



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EFECTO DEL ESTRÉS NEONATAL SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LAS  
INTERLEUCINAS (6/12) Y LA RESPUESTA DE ANSIEDAD EN  
RATONAS ADULTAS”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**ANGELA GUADALUPE PÁEZ ROMERO**



**MÉXICO, D.F.**

**2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** QFB. SATURNINO DE LEON CHAPA  
**VOCAL:** QFB. PATRICIA ELVIRA BERRON RUIZ  
**SECRETARIO:** DRA. MARIA GUADALUPE REYES GARCIA  
**1er. SUPLENTE:** EBC. JULIO CESAR MARTINEZ ALVAREZ  
**2° SUPLENTE:** DR. FERNANDO GARCIA TAMAYO

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA MOLECULAR

## **ASESOR DEL TEMA:**

DRA. MARIA GUADALUPE REYES GARCÍA

## **SUPERVISOR TÉCNICO:**

DR. FERNANDO GARCÍA TAMAYO

## **SUSTENTANTE (S):**

ANGELA GUADALUPE PÁEZ ROMERO

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero quiero agradecer a mi H. Facultad de Química y a la Universidad Nacional Autónoma de México por formarme personal, académica y profesionalmente.

A todos los profesores que en el transcurso de mi carrera transmitieron sus conocimientos e hicieron crecer mi amor por la Química.

Un agradecimiento sincero y profundo a la Dra. María Guadalupe Reyes García por dirigirme en la elaboración de esta Tesis, por su paciencia, transmitir sus valiosos conocimientos, su apoyo económico, personal, académico y profesional.

Al Dr. Fernando García Tamayo por orientar, apoyar y brindarme su experiencia al realizar este trabajo.

Al Profesor Ricardo Rodríguez Saenz al ayudarme en el análisis estadístico de esta Tesis.

A mis compañeros de Tesis, Miriam y Juan Carlos, que en seminarios y actividades me apoyaron en la obtención de algunos resultados.

Al bioterio del edificio E de la Facultad de Química, UNAM, y al Laboratorio de Inmunoterapia Experimental del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM, por el acceso a las instalaciones y equipos.

A mis amigos, Anabel, Luz Elena, Janeritte y Enrique, por estar en mi vida en los momentos felices y difíciles, por su apoyo sincero e incondicional.

A mis compañeros y amigos, Jazmín, David, Perla, Eva, Nalleli, Ana Paula, Esther, Baruch, Sergio, Francisco, Miguel, y Daniela por su amistad.

## DEDICATORIA

A Dios, por permitirme finalizar esta etapa de mi vida y llenarme de entendimiento y fortaleza para lograrlo.

Especialmente está dedicada a mis padres Ernesto Páez y Elva Romero, por todo su apoyo incondicional, su aliento, su amor, paciencia y enseñanza; por enriquecer a cada instante mi vida, por ser los mejores críticos y darme casi siempre un comentario oportuno; por darme las bases de una vida digna y plena, y permitirme gozar de comodidades que han logrado que finalice mi carrera. ¡¡¡Dedicada a el esfuerzo, trabajo y desvelo que han entregado a mi vida!!! Los amo.

A mis hermanos, Claudia y Orlando, por ser mis mejores amigos la mayor parte de mi vida. Por el abrazo y el cariño que he obtenido de ustedes en mis mejores y peores momentos. Igualmente los amo.

A mi sobrina Renata, por ser esa personita que ha venido a llenar de alegrías la casa y regala esas sonrisas que hacen más leve el trabajo. Te amo.

A Roque, por ser mi compañero estos años, apoyarme y brindarme ese cariño que alienta, motiva y enseña; por formar parte importante en mi vida. Te amo.

# ÍNDICE

RESUMEN	8
I. ANTECEDENTES	
1.-Definición de estrés	10
2.-Estrés agudo y estrés crónico	11
3.-Cambios bioquímicos del estrés	12
4.-Cambios en el Sistema Nervioso Central	13
5.-Consecuencias clínicas del estrés	15
6.-Estrés neonatal	16
7.-Estrés y citocinas	17
8.-Interleucina 6	18
9.-Interleucina 12	20
10.-Hormonas y citocinas	21
11.-Estrés y conducta	22
12.-Pruebas etológicas	23
a) Laberinto elevado	
b) Tabla de husmeo	
13.-ELISA	24
II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	
Objetivos	27
Hipótesis	27

III. MATERIAL Y MÉTODOS	
1.-Animales y grupos	28
2.-Inducción del estrés	29
3.-Ciclado en las ratonas adultas	31
4.-Prueba del Laberinto elevado	32
5.-Prueba de la Tabla de husmeo	34
6.-Inyección de Lipopolisacáridos	35
7.-Extracción de sangre	35
8.-Cuantificación de citocinas	35
9.-Análisis estadístico	37
IV. RESULTADOS	
A) Inducción del estrés	38
i) Neonatal	
ii) Por inmovilización	
B) Destete	41
C) Ciclado de las ratonas	41
D) Pruebas etológicas	42
a) Laberinto elevado	
b) Tabla de husmeo	
E) Cuantificación de Interleucinas séricas	49
V. DISCUSIÓN	52
VI. CONCLUSIONES	59

VII. BIBLIOGRAFÍA	60
VIII. APÉNDICE	
1) Soluciones y reactivos	68
2) Abreviaturas	72



## RESUMEN

En este trabajo experimental se estudió el efecto del estrés neonatal, tanto sobre la producción de IL-6 e IL-12, como sobre las respuestas de ansiedad, en ratonas adultas de dos meses de edad. Para ello se utilizaron cuatro grupos de ratonas ICR, recién nacidas, que fueron sometidas a diferentes situaciones estresantes. El grupo I fueron las ratonas que solo se estresaron neonatalmente por separación materna por 3 horas, durante 15 días; el grupo II fueron las ratonas que recibieron tanto el estrés neonatal por separación materna como el estrés por inmovilización de la edad adulta. El grupo III fueron ratonas que solo se estresaron durante su edad adulta, por inmovilización en tubo, durante 1 hora, una sola vez. El grupo IV fue un grupo control de ratonas que no tuvieron ningún tipo de estrés. Cuando los animales tenían dos meses de edad, se evaluaron sus respuesta de ansiedad, utilizando las pruebas etológicas de laberinto elevado y de la tabla de husmeo. Para evaluar el efecto del estrés sobre el sistema inmune en esos mismos animales, al día siguiente de haber efectuado las pruebas etológicas se determinaron las interleucinas 6 y 12 en el suero de todas las ratonas, utilizando un ELISA-sandwich.

La cuantificación de las interleucinas mencionadas mostró que el estrés neonatal produce un aumento estadísticamente significativo en la IL-6, en relación al grupo control. Lo mismo sucedió cuando las ratonas son estresadas únicamente en la edad adulta. Por su parte, la IL-12 no mostró cambios estadísticamente significativos en ninguno de los grupos de ratonas que fueron estresadas neonatalmente, en la etapa adulta o en ambos.

En cuanto a las pruebas de ansiedad, la prueba de laberinto elevado mostró una tendencia a aumentar la respuesta de ansiedad en las ratonas estresadas, aunque ésta no fue estadísticamente significativa. Por el contrario, en la prueba del husmeo, las ratonas mostraron un comportamiento diferencial, de acuerdo al tipo de estrés que recibieron. Analizando la respuesta de ansiedad en la periferia

de la tabla de husmeo, se encontró que el estrés neonatal disminuye significativamente la conducta exploratoria cuando las ratonas reciben un segundo estrés en la etapa adulta. Por otro lado, el estrés neonatal y el estrés de la etapa adulta promueven ligeramente la conducta exploratoria de las ratonas en la periferia. Cuando se analiza el husmeo en el centro, tanto en las ratonas que reciben solo el estrés neonatal como las que reciben el estrés neonatal y el estrés a las 6 semanas de edad, se encuentra que el estrés neonatal deja una huella en la conducta, porque disminuyen su actividad exploratoria. En cambio, el estrés de la edad adulta favorece la actividad exploratoria de las ratonas.

En este trabajo se comprobó que el estrés neonatal sí deja una huella, tanto inmunológica como conductual, que se revela en la conducta exploratoria de la tabla de husmeo y en los niveles de IL-6 séricos. Existe una relación inversa entre los niveles de IL-6 y la actividad exploratoria en las ratonas que recibieron un estrés neonatal. Cuando las ratonas reciben el estrés neonatal solo o junto con el estrés en la etapa adulta, disminuyen su actividad exploratoria pero aumentan su producción de IL-6. Por lo tanto, la conducta exploratoria y la producción de IL-6 pudieran ser parámetros confiables para seguir estudiando las consecuencias del estrés temprano.

## I. ANTECEDENTES

### 1.- Definición de estrés

Numerosas definiciones se han propuesto para el concepto de estrés. Existen definiciones biológicas y psicológicas para el estrés, que fue descrito por primera vez por Hans Selye, después de inyectar ratas con extractos de ovarios disueltos en formalina. Él lo llamó el Síndrome General de Adaptación (GAS por sus siglas en inglés), en el que observó un aumento en el tamaño de las glándulas suprarrenales y una disminución del tamaño del timo.

La definición biológica del estrés es todo aquel estímulo o amenaza, real o imaginaria, que pone en riesgo la vida del individuo. El estrés activa una respuesta fisiológica inespecífica, que se presenta en todo ser vivo, desde los más sencillos hasta los más complejos. En los animales superiores se caracteriza por un aumento del cortisol (en humanos) o cortisona (en animales) y catecolaminas (adrenalina). Otras manifestaciones de la respuesta de estrés son el aumento de la glucemia, con la supresión de otras funciones no necesarias en ese momento como son la alimentación, la reproducción y el sueño.

El estrés biológico también se ha estudiado a nivel celular, siendo la mitocondria el sitio principal de su producción. Se le conoce como estrés oxidativo y en él los radicales libres, producidos por el oxígeno (ROS) o por el nitrógeno (NOS) durante el metabolismo de la glucosa, reaccionan con las proteínas, ácidos nucleicos y lípidos de la célula, modificando su estructura y la función. Este tipo de estrés se puede incrementar en condiciones fisiológicas como el ejercicio o en muchas patologías humanas como la hipertensión, la aterosclerosis, la diabetes mellitus, hipercolesterolemia, envejecimiento, etc (Drummond, 2011).

El estrés psicológico es todo aquello que haga sentir exaltado, furioso o tenso a una persona. Se puede sentir estrés por situaciones como casarse, mudarse de casa o trabajo, tener hijos, los exámenes escolares, la solicitud de un empleo, enfrentar un problema, etc. El estrés es parte de la vida cotidiana y se ha dicho que estrés es vida o que la vida es estrés, porque no puede existir la vida sin que

se tengan que enfrentar retos diarios en los que se debe reaccionar rápidamente, como en una situación estresante.

El estrés es una constante en nuestras vidas, necesario para la adaptación y supervivencia. Cualquiera que sea la forma de estrés que se presente, éste prepara al organismo para una respuesta de lucha o huida, ya que aumenta las probabilidades de supervivencia frente a una amenaza a corto plazo.

Por otra parte, el estrés puede inducir ansiedad. La ansiedad generalizada se define como un estado de malestar caracterizado por intranquilidad, expectación aprehensiva y aumento de la vigilancia en ausencia de un estímulo desencadenante. Con frecuencia se manifiestan también reacciones autonómicas, como sudoración, taquicardia, alteraciones gastrointestinales, tensión muscular, temor e insomnio, entre otras (Kaplan y Sadock, 1991). Asimismo, la ansiedad también puede definirse como uno de los procesos cerebrales directamente involucrados en la supervivencia de diferentes especies animales, especialmente de aquellas que por su naturaleza son víctimas de los depredadores (Kaplan y Sadock, 1991; LeDoux, 1995; Lister, 1990).

En roedores, el estado de ansiedad está directamente asociado con el comportamiento defensivo.

De acuerdo al tiempo de duración y las consecuencias que produce el estrés, se le ha clasificado en 2 tipos: agudo y crónico.

