneos existentes por proliferación de las células endoteliales (Risau, 1997; Engelhardt, 2003). En la rata, la proliferación de las células endoteliales ocurre durante la vida prenatal y los primeros 20 días postnatales, con un pico máximo en los días postnatales 5 a 9 (Robertson et al., 1985). Durante la fase inicial de formación de nuevos vasos sanguíneos por angiogénesis, los pericitos degradan la membrana basal, se separan de la pared vascular y guían la migración de las células endoteliales en proliferación (Balanov y Dore-Duffy, 1998; Molnár y Saunders et al., 2009). Las células endoteliales localizadas en el extremo del capilar extienden tentáculos similares a filopodios que, mediante quimiotaxis, se aproximan a otros vasos sanguíneos y se fusionan las puntas (Mato et al., 1989). Una vez formada la unión interendotelial entre capilares en anastomosis, los pericitos migran nuevamente hacia la porción abluminal de las células endoteliales y promueven la síntesis de la membrana basal (Balanov y Dore-Duffy, 1998). Las células endoteliales que forman los primeros capilares encefálicos expresan marcadores de barrera hematoencefálica desde etapas tempranas del desarrollo vascular cerebral. En roedores, el transportador de glucosa (GLUT1) y la glicoproteína P se expresan desde E11; mientras que, la claudina-5 inicia su expresión en E19 (Molnár y Saunders et al., 2009).

En E12 a E14 en la rata, los vasos del plexo vascular perineural se alargan, penetran radialmente al neuroectodermo y ramifican en la zona subependimaria por medio de la degradación proteolítica de la matriz extracelular (Risau, 1991, 1997; Greenberg y Jin, 2005; Krause et al., 2002). Las ramificaciones subsecuentes, secundarias y terciarias, invaden capas cada vez más profundas del tubo neural (Bär, 1980). Los brotes vasculares que penetran al tubo neural en fases tempranas de la angiogénesis, se caracterizan por presentar lúmenes con gran diámetro, formas irregulares y fenestraciones (Stewart y Hayakawa, 1994; Engelhardt, 2003). A partir de E16, las células endoteliales establecen entre ellas uniones ocluyentes de pequeña longitud, junto a las que coexisten grandes hendiduras intercelulares que permiten la difusión paracelular de moléculas hidrofílicas (Stewart y Hayakawa, 1987; Risau, 1991; Schulze y Firth, 1992; Krause et al., 2002; Engelhardt, 2003). Conforme avanza el desarrollo vascular cerebral, los capilares adquieren la morfología característica del adulto, con paredes compactas, circulares,



ausencia de fenestraciones y establecimiento de uniones ocluyentes similares a las del adulto (Stewart y Hayakawa, 1987, 1994; Knisel et al., 1996; Engelhardt, 2003).

Los otros componentes de la barrera hematoencefálica se desarrollan de forma paralela a la génesis de los vasos sanguíneos cerebrales. Los precursores de los astrocitos, los glioblastos, surgen en la zona ventricular del tubo neural por división asimétrica de la glia radial; más tarde, hacia el final de la gestación el sitio de astroglíogenesis se localiza en la zona subventricular, donde permanece hasta la vida adulta (Goldman, 2001). En E16 en la rata aparecen los primeros astrocitos perivasculares (Senjo et al., 1986); sin embargo, el pico máximo de astroglíogenesis se alcanza hasta el día 15 de la vida postnatal (Riol et al., 1992).

Las primeras estructuras del sistema nervioso central en las que ocurre diferenciación astroglial durante fases tempranas del desarrollo postnatal son la formación hipocámpica (Nixdorf-Bergweiler, et al., 1994; Catalani et al., 2002), la cápsula interna (Earle y Mitrofanis, 1998) y la cápsula externa (Ludkiewics et al., 2001). En la rata, la mayor parte de la astroglia en esas estructuras surge antes del día postnatal 16 (Nixdorf-Bergweiler, et al., 1994; Earle y Mitrofanis, 1998; Ludkiewics et al., 2001; Catalani et al., 2002); mientras que para el resto de las estructuras encefálicas, la densidad astroglial alcanza los niveles observados en el individuo adulto entre la tercera y cuarta semanas postnatales (Ling y Leblond, 1973; Nixdorf-Bergweiler, et al., 1994). Durante las primeras semanas postnatales en la rata, la astroglia presenta pocas ramificaciones, que se caracterizan por extenderse 10-15µm alrededor del soma, ser finas, filamentosas, poseer varicosidades y terminar en forma de pequeñas estructuras bulbares (filopodio). A diferencia del individuo adulto, en la etapa postnatal temprana la astroglia no presenta delimitación clara de los dominios de astrocitos individuales (Nixdorf-Bergweiler, et al., 1994; Bushong et al., 2004). Durante las primeras tres a cuatro semanas postnatales, ocurre aumento progresivo en la longitud y número de ramificaciones de la astroglia (Catalani et al., 2002). Una de las características fundamentales de la astroglia para el mantenimiento de la barrera hematoencefálica, la extensión de los pies o procesos perivasculares, ocurre durante la segunda y tercera semanas postnatales (Bär y Wolff, 1976); lo que es concurrente al momento en que la barrera hematoencefálica adquiere la función de permeabilidad selectiva a moléculas circulantes en la sangre (Phelps, 1972).

La microglia, el otro componente glial de la barrera hematoencefálica, surge de monocitos infiltrados al sistema nervioso central durante el período embrionario y postnatal temprano (Tseng et al., 1983; Perry y Gordon, 1988). Durante la etapa embrionaria y en las primeras semanas postnatales la microglia experimenta cambios morfológicos asociados con su maduración funcional; inicialmente se caracteriza por tener un soma ameboideo, con abundante citoplasma y bien desarrollados organelos, especialmente vacuolas, lisosomas y fagosomas. Posteriormente, la microglia se torna pleomórfica, con forma ameboidea y extensión de pseudopodios, seguida de soma redondo con escasos procesos ramificados, cortos y de gran calibre. Al igual que ocurre con la astroglia, conforme avanza el desarrollo neural la microglia extiende mayor número de ramificaciones, que se caracterizan por ser delgadas y espinosas, hasta que al final de la tercera semana postnatal en la rata adquiere la morfología de la microglia en reposo propia del sistema nervioso central adulto (Wu et al., 1992; Dalmau et al., 1997, 1998).

Las primeras células microgliales aparecen en el encéfalo de la rata entre E12 a E14 (Tseng et al., 1983). Las regiones encefálicas por las que los monocitos invaden el tejido nervioso son los vasos sanguíneos locales y el *cavum* del septum pellucidum (Ling y Wong, 1993). En el día del nacimiento, la microglia ameboidea se localiza principalmente en la sustancia blanca subcortical y en las regiones circunventriculares (Imamoto y Leblond, 1978). Existen varios reservorios de microglia ameboidea en el sistema nervioso en desarrollo distribuidos en la sustancia blanca subcortical; el principal se localiza en el cuerpo calloso (Ling, 1976). Desde el cuerpo calloso, la microglia ameboidea migra hacia las cápsulas interna y externa para constituir los reservorios secundarios en el encéfalo de la rata (Earle y Mitrofanis, 1997; Ludkiewicz et al., 2001). Adicionalmente, la microglia ameboidea se concentra también en la sustancia blanca del cerebelo durante la primera semana postnatal en la rata (Ashwell, 1990). La diferenciación de la microglia ameboidea en microglia ramificada termina durante la segunda semana postnatal en el cuerpo calloso (Ling y Wong, 1993) y alrededor de la tercera semana postnatal en todo el encéfalo (Chugani et al., 1991; Ling y Wong, 1993).

En la neocorteza e hipocampo de la rata en la etapa postnatal temprana la morfología de la microglia se caracteriza por soma redondo con ramificaciones cortas y de gran calibre; en ambas estructuras el número de microglia ameboidea es muy bajo (Wu et al., 1993; Dalmau

et al., 1998). La microglia ameboidea presente en la neocorteza se localiza en la capa VI y sustancia blanca subcortical (Wu et al., 1993); mientras que en la formación hipocámpica la microglia ameboidea se localiza en las regiones ontogénicamente más recientes, como el giro dentado y el sector CA1 (Cuerno de Ammón 1) del hipocampo (Dalmau et al., 1998). En el caso de la neocorteza, se ha descrito un gradiente de desarrollo lateromedial y caudorostral de la microglia en el recién nacido y durante la primera semana postnatal; con mayor densidad de microglia ameboidea en las regiones corticales laterales (cortezas de la ínsula y somatosensorial) en comparación con las áreas corticales mediales (corteza motora y giro del cíngulo) (Wu et al., 1993). Sagitalmente, la microglia ameboidea se distribuye principalmente en las áreas rostrales (corteza orbitofrontal) y con menor densidad en las áreas corticales caudales (corteza visual) (Wu et al., 1993).

Desde etapas prenatales, la microglia ejerce sus funciones fagocíticas y de presentación de antígenos en el sistema nervioso central (Nakajima y Kohsaka, 1993; Kaur et al., 2007). La microglia ameboidea libera factores neurotróficos y gliotróficos (como el factor de crecimiento parecido a la insulina –IGF1 y el factor de crecimiento nervioso –NGF) que promueven la maduración neuronal, la sinaptogénesis y la gliogénesis (Nakajima y Kohsaka, 1993). Adicionalmente, la microglia ameboidea es capaz de diferenciarse en microglia reactiva y fagocitar células y axones en degeneración durante el desarrollo nervioso normal (Sánchez-López et al., 2005; Kaur et al., 2007). Durante el período embrionario y postnatal temprano, cuando los capilares encefálicos no han adquirido el fenotipo de barrera hematoencefálica, la microglia funciona como barrera para el paso de sustancias y materiales derivados o transportados por la sangre hasta los vasos sanguíneos cerebrales (Xu y Ling, 1994; Kaur et al., 2007). Finalmente, entre la tercera y cuarta semanas postnatales termina la formación de otro de los componentes de la barrera hematoencefálica, la lámina o membrana basal (Krause et al., 2002).

Los hallazgos en varios estudios experimentales en mamíferos altricios sugieren que la barrera hematoencefálica en el feto y el recién nacido es también funcionalmente inmadura (Bakay, 1953; Ferguson y Woodbury, 1969). En los animales altricios inmaduros, la barrera hematoencefálica es más permeable a macromoléculas que la barrera del encéfalo adulto y las macromoléculas alcanzan mayores concentraciones y más rápidamente que en el sistema nervioso central de animales adultos de la misma especie (Bakay, 1953;

Ferguson y Woodbury, 1969). Sin embargo, existen reportes contradictorios que indican que incluso a edades tempranas, como el día 10 de la gestación, los capilares de lo que será el sistema nervioso central son impermeables a colorantes vitales como el azul tripano (Grazer y Clemente, 1957).

### **Efectos de las hormonas del estrés sobre los componentes celulares de la barrera hematoencefálica**

El estrés y las hormonas que se liberan durante la exposición del organismo al mismo, pueden alterar el funcionamiento normal de las células que constituyen la barrera hematoencefálica. Las células endoteliales, los astrocitos y la microglia perivascular poseen receptores intracelulares para glucocorticoides (Bohn et al., 1991; Wolff et al., 1992; Tanaka et al., 1997). Adicionalmente, las células endoteliales, la microglia y las células del músculo liso perivascular expresan receptores para la hormona liberadora de corticotrofina y su familia de ligandos (Urocortina I, II y III) (Bale et al., 2002; Wang et al., 2002).

Experimentos *in vitro* muestran que los glucocorticoides ejercen efectos opuestos durante la morfogénesis vascular y el estadio maduro de la barrera hematoencefálica (Guerin et al., 1992; Wolff et al., 1992, 1993; Romero et al., 2003; Calabria et al., 2006; Förster et al., 2006; Blecharz et al., 2008). En cultivos de células endoteliales encefálicas y astrocitos, la administración de los glucocorticoides dexametasona e hidrocortisona inhibió la angiogénesis o formación de estructuras similares a capilares (Wolff et al., 1992, 1993). Por otro lado, en monocapas de células endoteliales encefálicas con propiedades similares a la barrera hematoencefálica, la adición de glucocorticoides al cultivo aumentó la expresión de las proteínas de unión ocludina y VE-cadherina, redistribuyó la expresión de la proteína citoplasmática ZO-1 a los bordes de contacto entre células endoteliales, aumentó la expresión del transportador de glucosa GLUT1 y la resistencia eléctrica transendotelial, y disminuyó la difusión paracelular de moléculas hidrofílicas a través de la monocapa (Guerin et al., 1992; Romero et al., 2003; Calabria et al., 2006; Förster et al., 2006; Blecharz et al., 2008).

A nivel de los componentes gliales de la barrera hematoencefálica, los glucocorticoides ejercen efectos diferenciales sobre la morfología y funcionalidad celular dependiendo de la

activación selectiva de los dos tipos de receptores intracelulares (tipo I o receptor mineralocorticoide y tipo II o receptor glucocorticoide) (Tanaka et al., 1997). *In vitro*, la activación específica de los receptores tipo I para glucocorticoides en las células microgliales aumentó la expresión de la sintasa del óxido nítrico y fosfatasa ácida, enzimas lisosomales necesarias para el funcionamiento adecuado de la microglia (Tanaka et al., 1997). Por otro lado, la activación selectiva del receptor tipo II en la microglia redujo la actividad de la óxido nítrico sintasa inducible, la fosfatasa ácida y el factor de crecimiento tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), enjuto el soma, disminuyó la proliferación y migración microglial, e incrementó la acumulación de materiales indigeridos dentro de lisosomas y vacuolas microgliales (Ganter et al., 1992; Tanaka et al., 1997; Drew y Chavis, 2000; Zhou et al., 2007).

Además de los glucocorticoides, se ha reportado que la hormona liberadora de corticotrofina también modifica la morfología y fisiología de los componentes celulares de la barrera hematoencefálica. Por ejemplo, la adición de urocortina, un precursor de la hormona liberadora de corticotrofina, a cultivos puros de células endoteliales encefálicas inhibió la formación de estructuras similares a capilares (Bale et al, 2002). Asimismo, el tratamiento con la hormona liberadora de corticotrofina en cultivos puros de la línea celular BV-2 de microglia de ratón y en cultivos primarios de microglia redujo la viabilidad celular y aumentó la muerte por apoptosis al inducir la activación de la caspasa 3, aumentar la producción de especies reactivas de oxígeno y reducir el potencial de membrana mitocondrial (Ock et al., 2006).

*In vivo*, la deficiencia en la expresión del receptor tipo 2 para la hormona liberadora de corticotrofina (CRH-R2) produjo hipervascularización cerebral en el ratón adulto, caracterizada por aumento en el número y diámetro de los grandes vasos sanguíneos encefálicos en comparación con ratones control (Bale et al., 2002). Contrario a los hallazgos *in vitro*, en el caso de la microglia se ha reportado que la administración aguda de corticosterona o el estrés por inmovilización en el ratón adulto incrementaron en 200% el número de microglia en todo el encéfalo en comparación con el grupo control; asimismo, el estrés y la corticosterona produjeron aumento en la tasa de proliferación de células microgliales respecto a lo observado en condiciones normales de microglia en reposo (Nair y Bonneau, 2006).

## **Efectos del estrés sobre el funcionamiento de la barrera hematoencefálica en animales adultos**

Los estudios que se han realizado muestran resultados contradictorios relativos a los efectos que el estrés ejerce sobre el funcionamiento de la barrera hematoencefálica. Varios reportes en la literatura describen aumento en la permeabilidad de la barrera después de estrés agudo (Belova y Jonsson, 1982; Friedman et al., 1996; Sharma, et al., 1996; Škultétyová et al., 1998; Esposito et al., 2001, 2002; Sharma, 2004; Theoharides y Konstantinidou, 2007); mientras que otros, muestran que el estrés o las hormonas que se liberan durante el mismo, no produjeron efectos adversos sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Sinton et al., 2000) o incluso mejoraron las propiedades de barrera (Ziylan et al., 1989). En la rata de 2 meses de edad, el estrés agudo aumentó la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al colorante azul de Evans y a sodio marcado con  $I^{131}$  en la corteza del cíngulo, los lóbulos parietal y occipital, la corteza del cerebelo, el hipocampo, núcleo caudado, tálamo, hipotálamo y asta dorsal de la médula espinal en los segmentos cervicales y torácicos (Sharma et al., 1996; Sharma, 2004). De igual forma, el estrés agudo en la rata adulta aumentó la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a la proteína albúmina en el hipocampo y cerebelo (Škultétyová et al., 1998), al colorante azul trípano en el hipotálamo, formación reticular, área tegmental ventral del mesencéfalo y porción ventral del puente (Belova y Jonsson, 1982) y al colorante azul de Evans en el diencéfalo, cerebelo y tallo cerebral (Esposito et al., 2001, 2002). En el ratón adulto el estrés agudo también aumentó la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a piridostigmina, un inhibidor de la acetilcolinesterasa, y al colorante azul de Evans; la actividad de la acetilcolinesterasa se redujo hasta en 50% en homogenados de corteza cerebral y el azul de Evans penetró 10 veces más al encéfalo de los ratones expuestos a estrés en comparación con sujetos control libres de estrés (Friedman et al., 1996).

Los efectos adversos del estrés sobre el funcionamiento de la barrera hematoencefálica pueden estar mediados por diversas moléculas circulantes en la sangre o presentes en el sistema nervioso central, cuyos niveles varían en función de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales. El aumento en la concentración central de hormona liberadora de corticotrofina durante la exposición a estresores puede promover la

degranulación de los mastocitos presentes en los espacios perivasculares encefálicos y de esa forma, puede activar a las células endoteliales con el consecuente aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Esposito et al., 2002). El estrés agudo también puede aumentar los niveles centrales de glutamato y potenciar la activación de los receptores tipo NMDA (Raudensky y Yamamoto, 2007); la activación de los receptores NMDA en las células endoteliales que forman los capilares encefálicos incrementa la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Koenig et al., 1992). También es posible que el aumento en los niveles centrales de serotonina, dependientes de estrés, incremente la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, puesto que la reducción en los niveles centrales de serotonina, de forma farmacológica o por lesión de los núcleos del rafe, en animales expuestos a estrés se acompañó de disminución en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Sharma et al., 1996).

Contrario a los hallazgos de Friedman et al. (1996) se ha descrito que el estrés agudo durante la vida adulta no produjo efectos sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a la piridostigmina (Sinton et al., 2000). Sinton et al. (2000) observaron que el porcentaje de actividad de la acetilcolinesterasa en los animales expuestos a estrés fue mayor que en los sujetos control, libres de manipulación de estrés; es decir, la barrera hematoencefálica de los sujetos expuestos a estrés fue menos permeable a la piridostigmina en comparación con la permeabilidad de la barrera en los animales control (Sinton et al., 2000). De igual forma, Ziylan et al. (1989) encontraron en la rata adulta que el tratamiento crónico con dexametasona redujo la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al aminoácido sintético  $\alpha$ -aminoisobutírico en los lóbulos parietal y occipital, el hipocampo, tálamo, núcleo caudado, mesencéfalo, cerebelo y bulbo raquídeo. Posterior al cese de la administración del glucocorticoide sintético se observó reversión del efecto protector con aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al aminoácido  $\alpha$ -aminoisobutírico en todo el encéfalo (Ziylan et al., 1989).

### **Efectos del estrés sobre el desarrollo de la barrera hematoencefálica**

En mamíferos precoces, la administración de corticosteroides durante la vida prenatal disminuyó la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a macromoléculas (Stonestreet et al., 1999, 2000). En ovejas que se encontraban al 60 y 80% del término de la gestación

la administración de dexametasona redujo la permeabilidad de la barrera al aminoácido sintético  $\alpha$ -aminoisobutírico marcado con carbono<sup>14</sup> en los fetos de las mismas edades gestacionales. Las estructuras que presentaron reducción en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica fueron la neocorteza, formación hipocámpica, cerebelo, tallo cerebral y porción cervical de la médula espinal (Stonestreet et al., 1999). Según Stonestreet et al. (1999), la dexametasona aceleró la maduración de la vasculatura del sistema nervioso central y así promovió que la barrera fuera selectivamente impermeable a moléculas circulantes en la sangre (Stonestreet et al., 1999, 2000). Sin embargo, morfológicamente se ha descrito en el mismo modelo experimental, que la administración del glucocorticoide sintético betametasona al final de la gestación retrasó el desarrollo de las uniones ocluyentes/estrechas entre las células endoteliales en el cuerpo calloso de la oveja recién nacida (Huang et al., 2001).

En cuanto a los efectos del estrés sobre el desarrollo de la neuroglia perivascular, se ha descrito que la administración de glucocorticoides durante la primera semana postnatal redujo el número de microglia con forma ameboidea en el cuerpo calloso en crías de rata de 7 días de edad (Ling, 1982; Kaur et al., 1994; Wu et al., 2001). La reducción en el número de microglia se debió a decremento temporal en el número de precursores, a la supresión concomitante en la génesis de la microglia y al aumento en la muerte celular (Kaur et al., 1994; Wu et al., 2001). La microglia que sobrevivió al tratamiento con los glucocorticoides presentó maduración acelerada, con morfología ramificada característica de la vida adulta y fagocitosis de fragmentos de las células microgliales muertas; mientras que, en ratas del grupo control de la misma edad, la microglia del cuerpo calloso permaneció con forma ameboidea (Ling, 1982; Kaur et al., 1994; Wu et al., 2001).



## JUSTIFICACIÓN

### Consecuencias funcionales del desarrollo alterado de la barrera hematoencefálica

*... the loss of blood-brain barrier integrity more closely approximates the sudden influx of toxic pollutants into a neighborhood from an unregulated industrial factory discharges. Acute exposure to blood-borne products and/or a decrease in the export of toxic metabolites directly induces neuronal stress and activation of central nervous system innate immune response (ie. microgliosis).*

Carson et al., 2006.

El desarrollo de la barrera hematoencefálica ocurre de manera asincrónica en las distintas regiones del sistema nervioso central e incluso dentro de la misma región se observa heterogeneidad en el grado de desarrollo de los distintos vasos sanguíneos que irrigan la zona (Cassella et al., 1996; Huang et al., 2001; Molnár y Saunders, 2009). Algunos de los marcadores moleculares de la barrera hematoencefálica aparecen en las células endoteliales desde el establecimiento del contacto célula-célula; posterior a la formación del lumen del capilar se expresan progresivamente el resto de los marcadores que definen a la barrera hematoencefálica (Cassella et al., 1996). El desarrollo progresivo de las características de barrera en los capilares encefálicos permite que la función principal de la barrera hematoencefálica, mantener la alostasis del microambiente nervioso, se ejerza desde la etapa prenatal de forma micro-regionalizada (Molnár y Saunders, 2009).

El desarrollo vascular cerebral ocurre de forma paralela al desarrollo del sistema nervioso central. En la corteza cerebral la densidad vascular varía en función de la maduración de cada región; así, en las regiones ontogenéticamente más tempranas se presenta mayor vascularización y mayor expresión de los marcadores moleculares de la barrera hematoencefálica que en las regiones corticales menos desarrolladas (Rowan y Maxwell, 1981). De igual forma, la modificación en el desarrollo funcional de la región cortical altera la densidad de vascularización en la microrregión. En la rata, la exposición a ambientes visualmente enriquecidos durante la etapa postnatal temprana aumentó la densidad vascular y la expresión de los marcadores de barrera hematoencefálica en la corteza visual primaria; mientras que la crianza en total oscuridad retrasó la maduración

microvascular, redujo la densidad capilar y la expresión de los marcadores de barrera en la misma región cortical (Argandoña y Lafuente, 1996; Argandoña et al., 2005).

Es así que el patrón de vascularización encefálica sigue al desarrollo anatómico y funcional de cada región del sistema nervioso central para suplir las demandas metabólicas cada vez mayores producidas por el aumento en la actividad neuronal y glial (Bär, 1980). El desarrollo deficiente de la barrera hematoencefálica limitaría el flujo sanguíneo y adquisición de nutrientes en distintas regiones del sistema nervioso central, con lo que se restringiría el desarrollo neuronal y glial progresivos (Argandoña et al., 2005). La disfunción de la barrera hematoencefálica durante etapas tempranas de la ontogenia también traería como consecuencia alteración en las características del medio interno nervioso; con la perturbación de la homeostasis encefálica podrían alterarse procesos del desarrollo como la neurogénesis, migración neuronal, sinaptogénesis y gliogénesis (Molnár y Saunders, 2009). Adicionalmente, la exposición directa del sistema nervioso inmaduro a los elementos sanguíneos (macromoléculas, aminoácidos y elementos celulares) podría alterar el funcionamiento normal neuronal y glial, con el consecuente daño a estructuras encefálicas necesarias para la generación de patrones conductuales característicos de la especie, aprendizaje y otras habilidades cognitivas (Rapoport, 1976). La exposición a distintos factores adversos durante las etapas prenatal y postnatal podría alterar el desarrollo normal de la barrera hematoencefálica y así afectar el desarrollo nervioso normal (Molnár y Saunders, 2009); entre los factores que se sabe alteran la morfología o el funcionamiento de la barrera hematoencefálica están la inflamación sistémica (Stolp et al., 2005), la hipoxia (Kaur y Ling, 2008), la exposición a drogas de abuso y contaminantes ambientales (Ginsberg et al., 2004; Pollard, 2007) y el estrés (Huang et al., 2001).

Dado que se desconoce el efecto que ejerce el estrés durante fases tempranas de la vida sobre el desarrollo anatómico y funcional de la barrera hematoencefálica en mamíferos altricios y puesto que los estudios en roedores adultos muestran resultados contradictorios respecto al efecto del estrés agudo sobre la morfología y permeabilidad de la barrera hematoencefálica; en el presente proyecto se buscó elucidar el efecto del estrés crónico prenatal o postnatal sobre el desarrollo anatómico y funcional de la barrera hematoencefálica en un mamífero altricio, la rata *Rattus norvegicus* (cepa Wistar).

### **OBJETIVO GENERAL:**

- Caracterizar el efecto de la exposición a estrés durante fases tempranas de la vida (prenatal o postnatal) sobre el desarrollo anatómico y funcional de la barrera hematoencefálica.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Determinar el efecto del estrés prenatal y postnatal sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en un mamífero altricio, la rata Wistar.
- Caracterizar el mecanismo por el que el estrés prenatal y postnatal altera el desarrollo funcional de la barrera hematoencefálica.
- Investigar qué cambios ocurren en el patrón de desarrollo y distribución de la microglia en el sistema nervioso central como consecuencia de la permeabilidad alterada de la barrera hematoencefálica después de estrés crónico perinatal.

### **HIPÓTESIS:**

- El estrés prenatal o postnatal modificará el desarrollo funcional de la barrera hematoencefálica al aumentar la permeabilidad de la barrera a macromoléculas circulantes en la sangre.
- El estrés prenatal modificará la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a través de alguno de los siguientes mecanismos: retraso en la formación de uniones ocluyentes entre las células endoteliales o inducción de la formación de caveolas en las células endoteliales.
- El estrés postnatal modificará el desarrollo de la barrera hematoencefálica a través de alguno de los siguientes mecanismos: retraso en la formación de uniones estrechas entre las células endoteliales y promoción de la formación de vesículas pinocíticas en las células endoteliales.
- La permeabilidad alterada de la barrera hematoencefálica por efecto de la exposición a estrés prenatal modificará el patrón de desarrollo y distribución de la microglia en las diversas estructuras del sistema nervioso central postnatal.
- La permeabilidad alterada de la barrera hematoencefálica por efecto de la exposición a estrés durante las primeras tres semanas postnatales modificará el

patrón de desarrollo y distribución de la microglia en las diversas estructuras del sistema nervioso central.

## MÉTODO

### Sujetos

Se usaron ratas de la cepa Wistar de 3 a 4 meses de edad, con gestación cronometrada y sus crías (n = 10 por camada). Las ratas madre se obtuvieron de la colonia del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, y se alojaron en grupos de tres sujetos con ciclos luz/oscuridad de 12 horas (luces encendidas a las 0700 horas) en condiciones de temperatura (20-22°C) y humedad controladas (45-55%). Durante el transcurso del experimento se mantuvo a todos los sujetos con agua y comida *ad libitum*. Todos los experimentos fueron aprobados por la Comisión de Bioética para Investigación en Animales del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, y fueron diseñados para reducir al mínimo el número de sujetos usados.

### Diseño del Experimento

Se asignó a las ratas madre a uno de dos grupos: **I.** Estrés durante la gestación y **II.** Grupo control. Después del parto, la mitad de cada camada del grupo control se asignó al procedimiento de estrés postnatal (Figura 4).



Figura 4. Diseño experimental del proyecto.

## **Materiales**

Para el procedimiento de estrés prenatal (nado forzado) se usó una caja transparente de plástico (60x44x30cm) con termostato y para el procedimiento de estrés postnatal se usó una incubadora (modelo RB360, W.C. Heraeus GMBH) y cajas de cartón individuales (8x8x8 cm). El desarrollo de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica se estudió con el uso del colorante azul de Evans (Sigma, E2129), con fórmula química  $C_{34}H_{24}N_6O_{14}S_4Na_4$  y peso molecular de 960.842 g/mol. El desarrollo de la microglia, uno de los componentes celulares de la barrera hematoencefálica, se estudió con el uso de la lectina de la *Griffonia simplicifolia* conjugada a peroxidasa de rábano (GSAI-B4-HRP) (Sigma, L5391), el anticuerpo para detectar la proteína Iba1 (Wako, 019-19741), el anticuerpo secundario biotinilado cabra anti-conejo (Chemicon, 21537), el kit Vectastain ABC (Vector, PK4000) y el kit de sustrato de peroxidasa DAB (Vector, SK4100). Las imágenes de inmunohistoquímica se adquirieron con un microscopio de campo claro (Carl Zeiss, modelo 1702) equipado con una cámara digital (Sony, modelo DSC-S85); mientras que la fluorescencia emitida por el azul de Evans fue documentada con una CCD AxioCam MRC (Carl Zeiss) acoplada a un microscopio de epifluorescencia (Carl Zeiss, modelo AxioImager.A1) usando el software AxioVision, versión 4.6.3 (Carl Zeiss).

Para el estudio ultraestructural de la barrera hematoencefálica se usó como trazador electrodenso la peroxidasa de rábano acoplada a la aglutinina del grano de trigo (WGA-peroxidasa) (Vector, PL-1026), 3,3'-diaminobenzidina (Sigma, D5637) y un microscopio electrónico (JEOL, modelo JEM-1010). Para la cuantificación de corticosterona por radioinmunoensayo se usó el kit de corticosterona de rata Coat-A-Count (Diagnostic Products Co., PITKRC-2) y un contador gamma (Packard Co., COBRA II). Todas las perfusiones se realizaron con una bomba de perfusión (Masterflex, modelo 77521-40, cabezal 7013-52). Los análisis cuantitativos del desarrollo de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, y de la densidad y distribución de la microglia se realizaron con el uso del programa ImageJ versión 1.32j, proporcionado gratuitamente por los National Institutes of Health, EUA (Rasband, 2005). Los análisis estadísticos se realizaron en los programas JMP, versión 4.0.2 Academic (SAS Institute Inc., EUA) y SPSS, versión 10.0 para Windows.

## **Procedimiento**

**Habituaación a las condiciones experimentales:** se llevó a cabo durante las tres semanas previas al inicio de la gestación en los grupos control y de estrés. En la primera semana se trasladó diariamente a los sujetos al sitio de experimentación y se les manipuló durante una hora. En la segunda semana se habituó a los sujetos a la tina para nado forzado sin agua durante 5 minutos diarios. Finalmente, durante la tercera semana se colocó a los sujetos durante 5 minutos diarios en la tina de nado con agua a 25°C, temperatura que se ha descrito no es estrés para la rata (Bruner y Vargas, 1994). Terminado el período de habituación se colocaron tres ratas hembra con un macho sexualmente experto durante 5 días. El inicio de la gestación se determinó por frotis vaginales diarios; el día que se encontraron espermatozoides y células cornificadas, características del estro en la rata (Marcondes et al., 2002), se consideró el día 0 de la gestación (E0). Asimismo, a partir de E21 se realizaron dos revisiones diarias de las ratas (a las 0800 y 1800 horas) para determinar el día del nacimiento de las crías, ese día se consideró el día postnatal 0.

**Estrés prenatal:** se llevó a cabo entre E10 a E20; con inicio el día previo a la formación del plexo vascular perineural (Bär, 1980) y con fecha de término un día antes del parto esperado. Como procedimiento de estrés durante la gestación se usó nado forzado durante 20 minutos diarios en agua a una temperatura de 32°C, temperatura que se ha descrito es estrés para roedores como la rata y el ratón (Abel, 1993; Bruner y Vargas, 1994; Gavrilovic y Dronjak, 2005). Para evitar que los sujetos alcanzaran el fondo de la tina de nado con las patas traseras, el nivel del agua se mantuvo entre 22 y 24 cm. También se cambió el agua de la tina de nado después de la sesión de cada sujeto para evitar la contaminación con la orina y heces fecales (Bruner y Vargas, 1994). Cada día al final de la sesión de nado se colocó a los sujetos en una caja con una toalla de algodón para que se secaran.

**Estrés postnatal:** se llevó a cabo en la mitad de las crías de cada camada del grupo control en los días postnatales 2 a 20 (Figura 4). El procedimiento de estrés postnatal consistió en la separación diaria madre-crías durante tres horas (Ladd et al., 2000, 2004). Cada día entre las 0900 y 1000 horas se separó a las crías de su madre y se les colocó en compartimentos individuales dentro de una incubadora con temperatura controlada. Durante las primeras dos semanas la temperatura de la incubadora se mantuvo a 32°C ±1°C (Ladd et al., 2004). Después del día postnatal 15, cuando las crías de rata son capaces de regular su temperatura

corporal (Satinoff, 2005), se colocó a los sujetos en cajas individuales a temperatura ambiente (23-25°C).

**Estudio del efecto del estrés prenatal o postnatal sobre el desarrollo de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica:** el azul de Evans es un colorante vital que forma conjugados estables con la proteína albúmina *in vivo* cuando se administra directamente en la circulación sistémica (Tshirgi, 1950; Freedman y Johnson, 1969). En mamíferos adultos en condiciones fisiológicas, el colorante administrado por vía intravenosa, intracardiaca o intraperitoneal tiñe de azul la piel, musculatura y vísceras torácicas y abdominales pero no cruza la barrera hematoencefálica, por lo que deja sin teñir al sistema nervioso central (Nag, 2003b). Debido a su acoplamiento a la proteína albúmina sérica, la presencia del colorante dentro del parénquima nervioso indica la ruptura de la barrera hematoencefálica a proteínas séricas y otras macromoléculas circulantes en la sangre (Tshirgi, 1950). En el presente experimento, el Azul de Evans se diluyó al 2% en solución salina estéril 0.9% y se administró por vía intracardiaca (ic. 0.04mL/g peso corporal, equivalente a 8mg/100g peso corporal; Nag, 2003b) a crías expuestas a estrés prenatal, postnatal y del grupo control en los días postnatales 1, 10, 20 y 30 (n=3-4 sujetos por grupo y por edad, n total = 49 crías). En todas las edades postnatales se anestesió a las crías con pentobarbital sódico intraperitoneal (ip. 6.3mg/kg peso corporal), se realizó una incisión del lado izquierdo del tórax y se administró el colorante en el ventrículo izquierdo. Se permitió la circulación del azul de Evans durante 10 minutos; tiempo durante el que se colocó a los sujetos en una incubadora a 30°C y se verificó constantemente la presencia de movimientos respiratorios. Transcurridos 10 minutos se corroboró la presencia de latido cardíaco y se perfundió a los sujetos con paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos-salina (PBS 0.1M, pH 7.4) durante 5 minutos.

Como una forma de evaluar el posible efecto que la hipoxia inducida por la apertura de la caja torácica pudiera ejercer sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Kaur y Ling, 2008), el colorante azul de Evans se administró a otro grupo control por vía intraperitoneal. El azul de Evans se diluyó al 2% en solución salina estéril y se administró por vía ip. (2.5mL/100g peso corporal) a 3-4 crías del grupo control en cada una de las edades estudiadas (días postnatales 1, 10, 20 y 30) (n total = 13). Después de 8 horas de circulación del colorante, se anestesió a los sujetos con pentobarbital sódico ip. (6.3mg/kg



peso corporal) y se perfundió con paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos-salina (PBS 0.1M, pH 7.4) durante 5 minutos.

De todos los sujetos que recibieron azul de Evans, por vía ic. o ip., se extrajo el cerebro después de la perfusión, se obtuvo el peso cerebral y se continuó la fijación por inmersión en paraformaldehído al 4% en PBS 0.1M durante 24 horas a 4°C. Del cerebro de cada sujeto se fotografiaron las vistas basal y dorsal; inmediatamente después se obtuvieron rebanadas sagitales o coronales de 2mm de espesor, que se fotografiaron por ambos lados junto con una regla milimétrica de color blanco. Las imágenes se adquirieron bajo condiciones de iluminación artificial constantes y se guardaron como archivos TIFF en formato de color verdadero (RGB), sin manipulación. Para cuantificar el grado de permeabilidad de la barrera hematoencefálica al colorante azul de Evans en las distintas condiciones experimentales (estrés prenatal, estrés postnatal y control) se realizó un análisis de densidad óptica con el programa de análisis de imágenes ImageJ, versión 1.32j (Rasband, 2005). La magnitud de la densidad óptica en el tejido teñido se relaciona directamente con la concentración del colorante azul de Evans (Fry, 1977, ver Anexo 1). Las regiones en las que se cuantificó la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al azul de Evans fueron las cortezas visual, auditiva, somatosensorial, motora, cíngulo, de la ínsula, frontal, orbitofrontal y entorrinal, el hipocampo, el septum, los ganglios basales, la amígdala, el tálamo, el hipotálamo, el bulbo olfativo, el cerebelo, el tectum y tegmento mesencefálicos, el puente, el bulbo raquídeo y los segmentos cervicales de la médula espinal.

Para llevar a cabo el análisis de densidad óptica en el programa ImageJ se transformó las imágenes a escala de grises de 8 bits por píxel. Los valores de la densidad óptica del programa ImageJ oscilan entre 0.00 para el color blanco y 2.60 para el color negro. En las vistas basal, dorsal y en los cortes coronales y sagitales del encéfalo se cuantificó la densidad óptica por regiones con base en el atlas del cerebro de la rata de Paxinos y Watson (1998) para las crías de 10, 20 y 30 días de edad; mientras que para las crías de 1 día de edad, se usó el atlas de Altman y Bayer (1995). Se obtuvieron valores promedio de densidad óptica cuando se fotografió la misma estructura en más de una rebanada del mismo cerebro. Se asumió que la magnitud de la densidad óptica de la regla milimétrica color blanco permaneció constante en las distintas fotografías, independientemente de

posibles variaciones en la luminosidad y de ajustes automáticos en la velocidad de exposición de la cámara digital, puesto que la prueba ANOVA no mostró diferencias estadísticamente significativas en la magnitud de densidad óptica de fondo entre los grupos control y de estrés prenatal o postnatal ( $F(4-111)=1.82$ ,  $p=0.12$ ). Así, en todas las fotografías se consideró a la densidad óptica de la regla milimétrica como ruido de fondo y se restó de cada una de las densidades ópticas de las distintas regiones nerviosas estudiadas. Para calcular la cantidad del colorante azul de Evans (M) por unidad de área en la superficie de cada región nerviosa estudiada ( $\text{nmol}/\text{cm}^2$ ), se usó la fórmula desarrollada por Fry (1977, Anexo 1):  $M = 3.92p + 0.80p^3$ . La variable  $p$  es la absorbencia del tejido teñido y se calcula como sigue:  $p = \ln(I / I_0)$ , donde  $I$  es la densidad óptica del tejido teñido con azul de Evans e  $I_0$  es la densidad óptica del tejido sin teñir. Para obtener la densidad óptica del tejido sin teñir se sacrificó a 2 crías de cada condición experimental (control, estrés prenatal y estrés postnatal), que no recibieron el colorante azul de Evans en los días postnatales 1, 10, 20 y 30.

Finalmente, con el propósito de demostrar que el colorante azul de Evans se acumuló dentro del parénquima encefálico y que la densidad óptica cuantificada en cada región no fue producto de remanentes de azul de Evans en las paredes de la vasculatura cerebral después de la perfusión, se administró azul de Evans a una cría de cada condición experimental en todas las edades estudiadas ( $n=11$ ) y se obtuvieron cortes para observarlos al microscopio. Además de teñir de color azul el encéfalo en condiciones de luz blanca, el azul de Evans emite fluorescencia de 575-640nm cuando se estimula a 546nm; así se obtuvieron cortes coronales de  $50\mu\text{m}$  en un microtomo de congelación a nivel de Bregma - 2.80 a -3.60 para fotografiar el hipocampo y se observaron en un microscopio equipado con la técnica de epifluorescencia.

**Estudio del mecanismo por el que el estrés prenatal o postnatal altera el desarrollo funcional de la barrera hematoencefálica (estudio ultraestructural):** se usó como trazador electrodenso la peroxidasa de rábano acoplada a la lectina de la aglutinina del grano de trigo (WGA-peroxidasa). La WGA-peroxidasa se une al ácido siálico y a la N-acetilglucosamina en el glicocalix que recubre la membrana luminal de las células endoteliales (Gonatas y Avrameas, 1973; Broadwell et al., 1988). Una vez acoplada a los elementos del glicocalix, la WGA-peroxidasa es transportada al citoplasma de las células

endoteliales por endocitosis adsorptiva y posteriormente se libera en la membrana abluminal. El marcaje de los espacios perivascuales del parénquima nervioso y de la microglia con la WGA-peroxidasa tarda en la rata adulta entre 3 a 12 horas en condiciones fisiológicas (Broadwell et al., 1988).

La WGA-peroxidasa se diluyó en 10 $\mu$ L de solución salina estéril 0.9% y se administró por vía ic. (10 $\mu$ g/g peso corporal; Banks y Broadwell, 1994) a una cría de cada condición experimental (estrés prenatal, estrés postnatal y control) en los días postnatales 1, 10, 20 y 30. En el día del sacrificio se anestesió a las crías con pentobarbital sódico ip. (5mg/kg peso corporal), se realizó una incisión del lado izquierdo del tórax y se administró el trazador en el ventrículo izquierdo. Se permitió la circulación de la WGA-peroxidasa durante 10 minutos; tiempo durante el que se colocó a los sujetos en una incubadora a 30°C y se verificó constantemente la presencia de movimientos respiratorios. Transcurridos 10 minutos se corroboró la presencia de latido cardíaco y se perfundió a los sujetos con solución salina 0.9% a 37°C a una velocidad de 3mL/minuto durante 5-8 minutos, seguida de fijador de Karnovsky pH 7.4, a una velocidad de 3mL/minuto durante 10 minutos.

Se extrajo rápidamente el cerebro, se obtuvieron rebanadas de 1-2mm de espesor y se continuó la post-fijación por inmersión durante 2 horas en el fijador de Karnovsky. Después del período de post-fijación se lavaron las rebanadas con amortiguador de cacodilato de sodio 0.1M y se obtuvieron cortes de 300 $\mu$ m del hipocampo en un vibratomo. Los cortes de hipocampo se procesaron para revelar la actividad de la WGA-peroxidasa como sigue: se incubaron durante una hora en una solución de diaminobenzidina (20mg/10mL) y peróxido de hidrógeno 0.02% en amortiguador TRIS 0.05M, pH 7.4; se lavaron con amortiguador TRIS 0.05M y finalmente con amortiguador de cacodilato de sodio 0.1M. Tras el proceso de revelado de la WGA-peroxidasa se disecó un bloque de 300 $\mu$ m x 1mm x 1mm que contenía el sector CA1, el giro dentado y el estrato radiatum del hipocampo. El bloque se post-fijó con OsO<sub>4</sub> al 1% en amortiguador Zetterqvist, seguido de deshidratación progresiva en alcoholes y acetonitrilo, e inclusión en Epon 812.

Se obtuvieron cortes semifinos (1 $\mu$ m) y finos (60-90nm) en el ultramicrotomo; los cortes semifinos se tiñeron con azul de Toluidina, y los cortes finos con acetato de uranilo y citrato de plomo. Se analizó cuantitativamente la morfología de las uniones ocluyentes entre las células endoteliales, la presencia de WGA-peroxidasa en el espacio paracelular, la

frecuencia y longitud de hendiduras entre las células endoteliales, la presencia de canales transcelulares y la densidad en la formación de vesículas endosómicas en las células endoteliales (<100nm de diámetro) y de cuerpos multivesiculares (200-500nm de diámetro) (Jastrow, 2008; Nag, 2003b). Con base en el modelo de Huang et al. (2001), el desarrollo de las uniones ocluyentes se dividió en cuatro estadios: uniones ocluyentes tipo 1 (fin-fin), unión ocluyente tipo 2 (traslape simple), unión ocluyente tipo 3 (mortero) y unión ocluyente tipo 4 (compleja) (Figura 5).

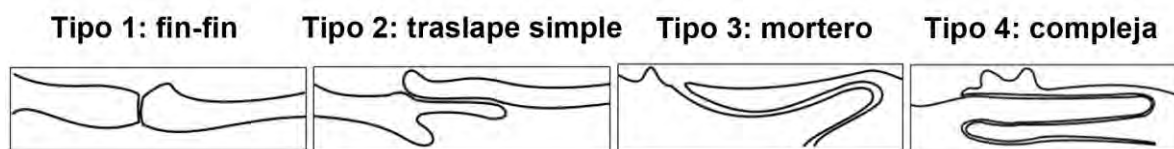


Figura 5. Estadios del desarrollo de las uniones ocluyentes entre las células endoteliales que forman la barrera hematoencefálica. Modificado de Huang et al. (2001).

**Estudio del efecto del estrés prenatal o postnatal sobre el desarrollo y distribución de la microglia:** para detectar la microglia en los días postnatales 1 y 10 se usó la isolectina de la *Griffonia simplicifolia* (GSAI-B4). La GSAI-B4 se acopla a los residuos  $\alpha$ -D-galactosa de glicoproteínas (Hayes y Goldstein, 1974) en la membrana de la microglia de los roedores (Streit y Kreutzberg, 1987). Además de la microglia, la lectina de la *Griffonia simplicifolia* tiñe el endotelio vascular encefálico; sin embargo, en el presente estudio y en reportes previos (Streit y Kreutzberg, 1987; Wu et al., 1992, 1993, 2001; Earle y Mitrofanis, 1998), la distinción entre endotelio encefálico y microglia no representó un problema para la cuantificación de la microglia gracias a las características morfológicas distintivas de cada tipo celular. Debido a que la expresión de los residuos de  $\alpha$ -D-galactosa en la membrana de la microglia se reduce durante la segunda semana postnatal (Wu et al., 1994), se usó un anticuerpo que reconoce a la proteína Iba1 para detectar la microglia en los días postnatales 20 y 30. La proteína Iba1, o molécula adaptadora de calcio ionizado 1, es una proteína intracelular que se expresa en células de linaje monocítico, como macrófagos y microglia, que interviene en la alta motilidad celular (Ohsawa et al., 2000; Kanazawa et al., 2002).

En los días postnatales 1, 10, 20 y 30 se sacrificó a 3-5 crías de cada condición experimental (estrés prenatal, estrés postnatal y control) (n total= 38). Se anestesió a las

crías con pentobarbital sódico ip. (6.3mg/kg peso corporal) y se perfundió por vía transcardíaca con solución salina 0.9% durante 5-8 minutos, seguida de paraformaldehído al 4% en PBS 0.1M durante 10 minutos a una velocidad de 3mL/min. Posteriormente, se extrajeron los cerebros, se obtuvo el peso cerebral y se continuó la post-fijación por inmersión en el mismo fijador (paraformaldehído al 4% en PBS 0.1M) durante 4 días a 4°C. Transcurrido ese período se embebió el tejido en solución de sacarosa al 30% durante 4 días a 4°C y se realizaron cortes coronales seriados por congelación de 40µm de espesor. Para evitar errores de cuantificación celular se seleccionó cada tercer corte para realizar la técnica de inmunohistoquímica.

Los cortes coronales se preincubaron en peróxido de hidrógeno al 1% en PBS durante 10 minutos para bloquear peroxidasas endógenas. Para la detección de la microglia con la isolectina de la *Griffonia simplicifolia* los cortes se lavaron en CaCl<sub>2</sub> 1mM y MgCl<sub>2</sub> 1mM diluidos en PBS-Tritón 1%. Posteriormente, los cortes se incubaron en una solución de isolectina de *Griffonia simplicifolia* (10µg/mL) con CaCl<sub>2</sub> 1mM y MgCl<sub>2</sub> 1mM diluidos en PBS-Tritón 1% (Streit y Kreutzberg, 1987) durante 48 horas a 4°C. Para la detección de la microglia con el anticuerpo anti-Iba1, después del bloqueo de peroxidasas endógenas se bloqueó con suero de cabra durante 1 hora a temperatura ambiente y se incubó con el anticuerpo anti-Iba1 (1µg/mL) diluido en TBS-tritón 1% durante 15 horas a 4°C. Después de varios lavados con TBS-tritón 1%, los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado cabra anti-conejo (prediluido) durante 48 horas a 4°C, seguido de incubación en el complejo Avidina-Biotina durante 3 horas a temperatura ambiente. Después de varios lavados con PBS se reveló la actividad de la peroxidasa de rábano con el kit de substrato de diaminobenzidina durante 2 a 4 minutos. Los cortes se colocaron en laminillas, se deshidrataron por desecación seguida de xileno y se montaron en entellán.

Se seleccionó al azar los cortes coronales a fotografiar de entre todos los cortes que contuvieran cada estructura de interés; se obtuvo una microfotografía por sujeto y por región. Las fotomicrografías se guardaron como archivos TIFF en formato de color verdadero (RGB), sin manipulación. Para la cuantificación de los efectos del estrés sobre el desarrollo y distribución de la microglia en el sistema nervioso central se usó la función de contador celular (*Cell Counter*; de Vos, 2005) del programa de análisis de imágenes ImageJ (Rasband, 2005).

Las estructuras del sistema nervioso en que se llevó a cabo la evaluación del desarrollo de la microglia fueron las cortezas visual, auditiva, somatosensorial, motora, de la ínsula, cíngulo, entorrinal, orbitofrontal y frontal, el hipocampo, septum, ganglios basales, amígdala, tálamo, hipotálamo, bulbo olfativo, cerebelo, mesencéfalo, puente y bulbo raquídeo. Adicionalmente se cuantificó la densidad de microglia en dos regiones de sustancia blanca subcortical consideradas reservorios de microglia en el mamífero, el cuerpo calloso y la cápsula interna, así como en la sustancia blanca del cerebelo. La localización de cada estructura se realizó con base en el atlas del cerebro de la rata de Paxinos y Watson (1998) para las crías de 10, 20 y 30 días de edad; mientras que para las crías de 1 día de edad, se usó el atlas de Altman y Bayer (1995). Las células de la microglia observadas se tipificaron en 4 tipos con base en la morfología del soma y la configuración de los procesos citoplásmicos; la clasificación de la microglia usada en el presente trabajo se realizó con base en una modificación de la clasificación hecha por Wu et al. (1992) y por Dalmau et al. (1997). La microglia se clasificó en: tipo 1 o microglia ameboidea; tipo 2 o microglia ameboidea con pseudopodios; tipo 3 o microglia con soma redondo y ramificaciones escasas, cortas y de gran calibre; y tipo 4 o microglia con soma aplanado, ramificaciones largas, delgadas y espinosas, considerado el último estadio de transición a la microglia en reposo del adulto (Figura 6).

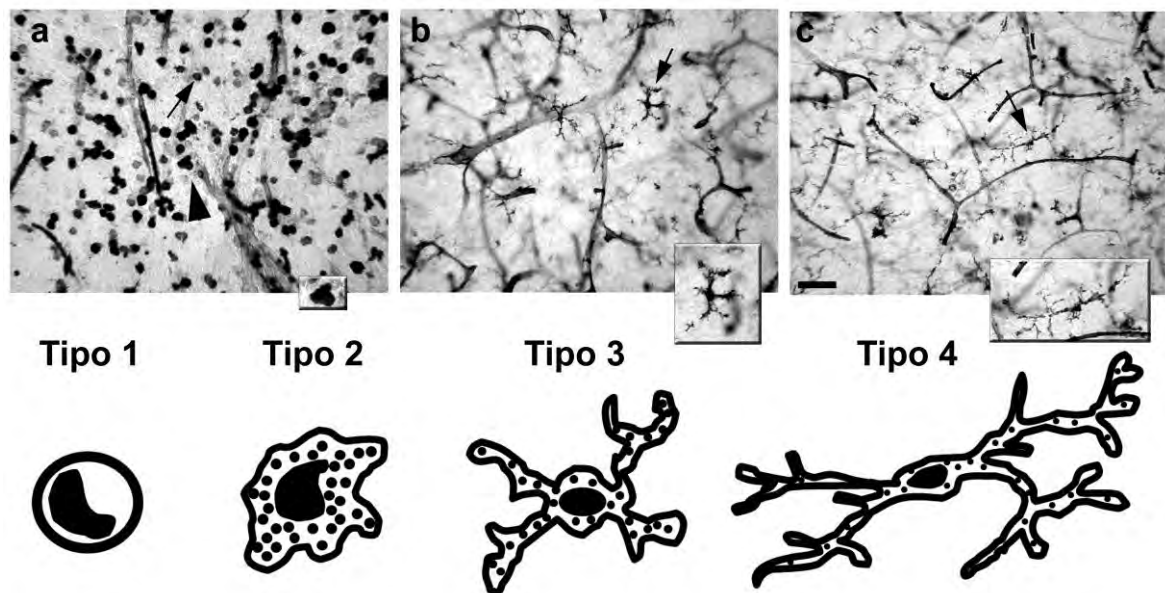


Figura 6. Estadios de desarrollo de la microglia en la rata. A) Cuerpo calloso del grupo control en el día postnatal 1; la flecha muestra una microglia Tipo 1 y la punta de flecha señala un ejemplo de

microglia Tipo 2. El inserto en A muestra una magnificación de la microglia Tipo 2 señalada. B) Mesencéfalo del grupo control en el día postnatal 10 en la que se muestra un ejemplo de microglia Tipo 3 (flecha). El inserto en B presenta una magnificación de la microglia ramificada Tipo 3 marcada en B. C) Corteza somatosensorial primaria en el día postnatal 10 que contiene un ejemplo de microglia Tipo 4 (flecha). El inserto en C presenta una magnificación de la microglia Tipo 4 señalada en C. Se observan también vasos sanguíneos inmunoreactivos a la lectina de la *Griffonia simplicifolia*. Barra de escala: 50 $\mu$ m. Los dibujos del panel inferior muestran la morfología característica de cada tipo de microglia. Modificada de Gómez-González y Escobar (2009b).

**Cuantificación de corticosterona en plasma:** en E20 se sacrificó por decapitación a dos ratas hembra gestantes, una rata control y otra expuesta a estrés durante E10 a E20. La rata expuesta a estrés durante la gestación se decapitó 5 minutos después del término de la sesión de nado forzado. De igual forma, en los días postnatales 1, 10, 20 y 30 se sacrificó por decapitación a 6-8 crías de cada condición experimental (estrés prenatal, estrés postnatal y control). Para evitar la variación intracamada, solo se obtuvo plasma de 2 crías de cada camada por condición experimental en cada una de las edades estudiadas. En todos los casos los sacrificios se llevaron a cabo entre las 1200-1210 horas para prevenir el efecto del ritmo circadiano de corticosterona; en el caso de las crías expuestas a estrés postnatal, el sacrificio se realizó 5 minutos después del término del período de separación materna. Se homogenizó las muestras obtenidas de los sujetos de la misma condición y edad. La sangre se colectó en un tubo de ensayo con gel activador de coagulo/Z (marca Vacutainer). Los tubos se centrifugaron a 6000 revoluciones por minuto, se obtuvo el suero y se almacenó a -20°C hasta el momento de la cuantificación de la concentración de corticosterona en plasma por radioinmunoensayo. Para la cuantificación se usó corticosterona de rata acoplada a I<sup>125</sup> como marcador; el procedimiento se efectuó siguiendo las instrucciones del proveedor del kit (Diagnostic Products Corporation). Se incubaron 50 $\mu$ L de plasma homogenado de sujetos de la misma condición y edad con corticosterona de rata marcada con I<sup>125</sup> en tubos de polipropileno durante dos horas a temperatura ambiente, seguido por decantación rápida y remoción de la humedad residual. Se incluyeron los siguientes controles de técnica: tubos de polipropileno vacíos y tubos de polipropileno con 1mL de corticosterona de rata acoplada a I<sup>125</sup> (radioactividad total). La radioactividad residual en

cada tubo se cuantificó durante un minuto en un contador Gamma. La concentración mínima de corticosterona detectada por el kit es 5.7ng/mL de plasma.

**Análisis estadístico:** se realizó un análisis exploratorio de los datos para determinar el cumplimiento de los supuestos estadísticos requeridos para la realización de pruebas paramétricas; la mayoría de las variables dependientes cuantificadas en el presente trabajo presentaron distribución normal. El supuesto de independencia entre las unidades experimentales se cumplió al seleccionar al azar a los sujetos de cada condición y cada edad. Debido a que algunas de las variables no cumplieron con el supuesto de esfericidad (que implica homogeneidad de varianzas y correlaciones bivariadas idénticas), requerido para la realización de la prueba ANOVA factorial, los valores de F obtenidos se evaluaron con base en el ajuste de grados de libertad ( $\epsilon$ ) de Huynh-Feldt. El coeficiente de corrección de Huynh-Feldt disminuye los grados de libertad para evaluar la F obtenida y con ello reduce la probabilidad de error estadístico tipo I (Box et al., 2005). Los análisis estadísticos se realizaron en los programas JMP, versión 4.0.2 Academic (SAS Institute Inc., EUA) y SPSS, versión 10.0 para Windows.

En el presente trabajo, el estudio del efecto del estrés prenatal o postnatal sobre el desarrollo de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica se analizó con la prueba ANOVA factorial, usando como factores la condición experimental (control, estrés prenatal y estrés postnatal), la edad (días postnatales 1, 10, 20 y 30) y las regiones nerviosas de interés. El efecto del procedimiento de administración del colorante (*ic versus ip*) sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en el grupo control se analizó también con el uso de la prueba ANOVA factorial, empleando como factores la región nerviosa y la edad. De igual forma, para el estudio del efecto del estrés sobre el desarrollo y distribución de la microglia se empleó la prueba ANOVA factorial usando como factores la región nerviosa de interés, el tipo celular (tipos 1, 2, 3 y 4), la condición experimental (control, estrés prenatal y estrés postnatal) y la edad (días postnatales 1, 10, 20 y 30). Las diferencias entre los grupos estrés prenatal, estrés postnatal y control en la magnitud del peso corporal, peso cerebral y la cantidad administrada de azul de Evans por vía intracardíaca se compararon con el uso de la prueba ANOVA de dos vías (*condición experimental x edad*).