## 2.- Estrés agudo y estrés crónico

Estrés agudo es el tipo de estrés que tiene una duración de minutos a horas. Activa el estado de alerta en los individuos e induce un incremento moderado en la producción de adrenalina y cortisol. Este tipo de estrés tiende a ser benéfico porque activa temporalmente al organismo, para que sea capaz de atender o enfrentar los retos de la vida diaria. Desde el punto de vista inmunológico, el estrés agudo aumenta la respuesta inmune adaptativa e innata al producir un mecanismo defensivo, por lo que mejora las defensas del organismo. Cuando esta

respuesta de estrés se prolonga en el tiempo o no se elimina el agente causal del estrés, se produce un estrés crónico.

El estrés crónico es el tipo de estrés que persiste por semanas o meses. En él se produce un aumento notable en la producción de cortisol, al principio, que después va disminuyendo paulatinamente. Como el estímulo estresante persiste en el estrés crónico, se van desgastando los mecanismos regulatorios que tienden a mantener el estrés bajo control, lo que genera enfermedades. En términos inmunológicos, el estrés crónico disminuye la inmunidad, al elevar los mecanismos inmunosupresores del organismo, ya que producen una menor cantidad de células inmunes o reducen sus actividades.

El caso en el cual la respuesta de estrés deja de representar un mecanismo defensivo se presenta cuando las agresiones o los daños se prolongan demasiado y se vuelven crónicos; promoviendo una defensa prolongada que se vuelve desgastante. Este estrés crónico se caracteriza, también, por el aumento prolongado en la producción de citocinas pro-inflamatorias y hormonas esteroides, que causan alteraciones bioquímicas en algunas regiones del cerebro como el hipotálamo, la amígdala y el hipocampo (Reyes y García, 2005).

### 3.- Cambios bioquímicos en el estrés

Activación de la respuesta de estrés.

La respuesta de estrés es un evento fisiológico que para activarse requiere de 3 acontecimientos ordenados: primero, que se presente el estímulo estresante; segundo, que ese estímulo estresante sea reconocido como amenazante, por medio del cerebro y, tercero, se responda ante el agente dañino, mediante el sistema fisiológico de lucha o defensa.

La respuesta del organismo al estrés produce la interacción de estructuras de integración en el cerebro, en particular en el núcleo paraventricular del hipotálamo y la amígdala. La estimulación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HHA) hace que se sintetice la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en el hipotálamo,

que llega a la hipófisis anterior, y ahí libera a la hormona adrenocorticotrópica (ACTH). Ésta hormona viaja por la circulación hasta las glándulas suprarrenales, donde induce la secreción de cortisol, el que a su vez ejercen un control inhibitorio sobre los receptores centrales inhibiendo la respuesta hormonal al estrés y restaurando el estado de equilibrio (Vidal, 2006).

Las hormonas del eje HHA tiene un rol protector en la adaptación al estrés, pero una activación sostenida o desequilibrada ejerce efectos dañinos en un organismo. Así como el síndrome de adaptación general desencadena cambios de conducta, fisiológicos y bioquímicos, las células individuales responden a situaciones de estrés activando sistemas de segundo mensajero, desencadenando mecanismos de respuesta, algunos de los cuales intervienen en el proceso de muerte celular. El incremento en los niveles de glucocorticoides y catecolaminas disminuyen la respuesta inmune celular y favorecen la susceptibilidad a las infecciones y el desarrollo de una respuesta inmune humoral (Elenkov y Chrousos, 1999). Además, está demostrado que los glucocorticoides disminuyen la celularidad del timo al inducir la muerte de los timocitos por apoptosis o inmunosupresión, al romper el complejo del receptor de los linfocitos T (Löwenberg et al., 2007).

#### 4.- Cambios en el Sistema Nervioso Central

La función básica del sistema inmune es reconocer lo que es propio de aquello que no lo es y defender al organismo de sustancias extrañas. Para cumplir esta función recibe información del sistema nervioso central (SNC) y el sistema endocrino. El SNC recibe información de los órganos sensoriales, de los sistemas inmune y endocrino y, de esta manera, controla y regula sus respuestas. A su vez, la función del sistema endocrino es recibir información del cerebro y del sistema inmune, y mediante la secreción de hormonas, regular la actividad de éstos. El cerebro tendría así una función triangular dirigida al mantenimiento de la homeostasis, que integraría estrechamente los tres sistemas señalados (Rodríguez, 2000).

La bidireccionalidad entre el sistema inmune y el sistema nervioso está claramente establecida (Blalock, 2005). Una gran cantidad de receptores para las citocinas pro-inflamatorias se encuentran en el sistema nervioso central y otras cantidades de receptores específicos para neurotransmisores son expresados en las células inmunes periféricas (Straub et al; 1998). Cada vez que se liberan neurotransmisores por el sistema nervioso, éstos influyen sobre las células de los sistemas endocrino e inmune. Estos sistemas están interconectados porque comparten la producción de varios mensajeros y receptores.

El cerebro modula el sistema inmune mediante la inervación directa o por la acción de neurotransmisores, neuropéptidos y hormonas. Las lesiones cerebrales, el estrés, las enfermedades psiquiátricas y neurodegenerativas pueden alterar significativamente la síntesis, liberación y metabolismo de los neurotransmisores y, por lo tanto, alterar la inmunidad celular y humoral. Inversamente la respuesta inmune e inflamatoria afectan las funciones del SNC.

El principal nexo entre el cerebro y el sistema inmune lo constituye el sistema nervioso autónomo, simpático y parasimpático. El timo posee inervación vagal mediada principalmente por acetilcolina. La conexión del sistema nervioso autónomo simpático (SNS) con los órganos inmunes es principalmente noradrenérgica (Rodríguez, 2000). En el bazo, el desarrollo de las vías catecolaminérgicas en los revestimientos linfáticos periarteriolares, se acompaña de cambios paralelos en la distribución y organización espacial de los linfocitos T, indicando que la noradrenalina regula el desplazamiento de los linfocitos T dentro del bazo y la disposición en compartimientos de las células T y B, justo después del nacimiento (Mardomingo, 1994).

El sistema nervioso simpático está relacionado con la respuesta de estrés al liberar neurotransmisores que producen aumento en la presión arterial, la frecuencia cardiaca, la respiración, la glucosa en la sangre, la sudoración, los factores de coagulación, la acidez en el estómago, la producción de lágrimas.

El hipotálamo es la estructura anatómica que coordina la respuesta del organismo al estímulo estresante mediante las secreciones hormonales de los

órganos endocrinos y la acción del sistema nervioso autónomo, que inerva los tejidos del sistema inmune. La biología molecular, mediante la dilucidación de los mecanismos implícitos en la transducción de señales, nos ha permitido entender las múltiples posibilidades de la comunicación cruzada (cross-talk) celular, que se realiza entre neurotransmisores, hormonas o citocinas. De esta manera el SNC puede producir una respuesta neuronal, endocrina, inmune o emocional; inmediata, mediata; única o múltiple y diversa (Rodríguez, 2000).

## 5.- Consecuencias clínicas del estrés

Como el estrés es una respuesta fisiológica que se activa frente a un estímulo o agente estresante e involucra la puesta en marcha de todos los sistemas del organismo, el sistema nervioso responde liberando catecolaminas, mientras que el endócrino libera cortisol y el sistema inmune responde activando las células de la respuesta innata. La activación de estos 3 sistemas lleva a un incremento del ritmo cardiaco, sudoración, dolores de cabeza, tensión muscular, dolores abdominales, boca seca, necesidad de orinar, insomnio, depresión, desesperación, irritabilidad, cansancio, dificultad para concentrarse. Las células inmunológicas incrementan su número y la producción de mediadores solubles como las citocinas IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  y quimiocinas como IL-8. En un proceso infeccioso, estas citocinas son las responsables de los síntomas que experimentan las personas enfermas (Reyes, 2007).

Diversos trabajos experimentales han reportado que cuando las personas se enferman con un agente infeccioso, presentan una serie de síntomas inespecíficos, tales como debilidad, malestar, incapacidad para concentrarse, hipersomnio, anorexia, disminución de la actividad y pérdida de interés por las actividades diarias. A este síndrome se le denomina “conducta del enfermo” que es el resultado del proceso de debilitamiento que se presenta durante la infección. Investigaciones recientes han establecido que estos síntomas son el resultado de la acción directa del sistema inmune sobre el sistema nervios central, como consecuencia de la acción de las citocinas que alteran la neurotransmisión y



modulan las funciones endocrinas en el cerebro, originando cambios de comportamiento y cognitivos (Moreno et al; 2009).

Al actuar sobre el sistema nervioso, las citocinas estimulan las neuronas que controlan la vida neurovegetativa y modifican la liberación de los neurotransmisores (las catecolaminas), que son mediadores de las principales manifestaciones clínicas del estrés. Estos neurotransmisores representan una especie de interfase en las relaciones entre el sistema inmune y el cerebro, como un mecanismo más de retroalimentación (por ejemplo producción de glucocorticoides y de GABA), que tiende a modular neurológicamente los mecanismos defensivos (Reyes y García, 2005).

## 6.- Estrés neonatal

Para estudiar el estrés se han creado múltiples metodologías que se utilizan en humanos y en animales de experimentación. Éstas están enfocadas a buscar cambios bioquímicos o conductuales que son producidos por modificaciones en el medio ambiente o producidos por fármacos.

En muchos organismos, la manipulación experimental en el desarrollo temprano ha demostrado tener efectos importantes en la conducta de miedo y de ansiedad en la edad adulta (Bakshi y Kalin, 2002).

Algunos estudios utilizan el modelo de “separación materna” para inducir un estrés temprano en los animales de estudio. En este modelo, las crías son separadas de su madre en puntos críticos durante su desarrollo y el efecto de este estrés se estudia más tarde durante su vida (Schmidt et al., 2003).

El mecanismo exacto por el cual la separación materna afecta el comportamiento y el perfil neuroquímico de los individuos adultos aún no está totalmente entendido, pero incluye alteraciones y implicaciones cruciales en los procesos emocionales y cognitivos (Aisa et al., 2007).

Se propone que cuando el estrés y el aumento conjunto en la producción de citocinas pro-inflamatorias ocurre tempranamente, pueden dejar “huellas” que se prolongan hasta la vida adulta. Investigaciones realizadas sobre la relación madre-hijo, en roedores sometidos a condiciones estresantes, muestran que el estrés inducido al comienzo de la vida puede influir más adelante sobre la conducta del animal adulto (García y Reyes, 2004). En monos, las consecuencias del estrés neonatal se pueden observar hasta en la juventud de esos animales, que disminuyen la respuesta de algunas citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-6, cuando son estimulados con endotoxinas (Coe et al; 2002).

## 7.- Estrés y citocinas

Las citocinas son glucoproteínas de bajo peso molecular, secretadas principalmente por las células del sistema inmune, que sirven de mensajeras entre ellas, las células del sistema nervioso y/o el endocrino. Participan en el inicio, desarrollo y control la inmunidad innata, la inmunidad adquirida y la inflamación. Ejercen su acción en las células blanco, a través de receptores específicos de membrana que luego transducen la señal hacia el núcleo. Existen diferentes familias de citocinas, producidas por una gran variedad de células, con diferentes actividades biológicas; las más importantes son: los factores hematopoyéticos, las interleucinas, los interferones, las quimiocinas y el factor de necrosis tumoral.

Se ha observado que las citocinas que pueden influir sobre la conducta son las mismas que inducen y/o modulan la respuesta vascular de las reacciones inflamatorias y que, por lo tanto, pueden ser clasificadas como facilitadoras (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-18, IL-12, INF- $\gamma$ , IL-2, quimocinas) o inhibitoras (IL-10, IL-6, TGF- $\beta$ , IL-4, IL-13) de la inflamación (Reyes, 2007).

Las interleucinas (IL) y los factores necrosantes de tumores (TNF) son 2 clases de citocinas que no solo están relacionadas con la respuesta del sistema inmune, sino también con la respuesta inflamatoria (Goldsby et al; 1999) y con los cambios en la conducta (Dantzer, 2001).

Las interleucinas IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  causan alteraciones neuroendocrinas y conductuales que, por una parte activan el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, con la secreción consiguiente de la hormona liberadora de corticotropina, la hormona adrenocorticotrópica y glucocorticoides (cortisol) y, por otra parte, son responsables del síndrome que se denomina “conducta del enfermo”.

Además, se ha observado que cuando se eleva la concentración de IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-2 ellas influyen sobre el sueño, la temperatura corporal, el apetito, las conductas locomotoras y exploratoria, así como sobre el estado de ánimo (Dantzer, 2007). Cabe mencionar que la CRH activa los comportamientos observados en la respuesta al estrés (Bakshi et al., 2002).

Por otro lado, está ampliamente demostrado que cuando se presenta un estrés crónico, las citocinas pro-inflamatorias como la IL-12, disminuyen su producción y su efectividad (Levi et al., 2011).

## 8.- Interleucina-6 (IL-6)

La Interleucina 6 es una proteína soluble, glucosilada que sirve de mensajera entre las células del sistema inmune, nervioso y endocrino. Es el miembro principal que da nombre a la familia de las citocinas de la IL-6, que incluye la interleucina 11 (IL-11), el factor inhibidor de leucemia (LIF), el factor neurotrópico ciliar (CNTF), la cardiotrofina-1 (CT-1) y la oncostatina M (OSM). La IL-6 ejerce funciones importantes en la regulación inmune, inflamación, neurogénesis, oncogénesis, la activación de la respuesta de fase aguda, la inducción de fiebre, la remodelación del hueso, la hematopoyesis, la activación de la inmunidad innata. (Kishimoto 2010). Sus actividades biológicas las comparte con CNTF, LIF y OSM.

La IL-6 se produce constitutivamente a muy bajos niveles, aunque su producción puede aumentarse rápidamente, de novo, bajo estimulación, después de lo cual es secretada en diferentes masas moleculares, desde los 19 a los 26 kDa.

Las principales células productoras de IL-6 son macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, monocitos en respuesta a diferentes estímulos internos y externos, especialmente en procesos inflamatorios. También puede ser producida por los linfocitos Th2 CD4<sup>+</sup> que ya han reconocido un antígeno, células tumorales, neuronas, células de la glía, trofoblastos y células de Leydig (Akdis et al; 2011).

Las endotoxinas bacterianas, infecciones virales, forskolina, forbol miristato acetato (PMA), ionóforo de calcio A23187, IL-1, TNF- $\alpha$ , adrenalina, son buenas inductoras de la síntesis de IL-6, al igual que cualquier daño tisular que active macrófagos o células epiteliales.

La IL-6 puede actuar sobre una gran variedad de tipos celulares que incluyen a las neuronas del hipotálamo, amígdala, células de Sertoli, ovario, células del sinovio, células del mesangio, hepatocitos, médula ósea, entre otras, a través del receptor de la IL-6 (IL-6R), una glucoproteína transmembranal formada por 2 subunidades. Una que se une a la IL-6, y la otra, la gp130, que transduce la señal que va a activar las vías de las cinasas JAK-STAT y el factor de transcripción NF $\kappa$ B, que activa la síntesis de otras citocinas pro-inflamatorias (Suzuki et al; 2011).

Las actividades biológicas de esta interleucina pleiotrópica la involucran con una gran variedad de procesos fisiológicos entre los que están: en el cerebro, la IL-6 es un factor neurotrófico que participa en su remodelación, la sobrevivencia de las neuronas, neurogenesis y neuroregeneración. En las células beta del páncreas, ella aumenta la secreción de insulina (Suzuki et al., 2011). Se le encuentra elevada en el suero de pacientes con una gran variedad de condiciones patológicas que incluyen la activación de una reacción inflamatoria: infecciones virales o bacterianas, enfermos con SIDA, en pacientes con tumores o con artritis reumatoide, en mixoma cardiaco, aterosclerosis, diabetes, esclerosis múltiple y Alzheimer, enfermedad de Parkinson y de Huntington, depresión, autoinmunidad y hasta en autistas (Spooren et al., 2011).

La IL-6 está implicada en un amplio espectro de actividades biológicas, en defensa humoral así como en celular. Es una interleucina pleiotrópica porque

puede actuar sobre varios tejidos diferentes y estimular distintas actividades biológicas. Estimula la síntesis de las proteínas de fase aguda por los hepatocitos, al mismo tiempo que participa en la inducción de las reacciones inflamatorias que se necesitan para controlar las infecciones. Participa en la modulación de la inflamación cuando estimula la hipófisis y provoca un aumento en la producción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) estimulando las adrenales y eleva la síntesis de glucocorticoides. También estimula la expresión de las moléculas HLA de clase I sobre la membrana de fibroblastos y es un modulador de la proliferación inicial del tejido hematopoyético de la médula ósea. Influye sobre la diferenciación de varias células nerviosas (Kishimoto et al; 2010).

## 9.- La Interleucina 12

La interleucina 12 es una glucoproteína de secreción compuesta por las subunidades de 35 y 40 kDa; es el miembro principal de la familia de la interleucina 12, que además incluye a la IL-23, IL-27 e IL-35, casi todas ellas diméricas (Akdis et al., 2011). La p35 tiene secuencias de aminoácidos que la relacionan con la IL-6, mientras que la subunidad p40 tiene una homología con el dominio extracelular del receptor de IL-6 (IL-6R).

Es producida por células presentadoras de antígeno como las células dendríticas (CD), monocitos, macrófagos, células de la glía y neutrófilos y en menor grado por células B.

El receptor heterodimérico de la IL-12 (IL-12R) está compuesto por IL-12R $\beta$ 1, la cuál es una estructura relacionada con la superfamilia de receptores de citocinas tipo I, y por IL-12R $\beta$ 2, la cual es un homólogo de la subunidad gp130. Este receptor es expresado en células T, NK y dendríticas (CD) activadas y líneas de células B.

Participa en la inmunidad adquirida, ayudando al desarrollo y mantenimiento de las células Th1, al incrementar los niveles de INF- $\gamma$  en las células Th1 y NK (Akdis et al 2011), granzimas, TRAIL, FasL y CCL5. Además, activa indirectamente la

actividad antimicrobiana, antiparasitaria y antitumoral de los macrófagos y la actividad citotóxica de las células NK y las células asesinas activadas por linfocinas (LAK). Incrementa la maduración de los linfocitos T citotóxicos activados y es un factor estimulador de la maduración de las células NK. La IL-12 es excelente para inhibir la metástasis y el crecimiento tumoral en modelos murinos, aunque su aplicación en pruebas clínicas es limitada por inducir toxicidad gastrointestinal, leucopenia y esplenomegalia (Xu et al., 2010). La IL-12 induce la producción de INF- $\gamma$  en las células NK y T.

#### 10.- Hormonas y citocinas

Las hormonas sexuales estrógeno, testosterona y progesterona ejercen principalmente una actividad inhibitoria sobre la inmunidad (Giannoni et al., 2011), ya que disminuyen la producción de citocinas pro-inflamatorias.

La comunicación entre el sistema endocrino y el sistema inmune se lleva a cabo por acción de las hormonas y citocinas. El sistema endocrino modula la respuesta del sistema inmune, a través de los receptores para hormonas que poseen las células inmunes. A la inversa, los tejidos del sistema endocrino poseen receptores para citocinas que permiten modificar su actividad. Además, los leucocitos pueden producir diferentes hormonas, bajo condiciones normales, infecciosas o por activación con neurotransmisores, mientras que las células del tejido endocrino pueden producir diferentes citocinas en condiciones normales o de estrés (Rodríguez, 2000).

La hormona liberadora de corticotropina (CRH) es clave en la modulación inmunoendocrina durante la inflamación y el estrés. Es producida a nivel del SNC por el hipotálamo y la pituitaria, mientras que a nivel periférico es producida por el bazo y algunas células inmunes como los linfocitos T y los macrófagos, en los sitios que hay inflamación aguda o crónica. Periféricamente, la CRH parece actuar como un mediador pro-inflamatorio autocrino y paracrino, ya que después de que se une a sus receptores en los leucocitos, se produce AMPc, el cual estimula la

secreción de IL-1, IL-6 y ACTH en los monocitos y macrófagos (Vidal, 2006).

Existe evidencia de que las hormonas sexuales tienen un papel en la modulación del sistema inmune, como parece señalarlo la mayor frecuencia de enfermedades autoinmunes en las mujeres (lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, artritis reumatoide). Entre las hormonas sexuales, el papel clave en la modulación del sistema inmune parece tenerlo la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH). Sus agonistas revierten la atrofia del timo y la disminución de la respuesta linfoproliferativa relacionada con la edad, mientras sus antagonistas reducen la linfoproliferación, el porcentaje de células CD4+ y el peso del timo (García-Tamayo, 1995). Los estrógenos reducen los timocitos inmaduros y aumentan la respuesta humoral, mientras la testosterona suprime tanto el desarrollo celular como la producción de anticuerpos (Song y Leonard, 2000).

## 11.- Estrés y conducta

La activación del sistema inmune está acompañada de una variedad de cambios en el comportamiento (Kent et al; 1992) tales como anorexia, la reducción en la locomoción y en la actividad exploratoria (Dantzer et al; 2007). Las citocinas pro-inflamatorias secretadas como parte de un proceso inflamatorio tienden a ser las responsables de estos cambios conductuales, que también se activan cuando se presenta un estrés psicológico.

Cuando el tipo y niveles de citocinas se aumentan a causa de la presencia permanente de los agentes estresantes, éstas se mantienen activas durante demasiado tiempo; entonces, la mayor producción de las citocinas o la concentración elevada de glucocorticoides se convierten en factores que pueden influir sobre la conducta, produciendo por ejemplo depresión (Leonard, 2001).

En los últimos 20 años se han encontrado pruebas de que las citocinas pro-inflamatorias también tienen una actividad muy importante durante el desarrollo embrionario del cerebro, tanto en humanos como en ratones. Es por ello que los cambios bioquímicos del estrés neonatal, mediados por citocinas, pueden afectar

de una manera permanente el volumen y la celularidad de varias regiones del cerebro, trascendiendo en la conducta del individuo adulto (Coe et al, 2003).

Se ha observado que algunas alteraciones en la conducta pueden influir sobre la concentración en el suero de varias hormonas y/o citocinas (Elenkov et al; 2000). Cabe mencionar que las enfermedades mentales tales como la esquizofrenia, la depresión y el autismo se acompañan de niveles elevados de IL-6 en el suero.

## 12.- Pruebas etológicas

Para medir la conducta de ansiedad o la actividad ansiolítica de fármacos en los roedores o animales pequeños existen diferentes métodos: privación de agua/comida, shock eléctrico, ruidos fuertes, exposición a olores de depredadores, nado forzado, todos ellos basados en la exposición a un estímulo dañino que produce una respuesta condicionada.

### a) Laberinto elevado.

Un método muy simple y validado para medir la ansiedad en roedores es la prueba en el laberinto elevado (Wall and Frye, 2007), que además ayuda a definir regiones del cerebro y los mecanismos subyacentes relacionados con el comportamiento de ansiedad. El número total de entradas representa la actividad locomotora, mientras el porcentaje de tiempo que pasan en los brazos abiertos y el porcentaje de entradas en ellos indica la ansiedad, independientemente de la locomoción (Hogg, 1996).

El laberinto elevado es una estructura en forma de cruz, de 4 brazos, que se eleva 50 cm del piso. Cada brazo de la cruz es equidistante, con 10 cm de ancho x 50 cm de largo; 2 brazos están descubiertos y 2 brazos están cubiertos por paredes elevadas de 40 cm.

La prueba de ansiedad en el laberinto elevado consiste en exponer a los roedores a un ambiente nuevo, colocándolos en el centro de la cruz, con la cara hacia un brazo cerrado durante 5 minutos, una sola vez. El comportamiento



ansiolítico o ansiogénico se registra en video, colocando la cámara en lo alto del cuarto de registro. Esta prueba conductual evalúa la tendencia natural que tienen los roedores hacia los espacios cerrados u oscuros y su miedo a los espacios abiertos o elevados.

b) Tabla de husmeo

Otro método para medir la conducta de ansiedad en ratas y ratones es la tabla de husmeo, que consiste en una placa de acrílico de 40 x 40 cm y 1 cm de espesor, con 16 agujeros de 1.5 cm de diámetro, colocados de manera equidistante. Además tiene unas paredes de acrílico de 40 cm de alto para evitar que se escapen los ratones. Esta prueba, al igual que el laberinto elevado, se fundamenta en exponer a los animales a un ambiente nuevo, midiendo su conducta exploratoria y su tendencia a huir (ansiedad).