Para determinar las diferencias específicas entre cada grupo de estrés (prenatal o postnatal) y el grupo control a cada edad estudiada, se realizaron códigos de contrastes ortogonales



para las pruebas ANOVA que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. En la prueba ANOVA factorial con factores intrasujetos y comparaciones múltiples se recomienda el uso de códigos de contraste ortogonales en lugar de pruebas *post-hoc* tradicionales para reducir la probabilidad de error estadístico tipo I (Abdi y Williams, 2010). Los códigos de contraste ortogonales permiten hacer sólo las comparaciones planeadas (p. ej. estrés prenatal *versus* control y estrés postnatal *versus* control) y evitan la comparación estadística entre condiciones no planeadas (p. ej. estrés prenatal *versus* estrés postnatal) (Box et al., 2005; Abdi y Williams, 2010). Los códigos de contraste se construyen al asignar coeficientes ( $C_1$ ) con valores positivos y negativos a las condiciones que se desean comparar. Para lograr la ortogonalidad o independencia, la suma y correlación de los coeficientes de contraste debe ser igual a 0 (Abdi y Williams, 2010). En particular, en el presente proyecto se asignaron valores de 1 y -1 a los grupos de estrés (prenatal o postnatal) y control, respectivamente. Posteriormente, se compararon los coeficientes de contraste mediante el uso de pruebas *F* o *t* de Student. En todas las pruebas estadísticas el valor de alfa ( $\alpha$ ) se mantuvo igual o menor a 0.05.

## **RESULTADOS**

### **Efecto del estrés prenatal o postnatal sobre el peso corporal y el peso cerebral.**

La exposición a estrés durante fases tempranas de la vida (etapas prenatal y postnatal) no modificó la masa corporal y cerebral durante el primer mes postnatal. Como se muestra en la Tabla 1, las crías expuestas a estrés prenatal o postnatal presentaron valores similares en la magnitud del peso corporal y peso cerebral a los observados en las crías del grupo control en los días postnatales 1, 10, 20 y 30 (Peso corporal:  $F(5-99)=0.313$ ,  $p=0.904$ ; Peso cerebral:  $F(5-97)=0.301$ ,  $p=0.911$ ). El único cambio estadísticamente significativo encontrado en todos los grupos experimentales fue aumento progresivo en la masa corporal y en el peso cerebral asociado a la edad de los sujetos (Peso corporal:  $F(3-99)=691.462$ ,  $p<0.001$ ; Peso cerebral:  $F(3-97)=1418.734$ ,  $p<0.001$ ).

Tabla 1. Peso corporal y peso cerebral en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en los días postnatales 1, 10, 20 y 30.

	<b>Edad</b>	<b>Peso Corporal</b>	<b>Peso Cerebral</b>
		<b>(g)</b>	<b>(g)</b>
<b>Control</b>	<b>1</b>	6.67 ± 0.12	0.31 ± 0.01
	<b>10</b>	19.83 ± 0.70	1.02 ± 0.02
	<b>20</b>	45.77 ± 1.63	1.52 ± 0.02
	<b>30</b>	102.25 ± 3.78	1.71 ± 0.03
<b>Estrés Prenatal</b>	<b>1</b>	6.34 ± 0.25	0.31 ± 0.01
	<b>10</b>	21.14 ± 1.05	1.02 ± 0.02
	<b>20</b>	46.37 ± 1.77	1.51 ± 0.02
	<b>30</b>	104.88 ± 5.62	1.74 ± 0.02
<b>Estrés Postnatal</b>	<b>10</b>	19.31 ± 0.57	1.05 ± 0.03
	<b>20</b>	44.14 ± 2.46	1.51 ± 0.02
	<b>30</b>	97.21 ± 6.29	1.73 ± 0.03

Media +/- error estándar. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

### **Concentración de corticosterona en plasma**

Con el propósito de determinar si los procedimientos usados (nado forzado y separación materna) desencadenaron la respuesta clásica de estrés en los sujetos experimentales, se cuantificó la concentración de corticosterona plasmática en las ratas madre y en las crías de todas las condiciones experimentales. El estrés durante la gestación aumentó 400% los niveles plasmáticos de corticosterona en la rata adulta dos días antes del día esperado de parto (día 20 de la gestación) en comparación con la rata control, libre de toda manipulación de estrés, en la misma etapa gestacional. La concentración de corticosterona en plasma en la rata control fue de 332.58ng/mL y en la rata expuesta a estrés durante los días 10 a 20 de la gestación fue de 1552.35ng/mL.

Debido al período de hipo-respuesta de estrés, presente durante las primeras dos semanas postnatales en la rata (Sapolsky y Meaney, 1986), los niveles circulantes de

glucocorticoides en todas las crías fueron considerablemente menores a los observados en las ratas gestantes. A pesar de ello, el estrés produjo cambios en la concentración plasmática de corticosterona respecto a las crías control de la misma edad ( $F(3-8)=80.85$ ,  $p<0.01$ ) (Tabla 2). En el día postnatal 1 el estrés prenatal aumentó 63% la concentración de corticosterona en plasma respecto al grupo control ( $C_1$ ,  $p>0.05$ ). En los días postnatales 10 y 20 sólo el grupo de estrés postnatal presentó aumento en la concentración de corticosterona en plasma con respecto al control cinco minutos después de terminado el período de privación materna ( $C_1$ ,  $p<0.001$ ); mientras que, el grupo de estrés prenatal presentó niveles de glucocorticoides similares a los observados en el grupo control de las mismas edades ( $C_1$ ,  $p>0.05$ ) (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración de corticosterona en plasma en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal.

	<b>Edad</b>	<b>Corticosterona plasmática (ng/mL)</b>
<b>Control</b>	<b>1</b>	46.65 ± 14.91
	<b>10</b>	6.03 ± 2.27
	<b>20</b>	19.54 ± 8.45
	<b>30</b>	97.71 ± 25.55
<b>Estrés Prenatal</b>	<b>1</b>	76.48 ± 14.91
	<b>10</b>	8.40 ± 3.23
	<b>20</b>	30.82 ± 12.39
	<b>30</b>	28.28 ± 25.55
<b>Estrés Postnatal</b>	<b>10</b>	22.66 ± 4.60 *
	<b>20</b>	193.39 ± 1.03 *
	<b>30</b>	15.44 ± 25.55

Media +/- error estándar.\*Diferencias significativas en comparación con el grupo control de la misma edad ( $p<0.05$ ).

Al mes de edad, los niveles de corticosterona plasmática del grupo control se aproximaron a los observados en el adulto en condiciones fisiológicas; sin embargo, en los grupos de estrés prenatal o postnatal de un mes de edad, la concentración plasmática de corticosterona fue similar a la observada durante los primeros 20 días postnatales, dentro del período de hipo-respuesta de estrés (Tabla 2). Los hallazgos en las crías de un mes de edad expuestas a estrés crónico perinatal sugieren que el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales aún no ha terminado su maduración.

### **Efecto del estrés prenatal o postnatal sobre el desarrollo funcional de la barrera hematoencefálica**

Con el propósito de controlar el efecto de la posible ruptura de la barrera hematoencefálica como consecuencia del volumen administrado de azul de Evans por vía intracardiaca, se comparó la cantidad administrada de azul de Evans en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal. Como se muestra en la Tabla 3, la cantidad administrada de azul de Evans en los grupos de estrés (prenatal y postnatal) fue similar a la administrada en el grupo control en cada una de las edades estudiadas (días postnatales 1, 10, 20 y 30) ( $F(5-27)=1.428$ ,  $p=0.246$ ).

En el grupo control, el colorante azul de Evans tiñó intensamente las regiones encefálicas que carecen de barrera hematoencefálica, como el plexo coroideo, los órganos circunventriculares, la eminencia media y la glándula pineal; mientras que, las regiones que poseen barrera hematoencefálica, como la neocorteza, núcleos grises subcorticales, cerebelo y tallo cerebral, presentaron ligera tinción durante el primer mes postnatal, sin cambios significativos asociados a la edad ( $p>0.05$ ) (Figura 7).

Tabla 3. Cantidad administrada de azul de Evans por vía ic. a los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en cada una de las edades estudiadas.

	<b>Edad</b>	<b>Azul de Evans ic. (mL)</b>
<b>Control</b>	<b>1</b>	0.023 ± 0.005
	<b>10</b>	0.085 ± 0.005
	<b>20</b>	0.193 ± 0.005
	<b>30</b>	0.410 ± 0.078
<b>Estrés Prenatal</b>	<b>1</b>	0.023 ± 0.005
	<b>10</b>	0.095 ± 0.010
	<b>20</b>	0.187 ± 0.023
	<b>30</b>	0.415 ± 0.070
<b>Estrés Postnatal</b>	<b>10</b>	0.072 ± 0.005
	<b>20</b>	0.193 ± 0.025
	<b>30</b>	0.333 ± 0.011

Media +/- error estándar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $p > 0.05$ ).

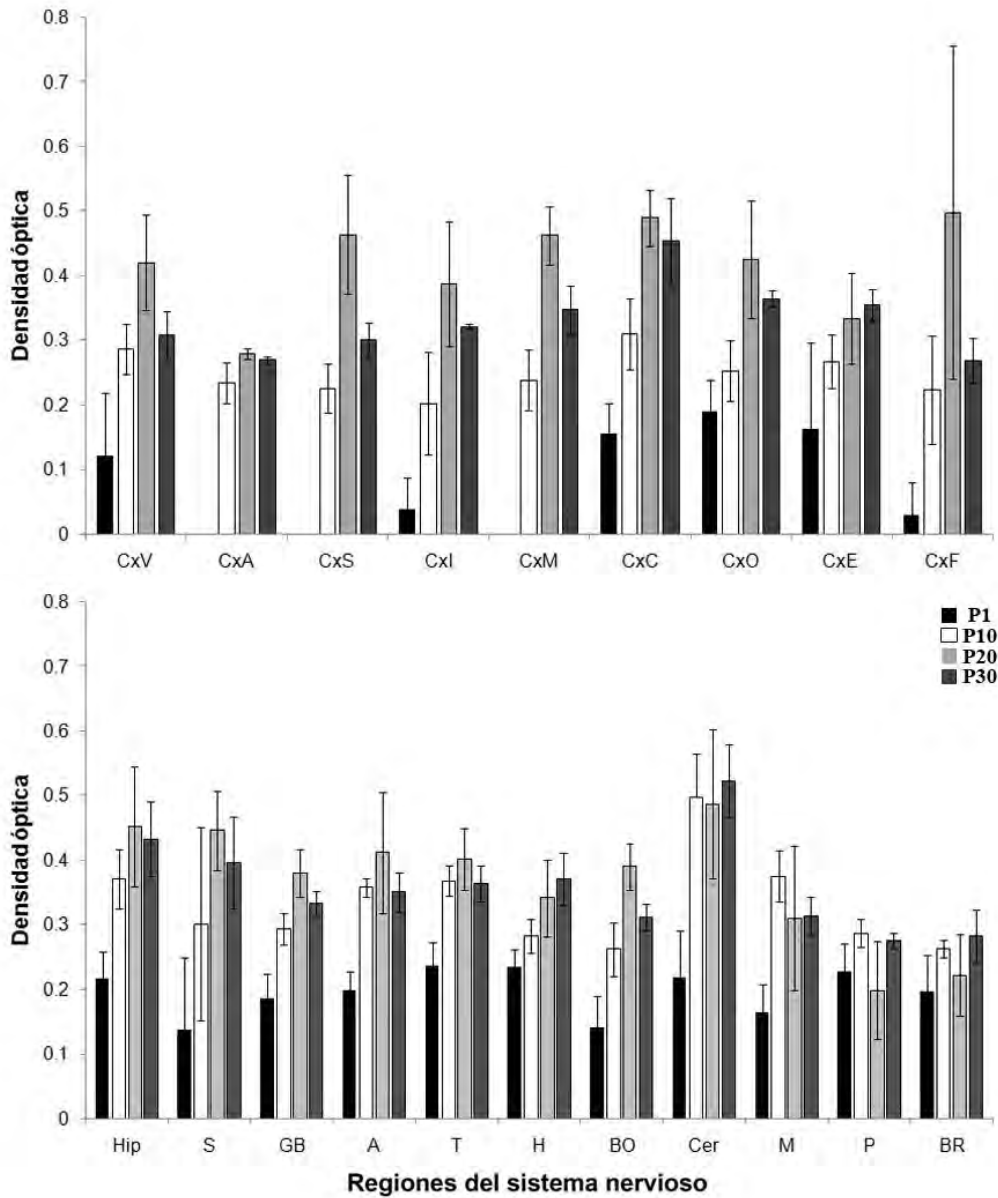


Figura 7. Desarrollo de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al colorante azul de Evans en el grupo control. Media +/- error estándar de unidades de densidad óptica en el grupo control en los días postnatales 1, 10, 20 y 30.

La exposición a estrés durante la gestación y la etapa postnatal temprana modificó significativamente el desarrollo de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al colorante azul de Evans durante el primer mes postnatal ( $F(42.14-227.59)=1.902$ ,  $p=0.002$ ). En el día postnatal 1, el grupo de estrés prenatal presentó niveles de densidad óptica

similares a los observados en el grupo control de la misma edad en cada una de las regiones encefálicas estudiadas ( $p > 0.05$ ) (Figuras 8 y 9).

En el día postnatal 10, sólo el grupo de estrés postnatal presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al colorante azul de Evans; mientras que las crías expuestas a estrés prenatal presentaron permeabilidad de la barrera hematoencefálica similar a la observada en el grupo control de la misma edad (Figuras 8 y 9). Las áreas de la neocorteza con permeabilidad aumentada al colorante azul de Evans en el grupo de estrés postnatal fueron la circunvolución del cíngulo ( $C_1$ ,  $p < 0.001$ ), las cortezas orbitofrontal ( $C_1$ ,  $p = 0.002$ ), de la ínsula ( $C_1$ ,  $p = 0.006$ ), entorrinal ( $C_1$ ,  $p = 0.003$ ), motora ( $C_1$ ,  $p = 0.005$ ), somatosensorial ( $C_1$ ,  $p = 0.003$ ), visual ( $C_1$ ,  $p = 0.004$ ) y auditiva ( $C_1$ ,  $p = 0.002$ ) (Figura 10). Adicionalmente, la exposición a estrés postnatal aumentó la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al azul de Evans en la corteza del cerebelo ( $C_1$ ,  $p = 0.006$ ), hipocampo ( $C_1$ ,  $p < 0.001$ ), bulbo olfatorio ( $C_1$ ,  $p = 0.004$ ), tálamo ( $C_1$ ,  $p = 0.001$ ), hipotálamo ( $C_1$ ,  $p = 0.004$ ), ganglios basales ( $C_1$ ,  $p = 0.001$ ), mesencéfalo ( $C_1$ ,  $p = 0.004$ ), puente ( $C_1$ ,  $p = 0.004$ ) y bulbo raquídeo ( $C_1$ ,  $p = 0.006$ ) en las crías de 10 postnatales en comparación con el grupo control de la misma edad (Figura 11).

El efecto adverso del estrés prenatal sobre el desarrollo funcional de la barrera hematoencefálica se observó hasta el día postnatal 20; edad en la que las crías expuestas a estrés prenatal presentaron mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica en la neocorteza, estructuras subcorticales, tallo cerebral y cerebelo en comparación con el grupo control de la misma edad. En el grupo de estrés prenatal se observó tinción azul oscura en la circunvolución del cíngulo ( $C_1$ ,  $p = 0.006$ ), y en las cortezas motora ( $C_1$ ,  $p = 0.012$ ), auditiva ( $C_1$ ,  $p = 0.024$ ) y visual ( $C_1$ ,  $p = 0.007$ ) (Figura 10). Asimismo, el estrés prenatal aumentó la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al azul de Evans en el hipocampo ( $C_1$ ,  $p = 0.002$ ), septum ( $C_1$ ,  $p = 0.006$ ), ganglios basales ( $C_1$ ,  $p = 0.015$ ), tálamo ( $C_1$ ,  $p = 0.013$ ), hipotálamo ( $C_1$ ,  $p = 0.024$ ), corteza del cerebelo ( $C_1$ ,  $p = 0.044$ ), mesencéfalo ( $C_1$ ,  $p = 0.005$ ) y puente ( $C_1$ ,  $p = 0.027$ ) en comparación con el grupo control de 20 días postnatales (Figura 11).



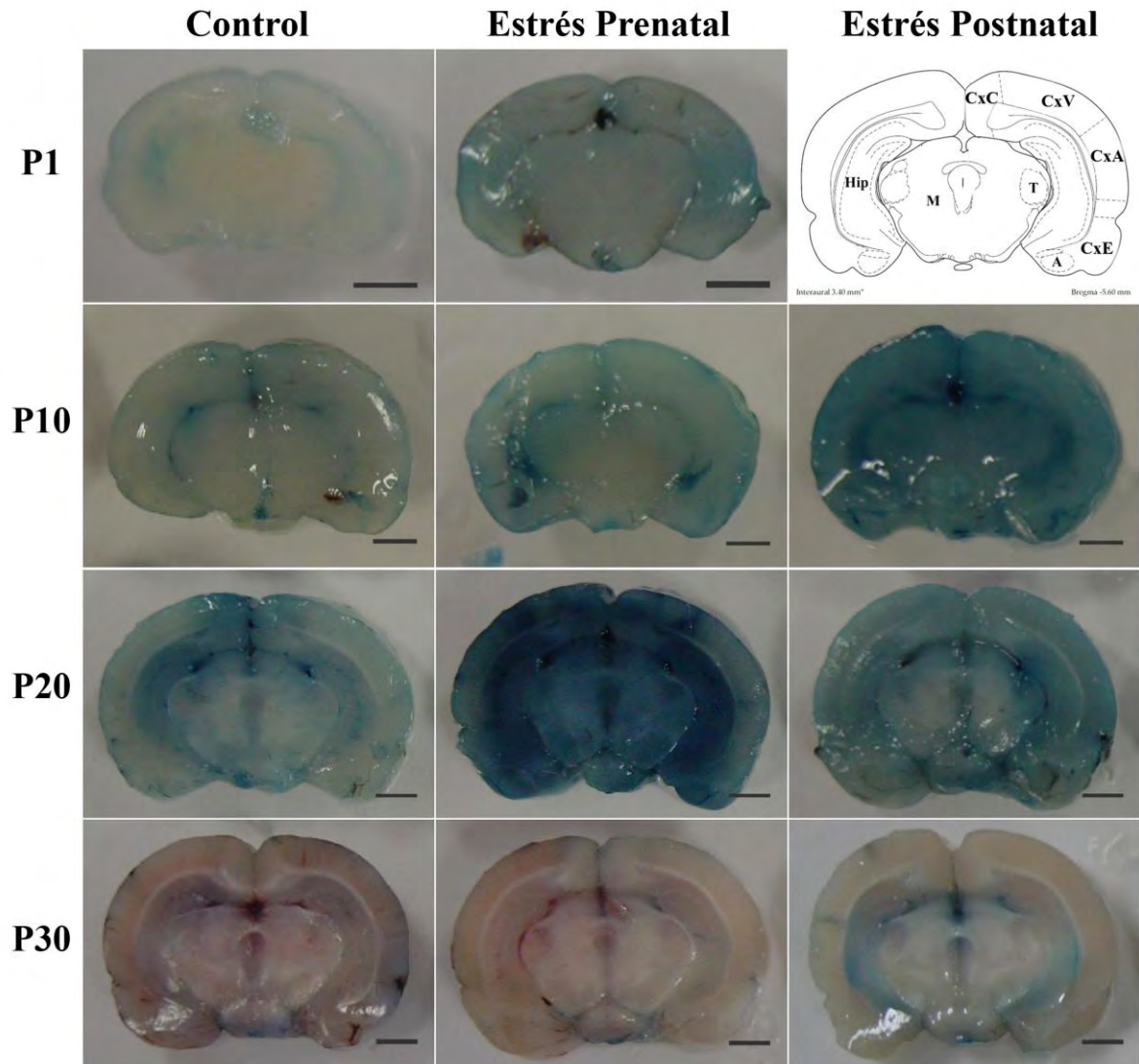


Figura 8. Desarrollo de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al colorante azul de Evans en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal. Cortes coronales a nivel de la lámina coronal 18 de Altman y Bayer (1995) para P1, y de la lámina 42 (Bregma -5.60mm) de Paxinos y Watson (1998) para los días P10, P20 y P30. Modificada de Gómez-González y Escobar (2009a). Barra de escala: 2mm.

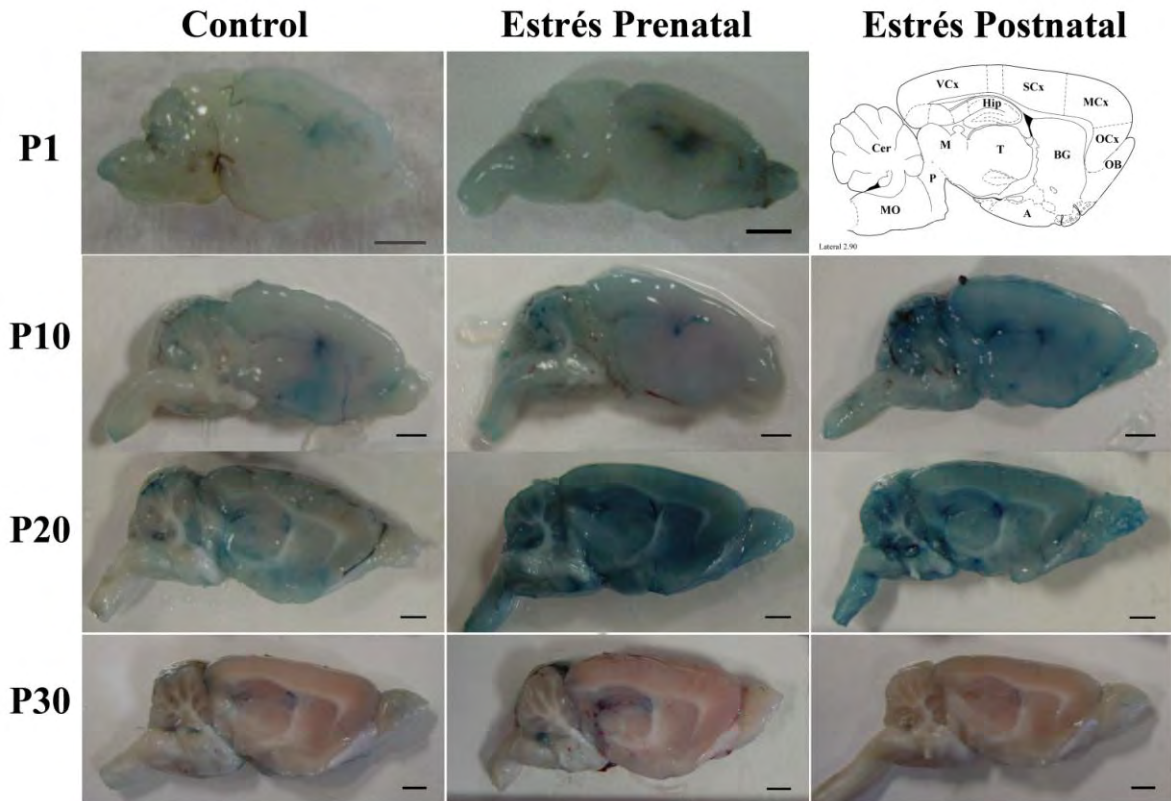


Figura 9. Desarrollo de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al colorante azul de Evans en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal. Cortes sagitales a nivel de la lámina sagital 6 de Altman y Bayer (1995) para P1, y de la lámina 86 (Lateral 3.40mm) de Paxinos y Watson (1998) para los días P10, P20 y P30. Modificada de Gómez-González y Escobar (2009a). Barra de escala: 2mm.

Por el contrario, las crías expuestas a estrés postnatal de 20 días de edad presentaron niveles similares de densidad óptica a los observados en el grupo control de la misma edad en todas las estructuras nerviosas estudiadas (Figuras 8-11). Como se observa en las Figuras 8 a 11 en el día postnatal 30 ambos grupos de estrés, prenatal y postnatal, alcanzaron un desarrollo normal de la barrera hematoencefálica; con permeabilidad de la barrera similar a la observada en los controles de un mes de edad, y tinción azul sólo en las regiones que están irrigadas por capilares fenestrados (órganos circunventriculares, plexo coroideo, eminencia media y glándula pineal).

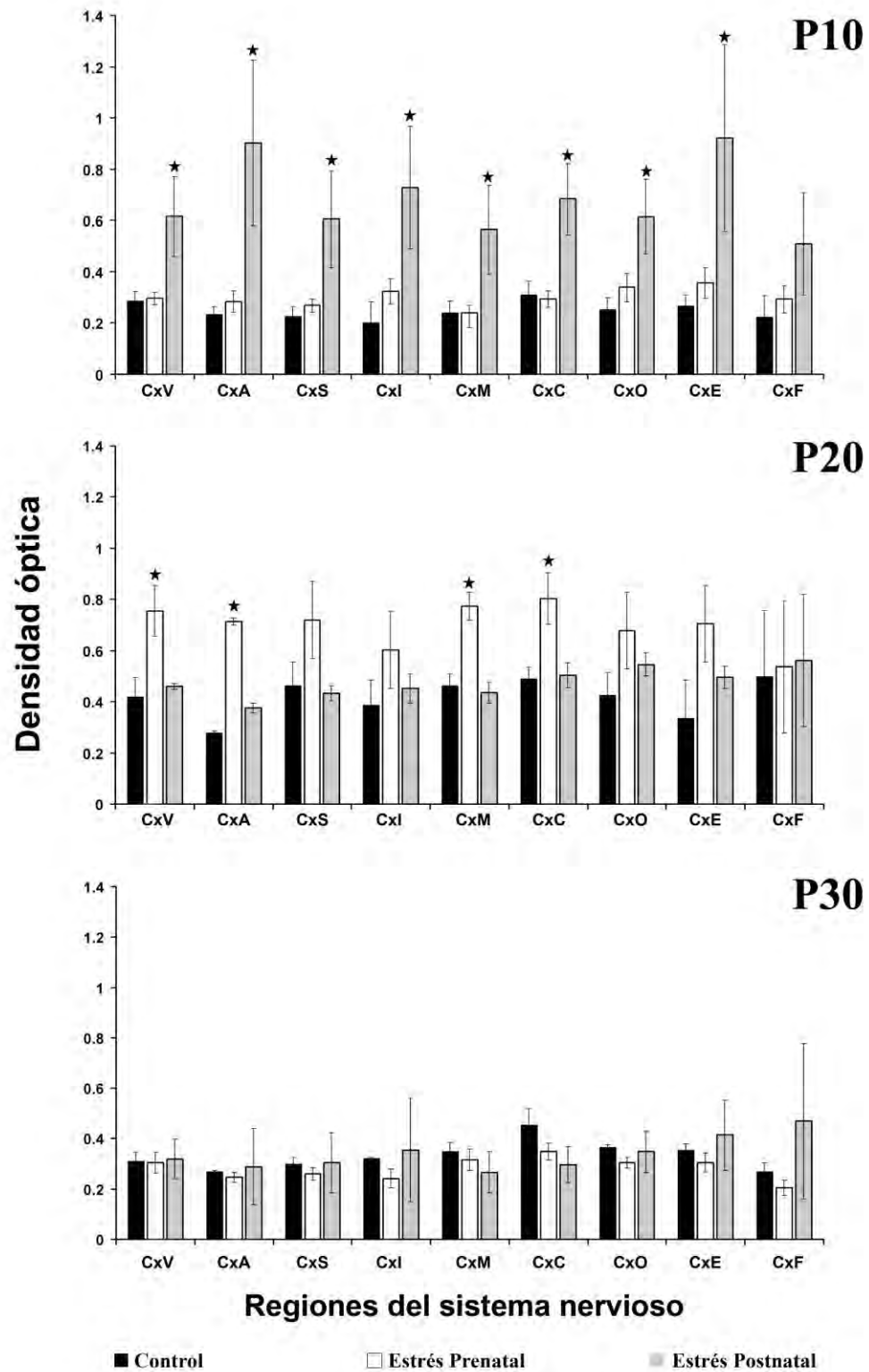


Figura 10. Permeabilidad de la barrera hematoencefálica en la neocorteza de los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal. Media  $\pm$  error estándar de unidades de densidad óptica. \*Diferencias significativas en comparación con el grupo control de la misma edad.

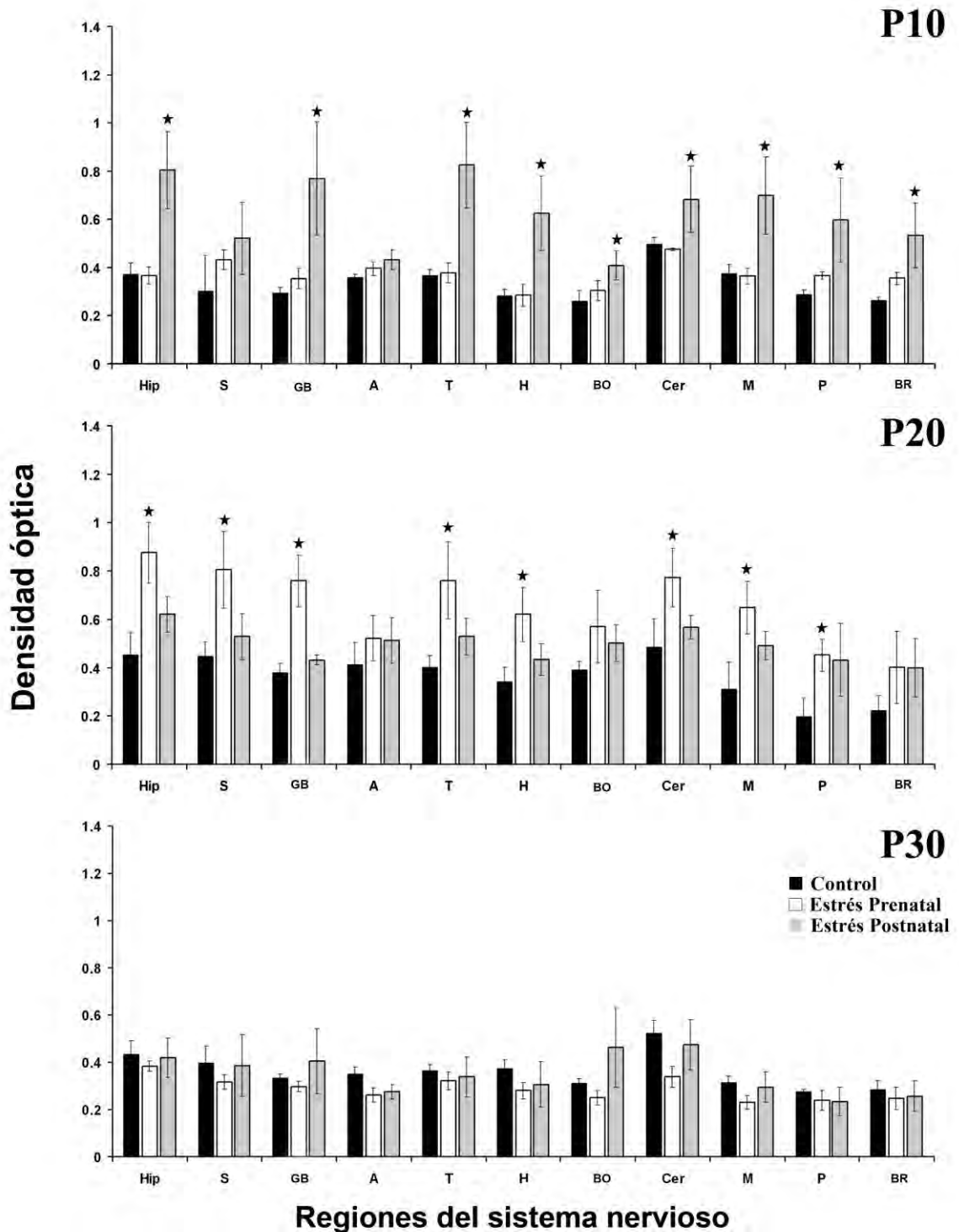


Figura 11. Permeabilidad de la barrera hematoencefálica en varias regiones encefálicas de los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal. Media  $\pm$  error estándar de unidades de densidad óptica. \* Diferencias significativas en comparación con el grupo control de la misma edad.

Con el uso de la fórmula de Fry (1977, ver Anexo 1) se calculó la concentración de azul de Evans presente en la superficie de las distintas estructuras nerviosas estudiadas en las crías de los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en los días postnatales 1, 10, 20 y 30. La prueba ANOVA mostró que hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en la concentración del colorante azul de Evans en las distintas regiones nerviosas estudiadas ( $F(27.04-155.52)=2.038$ ,  $p=0.004$ ). En el día postnatal 1 el grupo de estrés prenatal tendió a presentar mayor concentración del colorante azul de Evans en numerosas estructuras encefálicas en comparación con las crías control de la misma edad (Tabla 4); sin embargo las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p>0.05$ ).

Tabla 4. Concentración de azul de Evans (M) en distintas estructuras nerviosas de los grupos control y estrés prenatal en el día postnatal 1.

	<b>Neocorteza (nmol/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Hipocampo (nmol/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Diencéfalo (nmol/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Tallo cerebral (nmol/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Cerebelo (nmol/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Ganglios basales (nmol/cm<sup>2</sup>)</b>
<b>Control</b>	7.75 ± 2.70	10.01 ± 1.92	9.65 ± 1.54	6.90 ± 1.96	9.40 ± 3.31	10.26 ± 2.28
<b>Estrés Prenatal</b>	17.62 ± 4.60	16.69 ± 2.27	14.47 ± 3.14	9.83 ± 2.11	13.21 ± 2.98	18.92 ± 2.01

Media +/- error estándar de M (nmol/cm<sup>2</sup>).

Como se muestra en las Figuras 12 y 13, las crías expuestas a estrés postnatal de 10 días de edad presentaron aumento en la concentración del colorante azul de Evans en la mayor parte del encéfalo en comparación con las crías control de la misma edad ( $C_1$ ,  $p<0.05$ ); mientras que el grupo de estrés prenatal de 10 días postnatales no difirió significativamente del grupo control en la concentración del colorante azul de Evans en las regiones nerviosas estudiadas ( $C_1$ ,  $p>0.05$ ). En el día postnatal 20, las crías expuestas a estrés prenatal presentaron mayor acumulación del colorante azul de Evans en las distintas regiones estudiadas en comparación con las crías control de la misma edad ( $C_1$ ,  $p<0.05$ ), mientras

que las crías expuestas a estrés postnatal de 20 días de edad presentaron concentración del colorante azul de Evans similar a la del grupo control ( $C_1$ ,  $p>0.05$ ). En el día postnatal 30, la concentración del colorante azul de Evans fue similar en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal; como se observa en la Figuras 12 y 13, la acumulación del colorante dentro del tejido nervioso tendió a ser menor a la observada en las crías de cada condición experimental en los días en que la barrera hematoencefálica estaba funcionalmente inmadura (días postnatales 1, 10, y 20).

Con el propósito de demostrar que el colorante azul de Evans se acumuló dentro del parénquima encefálico y que la densidad óptica cuantificada en cada región no fue producto de remanentes de azul de Evans en las paredes de la vasculatura cerebral después de la perfusión, se realizaron cortes coronales de cerebros teñidos con azul de Evans y se observaron al microscopio de epifluorescencia. Como se muestra en la Figura 14, el colorante azul de Evans se distribuyó uniformemente en el parénquima nervioso, en este caso el hipocampo, de las crías control y expuestas a estrés; adicionalmente, se observaron algunas regiones con mayor intensidad de la señal fluorescente, que corresponden a las paredes de algunos grandes vasos sanguíneos. Concurrente con lo previamente mostrado respecto al efecto del estrés crónico perinatal sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al colorante azul de Evans, se observó que la intensidad de la epifluorescencia del azul de Evans fue mayor en las crías expuestas a estrés postnatal de 10 días de edad en comparación con las crías control y con las crías del grupo de estrés prenatal de la misma edad (P10) (Figura 14). Asimismo, las crías expuestas a estrés prenatal de 20 días de edad presentaron mayor intensidad de fluorescencia en comparación con las crías control de la misma edad (Figura 14).

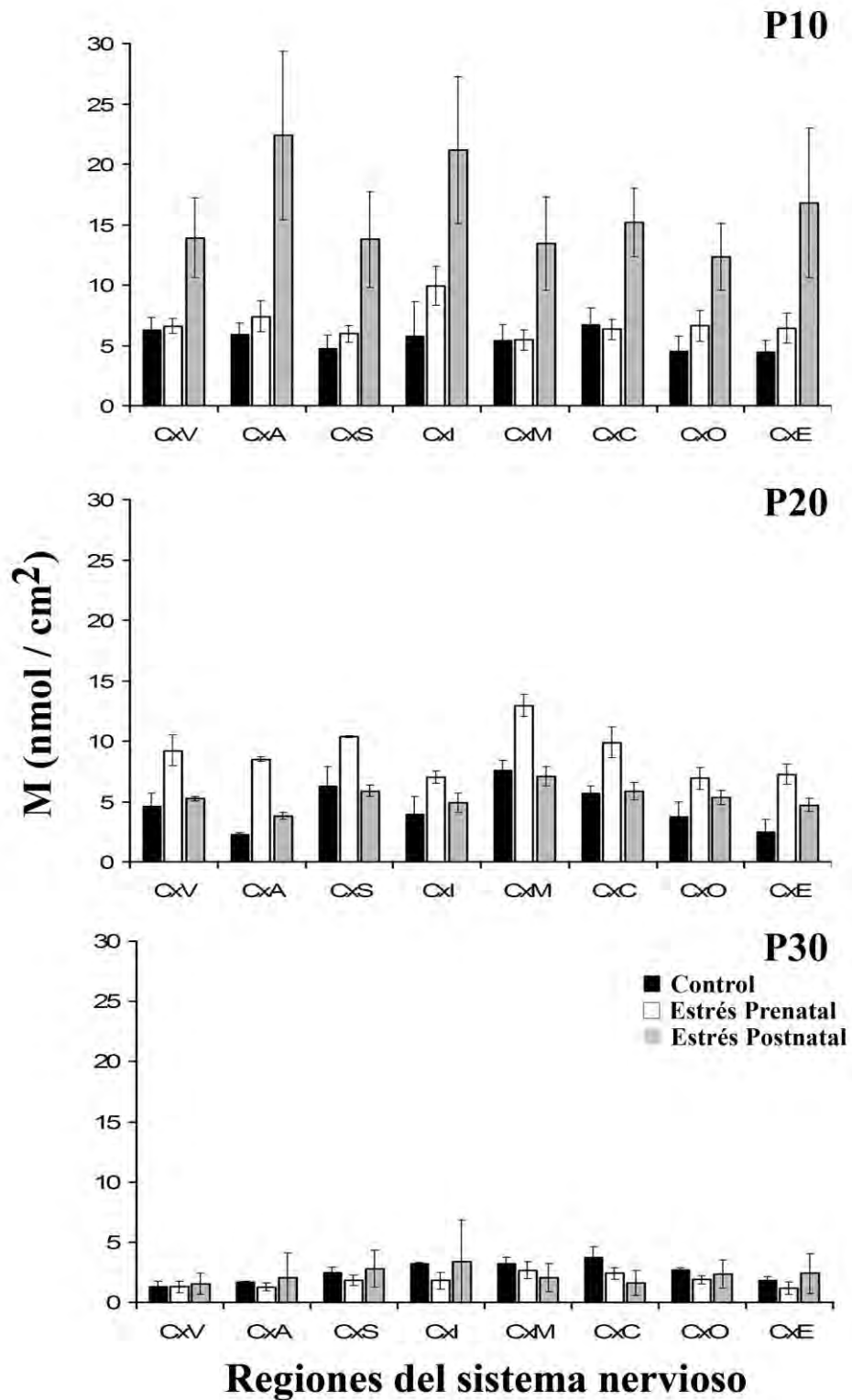


Figura 12. Concentración del colorante azul de Evans (M) en las distintas regiones de neocorteza en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en los días postnatales 10, 20 y 30. Media  $\pm$  error estándar de concentración del azul de Evans.

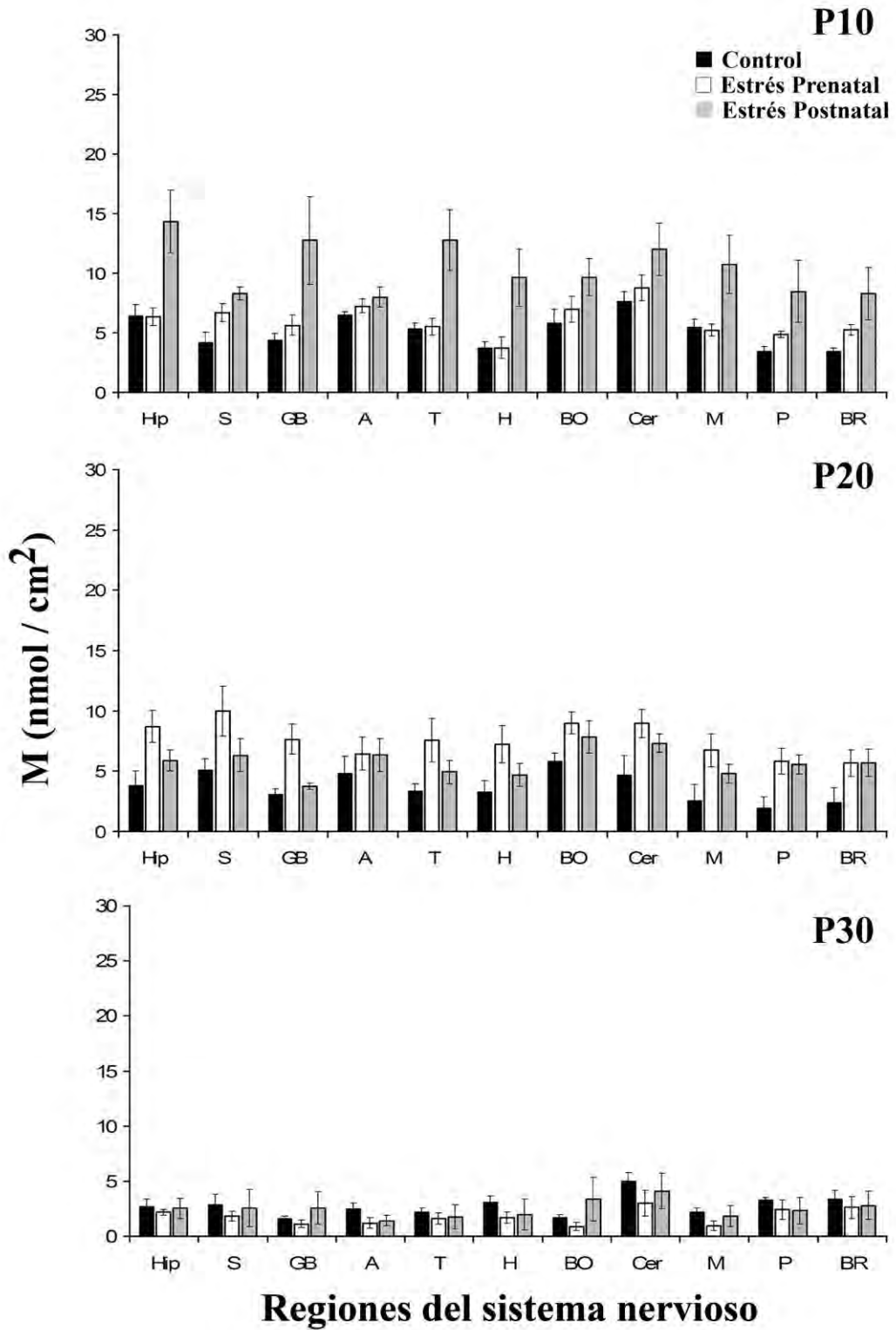


Figura 13. Concentración del colorante azul de Evans (M) en otras regiones encefálicas en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en los días postnatales 10, 20 y 30. Media  $\pm$  error estándar de concentración del azul de Evans.



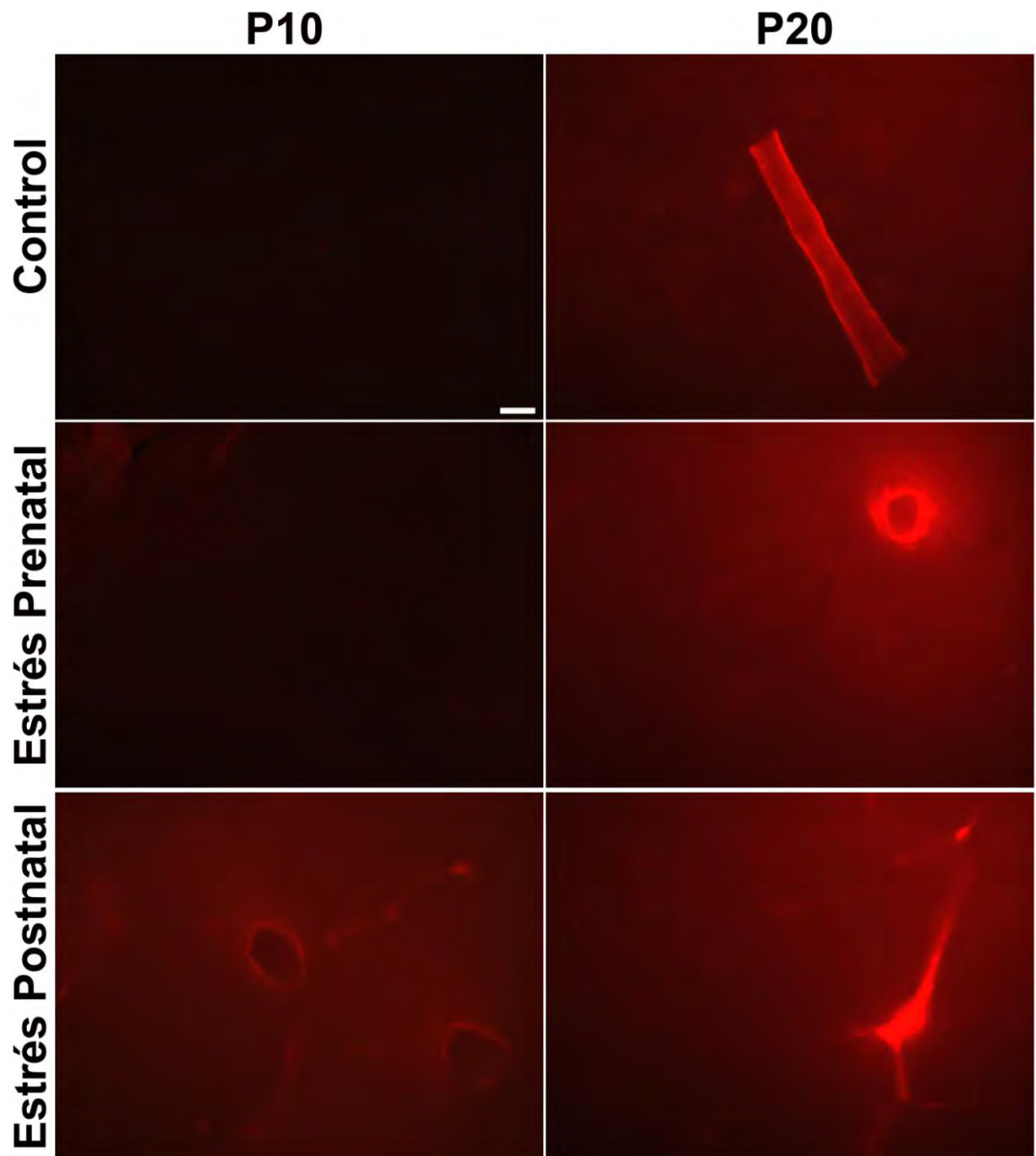


Figura 14. Distribución del colorante azul de Evans en el hipocampo de crías control, expuestas a estrés prenatal y estrés postnatal. Fluorescencia del azul de Evans en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en los días postnatales 10 y 20. Barra de escala: 20 $\mu$ m.

*Efecto del procedimiento de administración del colorante azul de Evans (intracardiaca versus intraperitoneal) sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en el grupo control*

Se administró azul de Evans por vía intraperitoneal para controlar el posible efecto adverso de la hipoxia, secundario a la apertura de la cavidad torácica, sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Kaur y Ling, 2008). Ambas formas de administración del colorante (ic. e ip.) produjeron tinción color azul intenso del soma de las crías. La forma de administración del azul de Evans (intracardiaca *versus* intraperitoneal) no influyó significativamente sobre el grado de permeabilidad de la barrera hematoencefálica en todas las estructuras nerviosas estudiadas (Figura 15) ( $F(23.21-139.30)=1.29$ ,  $p=0.18$ ). Por lo que se desechó la posibilidad que la hipoxia asociada a la apertura de la caja torácica contribuyera al cambio observado en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.

**Mecanismo por el que el estrés prenatal o postnatal altera el desarrollo funcional de la barrera hematoencefálica (estudio ultraestructural)**

El estudio ultraestructural se llevó a cabo en la formación hipocámpica de una cría control y de dos crías expuestas a estrés prenatal y a estrés postnatal en cada edad, debido a que el hipocampo presentó aumento significativo en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al colorante azul de Evans en ambos grupos de estrés. Específicamente, la cuantificación del efecto del estrés sobre el desarrollo anatómico de la barrera hematoencefálica se llevó a cabo en cortes finos que contuvieron el estrato *radiatum* y parte del giro dentado y del sector CA1 del hipocampo. En la Figura 16 se presentan los cortes semifinos posteriores a la obtención de los cortes finos de la formación hipocámpica. Las estructuras hipocámpicas que se muestran en la Figura 16 son ligeramente distintas entre las edades debido a cambios en el volumen encefálico del día postnatal 1 al 30 (ver Tabla 1); sin embargo la revisión de los cortes semifinos previos al tallado de la pirámide para los cortes finos (no mostrado) permitió la obtención de la misma región de la formación hipocámpica en todas las edades. La región en la que se llevó a cabo el estudio ultraestructural presenta alta densidad de capilares ( $<10\mu\text{m}$  de diámetro) y de vasos sanguíneos de mayor calibre (arteriolas y vénulas). En la Figura 16 se observa el lumen no teñido de los capilares, arteriolas y venulas y, formando la pared de los vasos sanguíneos se

observa una delgada capa de células endoteliales (teñidas en color morado) (ver inserto en Figura 16).

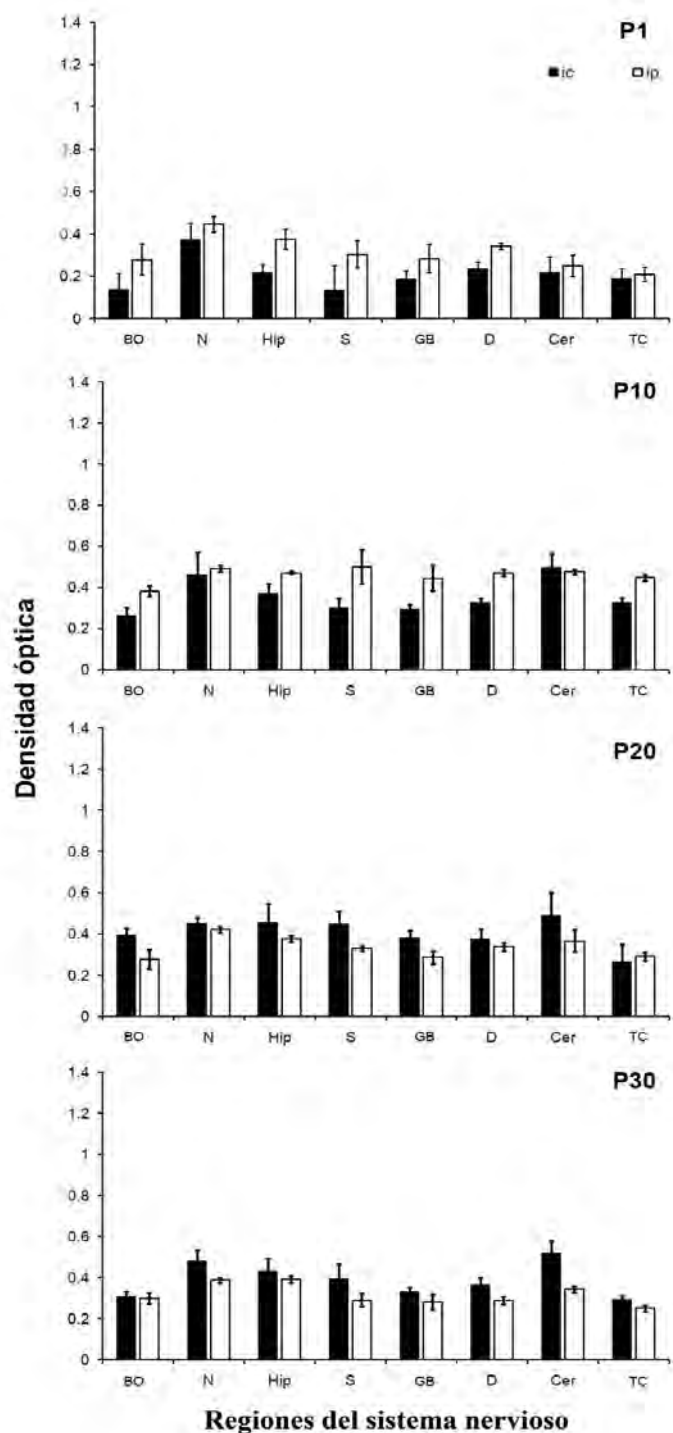


Figura 15. Efecto del procedimiento de administración del colorante azul de Evans sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en el grupo control en los días postnatales 1, 10, 20 y 30. Media  $\pm$  error estándar de unidades de densidad óptica.

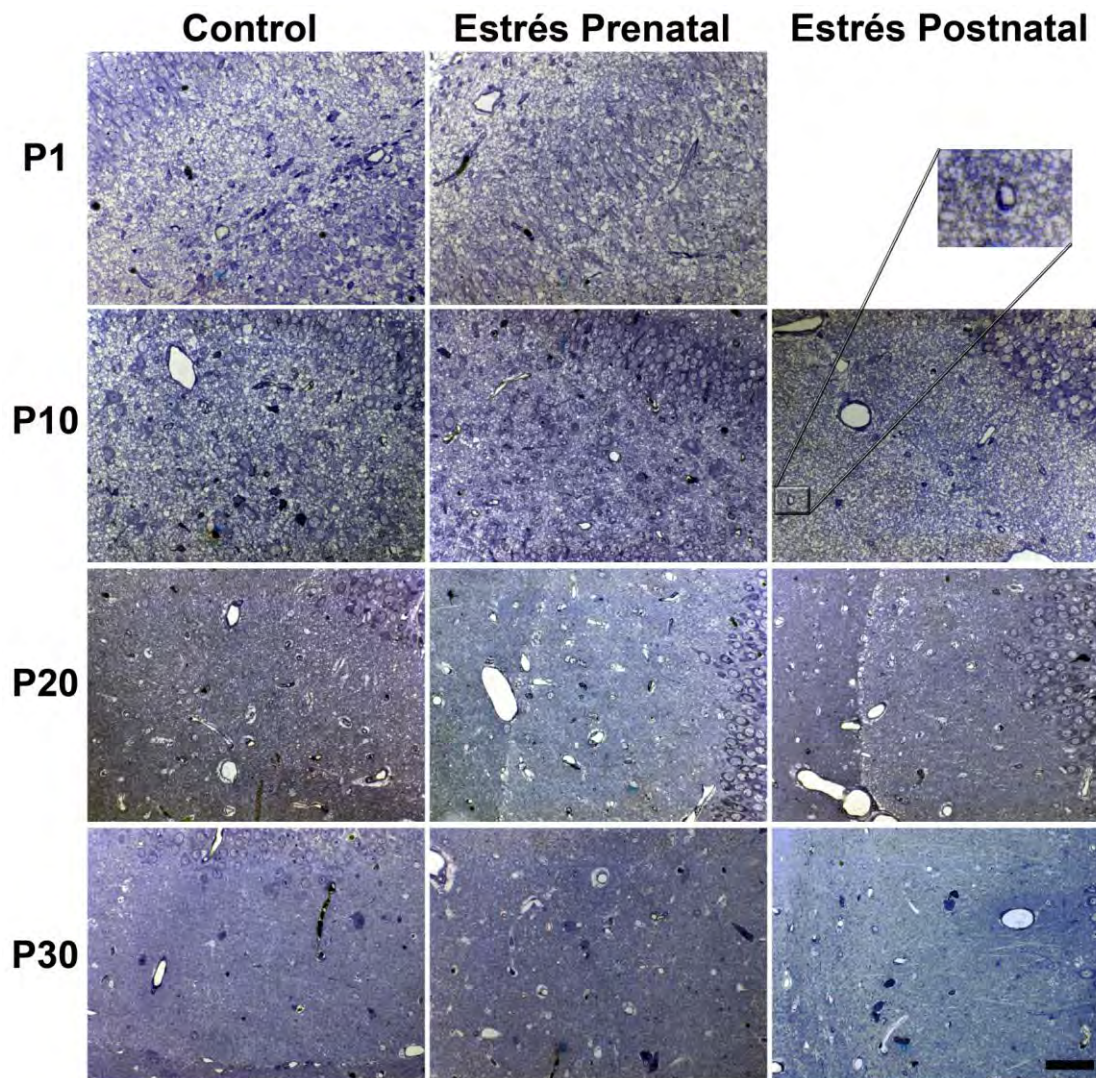


Figura 16. Densidad vascular en la formación hipocámpica en las crías control y expuestas a estrés prenatal o postnatal. Cortes semifinos ( $1\mu\text{m}$ ) de las crías control y expuestas a estrés prenatal y a estrés postnatal en los días postnatales 1, 10, 20 y 30. En el inserto aparece un ejemplo de un capilar hipocámpico de la cría expuesta a estrés postnatal de 10 días de edad. Tinción: azul de Toluidina. Cortes obtenidos posteriores a los cortes finos. Barra de escala:  $50\mu\text{m}$  para las microfotografías y  $20\mu\text{m}$  para el inserto en el grupo de estrés postnatal en P10.