Cabe mencionar que los índices de ansiedad en el laberinto elevado no se correlacionan con la cantidad de exploración en la tabla de husmeo (Weiss et al, 1998).

### 13.- ELISA

Los ensayos inmunológicos son procedimientos en los cuales se utilizan anticuerpos como enlazantes “específicos” para identificar una gran variedad de moléculas. Tienen aplicación universal para la determinación o cuantificación de fármacos terapéuticos, sustancias químicas, diversas moléculas biológicas, agentes infecciosos o los productos que ellos liberan. Estas interacciones inmunológicas también son ampliamente usadas para buscar los anticuerpos de respuesta del huésped en el suero, en la orina, en el líquido cefalorraquídeo, en saliva y en cualquier líquido biológico (Guzmán-Vázquez, 2004).

El radioinmunoensayo desarrollado en 1959 por Yalow y Berson, es el precursor de los ensayos inmunoenzimáticos que fueron descritos originalmente en 1971 por Engvall y Perlmann, y Van Wemen y Schuurs. Sin embargo, el uso de material radioactivo ha limitado el uso del radioinmunoensayo, y a la vez ha

popularizado el empleo del inmunoensayo enzimático (EIA), del que hay dos técnicas principales: el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y el ensayo inmunológico multiplicado por enzimas (EMIT).

El ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas (ELISA) utiliza una enzima, como marcador de los anticuerpos, para mediar la formación de complejos antígeno-anticuerpo. El marcador enzimático que se emplea en estos análisis se conjuga con un ligando, que puede ser un antígeno, un anticuerpo específico para el antígeno de interés, o un anticuerpo primario (Brecher, 2003).

El ELISA se basa en el uso de antígenos o de anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática, pudiendo ser revelada mediante la adición de un sustrato específico que, en contacto con la enzima, producirá un color observable a simple vista y cuantificable por un lector de densidad óptica (Guzmán-Vázquez, 2004).

La técnica de ELISA se caracteriza por presentar alta sensibilidad y especificidad, además brinda la posibilidad de analizar un gran número de muestras de manera sencilla, rápida y económica, sin mayor infraestructura.

Los anticuerpos utilizados en el método ELISA son de origen monoclonal o policlonal, que se suministran como antisuero o fracciones de inmunoglobulinas purificadas. Pueden ser solubles o estar inmóviles en un soporte sólido; reconocen y se unen a un antígeno específico o a un anticuerpo primario según el protocolo de análisis (Brecher, 2003). Los antígenos se purifican o se producen con tecnología recombinante; pueden estar inmóviles o solubles, dependiendo del protocolo de análisis.

Los conjugados enzimáticos son antígenos o anticuerpos unidos en forma covalente a la enzima de elección. Así, el producto que se forma de la unión covalente entre la enzima y el antígeno o anticuerpo es el conjugado (Guzmán-Vázquez, 2004). Es posible también marcar de forma no covalente anticuerpos o enzimas con biotina y agregar avidina. La avidina posee cuatro sitios de unión para la biotina y no todos ellos participan en la interacción con el anticuerpo

marcado con biotina. Este procedimiento se acorta utilizando anticuerpo marcado con biotina y avidina marcada con la enzima (Brecher, 2003).

Las combinaciones de enzima y sustrato que se emplean en los diversos métodos ELISA incluyen: 1) peroxidasa de rábano y su sustrato peróxido de hidrógeno, que en presencia de cromógeno o-fenilendiamina produce un producto color amarillo-naranja medible, 2) beta galactosidasa y su sustrato o-nitrofenil-beta-D-galactopiranosido, que se transforma en un producto nitrofenolado amarillento medible; o 3) fosfatas alcalina y su sustrato p-nitrofenilfosfato, que también se transforma en nitrofenolato de color amarillo intenso. En la técnica de ELISA generalmente se utiliza ácido sulfúrico para inhibir la actividad enzimática y estabilizar el producto final de reacción colorida (Brecher, 2003; Watkins, 2001).

## **OBJETIVOS**

Demostrar que el estrés neonatal crónico modifica la conducta de las ratonas cuando se someten a un segundo estrés, en su edad adulta.

Estudiar si el estrés neonatal crónico, aplicado durante 2 semanas, modifica significativamente la producción de la IL-6 y la IL-12, en la edad adulta.

Estudiar si los cambios en la conducta inducidos por el estrés se evidencian mejor en la prueba del laberinto elevado que en la prueba del husmeo.

## **HIPÓTESIS**

El estrés neonatal aplicado del día 2 al 14, después del nacimiento, deberá de aumentar la producción de IL-6 en el suero.

En las ratonas estresadas neonatalmente durante 14 días, la síntesis de IL-12 sérica deberá de incrementarse.

Los ratones que reciben un estrés durante dos semanas en su etapa postnatal y luego se someten a un segundo estrés, en su edad adulta, deberán de tener un cambio de conducta mayor al que presentan los animales que solo recibieron el estrés neonatal.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 1.- Animales y grupos

Se utilizaron 4 ratonas embarazadas, *Mus musculus* ICR, compradas en Harlan México, las cuales se mantuvieron en condiciones óptimas, con libre acceso a alimento y agua, ciclos de luz/oscuridad de 12 h y temperatura de  $22 \pm 0.1$  °C. Cada una de ellas estuvo en su caja individual, en el bioterio del edificio E de la Facultad de Química, UNAM, hasta que parieron. En total se obtuvieron 56 crías de las 4 camadas, con entre 13 y 15 crías por ratona. De estas camadas, 2 de ellas nacieron el mismo día y se identificaron como M1 y M2, respectivamente; las 2 restantes nacieron al día siguiente y fueron identificadas como M3 y M4.



FIGURA 1. Imagen de las condiciones experimentales en las que mantuvieron a las mamás y a las crías de las 4 ratonas ICR utilizadas en este experimento. Las camadas fueron marcadas, en sus respectivas cajas, con el número de crías y día de nacimiento.

Las camadas M1 y M2 fueron seleccionadas para formar el grupo de ratones Estresados, recibiendo desde el segundo día de su nacimiento el primer tipo de estrés, y las camadas M3 y M4 fueron seleccionadas para formar el grupo de ratones Control. Estos dos grupos de ratones estresados y no estresados se dividieron a su vez en dos subgrupos, dependiendo de si recibieron o no inmovilización en la edad adulta (el segundo tipo de estrés). Así, todos los ratones se distribuyeron en 4 grupos: el grupo I estuvo formado por los ratones recién nacidos que recibieron solo el estrés neonatal, el grupo II fueron ratones que

recibieron el estrés neonatal y el de inmovilización, el grupo III estuvo formado por los ratones que solo recibieron el estrés por inmovilización, y el grupo IV contenía a los ratones que no recibieron estrés alguno. Para el experimento completo solo se utilizaron 20 hembras hijas (5 ratonas/grupo).

## 2.- Inducción del estrés

El procedimiento utilizado para inducir estrés fue de dos tipos. En el primero se aplicó un estrés neonatal, crónico, a los grupos I y II provocado por separación materna. En él, al día siguiente de su nacimiento, las crías se extrajeron de su caja y se trasladaron a otra caja sin aserrín, sin tapa y sin calor adicional durante 3 horas. Al concluir este periodo de tiempo, las crías correspondientes se devolvieron a su caja con su madre.

Este estrés se realizó por 2 semanas completas, los 7 días de la semana, y a la misma hora, desde las 9 am a las 12 am, en los grupos I y II. El traslado de los ratones recién nacidos de una caja a la otra caja se realizó por la misma persona, con el mayor cuidado posible, intentando la misma manipulación siempre y usando guantes de látex para no impregnar de olores externos a las crías.



FIGURA 2 . El estrés por separación materna, se realizó a los grupos I y II, en una caja de policarbonato desprovista de cama de aserrín, durante 3 horas por 14 días.

Una vez terminado el estrés neonatal, todas las crías se dejaron crecer hasta alcanzar las 3 semanas de vida; en ese momento, se destetaron y se separaron por sexos, colocando 5 ratonas por caja.

El segundo tipo de estrés, agudo, se indujo en las ratonas jóvenes, de 6 semanas de edad, mediante su inmovilización. Para ello, se utilizó un tubo de centrifuga de 50 ml, perforado en la punta; se introdujo completamente a cada ratona, con la cara hacia el orificio y cerrando el tubo con su tapa. Enseguida, el tubo se colocó parado verticalmente sobre la tapa y se dejó así a cada ratona, durante una hora. Este estrés se aplicó una sola vez a las ratonas de los grupos II y III, después de haber comprobado que todas se encontraban cicladas en Metaestro.

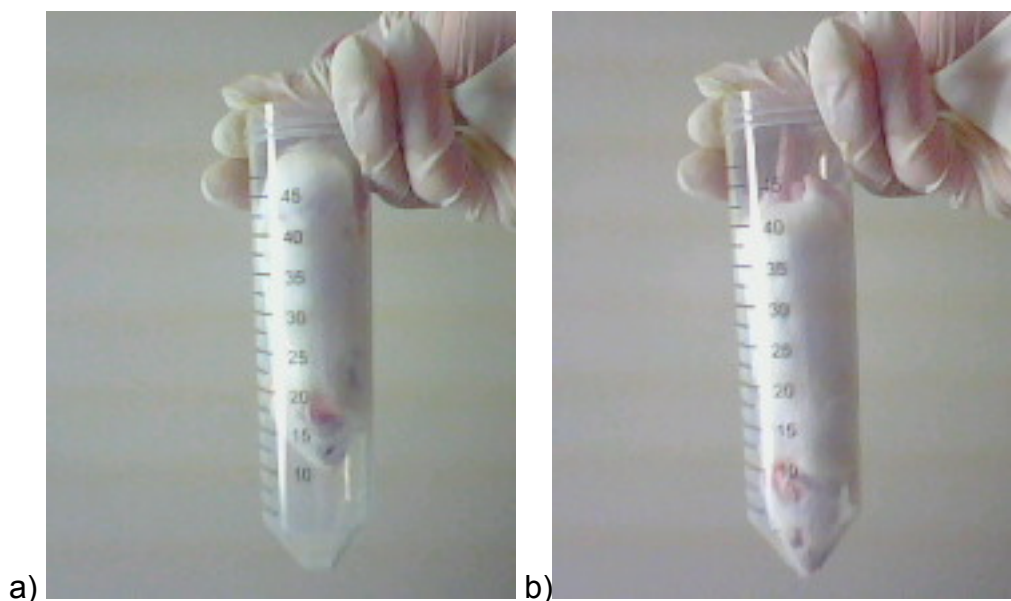


FIGURA 3. Imagen que muestra como se produjo el estrés por inmovilización, durante 1 hora, a cada ratona de 6 semanas de vida. a) Se colocó a cada animal dentro de un tubo de centrifuga de 50 ml, con la punta perforada. b) Luego, se introdujo completamente la ratona en el tubo y se colocó verticalmente sobre la mesa.

Para identificar a las hembras se marcaron por medio de muescas en las orejas, quedando así: grupo I, un orificio en la parte inferior de la oreja derecha, grupo II, un orificio en la parte inferior de la oreja izquierda. El grupo III se identificó

con un orificio en la parte superior de la oreja derecha. El grupo IV no fue marcado.

### 3.- Ciclado en las ratonas adultas

Para estudiar el efecto que tiene el estrés neonatal sobre la inmunidad, se buscó medir la producción de citocinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-12, en el suero de las ratonas adultas. El trabajar con animales hembras, implica el control de su estado hormonal, y para ello, se ciclaron las ratonas. Los 4 grupos de 5 ratonas de 6 semanas se pusieron en cajas conteniendo el aserrín proveniente de las cajas de ratones ICR, machos, jóvenes que se mantuvieron sobre él durante 1 semana.

Tres días después de introducir a las ratonas jóvenes en las cajas que contenía el aserrín usado por los ratones machos, se hizo el estudio del frotis vaginal. El procedimiento para el frotis consiste en sujetar a la ratona suavemente por la cola sobre una mesa y levantarle las patas traseras, manteniendo las delanteras en contacto con la mesa. Luego, con una pipeta Pasteur con la punta redondeada y un bulbo de hule colocado en el otro extremo de la pipeta, se introducen unas 2 gotas de agua destilada en el orificio vaginal. Con la pipeta rápidamente se hace un pequeño lavado vaginal e inmediatamente se recoge el agua, que se coloca en un portaobjetos. La muestra se tiñe con azul tripano al 4%, se tapa con un cubreobjetos e inmediatamente se observa al microscopio óptico, a un aumento de 40x.

Para poder utilizarse en el estudio de la conducta post-estrés y sobre la producción de las interleucinas 6 y 12, solamente se seleccionaron las ratonas que se encontraban en fase de Metaestro.





FIGURA 4. Técnica para realizar el frotis vaginal en cada ratona, utilizando la caja de alojamiento como soporte.

#### 4.- Prueba del laberinto elevado

Después de comprobar el ciclaje de todas las ratonas en Metaestro y de haber sometido inmediatamente al estrés por inmovilización a las ratonas de los grupos II y III, a todas las ratonas se les aplicaron las pruebas de conducta del laberinto elevado y de husmeo, para estudiar el efecto que el estrés neonatal y/o por inmovilización produjeron.

El laberinto elevado consiste en una cruz recta, hecha de acrílico opaco, con 4 brazos de 50 cm de largo y 10 cm de ancho, cada uno, que se elevan a 50 cm de altura por unos soportes de madera colocados en cada brazo y en el centro. Los 4 brazos se juntan en el centro formando un cuadrado de 10 cm por lado. Dos de los brazos localizados sobre el mismo eje se cubren en la periferia con unas paredes de acrílico oscuro de 40 cm de altura, en forma de U, que dejan descubierto solo el extremo de la cruz unido al centro. A esta estructura se le

conoce como brazos cerrados, mientras que los brazos perpendiculares, que no llevan estas estructuras se les denomina brazos abiertos.

Este tablero se ubicó en un cuarto adyacente a otro en el que se encontraba una cámara de video Samsung, conectada a una computadora laptop Gateway, con la cual se controlaba la grabación de la prueba.

La prueba consistió en colocar a la ratona en la parte central del laberinto mirando a uno de los brazos abiertos y grabándola en video por 5 minutos, según (Pellow y File 1986). Al terminar la filmación, se retira a la ratona del laberinto elevado, se limpian sus evacuaciones y se da una limpieza final con una solución de cloro, dejándola secar antes de estudiar al siguiente animal.



FIGURA 5. El laberinto elevado consiste en una cruz formada por 2 brazos cerrados y 2 brazos abiertos. La ratona se coloca en el centro y se graba por 5 minutos.

Al terminar el experimento se analizó cada video contando el número de veces que entró cada ratona en los brazos abiertos y en los brazos cerrados del laberinto; también se cuantificó el tiempo total que permanecieron en estas áreas o estuvo en el centro del laberinto. La lectura del video la realizó una sola persona, manteniendo los videos con un número aleatorio e identificándolos solo al finalizar la lectura de todos los videos, evitando así un sesgo en dichas lecturas.

## 5.- Prueba de la tabla de husmeo

La prueba del husmeo se realizó utilizando un tablero de acrílico opaco, de 40 x 40 cm, en el cual se encuentran 16 agujeros redondos de 1.5 cm de diámetro, distribuidos equidistantes sobre su superficie. El tablero está elevado a 2 cm de altura por unos soportes de acrílico, en sus 4 esquinas. Para que no se salieran fuera de esa área las ratonas, se le colocaron unas paredes de acrílico, removibles, de 40 cm de alto, como el usado por Weiss et al, 1998.



FIGURA 6. Tabla de husmeo, con 16 agujeros, con paredes removibles. La ratona se colocaba en el centro y era grabada en video por 5 minutos.

La prueba del husmeo consistió en colocar a cada ratona, de manera individual, en el centro del tablero y grabarla por 5 minutos. Al finalizar la prueba con cada ratona, el tablero se limpió de las excreciones con papel y luego con una solución de agua clorada y papel, dejando secar al aire, antes de estudiar al siguiente animal.

Al concluir las pruebas, se analizaron todos y cada uno de los videos, contando el número de “husmeos”. Un husmeo se contabilizó cuando la cabeza completa de la ratona se introdujo en el hoyo. Para la interpretación de la prueba,

los 16 hoyos de la tabla de husmeo se dividieron en centrales (4) y periféricos (12); al final se compararon los resultados obtenidos en los hoyos centrales con los de los agujeros periféricos. La lectura del video la realizó una sola persona, manteniendo los videos con un número aleatorio e identificándolos solo al finalizar la lectura de todos los videos, evitando así un sesgo en dichas lecturas.

#### 6.- Inyección de lipopolisacáridos

Un día después de las pruebas conductuales, cada ratona recibió una inyección (100  $\mu$ L) por vía intraperitoneal (IP), de una solución conteniendo 5mg/mL de lipopolisacáridos (LPS) bacterianos (E coli O111:B4), dejándolas en reposo por 4 horas. La administración de LPS se utiliza para inducir el síndrome de la “conducta del enfermo” y la rápida liberación de citocinas pro-inflamatorias (Dantzer et al., 2007).

#### 7.- Extracción de sangre

Cuatro horas después de la inyección IP de LPS, las ratonas fueron anestesiadas por vía IP con 50 mg/kg de pentobarbital sódico (Eutalender) e inmediatamente se les sangró a blanco por extracción del ojo, depositándola en viales. La sangre se dejó coagular durante 1 hora y luego se separó el coagulo de las paredes del vial. El suero se separó del coagulo por centrifugación de los viales a 2000 rpm durante 3 minutos en una centrífuga refrigerada a 4°C. La sangre se guardó a -20°C hasta que se utilizó en la medición de las citocinas inflamatorias.

#### 8.- Cuantificación de citocinas

Se realizó la cuantificación de las citocinas pro-inflamatorias (IL-6 e IL-12) por medio de la técnica de ELISA-sandwich en las muestras de suero.

Los anticuerpos de captura, monoclonales, anti IL-6 y anti IL-12 diluidos en una solución amortiguadora de NaHCO<sub>3</sub> (0.1 M, pH 8.2) se pegaron en las 2 placas de ELISA (EIA) a una concentración de 2 µg/mL y 6 µg/mL, respectivamente e incubándose toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente, se desechó el restante de anticuerpos de captura de todos los pozos y, en seguida, se lavaron 3 veces con una solución de PBS/Tween-20 al 0.05%. Posteriormente, todos los pozos se bloquearon con una solución de PBS/BSA al 3% y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se volvieron a lavar 4 veces con PBS/BSA y luego se añadieron en pozos independientes: 1º las citocinas recombinantes, a concentraciones entre 2000-15 pg/mL para obtener la curva estándar, y 2º los sueros de las ratonas en sus pozos correspondientes, diluidos en PBS/BSA al 1% e incubando nuevamente las placas toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente, se desechó el restante de las muestras y los estándares de las interleucinas y se lavaron los pozos 6 veces con PBS/Tween-20. Enseguida, se agregaron los anticuerpos secundarios, monoclonales, biotinilados anti IL-6 ó anti IL-12, diluidos en PBS/BSA al 1% a la concentración de 1mg/ml en sus pozos respectivos, incubando 1 hora a temperatura ambiente las placas. Al terminar esta incubación, se desechó el exceso de anticuerpos secundarios y los pozos se volvieron a lavar 6 veces con PBS/BSA. Después se agregó el conjugado estreptoavidina-peroxidasa diluida 1:4000 en PBS/BSA al 1% y se incubaron las placas por 45 minutos a temperatura ambiente. El restante del conjugado se eliminó de los pozos y se lavaron las placas 8 veces más, como antes. Finalmente, se añadió el sustrato ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbencetiazolin-6-sulfónico) (ABTS) a todos los pozos, tapando de la luz la reacción.

Las absorbancias de cada pozo se leyeron a los 15 y 30 minutos después, utilizando un lector de ELISA y un filtro de 405 nm.

## 9.- Análisis estadístico.

El análisis de los resultados de las pruebas de conducta en el laberinto elevado y la tabla de husmeo se hizo con la prueba no paramétrica de Chi cuadrada usando el programa GraphPad Prism 5. Los resultados de la cuantificación de las interleucinas 6 y 12 se hizo utilizando el programa de ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Tukey. El valor de p se fijo en 0.5%.

## IV. RESULTADOS

En este trabajo se estudió principalmente el efecto que el estrés neonatal ejerce sobre la conducta de ansiedad y la producción de las interleucinas 6 y 12 en 4 grupos de ratonas ICR jóvenes. El grupo I estuvo formado por las ratonas recién nacidas que recibieron solo el estrés neonatal, el grupo II fueron ratonas que recibieron el estrés neonatal y el de inmovilización, el grupo III estuvo formado por los ratonas que solo recibieron el estrés por inmovilización y el grupo IV contenía a los ratonas que no recibieron estrés alguno. Como en el diseño experimental se tenían considerados la inducción del estrés a diferentes edades, a continuación se muestran los resultados de cada estrés.

### A) Inducción del estrés

#### i) Neonatal

Todos los ratones de las 2 camadas utilizadas en la inducción del estrés neonatal sobrevivieron a los 14 días de separación materna diaria, durante 3 horas, como se puede apreciar en las figuras 1a) y 1b). No hubo ratones fallecidos ni enfermos. En la figura 1c) se muestra la misma camada de ratones, en su caja de alojamiento a los 7 días de nacidos. Las imágenes muestran que los ratoncitos tienden a agruparse para mantener el calor corporal entre ellos.