Para descartar posibles sesgos en el estudio ultraestructural debidos a diferencias en la densidad capilar, en los cortes semifinos se cuantificó el número de capilares por unidad de área. Como se muestra en la Tabla 5 la densidad de capilares hipocámpicos fue similar en las crías control y expuestas a estrés (prenatal o postnatal) de la misma edad; el único

cambio observado fue aumento en la densidad vascular asociado a la edad de los sujetos. Puesto que el tejido empleado en el estudio ultraestructural se obtuvo de una cría de cada condición experimental en cada edad, no fue posible realizar alguna prueba estadística que permitiera la comparación entre las distintas condiciones experimentales.

Tabla 5. Densidad de capilares hipocámpicos en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en todas las edades estudiadas.

	<b>Edad</b>	<b>Capilares/0.1mm<sup>2</sup></b>
<b>Control</b>	<b>1</b>	18.968
	<b>10</b>	21.200
	<b>20</b>	47.978
	<b>30</b>	51.326
<b>Estrés Prenatal</b>	<b>1</b>	13.389
	<b>10</b>	43.515
	<b>20</b>	49.094
	<b>30</b>	64.715
<b>Estrés Postnatal</b>	<b>10</b>	18.968
	<b>20</b>	51.326
	<b>30</b>	43.515

n=1 sujeto por condición por edad.

*Desarrollo anatómico de la barrera hematoencefálica en el grupo control*

Las características ultraestructurales de barrera en las células endoteliales del grupo control aparecieron progresivamente en los capilares hipocámpicos (<10µm de diámetro) entre los días postnatales 1 a 30. En el día postnatal 1 los capilares hipocámpicos presentaron morfología irregular no circular; hacia el día postnatal 10 el perímetro luminal de los capilares se redujo drásticamente al adquirir morfología circular y así permaneció hasta el día postnatal 30 (Tabla 6). Las células endoteliales del grupo control presentaron densidad

baja de vesículas pinocíticas negativas para la WGA-peroxidasa entre los días postnatales 1 y 20, con aumento subsecuente hasta aproximarse a los valores del adulto al mes de edad; por el contrario, la densidad de cuerpos multivesiculares (lisosomas secundarios) positivos para la WGA-peroxidasa disminuyó progresivamente entre los días postnatales 1 a 30. Finalmente, entre los días postnatales 1 a 30 ocurrió aumento progresivo en el espesor de la lámina basal y del glicocalix (Tabla 6).

En todas la edades estudiadas, los capilares hipocámpicos del grupo control presentaron uniones ocluyentes en distintos estadios de desarrollo, sin cambios asociados a la edad en la predominancia del algún tipo de unión ocluyente (tipo 1-fin-fin, tipo 2-traslape simple, tipo 3-mortero o tipo 4-compleja). Como se muestra en la Figura 20 la WGA-peroxidasa se difundió paracelularmente en los capilares hipocámpicos del grupo control; sin embargo en ninguna de las edades estudiadas se observó que la WGA-peroxidasa ocupara la longitud entera de la unión ocluyente. El porcentaje de la unión ocluyente ocupado por la WGA-peroxidasa presentó cambios asociados a la edad en el grupo control; como se muestra en la Tabla 7 los tipos de unión ocluyente 2, 3 y 4 presentaron aumento en el porcentaje de la unión ocupado por la WGA-peroxidasa en el día postnatal 20, con reducción subsecuente al mes de edad hasta los niveles observados en los días postnatales 1 y 10.

Tabla 6. Desarrollo de las características ultraestructurales de la barrera hematoencefálica en el grupo control.

<b>Edad</b>	<b>Perímetro luminal (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Lámina basal (nm)</b>	<b>Glicocalix (nm)</b>	<b>Vesícula pinocítica -WGA/100<math>\mu\text{m}</math></b>	<b>CMV/100<math>\mu\text{m}</math></b>
<b>1</b>	49.11 $\pm$ 27.97	27.57 $\pm$ 1.24	46.56 $\pm$ 11.07	0.795 $\pm$ 0.094	0.010 $\pm$ 0.005
<b>10</b>	20.82 $\pm$ 2.95	31.38 $\pm$ 1.54	69.62 $\pm$ 7.82	0.966 $\pm$ 0.080	0.004 $\pm$ 0.003
<b>20</b>	20.31 $\pm$ 3.77	40.46 $\pm$ 3.80	35.33 $\pm$ 3.26	0.503 $\pm$ 0.236	0
<b>30</b>	16.72 $\pm$ 1.59	49.65 $\pm$ 2.35	69.13 $\pm$ 7.48	1.335 $\pm$ 0.128	0

Media +/- error estándar. Abreviaturas: -WGA=vesículas pinocíticas que no contenían la WGA-peroxidasa, CMV=cuerpo multivesicular.

Tabla 7. Desarrollo de las uniones ocluyentes en los capilares hipocámpicos del grupo control.

Edad	% UO	% UO	% UO	% UO	WGA/UO	WGA/UO	WGA/UO	WGA/UO
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
1	0	55.55	33.33	11.11	0 %	19.44 %	10.03 %	5.57 %
10	16.66	33.33	25	25	12.81 %	17.16 %	5.23 %	6.18 %
20	18.18	54.54	9.09	18.18	50.14 %	32.90 %	35.85 %	24.52 %
30	0	62.5	25	12.5	0 %	13.06 %	11.03 %	0 %

En la tabla aparece el porcentaje de uniones ocluyentes de cada tipo (%UO Tipo-) en los días postnatales 1 (n=9 uniones ocluyentes), 10 (n=12 uniones ocluyentes), 20 (n=11 uniones ocluyentes) y 30 (n=8 uniones ocluyentes). También aparece el porcentaje de la longitud de la unión ocluyente ocupado por la WGA-peroxidasa (WGA/UO).

*Efectos del estrés crónico perinatal sobre el desarrollo anatómico de la barrera hematoencefálica*

La exposición a estrés crónico perinatal modificó diferencialmente algunos parámetros del desarrollo ultraestructural de la barrera hematoencefálica entre los días postnatales 1 a 30. En los capilares hipocámpicos de las crías expuestas a estrés prenatal se encontraron efectos diferenciales sobre el desarrollo de las distintas características de la barrera hematoencefálica; el estrés prenatal redujo el espesor de la pared capilar en los días postnatales 10-20 y promovió la desaparición de microvellosidades en el lumen de los capilares hipocámpicos en los días postnatales 1-20 en comparación con el grupo control de las mismas edades (Tabla 8). Por el contrario, la exposición a estrés crónico *in utero* aumentó el espesor del glicocalix en la membrana luminal de las células endoteliales en los primeros 20 días postnatales (Figura 17, Tabla 8); el aumento en el espesor del glicocalix marcado con la WGA-peroxidasa indica neutralización del glicocalix y aumento en la expresión de residuos de galactosil y N-acetilglucosamina, y se ha descrito que ambos factores favorecen la formación de vesículas pinocíticas (Noble et al., 1996).

Tabla 8. Características ultraestructurales de la barrera hematoencefálica en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal.

	Edad	Perímetro (µm)	Pared (nm)	Lámina basal (nm)	Glicocalix (nm)	Microvello/perímetro	Vesícula pinocítica +WGA /100µm <sup>2</sup>	Vesícula pinocítica -WGA /100µm <sup>2</sup>	CMV/100µm <sup>2</sup>
<b>Control</b>	<b>1</b>	49.11 ± 27.10	886.61 ± 225.97	27.57 ± 1.24	46.55 ± 11.07	0.31 ± 0.07	0.209 ± 0.040	0.795 ± 0.094	0.010 ± 0.005
	<b>10</b>	20.82 ± 2.95	955.85 ± 176.12	31.38 ± 1.54	69.62 ± 7.82	0.66 ± 0.09	0.251 ± 0.027	0.966 ± 0.080	0.004 ± 0.003
	<b>20</b>	20.31 ± 3.77	1079.75 ± 159.31	40.46 ± 3.80	35.33 ± 3.26	0.97 ± 0.39	0.169 ± 0.032	0.503 ± 0.236	0
	<b>30</b>	16.72 ± 1.59	794.33 ± 206.68	49.64 ± 2.35	69.13 ± 7.48	0.31 ± 0.06	0.315 ± 0.039	1.335 ± 0.128	0
<b>Estrés prenatal</b>	<b>1</b>	18.33 ± 3.60	1648.05 ± 296.62	29.67 ± 2.88	71.37 ± 8.63	0.21 ± 0.07	0.176 ± 0.055	0.834 ± 0.140	0.002 ± 0.002
	<b>10</b>	16.96 ± 1.53	910.84 ± 104.84	29.12 ± 1.21	117.56 ± 13.77	0.45 ± 0.06	0.350 ± 0.035	1.239 ± 0.109	0.004 ± 0.002
	<b>20</b>	21.89 ± 4.51	647.14 ± 131.57	34.51 ± 3.34	56.04 ± 6.76	0.41 ± 0.04	0.340 ± 0.039	1.232 ± 0.267	0.005 ± 0.003
	<b>30</b>	17.02 ± 0.90	548.12 ± 45.50	49.99 ± 1.21	73.59 ± 5.47	0.25 ± 0.01	0.297 ± 0.029	1.384 ± 0.092	0.003 ± 0.002
<b>Estrés postnatal</b>	<b>10</b>	13.11 ± 1.32	918.29 ± 153.59	31.22 ± 1.41	51.45 ± 7.37	0.33 ± 0.08	0.278 ± 0.058	1.180 ± 0.113	0.008 ± 0.004
	<b>20</b>	18.32 ± 1.76	488.59 ± 70.48	38.76 ± 1.46	49.47 ± 8.19	0.37 ± 0.06	0.404 ± 0.042	1.255 ± 0.270	0.004 ± 0.004
	<b>30</b>	15.46 ± 0.98	491.51 ± 72.05	48.89 ± 1.80	72.08 ± 6.29	0.15 ± 0.02	0.499 ± 0.069	1.729 ± 0.148	0.008 ± 0.003

Media +/- error estándar. Abreviaturas: +WGA=vesículas pinocíticas que contenían la WGA-peroxidasa, -WGA=vesículas pinocíticas que no contenían la WGA-peroxidasa, CMV=cuerpo multivesicular.



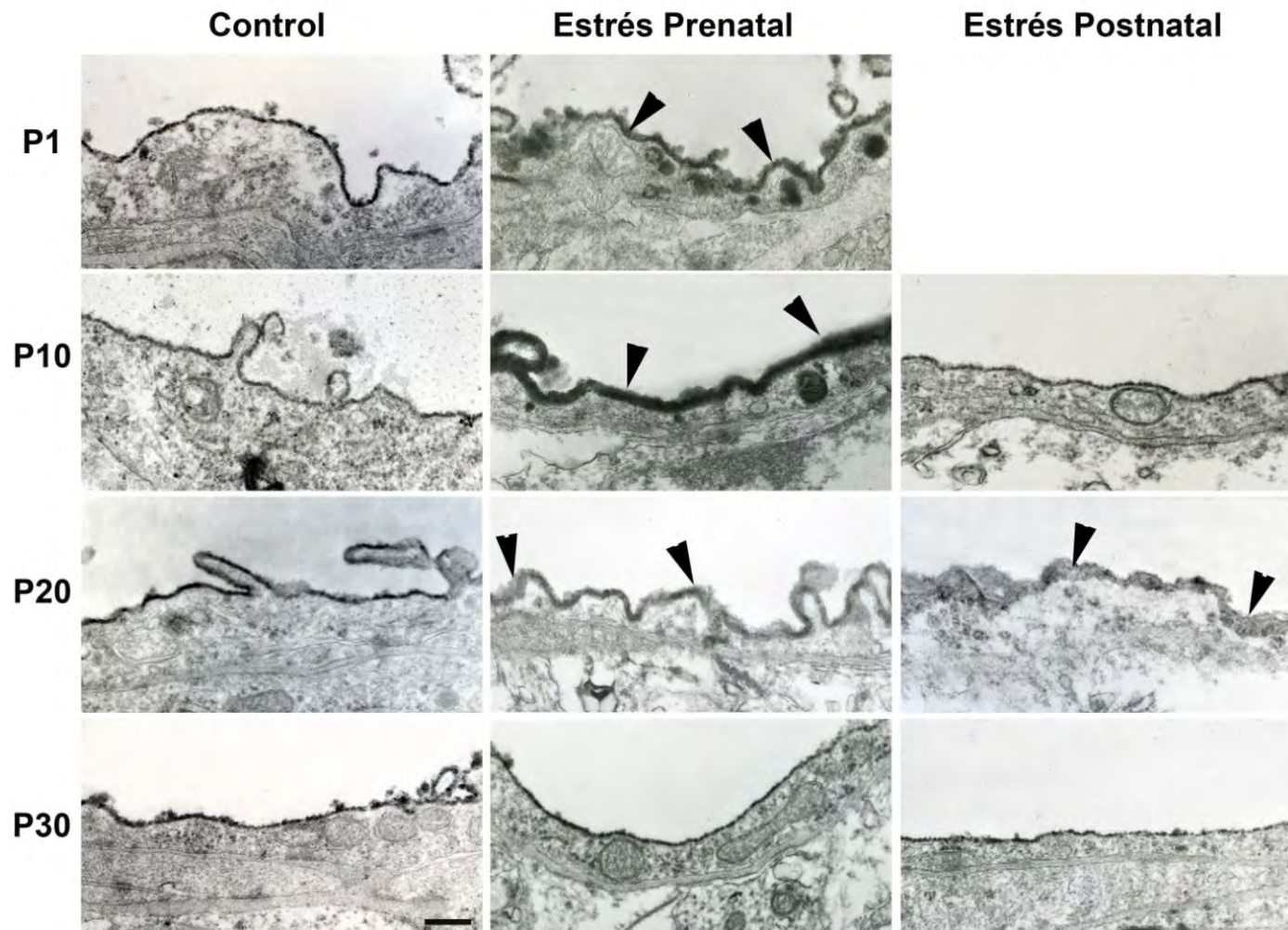


Figura 17. Desarrollo del glicocalix en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal. Las puntas de flecha señalan el glicocalix engrosado, marcado con la lectina WGA-peroxidasa en el lumen de los capilares hipocámpicos de las crías expuestas a estrés prenatal o postnatal en comparación con las crías control. Barra de escala: 300nm.

Concomitantemente, el estrés prenatal incrementó la densidad tanto de vesículas pinocíticas marcadas con la lectina WGA-peroxidasa como de vesículas pinocíticas no marcadas con el trazador electrodensito en los días postnatales 1-20 en comparación con el grupo control (Figura 18, Tabla 8). El aumento en el número de vesículas pinocíticas que contenían la WGA-peroxidasa promovió la formación de cuerpos multivesiculares positivos para la WGA-peroxidasa en el citoplasma de las células endoteliales (Figura 19); como se muestra en la Tabla 8, la densidad de los cuerpos multivesiculares fue mayor en los capilares hipocámpicos de las crías expuestas a estrés prenatal de 10, 20 y 30 días de edad en comparación con las crías control.

A pesar que no se observaron cambios sistemáticos en el patrón de desarrollo de las uniones ocluyentes por efecto de la exposición a estrés *in utero*; se encontró que el estrés prenatal modificó las características ultraestructurales de las uniones ocluyentes en los días postnatales 1, 10 y 30 (Tabla 9). La exposición a estrés crónico prenatal aumentó el porcentaje de la unión ocluyente ocupado por la lectina WGA-peroxidasa en las uniones tipo 1, 2 y 3 en las crías de 10 días postnatales en comparación con el control de la misma edad (Figura 20). En los días postnatales 1 y 30 los complejos de unión entre las células endoteliales hipocámpicas de las crías expuestas a estrés prenatal presentaron hendiduras interendoteliales (>200nm) (Figura 21). Ambos hallazgos, aumento en el porcentaje de la unión ocluyente ocupado por la WGA-peroxidasa y la presencia de hendiduras interendoteliales, sugieren que es posible que el estrés prenatal aumente la difusión paracelular de macromoléculas circulantes en la sangre, como el azul de Evans y la WGA-peroxidasa (Tabla 9). Finalmente, el estrés prenatal no afectó el patrón normal de desarrollo de la lámina basal (Tabla 8).

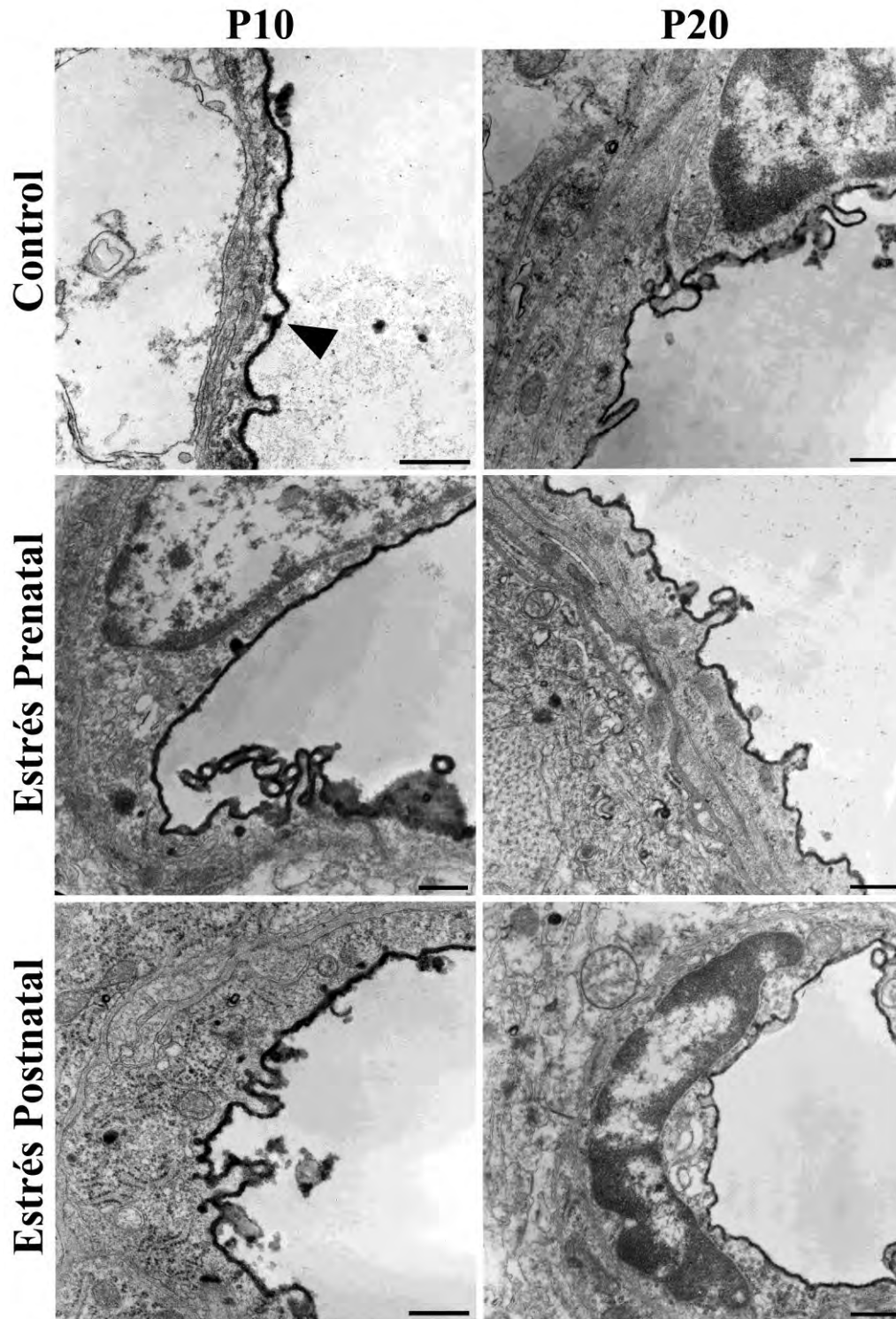


Figura18. Transporte de la WGA-peroxidasa mediado por vesículas pinocíticas en los capilares hipocámpicos de los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal. La punta de flecha señala una vesícula pinocítica marcada con la WGA-peroxidasa en el grupo control en P10. Barra de escala: 500nm (ver la siguiente página). Modificada de Gómez-González, Escobar (2009a).



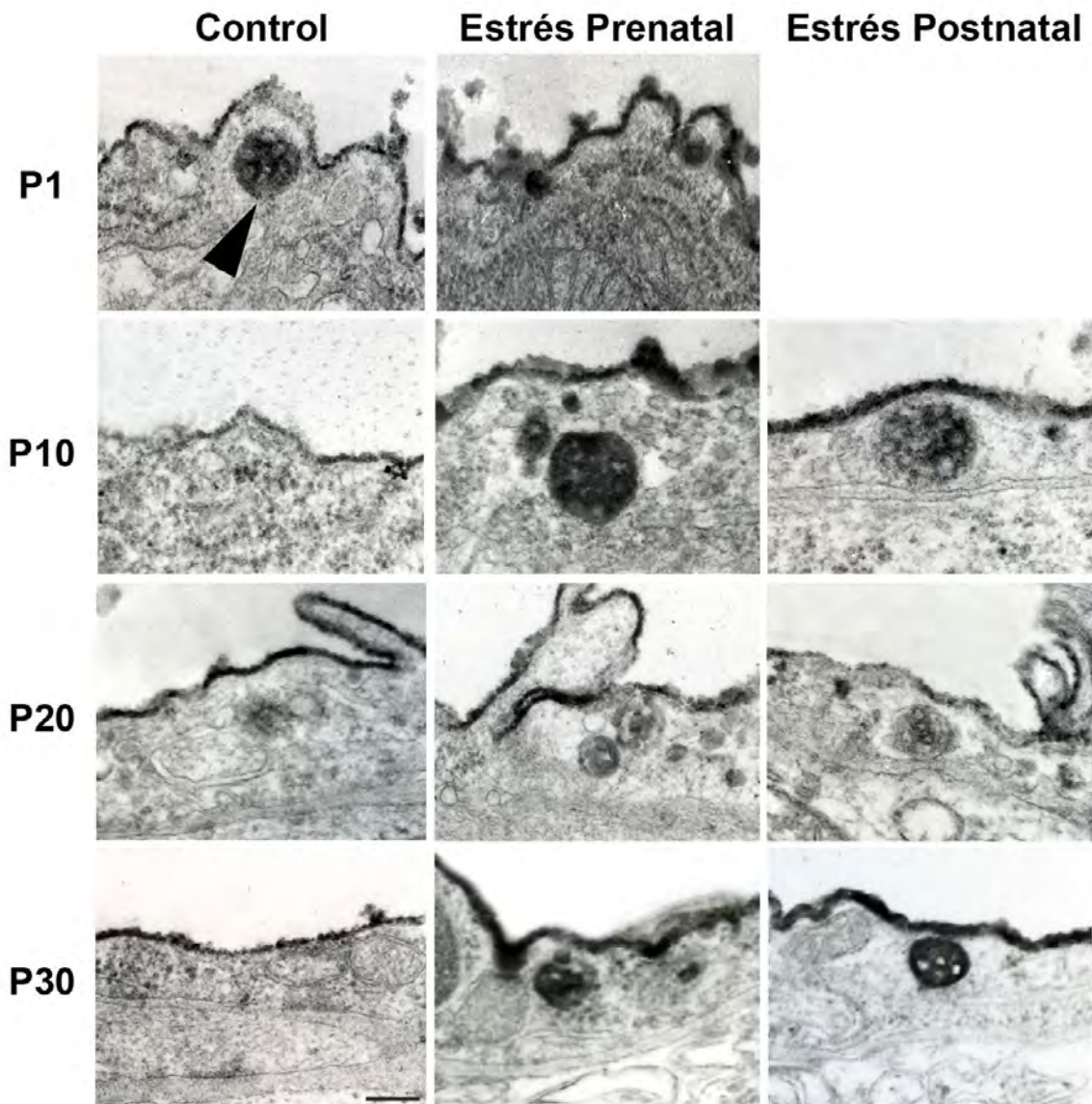


Figura 19. Cuerpos multivesiculares en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en los días postnatales 1, 10, 20 y 30. La punta de flecha señala un ejemplo de cuerpo multivesicular que contenía vesículas pinocíticas marcadas con la lectina WGA-peroxidasa en el citoplasma de las células endoteliales hipocámpicas de la cría control de un día postnatal. Barra de escala: 200nm.

Tabla 9. Características ultraestructurales de las uniones ocluyentes en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en los días postnatales 1, 10, 20 y 30.

	Edad	Unión ocluyente tipo 1		Unión ocluyente tipo 2		Unión ocluyente tipo 3		Unión ocluyente tipo 4	
		Hendidura (nm)	% WGA en UO	Hendidura (nm)	%WGA en UO	Hendidura (nm)	%WGA en UO	Hendidura (nm)	%WGA en UO
<b>Control</b>	<b>1</b>	ND	ND	ND	19.44	ND	10.03	ND	5.57
	<b>10</b>	ND	12.81	ND	17.16	ND	5.23	ND	6.18
	<b>20</b>	97.59	50.14	88.43	32.90	ND	35.85	ND	24.52
	<b>30</b>	ND	ND	142.62	13.06	ND	11.03	ND	0.00
<b>Estrés Prenatal</b>	<b>1</b>	ND	ND	197.97	17.31	ND	10.70	ND	ND
	<b>10</b>	ND	25.70	290.71	29.90	ND	35.95	ND	ND
	<b>20</b>	ND	ND	ND	22.28	ND	3.94	ND	0.00
	<b>30</b>	ND	46.13	229.41	7.02	304.35	11.14	ND	22.38
<b>Estrés Postnatal</b>	<b>10</b>	ND	8.24	172.25	14.71	ND	0.61	ND	ND
	<b>20</b>	ND	ND	ND	19.73	297.88	17.20	ND	ND
	<b>30</b>	ND	ND	ND	15.19	ND	9.04	ND	2.47

Abreviaturas: %WGA en UO = porcentaje de la longitud de la unión ocluyente ocupado por la WGA-peroxidasa; ND = no detectado.

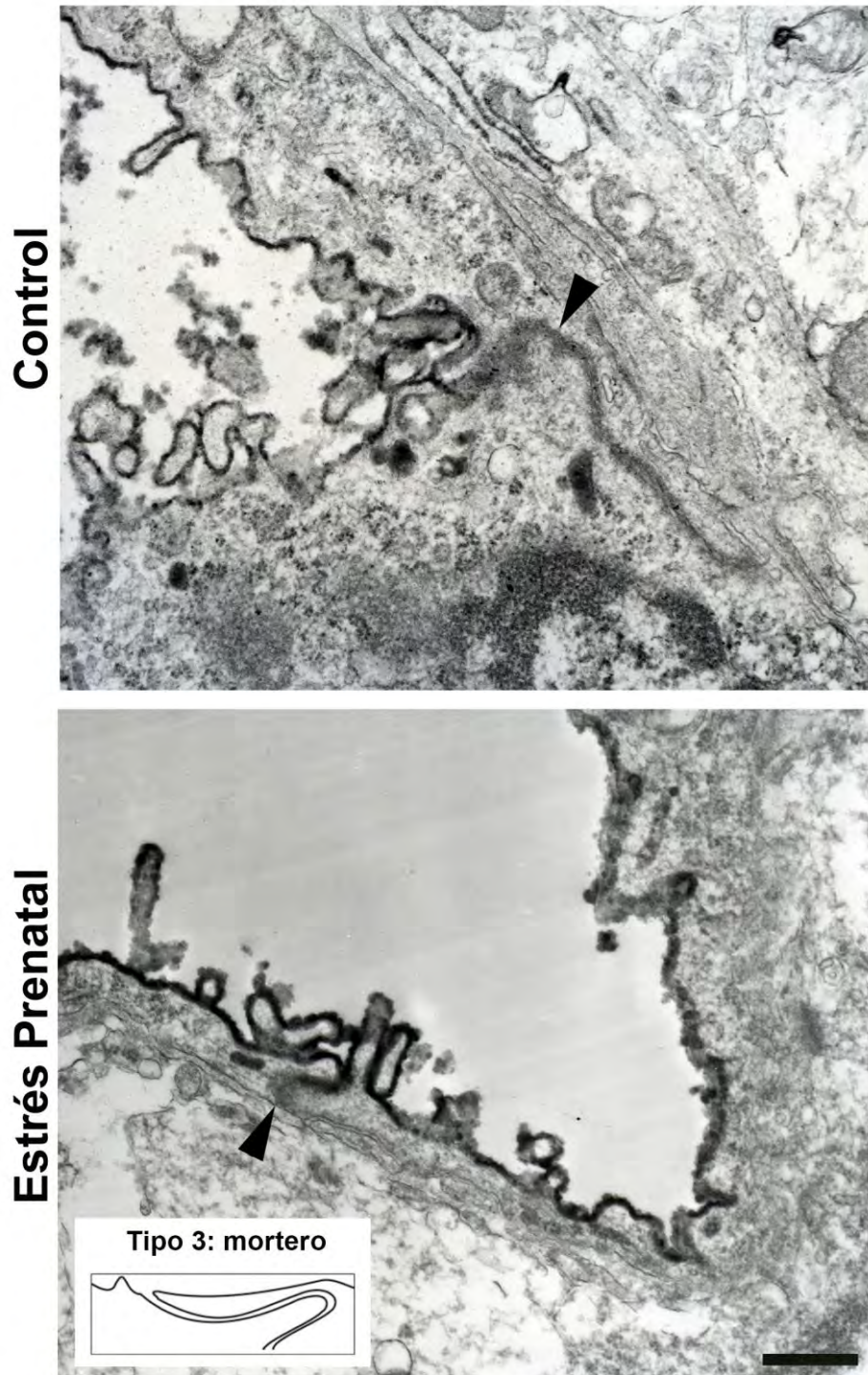
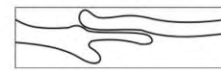


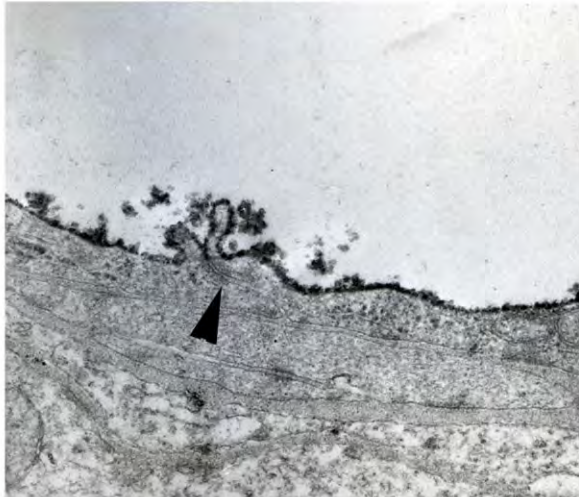
Figura 20. Difusión paracelular de la WGA-peroxidasa en los capilares hipocámpicos del grupo control y expuesto a estrés prenatal. La punta de flecha señala la unión ocluyente de la cría control y de la cría del grupo de estrés prenatal de 10 días de edad; en el grupo de estrés prenatal se observa aumento en la longitud de la unión ocluyente ocupado por el trazador electrodenso. Barra de escala: 500nm.



Tipo 2: traslape simple



**Control**



**Estrés Prenatal**

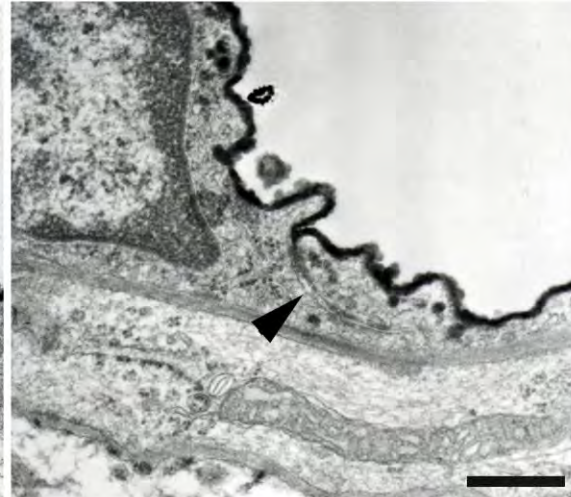


Figura 21. Hendiduras intercelulares en los capilares hipocámpicos de la cría expuesta a estrés prenatal y de la cría control de un mes de edad. La punta de flecha señala una unión ocluyente tipo 2 completamente desarrollada en la cría control y una unión ocluyente con hendiduras interendoteliales en la cría expuesta a estrés *in utero*. Barra de escala: 500nm.

Al igual que el estrés *in utero*, la exposición a estrés postnatal modificó diferencialmente los parámetros del desarrollo de la barrera hematoencefálica. Las crías del grupo de estrés postnatal presentaron aceleración en la maduración morfológica de los capilares hipocámpicos, caracterizada por reducción en el espesor de la pared del capilar desde el día postnatal 10 en comparación con la reducción hasta el mes de edad en las crías control; disminución de la densidad de microvellosidades en la membrana luminal entre los días postnatales 10 a 30 en comparación con el control (Tabla 8); y menor difusión paracelular de la WGA-peroxidasa en las uniones ocluyentes tipo 1-4 en los días postnatales 10 a 30 *versus* las crías control de la misma edad (Tabla 9). Por el contrario, la exposición a estrés crónico postnatal no modificó el patrón de desarrollo normal de la lámina o membrana basal (Tabla 8).

La permeabilidad aumentada de la barrera hematoencefálica al colorante azul de Evans y al trazador electrodensito WGA-peroxidasa en el grupo de estrés postnatal ocurrió también por aumento en el transporte mediado por caveolas en las células endoteliales. Así, se observó

que el estrés crónico postnatal aumentó la densidad de vesículas pinocíticas entre los días postnatales 10 a 30; sin embargo las vesículas marcadas con el trazador electrodenso solo aumentaron en densidad en el día postnatal 20 (Figura 18, Tabla 8). Concomitante con el incremento de densidad de vesículas marcadas con WGA-peroxidasa a los 20 días de edad, los capilares hipocámpicos de la cría expuesta a estrés postnatal presentaron aumento en el espesor del glicocalix en esa edad en comparación con los capilares de la cría control (Figura 17, Tabla 8). Finalmente, al igual que el estrés *in utero*, se encontró que el estrés crónico postnatal promovió la formación de cuerpos multivesiculares en el citoplasma de las células endoteliales entre los días postnatales 10 y 30 en comparación con el grupo control (Figura 19, Tabla 8).

### **Efecto del estrés prenatal o postnatal sobre el desarrollo y distribución de la microglia**

#### *Desarrollo de la microglia en el grupo control*

El patrón de distribución y el número de cada tipo de microglia en el sistema nervioso central del grupo control varió en función de la edad de los sujetos ( $F(17.94-59.83)=2.439$ ,  $p=0.005$ ). En las crías control se observó aumento del 131% en la microglia encefálica total entre los días postnatales 1 al 10; aumento del 282% en la densidad total de microglia encefálica entre los días postnatales 10 a 20 y subsecuente estabilización en la densidad de microglia entre los días postnatales 20 a 30 (Tabla 10). La densidad de microglia ramificada (tipo 3: microglia con soma redondo y ramificaciones escasas, cortas y de gran calibre; tipo 4: microglia con soma aplanado y ramificaciones largas, delgadas y espinosas) en todo el encéfalo aumentó progresivamente entre los días postnatales 1 a 20, con posterior estabilización alrededor del primer mes postnatal; mientras que la densidad de microglia ameboidea (tipo 1: microglia ameboidea; tipo 2: microglia ameboidea con pseudopodios) se redujo drásticamente entre los días postnatales 1 a 10 y se mantuvo en niveles bajos hasta el día postnatal 30 (Tabla 10).

En las crías control de un día de edad, la microglia ameboidea se concentró densamente en el cuerpo calloso y cápsula interna, ambos considerados reservorios de microglia en la rata, y con menor densidad en la sustancia blanca del cerebelo y en otras regiones encefálicas como el septum, bulbo olfativo y tallo cerebral. Como se muestra en la Figura 22, en el día postnatal 1 la mayoría de las células microgliales presentes en el cuerpo calloso, cápsula



interna y sustancia blanca del cerebelo fue tipo 2; mientras que menos del 30% de la microglia total en las tres estructuras subcorticales se tipificó como microglia tipo 1. En el día postnatal 10 se redujo drásticamente la densidad de microglia ameboidea en el principal reservorio glial, el cuerpo calloso, para desaparecer en el día postnatal 20. En la cápsula interna y sustancia blanca del cerebelo la microglia tipo 2 continuó presente con densidad reducida hasta el día postnatal 30. En las tres estructuras blancas subcorticales se encontró que la densidad de microglia ramificada (tipos 3 y 4) fue muy baja en el día postnatal 1 y aumentó progresivamente a partir del día postnatal 10, hasta constituir más del 75% de la población glial presente en cada estructura en el día postnatal 20 (Figura 22). En el cuerpo calloso, la densidad total de microglia se redujo del día postnatal 1 al 10 y se mantuvo estable hasta el primer mes de edad. En la cápsula interna la densidad total de microglia se mantuvo estable sin cambios significativos durante el primer mes postnatal y en la sustancia blanca del cerebelo aumentó progresivamente a partir del día postnatal 10 hasta alcanzar un nivel estable en las crías control de un mes de edad (Figura 22).

Tabla 10. Densidad de microglia encefálica en el grupo control en los días postnatales 1 a 30.

<b>Edad</b>	<b>Tipo1</b>	<b>Tipo 2</b>	<b>Tipo 3</b>	<b>Tipo 4</b>	<b>Total</b>
<b>1</b>	3 ± 1.16	10.28 ± 1.31	11.56 ± 2.88	3.49 ± 0.59	28.33 ± 1.59
<b>10</b>	0.53 ± 0.16	5.76 ± 0.34	21.15 ± 1.24	9.63 ± 0.28	37.07 ± 1.74
<b>20</b>	0.58 ± 0.35	7.50 ± 0.38	75.15 ± 6.38	18.92 ± 2.64	104.62 ± 4.22
<b>30</b>	0.10 ± 0.09	5.19 ± 1.57	74.41 ± 1.95	21.38 ± 8.58	101.44 ± 7.65

En la tabla aparece el número de cada tipo de microglia por cada 0.185mm<sup>2</sup> de área encefálica. La densidad de microglia encefálica se obtuvo mediante el promedio de la densidad de cada tipo de microglia en las regiones nerviosas estudiadas en las crías control en los días postnatales 1, 10, 20 y 30. Media +/- error estándar.

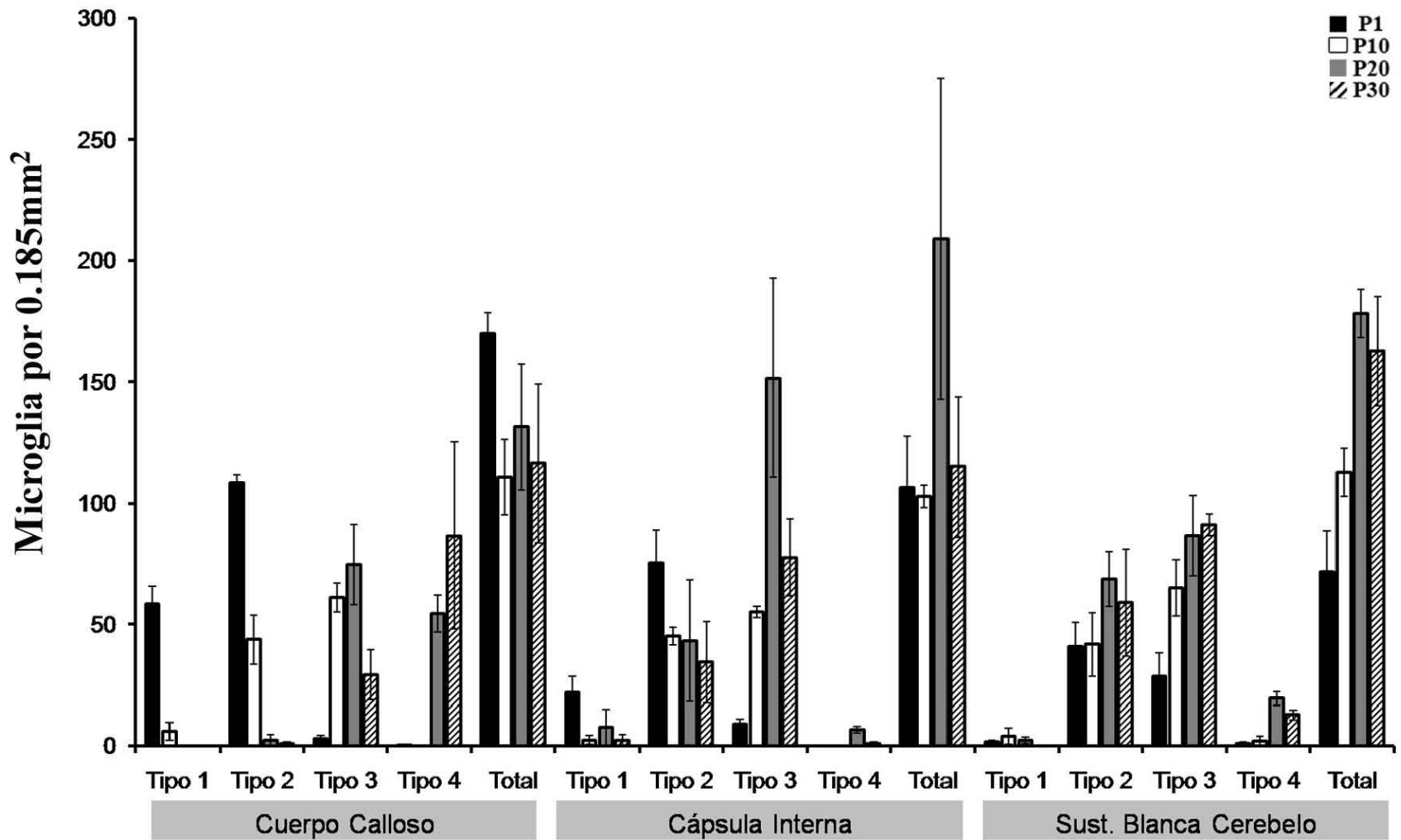


Figura 22. Desarrollo de la microglia en los reservorios gliales del grupo control. En la gráfica se muestra la densidad de cada tipo de microglia por cada 0.185mm<sup>2</sup> en el cuerpo calloso, cápsula interna y sustancia blanca del cerebelo. Media +/- error estándar.

En las estructuras corticales y subcorticales estudiadas se observó predominancia de microglia ramificada tipos 3 y 4 en las crías control de 1, 10, 20 y 30 días postnatales. Como se muestra en las Figuras 23 y 24, el número de células ramificadas de la microglia por cada  $0.185\text{mm}^2$  de las estructuras corticales y subcorticales aumentó progresivamente con la edad de los sujetos hasta alcanzar un nivel estable en el día postnatal 20. En regiones como las cortezas de la ínsula, entorrinal, frontal y del cíngulo, el hipocampo, septum, ganglios basales, amígdala, tálamo y bulbo olfativo se encontró aumento de más del 100% en el número de células tipificadas como microglia tipo 3 entre los días postnatales 1 a 10; mientras que en las otras estructuras estudiadas la densidad de microglia ramificada tipo 3 se mantuvo estable durante los primeros 10 días postnatales (Figura 23). Entre los días postnatales 10 a 20 ocurrió aumento de más del 300% en la densidad de microglia ramificada tipo 3 en todas las estructuras nerviosas estudiadas, excepto en el bulbo raquídeo; donde los niveles de microglia tipo 3 se mantuvieron estables durante el primer mes postnatal. Hacia el día postnatal 30 no hubo cambios significativos en la densidad de microglia ramificada tipo 3 en prácticamente ninguna de las estructuras nerviosas estudiadas.

La microglia ramificada tipo 4, el último estadio de desarrollo previo a la microglia en reposo característica del adulto, presentó un patrón de desarrollo diferente al de la microglia tipo 3; como se muestra en la Figura 24, la densidad de la microglia ramificada tipo 4 aumentó progresivamente entre los días postnatales 1 a 30 y siempre presentó niveles menores a los observados para la microglia tipo 3. En todas las estructuras nerviosas estudiadas el número total de microglia por cada  $0.185\text{mm}^2$  de área fue reducido en los días postnatales 1 y 10; hacia el día postnatal 20 la densidad total de microglia en todas las estructuras nerviosas estudiadas aumentó drásticamente y se mantuvo en los mismos niveles hasta el día postnatal 30 (Figura 25).

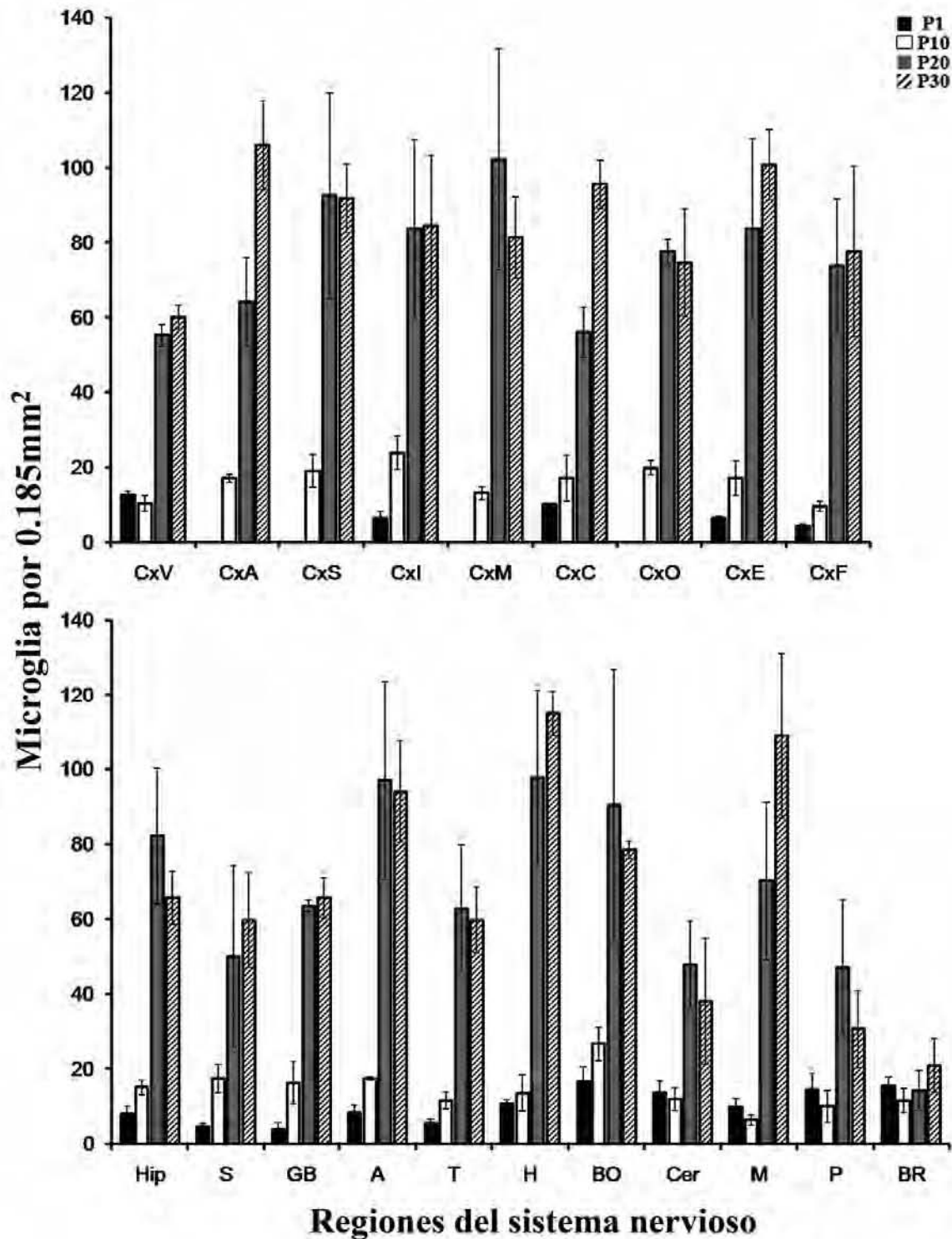


Figura 23. Patrón de desarrollo de la microglia ramificada tipo 3 en el grupo control en los días postnatales 1 a 30. En las gráficas aparecen la media +/- error estándar del número de células microgliales tipo 3 en la neocorteza, hipocampo, corteza del cerebelo y otras estructuras grises subcorticales.

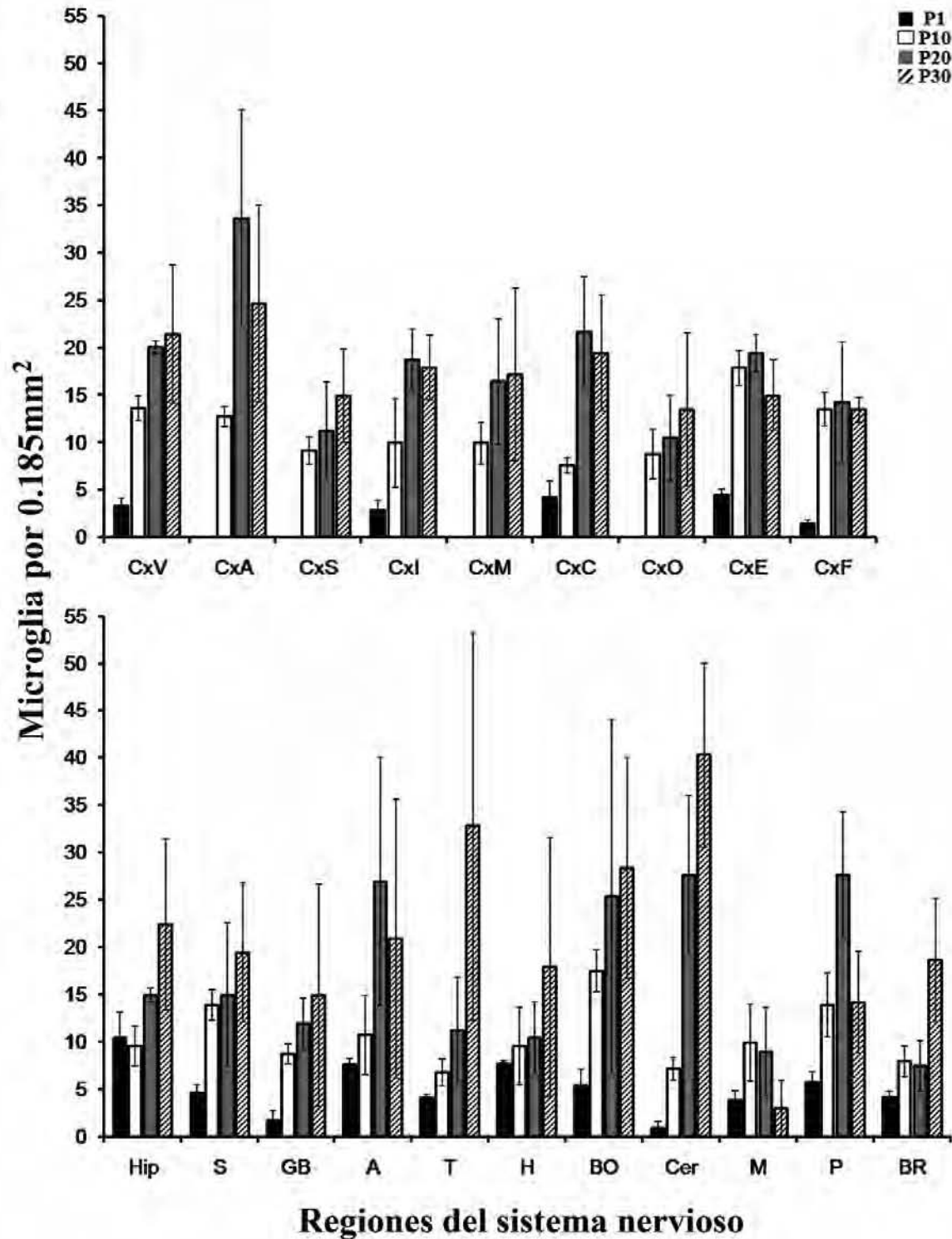


Figura 24. Patrón de desarrollo de la microglia ramificada tipo 4 en el grupo control en los días postnatales 1 a 30. En las gráficas aparecen la media +/- error estándar del número de células microgliales tipo 4 en la neocorteza, hipocampo, corteza del cerebelo y otras estructuras grises subcorticales.

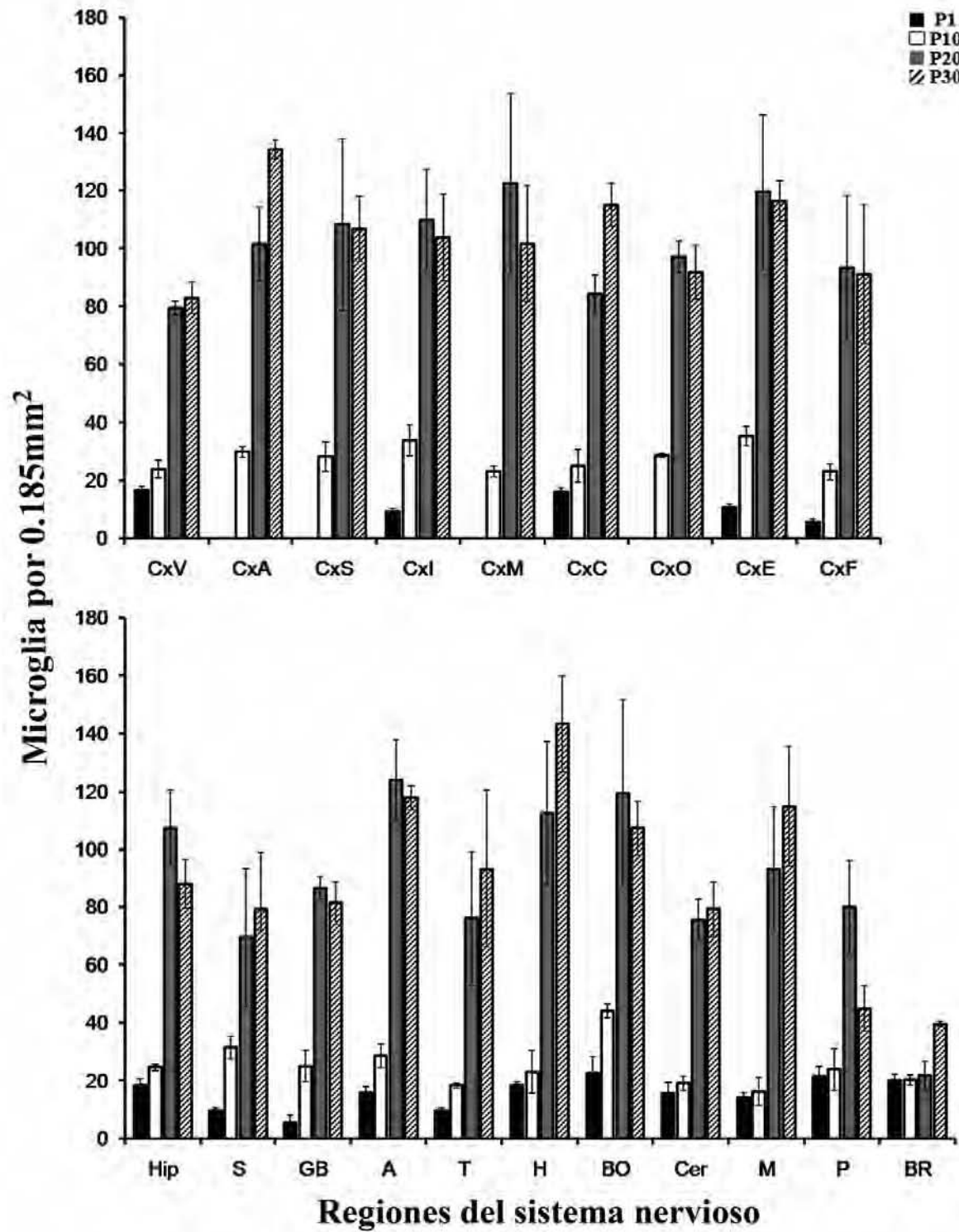


Figura 25. Densidad total de microglia en el grupo control en los días postnatales 1 a 30. En las gráficas aparecen la media +/- error estándar del número total de microglia en la neocorteza, hipocampo, corteza del cerebelo y otras estructuras grises subcorticales.

### *Efecto del estrés prenatal o postnatal sobre el desarrollo y distribución de la microglia*

La exposición a estrés durante la gestación y los primeros 20 días postnatales modificó significativamente el patrón de desarrollo y distribución de la microglia en la corteza, estructuras grises subcorticales ( $F(23.50-317.34)=1.576$ ,  $p=0.046$ ) y reservorios gliales ( $F(38.12-205.88)=2.011$ ,  $p=0.001$ ) de la rata durante la etapa postnatal temprana. En los reservorios gliales, cuerpo caloso, cápsula interna y sustancia blanca del cerebelo, el estrés durante las etapas prenatal o postnatal produjo cambios en la distribución y patrón de desarrollo de la microglia en los días postnatales 1 y 20. En el día postnatal 1, el estrés prenatal redujo el número de microglia tipo 1 ( $C_1$ ,  $p<0.001$ ) y de microglia tipo 2 ( $C_1$ ,  $p=0.001$ ) en el principal reservorio de microglia ameboidea, el cuerpo caloso, en comparación con el grupo control de la misma edad. Como se muestra en las Figuras 26 y 27, el estrés prenatal también disminuyó significativamente el número total de microglia en el cuerpo caloso del neonato en comparación con el grupo control ( $C_1$ ,  $p=0.018$ ). En el segundo reservorio de microglia ameboidea, la cápsula interna, el estrés prenatal aceleró el desarrollo de la microglia al aumentar la densidad de microglia ramificada tipo 3 ( $C_1$ ,  $p=0.035$ ) sin modificar el número de microglia ameboidea o la densidad total de microglia en esa estructura ( $p>0.05$ ) en comparación con las crías control de un día postnatal (Figuras 26 y 27). Finalmente, en la sustancia blanca del cerebelo el estrés prenatal redujo la densidad total de microglia (ameboidea y ramificada) en el neonato en comparación con los controles de la misma edad ( $C_1$ ,  $p>0.05$ ).

En el día postnatal 10, el patrón de desarrollo y distribución de la microglia en los reservorios gliales fue similar en las crías expuestas a estrés prenatal o postnatal y las crías del grupo control; excepto en el cuerpo caloso, donde la densidad de microglia ramificada tipo 3 fue menor en las crías expuestas a estrés prenatal en comparación con los controles ( $C_1$ ,  $p=0.041$ ). Como se muestra en la Figura 28, en el día postnatal 20 ambos procedimientos de estrés (prenatal o postnatal) tendieron a incrementar la densidad de microglia ramificada (tipos 3 y 4) ( $C_1$ ,  $p>0.05$ ) y aumentaron significativamente el número total de microglia por cada  $0.185\text{mm}^2$  de área en el cuerpo caloso ( $C_1$ ,  $p<0.05$ ). El estrés postnatal también aumentó la densidad de microglia tipo 3 y de microglia total en la sustancia blanca del cerebelo ( $C_1$ ,  $p<0.05$ ) a los 20 días postnatales. En la misma edad, P20, el grupo de estrés prenatal presentó aumento en la densidad de microglia tipo 4 en la

cápsula interna ( $C_1$ ,  $p=0.001$ ) y ninguna diferencia estadísticamente significativa en la sustancia blanca del cerebelo con respecto a grupo control (Figura 28). En el día postnatal 30 los tres grupos, estrés prenatal, estrés postnatal y control, presentaron distribución y patrón de desarrollo similar de la microglia en los tres reservorios gliales estudiados (cuerpo calloso, cápsula interna y sustancia blanca del cerebelo).

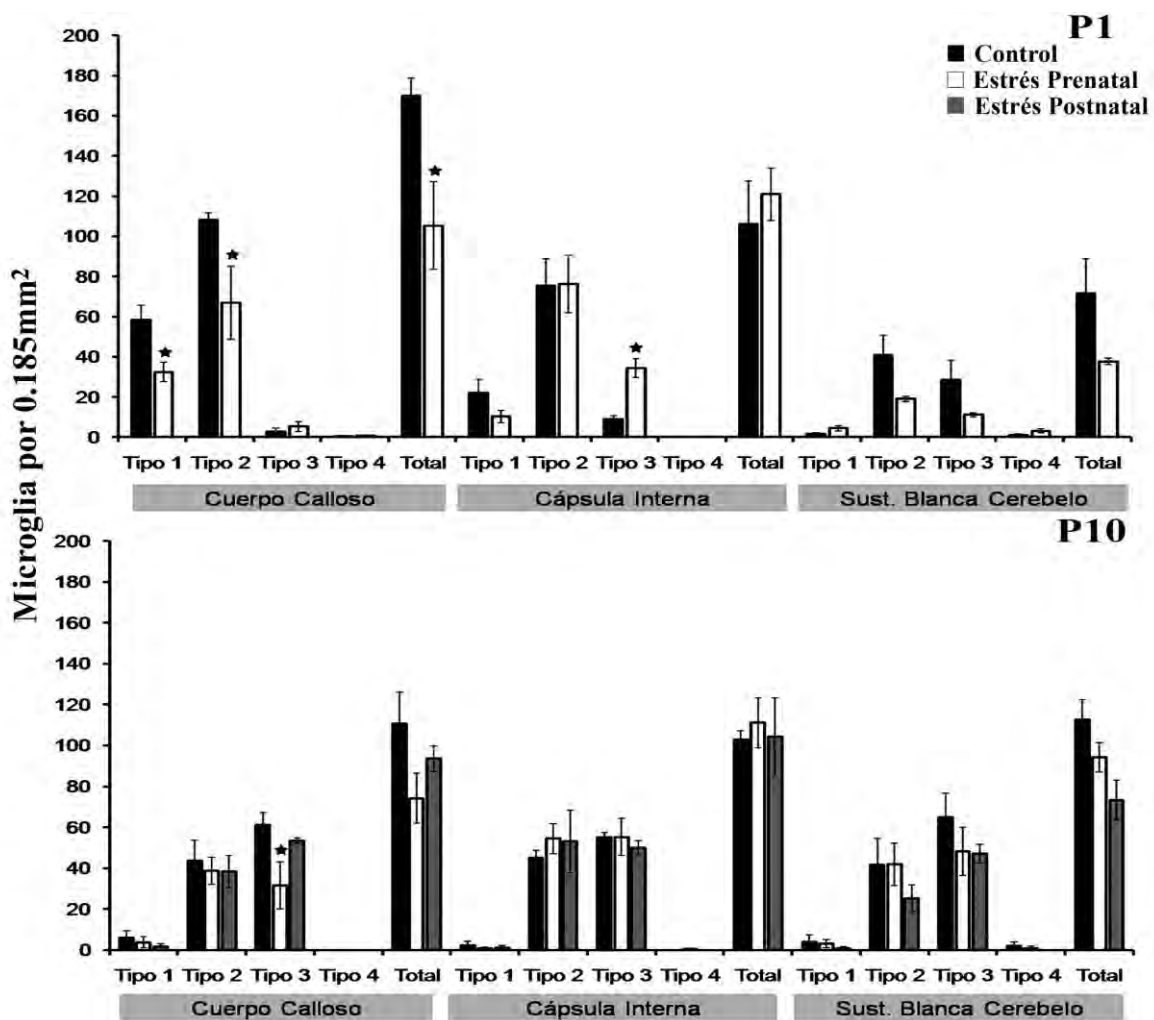


Figura 26. Desarrollo de la microglia en los reservorios gliales en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en los días postnatales 1 y 10. En las gráficas aparece la media $\pm$  error estándar de la densidad de microglia. \* Diferencias significativas en comparación con el grupo control de la misma edad ( $p<0.05$ ).



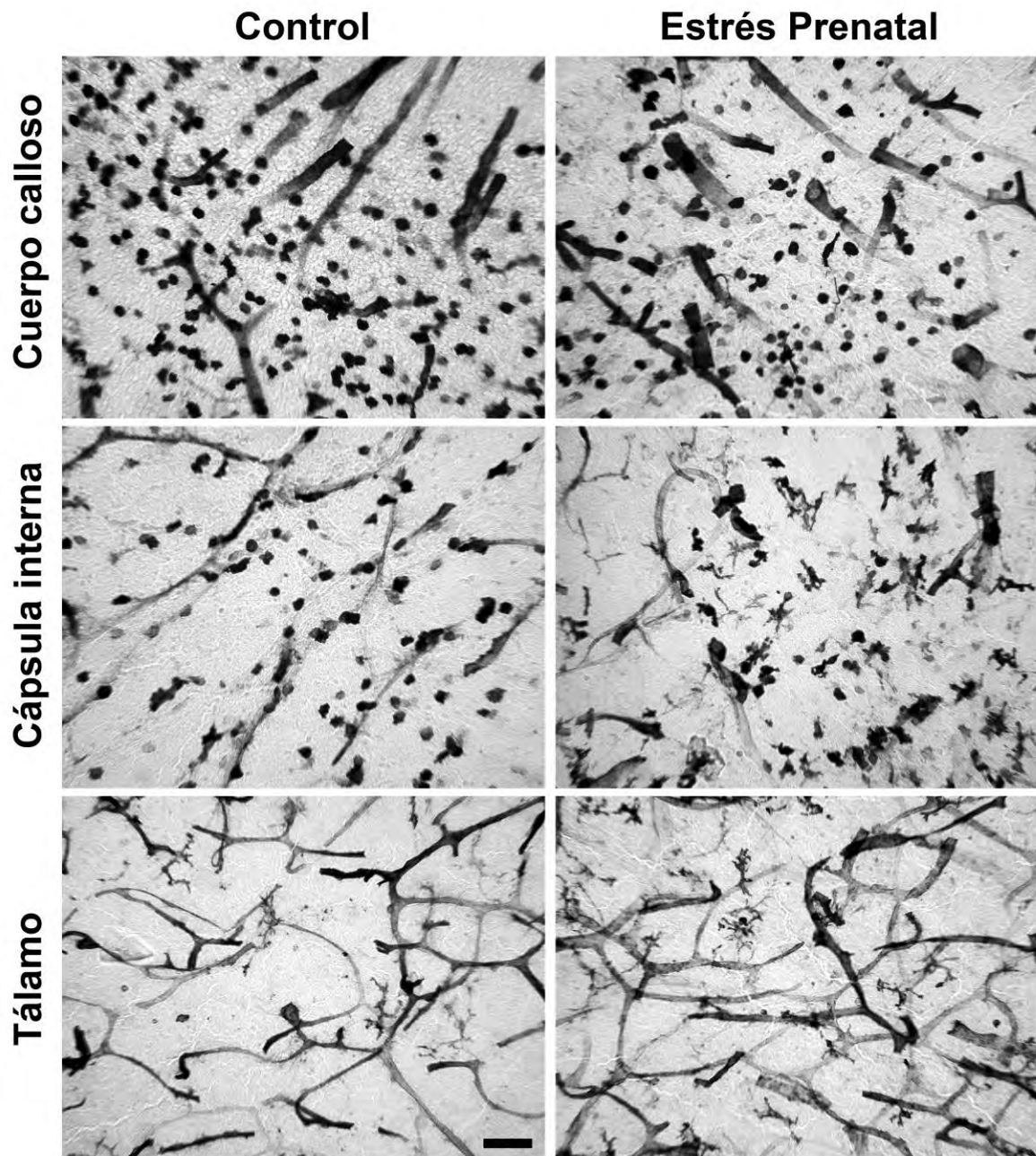


Figura 27. Efecto del estrés sobre el patrón de desarrollo de la microglia en el día postnatal 1. Además de la microglia se observan vasos sanguíneos inmunoreactivos a la lectina de la *Griffonia simplicifolia*. Modificada de Gómez-González y Escobar (2009b). Barra de escala: 50µm.

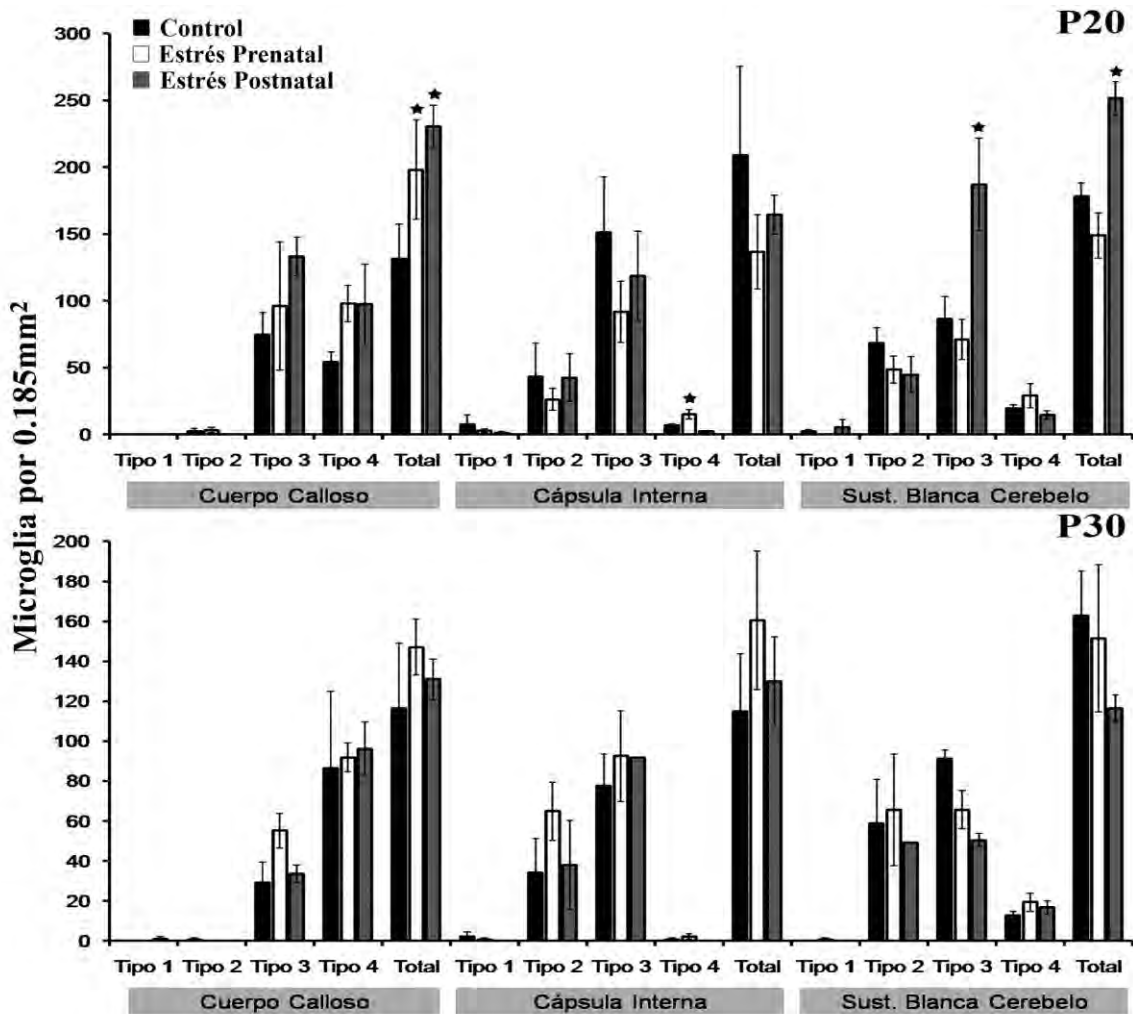


Figura 28. Desarrollo de la microglia en los reservorios gliales en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en los días postnatales 20 y 30. Media $\pm$  error estándar. \* Diferencias significativas en comparación con el grupo control de la misma edad ( $p < 0.05$ ).

De forma paralela a los cambios observados en los reservorios de microglia ameboidea de las crías expuestas a estrés (prenatal o postnatal), en algunas estructuras corticales y subcorticales estudiadas se encontró aumento en el número total de microglia en comparación con el grupo control en los días postnatales 1 y 20. En el día postnatal 1, las diferencias en el número total de microglia por cada  $0.185\text{mm}^2$  de área entre los grupos control y estrés prenatal fueron estadísticamente significativas en las cortezas entorrinal ( $C_1$ ,  $p < 0.001$ ) y parietal ( $C_1$ ,  $p = 0.043$ ), septum ( $C_1$ ,  $p = 0.001$ ), amígdala ( $C_1$ ,  $p = 0.012$ ) y tálamo ( $C_1$ ,  $p = 0.004$ ) (Figuras 27, 29 y 30).

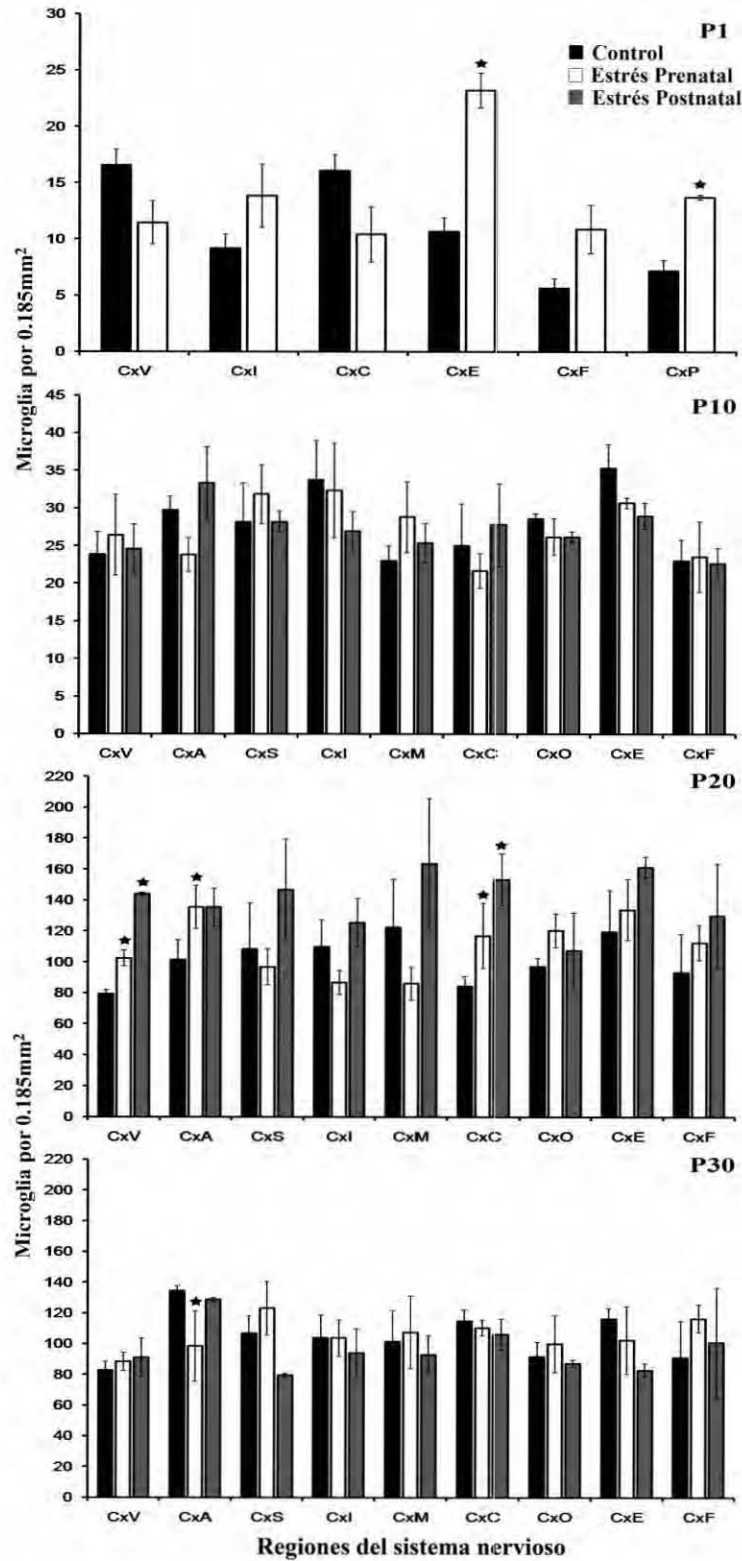


Figura 29. Densidad total de microglia en la neocorteza en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en los días postnatales 1 a 30. Media+/- error estándar. \*Diferencias significativas en comparación con el grupo control de la misma edad ( $p < 0.05$ ).

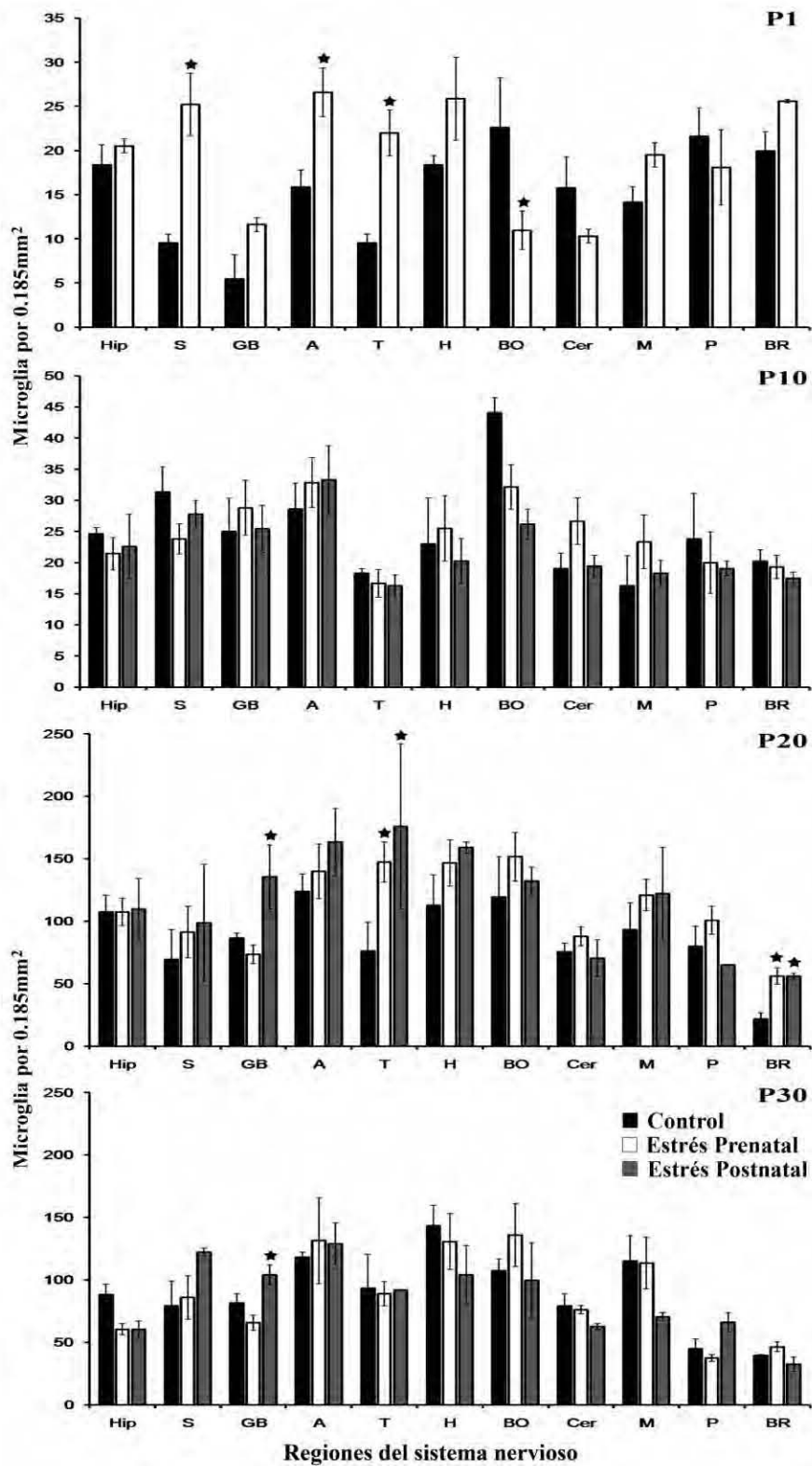


Figura 30. Densidad total de microglia en el hipocampo, cerebelo y núcleos grises subcorticales en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en los días postnatales 1, 10, 20 y 30. Media $\pm$ error estándar. \*Diferencias significativas en comparación con el grupo control de la misma edad.

El aumento en el número total de microglia se debió a incremento en la densidad de microglia ramificada tipos 3 y 4 en los días postnatales 1 y 20. En el día postnatal 1, el grupo expuesto a estrés prenatal presentó aumento en la densidad de microglia tipo 3 en las cortezas entorrinal ( $C_1$ ,  $p>0.05$ ) y parietal ( $C_1$ ,  $p=0.043$ ), septum ( $C_1$ ,  $p=0.004$ ), ganglios basales ( $C_1$ ,  $p>0.05$ ), amígdala ( $C_1$ ,  $p>0.05$ ) y tálamo ( $C_1$ ,  $p=0.003$ ) (Figuras 31 y 32). En la misma edad, día postnatal 1, el grupo de estrés prenatal presentó aumento en la densidad de microglia tipo 4 en las cortezas entorrinal ( $C_1$ ,  $p=0.039$ ), parietal ( $C_1$ ,  $p=0.042$ ), de la ínsula ( $C_1$ ,  $p>0.05$ ) y frontal ( $C_1$ ,  $p>0.05$ ), en el septum ( $C_1$ ,  $p>0.05$ ), ganglios basales ( $C_1$ ,  $p=0.32$ ), tálamo ( $C_1$ ,  $p=0.005$ ), hipotálamo ( $C_1$ ,  $p>0.05$ ) y mesencéfalo ( $C_1$ ,  $p>0.005$ ) (Figuras 33 y 34). Paradójicamente, en el neonato la exposición a estrés prenatal aumentó la densidad microglia ramificada tipo 4 en el bulbo raquídeo ( $C_1$ ,  $p<0.001$ ) y corteza del cerebelo ( $C_1$ ,  $p=0.002$ ) a expensas de la reducción significativa en la densidad de microglia ramificada tipo 3 en ambas estructuras (corteza del cerebelo:  $C_1$ ,  $p=0.012$ , y bulbo raquídeo:  $C_1$ ,  $p=0.045$ ).

En el día postnatal 10 el patrón de distribución de cada tipo de microglia fue similar en los grupos control y de estrés prenatal o postnatal. En el día postnatal 20 la exposición a estrés *in utero* aumentó la densidad total de microglia en las cortezas visual ( $C_1$ ,  $p=0.002$ ), auditiva ( $C_1$ ,  $p=0.032$ ) y del cíngulo ( $C_1$ ,  $p=0.016$ ), en el tálamo ( $C_1$ ,  $p=0.002$ ) y el bulbo raquídeo ( $C_1$ ,  $p<0.001$ ) en comparación con las crías control (Figuras 29 y 30). Mientras que el estrés postnatal produjo aumento en la densidad total de microglia en las cortezas visual ( $C_1$ ,  $p<0.001$ ), auditiva ( $C_1$ ,  $p>0.05$ ), entorrinal ( $C_1$ ,  $p>0.05$ ), y del cíngulo ( $C_1$ ,  $p=0.001$ ), en los ganglios basales ( $C_1$ ,  $p<0.001$ ), tálamo ( $C_1$ ,  $p<0.001$ ) y bulbo raquídeo ( $C_1$ ,  $p<0.001$ ) en comparación con el control de 20 días postnatales (Figuras 29 y 30). Como se muestra en las Figuras 31 a 34, el aumento en la densidad total de microglia en esas estructuras en las crías expuestas a estrés prenatal se debió principalmente a incremento en la densidad de microglia ramificada tipo 4; mientras que en el grupo de estrés postnatal el aumento en la densidad total de microglia se debió a mayor número de microglia ramificada tipo 3. Las regiones con diferencias significativas en el número de microglia tipo 4 por cada  $0.185\text{mm}^2$  en el grupo de estrés prenatal de 20 días postnatales fueron la corteza somatosensorial ( $C_1$ ,  $p=0.017$ ), la amígdala ( $C_1$ ,  $p=0.011$ ), tálamo ( $C_1$ ,

p<0.001) corteza del cerebelo ( $C_1$ ,  $p=0.012$ ), mesencéfalo ( $C_1$ ,  $p=<0.001$ ), puente ( $C_1$ ,  $p=0.016$ ) y el bulbo raquídeo ( $C_1$ ,  $p<0.001$ ) en comparación con el control de la misma edad (Figuras 33 y 34). Las regiones con diferencias significativas en la densidad de microglia tipo 3 en el grupo de estrés postnatal de 20 días postnatales fueron las cortezas visual ( $C_1$ ,  $p<0.001$ ) y del cíngulo ( $C_1$ ,  $p<0.001$ ), y los ganglios basales ( $C_1$ ,  $p=0.001$ ) en comparación con el control de la misma edad (Figuras 31 y 32).

En las crías expuestas a estrés prenatal o postnatal de 20 días de edad se observó que ambos tipos de microglia ramificada, tipos 3 y 4, presentaron incremento en el número de ramificaciones (no evaluado cuantitativamente), así como mayor intensidad del inmunomarcaje en comparación con las crías control de la misma edad. Como se muestra en la Figura 35, la microglia se tornó hiper-ramificada en el giro del cíngulo, tálamo y corteza del cerebelo de las crías expuestas a estrés prenatal o postnatal en comparación con los controles de 20 días postnatales.

En el día postnatal 1 los cambios en la densidad de microglia ameboidea y microglia ramificada en las crías expuestas a estrés *in utero* no se acompañaron de cambios globales en la densidad total de microglia ( $C_1$ ,  $p>0.05$ ). Como se muestra en la Tabla 11, el grupo de estrés prenatal de un día de edad presentó reducción de microglia ameboidea en el encéfalo tomado como un todo ( $C_1$ ,  $p>0.05$ ) y aumento generalizado en la densidad de microglia ramificada tipo 4 ( $C_1$ ,  $p=0.01$ ) en comparación con las crías control de la misma edad. Por el contrario, los cambios en el patrón de distribución y desarrollo de la microglia en el día postnatal 20 en las crías expuestas a estrés prenatal o postnatal sí conllevaron aumento en la densidad encefálica total de microglia ( $C_1$ ,  $p=0.001$ ); como se mostró anteriormente región por región, el incremento significativo en la densidad total de microglia se debió al aumento en la densidad de microglia ramificada tipo 3 en el grupo de estrés postnatal ( $C_1$ ,  $p=0.009$ ) y de microglia tipo 4 en el grupo de estrés prenatal ( $C_1$ ,  $p=0.001$ ).

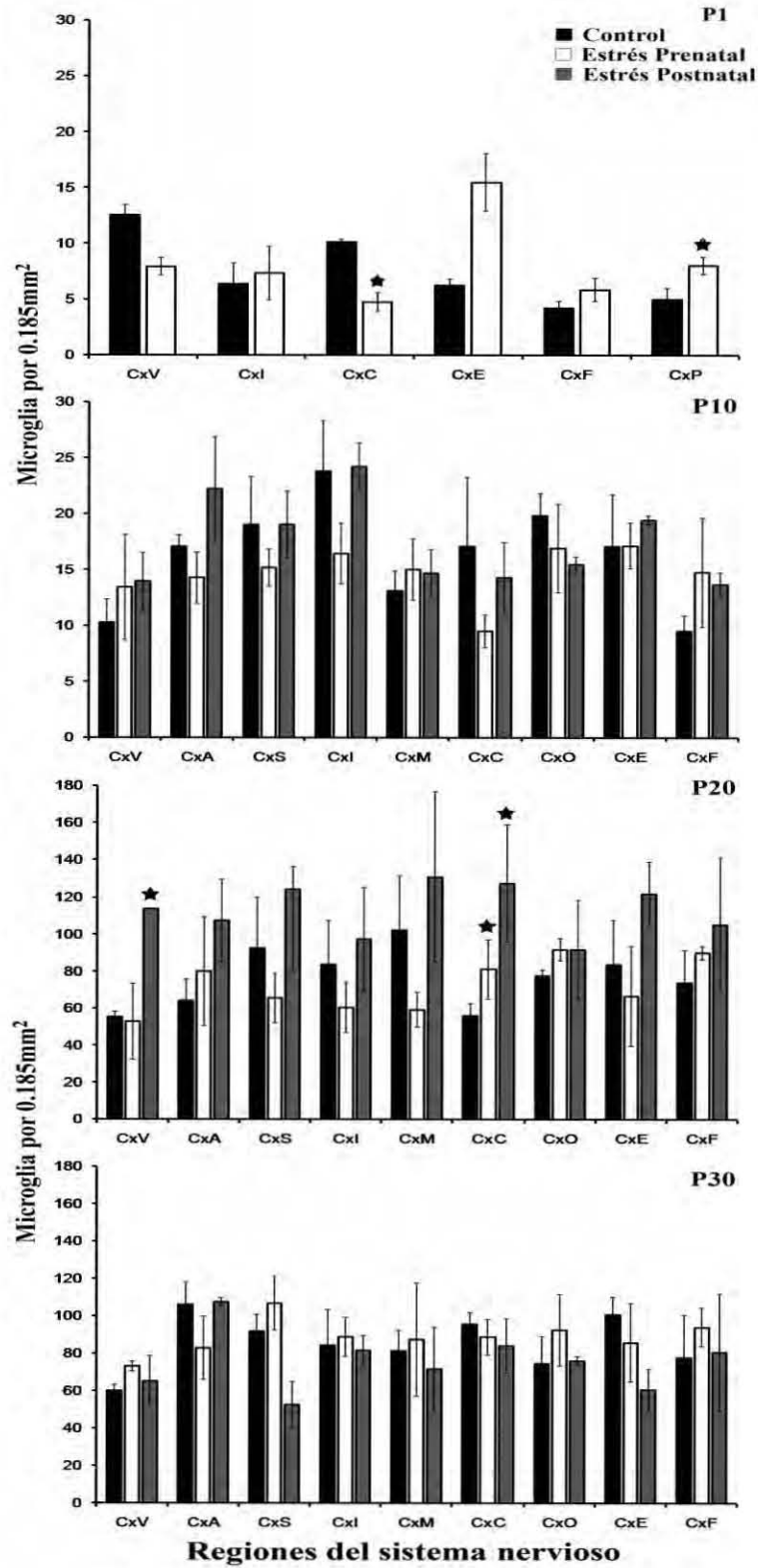


Figura 31. Densidad de microglia tipo 3 en la neocorteza en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en los días postnatales 1 a 30. Media $\pm$  error estándar. \*Diferencias significativas en comparación con el grupo control de la misma edad ( $p < 0.05$ ).

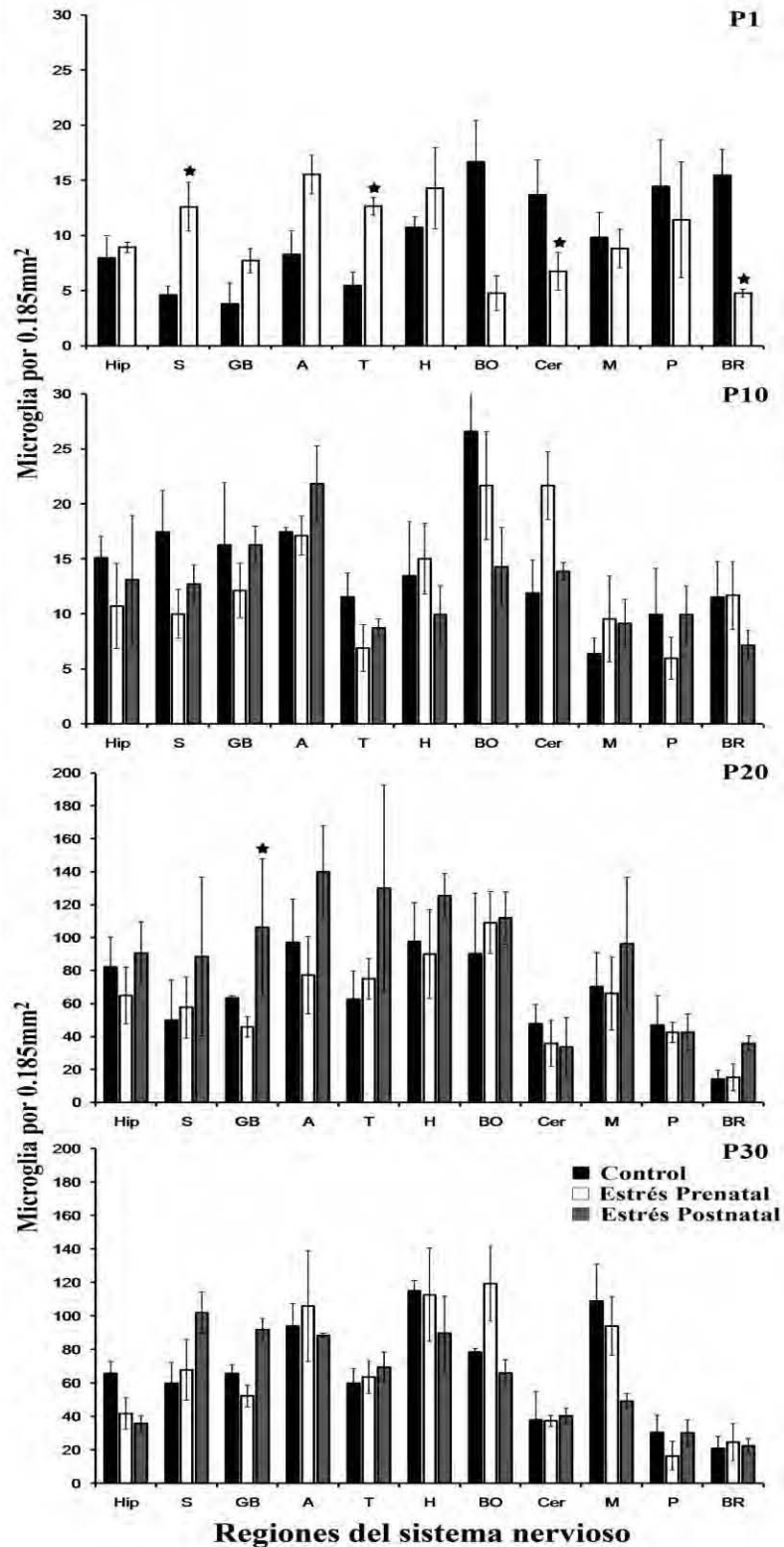


Figura 32. Densidad de microglia tipo 3 en el hipocampo, cerebelo y núcleos grises subcorticales en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en los días P1 a P30. Media $\pm$  error estándar. \*Diferencias significativas en comparación con el grupo control de la misma edad.



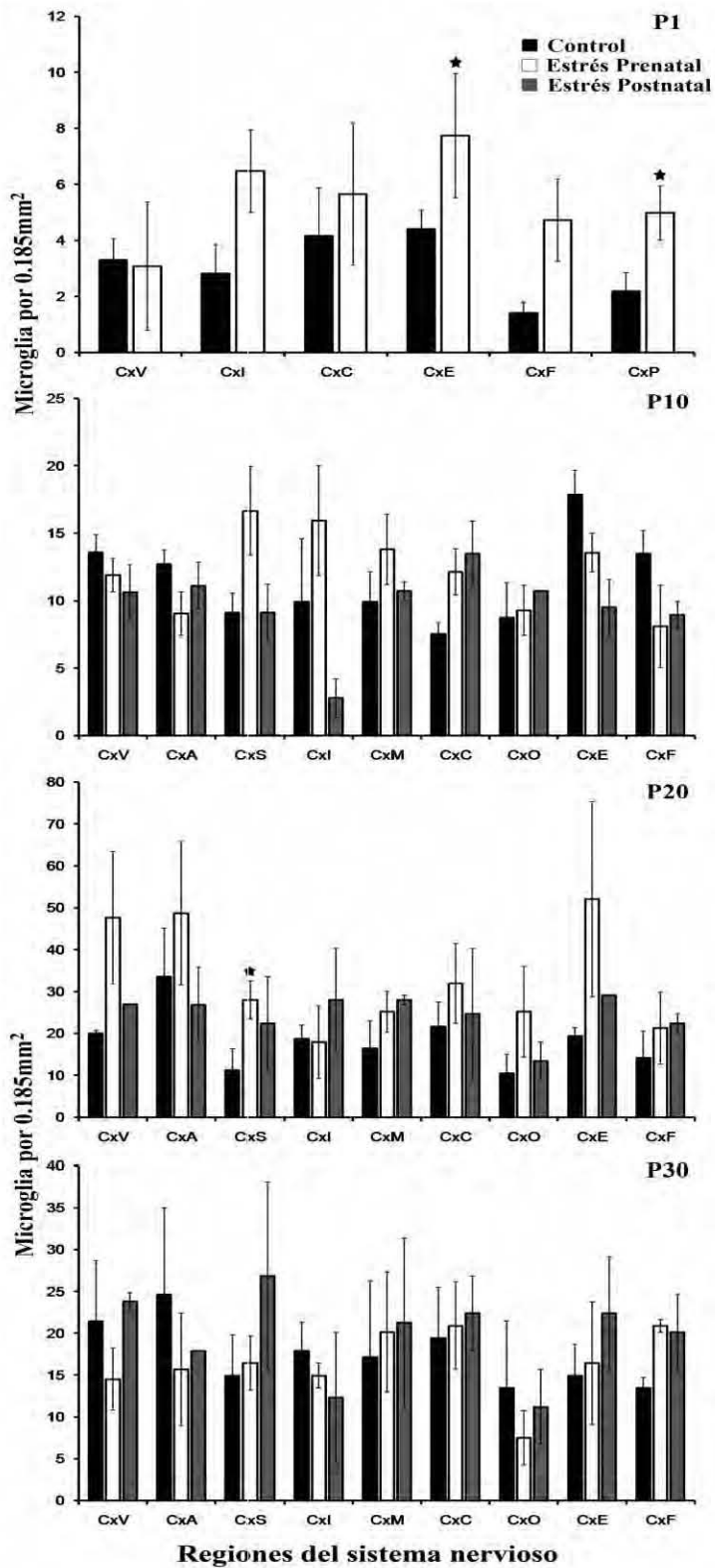


Figura 33. Densidad de microglia tipo 4 en la neocorteza en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en los días postnatales 1 a 30. Media $\pm$  error estándar. \*Diferencias significativas en comparación con el grupo control de la misma edad.

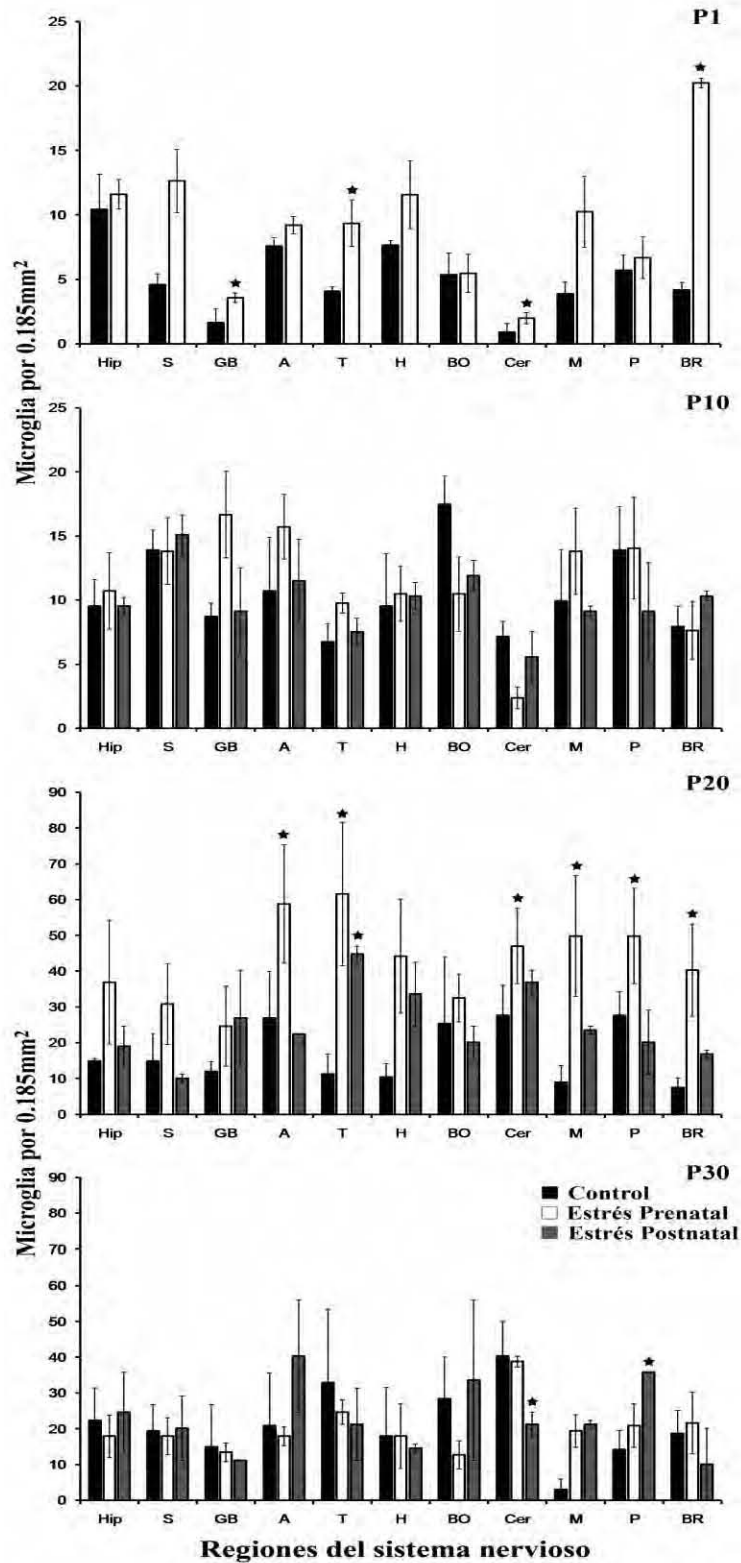


Figura 34. Densidad de microglia tipo 4 en el hipocampo, cerebelo y núcleos grises subcorticales en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en los días P1-P30. Media $\pm$  error estándar. \*Diferencias significativas en comparación con el grupo control de la misma edad ( $p < 0.05$ ).

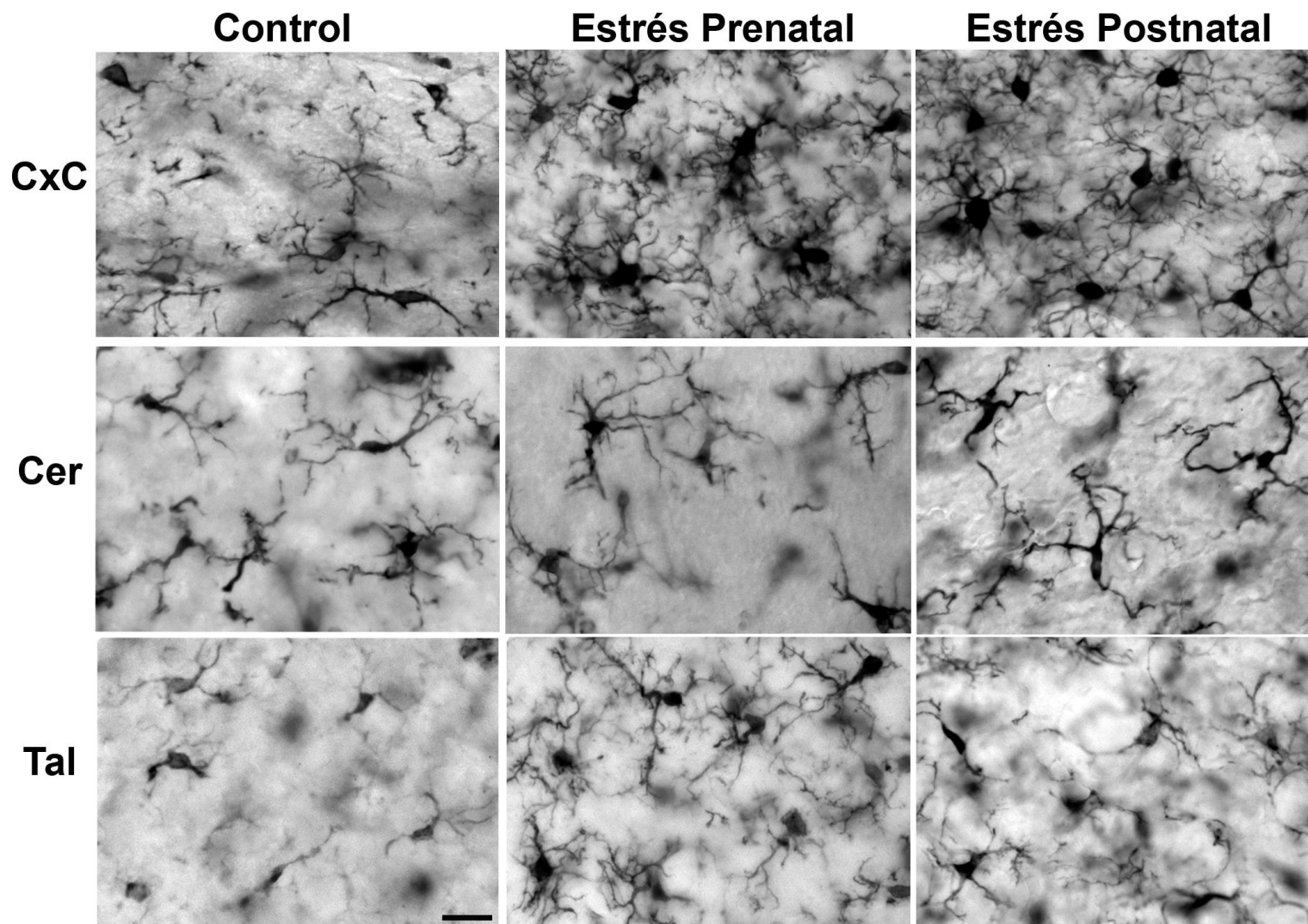


Figura 35. Características morfológicas de la microglia ramificada en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal de 20 días de edad. Inmunohistoquímica contra Iba1. Barra de escala: 20µm.

Tabla 11. Densidad de microglia encefálica en los grupos control, estrés prenatal y estrés postnatal en los días postnatales 1 a 30.

	<b>Edad</b>	<b>Tipo1</b>	<b>Tipo 2</b>	<b>Tipo 3</b>	<b>Tipo 4</b>	<b>Total</b>
<b>Control</b>	<b>1</b>	3 ± 1.16	10.28 ± 1.31	11.56 ± 2.88	3.49 ± 0.59	28.33 ± 1.59
	<b>10</b>	0.53 ± 0.16	5.76 ± 0.34	21.15 ± 1.24	9.63 ± 0.28	37.07 ± 1.74
	<b>20</b>	0.58 ± 0.35	7.50 ± 0.38	75.15 ± 6.38	18.92 ± 2.64	104.62 ± 4.22
	<b>30</b>	0.10 ± 0.09	5.19 ± 1.57	74.41 ± 1.95	21.38 ± 8.58	101.44 ± 7.65
<b>Estrés Prenatal</b>	<b>1</b>	1.94 ± 0.59	6.18 ± 2.23	9.06 ± 1.65	7.41 ± 0.9	24.59 ± 3.3
	<b>10</b>	0.37 ± 0.24	6.16 ± 1	17.86 ± 2.02	10.32 ± 0.78	34.71 ± 1.2
	<b>20</b>	0.51 ± 0.12	5.91 ± 1.12	69.17 ± 13.79	40.01 ± 9.31	117.67 ± 6.14
	<b>30</b>	0.06 ± 0.03	5.94 ± 1.8	76.32 ± 10.62	21.09 ± 1.63	103.84 ± 11.72
<b>Estrés Postnatal</b>	<b>10</b>	0.17 ± 0.08	5.43 ± 1.4	19.64 ± 0.55	8.53 ± 0.59	33.77 ± 2.56
	<b>20</b>	0.39 ± 0.19	4.14 ± 0.34	107.38 ± 19.37	26.62 ± 4.62	139.70 ± 14.79
	<b>30</b>	0.10 ± 0.001	4.14 ± 0.92	67.22 ± 1.5	23.80 ± 1.7	95.26 ± 7.65

En la tabla aparece el número de cada tipo de microglia por cada 0.185mm<sup>2</sup> de área encefálica. La densidad de microglia encefálica se obtuvo mediante el promedio de la densidad de cada tipo de microglia en las regiones nerviosas estudiadas. Media +/- error estándar.

## DISCUSIÓN

El propósito del presente trabajo fue elucidar el efecto que el estrés crónico durante fases tempranas de la vida (etapas prenatal o postnatal) ejerce sobre el desarrollo anatómico y funcional de la barrera hematoencefálica en un mamífero altricio, la rata *Rattus norvegicus* (cepa Wistar). La exposición a estrés prenatal o postnatal produjo efectos diferenciales sobre el desarrollo anatómico y funcional de la barrera hematoencefálica durante la etapa postnatal temprana. El estrés crónico perinatal modificó de forma generalizada el desarrollo funcional de la barrera hematoencefálica al aumentar el transporte transendotelial de macromoléculas circulantes en la sangre durante un período prolongado de la etapa postnatal temprana. Al mismo tiempo, el estrés crónico perinatal aceleró el desarrollo morfológico de los capilares que conforman la barrera hematoencefálica, al reducir el espesor de la pared capilar y la presencia de microvellosidades en el lumen de los capilares encefálicos. Paralelamente, el estrés crónico perinatal promovió aceleración del desarrollo del principal sistema de defensa glial encefálico, la microglia, y promovió microgliosis reactiva, caracterizada por aumento en la densidad de microglia ramificada, durante el período de mayor extravasación de macromoléculas circulantes en la sangre.

Específicamente, la exposición a estrés prenatal aumentó la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al colorante azul de Evans en las cortezas visual, auditiva, motora y del cíngulo, en el hipocampo, septum, ganglios basales, tálamo, hipotálamo, cerebelo, mesencéfalo y puente en las crías de 20 días postnatales. Como lo indicó el estudio ultraestructural de los capilares hipocámpicos, el aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en las crías expuestas a estrés *in utero* fue producto del incremento en el transporte mediado por vesículas pinocíticas, a la neutralización del glicocalix de la membrana luminal y al aumento en la difusión paracelular de macromoléculas circulantes en la sangre en comparación con las crías control de la misma edad. Paradójicamente, la exposición a estrés prenatal aceleró el desarrollo morfológico de la vasculatura hipocámpica al reducir el espesor de la pared capilar y promover la desaparición de microvellosidades en el lumen capilar hasta niveles similares a estadios de desarrollo más avanzados (p. ej. día postnatal 30 en el grupo control). Adicional a los cambios observados en los capilares encefálicos del grupo de estrés prenatal, se encontró que el principal sistema de defensa contra agentes patógenos invasores en el parénquima nervioso, la

microglia, presentó cambios en sus patrones de desarrollo y distribución. En el neonato, previo a la edad de mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica, el estrés prenatal aceleró la maduración morfológica de la microglia en los reservorios gliales del cuerpo calloso y cápsula interna. El estrés prenatal también pareció promover la migración microglial desde los reservorios hacia regiones corticales, subcorticales y del tallo cerebral en las crías de 1 día postnatal, sin aumentar la densidad encefálica total de microglia. En el día de mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica en el grupo de estrés prenatal, día postnatal 20, se observó aumento en el número de microglia ramificada (principalmente microglia caracterizada como tipo 4) en varias estructuras corticales y subcorticales; así como aumento en la densidad total de microglia encefálica.

La exposición a estrés postnatal alteró el funcionamiento adecuado de la barrera hematoencefálica al promover mayor permeabilidad a macromoléculas como el azul de Evans en el día postnatal 10; las regiones de la neocorteza con permeabilidad aumentada de la barrera hematoencefálica en el grupo de estrés postnatal fueron el giro del cíngulo, las cortezas visual, auditiva, somatosensorial, de la ínsula, motora, entorrinal y orbitofrontal. La exposición a estrés por separación materna durante los días postnatales 2 a 10 también tuvo como consecuencia permeabilidad aumentada al azul de Evans en el hipocampo, corteza del cerebelo, tálamo, hipotálamo, ganglios basales bulbo olfativo, mesencéfalo, puente y bulbo raquídeo. El estrés postnatal modificó el desarrollo funcional de la barrera hematoencefálica al promover la formación de vesículas pinocíticas y la neutralización del glicocalix de la membrana luminal de los capilares encefálicos. A pesar del desarrollo funcional alterado de la barrera hematoencefálica, el estrés postnatal promovió una maduración morfológica acelerada de los capilares encefálicos al reducir el espesor de la capa de células endoteliales y el número de extensiones citoplásmicas desde la membrana luminal (microvellosidades) y disminuir la difusión paracelular de macromoléculas circulantes en la sangre. Como consecuencia de los cambios en el desarrollo funcional de los vasos sanguíneos encefálicos, en el parénquima nervioso del grupo de estrés postnatal se presentó microgliosis reactiva en el día postnatal 20, caracterizada por aumento en la densidad de microglia ramificada tipo 3 y en la densidad total de microglia en numerosas regiones encefálicas. En ambos grupos, estrés prenatal y estrés postnatal, la reacción de microgliosis reactiva disminuyó al mes de edad, puesto que la densidad total de microglia y

de microglia ramificada (tipos 3 y 4) en todas las regiones encefálicas estudiadas fue similar a la observada en el grupo control de la misma edad.

### **Respuesta de estrés durante la gestación y etapa postnatal temprana**

Los procedimientos de estrés usados en el presente proyecto, nado forzado en las ratas gestantes y separación materna en las crías, fueron efectivos para producir la principal respuesta de estrés, la activación del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales. Ambos procedimientos aumentaron la concentración de corticosterona en plasma en condiciones crónicas, después de 10 días consecutivos de nado forzado en las ratas gestantes y de 18 días de separación materna en las crías. En las ratas madre se encontró que la exposición a estrés durante los días 10 a 20 de la gestación aumentó en más de 400% la concentración de corticosterona en plasma en comparación con los controles de la misma etapa gestacional. Mientras que la exposición a estrés postnatal aumentó más del 300% el nivel de corticosterona plasmática en los días postnatales 10 y 20, dentro de los 5 minutos posteriores al término del procedimiento de estrés, en comparación con crías control no separadas de su madre.

Tanto el nado forzado como la separación materna se usan comúnmente para estudiar el efecto del estrés sobre el funcionamiento del sistema nervioso central (eg. Ladd et al., 2000; Sakakibara et al., 2005). El nado forzado es un procedimiento estándar de estrés que implica someter a los animales experimentales a ejercicio físico concomitante con la exposición a distintas temperaturas del agua (Abel, 1993; Sutanto y de Kloet, 1994). A diferencia de los procedimientos estándar de ejercicio físico forzado, en los que los animales experimentales son sometidos a correr en ruedas giratorias o a nadar durante 120 minutos diarios (Mottola et al., 1989; Oliveira et al., 2004), el nado como procedimiento de estrés implica el ejercicio físico durante períodos breves, entre 3 y 25 minutos diarios (Abel, 1993); lo que evita los efectos hipóxicos y de restricción calórica fetal asociados con el ejercicio físico extenuante durante la gestación (Oliveira et al., 2004). La magnitud de la respuesta de estrés en el procedimiento de nado forzado varía en función de la duración del nado; en la rata, la concentración de corticosterona plasmática aumenta progresivamente a partir de 5 minutos de nado forzado hasta alcanzar un nivel máximo después de una sesión de 25 minutos de nado (Abel, 1993). Por otro lado, también se ha demostrado que la

temperatura del agua en el procedimiento de nado forzado está asociada con el nivel de la respuesta de estrés (fisiológica y conductual) en modelos experimentales en roedores; la variación sistemática de la temperatura del agua aumenta la concentración de corticosterona plasmática y la tasa de actividad durante el nado (Abel, 1993; Bruner y Vargas, 1994). Es así que la manipulación concomitante de las dos variables, duración del nado forzado y temperatura del agua, puede aumentar la magnitud de la respuesta de estrés en comparación con otros procedimientos como inmovilización y exposición al olor de predadores (Abel et al., 1993; Sutanto y de Kloet, 1994).

El procedimiento de estrés postnatal consistió en la separación diaria madre-cría durante tres horas en los días postnatales 2 a 20. La separación materna es un procedimiento de estrés postnatal ampliamente usado en roedores y en primates no humanos (eg. Ladd et al., 2000, 2004; Sánchez et al., 2001; Pryce et al., 2004). En la rata consiste en separar a las crías de su madre y en ocasiones también de las otras crías de la camada durante 15 minutos, 3 o 24 horas en los primeros 20 días postnatales (antes de la edad de destete de las crías) (eg. Ladd et al., 2000, 2004). La separación materna durante 15 minutos diarios usualmente produce efectos benéficos sobre la reactividad emocional y el desarrollo nervioso de las crías; sin embargo, períodos largos de separación materna ejercen efectos adversos sobre el desarrollo posterior de los sujetos experimentales (Ladd et al., 2000, 2004; Euthoven et al., 2007). El período de separación materna más usado es 3 horas (Ladd et al., 2000, 2004), debido a que en la rata el amamantamiento ocurre cada 2 a 3 horas durante la fase luminosa y períodos tan largos como 24 horas impiden la adecuada lactancia de las crías y promueven la acumulación de desechos por falta de acicalamiento anogenital materno (Friedman, 1979; Alberts, 2005).