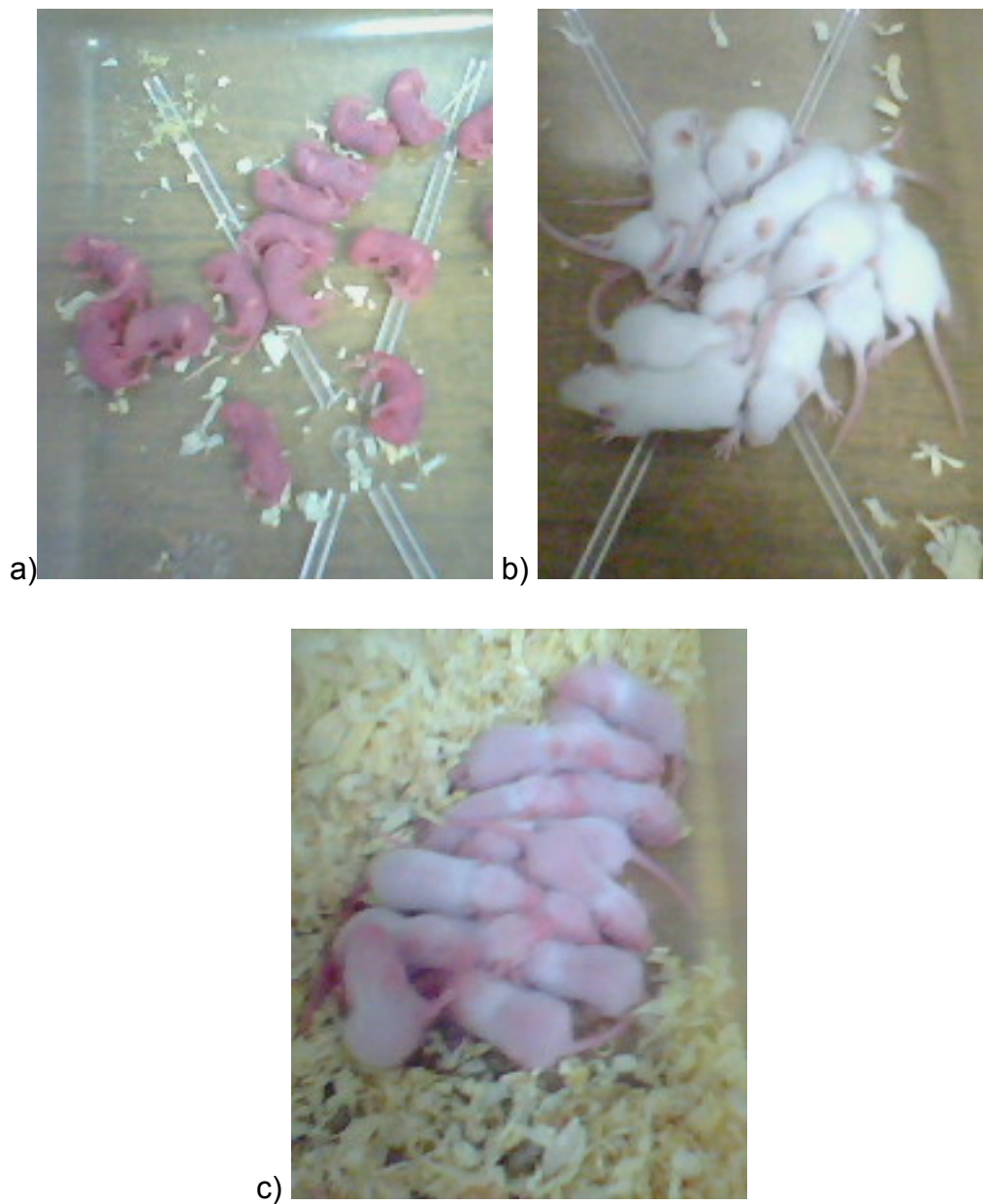


FIGURA 1. Estrés neonatal inducido en las 2 camadas de ratones ICR. a) Ratones ICR recién nacidos que fueron estresados por separación materna sobre una caja de policarbonato desprovista de cama de aserrín, durante 3 horas por 14 días. b) Los mismos ratones ICR a los 7 días de haber comenzado su estrés por separación materna. c) Imagen a las 2 semanas de vida de una de las 2 camadas de ratones ICR que fueron estresadas neonatalmente.



## ii) Por Inmovilización

Este tipo de estrés solo se realizó a los grupos de ratonas II (con estrés neonatal) y III (sin estrés neonatal) que ya habían sido destetadas y separadas por sexo, cuando ellas habían alcanzado las 6 semanas de edad.

Las ratonas adultas de 6 semanas de edad que fueron estresadas por inmovilización durante 1 hora, en una sola ocasión, mostraron diferentes conductas dentro del tubo. La mayoría de ellas mordían los tubos para tratar de escapar. Los tubos conteniendo cada ratona se tuvieron que poner parados verticalmente, sobre su tapa, para evitar que se rodaran, porque algunas ratonas eran muy inquietas. Una ventaja de esta posición es que, al invertir el tubo, tenían más espacio para respirar. Cuando se dejaban horizontales sobre la mesa, llegaron a caerse en algunas veces. La mayoría de las ratonas se orinaron o defecaron en la tapa.



FIGURA 2. Inmovilización de las ratonas adultas para estresarlas durante una hora. Cada ratona se introdujo con cuidado en un tubo de 50 ml con un orificio en el extremo cóncavo, por donde sacaba su nariz.

## B) Destete

Al terminar los 14 días de estrés neonatal, todas las crías de los 4 grupos experimentales se dejaron crecer dentro de sus cajas de alojamiento correspondientes, hasta que alcanzaron los 21 días de edad. En este momento, todos los animales fueron sexados, separados por sexo y destetados. Fueron reubicados en cajas que contenían 5 animales del mismo sexo/caja, de acuerdo al grupo experimental al que pertenecían. Todos los ratones se mantuvieron así hasta que alcanzaron la 6ª semana de vida. En este momento, se seleccionaron a las hembras de los 4 grupos para realizarles las pruebas de conducta que más adelante se mencionan.

## C) Ciclado de las ratonas

Como se necesitaba que las ratonas ICR de 6 semanas de edad se encontraran en la fase de metaestro, para poder estudiarlas inmunológicamente, se tuvo que hacer un ciclado de ellas. Para saber en que fase del ciclo estral se encontraban todas y cada una de ellas, se les hicieron frotis vaginales. Como se muestra en la siguiente figura, en esta fase del ciclo los frotis presentaron una gran cantidad de leucocitos y pocas células epiteliales queratinizadas en la mucosa vaginal, característico de la fase de metaestro.

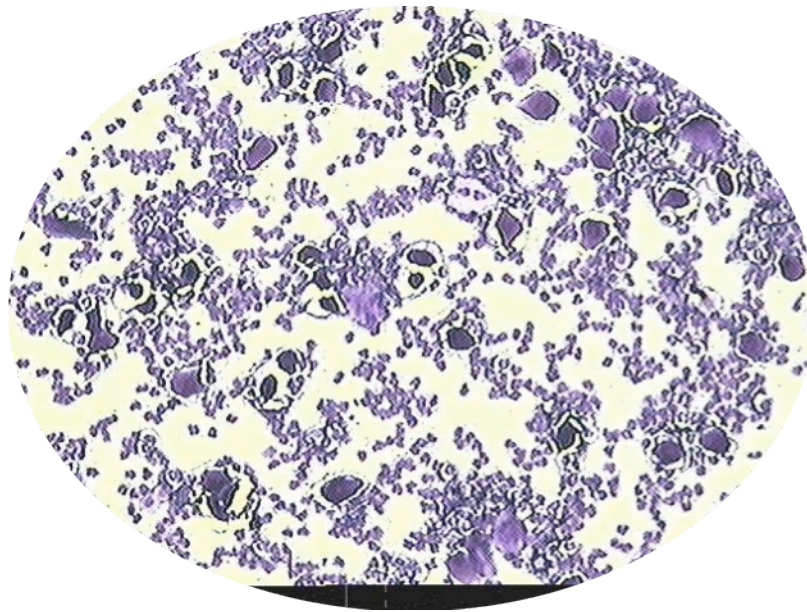


FIGURA 3. La imagen muestra la gran cantidad de leucocitos presentes en la fase de metaestro, teñidos con azul tripano al 4 %. Los leucocitos son los puntos morados pequeños y las células epiteliales son las figuras amorfas más grandes, intensamente teñidas de morado.

#### D) Pruebas etológicas

##### a) Laberinto elevado

La tabla 1 muestra el número de entradas de cada grupo experimental en cada uno de los brazos. Aquí se puede observar los grupos de ratonas estresadas tuvieron un comportamiento distinto, y hasta diferenciado, con respecto al que se presentó en el grupo control. Así, en los brazos abiertos, el grupo control (IV) tuvo el menor número de entradas en ellos que los grupos con algún tipo de estrés (I, II, III). En cambio, en los brazos cerrados, el grupo control (IV) hizo el mayor número de entradas en relación a los grupos con algún tipo de estrés (I, III) o con ambos tipos de estrés (II). Por otra parte, las ratonas estresadas neonatalmente (I) aumentan sus entradas en los brazos abiertos, mientras disminuyen el número de entradas en los brazos cerrados, en relación al grupo control, lo que indica que el estrés produce una mayor ansiedad en las ratonas,

haciendo que anden explorando en estos brazos abiertos. De los 3 grupos de ratonas estresadas, ellas fueron las que entraron menos veces a los brazos cerrados del laberinto, demostrando que fueron las más afectadas por estrés. Por su parte, las ratonas del grupo III incrementaron sus entradas a los brazos abiertos, pero disminuyeron sus entradas en los brazos cerrados, con respecto a las ratonas control. En conjunto, estos resultados muestran: 1) que el estrés neonatal sí afecta el comportamiento de los individuos y 2) que el estrés afecta el comportamiento de las ratonas de manera homogénea.

<b>Grupo</b>	<b>Brazo abierto</b>	<b>Brazo cerrado</b>	<b>Total</b>
<b>I</b>	22	50	72
<b>II</b>	22	61	83
<b>III</b>	25	60	85
<b>IV</b>	14	67	81

TABLA 1. Registro del número de entradas totales de cada grupo de ratonas, en cada uno de los brazos.

La tabla 2 muestra el tiempo, en minutos, que permanecieron las ratonas en cada uno de los brazos y en la parte central del laberinto elevado. Aquí se puede observar que todos los grupos pasaron más tiempo sobre los brazos cerrados, lo cual es semejante a lo que se observó en el número de entradas. Las ratonas del grupo control (IV) pasaron más tiempo en los brazos cerrados que los demás grupos, aunque es muy pequeña esta diferencia. De los grupos estresados, el grupo de ratonas al que se le aplicó ambos tipos de estrés (II) es el que pasó el mayor tiempo en los brazos abiertos y en los cerrados. La preferencia a permanecer en los brazos cerrados pudiera indicar que tuvieron un mayor grado de temor o prefieren una área protegida. Del mismo modo, en esta tabla se puede observar el tiempo que las ratonas se mantuvieron en el centro del laberinto elevado, dando una idea del tiempo de indecisión para dirigirse a uno de los brazos. Las ratonas del grupo control (IV) fueron las más indecisas y las ratonas estresadas neonatalmente fueron las más rápidas en dejar el centro del laberinto.

<b>Grupo</b>	<b>Brazo abierto</b>	<b>Brazo cerrado</b>	<b>Centro</b>
<b>I</b>	0:43	2:44	1:33
<b>II</b>	0:44	2:51	1:25
<b>III</b>	0:39	2:39	1:41
<b>IV</b>	0:23	2:52	1:45

TABLA 2. Registro de tiempo (minutos) total en cada uno de los brazos y su permanencia en el centro.

Al utilizar la prueba estadística de Chi cuadrada ( $X^2$ ) y tablas de contingencia de 2X2, se obtuvo que el valor de  $X^2$  era de 0.1765, al comparar el número de entradas en ambos brazos, en los cuatro grupos de ratonas estudiados (Tabla 3). Este resultado reflejó que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Por otra parte, al comparar el tiempo de permanencia, en segundos, de las ratonas en ambos brazos del laberinto elevado (Tabla 4), el valor de  $X^2$  fue de 0.9319 que, de igual forma, indicó que no existía diferencia estadísticamente significativa entre los 4 grupos experimentales ( $p < 0.6$ ).

		<b>ESTRÉS NEONATAL</b>		<b>Total</b>
		<b>SI</b>	<b>NO</b>	
<b>ESTRÉS CON TUBO</b>	<b>SI</b>	83	85	168
	<b>NO</b>	72	81	153
<b>Total</b>		155	166	321

TABLA 3. Tabla de contingencia de 2X2 para el número de entradas totales en ambos brazos del laberinto elevado.

$$X^2 = [321 * ((83*81)-(85*72))^2] / (155*166*168*153) = 0.1765$$

∴ No es significativo, con una probabilidad  $< 0.6$

		ESTRÉS NEONATAL		Total
		SI	NO	
ESTRÉS CON TUBO	SI	1084	994	2078
	NO	1009	983	1992
Total		2093	1977	4070

TABLA 4. Tabla de contingencia de 2X2 para el tiempo total de permanencia, en segundos, en ambos brazos del laberinto elevado.

$$X^2 = [4070 * ((1084*983)-(994*1009))^2] / (2093*1977*2078*1992) = 0.9319$$

∴ No es Significativo, con una probabilidad < 0.4

#### b) Tabla de husmeo

La Tabla 5 muestra el número de husmeos promedio en los grupos de ratonas estudiadas. En este aparato, cada grupo de ratonas tuvo un comportamiento particular. Las ratonas que recibieron el estrés neonatal y después el estrés por inmovilización (II) tuvieron el menor número de entradas, tanto en el centro como en la periferia, en relación a los demás grupos experimentales; por lo tanto, ellas fueron las que presentaron la menor conducta exploratoria. Llama la atención que las ratonas del grupo estresado solo neonatalmente (I) y del grupo estresado por inmovilización en la edad adulta (III) aumentaron un poco su exploración en la periferia, en relación al grupo control, mientras que los husmeos en el centro se aumentaron en el grupo III y disminuyeron en el grupo I, cuando se compararon con los de las ratonas control.