En el presente estudio el nado forzado durante 10 días consecutivos produjo aumento del nivel de corticosterona plasmática en la rata gestante 5 minutos después del término de la última sesión de nado. De igual forma, la separación materna crónica promovió aumento en la liberación de corticosterona 8 y 20 días después del inicio de la exposición al estresor en las crías. Los hallazgos anteriores indican que a pesar de la exposición crónica a los estresores no se presentó adaptación de la respuesta de estrés, indicado por el alto nivel de activación del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales en los sujetos experimentales después de 8 días o más de exposición al nado forzado o separación



materna. El presente hallazgo contrasta con reportes previos en los que se describió adaptación de la respuesta de estrés tras la exposición crónica a estresores físicos o psicológicos (eg. inmovilización, descargas eléctricas y exposición a bajas temperaturas ambientales) (Selye, 1936, 1950; Sutanto y de Kloet, 1994). En el caso del nado forzado, estudios previos indican que la manipulación concomitante de la duración de la sesión de nado y la temperatura del agua previene la adaptación de la respuesta de estrés después de períodos de hasta 14 días consecutivos de nado (Abel y Hannigan, 1992; Dal-Zotto et al., 2000). Por otro lado, el procedimiento de separación materna en las crías de rata usualmente se realiza de forma consecutiva durante los primeros 14 días postnatales y, a pesar del período de hipo-respuesta de estrés (Sapolsky y Meaney, 1986), se ha mostrado que la separación materna crónica mantiene elevados los niveles plasmáticos de corticosterona en las crías hasta el día postnatal 14 (Ladd et al., 2000, 2004). Es así que, la activación prolongada del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales en las ratas gestantes y en las crías expuestas a estrés postnatal pudo haber afectado el desarrollo anatómico y funcional de la barrera hematoencefálica y promover la microgliosis reactiva en ambos grupos experimentales (estrés prenatal y estrés postnatal).

En roedores, el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales materno incrementa su nivel de actividad basal a partir de la segunda semana de gestación y alcanza su nivel máximo durante el parto (Dupouy et al., 1975; Neumann et al., 1998; Takahashi et al., 1998; Slattery y Neumann, 2008); mientras que, conforme avanza la gestación disminuye la magnitud de la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales ante la exposición a distintos estresores físicos y psicológicos (Neumann et al., 1998; Brunton y Russel, 2008; Slattery y Neumann, 2008). A pesar de la hipo-respuesta de estrés en la rata gestante, la disminución en la concentración plasmática materna de globulina transportadora de corticosteroides (Takahashi et al., 1998) y la reducción en la expresión de la enzima  $11\beta$ -deshidrogenasa hidroxisteroidea tipo 2 en la placenta (Mairesse et al., 2007) aumentan los niveles de glucocorticoides que pueden entrar a la circulación fetal (Zarrow et al., 1970; Takahashi et al., 1998). Adicionalmente, el aumento en la liberación de hormona liberadora de corticotrofina por las glándulas endometriales, el estroma endometrial decidualizado y la placenta hacia el final de la gestación (Avishai-Eliner et al.,

2002; Kalantaridou et al., 2007) incrementa la activación del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales tanto materno como fetal (Avishai-Eliner et al., 2002).

Durante la etapa postnatal temprana, la concentración de corticosterona en plasma en las crías control y expuestas a estrés prenatal o postnatal fue menor a la observada en el adulto, debido al período de hipo-respuesta de estrés (Sapolsky y Meaney, 1986). El período de hipo-respuesta de estrés en la rata inicia a partir de las primeras 36 horas posteriores al nacimiento y termina al final de la segunda semana postnatal (Sapolsky y Meaney, 1986; Levine et al., 2000). De manera similar a lo reportado en la literatura, en las crías del grupo control se observaron cambios en la concentración plasmática de corticosterona dependientes de la edad de los sujetos. En el día postnatal 1 las crías control presentaron nivel elevado de corticosterona, seguido de reducción significativa en los días postnatales 10 y 20; finalmente, al mes de edad la concentración de corticosterona plasmática de las crías del grupo control comenzó a incrementarse hasta aproximarse a los niveles basales característicos del adulto. En las crías de los grupos de estrés prenatal y estrés postnatal, el período de hipo-respuesta de estrés pareció prolongarse hasta el día postnatal 30; puesto que aún a esa edad se mantuvieron reducidos los niveles de corticosterona plasmática. El mantenimiento de niveles reducidos de corticosterona plasmática en las crías expuestas a estrés prenatal o postnatal puede estar relacionado con la disminución del volumen de la glándula suprarrenal subsecuente a la exposición crónica a estrés perinatal (Dupoy et al., 1987; Lesage et al., 2001; Mairesse et al., 2007).

En el grupo de crías expuestas a privación materna, los niveles de corticosterona plasmática fueron 300% superiores a los observados en las crías control; tal hallazgo difiere de reportes previos en los que se encontró que la exposición a estrés durante el período de hipo-activación del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales produce aumentos moderados de 50-80% de concentración de corticosterona plasmática (Sapolsky y Meaney, 1986). Tal discrepancia en la magnitud de la respuesta de estrés entre lo reportado en el presente estudio y los reportes en la literatura puede deberse a la diferencia en el tipo de estresor postnatal usado, estresor físico (eg. exposición a bajas temperaturas ambientales, inyecciones de solución salina, manipulación breve) en los reportes previos (Sapolsky y Meaney, 1986; Levine et al., 2000) *versus* estresor psicológico (separación materna) en el presente estudio. Al igual que ocurre en el adulto, la exposición a distintos tipos de

estresores, así como la intensidad, duración, predictabilidad y controlabilidad de los mismos influye sobre la magnitud de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales en la etapa postnatal temprana (Anisman y Merali, 1999; Levine et al., 2000; Gerrig y Zimbardo, 2005). Dentro de la circulación fetal y del neonato, las hormonas liberadas durante estrés pueden unirse a sus receptores localizados en las células endoteliales y microglia (Bohn et al., 1991; Wolff et al., 1992; Tanaka et al., 1997; Bale et al., 2002; Wang et al., 2002;) y modificar el desarrollo normal de la barrera hematoencefálica y de la microglia.

### **Desarrollo de la barrera hematoencefálica en el grupo control**

La magnitud de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al trazador azul de Evans se mantuvo relativamente constante durante los primeros 30 días postnatales en las estructuras encefálicas estudiadas en el grupo control. En todas las edades, la coloración encefálica fue azul tenue, con tendencia a mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica al colorante en los días postnatales 10 y 20. Paradójicamente, los vasos sanguíneos encefálicos experimentaron cambios morfológicos asociados con la edad, indicativos de maduración estructural continua de la barrera hematoencefálica. En el hipocampo, ocurrió aumento progresivo en la densidad vascular, incluidos capilares, vénulas y arteriolas, entre los días postnatales 10 a 30. Ultraestructuralmente, los capilares hipocámpicos del grupo control presentaron reducción progresiva en el perímetro luminal, lo que indica adquisición de la morfología circular característica de los capilares encefálicos, aumento gradual del espesor de la lámina basal entre los días postnatales 1 a 30. En cuanto a la morfología de las uniones ocluyentes, los capilares hipocámpicos del grupo control presentaron cambios asociados a la edad en el índice de difusión paracelular del trazador electrodenso. En las uniones ocluyentes el porcentaje ocupado por la WGA-peroxidasa se mantuvo reducido en los días postnatales 1 y 10, aumentó en el día postnatal 20 y se redujo nuevamente al mes de edad hasta los niveles observados en el neonato; sin embargo, en ninguna de las edades estudiadas se observó que la longitud total de la unión ocluyente estuviera ocupada por el trazador electrodenso.

Los hallazgos ultraestructurales en el grupo control concuerdan con lo reportado en estudios previos acerca del desarrollo de la barrera hematoencefálica en la rata (Donahue y

Pappas, 1961; Stewart y Hayakawa, 1987, 1994; Schulze y Firth, 1992; Farrell y Risau, 1994). A partir del día 11 de la gestación en la rata ocurre cambio progresivo en la morfología de los capilares cerebrales; los primeros capilares son fenestrados, con forma irregular, paredes gruesas y grandes hendiduras interendoteliales (Farrell y Risau, 1994; Stewart y Hayakawa, 1994). Conforme avanza el desarrollo, disminuye la longitud de las hendiduras interendoteliales, se compacta gradualmente el citoplasma de las células endoteliales, desaparecen las fenestraciones y aumenta el espesor de la lámina o membrana basal (Donahue y Pappas, 1961; Stewart y Hayakawa, 1987, 1994; Schulze y Firth, 1992). Después del destete en la rata, la barrera hematoencefálica adquiere las características ultraestructurales y funcionales propias del adulto (Farrell y Risau, 1994).

A pesar de los cambios morfológicos progresivos en los capilares encefálicos, la barrera hematoencefálica presentó permeabilidad reducida a macromoléculas circulantes en la sangre, como el azul de Evans y la WGA-peroxidasa. Se sabe que a pesar que el desarrollo de la barrera hematoencefálica ocurre de manera asincrónica en las distintas regiones del sistema nervioso central (Cassella et al., 1996; Huang et al., 2001; Molnár y Saunders, 2009), algunas de las características de barrera en los capilares encefálicos aparecen desde el contacto célula endotelial-célula endotelial; por lo que la función principal de la barrera hematoencefálica, mantener la homeostasis del microambiente nervioso, se ejerce desde etapas tempranas del desarrollo de forma micro-regionalizada (Molnár y Saunders, 2009).

### **Desarrollo de la microglia en el grupo control**

En las crías control de 1 día de edad la microglia amebocítica se concentró densamente en los reservorios gliales, cuerpo calloso y cápsula interna, y con menor densidad en la sustancia blanca del cerebelo, septum, bulbo olfativo y tallo cerebral. En la corteza cerebral, formación hipocámpica, corteza del cerebelo y núcleos grises subcorticales de las crías control de 1 día postnatal, el tipo de microglia predominante fue microglia con ramificaciones cortas y de gran calibre (tipo 3). Hacia el día postnatal 10 en el cuerpo calloso y cápsula interna disminuyó significativamente la densidad de microglia amebocítica y aumentó la densidad de microglia ramificada. De igual forma, en las estructuras grises corticales y subcorticales de las crías control de 10 días postnatales se observó aumento en la densidad de microglia ramificada en comparación con el día postnatal 1. En el día

postnatal 20 la microglia ameboidea desapareció del reservorio del cuerpo calloso y se mantuvo en el mismo nivel en la cápsula interna y sustancia blanca del cerebelo; en el resto de las estructuras encefálicas la densidad de microglia tipos 3 y 4 aumentó en más del 300% en comparación con las crías control de 10 días postnatales. Finalmente, en todas las estructuras nerviosas estudiadas en el grupo control, la densidad de microglia ameboidea y ramificada se mantuvo estable entre los días postnatales 20 y 30.

La alta densidad de microglia ameboidea en el cuerpo calloso y cápsula interna del grupo control coincide con reportes previos que indican que ambas estructuras subcorticales constituyen reservorios gliales en el encéfalo neonatal (Ling, 1976; Imamoto y Leblond, 1978; Wu et al., 1992; Ling y Wong, 1993; Earle y Mitrofanis, 1998). En cuanto a la alta concentración de microglia ameboidea en la sustancia blanca del cerebelo, Ashwell (1990) mostró que la acumulación de la microglia en esa estructura está estrechamente relacionada con la muerte neuronal en la corteza del cerebelo. Por otro lado, dada su localización anatómica, la sustancia blanca del cerebelo podría constituir un reservorio glial adicional, de gran importancia para el desarrollo de la microglia en la corteza y núcleos profundos del cerebelo, así como en el tallo cerebral.

La reducción drástica en la densidad de microglia ameboidea del cuerpo calloso en el día postnatal 10 en las crías control coincide con experimentos previos que mostraron que la microglia ameboidea del cuerpo calloso se diferencia en microglia ramificada y migra hacia los reservorios gliales secundarios, localizados en las cápsulas interna y externa (Earle y Mitrofanis, 1997; Ludkiewicz et al., 2001), y hacia estructuras grises corticales y subcorticales (Chugani et al., 1991; Ling y Wong, 1993). De manera similar a lo descrito en las crías del grupo control, se ha reportado que la diferenciación de la microglia ameboidea en microglia ramificada termina durante la segunda semana postnatal en el cuerpo calloso (Ling y Wong, 1993) y alrededor de la tercera semana postnatal en todo el encéfalo (Chugani et al., 1991; Ling y Wong, 1993).

En cuanto al desarrollo de la microglia en la neocorteza y formación hipocámpica, estudios previos reportan un patrón de desarrollo similar al descrito en las crías del grupo control (Wu et al., 1993; Dalmau et al., 1998). Adicionalmente, en ambas estructuras se describió un gradiente de desarrollo de la microglia; Wu et al. (1993) refirieron un gradiente de desarrollo lateromedial y caudorostral en la neocorteza, con gran densidad de microglia

ameboidea en las cortezas laterales (p. ej. cortezas somatosensorial y de la ínsula) y mayor proporción de microglia ramificada en cortezas mediales (p. ej. corteza motora y giro del cíngulo). Sagitalmente, Wu et al., (1993) describieron etapas más avanzadas del desarrollo de la microglia en las cortezas caudales (p. ej. corteza visual primaria) en comparación con las cortezas rostrales (p. ej. corteza orbitofrontal). En la formación hipocámpica se observó reducción progresiva de la microglia ameboida de la fisura hipocámpica al estrato piramidal del cuerno de Ammón (Dalmau et al., 1998). Dalmau et al. (1998) también describieron un gradiente lateromedial dentro del cuerno de Ammón y el giro dentado; caracterizado por fases más avanzadas de desarrollo de la microglia en el sector CA3 en comparación con el sector CA1 y gran densidad de microglia ameboida en el brazo interno de la capa granular del giro dentado, en comparación con el brazo externo. A diferencia de los reportes de Dalmau et al. (1998) y Wu et al. (1993), en el grupo control no se encontraron tales patrones de desarrollo de la microglia en la neocorteza y formación hipocámpica; sin embargo, se requieren estudios más detallados de cada capa en ambas estructuras para poder determinar la dirección del gradiente de desarrollo de la microglia.

### **Efecto del estrés sobre el desarrollo anatómico y funcional de la barrera hematoencefálica**

El estrés crónico perinatal modificó de forma generalizada el desarrollo funcional de la barrera hematoencefálica al aumentar el transporte transendotelial de macromoléculas circulantes en la sangre durante un período prolongado de la etapa postnatal temprana. La exposición a estrés prenatal aumentó la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al colorante azul de Evans en las cortezas visual, auditiva, motora y del cíngulo, en el hipocampo, septum, ganglios basales, tálamo, hipotálamo, cerebelo, mesencéfalo y puente en las crías de 20 días postnatales. Asimismo, la exposición a estrés postnatal promovió mayor permeabilidad a macromoléculas en el día postnatal 10 en prácticamente las mismas regiones en las que el estrés prenatal produjo permeabilidad aumentada de la barrera hematoencefálica. Las estructuras nerviosas con mayor permeabilidad al azul de Evans en el grupo de estrés postnatal de 10 días de edad fueron el giro del cíngulo, las cortezas visual, auditiva, somatosensorial, de la ínsula, motora, entorrinal y orbitofrontal, el hipocampo, corteza del cerebelo, tálamo, hipotálamo, ganglios basales bulbo olfativo,

mesencéfalo, puente y bulbo raquídeo. En ambas condiciones experimentales, el colorante azul de Evans se concentró densamente en la matriz extracelular del parénquima nervioso y no solamente en las paredes de los capilares encefálicos.

El trazador azul de Evans se administró por vía intracardiaca mientras los sujetos estaban bajo los efectos del anestésico pentobarbital sódico. Reportes previos encontraron que la reducción en la presión arterial inducida por el pentobarbital sódico en la misma dosis que la usada en el presente estudio, no modifica el efecto que el estrés o alguna otra manipulación experimental ejerce sobre el funcionamiento de la barrera hematoencefálica en la rata adulta (Sharma y Dey, 1981; Chi et al., 1998; Sharma, 2004). Asimismo, para controlar el posible efecto de hipoxia secundario a la apertura de la caja torácica sobre el funcionamiento de la barrera hematoencefálica (Kaur y Ling, 2008), se llevó a cabo un experimento en el que el colorante azul de Evans se administró por vía intraperitoneal a crías control en cada una de las edades estudiadas (días postnatales 1, 10, 20 y 30). La vía de administración del colorante (intracardiaca *versus* intraperitoneal) no influyó significativamente sobre el grado de permeabilidad de la barrera hematoencefálica en todas las regiones nerviosas cuantificadas en las crías control; por lo que se puede generalizar que los efectos adversos de aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en las crías expuestas a estrés prenatal o postnatal fueron independientes de la posible hipoxia y se debieron específicamente a la exposición crónica a estrés.

Efectos similares de incremento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a moléculas acopladas a proteínas séricas se han descrito en mamíferos adultos sujetos a estrés agudo por nado forzado, inmovilización y exposición a altas temperaturas (Belova y Jonnson, 1982; Friedman et al., 1996; Sharma et al., 1996; Škultétyová et al., 1998; Esposito et al., 2001, 2002; Sharma, 2004; Theoharides y Konstantinidou, 2007). En esos trabajos, el estrés durante períodos breves aumentó la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en regiones similares a las que en este estudio presentaron mayor permeabilidad al colorante azul de Evans, como la circunvolución del cíngulo, las cortezas frontal, parietal, occipital y del cerebelo, el hipocampo, núcleo caudado, tálamo, tallo cerebral y médula espinal (Belova y Jonnson, 1982; Friedman et al., 1996; Sharma et al., 1996; Sharma, 2004). Aparentemente, esas regiones del sistema nervioso central son más

susceptibles a los efectos adversos del estrés sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica desde fases tempranas del desarrollo.

Por el contrario, experimentos realizados en un mamífero precoz, la oveja, indican que los glucocorticoides disminuyen la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a moléculas circulantes en el torrente sanguíneo (Stonestreet et al., 1999, 2000). Stonestreet et al. (1999, 2000) encontraron que la administración de dexametasona a fetos de oveja que se encontraban al 60 y 80% del término de la gestación aceleró la velocidad de maduración de la barrera hematoencefálica. En ese experimento, la dexametasona redujo la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al aminoácido sintético  $\alpha$ -aminoisobutírico acoplado a C<sup>14</sup> en la neocorteza, hipocampo, núcleo caudado, tálamo, cerebelo, tallo cerebral y porción cervical de la médula espinal con respecto al grupo control (Stonestreet et al., 1999, 2000). Importantly, esas regiones fueron las que en mamíferos adultos presentaron mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica por la exposición aguda a estrés (Belova y Jonnson, 1982; Friedman et al., 1996; Sharma et al., 1996; Sharma, 2004) y también son las que se caracterizaron por permeabilidad incrementada al trazador azul de Evans subsecuente a la exposición a estrés prenatal o postnatal.

Los hallazgos del presente estudio también contradicen lo obtenido por Sinton et al. (2000) y Ziylan et al. (1989), quienes mostraron que en el roedor adulto la exposición a estrés agudo o la administración del glucocorticoide sintético dexametasona no produjo efectos adversos e incluso mejoró el funcionamiento de la barrera hematoencefálica al reducir la permeabilidad a moléculas circulantes en la sangre que normalmente no atraviesan la barrera hematoencefálica, como el aminoácido sintético  $\alpha$ -aminoisobutírico y la piridostigmina (Ziylan et al., 1989; Sinton et al., 2000). Paralelamente, algunos experimentos *in vitro* en monocapas de células endoteliales con propiedades similares a la barrera hematoencefálica indican que la exposición a los glucocorticoides mejora las propiedades de barrera. Específicamente, los glucocorticoides aumentan la expresión de las proteínas de la unión ocluyente y del transportador de glucosa GLUT1, incrementan la resistencia eléctrica transendotelial y disminuyen la difusión paracelular de moléculas hidrofílicas a través de la monocapa (Guerin et al., 1992; Romero et al., 2003; Calabria et al., 2006; Förster et al., 2006; Blecharz et al., 2008).



En este estudio se encontraron efectos de interacción entre condición experimental y edad en la magnitud de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al colorante azul de Evans en casi todas las regiones cuantificadas. Lo anterior se debe a que en mamíferos altricios la barrera hematoencefálica es inmadura al nacimiento y su desarrollo continua hasta el final de la cuarta semana postnatal, cuando termina la formación de la lamina basal (Krause et al., 2002); por lo que toda manipulación que altere la permeabilidad de la barrera dependerá del estadio de desarrollo de los componentes celulares de la misma al momento del tratamiento. En ciertas edades, algunos de los componentes de la barrera hematoencefálica serán más vulnerables a los efectos del estrés que otros. El estudio ultraestructural de los capilares hipocámpicos, mostró que la permeabilidad aumentada de la barrera hematoencefálica en las crías expuestas a estrés prenatal se debió al incremento en el transporte mediado por vesículas pinocíticas y al aumento en la difusión paracelular; mientras que, en el grupo de estrés postnatal sólo se observó mayor número de caveolas en los capilares hipocámpicos.

Los hallazgos ultraestructurales en el grupo de estrés prenatal concuerdan con el retraso en la maduración de las uniones ocluyentes en el cuerpo caloso secundario a la administración de glucocorticoides al final de la gestación en un mamífero precoz, la oveja (Huang et al., 2001). Huang et al. (2001) describieron que la administración de betametasona a la madre gestante aumentó el número de uniones ocluyentes simples (con pocos puntos de unión entre las células endoteliales) en los fetos a término en comparación con ovejas control, que presentaron mayor número de uniones ocluyentes complejas (de mayor longitud y grado de compactación) en la zona del cuerpo caloso. El incremento en el transporte transendotelial mediado por vesículas pinocíticas en ambos grupos de estrés, prenatal y postnatal, coincide también con el hallazgo de reversión de la permeabilidad aumentada de la barrera por inhibición del transporte vesicular endotelial en ratas adultas expuestas a inmovilización y nado forzado (Sharma, 2004). En ese estudio se administró vinblastina, un fármaco antimitótico que al inhibir la polimerización de microtúbulos impide la formación de vesículas pinocíticas, a ratas adultas expuestas a estrés agudo y se encontró que la inhibición del transporte mediado por vesículas pinocíticas revirtió la permeabilidad aumentada de la barrera a trazadores exógenos circulantes en la sangre (Sharma, 2004).

El estrés crónico perinatal pudo ejercer sus efectos adversos sobre el desarrollo funcional de la barrera hematoencefálica a través de diversas moléculas circulantes en la sangre o presentes en el sistema nervioso central, cuyos niveles varían en función de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales. Reportes en la literatura indican que el aumento en la concentración central de hormona liberadora de corticotrofina durante estrés promueve la degranulación de mastocitos perivasculares con la concomitante activación de las células endoteliales y el aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Esposito et al., 2001, 2002). Por otro lado, el aumento en los niveles centrales de glutamato y la potenciación de la actividad de los receptores tipo NMDA después de estrés activa a las células endoteliales y también incrementa la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Koenig et al., 1992). Otros neurotransmisores que podrían mediar la alteración funcional de la barrera hematoencefálica por exposición a estrés son la serotonina, adrenalina y noradrenalina; en los tres casos se ha descrito que en condiciones de estrés agudo los niveles aumentan significativamente y cuando se suprime el funcionamiento de esos sistemas de neurotransmisión, paralelamente se revierte el efecto adverso del estrés sobre el funcionamiento de la barrera hematoencefálica (Abdul-Rahman et al., 1979; Sharma et al., 1996; Kuang et al., 2004). Adicionalmente, la hipertermia inducida por estrés (aumento de hasta 2.5°C por encima de la temperatura corporal normal) (Conley y Hutson, 2007) podría incrementar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a macromoléculas circulantes en la sangre (Kiyatkin y Sharma, 2009).

### **Efectos del estrés sobre el desarrollo y patrón de distribución de la microglia**

En las crías expuestas a estrés *in utero* se encontró aceleración del desarrollo de la microglia en prácticamente todo el encéfalo en el día postnatal 1. El estrés prenatal disminuyó la densidad de microglia ameboidea y el número total de microglia en el principal reservorio glial del encéfalo, el cuerpo calloso, y concomitantemente aumentó la densidad de microglia ramificada sin modificar la densidad total de microglia en el segundo reservorio glial, la cápsula interna. La exposición a estrés prenatal también aumentó la densidad total de microglia en las cortezas entorrinal y parietal, el septum, amígdala y tálamo. En esas y otras regiones (eg. cortezas frontal y de la ínsula, ganglios basales, hipotálamo y mesencéfalo) el aumento en la densidad total de microglia se debió al

incremento en la densidad de microglia ramificada. En el día postnatal 20, ambos grupos, estrés prenatal y estrés postnatal, presentaron microgliosis reactiva en prácticamente todo el encéfalo; la microgliosis reactiva se caracterizó por aumento en la densidad de microglia con ramificaciones cortas y de gran calibre (tipo 3) para el caso del grupo de estrés postnatal y microglia con ramificaciones largas y espinosas (tipo 4) para el caso del grupo de estrés prenatal. En ambos grupos de estrés la microgliosis reactiva desapareció al mes de edad; momento en el que la densidad de la microglia ramificada y microglia total de las crías expuestas a estrés crónico perinatal fue comparable a la observada en las crías del grupo control.

Efectos similares de aceleración en la maduración de la microglia en los reservorios de microglia ameboidea del encéfalo se han descrito subsecuentes a procedimientos de estrés diferentes a los usados en el presente estudio (Ling, 1982; Kaur et al., 1994; Wu et al., 2001). Ling (1982) y Wu et al. (2001) administraron acetato de cortisona a crías de rata en el día postnatal 1; mientras que Kaur et al. (1994) y Wu et al. (2001) inyectaron subcutáneamente dexametasona a crías de rata en los días postnatales 1, 3 y 5. En esos reportes se encontró que el estrés farmacológico inducido por la administración de glucocorticoides durante la primera semana postnatal redujo en 40-60% la densidad de microglia ameboidea en el cuerpo calloso (Ling, 1982; Kaur et al., 1994; Wu et al., 2001); reducción de magnitud similar a la encontrada en el presente estudio (55 a 61%) en las crías del grupo de estrés prenatal en el día postnatal 1.

Kaur et al. (1994) y Wu et al. (2001) atribuyeron la reducción en la densidad de microglia en el cuerpo calloso al posible aumento en la muerte microglial, a la disminución en la proliferación de los precursores de la microglia, o bien a la aceleración de la diferenciación de la microglia ameboidea en microglia ramificada. Modelos *in vitro* mostraron que la adición de las hormonas liberadas durante estrés a cultivos puros de microglia enjuto el soma, disminuyó la proliferación celular y redujo la viabilidad celular (Ganter et al., 1992; Tanaka et al., 1997; Drew y Chavis, 2000; Ock et al., 2006; Zhou et al., 2007). Sin embargo, en el presente estudio, la ausencia de decremento global en la densidad de microglia encefálica en el día postnatal 1 indica que la reducción en la microglia ameboidea en el principal reservorio glial (el cuerpo calloso) no es producto del aumento en la muerte celular. Los hallazgos sugieren que la microglia ameboidea del cuerpo calloso se

diferenció rápidamente en microglia ramificada y migró hacia su localización final en las estructuras grises corticales y subcorticales. Además, el desarrollo acelerado de la microglia en las crías recién nacidas expuestas a estrés prenatal concuerda con los hallazgos de aceleración en la maduración morfológica de los vasos sanguíneos hipocámpicos en las crías expuestas a estrés prenatal.

Por otro lado, el aumento en la densidad de microglia ramificada en los grupos de estrés prenatal y postnatal de 20 días de edad es compatible con una reacción de microgliosis producto del daño encefálico inducido por la permeabilidad aumentada de la barrera hematoencefálica a macromoléculas circulantes en la sangre (Hooper et al., 2009). En ambos grupos de estrés, prenatal y postnatal, el aumento en la densidad de microglia ramificada y de microglia total en varias de las regiones corticales y subcorticales estudiadas, se acompañó de incremento significativo en la densidad encefálica de microglia ramificada y microglia total. A pesar de ser clasificadas como microglia tipos 3 y 4 con base en sus características morfológicas, la microglia ramificada de las crías expuestas a estrés prenatal o postnatal presentó aumento aparente en el número de ramificaciones en comparación con los controles de la misma edad y en comparación con las mismas condiciones experimentales en los días postnatales previos.

Los cambios observados en la densidad y morfología de la microglia en los grupos de estrés prenatal o postnatal de 20 días de edad concuerdan con las descripciones clásicas de microgliosis reactiva subsecuente al daño del sistema nervioso central (Streit et al., 1990). Característicamente, dentro de las primeras 24 horas posteriores al daño en el sistema nervioso adulto la microglia ramificada en reposo se torna hiper-ramificada (Streit et al., 1990). Si el daño es moderado, la microglia hiper-ramificada migra hacia la proximidad de la lesión y se mantiene allí durante períodos breves (Streit et al., 1990; McKay et al., 2007). Ante lesiones extensas o graves del sistema nervioso central, la microglia hiper-ramificada presenta una reacción hipertrófica, con pérdida de ramificaciones, aumento en el tamaño del soma y adquisición de una forma redonda (microglia reactiva). Dos a tres días después de la lesión la microglia comienza a proliferar; así, la densidad máxima microglial se alcanza entre 4 y 7 días posteriores al daño agudo. En la mayoría de los casos, la microgliosis reactiva desaparece 30 días después de la lesión (Streit et al., 1990).

Los hallazgos del presente estudio también concuerdan con reportes previos de microgliosis reactiva durante el desarrollo postnatal temprano (Sánchez-López et al., 2005). Sánchez-López et al. (2005) mostraron que durante la etapa postnatal temprana la microglia inmadura es capaz de activarse en respuesta al daño del sistema nervioso. Ante lesión de la retina la microglia inmadura reactiva presentó un soma de mayor tamaño con ausencia de pseudopodios en comparación con la microglia ameboidea característica del desarrollo nervioso normal. A diferencia de la reacción globalizada de microgliosis reactiva típica del adulto (Streit et al., 1990; McKay et al., 2007), la microglia inmadura en contacto directo con la lesión es la única que presenta morfología reactiva debido probablemente a la ausencia de receptores para los factores quimiotáxicos liberados durante daño nervioso que le impiden a la microglia inmadura reactiva migrar hacia el sitio de la lesión (Sánchez-López et al., 2005). Lo anterior es consistente con los hallazgos del presente estudio que indican que la microglia hiper-ramificada se distribuyó homogéneamente en la mayoría de las regiones encefálicas estudiadas; regiones que presentaron alta permeabilidad de la barrera hematoencefálica a macromoléculas circulantes en la sangre.

### **Consecuencias funcionales del desarrollo alterado de la barrera hematoencefálica**

La barrera hematoencefálica es el principal sistema encargado de mantener la homeostasis en el sistema nervioso central (Fishman, 1990); por lo que su integridad funcional y anatómica es indispensable para el adecuado funcionamiento neuronal y glial (Rapoport, 1976). La ausencia de permeabilidad selectiva de la barrera hematoencefálica junto con la disfunción de los mecanismos de transporte en las células endoteliales permitiría que numerosas moléculas potencialmente neurotóxicas, como los altos niveles de glutamato y potasio circulantes en la sangre (Fishman, 1990), penetren al parénquima nervioso y produzcan daño en las diversas estructuras nerviosas. Además, la presencia del colorante azul de Evans y del trazador electrodensito WGA-peroxidasa en el parénquima nervioso indica la extravasación de proteínas séricas como la albúmina, lipoproteínas, globulina y fibrinógeno (Fry, 1977; Nag, 2003b), que directamente activan a la microglia (Hooper et al., 2009). La microglia reactiva al aumentar la expresión de la sintasa inducible de óxido nítrico y al liberar factores neurotóxicos como el glutamato, el factor de crecimiento tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )

y el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ), podría producir muerte neuronal por excitotoxicidad y por apoptosis (Hooper et al., 2009).

Dado que el desarrollo vascular cerebral ocurre de forma paralela al desarrollo del sistema nervioso central y la densidad vascular varía en función de la maduración de cada región (Rowan y Maxwell, 1981; Argandoña y Lafuente, 1996; Argandoña et al., 2005); la alteración en el desarrollo funcional de la barrera hematoencefálica podría alterar las características del medio interno nervioso y subsecuentemente modificar procesos del desarrollo como la neurogénesis, migración neuronal, sinaptogénesis y gliogénesis (Molnár y Saunders, 2009). Los hallazgos del presente estudio concuerdan con reportes previos que indican que la exposición a distintos factores adversos como inflamación sistémica (Stolp et al., 2005), hipoxia (Kaur y Ling, 2008), drogas de abuso y contaminantes ambientales (Ginsberg et al., 2004; Pollard, 2007) durante las etapas prenatal y postnatal temprana altera el desarrollo de la barrera hematoencefálica y así afecta el desarrollo nervioso normal (Molnár y Saunders, 2009).

En particular, en el presente estudio la exposición a estrés durante fases tempranas de la vida (prenatal o postnatal) aumentó la permeabilidad de la barrera en regiones encefálicas que controlan funciones importantes como la formación hipocámpica (corteza entorrinal, hipocampo, giro dentado), implicada en el aprendizaje de lugar en la rata (Martin y Clark, 2007); los ganglios basales, la corteza motora primaria y la corteza del cerebelo, indispensables para el control del movimiento y la coordinación de patrones complejos de conducta (Scott, 2004); el tálamo y las cortezas sensoriales primarias, encargados del procesamiento de las distintas modalidades sensoriales (Alitto y Usrey, 2003); y regiones del sistema límbico, como la circunvolución del cíngulo, la corteza orbitofrontal y el hipotálamo, indispensables para el procesamiento de las emociones y el control del sistema nervioso autónomo (Dalglish, 2004).

## CONCLUSIÓN

La exposición a estrés crónico durante las etapas prenatal y postnatal produjo efectos adversos sobre el desarrollo funcional de la barrera hematoencefálica en un mamífero altricio, la rata Wistar. El estrés crónico perinatal alteró de forma generalizada el desarrollo funcional de la barrera hematoencefálica al aumentar significativamente el transporte transendotelial de macromoléculas circulantes en la sangre durante la etapa postnatal temprana. Paralelamente la exposición a estrés *in utero* por nado forzado de la madre gestante y a estrés postnatal por separación materna, promovió microgliosis reactiva en prácticamente todo el encéfalo de las crías de 20 días de edad. La microgliosis reactiva en las crías expuestas a estrés crónico perinatal se caracterizó por aumento en la densidad de microglia ramificada (tipos 3 y 4) y de microglia total durante el período de mayor extravasación de macromoléculas circulantes en la sangre; además, la microglia de las crías expuestas a estrés presentó aumento aparente en la densidad de ramificaciones, similar a la morfología de la microglia hiper-ramificada descrita en condiciones de daño leve del sistema nervioso central adulto.

Paradójicamente, el estrés crónico perinatal aceleró el desarrollo anatómico de los capilares que conforman la barrera hematoencefálica; puesto que redujo el espesor de la pared capilar y disminuyó la presencia de extensiones citoplasmáticas (tipificadas como microvellosidades) en el lumen de los capilares encefálicos en comparación con las crías control de la misma edad. Concomitante con los cambios en el desarrollo anatómico de los capilares encefálicos, el estrés crónico perinatal (en particular el estrés *in utero*) promovió maduración acelerada del principal sistema de defensa glial encefálico, la microglia, al reducir la densidad encefálica de microglia ameboidea y aumentar la densidad de microglia ramificada sin modificar la densidad total de microglia en las crías recién nacidas.

Ambos procedimientos, nado forzado en las ratas gestantes y separación materna en las crías, produjeron eficientemente la principal respuesta de estrés, la activación del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales. La activación prolongada del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales en las ratas gestantes y en las crías expuestas a estrés postnatal pudo haber afectado el desarrollo anatómico y funcional de la barrera hematoencefálica y promover la microgliosis reactiva directa e indirectamente. Directamente al unirse las hormonas liberadas durante el estrés (eg. hormona liberadora de

corticotrofina y glucocorticoides) a sus receptores localizados en los componentes celulares de la barrera hematoencefálica; e indirectamente a través de otros efectores como la degranulación de mastocitos, la liberación de glutamato, serotonina o noradrenalina, o la hipertermia, secundarios todos a la activación del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales.



## REFERENCIAS

- Abbott NJ. 2002. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *Journal of Anatomy*, 200: 629-638.
- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, 7: 41-53.
- Abdi H, Williams LJ. 2010. Contrast analysis. En: Salkind N (Ed.). *Encyclopedia of Research Design*. Thousand Oaks CA: Sage. Obtenido el 9 de octubre de 2009 en: <http://www.utdallas.edu/~herve/abdi-contrasts2010-pretty.pdf>
- Abdul-Rahman A, Dahlgren N, Johansson BB, Siesjö BK. 1979. Increase in local cerebral blood flow induced by circulating adrenaline: involvement of blood-brain barrier dysfunction. *Acta Physiologica Scandinavica*, 107: 227-232.
- Abel EL. 1993. Physiological correlates of the forced swim test in rats. *Physiology and Behavior*, 54: 309-317.
- Abel EL, Hannigan JH. 1992. Effects of chronic forced swimming and exposure to alarm substance: physiological and behavioral consequences. *Physiology and Behavior*, 52: 781-785.
- Alberts JR. 2005. Infancy. En: Whishaw IQ, Kolb B (Eds.). *The behavior of laboratory rat: a handbook with tests*. Nueva York: Oxford University Press, pp. 266-267.
- Altman J, Bayer SA. 1995. *Atlas of prenatal rat brain development*. Boca Ratón: CRC Press.
- Alitto HJ, Usrey WM. 2003. Corticothalamic feedback and sensory processing. *Current Opinion in Neurobiology*, 13: 440-445.
- American Heritage Dictionary of the English Language. 1992. 3ª Edición. Boston: Houghton Mifflin Company.
- American Psychological Association. 2008. Glossary of psychological terms. Consultado en: <http://www.psychologymatters.org/glossary.html#s> Última visita: 27 de octubre de 2008.
- Anisman H, Merali Z. 1999. Understanding stress: characteristics and caveats. *Alcohol Research and Health* 23: 241-249.
- Argandoña EG, Bengoetxea H, Lafuente JV. 2005. Lack of experience-mediated differences in the immunohistochemical expression of blood-brain barrier markers (EBA

and GluT-1) during the postnatal development of the rat visual cortex. *Developmental Brain Research*, 156: 158-166.

Argandoña EG, Lafuente JV. 1996. Effects of dark-rearing on the vascularization of the developmental rat visual cortex. *Brain Research*, 732: 43-51.

Ashwell K. 1990. Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum. *Developmental Brain Research* 55: 219-230.

Avishai-Eliner S, Brunson KL, Sandman CA, Baram TZ. 2002. Stressed-out, or in (utero)? *Trends in Neurosciences*, 25: 518-524.

Ayra V, Demarco VG, Issar M, Hochhaus G. 2006. Contrary to adult, neonatal rats show pronounced brain uptake of corticosteroids. *Drug, Metabolism and Disposition*, 34: 939-942.

Bakay L. 1953. Studies on blood-brain barrier with radioactive phosphorus. III. Embryonic development of the barrier. *Archives of Neurology and Psychiatry*, 70: 30-39.

Balanov R, Dore-Duffy P. 1998. Role of the CNS microvascular pericyte in the blood-brain barrier. *Journal of Neuroscience Research*, 53: 637-644.

Bale TC, Giordano FJ, Hickey RP, Huang Y, Nath AK, Peterson KL, Vale WV, Lee K-F. 2002. Corticotropin-releasing factor receptor 2 is a tonic suppressor of vascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 7734-7739.

Ballabh P, Braun A, Nedergaad M. 2004. The blood-brain barrier: an overview. Structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of Disease*, 16: 1-13.

Banks WA, Broadwell RD. 1994. Blood to brain and brain to blood passage of native horseradish peroxidase, wheat germ agglutinin, and albumin: pharmacokinetic and morphological assessments. *Journal of Neurochemistry*, 62: 2404-2419.

Bär T, Wolff JR. 1976. Development and adult variations of the wall of brain capillaries in the neocortex of rat and cat. En: Cervos-Navarro J, et al. (Eds.). *The Cerebral Vessel Wall*. Nueva York: Raven Press, pp. 1-6.

Bär T. 1980. The vascular system of the cerebral cortex. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*, 59: 1-62.

Barbazanges A, Piazza PV, Le Moal M, Maccari S. 1996. Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. *Journal of Neuroscience*, 16: 3943-3949.

Bauer HC, Bauer H, Lemetschwandter A, Amberger A, Ruiz P, Steiner M. 1993. Neovascularization and the appearance of morphological characteristics of the blood-brain barrier in the embryonic mouse central nervous system. *Brain Research*, 75: 269-278.

Belova TI, Jonsson G. 1982. Blood-brain barrier permeability and immobilization stress. *Acta Physiologica Scandinavica*, 116: 21-29.

Bernard C. 1930. *Introduction a l'e Etude de la Médecine Expérimentale*. 5a. Edición. Paris: Librarie Delagrave.

Blecharz KG, Drenckhahn D, Förtster CY. 2008. Glucocorticoids increase VE-cadherin expression and cause cytoskeletal rearrangements in murine brain endothelial cEND cells. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 28: 1139-1149.

Bohn MC. 1980. Granule cell genesis in the hippocampus of rats treated neonatally with hydrocortisone. *Neuroscience*, 5: 2003-2012.

Bohn MC, Friedrich VLJr. 1982. Recovery of myelination in rat optic nerve after developmental retardation by cortisol. *Journal of Neuroscience*, 2: 1292-1298.

Bohn MC, Howard E, Vielkind U, Krowsky Z. 1991. Glial cells express both mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 40: 105-111.

Bohn MC, Lauder JM. 1978. The effects of neonatal hydrocortisone on rat cerebellar development. *Developmental Neuroscience*, 1: 250-266.

Box, G.E.P., Hunter, J.S., Hunter, W.G., 2005. *Statistics for Experimenters. Design, Innovation, and Discovery*. Wiley-Interscience, Nueva Jersey.

Broadwell RD, Balin BJ, Salcman M. 1988. Transcytotic pathway for blood-borne protein through the blood-brain barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85: 632-636.

Brown RW, Kotolevtsev Y, Leckie C, Lindsay RS, Lyons V, Murad P, Mullins JJ, Chapman KE, Edwards CRW, Seckl JR. 1996. Isolation and cloning of human placental 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-2 cDNA. *Biochemical Journal*, 313: 1007-1717.

Bruner C, Vargas I. 1994. The activity of rats in a swimming situation as a function of water temperature. *Physiology and Behavior*, 55: 21-28.

- Brunton PJ, Russel JA. 2008. The expectant brain: adapting for motherhood. *Nature Reviews Neuroscience*, 9: 11-25.
- Burton PJ, Smith RE, Krozowski ZS, Waddell BJ. 1996. Zonal distribution of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 messenger ribonucleic acid expression in the rat placenta and decidua during late pregnancy. *Biology of Reproduction*, 55: 1023-1028.
- Bushong EA, Martone ME, Ellisman MH. 2004. Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 22: 73-86.
- Calabria AR, Weidenfeller C, Jones AR, de Vries HE, Shusta EV. 2006. Puromycin-purified rat brain microvascular endothelial cell cultures exhibit improved barrier properties in response to glucocorticoid induction. *Journal of Neurochemistry*, 97 : 922-933.
- Carson MJ, Doose JM, Melchior B, Schmid CD, Ploix CC. 2006. CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunological Reviews*, 213: 48-65.
- Cassella JP, Lawreson JG, Allt G, Firth JA. 1996. Ontogeny of four blood-brain barrier markers: an immunocytochemical comparison of pial and cerebral cortical microvessels. *Journal of Anatomy*, 189: 407-415.
- Catalani A, Sabbatini M, Consoli C, Cinque C, Tomassoni D, Azmitia E, Angelucci L, Amenta F. 2002. Glial fibrillary acidic protein immunoreactive astrocytes in developing rat hippocampus. *Mechanisms of Ageing and Development*, 123: 481-490.
- Challis JRG, Matthews SG, Gibb W, Lye SJ. 2000. Endocrine and paracrine regulation of birth term and preterm. *Endocrine Reviews*, 21: 514-550.
- Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P. 2007. The origin and cell lineage of microglia –New concepts. *Brain Research Reviews* 53: 344-354.
- Chi OZ, Chun TW, Liu X, Weiss HR. 1998. The effects of pentobarbital on blood-brain barrier disruption caused by intracarotid injection of hyperosmolar mannitol. *Anesthesia and Analgesia*, 86: 1230-1235.
- Chrousos GP. 1998. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye memorial lecture. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851: 311-335.
- Chugani DC, Kedersha NL, Rome LH. 1991. Vault immunofluorescence in the brain: new insights regarding the origin of microglia. *Journal of Neuroscience*, 11: 256-268.

- Clayton CJ, Grosser BI, Stevens W. 1977. The ontogeny of corticosterone and dexamethasone receptors in rat brain. *Brain Research*, 134: 445-453.
- Conley RK, Hutson PH. 2007. Effects of acute and chronic treatment with fluoxetine on stress-induced hyperthermia in telemetered rats and mice. *European Journal of Pharmacology*, 564: 138-145.
- Cullinan WE, Herman JP, Helmrich DL, Watson SJ. 1995. A neuroanatomy of stress. En: Friedman MJ, Charney DS, Deutch AY (Eds.). *Neurobiological and Clinical Consequences of Stress. From Normal Adaptation to Post-Traumatic Stress Disorder*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, pp: 3-26.
- Dalgleish T. 2004. Timeline: The emotional brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 5: 583-589.
- Dalmau I, Finsen B, Tonder N, Zimmer J, González B, Castellano B. 1997. Development of microglia in the prenatal rat hippocampus. *Journal of Comparative Neurology*, 377: 70-84.
- Dalmau I, Finsen B, Zimmer J, González B, Castellano B. 1998. Development of microglia in the postnatal rat hippocampus. *Hippocampus*, 8: 458-474.
- Dal-Zotto S, Martí O, Armario A. 2000. Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioural and physiological responses to the stressor. *Behavioural Brain Research*, 114: 175-181.
- de Kloet ER, Karst H, Jöels M. 2008. Corticosteroid hormones in the central stress response: quick-and-slow. *Frontiers in Neuroendocrinology* 29: 268-272.
- de Vos K. 2005. Cell Counter. In: Rasband WS. *Image J*. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/1997-2005>.
- Diccionario Panhispánico de Dudas. 2005. 1ª Edición. Real Academia Española. Consultado en: <http://buscon.rae.es/dpdI/SrvltConsulta?lema=estres&origen=RAE>. Última consulta: 22 de octubre de 2008.
- Donahue S, Pappas GD. 1961. The fine structure of capillaries in the cerebral cortex of the rat at various stages of development. *American Journal of Anatomy*, 108: 331-347.
- Drew PD, Chavis JA. 2000. Inhibition of microglial cell activation by cortisol. *Brain Research Bulletin*, 52: 391-396.

- Dubois PM, Amraoui AE, Héritier AG. 1997. Development and differentiation of pituitary cells. *Microscopy Research and Technique*, 39: 98-113.
- Duman RS. 1995. Regulation of intracellular signal transduction and gene expression by stress. En: Friedman MJ, Charney DS, Deutch AY (Eds.). *Neurobiological and Clinical Consequences of Stress. From Normal Adaptation to Post-Traumatic Stress Disorder*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, pp.: 27-43.
- Dupoy JP, Chatelain A, Boudouresque F, Conte-Devolx B, Oliver C. 1987. Effects of chronic maternal dexamethasone treatment on the hormones of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat fetus. *Biology of the Neonate*, 52: 216-222.
- Dupoy JP, Coffigny H, Magre S. 1975. Maternal and foetal corticosterone levels during late pregnancy in rats. *Journal of Endocrinology*, 65: 347-352.
- Earle KL, Mitrofanis J. 1997. Identification of transient microglial cell colonies in the forebrain white matter of developing rats. *Journal of Comparative Neurology*, 387: 371-384.
- Earle KL, Mitrofanis J. 1998. Development of glia and blood vessels in the internal capsule of rats. *Journal of Neurocytology*, 27: 127-139.
- Engelhardt B. 2003. Development of the blood-brain barrier. *Cell and Tissue Research*, 314: 119-129.
- Escobar A, Gómez-González B. 2008. Barrera hematoencefálica. Neurobiología, implicaciones clínicas y efectos del estrés sobre su desarrollo. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 9: 395-405.
- Esposito P, Chandler N, Kandere K, Basu S, Jacobson S, Connolly R, Tutor D, Theoharides TC. 2002. Corticotropin-releasing hormone and brain mast cells regulate blood-brain-barrier permeability induced by acute stress. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 303: 1061-1066.
- Esposito P, Gheorghe D, Kandere K, Pang X, Connolly R, Jacobson S, Theoharides TC. 2001. Acute stress increases permeability of the blood-brain-barrier through activation of brain mast cells. *Brain Research*, 888: 117-127.
- Euthoven L, de Kloet ER, Oitzl MS. 2007. Effects of maternal deprivation of CD1 mice on performance in the water maze and swim stress. *Behavioral Brain Research*, 187: 195-199.

- Farrell CL, Risau W. 1994. Normal and abnormal development of the blood-brain barrier. *Microscopy Research and Technique*, 27: 495-506.
- Fellin T. 2009. Communication between neurons and astrocytes: relevance to the modulation of synaptic and network activity. *Journal of Neurochemistry*, 108: 533-544.
- Ferguson RK, Woodburg DM. 1969. Penetration of <sup>14</sup>C-inulin and <sup>14</sup>C-sucrose into brain, cerebrospinal fluid and skeletal muscle of developing rats. *Experimental Brain Research*, 7: 181-194.
- Fishman RA. 1990. Blood-brain barrier. En: Fishman RA (Ed.). *Cerebrospinal Fluid in Diseases of the Nervous System*. Saunders: Filadelfia, capítulo 3, pp. 43-62.
- Förster C, Waschke J, Burek M, Leers J, Drenckhahn D. 2006. Glucocorticoid effects on mouse microvascular endothelial barrier permeability are brain specific. *Journal of Physiology* 573.2: 413-425.
- Frank PG, Woodman SE, Park DS, Lisanti MP. 2003. Caveolin, caveolae, and endothelial cell function. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23: 729-736.
- Freedman FB, Johnson JA. 1969. Equilibrium and kinetic properties of the Evans blue-albumin system. *American Journal of Physiology*, 216: 675-681.
- Friedman MI. 1979. Effects of milk consumption and deprivation on body fluids of suckling rats. *Physiology and Behavior*, 23: 1029-1033.
- Friedman A, Kaufer D, Shemer J, Hendler I, Soreq H, Tur-Kaspa I. 1996. Pyridostigmine brain penetration under stress enhances neuronal excitability and induces early immediate transcriptional response. *Nature Medicine*, 2: 1382-1385.
- Fry DL. 1977. Aortic Evans blue dye accumulation: its measurement and interpretation. *American Journal of Physiology*, 232: H204-H222.
- Ganter S, Northoff H, Mannel D, Gebicke-Harter PJ. 1992. Growth control of cultured microglia. *Journal of Neuroscience Research*, 33: 218-230.
- Gavrilovic L, Dronjak S. 2005. Activation of rat pituitary-adrenocortical and sympathoadrenomedullary system in response to different stressors. *Neuro Endocrinology Letters*, 26: 515-520.
- Gerrig RJ, Zimbardo PG. 2005. Emotion, stress and health. En: Gerrig RJ, Zimbardo PG (Eds.). *Psychology and life*. 17ª Edición. Boston: Pearson, pp. 392-433.

- Ghosh B, Wood CR, Held GA, Abbot BD, Lau C. 2000. Glucocorticoid receptor regulation in the rat embryo: a potential site for developmental toxicity? *Toxicology and Applied Pharmacology*, 164: 221-229.
- Gilbert S. 2003. *Developmental Biology*. 7a. Edición. Massachusetts: Sinauer Associates, pp. 491-523.
- Ginsberg G, Hattis D, Miller R, Sonawane B. 2004. Pediatric pharmacokinetic data: implications for environmental risk assessment for children. *Pediatrics*, 113: 973-983.
- Goldman JE. 2001. Developmental origins of astrocytes. En: Jessen KR, Richardson WD (Eds.). *Glial Cell Development: Basic Principles and Clinical Relevance* (2ª edición). Oxford: Oxford University Press, pp. 55-74.
- Gómez-González B, Escobar A. 2002. Neuroanatomía del estrés. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 3: 273-282.
- Gómez-González B, Escobar A. 2009a. Altered functional development of the blood-brain barrier after early life stress in the rat. *Brain Research Bulletin*, 79: 376-387.
- Gómez-González B, Escobar A. 2009b. Prenatal stress alters microglial development and distribution in postnatal rat brain. *Acta Neuropathologica* (DOI: 10.1007/s00401-009-0590-4).
- Gonatas NK, Avrameas S. 1973. Detection of plasma membrane carbohydrates with lectin peroxidase conjugates. *Journal of Cell Biology*, 59: 436-443.
- Gould E, Woolley CS, Cameron HA, Daniels DC, McEwen BS. 1991a. Adrenal steroids regulate postnatal development of the rat dentate gyrus: II. Effects of glucocorticoids and mineralocorticoids on cell birth. *Journal of Comparative Neurology*, 313: 486-493.
- Gould E, Woolley CS, McEwen BS. 1991b. Adrenal steroids regulate postnatal development of the rat dentate gyrus: I. Effects of glucocorticoids on cell death. *Journal of Comparative Neurology*, 313: 479-485.
- Grazer FM, Clemente CD. 1957. Developing blood-brain barrier to trypan blue. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 94: 758-760.
- Greenberg DA, Jin K. 2005. From angiogenesis to neuropathology. *Nature*, 438: 954-959.



- Guerin C, Wolff JEA, Lathera J, Drewes LR, Brem H, Goldstein GW. 1992. Vascular differentiation and glucose transporter expression in rat gliomas: effects of steroids. *Annals of Neurology* 31: 481-487.
- Guillemin GJ, Brew BJ. 2004. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *Journal of Leukocyte Biology*, 75: 388-397.
- Hart MN, Fabry Z. 1995. CNS antigen presentation. *Trends in Neurosciences*, 18: 475-481.
- Hayes CE, Goldstein IJ. 1974. An  $\alpha$ -D-Galactosyl-binding lectin from *Bandeiraea simplicifolia* seeds: isolation by affinity chromatography and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 249: 1904-1914.
- Hooper C, Pinteaux-Jones F, Fry VAH, Sevastou IG, Baker D, Heales SJ, Pocock JM. 2009. Differential effects of albumin on microglia and macrophages; implications for neurodegeneration following blood-brain barrier damage. *Journal of Neurochemistry*, 109: 694-705.
- Huang WL, Harper CG, Evans SF, Newnham JP, Dunlop SA. 2001. Repeated prenatal corticosteroid administration delays astrocyte and capillary tight junction maturation in fetal sheep. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 9: 487-493.
- Ifft JD. 1972. An autoradiographic study of the final division of neurons in rat hypothalamic nuclei. *Journal of Comparative Neurology*, 144: 193-204.
- Imamoto K, Leblond CP. 1978. Radioautographic investigation of gliogenesis in the *corpus callosum* of young rats. II. Origin of microglial cells. *Journal of Comparative Neurology*, 180: 134-164.
- Jacobson M. 1991. *Developmental Neurobiology*. 2<sup>nd</sup> Ed. Nueva York: Appleton-Century Crofts.
- Jastrow H. 2008. Electron microscopic atlas of cells, tissues and organs in the internet. Consultado en: <http://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/EMAtlas.html>. Última visita: 23 de junio de 2008.
- Joëls M. 2006. Corticosteroid effects in the brain: U-shape it. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27: 244-250.

- Jöels M, Karst H, DeRijk R, de Kloet ER. 2007. The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. *Trends in Neurosciences*, 31: 1-7.
- Joly J-S, Osório J, Alunni A, Auger H, Kano S, Rétaux S. 2007. Windows of the brain: towards a developmental biology of circumventricular and other neurohemal organs. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 18: 512-524.
- Kalantaridou SN, Zoumakis E, Makrigiannakis A, Godoy H, Chrousos GP. 2007. The role of corticotropin-releasing hormone in blastocyst implantation and early fetal immunotolerance. *Hormone and Metabolic Research*, 39: 474-477.
- Kanazawa H, Ohsawa K, Sasaki Y, Kohsaka S, Imai Y. 2002. Macrophage/microglia-specific protein Iba1 enhances membrane ruffling and Rac activation via phospholipase C- $\gamma$ -dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 20026-20032.
- Kaur C, Dheen ST, Ling E. 2007. From blood to brain: amoeboid microglial cell, a nascent macrophage and its functions in developing brain. *Acta Pharmacologica Sinica*, 28: 1087-1096.
- Kaur C, Ling EA. 2008. Blood brain barrier in hypoxia-ischemic conditions. *Current Neurovascular Research*, 5: 71-81.
- Kaur C, Wu CH, Wen CY, Ling EA. 1994. Studies of the effects of subcutaneous injections of glucocorticoids on amoeboid microglia in postnatal rat brain. *Archives of Histology and Cytology*, 57: 449-459.
- Keegan CE, Hammer GD. 2002. Recent insights into the organogenesis of the adrenal cortex. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 13: 200-208.
- Keller FS, Schoenfeld WN. 1950. *Principles of Psychology*. Nueva York: Appleton-Century Crofts.
- Kim JJ, Diamond DM. 2002. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nature Reviews Neuroscience*, 3: 453-462.
- Kitraki E, Kittas C, Stylianpoulou F. 1997. Glucocorticoid receptor gene expression during rat embryogenesis. An in situ hybridization study. *Differentiation*, 62: 21-31.
- Kiyatkin EA, Sharma HS. 2009. Permeability of the blood-brain barrier depends on brain temperature. *Neuroscience*, 161: 926-939.
- Kniesel U, Risau W, Wolburg H. 1996. Development of blood-brain barrier tight junctions in the rat cortex. *Developmental Brain Research*, 96: 229-240.

- Koenig H, Trout JJ, Goldstone AD, Lu CY. 1992. Capillary NMDA receptors regulate blood-brain barrier function and breakdown. *Brain Research*, 588: 297-303.
- Korosi A, Baram TZ. 2008. The central corticotropin releasing factor system during development and adulthood. *European Journal of Pharmacology*, 583: 204-214.
- Krause D, Faustman PM, Dermietzel R. 2002. Molecular anatomy of the blood-brain barrier in development and aging. En: de Vellis J (Ed.). *Neuroglia in the Aging Brain*. Nueva Jersey: Humana Press, pp. 291-303.
- Kuang F, Wang B-R, Zhang P, Fei L-L, Jia Y, Duan X-L, Xu Z, Li G-L, Jiao X-Y, Ju G. 2004. Extravasation of blood-borne immunoglobulin G through blood-brain barrier during adrenaline-induced transient hypertension in the rat. *International Journal of Neuroscience*, 114: 575-591.
- Ladd CO, Huot RL, Thrivikraman KV, Nemeroff CB, Meaney MJ, Plotsky PM. 2000. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Progress in Brain Research*, 122: 81-103.
- Ladd CO, Huot RL, Thrivikraman KV, Nemeroff CB, Plotsky PM. 2004. Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation. *Biological Psychiatry*, 55: 367-375.
- Lai CH, Kuo KH. 2005. The critical component to establish in vitro BBB model: pericyte. *Brain Research Reviews*, 50: 258-265.
- Lesage J, Blondeau B, Grino M, Breant B, Dupoy JP. 2001. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the newborn rat. *Endocrinology*, 142: 1692-1702.
- Levine S, Dent G, de Kloet ER. 2000. Stress-hyporesponsive period. En: *Encyclopedia of Stress*, vol. 3. Nueva York: Academic Press, pp. 518-526.
- Levine S, Ursin H. 1991. What is stress? En: Brown MR, Koob GF, Rivier C (Eds.). *Stress neurobiology and neuroendocrinology*. Nueva York: Marcel Dekker Inc., pp. 3-21.
- Ling EA. 1976. Some aspects of amoeboid microglia in the corpus callosum and neighboring regions of neonatal rats. *Journal of Anatomy*, 121: 29-45.

- Ling EA. 1982. Influence of cortisone on amoeboid microglia and microglial cells in the corpus callosum in postnatal rats. *Journal of Anatomy*, 134: 705-717.
- Ling EA, Leblond CP. 1973. Investigation of glial cells in semi-thin sections. II. Variations with age in the numbers of the various glial cell types in rat cortex and corpus callosum. *Journal of Comparative Neurology*, 149: 73-82.
- Ling EA, Wong WC. 1993. The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia*, 7: 9-18.
- Ludkiewicz B, Domaradzka-Pytel B, Morys J. 2001. Microglial and astroglial cells in the rat paraclaustral reservoir during postnatal development: an immunohistochemical study. *Acta Neurobiologica Experimental* 61: 35-43.
- Mairesse J, Lesage J, Breton C, Bréant B, Hahn T, Darnaudéry M, Dickson SL, Seckl J, Blondeau B, Vieau D, Maccari S, Viltart O. 2007. Maternal stress alters endocrine function of the fetoplacental unit in rats. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, 292: E1526-E1533.
- Makrigiannakis A, Zoumakis E, Kalantaridou S, Coutifaris C, Margioris AN, Coukos G, Rice KC, Gravanis A, Chrousos GP. 2001. Corticotropin-releasing hormone promotes blastocyst implantation and early maternal tolerance. *Nature Immunology*, 2: 1018-1024.
- Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. 2002. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*, 62: 609-614.
- Martin DL. 1992. Synthesis and release of neuroactive substances by glial cells. *Glia*, 5: 81-94.
- Martin SJ, Clark RE. 2007. The rodent hippocampus and spatial memory: from synapses to systems. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64: 401-431.
- Mato M, Ookawara S, Namiki T. 1989. Studies on the vasculogenesis in rat cerebral cortex. *Anatomical Record*, 224: 355-364.
- Mauch DH, Nögler K, Schumacher S, Göritz C, Müller E-C, Otto A, Pfrieder FW. 2001. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science*, 294: 1354-1357.
- McEwen BS. 1998. Protective and damaging effects of stress mediators. *New England Journal of Medicine*, 338: 171-179.
- McEwen BS, Weiss JM; Schwartz LS. 1969. Uptake of corticosterone by rat brain and its concentration by certain limbic structures. *Brain Research*, 16: 227-241.

McKay SM, Brooks DJ, Hu P, McLachlan EM. 2007. Distinct types of microglial activation in white and grey matter of rat lumbosacral cord after mid-thoracic spinal transaction. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 66: 698-710.

Merriam-Webster's Collegiate Dictionary. 1998. Springfield, Ma: Merriam-Webster Inc.

Mitani F, Mukai K, Miyamoto H, Suetmatsu M, Ishimura Y. 1999. Development of functional zonation in the rat adrenal cortex. *Endocrinology*, 140: 3342-3353.

Molnár Z, Saunders N. 2009. Neurodevelopment and the brain barriers. Working Group Draft Reports, Fifteen Annual Blood-Brain Barrier Consortium Meeting in collaboration with the International Brain Barriers Society. Gleneden Beach, Oregon USA, Marzo 19-21 del 2009.

Morohashi K. 1997. The ontogenesis of the steroidogenic tissues. *Genes and Cells*, 2: 95-106.

Mottola MF, Bagnall KM, Belcastro AN. 1989. Effects of strenuous maternal exercise on fetal organ weights and skeletal muscle development in rats. *Journal of Developmental Physiology*, 11: 115-125

Mulder EJH, Robles de Medina PG, Huizink AC, Van der Bergh BRH, Buitelaar JK, Visser GHA. 2002. Prenatal maternal stress: effects on pregnancy and the (unborn) child. *Early Human Development*, 70: 3-14.

Nag S. 2003a. Morphology and molecular properties of cellular components of normal cerebral vessels. En: Nag S (Ed.). *The Blood-Brain Barrier: Biology and Research Protocols. Methods in Molecular Medicine*, 89: 3-36.

Nag S. 2003b. Blood-brain barrier permeability using tracers and immunohistochemistry. En: Nag S (Ed.). *The Blood-brain barrier: biology and research protocols. Methods in Molecular Medicine*, 89: 133-144.

Nair A, Bonneau RH. 2006. Stress-induced elevation of glucocorticoids increases microglia proliferation through NMDA receptor activation. *Journal of Neuroimmunology*, 171: 72-85.

Nakajima K, Kohsaka S. 1993. Functional roles of microglia in the brain. *Neuroscience Research*, 17: 187-203.

Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. 2003. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends in Neurosciences*, 26: 523-530.

- Nelson RJ. 2000. Stress. En: Nelson RJ (Ed.). An introduction to behavioral endocrinology. Massachusetts: Sinauer Associates Inc., pp. 557-591.
- Neumann ID, Johnstone HA, Hatzinger M, Liebsch G, Shipston M, Russel JA, Landgraf R, Douglas AJ. 1998. Attenuated neuroendocrine responses to emotional and physical stressors in pregnant rats involve adenohipophysial changes. *Journal of Physiology*, 508: 289-300.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308: 1314-1318.
- Nixdorf-Bergweiler BE, Albrecht D, Heinemann U. 1994. Developmental changes in the number, size, and orientation of GFAP-positive cells in the CA1 region of rat hippocampus. *Glia*, 12: 180-195.
- Noble LJ, Mauters AEM, Hall JJ. 1996. Characterization of the microvascular glycocalyx in normal and injured spinal cord in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 376: 542-556.
- Oberheim NA, Takano T, Han X, He W, Lin JHC, Wang F, Xu Q, Wyatt JD, Pilcher W, Ojeman JG, Ransom BR, Goldman SA, Nedergaard M. 2009. Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 29: 3276-3287.
- Ock J, Lee H, Kim S, Lee W-H, Choi D-K, Park EJ, Kim S-H, Kim IK, Suk K. 2006. Induction of microglial apoptosis by corticotropin-releasing hormone. *Journal of Neurochemistry*, 98: 962-972.
- Ohsawa K, Imai Y, Kanazawa H, Sasaki Y, Kohsaka S. 2000. Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *Journal of Cell Science*, 113: 3073-3084.
- Oliveira AO, Fileto C, Melis MS. 2004. Effect of strenuous maternal exercise before and during pregnancy on rat progeny renal function. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37: 907-911.
- Owen D, Andrews MH, Matthews SG. 2005. Maternal adversity, glucocorticoids and programming of neuroendocrine function and behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29: 209-226.
- Pappiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D. 2006. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature*, 443: 700-704.

- Pardridge WM, Mietus LJ. 1979. Regional blood-brain transport of the steroid hormones. *Journal of Neurochemistry*, 33: 579-581.
- Patcher JS, de Vries HE, Fabry Z. 2003. The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 62: 593-604.
- Paxinos G, Watson C. 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press-Elsevier.
- Perry VH, Gordon S. 1988. Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends in Neurosciences*, 11: 273-277.
- Peters A, Palay SL, Webster HF. 1991. Blood vessels. En: Peters A, Palay SL, Webster HF (Eds.). *The fine structure of the nervous system. Neurons and their supporting cells*. Nueva York: Oxford University Press, pp. 344-355.
- Phelps CH. 1972. The development of glio-vascular relationships in the rat spinal cord. *Zeitschrift fur Zellforschung*, 128: 555-563.
- Pollard I. 2007. Neuropharmacology of drugs and alcohol in mother and fetus. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 12: 106-113.
- Pryce CR, Dettling AC, Spengler M, Schnell CR, Feldon J. 2004. Deprivation of parenting disrupts development of homeostatic and reward systems in marmoset monkey offspring. *Biological Psychiatry*, 56: 72-79.
- Raivich G. 2005. Like cops on the beat: the active role of resting microglia. *Trends in Neurosciences*, 28: 571-573.
- Ransom B, Behar T, Nedergaard M. 2003. New roles for astrocytes (stars at last). *Trends in Neurosciences*, 26: 520-522.
- Rapoport SI. 1976. *Blood-Brain Barrier in Physiology and Medicine*. Nueva York: Raven Press, Capítulo III, pp. 43-86.
- Rasband WS. 2005. Image J. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/1997-2005>.
- Raudensky J, Yamamoto BK. 2007. Effects of chronic unpredictable stress and methamphetamine on hippocampal glutamate function. *Brain Research*, 1135 : 129-135.
- Razani B, Woodman SE, Lisanti MP. 2002. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacological Reviews*, 54: 431-467.

Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MAMJ, oude Egbrink MGA. 2007. The endothelial glycocalyx : composition, functions, and visualization. *Pflugers Archive – European Journal of Physiology*, 454 : 345-359.

Riol H, Fages C, Tardy M. 1992. Transcriptional regulation of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-mRNA expression during postnatal development of mouse brain. *Journal of Neuroscience Research*, 32: 79-85.

Risau W. 1991. Induction of blood-brain barrier endothelial cell differentiation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 633: 405-419.

Risau W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386: 671-674.

Risau W, Wolburg H. 1990. Development of the blood-brain barrier. *Trends in Neurosciences*, 13: 174-178.

Robertson PL, Du Bois M, Bowman PD, Goldstein GW. 1985. Angiogenesis in developing rat brain: An *in vivo* and *in vitro* study. *Developmental Brain Research*, 23: 219-223.

Romero IA, Radewicz K, Jubin E, Michel CC, Greenwood J, Couraud P-O, Adamson P. 2003. Changes in cytoskeletal and tight junctional proteins correlate with decreased permeability induced by dexamethasone in cultured rat brain endothelial cells. *Neuroscience Letters*, 344: 112-116.

Roos TB. 1957. Steroid synthesis in embryonic and fetal rat adrenal tissue. *Endocrinology*, 81: 716-728.

Rose C, Ransom BR. 1997. Gap junctions equalize intracellular Na<sup>+</sup> concentrations in astrocytes. *Glia*, 20: 299-307.

Rowan RA, Maxwell DS. 1981. Patterns of vascular sprouting in the postnatal development of the cerebral cortex of the rat. *American Journal of Anatomy*, 160: 247-255.

Sakakibara H, Ishida K, Izawa Y, Minami Y, Saito S, Kawai Y, Butterweck V, Tamaki T, Nakaya Y, Terao J. 2005. Effects of forced swimming stress on rat brain function. *Journal of Medical Investigation* 52: 300-301.

Sánchez MM, Ladd CO, Plotsky PM. 2001. Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: evidence from rodent and primate models. *Development and Psychopathology*, 13: 419-449.



- Sánchez-López AM, Cuadros MA, Calvente R, Tassi M, Marín-Teva JL, Navascués J. 2005. Activation of immature microglia in response to stab wound in embryonic quail retina. *Journal of Comparative Neurology*, 492: 20-33.
- Sapolsky RM, Meaney MJ. 1986. Maturation of the adrenal stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hypo-responsive period. *Brain Research Reviews*, 11: 65-76.
- Satinoff E. 2005. Thermoregulation. En: Whishaw IQ, Kolb B (Eds.). *The behavior of the laboratory rat: a handbook with tests*. Nueva York: Oxford University Press, pp. 226-235.
- Schulze C, Firth JA. 1992. Interendothelial junctions during blood-brain barrier development in the rat: morphological changes at the level of individual tight junctions contacts. *Developmental Brain Research*, 69: 85-95.
- Scott SH. 2004. Optimal feedback control and the neural basis of volitional motor control. *Nature Reviews Neuroscience*, 5: 532-546.
- Seckl JR. 1997. Glucocorticoids, feto-placental 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2, and early life origins of adult disease. *Steroids*, 62: 89-94.
- Seckl JR. 2001. Glucocorticoid programming of the fetus: adult phenotypes and molecular mechanisms. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 185: 61-71.
- Selye H. 1936. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, 138: 32.
- Selye H. 1950. *The physiology and pathology of exposure to stress. A treatise based on the concepts of the general adaptation syndrome and the diseases of adaptation*. Montreal: Acta Inc., pp. 5-51.
- Senjo M, Ishibashi T, Terashima T, Inoue Y. 1986. Correlation between astroglial genesis and blood-brain barrier formation: Immunocytochemical demonstration by using astroglia-specific enzyme glutathione S-transferase. *Neuroscience Letters*, 66: 39-42.
- Sharma HS. 2004. Blood-brain and spinal cord barriers in stress. En: Sharma HS, Westman J (Eds.). *Blood-spinal cord and brain barriers in health and disease*. San Diego: Elsevier, pp. 231-298.
- Sharma HS, Dey PK. 1981. Impairment of blood-brain barrier by immobilization stress: role of serotonin. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 25: 111-122.

Sharma HS, Westman J, Cervós J, Dey PK, Nyberg F. 1996. Probable involvement of serotonin in the increased permeability of the blood-brain barrier by forced swimming. An experimental study using Evans blue and <sup>131</sup>I-sodium tracers in the rat. *Behavioral Brain Research*, 72: 189-196.

Shepro D, Morel NML. 1993. Pericyte physiology. *FASEB Journal*, 7: 1031-1038.

Sidman M. 1960. *Tactics of Scientific Research. Evaluating Experimental Data in Psychology*. Nueva York: Basic Books Inc.

Sims DE. 1986. The pericyte. A review. *Tissue and Cell*, 18: 153-174.

Sinton CM, Fitch TE, Petty F, Haley RW. 2000. Stressful manipulations that elevate corticosterone reduce blood-brain barrier permeability to pyridostigmine in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 165: 99-105.

Škultéjová I, Tokarev D, Ježová D. 1998. Stress-induced increase in blood-brain barrier permeability in control and monosodium glutamate-treated rats. *Brain Research Bulletin*, 45: 175-178.

Slattery DA, Neumann ID. 2008. No stress please! Mechanisms of stress hyporesponsiveness of the maternal brain. *Journal of Physiology*, 586.2: 377-385.

Staud F, Mazancová K, Miksik I, Pávek P, Fendrich Z, Pácha J. 2006. Corticosterone transfer and metabolism in the dually perfused rat placenta: effect of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *Placenta*, 27: 171-180.

Sterling P, Eyer J. 1988. Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. En: Fisher S, Reason J (Eds.). *Handbook of life stress, cognition and health*. Nueva York: John Wiley & Sons, pp. 629-649.

Stewart PA, Hayakawa K. 1987. Interendothelial junctional changes underlie the developmental 'tightening' of the blood-brain barrier. *Developmental Brain Research*, 32: 271-281.

Stewart PA, Hayakawa K. 1994. Early ultrastructural changes in blood-brain barrier vessels of the rat embryo. *Developmental Brain Research*, 78: 25-34.

Stolp HB, Dziegielewska KM, Ek CJ, Habgood MD, Lane MA, Potter AM, Saunders NR. 2005. Breakdown of the blood-brain barrier to proteins in white matter of the developing brain following systemic inflammation. *Cell and Tissue Research*, 320: 369-378.

- Stonestreet BS, Petersson KH, Sadowska GB, Pettigrew KD, Patlak CS. 1999. Antenatal steroids decrease blood-brain barrier permeability in the ovine fetus. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 45: R283-R289.
- Stonestreet BS, Sadowska GB, McKnight AJ, Patlak C, Petersson KH. 2000. Exogenous and endogenous corticosteroids modulate blood-brain barrier development in the ovine fetus. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 279: R468-R477.
- Streit WJ, Kreutzberg GW. 1987. Lectin binding by resting and reactive microglia. *Journal of Neurocytology*, 16: 249-260.
- Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. 1990. Reactive microgliosis. *Progress in Neurobiology*, 57: 563-581.
- Sutanto W, de Kloet ER. 1994. The use of various animal models in the study of stress-related phenomena. *Laboratory Animals*, 28: 293-306.
- Takahashi LK, Turner JG, Kalin NH. 1998. Prolonged stress-induced elevation in plasma corticosterone during pregnancy in the rat: implications for prenatal stress studies. *Psychoneuroendocrinology*, 23: 571-581.
- Tanaka J, Fujita H, Matsuda S, Toku K, Sakanaka M, Maeda N. 1997. Glucocorticoid- and mineralocorticoid receptors in microglial cells: the two receptors mediate differential effects of corticosteroids. *Glia*, 20: 23-37.
- Taniguchi Y, Yasutaka S, Kominami R, Shinohara H. 2002. Proliferation and differentiation of rat anterior pituitary cells. *Anatomy and Embryology*, 206: 1-11.
- Tasker JG, Di S, Malcher-Lopes R. 2006. Rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology* 147: 5549-5556.
- Theoharides TC, Konstantinidou A. 2007. Corticotropin-releasing hormone and the blood-brain barrier. *Frontiers in Bioscience*, 12: 1615-1628.
- Truex RC, Carpenter MB. 1971. *Neuroanatomía humana de Strong y Elwyn*. Mosovich A (Trad.). Buenos Aires: El Ateneo.
- Tseng CY, Ling EA, Wong WC. 1983. Light and electron microscopic and cytochemical identification of amoeboid microglial cells in the brain of prenatal rats. *Journal of Anatomy*, 136: 837-849.

- Tshirgi RD. 1950. Protein complexes and the impermeability of the blood-brain barrier to dyes. *American Journal of Physiology*, 163: 756.
- Ueno M. 2007. Molecular anatomy of the brain endothelial barrier: an overview of the distributional features. *Current Medicinal Chemistry*, 14: 1199-1206.
- Uylings HBM, Van Eden CC, Parnavelas JG, Kalsbeek A. 1990. The prenatal and postnatal development of the rat cerebral cortex. En: Kolb B, Tees RC (Eds.). *The Cerebral Cortex of the Rat*. Massachusetts: MIT, pp. 35-76.
- Vilhardt F. 2005. Microglia: phagocyte and glial cell. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37: 17-21.
- Wada H. 2008. Glucocorticoids: mediators of vertebrate ontogenic transitions. *General and Comparative Endocrinology*, 156: 441-453.
- Wang W, Ji P, Riopelle RJ, Dow KE. 2002. Functional expression of corticotropin-releasing hormone (CRH) receptor 1 in cultured rat microglia. *Journal of Neurochemistry*, 80: 287-294.
- Webster's New World Dictionary of the American Language. 1980. 2<sup>a</sup> Edición. Nueva York: Simon & Schuster.
- Wikipedia. 2009. Glycocalyx. Consulta en: <http://en.wikipedia.org/wiki/Glycocalyx>. Última visita: 8 de enero de 2009.
- Witschi E. 1962. Development: rat. En: Altman PL, Dittmer DS (Eds.). *Growth including reproduction and morphological development*. Washington: Federation of American Societies for Experimental Biology, pp. 304-314.
- Wolff JEA, Guerin C, Laterra J, Bressler J, Indurri RR, Brem H, Goldstein GW. 1993. Dexamethasone reduces vascular density and plasminogen activator activity in 9L rat brain tumors. *Brain Research*, 604: 79-85.
- Wolff JEA, Laterra J, Goldstein GW. 1992. Steroid inhibition of neural microvessel morphogenesis *in vitro*: receptor mediation and astroglial dependence. *Journal of Neurochemistry*, 58: 1023-1032.
- Wu CH, Chien HF, Chang CY, Chen SH, Huang YS. 2001. Response of amoeboid and differentiating ramified microglia to glucocorticoids in postnatal rats: a lectin histochemical and ultrastructural study. *Neuroscience Research*, 40: 235-244.

- Wu CH, Wen CY, Shieh JY, Ling EA. 1992. A quantitative and morphometric study of the transformation of amoeboid microglia into ramified microglia in the developing corpus callosum in rats. *Journal of Anatomy*, 181: 423-430.
- Wu CH, Wen CY, Shieh JY, Ling EA. 1993. A quantitative study of the differentiation of microglial cells in the developing cerebral cortex in rats. *Journal of Anatomy* 182: 403-413.
- Wu CH, Wen CY, Shieh JY, Ling EA. 1994. Down-regulation of membrane glycoprotein in amoeboid microglia transforming into ramified microglia in postnatal rat brain. *Journal of Neurocytology*, 23: 258-269.
- Xu J, Ling EA. 1994. Studies of the distribution and functional roles of transitory amoeboid microglial cells in developing rat brain using exogenous horseradish peroxidase as a marker. *Journal of Brain Research*, 35: 103-111.
- Zagron G, Weinstock M. 2006. Maternal adrenal hormone secretion mediates behavioral alterations induced by prenatal stress in male and female rats. *Behavioural Brain Research*, 175: 323-328.
- Zarrow MX, Phillpot JE, Denenberg VH. 1970. Passage of <sup>14</sup>C-4-corticosterone from the rat mother to the foetus and neonate. *Nature*, 226: 1058-1059.
- Zhou Y, Ling EA, Dheen ST. 2007. Dexamethasone suppresses MCP-1 production via kinase phosphatase-1 dependent inhibition of JNK and p38 MAPK in activated microglia. *Journal of Neurochemistry*, 102: 667-678.
- Ziylan YZ, Lefauconnier JM, Bernard G, Bourre JM. 1989. Regional alterations in blood-to-brain transfer of  $\alpha$ -aminoisobutyric acid and sucrose, after chronic administration and withdrawal of dexamethasone. *Journal of Neurochemistry*, 52: 684-689.
- Zlokovic BV. 2008. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57: 178-201.

## **ANEXO 1: CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DEL COLORANTE AZUL DE EVANS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

En el presente trabajo, la cuantificación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al colorante azul de Evans se realizó mediante la medición de la densidad óptica de cada una de las estructuras nerviosas estudiadas. Tal cuantificación se basa en el supuesto que la magnitud de la tinción del sistema nervioso central tras la administración de azul de Evans y otros colorantes vitales (p.ej. azul tripano) aumenta progresivamente con el paso del tiempo en casos de ruptura de la barrera hematoencefálica; en tales condiciones patológicas, el parénquima nervioso adquiere una coloración azul intensa que aumenta de intensidad de forma progresiva y, la extensión del área afectada por la ruptura de la barrera hematoencefálica es cada vez mayor (tinción azul en regiones más extensas del encéfalo y la médula espinal) (eg. Belova y Jonsson, 1982; Sharma, 2004). Además, existe una relación directa entre la coloración azul del tejido y la cantidad del colorante presente en el tejido (Fry, 1977). Así, con la finalidad de caracterizar la función de la relación entre densidad óptica y concentración del colorante en las condiciones experimentales del proyecto de investigación, se graficó la magnitud del cambio en la densidad óptica en función del aumento progresivo en la concentración del colorante azul de Evans diluido en solución salina.

Las distintas concentraciones del colorante azul de Evans diluidas en 0.5mL de solución salina estéril fueron: 0, 2.5, 5, 10, 50, 100 y 500 $\mu$ g, 1, 5 y 10mg. Las diluciones de azul de Evans se colocaron en una caja de cultivo de 24 pozos, transparente para fotografiarlas con una cámara digital (modelo DSC-S85, Sony). Se obtuvieron dos imágenes de las diluciones de azul de Evans (Figura 1); las imágenes se adquirieron con un fondo blanco bajo condiciones de iluminación artificial similares a las mantenidas durante la adquisición de las fotografías de los encéfalos de las crías a las que se administró azul de Evans. Junto con las diluciones se fotografió una regla milimétrica color blanco. Las imágenes se guardaron como archivos TIFF en formato de color verdadero (RGB), sin manipulación. Para llevar a cabo el análisis de densidad óptica en el programa ImageJ se transformó a escala de grises de 8 bits cada píxel de las imágenes con la siguiente fórmula:

$$\text{GRIS} = 0.299(\text{rojo}) + 0.587(\text{verde}) + 0.114(\text{azul}) \quad (1)$$

Se cuantificó la densidad óptica de un área de  $7\text{mm}^2$  de cada dilución. Se obtuvo el promedio de la densidad óptica de cada dilución en las dos fotografías.

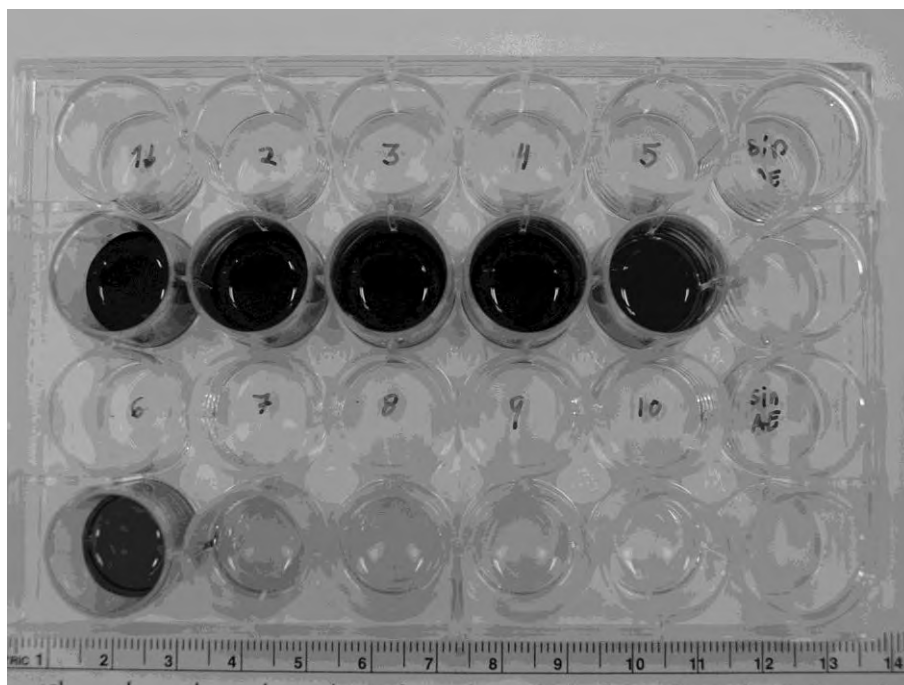


Figura 1. Diluciones seriales de azul de Evans. Las diluciones van de mayor (Pozo 1) a menor concentración de azul de Evans (Pozo 10).

Se asumió que la magnitud de la densidad óptica de la regla milimétrica color blanco permaneció constante en las distintas fotografías, independientemente de posibles variaciones en la luminosidad y de ajustes automáticos en la velocidad de exposición de la cámara digital. Así, se consideró a la densidad óptica de la regla milimétrica como ruido de fondo y se restó de cada una de las densidades ópticas de las distintas diluciones. Como se observa en la Figura 2, la función de la relación de la magnitud de la densidad óptica con la concentración de azul de Evans presenta una forma de “S”, con características lineales en el rango de 0.18 a 2.23 unidades de densidad óptica (correspondientes al rango de 10-500 $\mu\text{g}/0.5\text{mL}$  de concentración de azul de Evans). La cantidad administrada de azul de Evans a las crías se encuentra dentro del rango de la función lineal de la relación entre la densidad óptica y la concentración de azul de Evans; cada cría recibió 80 $\mu\text{g}/\text{g}$  peso corporal de azul de Evans diluido en solución salina por vía intracardiaca. Así se consideró que la

densidad óptica está directamente relacionada con la concentración del colorante azul de Evans.

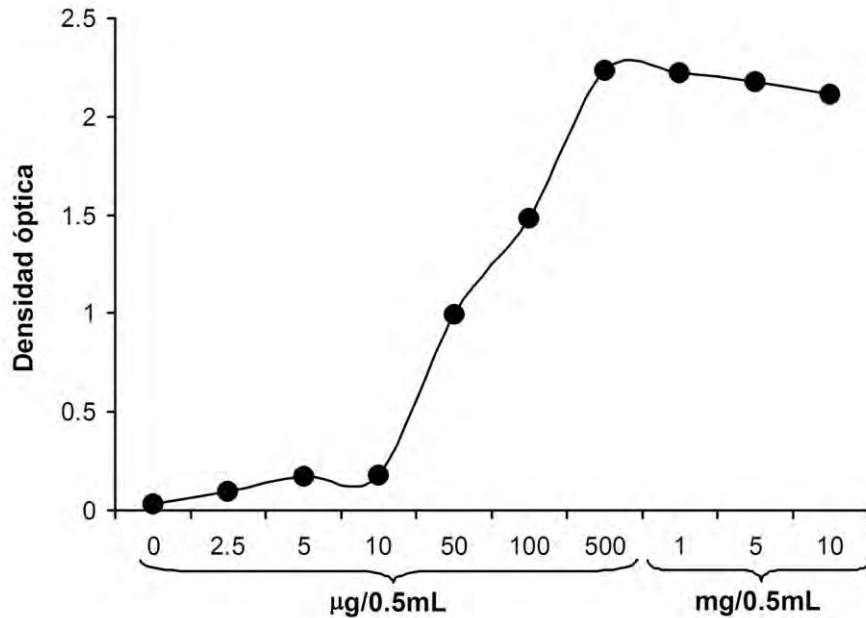


Figura 2. Función de la relación entre densidad óptica y concentración de azul de Evans.

Adicionalmente, con base en el análisis de la densidad óptica Fry (1977) derivó una fórmula empírica para calcular la concentración del colorante azul de Evans en tejido teñido; la cual ha sido empleada por otros (LaMack et al., 2006). De acuerdo con Fry (1977), la cuantificación de la cantidad de colorante presente en un tejido sigue el modelo de reflectancia óptica basado en la Ley de Beer-Lambert de absorción de la luz. En óptica, la Ley de Beer-Lambert es una fórmula empírica que relaciona la absorción de la luz con las propiedades del material a través del cual la luz viaja (Wikipedia, 2007). La ecuación de la Ley de Beer-Lambert es:

$$A = \alpha l c = -\ln (I_1/I_0) \quad (2)$$

donde  $A$  es la absorbancia de la muestra,  $\alpha$  es el coeficiente de absorción del absorbedor ( $\text{cm}^2\text{nmol}^{-1}$ ),  $l$  es la distancia que la luz viaja a través del material,  $c$  es la concentración del absorbedor en el material,  $I_0$  es la intensidad de la luz incidente e  $I_1$  es la intensidad de la luz después de su paso a través del material (Wikipedia, 2007).



En el caso de la aplicación fisiológica de la Ley de Beer-Lambert, Fry (1977) hipotetizó que si la luz es transmitida a través de la superficie de un tejido y luego reflejada desde el tejido, el decremento de la luz que es absorbida por el tejido debería guardar alguna relación con la acumulación del colorante azul de Evans (el absorbedor) en la superficie del tejido. En la Figura 3 se presenta un diagrama del modelo de reflectancia de Fry (1977). La fuente de luz emite un rayo con intensidad  $I_1$  hacia la superficie del tejido teñido y el sensor recibe un rayo con intensidad  $I_4$ . La proporción  $I_4/I_1$  se define como la reflectancia de la superficie; el tejido tiene un espesor específico ( $\delta$ ) y contiene una concentración promedio del colorante ( $c$ ). Como se observa en la Figura 3, la intensidad de la luz que pasa a través de la superficie teñida se reduce de  $I_1$  a  $I_2$  y es reflejada con una intensidad  $I_3$ . La intensidad de la luz reflejada desde el tejido ( $I_3$ ) se reduce nuevamente a su paso por el tejido teñido hasta una intensidad  $I_4$ , que es detectada por el sensor.

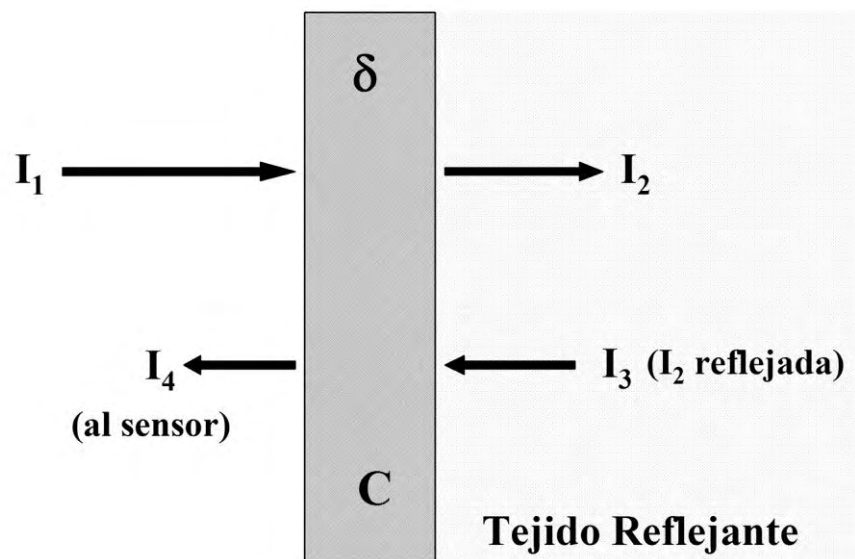


Figura 3. Modelo de reflectancia óptica de Fry (1977).

Para calcular la cantidad del colorante azul de Evans ( $M$ ) por unidad de área en la superficie del tejido ( $\text{nmol}/\text{cm}^2$ ), Fry (1977) desarrolló el modelo empírico:

$$M = 3.92 p + 0.80 p^3 \quad (3)$$

Fry (1977) calculó las constantes de la ecuación 3 con base en una serie de experimentos en los que obtuvo desde el tejido concentraciones conocidas de azul de Evans. Fry (1977)

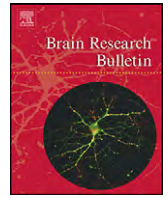
obtuvo el azul de Evans contenido en la superficie de una preparación de la aorta a través de lavados con distintas concentraciones de albúmina, proteína sérica a la que se acopla con gran afinidad el azul de Evans, y en el espectrofotómetro cuantificó la cantidad de azul de Evans. Con el uso del método de mínimos cuadrados Fry (1977) determinó los coeficientes con mejor ajuste. En la ecuación 3  $p$  se define como la absorbencia del tejido teñido y se obtiene directamente con la aplicación de la Ley de Beer-Lambert:

$$p = \ln (I / I_0) \quad (4)$$

donde  $I$  es la densidad óptica del tejido teñido con azul de Evans e  $I_0$  es la densidad óptica del tejido sin teñir. Para que la ecuación 3 sea válida debe mantenerse constante la intensidad de la iluminación incidente en el tejido teñido y sin teñir ( $I_1$ ).

### Referencias

- Belova TI, Jonsson G. 1982. Blood-brain barrier permeability and immobilization stress. *Acta Physiologica Scandinavica*, 116: 21-29.
- Fry DL. 1977. Aortic Evans blue dye accumulation: its measurement and interpretation. *American Journal of Physiology*, 232: H204-H222.
- LaMack JA, Himburg HA, Friedman MH. 2006. Effect of hypercholesterolemia in transendothelial EBD-albumin permeability and lipid accumulation in porcine iliac arteries. *Atherosclerosis*, 184: 255-263.
- Sharma HS. 2004. Blood-brain and spinal cord barriers in stress. En: Sharma HS, Westman J (Eds.). *Blood-spinal cord and brain barriers in health and disease*. San Diego: Elsevier, pp. 231-298.
- Wikipedia. 2007. Beer-Lambert Law. Consulta en: [http://en.wikipedia.org/wiki/Beer-Lambert\\_law](http://en.wikipedia.org/wiki/Beer-Lambert_law) Última visita: 4 de diciembre de 2007.



## Research report

## Altered functional development of the blood–brain barrier after early life stress in the rat

B. Gómez-González<sup>a,b</sup>, A. Escobar<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Department of Cell Biology and Physiology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510, México D.F., Mexico<sup>b</sup> Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510, México D.F., Mexico

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 9 December 2008

Received in revised form 9 May 2009

Accepted 13 May 2009

Available online 20 May 2009

## Keywords:

Evans blue

WGA-HRP

Postnatal stress

Prenatal stress

Blood–brain barrier

Corticosterone

## ABSTRACT

This study investigated the effect of early life stress on blood–brain barrier functional development in an altricial mammal, the Wistar rat. Forced swimming between gestational days 10–20 was used as a stress procedure in pregnant rats. After delivery, half of the control litters underwent 180 min maternal separation from postnatal day 2–20. Controls were kept without any stress manipulations. At sacrifice between postnatal days 1–30 subjects were given intracardiac Evans blue or the lectin wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase (WGA-HRP). Evans blue-stained brain slices were photographed and optical density quantified. WGA-HRP stained brains were processed for ultrastructural analysis. Plasma corticosterone at embryonic day 20 and postnatal days 1, 10, 20 and 30 was quantified by radioimmunoassay. At postnatal day 10, postnatal stress increased Evans blue entry to the neocortex, hippocampus, diencephalon, basal ganglia, olfactory bulb, brain stem, cerebellum, and spinal cord. At postnatal day 20, prenatal stress increased Evans blue concentration in the same regions as those affected after postnatal stress. Between postnatal days 10–20, both stress groups showed increased WGA-HRP caveolae-mediated transport in the hippocampal capillaries. By postnatal day 30, the blood–brain barrier was functionally mature in both control and stressed pups. Plasma corticosterone concentration was higher in pregnant stressed dams as compared to controls. Postnatal stress increased plasma corticosterone at postnatal days 10 and 20. The findings suggest that chronic perinatal stress alters blood–brain barrier functional development by increasing caveolae-mediated transport in brain endothelial cells.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

The blood–brain barrier (BBB) maintains homeostasis of the central nervous system microenvironment [21]. It is a complex cellular system formed by endothelial cells, basal lamina, pericytes, astrocytes and microglia [8,40]; that develops simultaneously with the brain along the perinatal period [10,27,40]. Maturation of the BBB is closely linked to the functional development of each nervous region, since the capillary density matches local function in cortical regions during early life [6]. Vasculogenesis in the neural tube begins on embryonic days 10–11 (E10–E11) in the rat [10], and angiogenesis continues until postnatal day (P) 20 [41]. The first endothelial tight junctions are seen on E16 [27,40]. Astrocytes originate around E16 and extend perivascular processes during the second and third postnatal weeks [11,45]. The basal lamina also matures during the postnatal life; its development ends around the fourth postnatal week [27]. The BBB is also functionally imma-

ture during prenatal and early postnatal life concomitantly with structural immaturity [38]. Any adverse stimulus occurring during the perinatal period might alter the normal developmental process of the BBB. Delayed or defective BBB maturation might compromise the sequence of normal functional development of nervous structures by restricting blood supply to developing neurons with constantly increasing metabolic demands [5]. Moreover, noxious agents circulating in the blood [21] might alter neuronal and glial function with ensuing damage to brain structures essential to learning, memory and movement [38].

Under conditions of acute stress, the BBB permeability of adult mammals is usually increased and exogenous tracers such as Evans blue, trypan blue, and horseradish peroxidase or endogenous serum albumin readily cross the BBB in several central nervous system (CNS) regions [12,22,46,48,50,54]. A few reports in both mature and immature mammals, however, refer to decreased or no change in BBB permeability to tracers given intravenously after acute stress [49,51,52]. For instance in the sheep CNS, decreased BBB permeability to a synthetic amino acid coupled with <sup>14</sup>C was noted after *in utero* exposure to dexamethasone [51,52].

BBB development can be altered by stress hormones, corticotrophin releasing factor [7] and glucocorticoids [25,55]. *In vivo*,

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 5622 3850; fax: +52 55 5622 3850.

E-mail addresses: [bgomezglez@gmail.com](mailto:bgomezglez@gmail.com) (B. Gómez-González), [alesiz@servidor.unam.mx](mailto:alesiz@servidor.unam.mx) (A. Escobar).

dexamethasone administration at 70–80% of gestation term in the sheep delayed capillary tight junction development in fetal lambs [25]. *In vitro*, corticotrophin releasing factor and glucocorticoids exerted inhibitory action on the formation of capillary-like structures in endothelial cell cultures [7,55].

Stress effects on the functional development of the BBB in altricial mammals are not yet known. In adult mammals, the precise effects of stress on BBB function remain a controversial research area [12,22,46,48–50,54]. The experiments here reported are intended to ascertain the effects of perinatal stress, both prenatal and postnatal, on the BBB functional development in the rat.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Subjects

Twenty-six pregnant Wistar rats (200 g), 9 weeks of age at the beginning of the experiment, and their pups (10 per litter) were used. Dams were born and reared in our Institution vivarium. Rats were maintained on a 12-h light/dark cycle (lights on at 07:00 h) with constant temperature (20–22 °C) and humidity (45–55%). Commercial rat chow and tap water were available *ad libitum* to dams and offspring throughout the experiment. All the experiments were approved by the Local Committee on Animal Research and were performed in accordance with the Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research [34].

Each pregnant rat was assigned at random to one of two groups: (I) forced swimming stress group ( $n = 11$ ), and (II) control group ( $n = 15$ ). E0 occurred when the daily vaginal smear contained spermatozooids and typical cornified estrus cells [32]. Pregnant rats were caged in groups of three until E20, day when each rat was caged individually. The day pups were born was considered postnatal day (P) 0. Two days after parturition half of the litters from the control group was randomly assigned to the postnatal stress procedure and the other half remained in their home-cage. Given that gender differences in BBB functioning associate to the sexual maturation-related raise in sex steroids [16,35], both male and female pups were studied in all the experiments.

### 2.2. Materials

A transparent plastic water tank (60 cm × 44 cm × 30 cm) with thermostat was used for the prenatal stress procedure. For the postnatal stress procedure, an incubator (W.C. Heraeus GmbH, RB360, Hanau) and individual carton cages (8 cm × 8 cm × 8 cm) were used. Evans blue (SIGMA, E2129, USA) and the lectin wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase (WGA-HRP, Vector Laboratories, PL-1026, USA) were used to trace development of the BBB. For corticosterone quantification, the Coat-A-Count rat corticosterone radioimmunoassay test kit (Diagnostic Products Corporation, PITKRC-2, USA) was used with a gamma counter (COBRA II, Packard Co., USA). Statistical analyses were performed using SPSS software, version 10.0 for Windows.

### 2.3. Procedure

#### 2.3.1. Prenatal stress (in utero stress)

Prenatal stress consisted of 20 min daily forced swimming in 32 °C water between E10 (the beginning of vasculogenesis) to E20 [10]. Forced swimming in 32 °C water produces a stronger stress response in the adult rat as compared to forced swimming in neutral temperatures (22–25 °C) [2,17]. At the end of the forced swimming session, the pregnant rats were dried gently with a cotton towel and were placed back in their home-cages. Controls were kept in the same environment without stress manipulation.

#### 2.3.2. Postnatal stress

Postnatal stress consisted of 180 min of daily maternal separation [29] from P2 to P20, period encompassing postnatal BBB development. Each day, the postnatal stress procedure began between 09:00 and 10:00 h. Rat pups suckle every 2–3 h during the light period [3,23]; for that reason care was taken to begin maternal deprivation immediately after the end of a suckling session. Usually within 5–10 min following the pups' return to the nest the dam began to nurse them. In order to avoid body temperature fluctuations in the maternally deprived pups, they were maintained in an incubator at the normal nest temperature (32 °C) from P2 to P14, and at 24 °C from P15 to P20, the age at which rat pups become capable of thermoregulation [44].

#### 2.3.3. Quantification of Evans blue entry through the BBB

Evans blue was diluted at 2% in normal sterile saline solution (0.9%) [33]. On P1, P10, P20 and P30, pups of stressed and control groups ( $n = 4–5$  per group, total = 49 pups) were anesthetized with *ip.* sodium pentobarbital (0.063 g/kg body weight). A 5–8 mm thoracic incision was done on the left side of each pup, the heart was partially exposed, and 0.4 mL/100 g body weight of 2% Evans blue solution (equivalent to 8 mg/100 g body weight) was given intracardially in the left ventricle [33]. During a 10-min period pups remained deeply anesthetized and were maintained

warm in an incubator, the heart beating continued uninterruptedly and the respiratory rate slightly slowed. At the end of that period, pups were perfused with 4% paraformaldehyde in 0.1 M saline-phosphate buffer during 5 min. To avoid intralitter variation, only two pups per litter were used for the quantification of Evans blue entry through the BBB at each age.

Intraperitoneal administration of 2% Evans blue (2.5 mL/100 g body weight) was performed in another control group at same ages: P1, P10, P20, and P30 ( $n = 3–4$  pups per age, total = 13 pups) in order to control for possible effects of hypoxia induced by opening the thoracic cage. After 8 h, the pups were sacrificed as previously stated.

Brains from all subjects were removed, weighed and fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in 0.1 M saline-phosphate buffer. During post-fixation, brains were stored at 4 °C. After 24 h specimens were hand-sectioned in 2 mm thick coronal or sagittal slices. Sections were photographed without magnification together with a white millimeter scale using a Sony digital camera (model DSC-S85, Sony, USA) under the same artificial light conditions. Images were quantitatively analyzed for optical density with the ImageJ software, version 1.32j [39]. The optical density of Evans blue-stained tissue was related to Evans blue concentration [24,30] in regions of interest defined using landmarks of Paxinos and Watson [36] for 10-, 20- and 30-day old pups; and data from Altman and Bayer [4] for 1-day old pups. In all the photographs the assumption was done that the optical density of the white millimeter scale remained independent of the intensity of incident illumination, and therefore the optical density of the millimeter scale was taken as background noise and subtracted from the optical density of each region of interest. Moreover, a two-way ANOVA test (experimental condition × age) revealed no significant differences in the background optical density between stressed (prenatal or postnatal) and control groups at any of the ages studied ( $F(4,111) = 1.82, p = 0.12$ ).

Mean values of the optical density were calculated for the structures identified in more than one slice of the same brain. In a previously validated study, Fry [24] derived an empirical relationship between the amount of Evans blue per unit area ( $M$ , nmol/cm<sup>2</sup>) and the optical density (OD):  $M = 3.92p + 0.80p^3$ . Where  $p$  is the optical absorbance obtained as follow:  $p = -\ln(\text{OD stained tissue}/\text{OD unstained tissue})$ . To obtain the optical density of unstained brain tissue, additional stressed and control pups at each age ( $n = 3$ ) were sacrificed without Evans blue administration. The mean optical density for each of the brain regions studied was obtained and the data used in calculations of mean Evans blue concentration for stressed and control pups.

To show that Evans blue accumulated inside the brain parenchyma and that the optical density quantified in the brain did not solely reflect the possible Evans blue remnants in the vessel wall after perfusion, 50 μm brain coronal slides were obtained on a freezing microtome for one subject of each experimental condition at each age studied (P1, P10, P20 and P30). These sections were observed in the microscope using fluorescence optics with excitation at 546 nm and emission at 575–640 nm (Carl Zeiss, AxioImager.A1, Germany). The 50 μm slides were photographed using a digital camera (Carl Zeiss, AxioCam MRC, Germany) and the AxioVision software, version 4.6.3 (Carl Zeiss, Germany).

#### 2.3.4. Ultrastructure of the BBB

On P10 and P20, one pup of each group (total = 6 pups) was anesthetized with *ip.* sodium pentobarbital (0.050 g/kg body weight). A 5–8 mm thoracic incision was done on the left side of each pup, the heart was partially exposed, and 10 μg/g body weight of WGA-HRP diluted in normal sterile saline solution (0.9%) was given intracardially in the left ventricle [9]. During a 10-min period pups remained anesthetized and were kept warm in an incubator, the heart beating and the respiratory rate continued uninterruptedly. At the end of that period, pups were perfused with normal saline solution (0.9%) during 5–8 min, followed by Karnovsky fixative (2% glutaraldehyde, 2% formaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.4) during 10 min.

Brains were removed, hand-sectioned in 1–2 mm thick coronal slices and fixed by immersion in Karnovsky fixative during 2 h at 4 °C. After that period, slices containing the hippocampus were rinsed thoroughly in sodium cacodylate buffer and cut into 300 μm thick sections on a vibratome. Peroxidase activity was visualized by incubating the sections in 3,3'-diaminobenzidine (20 mg/10 mL) diluted in tris buffer (0.05 M, pH 7.3) with 0.02% hydrogen peroxide. Sections were rinsed in sodium cacodylate buffer; a 1 mm × 1 mm × 300 μm block containing the CA1, dentate gyrus and *stratum radiatum* of the hippocampus was obtained. The block was post-fixed in 1% osmium tetroxide in Zetterqvist-buffered saline solution, dehydrated in a graded series of ethanol and embedded in Epon 812. Ultrathin sections were post-stained with heavy metals and observed under a JEOL electron microscope (JEM-1010).

#### 2.3.5. Plasma corticosterone quantification

On E20 pregnant rats from control and stress groups were sacrificed by rapid decapitation and trunk blood was collected in order to quantify plasma corticosterone. Pregnant rats from the stress group were sacrificed 5 min after the end of the stress procedure (forced swimming). Six to eight pups per group at P1, P10, P20 and P30 (total = 81 pups) were also sacrificed to obtain trunk blood. To avoid intralitter variation, only two pups per litter were used for the plasma corticosterone quantification at each age. Given the low quantity of trunk blood obtained from pups at P1 and P10, the trunk blood from same condition subjects was pooled for each of the five ages studied. To prevent the effects of corticosterone circadian rhythm, all subjects were decapitated at 12:00 h. Blood samples were collected in ice-cooled tubes containing the clot activator/Z, centrifuged at 6000 rpm for 15 min and the supernatant

**Table 1**  
Body weight and brain weight in control and stress groups (mean  $\pm$  SEM).

	Age	Body weight (g)	Brain weight (g)	Evans blue ic (mL)
Control	1	6.89 $\pm$ 0.24	0.3 $\pm$ 0.017	0.023 $\pm$ 0.003
	10	20.71 $\pm$ 1.03	1.023 $\pm$ 0.047	0.085 $\pm$ 0.002
	20	46.14 $\pm$ 2.50	1.516 $\pm$ 0.031	0.193 $\pm$ 0.003
	30	99.62 $\pm$ 6.88	1.79 $\pm$ 0.036	0.410 $\pm$ 0.045
Prenatal stress	1	6.72 $\pm$ 0.39	0.326 $\pm$ 0.010	0.023 $\pm$ 0.003
	10	23.51 $\pm$ 1.19	1.053 $\pm$ 0.014	0.095 $\pm$ 0.005
	20	46.96 $\pm$ 1.99	1.566 $\pm$ 0.024	0.187 $\pm$ 0.011
	30	104.36 $\pm$ 6.50	1.795 $\pm$ 0.042	0.415 $\pm$ 0.035
Postnatal stress	10	19.32 $\pm$ 0.33	1.063 $\pm$ 0.051	0.072 $\pm$ 0.002
	20	45.25 $\pm$ 3.32	1.528 $\pm$ 0.031	0.193 $\pm$ 0.014
	30	90.85 $\pm$ 6.50	1.775 $\pm$ 0.029	0.333 $\pm$ 0.006

In all comparisons the significance was  $p > 0.05$ .

plasma was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until further processing. Plasma corticosterone concentration was quantified by radioimmunoassay using the  $^{125}\text{I}$  rat corticosterone as a marker, following the instructions of the manufacturer. Briefly, 50  $\mu\text{L}$  plasma was incubated with  $^{125}\text{I}$  rat corticosterone in plain polypropylene tubes during 2 h at room temperature, followed by rapid decantation and removal of moisture. Controls included uncoated polypropylene tubes and nonspecific binding tubes (total counts). Tube radioactivity was counted during 1 min in a gamma counter, the kit used was able to detect as little as 5.7 ng/mL of plasma corticosterone concentration.

### 2.3.6. Statistical analyses

The statistical test used to compare the differences between the stress and the control groups in BBB functional development was a mixed ANOVA test [15,28]; using as within-subjects factor the nervous regions of interest and as between-subjects factors the experimental condition and age [26]. The Huynh–Feldt epsilon was applied to the degrees of freedom to account for violation of the sphericity assumption in all the mixed ANOVA test [26]. Other statistical analyses done included two-way ANOVA tests (experimental condition  $\times$  age) for body weight, brain weight and plasma corticosterone concentration. A mixed ANOVA test was also used to compare the effects of Evans blue administration (intracardiac versus intraperitoneal) on CNS blue staining in the control group, using as within-subjects factors, the nervous regions of interest and as between-subjects factors, the administration procedure and the age. In order to prove specific differences in the Evans blue leakage between each stress group and the control group at each age, orthogonal contrast codes ( $C_1$ ) were done for the significant ANOVA tests, contrast coefficients of 1 and  $-1$  were assigned to the stress (prenatal or postnatal) groups and control group, respectively; for each test of the coefficient contrast the alpha level was maintained at 0.05.

## 3. Results

### 3.1. Body weight and brain weight

Body weight and brain weight were the same in both stressed and control groups; a two-way ANOVA (experimental condition  $\times$  age) revealed no significant differences between stressed and control pups at any of the ages studied (body weight:  $F(5,48) = 0.64$ ,  $p = 0.66$ ; brain weight:  $F(5,48) = 0.21$ ,  $p = 0.95$ ) (Table 1).

### 3.2. Plasma corticosterone levels

Stress during gestation increased 400% plasma corticosterone levels in dams 2 days prior to delivery. At E20, pregnant rats subjected to stress since E10, had a plasma corticosterone concentration of 1552 ng/mL in pooled samples taken 5 min after the end of the last swimming session; corticosterone concentration was 332 ng/mL in pooled samples from control pregnant rats at the same gestation day.

The ANOVA tests showed the mean plasma corticosterone concentration was significantly different between stressed and control groups (experimental condition  $\times$  age,  $F(3,8) = 80.85$ ,  $p < 0.01$ ). Plasma corticosterone concentration increased by 63% in 1-day old pups exposed to prenatal stress as compared to controls (Table 2) ( $C_1$ ,  $p > 0.05$ ). By 10 and 20 days of age, only postnatally stressed pups showed a pronounced increase in plasma corticosterone

( $C_1$ ,  $p < 0.001$ ); meanwhile 10- and 20-day old prenatally stressed pups presented a similar low level of plasma corticosterone as controls ( $C_1$ ,  $p > 0.05$ ). At P1, P10 and P20 both stressed (prenatal or postnatal) and control groups showed lower net values of plasma corticosterone concentration than the corticosterone values observed in pregnant adult rats (332 ng/mL in the control pregnant rats and 94–723 ng/mL in the kit reference range), likely due to a stress hypo-responsive period [43]. By P30, control levels approximated the adult levels of plasma corticosterone; but prenatally and postnatally stressed pups continued to show values of plasma corticosterone similar to those found during the stress hypo-responsive period (Table 2).

### 3.3. Stress effects on Evans blue entry through the BBB

Evans blue intensely dyed control brain regions that normally lack a BBB such as the circumventricular organs, and lightly dyed the neocortex, hippocampus, subcortical nuclei, cerebellum and brain stem (Figs. 1 and 2).