<b>Grupo</b>	<b>Husmeo centro</b>	<b>Husmeo periferia</b>	<b>Husmeo total</b>
<b>I</b>	20	155	175
<b>II</b>	14	103	117
<b>III</b>	28	158	186
<b>IV</b>	22	152	174

TABLA 5. Número de husmeos en cada región de la tabla de husmeo, de cada grupo de ratonas.

El gráfico 1 demuestra que el estrés neonatal (I) disminuye los “husmeos” en la parte central de la tabla de husmeo (-9.09%), en comparación con el grupo control (IV). La disminución en la actividad exploratoria en el centro de la tabla de husmeo se incrementó (-36.36%) cuando las ratonas recibieron un segundo estrés (II). Este resultado indicó que un estrés neonatal más un estrés en la edad adulta inhibieron aún más la exploración en este grupo de ratonas (II), cuando se les colocó en un nuevo ambiente. Por otra parte, el segundo estrés (III), por sí solo, incrementó el número de “husmeos” centrales de las ratonas (27.27%) en comparación con el grupo control. Todos estos resultados demuestran que: 1) el estrés ejerce un efecto diferenciado sobre el comportamiento de las ratonas y 2) un estrés neonatal agudo incrementa la ansiedad en las ratonas y, por tanto, disminuye su capacidad exploratoria en el centro de la tabla de husmeo.

## husmeo centro

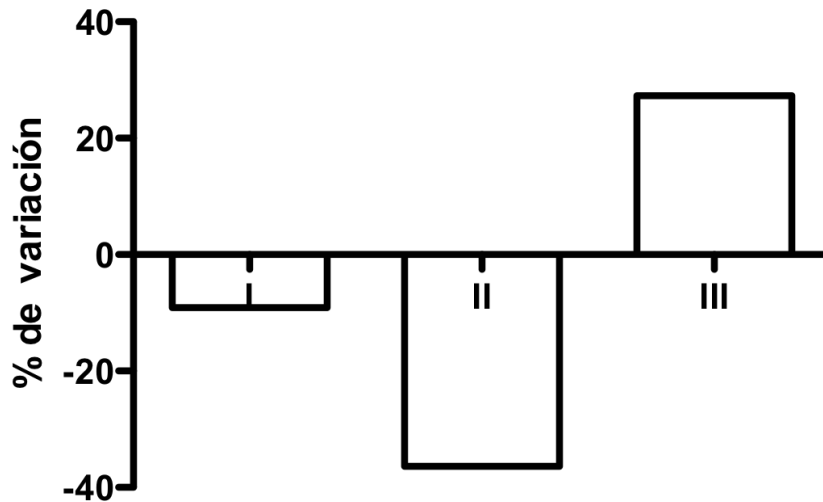


GRÁFICO 1. Incrementos en el número de husmeos en los hoyos centrales entre los grupos con algún tipo de estrés y el grupo control. I = estrés neonatal, II = estrés neonatal + estrés por inmovilización, III = estrés por inmovilización.

El gráfico 2 representa las variaciones en la conducta exploratoria en la periferia de la tabla de husmeo, en los 4 grupos de ratonas estudiadas. Aquí hubo una disminución notable (-32.23) en el porcentaje de husmeos que realizaron las ratonas sometidas a los 2 tipos de estrés (II), en comparación con el grupo control (IV). Esto demostró que el estrés provocó una inhibición de la actividad exploratoria en las ratonas del grupo II. Por su parte, las ratonas con un solo tipo de estrés (grupos I y III) aumentaron el número de “husmeos” en la periferia, aunque en menor proporción (1.97% y 3.94%, respectivamente) en relación a las ratonas del grupo control. Estos resultados indicaron que cuando se presenta un solo estrés, las ratonas tienden a incrementar su actividad exploratoria. Cuando el estrés se repite, en los individuos, hace que la conducta exploratoria se disminuya.



## husmeo periferia

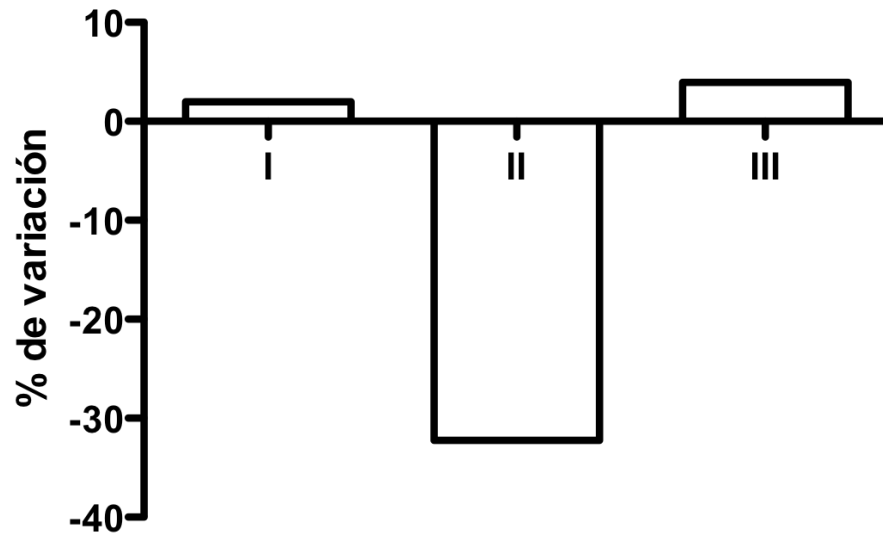


GRÁFICO 2. Cambios en el número de husmeos de los hoyos periféricos en los grupos con algún tipo de estrés y el grupo control. Grupo I (estrés neonatal), Grupo II (estrés neonatal + estrés por inmovilización), Grupo III (estrés por inmovilización) y Grupo IV (Control).

El análisis estadístico de la prueba de husmeo en las ratonas, utilizando la Chi cuadrada y una tabla de contingencia de 2X2, mostró que el valor de  $X^2$  era de 8.7185 al comparar los cuatro grupos de estudio. Este resultado sí fue estadísticamente significativo, con una probabilidad  $p < 0.01$ .

		ESTRÉS NEONATAL		Total
		SI	NO	
ESTRÉS CON TUBO	SI	117	186	303
	NO	175	174	349
Total		292	360	652

TABLA 6. Tabla de contingencia de 2X2 para el número total de husmeos en la tabla de husmeo.

$$\chi^2 = [652 * ((117*174)-(186*175))^2] / (292*360*303*349) = 8.7185$$

∴ Es significativo, con una probabilidad < 0.01

#### E) Cuantificación de interleucinas séricas.

##### a) IL-6

Al día siguiente de haber realizado las pruebas de conducta, todas las ratonas fueron inyectadas con LPS. A las 4 horas de esta inyección, cada una de las ratonas fueron anestesiadas con 50 mg/kg de pentobarbital sódico, se recolectó su sangre e inmediatamente se sacrificaron por dislocación cervical. El suero separado se utilizó para la cuantificación de citocinas pro-inflamatorias mediante un ELISA-sándwich.

La determinación de citocinas inflamatorias en el suero de las ratonas ICR presentó un comportamiento diferencial, a las 4 horas de haber sido estimuladas con los LPS bacterianos. La IL-6 subió de manera estadísticamente significativa en el suero de todas las ratonas sometidas a estrés, mientras que la IL-12 mostró niveles casi iguales en los 4 grupos de animales.

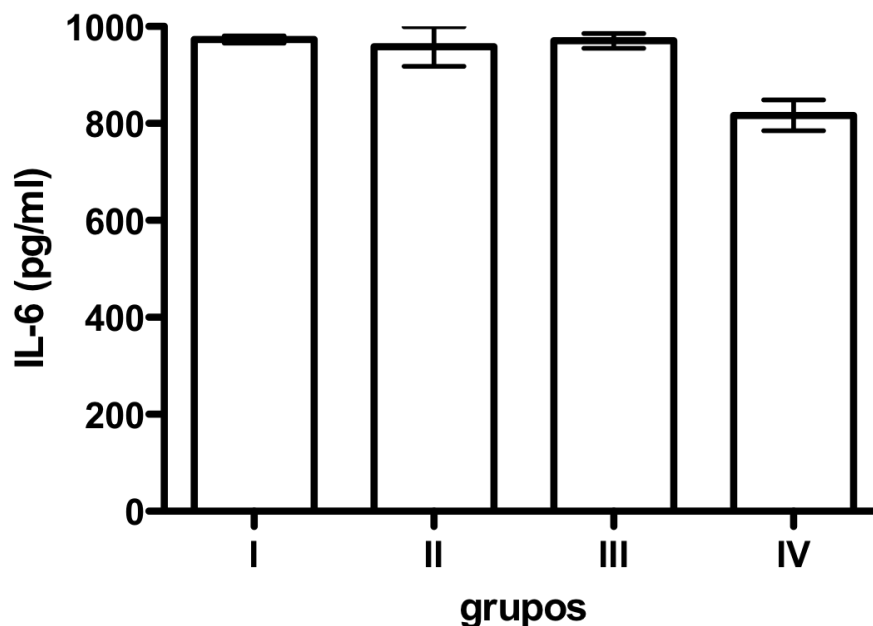


GRÁFICO 3. Niveles séricos de IL-6 producida por cada uno de los grupos de ratonas ICR estudiadas. Grupo I (estrés neonatal), Grupo II (estrés neonatal + estrés por inmovilización), Grupo III (estrés por inmovilización) y Grupo IV (Control).

Los ratonas estresadas neonatalmente (grupo I) fueron las que más subieron su producción de IL-6 (973.1 + 7.65 pg/ml) con un incremento de más de 150 pg/ml, respecto a los valores de IL-6 de las ratonas control. Las ratonas del grupo II, que recibieron tanto el estrés neonatal como el estrés por inmovilización, a los 2 meses de edad, aumentaron también su producción de IL-6 en el suero, solo que su aumento fue más discreto que en los otros 2 grupos de ratonas estresadas (958.4 + 40.91 pg/ml). Las ratonas del grupo III, que recibieron el estrés por inmovilización en su edad adulta, aumentaron su producción de IL-6 casi tanto como las ratonas estresadas después de nacer, alcanzando los 970.6 + 15.24 pg/ml. Los niveles de IL-6 en las ratonas control (grupo IV) estimuladas previamente con LPS fueron de 816.8 + 31.60 pg/ml. Los aumentos en la producción de IL-6 sérica en los 3 grupos de ratonas estresadas fueron diferentes estadísticamente ( $p < 0.05$ ) de los valores de IL-6 en el grupo control, al analizarlos

con la prueba de ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Tukey.

b) IL-12

Los niveles en suero de la IL-12 en cada grupo de ratonas ICR estresadas se muestran en el gráfico No. 4. En el se encontró que los valores de IL-12 en el suero de los 4 grupos de ratonas no mostraron diferencia estadísticamente significativas ( $p=0.14$ ) al comparar todos los grupos experimentales. Los valores promedio de IL-12 estuvieron entre los 54.1 y los 54.9 pg/ml

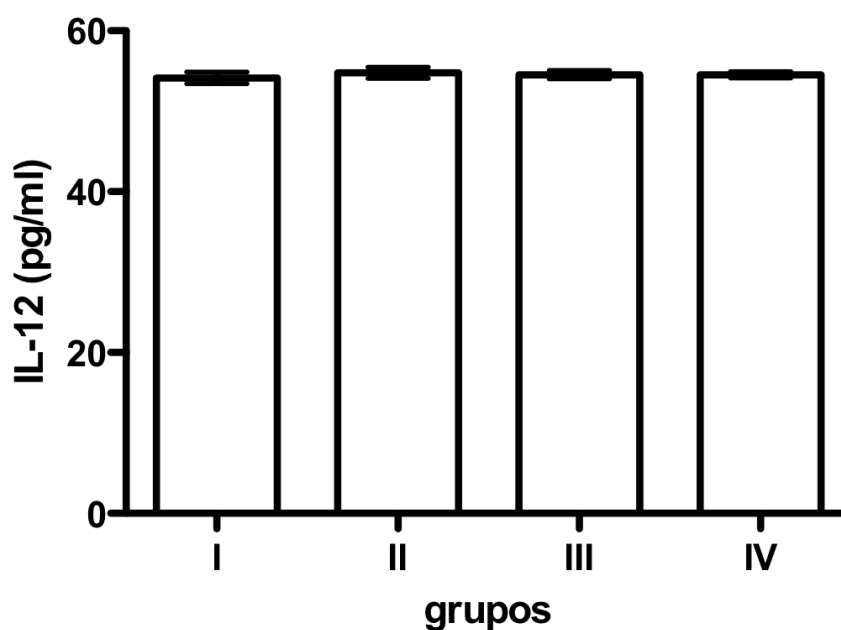


GRÁFICO 4. Cantidad de IL-12 producida medida en el suero de cada grupos de ratonas ICR estudiadas. Valores de media + desviación estándar.