Both prenatal and postnatal stress increased significantly Evans blue entry in several CNS regions; the mixed ANOVA showed that the interaction experimental condition  $\times$  age  $\times$  brain region was significant ( $F(42.14,227.59) = 1.90$ ,  $p < 0.01$ ). At P1, prenatal stress and control groups showed similar Evans blue leakage in every region studied (Figs. 1 and 2). At P10, changes in Evans blue penetration to the CNS were observed only in the postnatal stress group; meanwhile prenatal stress group did not differ from controls in the blue staining of almost every region studied at that age (P10). As shown in Figs. 1–3, 10-day old postnatally stressed pups presented an increased Evans blue entry through the BBB in the whole neocortex, including the cingulate gyrus, orbitofrontal, entorhinal, insular, motor, somatosensory, visual, and auditory cortices as compared to controls ( $C_1$ ,  $p < 0.01$ ). Postnatally stressed

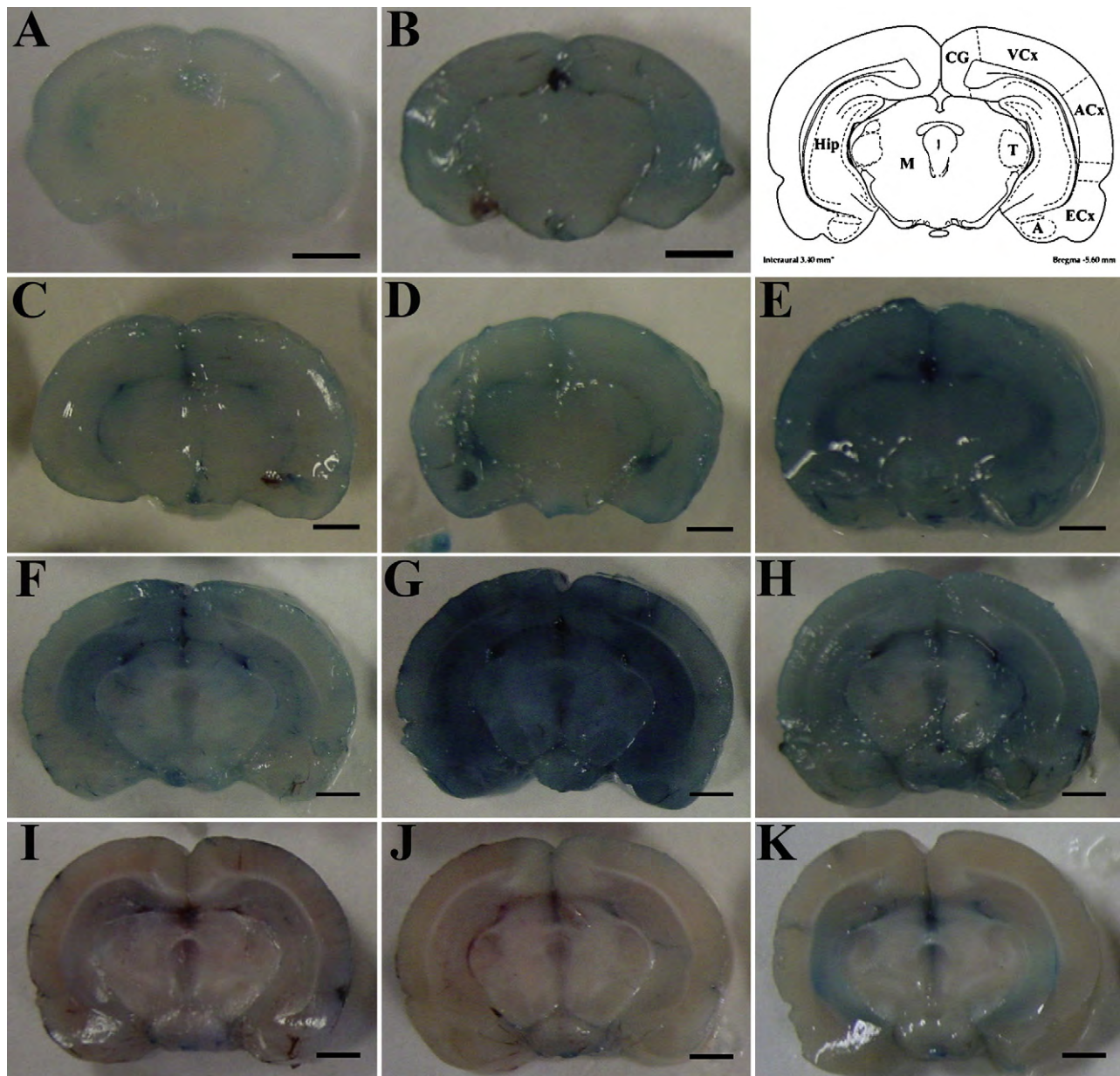
**Table 2**

Plasma corticosterone concentration in control and stress groups (mean  $\pm$  SEM).

	Age	Corticosterone (ng/mL)
Control	1	46.65 $\pm$ 14.91
	10	6.03 $\pm$ 2.27
	20	19.54 $\pm$ 8.45
	30	97.71 $\pm$ 25.55
Prenatal stress	1	76.48 $\pm$ 14.91
	10	8.40 $\pm$ 3.23
	20	30.82 $\pm$ 12.39
	30	28.28 $\pm$ 25.55
Postnatal stress	10	22.66 $\pm$ 4.60*
	20	193.39 $\pm$ 1.03*
	30	15.44 $\pm$ 25.55

\* Significant differences as compared to same age controls ( $p < 0.05$ ).





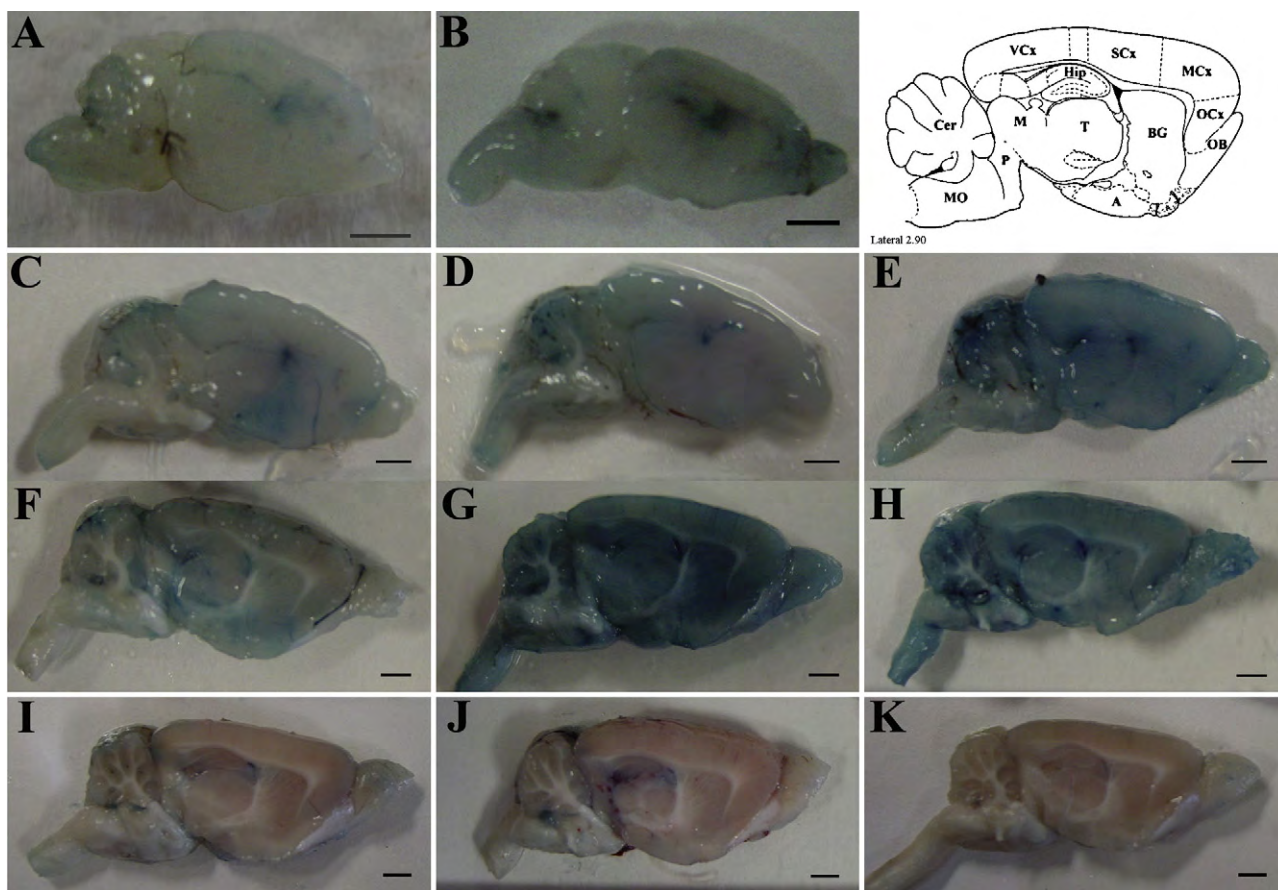
**Fig. 1.** Brain coronal slices showing Evans blue leakage in stress and control groups. Control group at P1 (A), P10 (C), P20 (F) and P30 (I). Prenatally stressed pups at P1 (B), P10 (D), P20 (G) and P30 (J). Postnatally stressed pups at P10 (E), P20 (H) and P30 (K). Abbreviations: A = amygdala, ACx = auditory cortex, CG = cingulate gyrus, ECx = entorhinal cortex, Hip = hippocampus, M = midbrain, T = thalamus, VCx = visual cortex. Based on plate 42 (Bregma – 5.60 mm) from [36] for P10–P30 and plate coronal 18 from [4] for P1. Scale bar: 2 mm.

P10 pups also showed significantly increased dye entry in the hippocampus (Fig. 4), thalamus, hypothalamus, basal ganglia, olfactory bulb, midbrain, pons, medulla oblongata, cerebellum, and cervical spinal cord as compared to same age control pups ( $C_1$ ,  $p < 0.01$ ) (Figs. 1, 2 and 5).

The adverse effects of prenatal stress on BBB functional development were observed until P20, when Evans blue entry was significantly increased in the cingulate gyrus, auditory, motor, and visual cortices of prenatal stressed pups (Figs. 1–3) ( $C_1$ ,  $p < 0.05$ ). At P20, prenatal stress also increased Evans blue entry in the hippocampus (Fig. 4), septum, basal ganglia, thalamus, hypothalamus, midbrain, pons, cerebellum, and cervical spinal cord in comparison with same age controls ( $C_1$ ,  $p < 0.05$ ) (Figs. 1, 2 and 5). However, at 20 days of age, the postnatal stress group did not differ significantly from controls in any neuroanatomic region (Figs. 1 and 2). As shown

in Figs. 1–5, by 30 days of age, CNS dye entry diminished drastically in all subjects; indicating BBB maturation in both stressed and control pups.

The significant differences found in the optical density comparison between stressed and control groups were preserved when Evans blue surface concentration data were analyzed with the mixed ANOVA test ( $F(27.04,155.52) = 2.03$ ,  $p < 0.01$ ). The mean Evans blue surface concentration was significantly higher at P10 in the neocortex, hippocampus, diencephalon, basal ganglia, and brain stem of the postnatal stress group as compared to the same age control group (Table 3). At P20 the prenatal stress group presented a significant increase in the mean Evans blue concentration as compared to controls in the neocortex, hippocampus, diencephalon, basal ganglia, brain stem, and cerebellum (Table 3).



**Fig. 2.** Brain sagittal slices showing Evans blue entry through the BBB in stress and control groups from P1 to P30. Control group at P1 (A), P10 (C), P20 (F) and P30 (I). Prenatally stressed pups at P1 (B), P10 (D), P20 (G) and P30 (J). Postnatally stressed pups at P10 (E), P20 (H) and P30 (K). Abbreviations: BG = basal ganglia, Cer = cerebellum, MCx = motor cortex, MO = medulla oblongata, OB = olfactory bulb, OCx = orbitofrontal cortex, P = pons, SCx = somatosensory cortex. Based on plate 85 (Lateral 2.90) from [36] for P10–P30 and plate sagittal 6 from [4] for P1. Scale bar: 2 mm.

Fluorescence microscopy revealed that in the stressed pups Evans blue readily accumulated inside the brain parenchyma at all ages studied, with low residual dye in the brain vessel network (Fig. 6B). As shown in Fig. 6, the brain parenchyma, in this case the hippocampus of a 10-day old postnatally stressed pup (Fig. 6B), presented a homogeneous red fluorescence as compared to same age controls (Fig. 6A). In controls, given the low Evans blue concentration inside the brain parenchyma (see Table 3), the red fluorescence was undetectable (Fig. 6A). The same pattern of intense red fluorescence of the postnatally stressed pup was observed in the brain parenchyma of a 20-day old prenatally stressed pup (not shown); meanwhile no red fluorescence was observed in the control pups

(e.g. Fig. 6A) and in the stressed pups at ages without significant increases in Evans blue entry through the BBB.

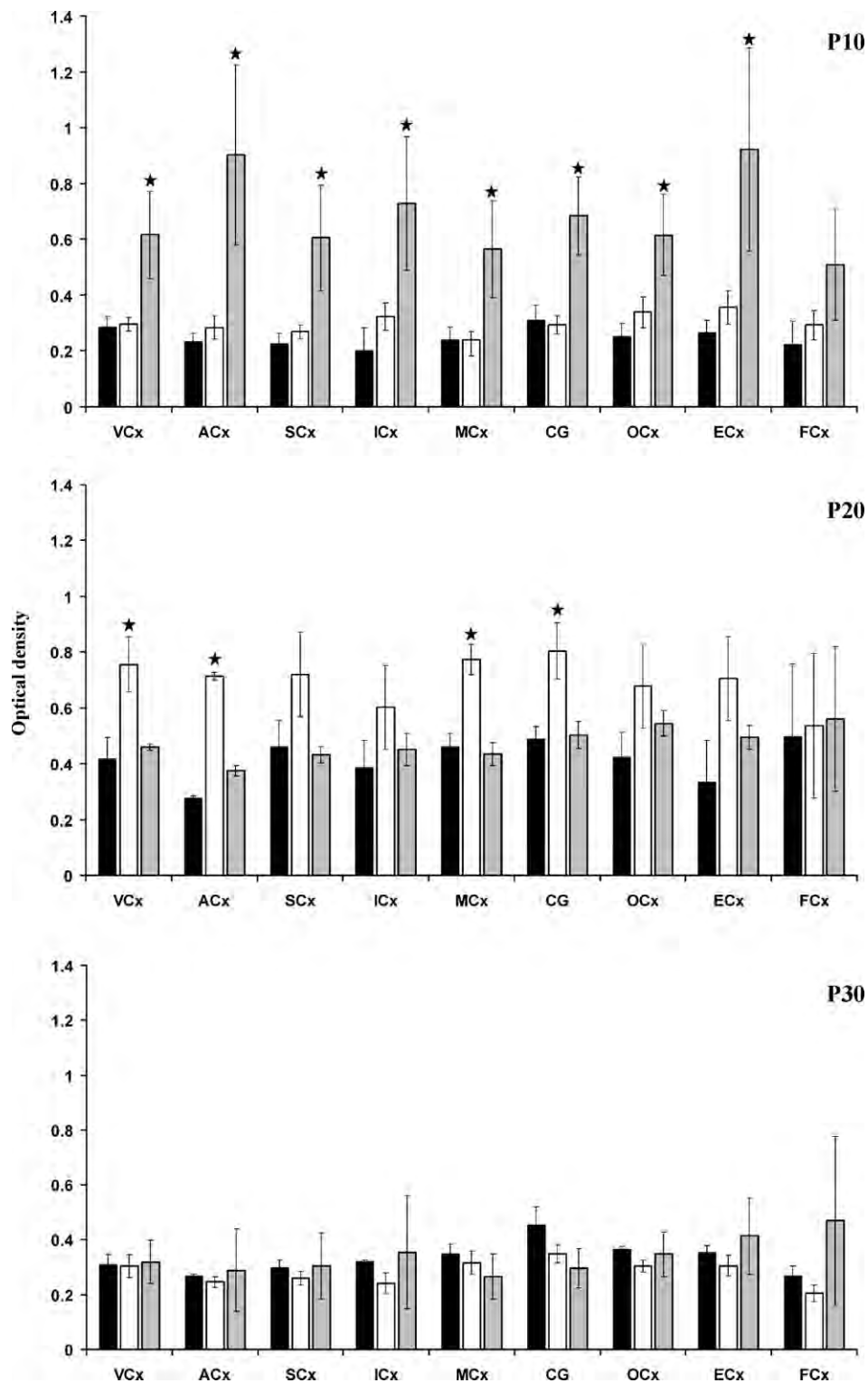
### 3.4. Ultrastructure of the BBB

Both stressed and control pups presented WGA-HRP reaction in the microvessel luminal surface and endocytosed by caveolae inside the endothelial cells. Ten- and twenty-day old stressed pups, both prenatal and postnatal, showed increased caveolae-mediated transport of the lectin WGA-HRP throughout the hippocampal endothelial cells as compared to same age controls (Fig. 7). In some microvessel profiles (<10  $\mu\text{m}$  diameter) caveolae containing

**Table 3**  
Mean Evans blue concentration (nmol/cm<sup>2</sup>) in each nervous region of interest in control and stress groups (mean  $\pm$  SEM).

	Age	Neocortex	Hippocampus	Diencephalon	Brain stem	Cerebellum	Basal ganglia
Control	10	6.614 $\pm$ 1.203	6.428 $\pm$ 0.941	4.531 $\pm$ 0.443	4.440 $\pm$ 0.457	7.640 $\pm$ 0.805	4.421 $\pm$ 0.524
	20	5.464 $\pm$ 0.962	3.814 $\pm$ 1.178	3.316 $\pm$ 0.769	2.357 $\pm$ 1.199	4.713 $\pm$ 1.571	3.068 $\pm$ 0.499
	30	2.624 $\pm$ 0.330	2.734 $\pm$ 0.662	2.642 $\pm$ 0.453	2.773 $\pm$ 0.292	4.955 $\pm$ 0.870	1.607 $\pm$ 0.236
Prenatal stress	10	8.531 $\pm$ 1.301	6.362 $\pm$ 0.750	4.622 $\pm$ 0.815	5.117 $\pm$ 0.335	8.785 $\pm$ 1.063	5.637 $\pm$ 0.828
	20	9.287 $\pm$ 0.498*	8.716 $\pm$ 1.346*	7.410 $\pm$ 1.639*	6.243 $\pm$ 1.176*	8.944 $\pm$ 1.199*	7.652 $\pm$ 1.227*
	30	1.802 $\pm$ 0.451	2.179 $\pm$ 0.259	1.659 $\pm$ 0.524	1.731 $\pm$ 0.603	3.013 $\pm$ 1.155	1.130 $\pm$ 0.310
Postnatal stress	10	14.983 $\pm$ 3.776*	14.352 $\pm$ 2.634*	11.201 $\pm$ 2.511*	9.570 $\pm$ 2.413*	11.999 $\pm$ 2.173	12.741 $\pm$ 3.660*
	20	5.611 $\pm$ 0.352	5.905 $\pm$ 0.856	4.814 $\pm$ 0.797	5.206 $\pm$ 0.819	7.317 $\pm$ 0.788	3.759 $\pm$ 0.258
	30	2.324 $\pm$ 1.351	2.537 $\pm$ 0.944	1.866 $\pm$ 1.263	2.208 $\pm$ 1.082	4.104 $\pm$ 1.642	2.557 $\pm$ 1.455

\* Significant differences as compared to same age controls ( $p < 0.05$ ).



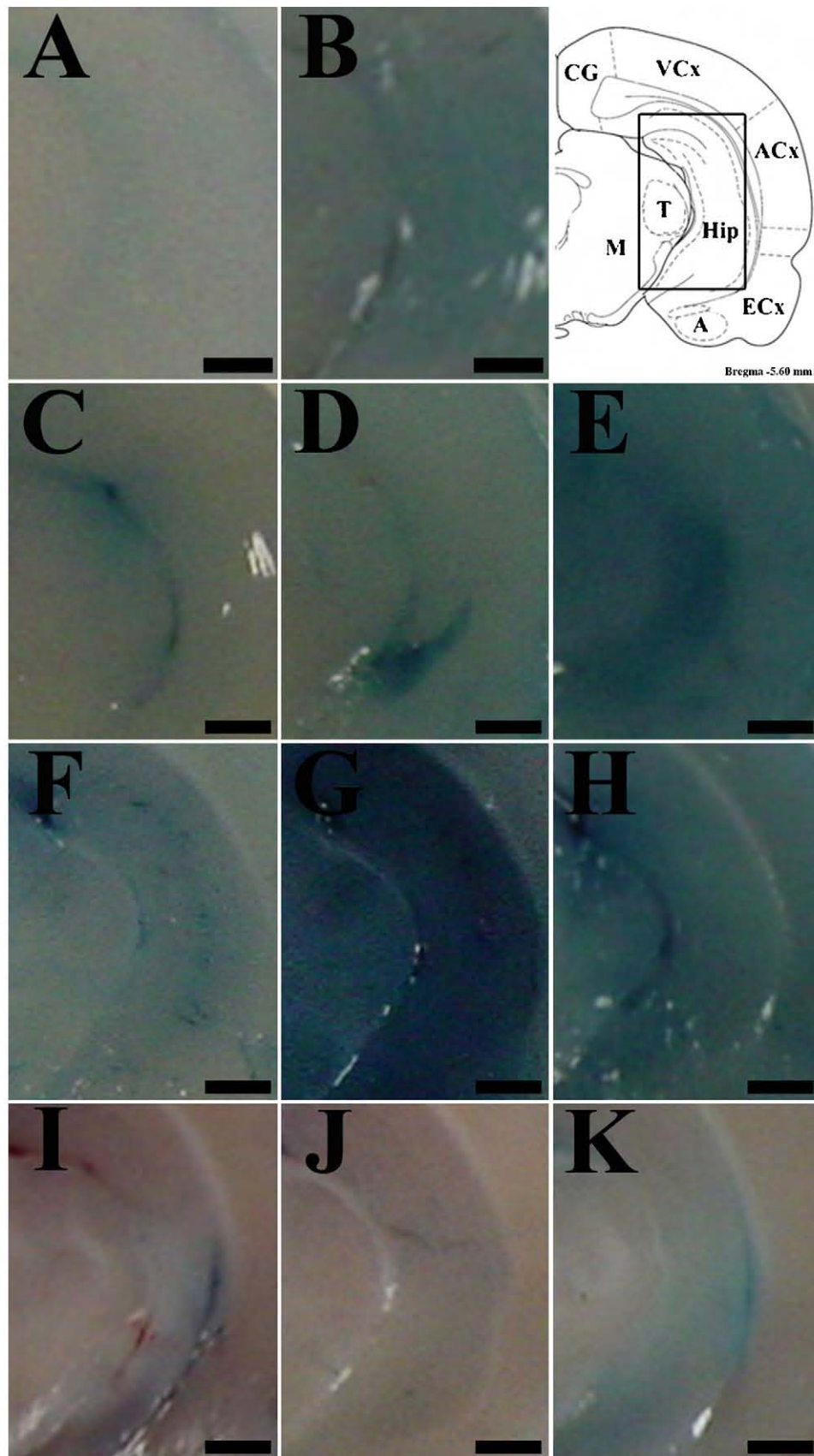
**Fig. 3.** Neocortical Evans blue staining in control and stress groups. Graphs show the optical density values in neocortical regions studied in the prenatal stress (white bars), postnatal stress (gray bars) and control group (black bars) at P10, P20 and P30 (mean  $\pm$  SEM). \*Significant differences as compared to controls ( $p < 0.05$ ). Abbreviations as previously stated except: FCx=frontal cortex, ICx=insular cortex.

WGA-HRP were seen as  $\Omega$ -shaped cell-surface invaginations in the luminal wall (Fig. 7C, E and F), as detached plasmalemmal vesicles near the luminal wall or in the proximity of the abluminal surface of the endothelial cells (Fig. 7E). Fenestrations were not observed at any of the studied ages, P10 and P20, nor was WGA-HRP seen occupying the entire length of the endothelial tight junctions in stressed or control pups (data not shown).

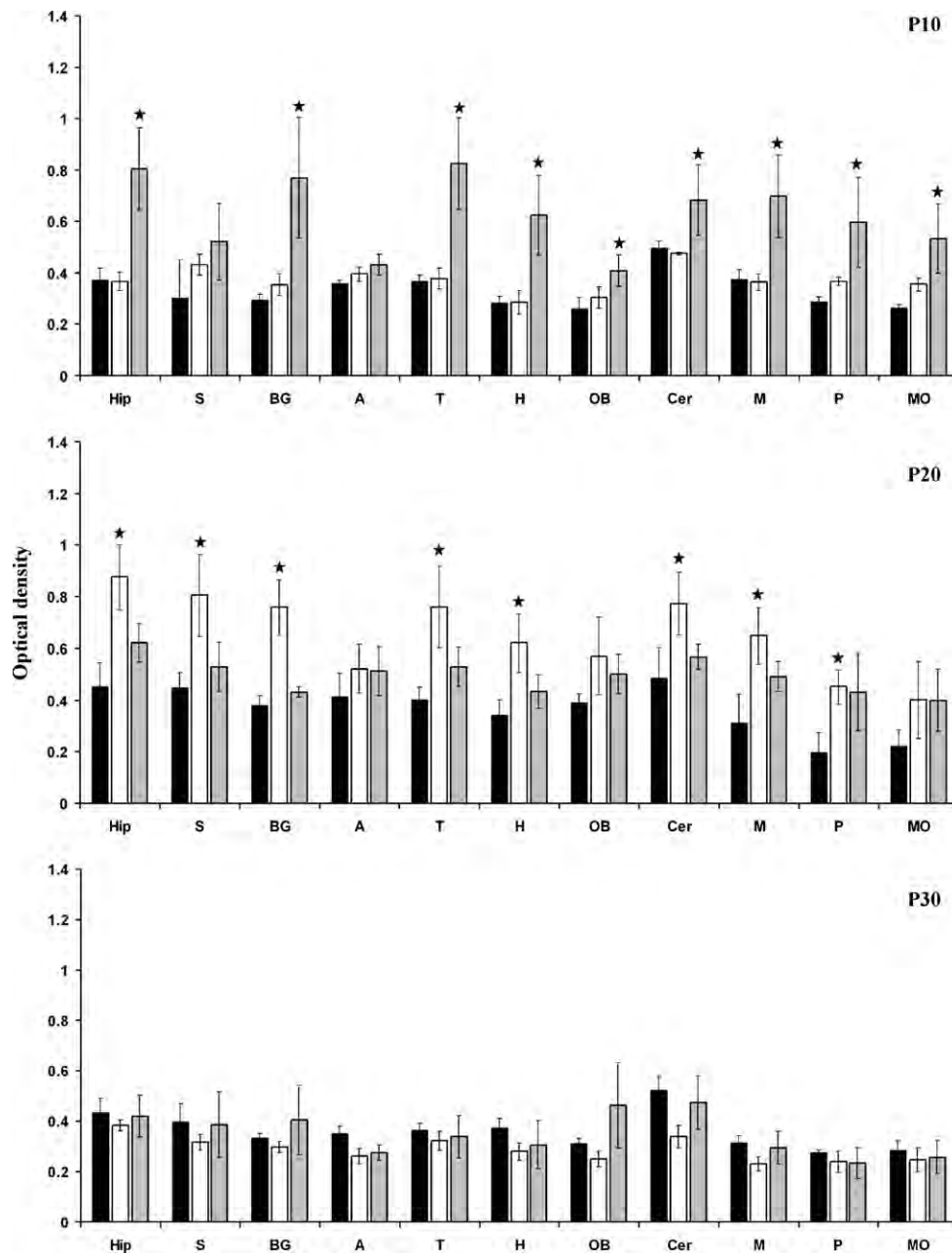
### 3.5. Intracardiac versus intraperitoneal administration of Evans blue in the control group

In controls, there was no significant difference in the blue staining in the neuroanatomic regions at any of the ages studied ( $F(23.21,139.30)=1.29$ ,  $p=0.18$ ) that could be attributed to intracardiac versus intraperitoneal administration of the dye





**Fig. 4.** Evans blue leakage in the hippocampus of stressed and control pups. Photographs show higher magnification of the hippocampal region in Fig. 1. Control group at P1 (A), P10 (C), P20 (F) and P30 (I). Prenatally stressed pups at P1 (B), P10 (D), P20 (G) and P30 (J). Postnatally stressed pups at P10 (E), P20 (H) and P30 (K). Abbreviations as previously stated. Scale bar: 1 mm.



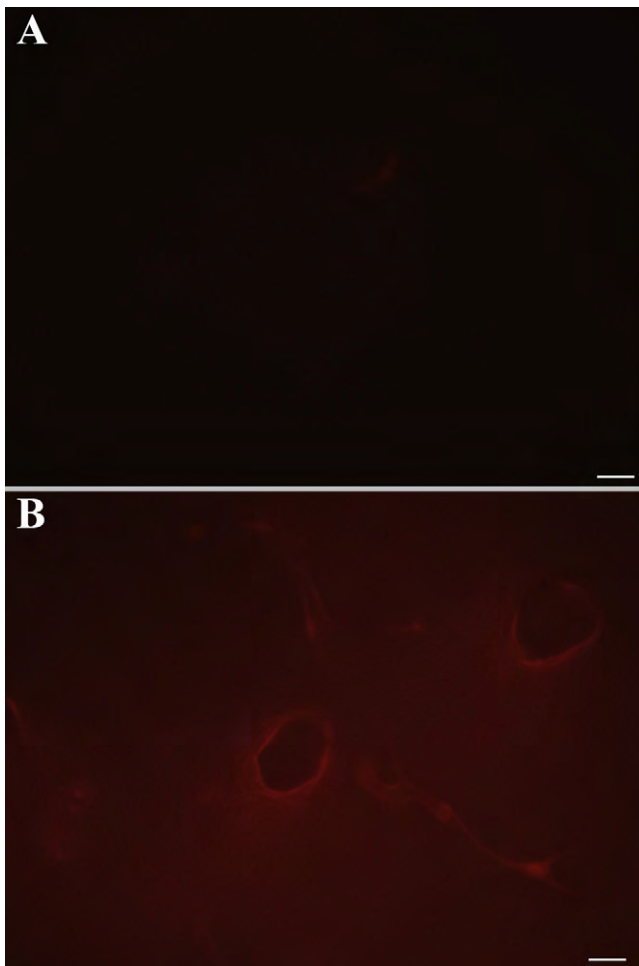
**Fig. 5.** Optical density values in the hippocampus, subcortical nuclei, brain stem and cerebellum of stressed and control subjects from P10 to P30. Prenatal stress appears as white bars, postnatal stress as gray bars, and control group as black bars (mean  $\pm$  SEM). \*Significant differences as compared to same age controls ( $p < 0.05$ ). Abbreviations as previously stated except: H = hypothalamus, S = septum.

(Supplementary Figure 1). Although hypoxia is known to influence BBB transvascular transport of Evans blue, hypoxic effects were similar in stressed and control pups because the two groups underwent similar procedures as outlined in Section 2. Thus the possibility that hypoxia might have contributed to the observed stress effects on BBB permeability was nil.

#### 4. Discussion

This study investigated the effects of early life stress (prenatal or postnatal) on the functional development of the BBB in an altricial mammal, the Wistar rat. At P20 several cortical regions (cingulate gyrus, motor, auditory, and visual cortices, hippocampus and cerebellar cortex) and subcortical structures (septum, thalamus, hypothalamus, basal ganglia, brain stem and cervical spinal cord)

showed increased Evans blue leakage after prenatal stress as compared to controls. Postnatal stress at P10 also led to increased Evans blue entry in areas similar to those affected in prenatal stress, in addition to the olfactory bulb, entorhinal, orbitofrontal, insular, and somatosensory cortices. At both ages (P10 in postnatally stressed pups and P20 in prenatally stressed pups) Evans blue accumulated at higher concentrations in the brain parenchyma of chronically stressed pups as compared to same age controls regardless of the prenatal or postnatal timing of the stress. Early life stress, both prenatal and postnatal, increased WGA-HRP caveolae-mediated transport in the hippocampal microvessels at P10 and P20. Delay in maturation of the BBB could allow additional molecules deleterious to the CNS (e.g. high glutamate and potassium levels) [21] to enter the developing CNS and alter neuronal and glial function with subsequent damage to multiple brain regions.



**Fig. 6.** Evans blue distribution in the hippocampus in 10-day old postnatally stressed and control pups. Fluorescence optics photomicrographs of the hippocampus in the control (A) and postnatal stress groups (B). Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ .

Evans blue is a dye which binds to serum albumin protein; thus Evans blue leakage in the central nervous system indicates increased transvascular transport of albumin and other macromolecules such as lipoproteins, globulin and fibrinogen [24,33]. The lectin WGA-HRP binds to sialic acid and *N*-acetylglucosamine oligosaccharides on the plasmalemma and enters endothelial cells within caveolae [9]. Passage of the lectin WGA-HRP throughout the BBB is slightly faster than albumin and albumin-bound tracers [9]; therefore the increase of WGA-HRP caveolae-mediated transport in P10-prenatally stressed pups and in P20-postnatally stressed pups as compared to the reduced BBB permeability to Evans blue at those specific group  $\times$  age conditions, may indicate a higher affinity of the electrodense tracer for caveolae-mediated transport as compared to Evans blue inclusive at those conditions of reduced Evans blue leakage.

It is known that the stress induced effects upon BBB permeability are not modified by the pentobarbital anesthesia used before the intracardiac administration of the Evans blue tracer [46,47]. However, some reports indicate that pentobarbital anesthesia may have protective effects on BBB under conditions of increased permeability; for instance, in the rat, sodium pentobarbital administration before BBB opening by hyperosmolar mannitol prevented leakage of a synthetic amino acid coupled to  $^{14}\text{C}$  in the neocortex [20]. Therefore, pentobarbital anesthesia in our stressed and control pups could have reduced Evans blue leakage in all groups resulting in an underestimation of stress effects upon BBB permeability. Addi-

tionally, there was no difference in staining of the central nervous system using intracardiac or intraperitoneal administration of the Evans blue tracer indicating that any hypoxia that might be related to opening of the thoracic cage, did not affect BBB permeability.

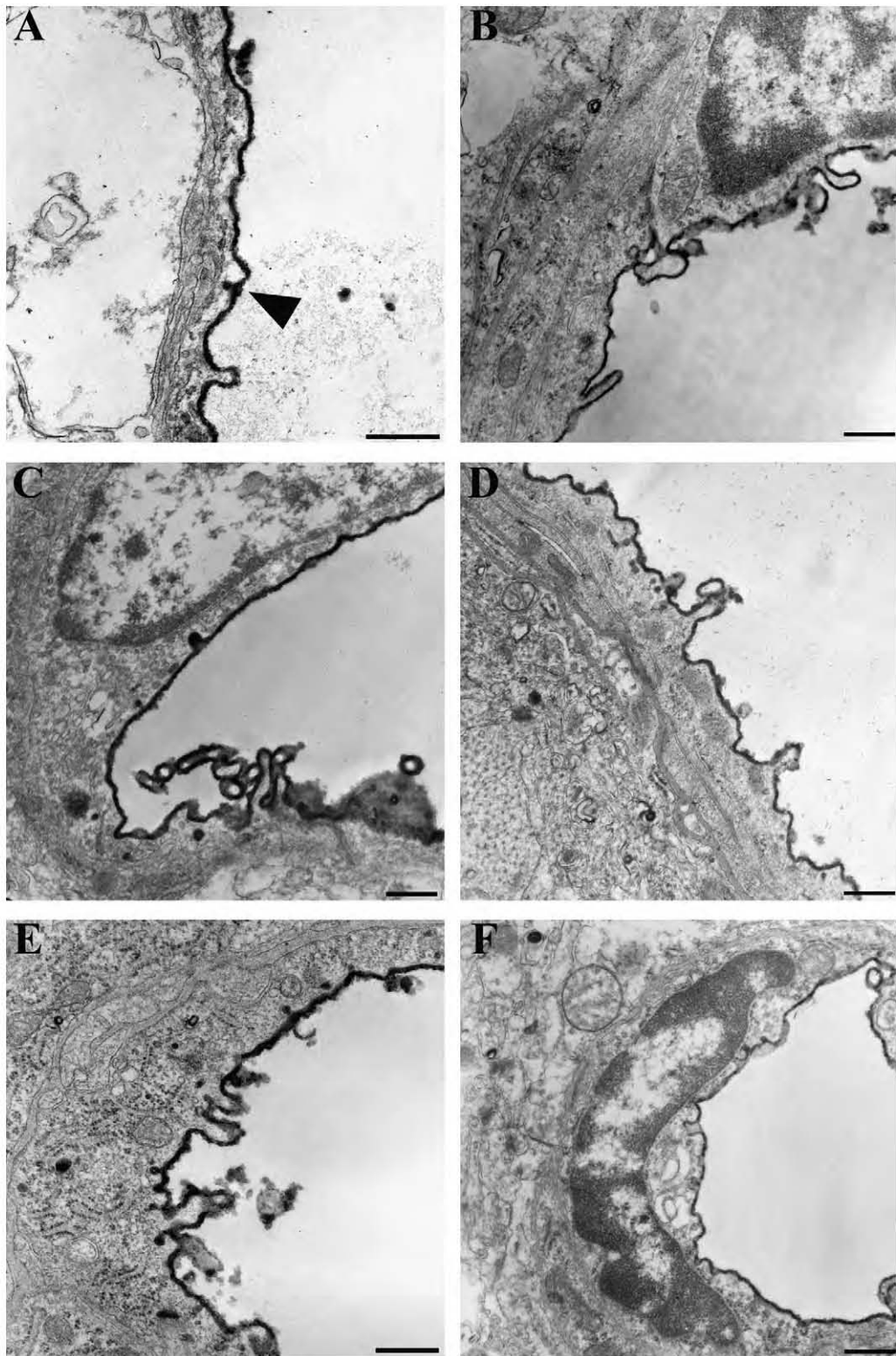
It is important to make clear what mechanisms may be involved in the BBB delayed development induced by stress. In our study, stress during gestation greatly increased plasma corticosteroid levels in the pregnant dams. In rodents, corticosterone is able to cross the placental barrier [56], because the mRNA 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression decreases dramatically in the labyrinth zone of the placenta (the major site of maternal/fetal exchange) since E16 [18] with ensuing increases in fetal plasma corticosterone [56]. Moreover, maternal stress exposure during the last 11 gestation days produces a greater reduction in the placental mRNA 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression [31]. Therefore, in our subjects, corticosterone could enter the fetal circulation and bind to both high and low affinity glucocorticoid receptors expressed in endothelial cells, astrocytes and microglia, the BBB cellular components [14,53,55]. Plasma corticosterone rose to high levels in pups undergoing postnatal stress at P10 and P20 indicating that the stress procedure used (maternal deprivation) did induce a stress response that may be involved in BBB functional development. Other workers have noted that epinephrine and corticotrophin releasing factor increase BBB permeability in adult rodents subjected to acute stress [1,54] hence, it is possible that other non-steroidal stress hormones could have influenced our findings as well.

Similar findings of increased dye leakage through the BBB have been reported in adult animals subjected to acute stress by forced swimming, immobilization and heat exposure [12,22,46,48,50,54] in similar neuroanatomic regions as we report herein in the prenatal or postnatal stress groups. Also, Huang et al. [25] showed that repeated betamethasone administration at 70–80% of gestation term delayed the normal capillary tight junction development in the fetal lamb. Moreover, *in vitro* experiments in which corticotrophin releasing factor or glucocorticoids were added to endothelial cell cultures (with or without astrocytes), provided evidence that stress hormones alter BBB development by inhibiting the formation of capillary-like structures [7,55].

Paradoxically, some *in vitro* experiments with primary cultures of brain microvascular endothelial cells indicate that glucocorticoids may improve the barrier properties of the established monolayer by decreasing permeability to tracers such as fluorescein, increasing transendothelial electric resistance, and increasing the expression of occludin, VE-cadherin, and ZO-1, proteins constituents of the endothelial tight junction [13,19,42]. Also, contrary to our findings in both stress groups, Stonestreet et al. [51,52] demonstrated that dexamethasone administration at 60–80% of gestation term decreased BBB permeability to a synthetic amino acid coupled to  $^{14}\text{C}$  in the neocortex, hippocampus, caudate nucleus, thalamus, cerebellum, midbrain superior colliculus, pons, medulla oblongata and cervical spinal cord of the newborn sheep. In the adult sheep Ziylan et al. [57] also found that chronic dexamethasone treatment reduced entry through the BBB of  $\alpha$ -aminoisobutyric acid, the same synthetic amino acid used by Stonestreet et al. [51,52].

Taken into account our findings and the above cited studies, glucocorticoids released during early life stress or exogenously administered glucocorticoids during the BBB maturation period may influence adversely both morphological and functional BBB development, by delaying angiogenesis [55], endothelial tight junction formation [25] or by drastically increasing transvascular transport of macromolecules that normally are hindered from the brain inclusive during early postnatal development (low Evans blue leakage in the control group). Meanwhile in the completely developed BBB the glucocorticoid effects on BBB function remain a





**Fig. 7.** Ultrastructure of the BBB in the hippocampus of the control and stress groups. (A, C and E) Hippocampal microvessel profiles of 10-day old control (A), prenatally stressed (C) and postnatally stressed (E) pups. (B, D and F) Hippocampal microvessel profiles of 20-day old control (B), prenatally stressed (D) and postnatally stressed (F) pups. In (A) the arrowhead shows WGA-HRP caveolae-mediated transport. Scale bar: 500 nm.

controversial research area. Some reports indicate that exogenous glucocorticoid administration improve the barrier properties of the BBB [13,19,42,49,51,52,57]; while others found that acute stress exposure, with the concomitant rise in glucocorticoids, adrenalin and corticotrophin releasing factor, wanes the BBB by increasing macromolecules leakage [12,22,46,48,54].

In conclusion, chronic perinatal stress (prenatal and postnatal) exerted adverse effects on BBB functional development; the mechanism includes increased transvascular transport mediated by caveolae. The stress effects upon BBB could affect important neural developing processes (that are occurring during the period of Evans blue leakage-induced by stress), such as neurogenesis,

myelination, and synaptogenesis [37], since direct exposure to blood-borne products can induce neuronal and glial damage [38]. Moreover, some of the cellular components of the BBB would be more vulnerable to the adverse stress effects than others depending on the timing of the stress exposure.

### Acknowledgement

Supported by research grant PAPIIT IN219407 from DGAPA, UNAM to A Escobar and stipend 188838 from CONACyT to B Gómez-González.

To Prof. Dr. Karen M. Weidenheim, M.D., Chief of the Division of Neuropathology, Montefiore Medical Center, for the correction of the English language and for her valuable comments on the final version of the manuscript.

To Dr. Carolina Escobar Briones and Roberto Salgado for their valuable technical assistance and guidance with the radioimmunoassay technique.

To Dr. Horacio Merchant Larios for his valuable technical assistance and guidance with the electron microscopy technique.

To Alejandro Marmolejo and José Guadalupe Baltazar for their valuable technical assistance with tissue processing and film development for the electron microscopy.

To Dr. Carolina Escobar Briones and Dr. Gabriela Morali de la Brena for their valuable comments and help in clarifying ideas on the text of the manuscript.

To Jorge Ruiz for the guidance with the statistical tests and to Guadalupe Flores Cruz for the revision of the final version of the manuscript.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.brainresbull.2009.05.012.

### References

- [1] A. Abdul-Rahman, N. Dahlgren, B.B. Johansson, B.K. Siesjö, Increase in local cerebral blood flow induced by circulating adrenaline: involvement of blood-brain barrier dysfunction, *Acta Physiol. Scand.* 107 (1979) 227–232.
- [2] E.L. Abel, Physiological correlates of the forced swim test in rats, *Physiol. Behav.* 54 (1993) 309–317.
- [3] J.R. Alberts, *Infancy*, in: I.Q. Whishaw, B. Kolb (Eds.), *The Behavior of Laboratory Rat: A Handbook with Tests*, Oxford University Press, New York, 2005, pp. 226–235.
- [4] J. Altman, S.A. Bayer, *Atlas of prenatal rat brain development*, CRC Press, Boca Raton, 1995.
- [5] E.G. Argandoña, H. Bengoetxea, J.V. Lafuente, Lack of experience mediated differences in the immunohistochemical expression of blood-brain barrier markers (EBA and GluT-1) during the postnatal development of the rat visual cortex, *Dev. Brain Res.* 156 (2005) 158–166.
- [6] E.G. Argandoña, J.V. Lafuente, Effects of dark-rearing on the vascularization of the developmental rat visual cortex, *Brain Res.* 732 (1996) 43–51.
- [7] T.C. Bale, F.J. Giordano, R.P. Hickey, Y. Huang, A.K. Nath, K.L. Peterson, W.V. Vale, K.-F. Lee, Corticotrophin-releasing factor receptor 2 is a tonic suppressor of vascularization, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (2002) 7734–7739.
- [8] P. Ballabh, A. Braun, M. Nedergaard, The blood-brain barrier: an overview. Structure, regulation, and clinical implications, *Neurobiol. Dis.* 16 (2004) 1–13.
- [9] W.A. Banks, R.D. Broadwell, Blood to brain and brain to blood passage of native horseradish peroxidase, wheat germ agglutinin, and albumin: pharmacokinetic and morphological assessments, *J. Neurochem.* 62 (1994) 2404–2419.
- [10] T. Bär, The vascular system of the cerebral cortex, *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 59 (1980) 1–62.
- [11] T. Bär, J.R. Wolff, Development and adult variations of the wall of brain capillaries in the neocortex of rat and cat, in: J. Cervós-Navarro, E. Betz, F. Matakas, et al. (Eds.), *The Cerebral Vessel Wall*, Raven Press, New York, 1976, pp. 1–6.
- [12] T.I. Belova, G. Jonsson, Blood-brain barrier permeability and immobilization stress, *Acta Physiol. Scand.* 116 (1982) 21–29.
- [13] K.G. Blecharz, D. Drenckhahn, C.Y. Förster, Glucocorticoids increase VE-cadherin expression and cause cytoskeletal rearrangements in murine brain endothelial cEND cells, *J. Cer. Blood Flow Met.* 28 (2008) 1139–1149.
- [14] M.C. Bohn, E. Howard, U. Vielkind, Z. Krowsky, Glial cells express both mineralocorticoid and glucocorticoid receptors, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 40 (1991) 105–111.
- [15] G.E.P. Box, J.S. Hunter, W.G. Hunter, *Statistics for Experimenters. Design, Innovation, and Discovery*, Wiley-Interscience, New-Jersey, 2005.
- [16] R.W. Brown, *Adolescence*, in: I.Q. Whishaw, B. Kolb (Eds.), *The Behavior of Laboratory Rat: A Handbook with Tests*, Oxford University Press, New York, 2005, pp. 278–286.
- [17] C.A. Bruner, I. Vargas, The activity of rats in a swimming situation as a function of water temperature, *Physiol. Behav.* 55 (1994) 21–28.
- [18] P.J. Burton, R.E. Smith, Z.S. Krozowski, B.J. Waddell, Zonal distribution of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 messenger ribonucleic acid expression in the rat placenta and deciduas during late pregnancy, *Biol. Reprod.* 55 (1996) 1023–1028.
- [19] A.R. Calabria, C. Weidenfeller, A.R. Jones, H.E. de Vries, Puromycin-purified rat brain microvascular endothelial cell cultures exhibit improved barrier properties in response to glucocorticoid induction, *J. Neurochem.* 97 (2006) 922–933.
- [20] O.Z. Chi, T.W. Chun, X. Liu, H.R. Weiss, The effects of pentobarbital on blood-brain barrier disruption caused by intracarotid injection of hyperosmolar mannitol in rats, *Anesth. Analg.* 86 (1998) 1230–1235.
- [21] R.A. Fishman, *Blood-brain barrier*, in: R.A. Fishman (Ed.), *Cerebrospinal Fluid in Diseases of the Nervous System*, Saunders, Philadelphia, 1990, pp. 43–62.
- [22] A. Friedman, D. Kauffer, J. Shemer, I. Hendler, H. Soreq, I. Tur-Kaspa, Pyridostigmine brain penetration under stress enhances neuronal excitability and induces early immediate transcriptional response, *Nat. Med.* 2 (1996) 1382–1385.
- [23] M.I. Friedman, Effects of milk consumption and deprivation on body fluids of suckling rats, *Physiol. Behav.* 23 (1979) 1029–1033.
- [24] D.L. Fry, Aortic Evans blue dye accumulation: its measurement and interpretation, *Am. J. Physiol.* 232 (1977) H204–H222.
- [25] W.L. Huang, C.G. Harper, S.F. Evans, J.P. Newnham, S.A. Dunlop, Repeated prenatal corticosteroid administration delays astrocyte and capillary tight junction maturation in fetal sheep, *Int. J. Dev. Neurosci.* 19 (2001) 487–493.
- [26] S.W. Huck, *Fully repeated measures analyses of variance*, in: S.W. Huck (Ed.), *Reading Statistics and Research*, Longman, New York, 2000, pp. 467–500.
- [27] D. Krause, P.M. Faustman, R. Dermietzel, Molecular anatomy of the blood-brain barrier in development and aging, in: J. de Vellis (Ed.), *Neuroglia in the Aging Brain*, Humana Press, New Jersey, 2002, pp. 291–303.
- [28] M. Kristensen, T. Hansen, Statistical analyses of repeated measures in physiological research: a tutorial, *Adv. Physiol. Educ.* 28 (2004) 2–14.
- [29] C.O. Ladd, R.L. Huot, K.V. Thirvikraman, C.B. Nemeroff, P.M. Plotsky, Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation, *Biol. Psychiatry* 55 (2004) 367–375.
- [30] J.A. LaMack, H.A. Himgburg, H.M. Friedman, Effect of hypercholesterolemia in transendothelial EBD-albumin permeability and lipid accumulation in porcine iliac arteries, *Atherosclerosis* 184 (2006) 255–263.
- [31] J. Mairesse, J. Lesage, C. Breton, B. Bréant, T. Hahn, M. Darnaudéry, S.L. Dickson, J. Seckl, B. Blondeau, D. Vleau, S. Maccari, O. Viltart, Maternal stress alters endocrine function of the fetoplacental unit in rats, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292 (2007) E1526–E1533.
- [32] F.K. Marcondes, F.J. Bianchi, A.P. Tanno, Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations, *Braz. J. Biol.* 62 (2002) 609–614.
- [33] S. Nag, Blood-brain barrier permeability using tracers and immunohistochemistry, *Meth. Mol. Med.* 89 (2003) 133–144.
- [34] NRC (National Research Council), *Guidelines for the care and use of mammals in neuroscience and behavioral research*, The National Academies Press, Washington DC, 2003.
- [35] B. Öztaş, H. Koçak, P. Öner, M. Küçük, Sex-dependent changes in blood-brain barrier permeability and brain Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase activity in rats following acute water intoxication, *J. Neurosci.* 62 (2000) 750–753.
- [36] G. Paxinos, C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press-Elsevier, San Diego, 1998.
- [37] M.S. Rao, M. Jacobson, *Developmental Neurobiology*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2005.
- [38] S.I. Rapoport, Sites and functions of the blood-brain barrier, in: S.I. Rapoport (Ed.), *Blood-Brain Barrier in Physiology and Medicine*, Raven Press, New York, 1976, pp. 43–86.
- [39] W.S. Rasband, ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 2005, available at: <http://rsb.info.nih.gov/ij/> 1997–2005.
- [40] W. Risau, Induction of blood-brain barrier endothelial cell differentiation, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 633 (1991) 405–419.
- [41] P.L. Robertson, M. du Bois, P.D. Bowman, G.W. Goldstein, Angiogenesis in developing rat brain: an in vivo and in vitro study, *Dev. Brain Res.* 23 (1985) 219–223.
- [42] I.A. Romero, K. Radewicz, E. Jubin, C.C. Michel, J. Greenwood, P.-O. Couraud, P. Adamson, Changes in cytoskeletal and tight junctional proteins correlate with decreased permeability induced by dexamethasone in cultured rat brain endothelial cells, *Neurosci. Lett.* 344 (2003) 112–116.
- [43] R.M. Sapolsky, M.J. Meaney, Maturation of the adrenal stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period, *Brain Res. Rev.* 11 (1986) 65–76.
- [44] E. Satinoff, Thermoregulation, in: I.Q. Whishaw, B. Kolb (Eds.), *The Behavior of Laboratory Rat: A Handbook with Tests*, Oxford University Press, New York, 2005, pp. 226–235.
- [45] M. Senjo, T. Ishibashi, T. Terashima, Y. Inoue, Correlation between astrogliogenesis and blood-brain barrier formation: Immunocytochemical demonstration by using astroglia-specific enzyme glutathione S-transferase, *Neurosci. Lett.* 66 (1986) 39–42.

- [46] H.S. Sharma, Blood-brain and spinal cord barriers in stress, in: H.S. Sharma, J. Westman (Eds.), *Blood-Spinal Cord and Brain Barriers in Health and Disease*, Elsevier, San Diego, 2004, pp. 231–298.
- [47] H.S. Sharma, P.K. Dey, Impairment of blood-brain barrier by immobilization stress: role of serotonin, *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 25 (1981) 111–122.
- [48] H.S. Sharma, J. Westman, J. Cervós, P.K. Dey, F. Nyberg, Probable involvement of serotonin in the increased permeability of the blood-brain barrier by forced swimming. An experimental study using Evans blue and <sup>131</sup>I-sodium tracers in the rat, *Behav. Brain Res.* 72 (1996) 189–196.
- [49] C.M. Sinton, T.E. Fitch, F. Petty, R.W. Haley, Stressful manipulations that elevate corticosterone reduce blood-brain barrier permeability to pyridostigmine in the rat, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 165 (2000) 99–105.
- [50] I. Škultétyová, D. Tokarev, D. Ježová, Stress-induced increase in blood-brain barrier permeability in control and monosodium glutamate-treated rats, *Brain Res. Bull.* 45 (1998) 175–178.
- [51] B.S. Stonestreet, K.H. Petersson, G.B. Sadowska, K.D. Pettigrew, C.S. Patlak, Antenatal steroids decrease blood-brain barrier permeability in the ovine fetus, *Am. J. Physiol. Reg. Integr. Comp. Physiol.* 45 (1999) R283–R289.
- [52] B.S. Stonestreet, G.B. Sadowska, A.J. McKnight, C. Patlak, K.H. Petersson, Exogenous and endogenous corticosteroids modulate blood-brain barrier development in the ovine fetus, *Am. J. Physiol. Reg. Integr. Comp. Physiol.* 279 (2000) R468–R477.
- [53] J. Tanaka, H. Fujita, S. Matsuda, K. Toku, M. Sakanaka, N. Maeda, Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in microglial cells: the two receptors mediate differential effects of corticosteroids, *Glia* 20 (1997) 23–37.
- [54] T.C. Theoharides, A. Konstantinidou, Corticotropin-releasing hormone and the blood-brain barrier, *Front. Biosci.* 12 (2007) 1615–1628.
- [55] J.E.A. Wolff, J. Laterra, G.W. Goldstein, Steroid inhibition of neural microvessel morphogenesis in vitro: receptor mediation and astroglial dependence, *J. Neurochem.* 58 (1992) 1023–1032.
- [56] M.X. Zarrow, J.E. Phillipot, V.H. Denenberg, Passage of <sup>14</sup>C-4-corticosterone from the rat mother to the foetus and neonate, *Nature* 226 (1970) 1058–1059.
- [57] Y.Z. Ziyilan, J.M. Lefauconnier, G. Bernard, J.M. Bourre, Regional alterations in blood-to-brain transfer of  $\alpha$ -aminoisobutyric acid and sucrose, after chronic administration and withdrawal of dexamethasone, *J. Neurochem.* 52 (1989) 684–689.

# Prenatal stress alters microglial development and distribution in postnatal rat brain

Beatriz Gómez-González · Alfonso Escobar

Received: 15 April 2009 / Revised: 28 August 2009 / Accepted: 4 September 2009  
© Springer-Verlag 2009

**Abstract** Stress affects microglial function and viability during adulthood and early postnatal life; however, it is unknown whether stress to the pregnant dam might alter offspring microglia. The effects of prenatal stress on microglial development and distribution in the postnatal brain were studied using Wistar rats. Prenatal stress consisting of 20 min of forced swimming occurred on embryonic days 10–20. On postnatal days 1 and 10, stressed and control pups were killed. Microglia were identified using *Griffonia simplicifolia* lectin and quantified in the whole encephalon. In addition, plasma corticosterone was measured in dams at embryonic day 20, and in pups on postnatal days 1 and 10. At postnatal day 1, there was an increase in number of ramified microglia in the parietal, entorhinal and frontal cortices, septum, basal ganglia, thalamus, medulla oblongata and internal capsule in the stressed pups as compared to controls, but also there was a reduction of amoeboid microglia and the total number of microglia in the corpus callosum. By postnatal day 10, there were no differences in the morphologic type or the distribution of microglia between the prenatal stress and control groups, except in the corpus callosum; where prenatal stress decreased the number of ramified microglia. The stress procedure was effective in producing plasma rise in corticosterone levels of pregnant rats at embryonic day 20 when compared to

same age controls. Prenatal stress reduced the number of immature microglia and promoted an accelerated microglial differentiation into a ramified form. These findings may be related to an increase in plasma corticosterone in the pregnant dam.

**Keywords** In utero stress · Amoeboid microglia · Ramified microglia · Corticosterone

## Introduction

The origin of microglia is one of the most controversial issues on glial research. Several hypotheses have been proposed in relation to the origin of microglia; microglia have been considered to be of mesodermal, neuroectodermal (similar to astrocytes and oligodendrocytes) or monocytic origin [10, 28]. Consensus opinion currently holds that microglia derive from the embryonic mesoderm [10]; specifically, microglia are thought to derive from peripheral blood monocytes that infiltrate the central nervous system via local blood vessels during embryonic and early postnatal life [32, 42, 51]. In the rat, microglia are first seen between embryonic days 12–14 [51]. During early phases of neural development, microglia are amoeboid. As development progresses, microglia acquire a mature ramified form [28, 32]. At birth, amoeboid microglia concentrate in three colonies in the rat forebrain: the corpus callosum, internal capsule and ventral part of the external capsule [16, 30, 33]. From those reservoirs, amoeboid microglia migrate to all remaining neuroanatomic sites during the later embryonic stages and the first 3 postnatal weeks [11]. In the early postnatal rat, ramified microglia with short stout processes are the predominant form in the neocortex and hippocampus, and there is

---

B. Gómez-González (✉) · A. Escobar  
Department of Cell Biology and Physiology,  
Instituto de Investigaciones Biomédicas,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
Ciudad Universitaria, 04510 Mexico D.F., Mexico  
e-mail: bgomezglez@gmail.com

B. Gómez-González  
Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma de  
México, Mexico D.F., Mexico



a reduced number of amoeboid microglia [12, 55]. In those regions, amoeboid microglia are found mainly in the deeper neocortical layers immediately over the corpus callosum [55] and in the ontogenetically newer hippocampal areas, such as the dentate gyrus and CA1 region [12].

Microglia express both high and low-affinity glucocorticoid receptors [50] as well as receptors for the corticotrophin-releasing hormone (CRH) [53]. The possibility exists that stress might alter the normal functioning and development of microglia. In vitro, glucocorticoids exert inhibitory effects on microglial function by acting on the type II or low-affinity glucocorticoid receptor, while glucocorticoids bound to type I receptors, or high-affinity mineralocorticoid receptor, stimulate microglial-inducible nitric oxide synthase and acid phosphatase activities. When present, both enzymes reflect appropriate functioning of microglial cells [50]. High levels of glucocorticoids, acting on type II receptors, shrink microglial soma [50], diminish cell proliferation [17, 50] and migration [58], and increase accumulation of undigested materials inside microglial lysosomes and vacuoles [50]. Like glucocorticoids, the CRH adversely affects microglial function; in vitro, CRH reduces 20% microglial cell viability and induces apoptotic cell death [40].

Experiments in vivo also indicate that stress hormones present during early life alter microglial development and also affect other neurodevelopmental processes, such as neurogenesis, synaptogenesis, astrocyte morphology and development of the blood–brain barrier [6, 19, 22, 36]. In the newborn rat, cortisone administration reduces the number of amoeboid microglia by 50% in the corpus callosum during the first postnatal week [31, 56]. It has been suggested that administration of the synthetic glucocorticoid dexamethasone on postnatal days 1, 3 and 5 (which diminished 40–60% of the number of amoeboid microglia in the corpus callosum of 1-week-old rat pups) reduces microglial cell proliferation, accelerates maturation and increases microglial cell death [26, 56].

Both in vitro and in vivo experiments indicate that stress hormones may affect microglial function and viability; however, it is still unknown whether stress to the dam during the period when the first microglial progenitors infiltrate into the fetal central nervous system affects microglial development and distribution in the postnatal brain. Therefore, this study aimed to investigate the effect of prenatal stress on microglial development and distribution in the whole neonatal rat brain. It was considered that prenatal stress would alter microglial distribution in the whole brain concomitantly to the microglial changes in the main glial reservoir, the corpus callosum, and it was thought that the change would occur during early postnatal life as reported previously [26, 31, 56].

## Materials and methods

### Animals

Twelve pregnant Wistar rats (200 g), 10 weeks of age at the beginning of the experiment, and their pups (ten per litter) were used; extra pups were randomly removed after delivery to obtain a litter size equal to ten pups at postnatal day 1. Dams were born and reared in our vivarium, at the Instituto de Investigaciones Biomédicas of the Universidad Nacional Autónoma de México, and were maintained on a 12-hour light/dark cycle (lights on at 0700 hours) with constant temperature (20–22°C) and humidity (45–55%). Commercial rat chow and tap water were available ad libitum to dams throughout the experiment. Two weeks before the beginning of gestation, all animals were handled daily during 15 min and afterward were exposed to the swimming tank filled with 23°C water during 5 min to avoid adverse effects (e.g., sudden death) of abrupt prolonged forced swimming [7]. The 23°C water temperature is deemed neutral for the rat and consequently is commonly used in other non-stressful swimming procedures such as the Morris water maze (e.g., [49]). After the habituation to experimental handling, groups of two to three dams were caged with an adult sexually experienced male rat for 5 days. Embryonic day 0 (E0) occurred when the daily vaginal smear contained spermatozooids with typical cornified estrus cells [34], therefore, oocyte fertilization should have occurred during the day following the pairing with the male rat [48]. Beginning on E0, pregnant rats were caged in groups of three until day E20, when each rat was caged individually and delivery occurred on E22. The day pups were born was considered as postnatal day 0 (P0). Each pregnant rat was assigned at random to one of two groups: (I) forced swimming stress group or (II) control group. The experiments were approved by the local committee on animal research. The experiments were done in accordance with the Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research of the Institute for Laboratory Animal Research, USA [39] and were designed to reduce to the minimum the number of animals used.

### Materials

A transparent plastic water tank (60 × 44 × 30 cm) with thermostat was used for the prenatal stress procedure (forced swimming). The water was maintained at a level of 22–24 cm so that rats could not rest their hind limbs on the bottom.

For microglial histochemistry, the lectin from *Griffonia simplicifolia* conjugated to horseradish peroxidase (GSAI-B4-HRP) (Sigma, L5391, USA) and the peroxidase



substrate diaminobenzidine kit (Vector Labs, SK4100, USA) were used.

For corticosterone quantification by radioimmunoassay, the Coat-A-Count rat corticosterone kit (Diagnostic Products Corporation, PITKRC-2, USA) and a gamma counter (COBRA II, Packard Co., USA) were used.

Quantitative analysis of stress effects on microglial development and distribution was done using the software ImageJ version 1.32j [43] and the plug-in cell counter [15], provided freely by the National Institutes of Health, USA. The statistical analyses were carried on the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software, version 10.0 for Windows.

### Prenatal stress

Prenatal stress (in utero stress) was carried on from E10 to E20, beginning 2 days ahead of the first appearance of microglial cells in the rat central nervous system during the day when neurulation occurs [25]. Prenatal stress consisted of 20 min of daily forced swimming in 32°C water, a temperature that is known to be stressful for the rat [1, 9, 18]. The stress procedure used, with the concomitant control of session duration and water temperature, retards the stress–response adaptation as observed under chronic exposure to other physical stressors such as immobilization or predator presence [2, 14]. To avoid water pollution with the urine and fecal boli of preceding rats, the tank was re-filled with clean water once the swimming session of each subject was over. At the end of the swimming session, the pregnant rats were dried gently with a cotton towel for 1 min and placed back in their home cages (40 × 22 × 20 cm) until the next swimming session (24 h later). Controls were kept in the same environment as stressed rats, but without any stress manipulation; the only handling of controls occurred every third day to change bed material.

### Microglial histochemistry

Characterization of the microglial cells is difficult, as these cells share several antigens with different cell types (e.g., macrophages, endothelial cells, lymphocytes) [20]; however, microglial cells bind lectins avidly during the early developmental stages [13, 16, 46, 47, 54–56]. Therefore, to study stress effects on microglial development and distribution in the rat brain, free floating sections were stained with the lectin *G. simplicifolia*, which binds to the  $\alpha$ -D-galactosyl residues of membranous glycoproteins [21] in the rodent microglia [47]. The lectin derived from *G. simplicifolia* has been shown to be a reliable marker and an accurate method for the identification of microglial cells in rodent nervous tissues,

though in addition to microglia, it stains blood vessel endothelium [46, 47]. Given the morphological differences between microglial and endothelial cells, identification and quantification of microglia did not represent a problem in the present study as noted also by others using the same method [16, 46, 47, 54–56].

Microglial differentiation occurs predominantly during the early postnatal period. In the newborn rat microglia concentrate in the glial reservoirs (in the corpus callosum and internal capsule) and during the second postnatal week microglia migrate to the whole encephalon and differentiate into the mature ramified form [11, 16, 30, 33]. Therefore, to study stress effects on microglial postnatal development, three to five pups of each group (prenatal stress and control) on postnatal days 1 and 10 (total, 18 pups) were anesthetized with intraperitoneal pentobarbital sodium (0.063 g/kg body weight) and perfused transcardially with normal saline solution followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M saline-phosphate buffer (PBS). One to two pups per litter were used at each age (pups were obtained from six different litters). The brains were removed and post-fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS during 4 days at 4°C, followed by cryoprotection in 30% sucrose solution for 4 days. The whole brain was cut serially in a freezing microtome into 40  $\mu$ m thick coronal sections. Sections were preincubated in 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min before the application of the lectin to block endogenous peroxidase activity. After a brief washing with 1 mM CaCl<sub>2</sub> and MgCl<sub>2</sub> in 1% Triton-PBS, sections were incubated in *G. simplicifolia* lectin (10  $\mu$ g/mL) with 1 mM CaCl<sub>2</sub> and MgCl<sub>2</sub> diluted in 1% Triton-PBS [47] for 48 h at 4°C. The sections were then reacted with the peroxidase substrate diaminobenzidine kit, collected on slides, dehydrated and coverslipped.

### Quantification of stress effects on microglial development and distribution

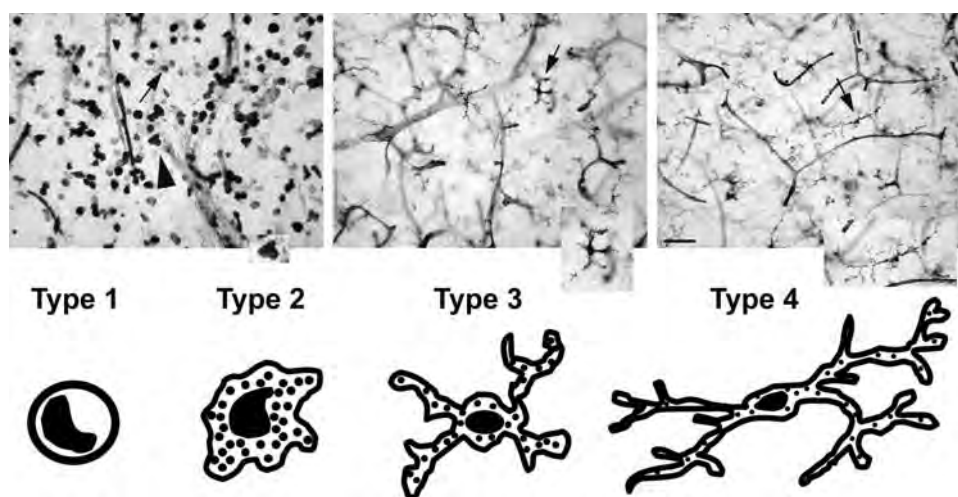
Microglial development was studied in the following central nervous system regions: visual, auditory, somatosensory and motor cortices, cingulate gyrus, insular, frontal, orbitofrontal and entorhinal cortices, hippocampus, septum, basal ganglia, amygdala (corticomedial nucleus), thalamus (dorsomedial nucleus), hypothalamus (paraventricular nucleus), olfactory bulb, cerebellum, midbrain, pons, medulla oblongata, corpus callosum, internal capsule and cerebellar white matter. Localization of each structure in the rat brain was based on the plates from Altman and Bayer [3] for 1-day-old pups and plates from Paxinos and Watson [41] for 10-day-old pups. Slices to be photographed were randomly selected between all the slices containing each region of interest. One photomicrograph per region per pup was obtained with a Zeiss

microscope (model 1702, Carl Zeiss, Mexico) and a digital camera (model DSC-S85, Sony, Mexico). Photomicrographs were obtained using the 25× objective; a total area of 0.185 mm<sup>2</sup> (0.50 mm × 0.37 mm), equivalent to the visual field of the microscope, was photographed for each of the central nervous system structures studied. Photomicrographs were saved as TIFF files without any manipulation and quantitatively analyzed with the plug-in cell counter [15] of the software ImageJ, version 1.32j [43].

Lectin-immunoreactive cells were classified into four morphological types based on their cell shape and configuration of their cytoplasmic processes, according to a modified version of the classification done by Wu et al. [54]. These comprised amoeboid cells (type 1), amoeboid cells bearing pseudopodia (type 2), cells with round soma bearing short, stout processes (type 3), and cells with a flattened elongated soma, thin and long processes (type 4) considered as the last transition stage to the mature resting microglia (Fig. 1). The numbers of each type of lectin-immunoreactive cells and the total number of microglial cells were obtained for each brain region studied; thereafter, mean numbers of each lectin-immunoreactive cell type per region were used to construct distribution maps in the prenatal stress and control groups on postnatal days 1 and 10, using plates 20 and 84 from Paxinos and Watson [41] as a template. The sagittal map was reconstructed from the quantified coronal slices. In both distribution maps (coronal and sagittal), each dot represents one lectin-immunoreactive cell per 0.185 mm<sup>2</sup>.

#### Plasma corticosterone quantification

Plasma corticosterone was quantified to assess the effectiveness of the stress procedure to generate a prolonged stress response in both dams and pups and also to ascertain the possible role of glucocorticoids as mediators of the stress effects on microglial development and distribution. On E20, pregnant rats from control and stress groups were killed by rapid decapitation and blood was collected to quantify plasma corticosterone. Pregnant rats from the stress group were killed 5 min after the end of the stress procedure (forced swimming). Six pups per group (control and prenatal stress) at postnatal days 1 and 10 (total, 24 pups) were also killed and their blood was obtained. Only two pups per litter were used for the plasma corticosterone quantification. Given the low quantity of trunk blood obtained from 1-day-old and 10-day old pups, blood from the same condition and age rats was pooled for each of the three ages studied (pups were obtained from six different litters, some were of the same litter as those used for the microglial quantification). To prevent the effects of corticosterone circadian rhythm, all rats were decapitated at 1200 hours. Blood was collected in ice-cooled tubes containing a clot activator (Terumo, Venoject, Europe), the tubes were centrifuged at 6000 rpm for 15 min and the plasma was stored until further processing at −20°C. Plasma corticosterone concentration was quantified by radioimmunoassay using the <sup>125</sup>I rat corticosterone as a marker, following the manufacturer's instructions (Diagnostic Products Corporation, PITKRC-2, USA). Briefly,



**Fig. 1** Microglial cell types. Both photomicrographs and drawings show the classification of microglial cell types used in the present study based on the classification by Wu et al. [56]. **a** Photomicrograph of the control corpus callosum at postnatal day 1 showing representative type 1 amoeboid microglial cells (*arrow*) and type 2 amoeboid microglia (*arrowhead*). The *inset* in (**a**) shows a higher magnification of type 2 microglia. **b** Photomicrograph of the 10-day-old control

midbrain showing representative type 3 microglia (*arrow*). The *inset* in (**b**) shows a higher magnification of the marked type 3 microglia. **c** Photomicrograph of the control somatosensory cortex at postnatal day 10 showing representative type 4 microglia (*arrow*). The *inset* in (**c**) shows a higher magnification of the marked type 4 microglia. **a-c** Lectin-immunoreactive blood vessels are observed in addition to microglia. Scale bar 50 μm applies to the three photomicrographs

50  $\mu$ L plasma was incubated with  $^{125}$ I rat corticosterone in plain polypropylene tubes during 2 h at room temperature, followed by rapid decantation and removal of moisture. Controls included uncoated polypropylene tubes and non-specific binding tubes (total counts). Tube radioactivity was counted during 1 min in a Gamma counter; the kit used was able to detect as little as 5.7 ng/mL of plasma corticosterone concentration. Corticosterone antiserum of the Coat-A-Count rat corticosterone kit is highly specific to rat corticosterone with low cross-reactivity to 11-deoxycorticosterone (<2.9%), progesterone (<0.9%), cortisol (<0.4%), aldosterone (<0.3%), testosterone (<0.05%), 18-hydroxy deoxycorticosterone (<0.02%) and 17 $\alpha$ -hydroxy progesterone (<0.05%). The intra-assay CVs for the rat corticosterone quantification were about 6.8%, while inter-assay CVs were about 8.5%.

### Statistical analysis

The data fulfilled the normality and variance homogeneity requirements for performing statistical parametric analysis. Thus, the statistical test used to compare the differences between the prenatal stress group and the control group in microglial development was a two-way ANOVA test (experimental condition  $\times$  age) [8, 23, 29]. To show specific differences in microglial development and distribution between the prenatal stress group and the control group at each age, orthogonal contrast codes (C) were performed. The orthogonal contrast codes were used instead of traditional ANOVA post hoc tests as a mean to lessen the probability of statistical error type I associated with such

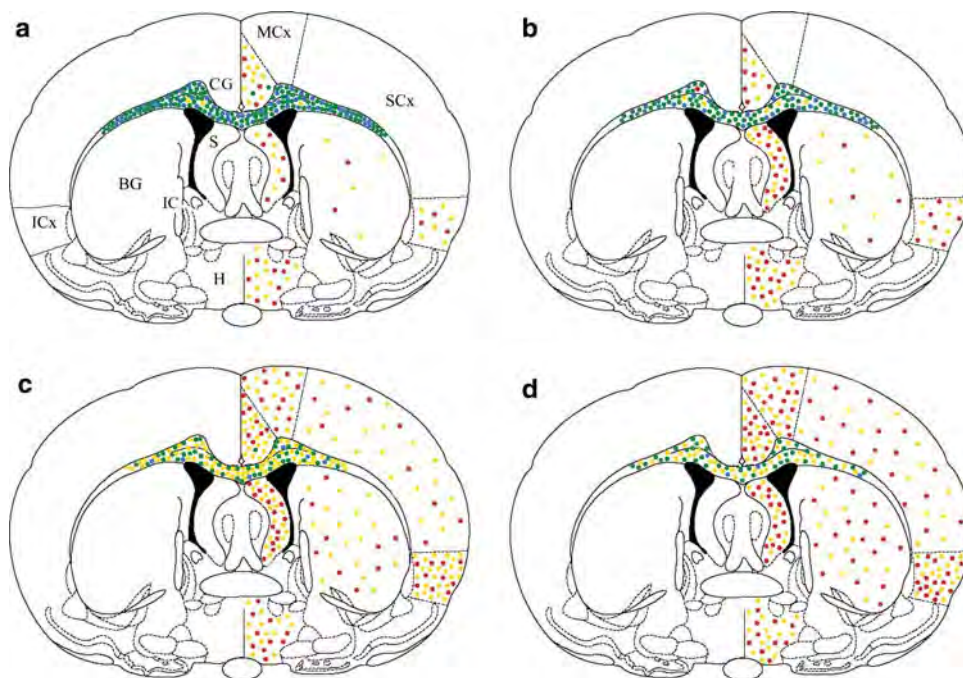
multiple comparisons (experimental condition  $\times$  age per each nervous region) [8]. Contrast coefficients of  $-1$  and  $1$  were assigned to the control and prenatal stress groups, respectively; for each test of the coefficient contrast, the alpha level was set at 0.05. Because pooled plasma samples were used, no statistical test was performed on the corticosterone data.

## Results

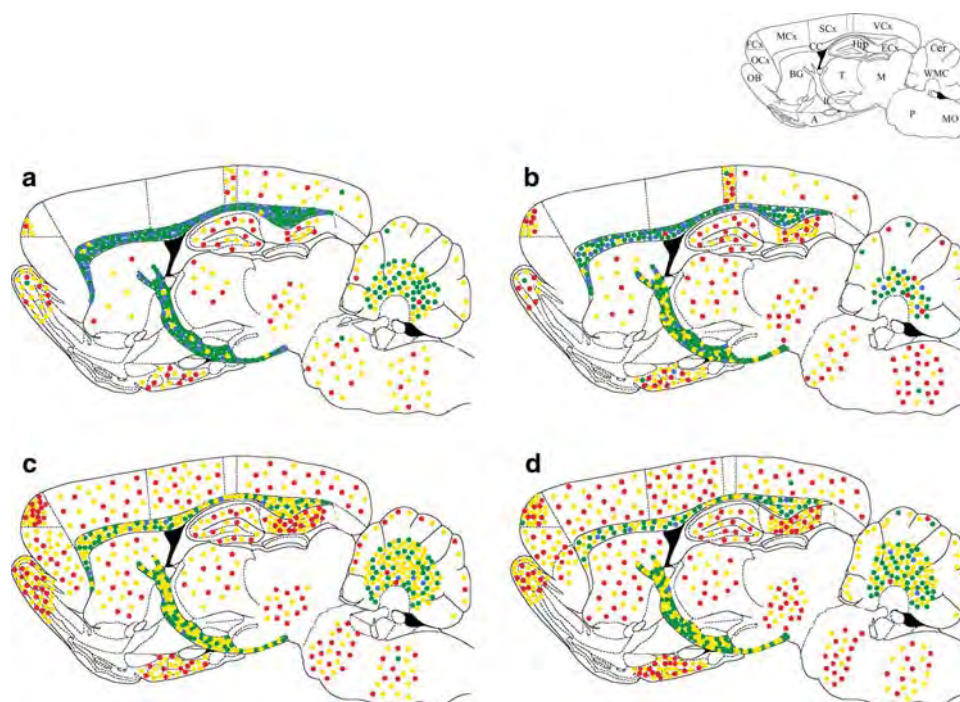
### Development and distribution of microglia in the control brains

In the 1-day-old control pups, amoeboid cells were concentrated in the two major brain reservoirs, corpus callosum and internal capsule, and in the subcortical white matter of the cerebellum (Figs. 2a, 3a). Approximately, 50% of the amoeboid lectin-immunoreactive cells in the 1-day-old control pups were localized in the corpus callosum, 40% in the internal capsule and the remaining 10% in the white matter of the cerebellum and in subcortical regions such as the septum, olfactory bulb, midbrain, pons and medulla oblongata. As is shown in the distribution maps of the control group in Figs. 2a, 3a and 4, at postnatal day 1, the majority of lectin-immunoreactive cells found in both brain reservoirs were of type 1, the most primitive stage of microglial development, or type 2, amoeboid cells with pseudopodia. On postnatal day 1, there were only few lectin-immunoreactive cells with short stout processes (type 3) in either reservoir. On the other hand, all the

**Fig. 2** Microglial distribution in coronal maps at postnatal days 1 and 10. **a** Control group on postnatal day 1. **b** Prenatal stress group on postnatal day 1. **c** Control group on postnatal day 10. **d** Prenatal stress group on postnatal day 10. In the four distribution maps, type 1 microglial cells are represented as blue dots, type 2 as green dots, type 3 as yellow dots and type 4 as red dots. BG basal ganglia, CC corpus callosum, CG cingulate gyrus, H hypothalamus, IC internal capsule, ICx insular cortex, MCx motor cortex, S septum, SCx somatosensory cortex. Modified from Plate 20 of Paxinos and Watson [41]







**Fig. 3** Microglial distribution in sagittal maps on postnatal days 1 and 10. The drawings are sagittal reconstructions from coronal slices. **a** Control group on postnatal day 1. **b** Prenatal stress group on postnatal day 1. **c** Control group on postnatal day 10. **d** Prenatal stress group on postnatal day 10. In the four distribution maps, type 1 microglial cells are represented as *blue dots*, type 2 as *green dots*, type 3 as *yellow dots* and type 4 as *red dots*. *A* amygdala, *BG* basal

ganglia, *Cer* cerebellar cortex, *CC* corpus callosum, *ECx* entorhinal cortex, *FCx* frontal cortex, *Hip* hippocampus, *IC* internal capsule, *M* midbrain, *MCx* motor cortex, *MO* medulla oblongata, *OB* olfactory bulb, *OCx* orbitofrontal cortex, *P* pons, *SCx* somatosensory cortex, *T* thalamus, *VCx* visual cortex, *WMC* white matter of the cerebellum. Modified from Plate 84 of Paxinos and Watson [41]

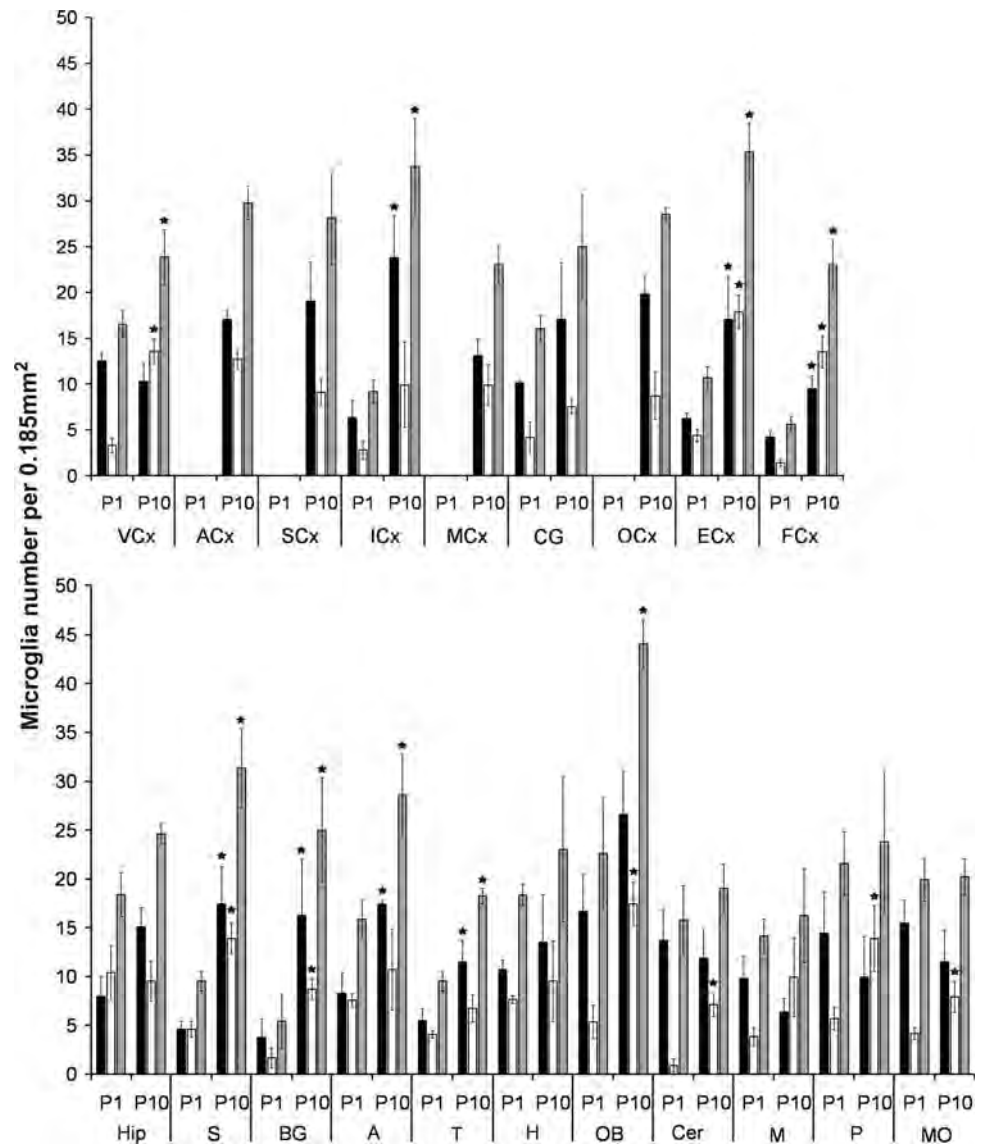
cortical and subcortical regions studied showed predominance of type 3 lectin-reactive cells and a small number of type 4 microglia on postnatal day 1 (Figs. 2a, 3a, 4).

By postnatal day 10, amoeboid microglia in the corpus callosum ( $P < 0.01$ ) and internal capsule ( $P > 0.05$ ) reservoirs were severely decreased (Fig. 4). At the same age (postnatal day 10), controls also presented a rise in the number of ramified lectin-immunoreactive cells (mainly type 3) in both reservoirs as compared to postnatal day 1 (Fig. 4). Significant differences were found in both, corpus callosum ( $P < 0.001$ ) and internal capsule ( $P < 0.001$ ). Several other brain regions that were studied presented increases in the total number of microglial cells per  $0.185 \text{ mm}^2$  area, due mainly to a rise in the number of ramified microglia (see Fig. 4). Brain regions with a higher number of total microglia on postnatal day 10 as compared to postnatal day 1 were the insular, visual, entorhinal and frontal cortices ( $P < 0.05$ ), thalamus, septum, amygdala, basal ganglia and olfactory bulb ( $P < 0.05$ ). The number of ramified lectin-immunoreactive cells per area increased significantly in the visual, insular, entorhinal and frontal cortices ( $P < 0.01$ ), and also in the septum, basal ganglia, amygdala, olfactory bulb, medulla oblongata and cerebellum ( $P < 0.05$ ) of 10-day-old control brains as compared to newborn controls.

#### Stress effects on microglial development and distribution

Prenatal stress modified the microglial development and distribution in the postnatal rat brain. In the corpus callosum, prenatal stress reduced the number of amoeboid microglia on postnatal day 1 compared to the same age control group (Figs. 5, 6). As shown in the distribution maps (Figs. 2a, b, 3a, b), the most primitive form of microglia (type 1) were decreased by more than 40% in the corpus callosum of the 1-day-old prenatally stressed pups with respect to the controls ( $P < 0.05$ ), and the number of type 2 lectin-immunoreactive cells (amoeboid cells with pseudopodia) were reduced, approximately 25%, in the prenatal stress group as compared to the controls ( $P = 0.056$ ). Prenatal stress also diminished the total number of microglia in the corpus callosum in 1-day-old pups as compared to controls ( $P < 0.05$ ; Fig. 6). In the internal capsule reservoir, prenatal stress appeared to accelerate microglial development in 1-day-old pups as compared to same age controls, without affecting total number of microglia (Fig. 5c, d). The distribution maps (Figs. 2a, b, 3a, b) and Fig. 6 show that on postnatal day 1, prenatal stress had increased the number of ramified lectin-immunoreactive cells (mainly type 3 microglia) in the

**Fig. 4** Microglial development in the control group. The graphs show the mean number of each microglial cell type in the control group on postnatal days 1 (P1,  $n = 5$ ) and 10 (P10,  $n = 3$ ) in all the brain structures studied. Type 3 lectin-immunoreactive cells appear as black bars, type 4 as white bars and total number of microglia as gray bars. Type 1 and type 2 lectin-immunoreactive cells are not represented in the graphs because of the low density of those microglial cell types in cortical and subcortical regions. Error bars represent standard error. \*Significant differences as compared to P1 ( $P < 0.05$ ). Abbreviations are as previously stated

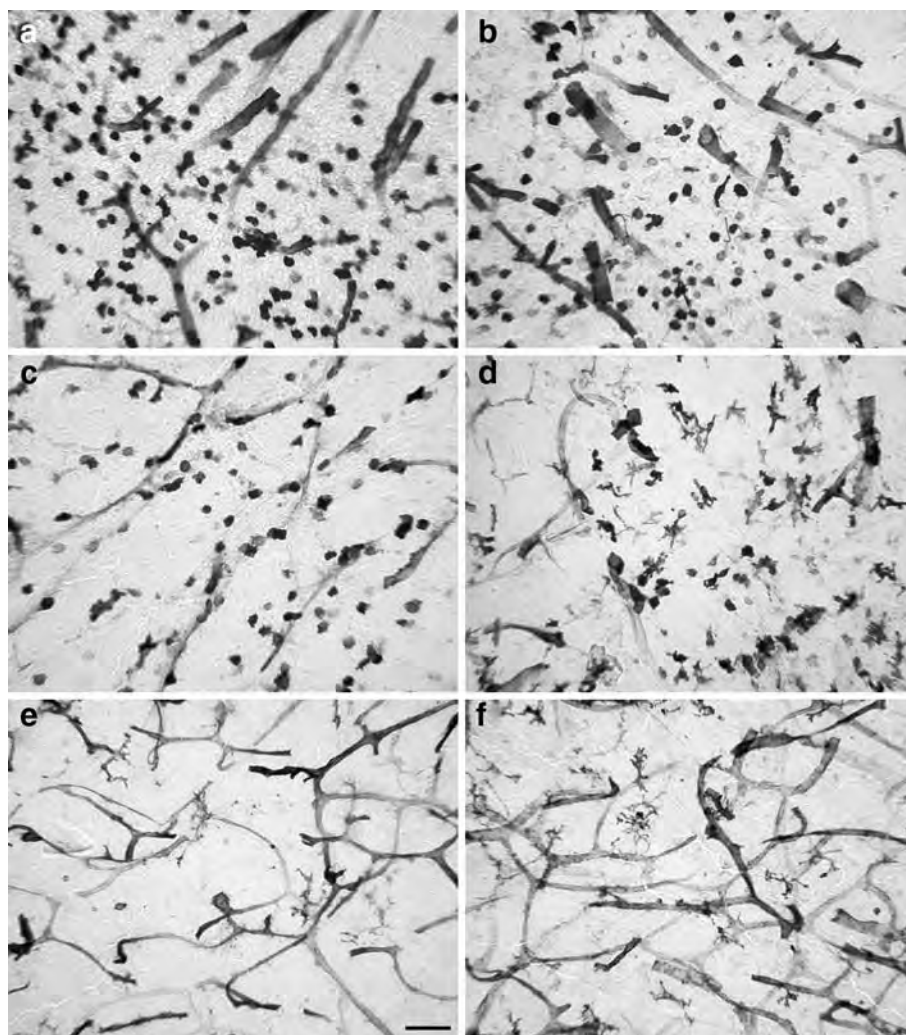


internal capsule by more than 200% when compared to controls ( $P < 0.05$ ). In a similar manner, prenatally stressed pups also showed an increase in the total number of microglia in some neuroanatomic regions on postnatal day 1 as compared to the control group (Figs. 5, 7). Brain regions with increased number of total microglia per 0.185 mm<sup>2</sup> area in the prenatal stress group were the entorhinal and parietal cortices ( $P < 0.005$ ), the septum, amygdala and thalamus ( $P < 0.05$ ; Figs. 2a, b, 3a, b, 7). In those regions, the increase in the total number of microglia was due to an increase in the mean number of ramified lectin-immunoreactive cells (both type 3 and type 4 microglia) (Fig. 7). Globally, prenatal stress increased significantly the number of type 4 microglia per 0.185 mm<sup>2</sup> whole brain area ( $P < 0.01$ ), and slightly decreased type 1 and type 2 microglia density ( $P < 0.05$ ), but did not increase the total number of microglia in the whole neonatal brain (Table 1).

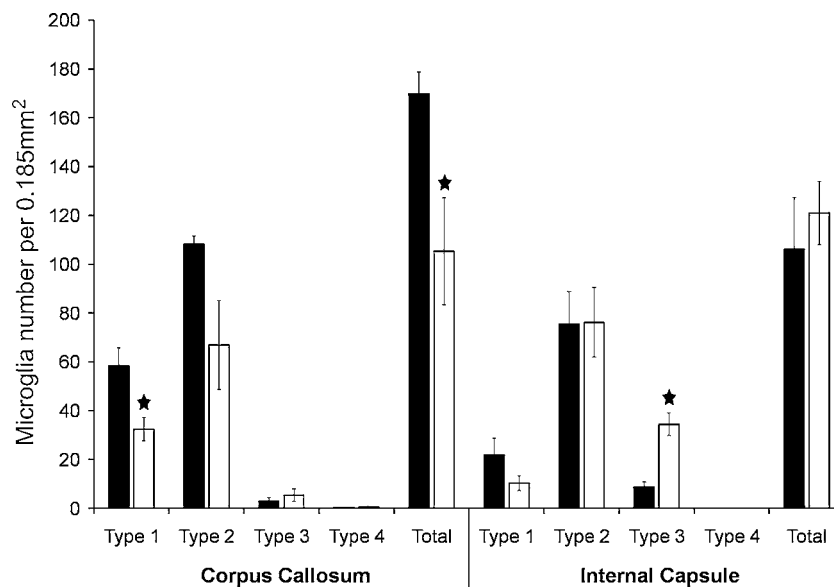
On postnatal day 10, both groups showed similar mean number, distribution and developmental stages of microglia across all brain regions studied ( $P < 0.05$ ; Figs. 2c, d, 3c, d; Table 1). In the brain reservoirs, amoeboid microglia had differentiated into ramified microglia and the mean numbers of each cell type showed no significant difference between prenatally stressed and control pups, except in the corpus callosum, where prenatally stressed pups showed 50% less number of type 3 microglia as compared to same age controls ( $P < 0.05$ ) and no significant statistical reduction in the total number of microglia ( $P > 0.05$ ). The mean number of type 3 microglia in the corpus callosum of 10-day-old prenatally stressed pups was  $31.66 \pm 11.49$  versus  $61.09 \pm 6$  in controls. Meanwhile, total number of microglia in the corpus callosum of prenatally stressed pups was  $74.27 \pm 12.26$  in comparison with  $110.69 \pm 15.53$  in the control group.

**Fig. 5** Prenatal stress effects on microglial development on postnatal day 1.

**a** Photomicrograph of the control corpus callosum on postnatal day 1. **b** Corpus callosum of the prenatal stress group. **c** Photomicrograph of the control internal capsule. **d** Prenatal stress group internal capsule. **e** Photomicrograph of the control thalamus. **f** Thalamus in the 1-day-old prenatally stressed pups. **a-f** Lectin-immunoreactive blood vessels are observed in addition to stained microglia. Scale bar 50  $\mu\text{m}$  applies to the six photomicrographs

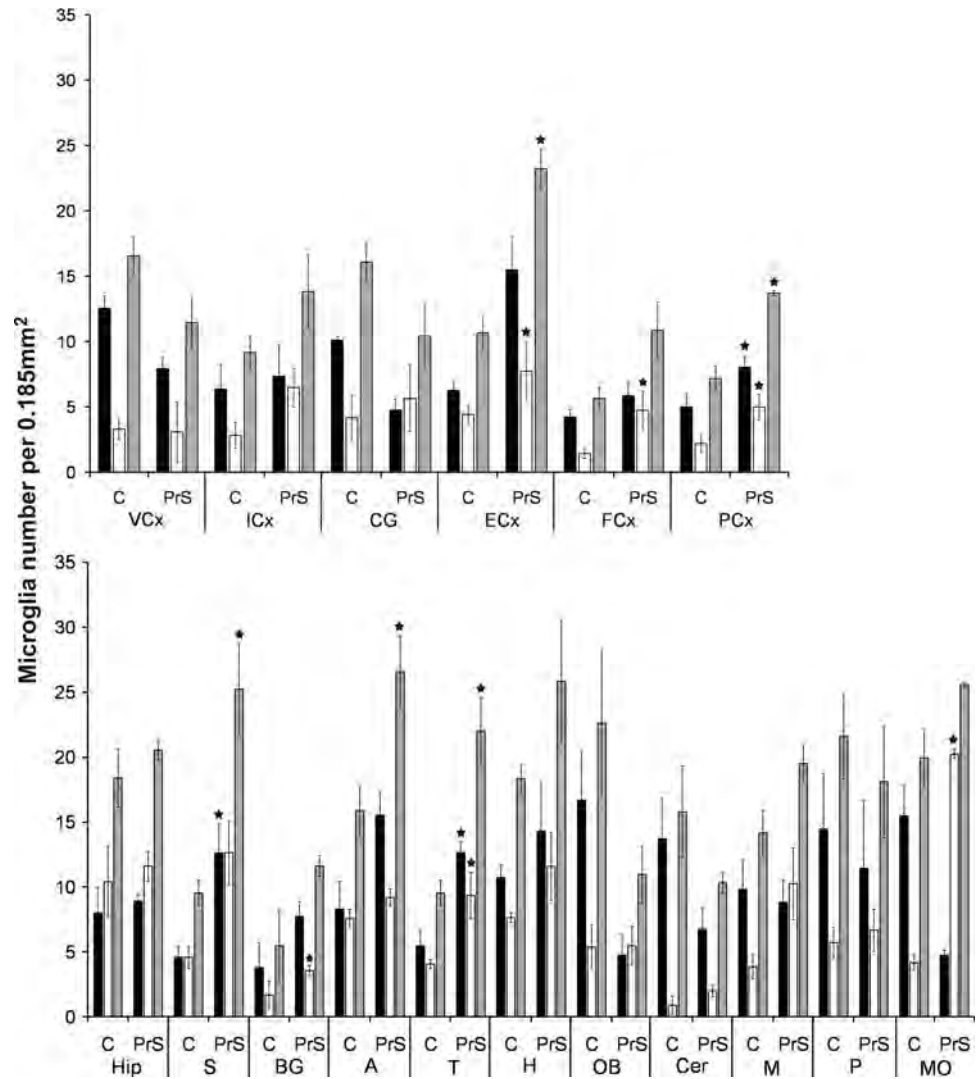


**Fig. 6** Microglial distribution in brain reservoirs in the control and prenatal stress groups on postnatal day 1. The graph shows the mean number of each microglial cell type and the total number of microglia in both brain reservoirs studied, corpus callosum and internal capsule, in the control (black bars) and prenatal stress (white bars) groups. Error bars represent standard error. \*Significant differences as compared to the control group ( $P < 0.05$ )





**Fig. 7** Microglial distribution in the whole brain in the control and prenatal stress groups on postnatal day 1. The graphs shows the mean number of type 3, type 4, and the total number of microglia in the neocortex and other brain regions studied in the control (*Ctrl*) and prenatal stress (*PrS*) groups. Type 3 microglia appear as *black bars*, type 4 lectin-immunoreactive cells as *white bars* and total microglia as *gray bars*. Type 1 and type 2 lectin-immunoreactive cells are not represented in the graphs because of the low density of those microglial cell types in cortical and subcortical regions. *Error bars* represent standard error. \*Significant differences as compared to same age controls ( $P < 0.05$ ). Abbreviations are as previously stated



**Table 1** Microglial density in the whole brain in prenatal stress and control groups

	Type 1	Type 2	Type 3	Type 4	Total
<b>Control</b>					
P1	3 ± 1.16	10.28 ± 1.31	11.56 ± 2.88	3.49 ± 0.59	28.33 ± 1.59
P10	0.53 ± 0.16	5.76 ± 0.34	21.15 ± 1.24	9.63 ± 0.28	37.07 ± 1.74
<b>Prenatal stress</b>					
P1	1.94 ± 0.59	6.18 ± 2.23	9.06 ± 1.65	7.41 ± 0.9*	24.59 ± 3.3
P10	0.37 ± 0.24	6.16 ± 1	17.86 ± 2.02	10.32 ± 0.78	34.71 ± 1.2

Mean number of microglia in the whole brain per 0.185 mm<sup>2</sup> area is shown, mean ± standard error

\* Significant differences as compared to the same age control ( $P < 0.05$ )

### Plasma corticosterone levels

Stress during gestation increased plasma corticosterone levels by more than 400% in dams 2 days prior to delivery. At E20, pregnant rats subjected to stress had a plasma corticosterone concentration of 1,552 ng/mL; meanwhile, control pregnant rats presented 332 ng/mL corticosterone

concentrations. In pups, stress also produced an increase in plasma corticosterone concentration; however, both groups presented lower net values than that observed in pregnant adult rats due to the stress hyporesponsive period [45]. On postnatal day 1, the corticosterone concentration in prenatally stressed pups was 76 ng/mL and in controls, 46 ng/mL. By postnatal day 10, both groups, prenatal stress

and control, had low levels of corticosterone in plasma (8 ng/mL in controls and 11 ng/mL in the prenatal stress group).

## Discussion

This study investigated the effects of stress, during the period when the first monocytes infiltrate into the central nervous system, on microglial development and distribution in the postnatal rat brain. In utero stress reduced the number of amoeboid lectin-immunoreactive cells and total microglia in the corpus callosum reservoir in 1-day-old rat pups resulting in a decreased number of ramified microglia in the same structure on postnatal day 10. Concomitantly, prenatal stress accelerated microglial development in the second brain reservoir, the internal capsule, at 1 day of age, by slightly decreasing type 1 amoeboid microglia and considerably increasing type 3 ramified lectin-immunoreactive cells without affecting the total microglia population. In other neuroanatomic regions, such as the entorhinal and parietal cortices, septum, amygdala and thalamus, prenatal stress also increased the total number of microglia, mainly by increasing the numbers of ramified microglia (both type 3 and type 4). Prenatal stress increased type 4 ramified microglia in the whole neonatal rat brain without affecting the total number of microglia in the brain taken as a whole. Those parallel changes in microglial cell types in the corpus callosum and the other nervous regions studied could be related to accelerated microglial development associated with stress, suggesting that lectin-immunoreactive cells from the corpus callosum of the prenatally stressed pups might have spread to other brain regions earlier than in the control group. This is the first time that prenatal stress has been reported to modify microglial development and distribution in the early postnatal rat brain.

Other studies that attempted to depict the effects exerted by pharmacological stress on microglial development have used procedures and timing different from ours [26, 31, 56]. Ling [31] and Wu et al. [56] administered a single subcutaneous dose of cortisone acetate on postnatal day 1, while Kaur et al. [26] and Wu et al. [56] injected subcutaneously dexamethasone to rat pups on postnatal days 1, 3 and 5. Those studies were limited to the corpus callosum, where the number of amoeboid microglia was reduced by 40–60% [26, 31, 56]. Our findings were different. We quantified microglia in both corpus callosum and internal capsule in one-day-old pups, and found the number of amoeboid microglia to be reduced by only 15–40%. A possible explanation for the discrepancy between our study and those of others might be the different developmental timing in which stress was exerted (prenatal versus

postnatal) and the different stress procedures used (physical versus pharmacological). Moreover, the lesser decrease in the corpus callosum amoeboid microglia found in our study could also be explained by the sustained proliferation of microglial cells inside the postnatal rat brain and by the continued infiltration of monocytes to the brain parenchyma as previously shown by Dalmau et al. [13], Perry and Gordon [42] and Tseng et al. [51].

Kaur et al. [26] and Wu et al. [56] attributed the glucocorticoid-induced reduction in the number of amoeboid microglia in the corpus callosum reservoir to reduced microglial cell proliferation, accelerated maturation or increased microglial cell death. However none of those hypotheses were tested directly by Kaur et al. [26] and Wu et al. [56]. In vitro experiments indicate that glucocorticoids acting on type II, low-affinity receptors, similar to the glucocorticoid-binding pattern during stress, may reduce microglial viability [50]. In our study, the absence of a global reduction in the number of microglial cells in the whole encephalon indicates that the amoeboid microglial reduction in the corpus callosum may not be a consequence of increased microglial cell death, but instead it appears that the corpus callosum amoeboid microglia had differentiated into the ramified form and had spread to their final positions in other brain regions, as denoted by an increase in ramified and total numbers of microglia in the parietal and entorhinal cortices, thalamus, amygdala and septum. However, the incidence of microglial cell death was not addressed directly in our study; therefore, more studies are needed to clarify the mechanism by which prenatal stress decreases amoeboid microglia in the corpus callosum reservoir.

Regarding the normal microglial development, in our 1-day-old control group, amoeboid microglia were concentrated in the corpus callosum, internal capsule and white matter of the cerebellum. Previously, both the corpus callosum and internal capsule have been identified as glial reservoirs in the postnatal rat brain [16, 30]. Similar to our findings in the neonatal rat, amoeboid microglia have been also described to concentrate in clumps in the central white matter of the cerebellum in the newborn mice and, beginning on postnatal day 3 amoeboid microglia spread to folial white matter [5]. Like the corpus callosum and internal capsule [16, 24, 30, 32, 54], the cerebellar white matter could thus represent an additional brain reservoir of amoeboid microglia, particularly relevant to the development of microglia in the cerebellar cortex, subcortical cerebellar nuclei and adjacent areas in the brainstem. Moreover, amoeboid microglia of the cerebellar white matter exert major effects on cerebellar cytoarchitecture arrangement. Cerebellar amoeboid microglia are involved in phagocytosis of dying cells, as in other nervous regions during early development [5], and are also known to trigger Purkinje cell death program by partially surrounding



Purkinje cells and releasing reactive oxygen species in a manner similar to a respiratory burst [35].

In a further study, Wu et al. [55] reported data on the presence of ramified microglia in a few neocortical areas of the newborn and 4-day-old rat. From postnatal day 0 to 4, Wu et al. [55] found a change in the prevalence of each type of microglia in the rat neocortex. At postnatal day 0, the majority of microglial cells were ramified with round soma and short stout processes. By postnatal day 4, cortical microglia acquired their mature morphology (a flattened elongated soma with thin and long processes) [55]. We observed a similar change in the microglial morphology from postnatal day 1 to 10. In addition, in our 10-day-old control rats, ramified microglia increased by more than 500% in the brain reservoirs, and similarly in the neocortex, subcortical nuclei, cerebellar cortex and brainstem as compared to 1-day-old controls.

During early development of the central nervous system, microglia exert multiple protective, trophic and organizational functions that afford proper neural development [28]. In particular, amoeboid microglial cells form a protective phagocytic barrier, which is deemed to be necessary in the perinatal period when the blood–brain barrier is still immature [27]. Like adult activated microglia, amoeboid microglial cells may also differentiate into activated microglia (with a large soma bearing very short or no processes) after contacting an injured area along its migration pathway in the central nervous system and are capable of phagocytosis [44]. Moreover, microglia may also play an active role in triggering apoptotic Purkinje cell death in the developing cerebellum [35]. The trophic microglial functions include the release of neurotrophic factors, the promotion of angiogenesis and astrocyte proliferation [37] and in the developing white matter, amoeboid microglia also promote axonal growth and function as guides for developing axons [28]. The functions of microglia in neural environment maintenance extend until adulthood, when resting microglia processes display highly motile filopodia-like protrusions that constantly survey the neural microenvironment. By this means, microglia may effectively clear the brain parenchyma of accumulated metabolic products and deteriorated tissue debris [38]. This is the first time that prenatal stress is shown to modify microglial development and distribution, therefore it is unknown whether the observed stress effects on microglia at postnatal day 1 had any long-lasting consequences. Given that during the early postnatal period occur numerous brain developmental processes (e.g. neurogenesis, myelination, synaptogenesis, astroglioneurogenesis, neuronal cell death and blood–brain barrier maturation) [6, 19, 22, 25, 36, 52] it is possible that altered microglial development induced by *in utero* stress may affect other developmental processes either changing

microenvironment molecular constitution or triggering earlier inflammatory changes secondary to the blood–brain barrier opening induced by prenatal stress [19, 22]. Although punctual, the altered microglial development might alter extensively the other neurodevelopmental processes ensuing perdurable structural changes; for example it is possible that the change in the distribution pattern of microglia in the prenatal stress group may render vulnerable some neuroanatomic regions due to the reduction of neurotrophic factors, such as the corpus callosum where there is a continuous axonal growth [28, 37].

Accelerated microglial development could be related to binding of glucocorticoids to their intracellular low-affinity receptors, type II receptors [50]. We documented increased plasma corticosterone in our stressed pregnant dams during the last day of exposure to the stress procedure (forced swimming). In rodents, corticosterone crosses the placental barrier [57], enters the fetal circulation, crosses rapidly the immature fetal blood–brain barrier [4] and binds to its receptors in the developing microglia [50]. After increased glucocorticoid levels, microglia proliferation is reduced and microglial cell death also occurs as previously reported in *in vivo* experiments [26, 56] and also *in vitro* [17, 50].

In conclusion, prenatal stress reduced the number of immature microglia in the two main brain reservoirs of amoeboid microglia, corpus callosum and internal capsule, and promoted an accelerated microglial differentiation into a ramified form in the internal capsule and brain regions such as the entorhinal cortex, parietal lobe neocortex, thalamus and septum in the neonate Wistar rat model. The effects of prenatal stress were associated with a rise in plasma corticosterone in the pregnant rat, and visible effects on microglial development and differentiation are likely mediated via the microglial corticosterone receptors.

**Acknowledgments** Supported by research grant PAPIIT IN219407 from DGAPA UNAM to A Escobar, and stipend 188838 from CONACyT to B Gómez-González. We thank Dr. Karen M. Weidenheim, M.D., Chief of the Division of Neuropathology, Montefiore Medical Center, for the correction of the English language and for her valuable comments on the final version of the manuscript. We thank Dr. Carolina Escobar for kindly providing the Coat-A-Count rat corticosterone kit, Dr. Carolina Escobar and Roberto Salgado for their valuable technical help and guidance with the radioimmunoassay technique, Jorge Ruiz for the guidance with the statistical tests, and Guadalupe Flores Cruz for the revision of an early version of the manuscript.

## References

1. Abel EL (1993) Physiological correlates of the forced swim test in rats. *Physiol Behav* 54:309–317
2. Abel EL, Hannigan JH (1992) Effects of chronic forced swimming and exposure to alarm substance: physiological and behavioral consequences. *Physiol Behav* 52:781–785

3. Altman J, Bayer SA (1995) Atlas of prenatal rat brain development. CRC Press, Boca Raton
4. Arya V, Demarco VG, Issar M, Hochhaus G (2006) Contrary to adult, neonatal rats show pronounced brain uptake of corticosteroids. *Drug Met Disp* 34:939–942
5. Ashwell K (1990) Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum. *Dev Brain Res* 55:219–230
6. Barros VG, Duhalde-Vega M, Caltana L, Brusco A, Antonelli MC (2006) Astrocyte-neuron vulnerability to prenatal stress in adult rat brain. *J Neurosci Res* 83:787–800
7. Binik YW, Theriault G, Shustak B (1977) Sudden death in the laboratory rat: cardiac function, sensory and experimental factors in swimming deaths. *Psychosom Med* 39:82–92
8. Box GEP, Hunter JS, Hunter WG (2005) Statistics for experimenters. Design, innovation, and discovery. Wiley-Interscience, New Jersey
9. Bruner C, Vargas I (1994) The activity of rats in a swimming situation as a function of water temperature. *Physiol Behav* 55:21–28
10. Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P (2007) The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev* 53:344–354
11. Chugani DC, Kederasha NL, Rome LH (1991) Vault immunofluorescence in the brain: new insights regarding the origin of microglia. *J Neurosci* 11:256–268
12. Dalmau I, Finsen B, Zimmer J, González B, Castellano B (1998) Development of microglia in the postnatal rat hippocampus. *Hippocampus* 8:458–474
13. Dalmau I, Vela JM, González B, Finsen B, Castellano B (2003) Dynamics of microglia in the developing rat brain. *J Comp Neurol* 458:144–157
14. DalZotto S, Martí O, Armario A (2000) Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioral and physiological responses to the stressor. *Behav Brain Res* 114:175–181
15. De Vos K (2004) Cell counter. In: Rasband WS. Image J. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/1997–2005>
16. Earle KL, Mitrofanis J (1998) Development of glia and blood vessels in the internal capsule of rats. *J Neurocytol* 27:127–139
17. Ganter S, Northoff H, Mannel D, Gebicke-Harter PJ (1992) Growth control of cultured microglia. *J Neurosci Res* 33:218–230
18. Gavrilovic L, Dronjak S (2005) Activation of rat pituitary–adrenocortical and sympathoadrenomedullary system in response to different stressors. *Neuro Endocrinol Lett* 26:515–520
19. Gómez-González B, Escobar A (2009) Altered functional development of the blood–brain barrier after early life stress in the rat. *Brain Res Bull* 79:376–387
20. Guillemin GJ, Brew BJ (2004) Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J Leuk Biol* 75:388–397
21. Hayes CE, Goldstein IJ (1974) An  $\alpha$ -D-galactosyl-binding lectin from *Bandeiraea simplicifolia* seeds: isolation by affinity chromatography and characterization. *J Biol Chem* 249:1904–1914
22. Huang WL, Harper CG, Evans SF, Newnham JP, Dunlop SA (2001) Repeated prenatal corticosteroid administration delays astrocyte and capillary tight junction maturation in fetal sheep. *Int J Dev Neurosci* 19:487–493
23. Huck SW (2000) Fully repeated measures analyses of variance. In: Huck SW (ed) Reading statistics and research. Longman, New York, pp 467–500
24. Imamoto K, Leblond CP (1978) Radioautographic investigation of gliogenesis in the corpus callosum of young rats. II. Origin of microglial cells. *J Comp Neurol* 180:139–163
25. Jacobson M (1991) Developmental neurobiology. Plenum Press, New York
26. Kaur C, Wu CH, Wen CY, Ling EA (1994) The effects of subcutaneous injections of glucocorticoids on amoeboid microglia in postnatal rats. *Arch Histol Cytol* 57:449–459
27. Kaur C, Too HF, Ling EA (2004) Phagocytosis of *Escherichia coli* by amoeboid microglial cells in the developing brain. *Acta Neuropathol (Berlin)* 107:204–208
28. Kaur C, Dheen ST, Ling E-A (2007) From blood to brain: amoeboid microglial cell, a nascent macrophage and its functions in developing brain. *Acta Pharmacol Sin* 28:1087–1096
29. Kristensen M, Hansen T (2004) Statistical analyses of repeated measures in physiological research: a tutorial. *Adv Physiol Educ* 28:2–14
30. Ling EA (1976) Some aspects of amoeboid microglia in the corpus callosum and neighboring regions of neonatal rats. *J Anat* 121:29–45
31. Ling EA (1982) Influence of cortisone on amoeboid microglia and microglial cells in the corpus callosum in postnatal rats. *J Anat* 134:705–717
32. Ling EA, Wong WC (1993) The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* 7:9–18
33. Ludkiewicz B, Domaradzka-Pytel B, Morys J (2001) Microglial and astroglial cells in the rat paraclaustral reservoir during postnatal development: an immunohistochemical study. *Acta Neurobiol Exp* 61:35–43
34. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP (2002) Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 62:609–614
35. Marín-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M (2004) Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 41:535–547
36. Mirescu C, Peters JD, Gould E (2004) Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nat Neurosci* 7:841–846
37. Nakajima K, Kohsaka S (1993) Functional roles of microglia in the brain. *Neurosci Res* 17:187–203
38. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314–1318
39. NRC (National Research Council) (2003) Guidelines for the care and use of mammals in neuroscience and behavioral research. National Academic Press, Washington DC
40. Ock J, Lee H, Kim S et al (2006) Induction of microglial apoptosis by corticotropin-releasing hormone. *J Neurochem* 98:962–972
41. Paxinos G, Watson C (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press–Elsevier, San Diego
42. Perry VH, Gordon S (1988) Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci* 11:273–277
43. Rasband WS (2004) Image J. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/1997–2005>
44. Sánchez-López AM, Cuadros MA, Calvente R, Tassi M, Marín-Teva JL, Navascués J (2005) Activation of immature microglia in response to stab wound in embryonic quail retina. *J Comp Neurol* 492:20–33
45. Sapolsky RM, Meaney MJ (1986) Maturation of the adrenal stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res Rev* 11:65–76
46. Streit WJ (1990) An improved staining method for rat microglial cells using the lectin from *Griffonia simplicifolia* (GSA I-B<sub>4</sub>). *J Histochem Cytochem* 38:1683–1686
47. Streit WJ, Kreutzberg GW (1987) Lectin binding by resting and reactive microglia. *J Neurocytol* 16:249–260
48. Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL (2006) The laboratory rat. American College of Laboratory Animal Medicine Series. Academic Press, New York

49. Szyndler J, Piechal A, Blecharz-Klin K, Skórzewska A, Maciejak P, Walkowiak J, Turzyńska D, Bidziński A, Plaźnik A, Widy-Tyszkiewicz E (2006) Effect of kindled seizures on rat behavior in water Morris maze test and amino acid concentrations in brain structures. *Pharmacol Rep* 58:75–82
50. Tanaka J, Fujita H, Matsuda S, Toku K, Sakanaka M, Maeda N (1997) Glucocorticoid- and mineralocorticoid receptors in microglial cells: the two receptors mediate differential effects of corticosteroids. *Glia* 20:23–37
51. Tseng CY, Ling EA, Wong WC (1983) Light and electron microscopic and cytochemical identification of amoeboid microglial cells in the brain of prenatal rats. *J Anat* 136:837–849
52. Uno H, Lohmiller L, Thieme C et al (1990) Brain damage induced by prenatal exposure to dexamethasone in fetal rhesus macaques. I. Hippocampus. *Dev Brain Res* 53:157–167
53. Wang W, Ji P, Riopelle RJ, Dow KE (2002) Functional expression of corticotropin-releasing hormone (CRH) receptor 1 in cultured rat microglia. *J Neurochem* 80:287–294
54. Wu CH, Wen CY, Shieh JY, Ling EA (1992) A quantitative and morphometric study of the transformation of amoeboid microglia into ramified microglia in the developing corpus callosum in rats. *J Anat* 181:423–430
55. Wu CH, Wen CY, Shieh JY, Ling EA (1993) A quantitative study of the differentiation of microglial cells in the developing cerebral cortex in rats. *J Anat* 182:403–413
56. Wu CH, Chien HF, Chang CY, Chen SH, Huang YS (2001) Response of amoeboid and differentiating ramified microglia to glucocorticoids in postnatal rats: a lectin histochemical and ultrastructural study. *Neurosci Res* 40:235–244
57. Zarrow MX, Phillipot JE, Denenberg VH (1970) Passage of 14C-4-corticosterone from the rat mother to the foetus and neonate. *Nature* 226:1058–1059
58. Zhou Y, Ling EA, Dheen ST (2007) Dexamethasone suppresses MCP-1 production via kinase phosphatase-1 dependent inhibition of JNK and p38 MAPK in activated microglia. *J Neurochem* 102:667–678