## V. DISCUSIÓN

Nuestro trabajo sigue la misma línea de investigación que desde hace años han desarrollado diversos grupos que estudian las consecuencias del estrés temprano. Desde hace tiempo se conoce que las situaciones estresantes, en el periodo postnatal inmediato, pueden influir sobre la conducta de personas y animales de experimentación adultos. Estas investigaciones han sido muy importantes porque han revelado la necesidad de cuidar no solo la salud sino también el bienestar del recién nacido y, además, las repercusiones que pueden tener los maltratos y la exposición al estrés a una edad temprana.

Hace más de una década, Graham y col. (Graham et al., 1999) publicaron una revisión sobre el interés que existía en ese momento por estudiar las secuelas conductuales y neurobiológicas de la exposición a eventos tempranos adversos o estresantes. Aunque en ese momento la mayor parte de los estudios habían sido realizados sobre animales de laboratorio, principalmente roedores y algunos primates, los objetivos de todos ellos estaban dirigidos a la prevención y el tratamiento de los desórdenes que aparecían en niños y adolescentes como una consecuencia del abuso o el maltrato que ellos habían padecido a una edad temprana (Bremner et al., 1993). Actualmente, los objetivos de todos estos trabajos experimentales siguen siendo los mismos. Las limitaciones éticas que impiden provocar cualquier tipo de estimulación estresante en humanos recién nacidos, ha conducido los estudios hacia modelos animales y se han desarrollado una serie de pruebas que permiten conocer, con relativa exactitud, alteraciones conductuales similares a las que pueden presentar los humanos.

Probablemente los primeros trabajos en señalar la relación entre el estrés neonatal, la producción de corticosterona y los cambios conductuales fueron publicados por Levine y colaboradores (Levine et al., 1967). Ellos observaron que la estimulación eléctrica aumentaba los niveles de corticosteroides en el suero y afectaba la conducta de las ratas a una edad infantil. Estudios posteriores confirmaron la importancia del hipotálamo en estas respuestas de estrés y la

relación señalada entre los niveles elevados de glucocorticoides (cortisol en los primates y corticosterona en los roedores) y el aumento en la producción del factor estimulante de la liberación de corticotropina (CRF).

A continuación se multiplicaron las investigaciones al respecto y entonces se realizaron otros análisis más avanzados para conocer si el estrés temprano afecta o no la expresión ulterior de los receptores cerebrales para las hormonas adrenales y, más adelante, si sus consecuencias podían estar mediadas o no por mecanismos epigenéticos (Mc Gowan et al., 2009).

Nuestro trabajo estuvo dirigido, en primer lugar, a confirmar que, en las condiciones experimentales de nuestro laboratorio, el estrés neonatal causado por una separación materna, afecta la conducta de esos mismos animales cuando, una vez que alcanzaban la edad adulta, vuelven a ser sometidos a un estímulo estresante (ahora por inmovilización).

Los resultados de las pruebas utilizadas para medir la ansiedad de los animales inmovilizados mostraron que el antecedente de una separación materna en los días siguientes al nacimiento influye significativamente en la conducta. Las ratonas utilizadas en nuestro experimento tuvieron un comportamiento diferente al de sus controles cuando se les estudió su actividad motora sobre un área cerrada que tenía 16 agujeros, en los cuales ellas solamente podían introducir la nariz y husmear. Los animales estresados, particularmente los que habían sido colocados en esta situación a una edad neonatal, mostraron una motilidad disminuida, en los agujeros colocados en el centro de la tabla, mientras que aumentaron ligeramente su husmeo en los agujeros que estaban en la periferia. Esta tendencia a replegarse hacia las paredes y reducir la exploración del nuevo ambiente, en relación a los animales del grupo control, fue interpretada como una manifestación de ansiedad o miedo y resultó significativamente diferente a la mostrada por los ratones del grupo control.

Los resultados de la prueba anterior (prueba del husmeo) se compararon con los resultados de otra prueba (prueba del laberinto elevado). Sin embargo, no se obtuvieron resultados homólogos, porque colocados en el laberinto elevados no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de animales estresados y sus controles. En los animales que habían sido estresados disminuyeron los tiempos de permanencia en espacios cerrados que estaban ligeramente más oscuros, así como también disminuyó el número de veces que los animales entraban y salían de esos espacios cerrados. En cambio, los animales estresados tenían aumentados sus tiempos de exploración de los espacios abiertos, que estaban más iluminados y ofrecían menos seguridad.

En nuestras condiciones experimentales, la prueba del husmeo resultó más sensible para medir la ansiedad o el miedo de los animales que exploraban un ambiente nuevo, que la prueba del laberinto elevado. No formó parte de los objetivos de este estudio llevar a cabo una comparación entre las dos pruebas.

En el momento de comparar nuestros resultados con los de otros autores se encontró que la bibliografía reunida contiene resultados que difieren entre una y otra referencia bibliográfica. Probablemente esto se debe a que existen numerosas diferencias en el trabajo experimental, no solamente según la cepa, la edad de los animales y el procedimiento seleccionado para aplicar el estrés, sino también según el sexo. Esto último era de esperar, ya que se conoce el efecto de las hormonas sexuales sobre la conducta.

Nuestro trabajo no intentó comparar los efectos del género sobre las consecuencias del estrés neonatal. Solamente se eligió un modelo con animales hembra porque se observó que eran mucho más comunes los trabajos realizados sobre las consecuencias del estrés en animales macho que en animales hembra. Y se propuso probar que los efectos del estrés neonatal también se observaban en los ratones hembra. Probablemente las variaciones que introduce el ciclo estral y las dificultades para homogenizar las poblaciones bajo estudio pueden haber sido las causas de que no sean frecuentes los trabajos sobre animales hembra.

Pero en nuestro caso, no se presentaron problemas en el momento de ciclar las ratonas. Se tomó el cuidado de homologar cuidadosamente el periodo del ciclo estral de los animales antes de que fueran estresados y las desviaciones estándar de los promedios no mostraron dispersiones muy amplias de los valores encontrados.

Un trabajo reciente realizado en ratas (Biala et al., 2011) reveló que los animales hembra adultos normales mostraban niveles de ansiedad significativamente inferiores a los de los machos cuando se les aplicaba la prueba del laberinto elevado. Además, se pudo observar que si los animales eran sometidos a un estrés neonatal, se atenuaban esas diferencias según el género y los valores eran similares entre los dos sexos. Por otra parte, cuando el estrés neonatal fue aplicado a los animales de los dos sexos, en los dos grupos disminuyó la expresión de proteínas sinápticas en la región del hipocampo. Los autores atribuyen a la reducción de las sinapsis los cambios conductuales.

En nuestro experimento, el género de los ratones utilizados puede haber influido en los niveles de ansiedad que se alcanzaron cuando se aplicaron las pruebas para medir la conducta de los animales. Pero esto no introdujo ningún sesgo en los resultados porque todos los animales eran del mismo sexo y los resultados del análisis estadístico mostraron diferencias claramente significativas en una de las pruebas. La comparación entre los dos géneros no fue un objetivo de este trabajo experimental.

En algunos trabajos se menciona y se presentan pruebas de que el estrés neonatal disminuye las sinapsis interneuronales, particularmente en el hipocampo, y que esta alteración puede ser señalada como la responsable de los cambios conductuales que se presentan posteriormente en la edad adulta. Estudios más reveladores muestran que no solo disminuyen las sinapsis, sino también la cantidad de neuronas en algunas regiones del cerebro. Las imágenes de la resonancia magnética nuclear han mostrado que el estrés temprano puede disminuir hasta más de un 10% el área que ocupa el hipocampo izquierdo.



El hipocampo es una zona del cerebro muy importante para la conservación de los recuerdos y de ella depende la memoria de los ratones y de las personas. Algunos han sugerido que esa pérdida de tejido cerebral (y de los recuerdos) a causa del estrés temprano puede estar asociada a que posteriormente se desarrolle una personalidad irritable, hostil y depresiva, así como, por supuesto, una memoria deficiente (García et al., 2004). Otros autores mencionan que el animal estresado neonatalmente queda “marcado” de por vida a expresar una cantidad menor de receptores cerebrales para la corticosterona y que este otro fenómeno también influye en la conducta del animal adulto (su ansiedad) cuando vuelve a ser sometido a condiciones estresantes varios meses más tarde.

Finalmente, en los últimos años los cambios en los patrones de conducta han sido relacionados con la actividad del sistema inmune, particularmente con la producción de algunas citocinas pro-inflamatorias. Numerosos trabajos han mostrado, clínica y experimentalmente, que los niveles elevados de la IL-6 están casi constantemente asociados a un cambio significativo en el comportamiento. Se ha acuñado el término “síndrome de la conducta del enfermo” en el entendimiento de que esa persona tiene en ese momento un aumento en la producción de sus citocinas pro-inflamatorias (Dantzer 2001).

Trabajos más audaces sugieren una relación entre los niveles de algunas citocinas y varios desórdenes mentales como la esquizofrenia y las neurosis. Infecciones virales responsables de influenza en la madre embarazada, que probablemente representaron una situación de estrés para ella y el producto, han sido relacionadas con el desarrollo posterior de esquizofrenia en el adulto que se estuvo gestando durante la infección materna. Otros prefieren destacar la importancia de algunas citocinas en el desarrollo del cerebro durante el periodo embrionario normal y el significado que pueden tener los cambios en sus tasas de producción o sus concentraciones tisulares. Los trabajos más recientes se orientan hacia mecanismos más complejos y se refieren a las alteraciones epigenéticas como las causas de que un estrés temprano pueda dejar una “huella”

que no solo perdura hasta la vida adulta de una persona sino que, además, puede ser heredado a sus descendientes.

Nuestros resultados solamente muestran que las ratonas expresan cambios conductuales similares a los que han sido reportados en ratones macho después de haber sido expuestas a un estrés neonatal. La exploración de los mecanismos responsables de esos cambios no formó parte del trabajo y los resultados que muestran un aumento de la IL-6 en el suero de los animales expuestos al estrés no son probatorios de que esa citocina es la responsable de una conducta alterada, aunque si resultan sugestivos de que el estrés puede desordenar las interacciones fisiológicas entre los sistema nervioso, endocrino e inmune.

Los resultados obtenidos, respecto a la IL-12 nos demuestran que no hay una diferencia en la producción de esta citocina entre los diferentes grupos de ratonas estudiadas; esto se presentó, probablemente, a que el tiempo de medición de las interleucinas fue a las 4 horas después de ser estimulada su producción, y por tanto no es perceptible una mayor cuantificación, pero si es observable la relación entre la diferencia mínima en la producción de IL-12 entre los grupos de estudio.

La cuantificación de las interleucinas en este estudio no es comparable con la cuantificación en otros estudios, debido a que nosotros medimos la producción de citocinas séricas y comúnmente son medidas en cultivos de tejidos.

Estos resultados asocian el perfil de las respuestas conductuales e inmunes de los animales estresados neonatalmente que volvieron a ser estresados en la vida adulta. El presente trabajo es original. Experimentalmente, es la primera vez que se explora si el estrés neonatal altera o no paralelamente las relaciones entre la conducta y la producción de citocinas en los animales adultos.

El panorama general del estrés neonatal, su frecuencia y la posibilidad de que altere la conducta del individuo adulto, son razones suficientes que justifican abrir y explorar esta ventana hacia el cerebro que se está desarrollando. La intención

es conocer más profundamente sus funciones y poder prevenir o remediar el daño que pueda sufrir a causa del estrés.

## **VI. CONCLUSIONES**

1. Las ratonas adultas que son expuestas a un estrés agudo aumentan significativamente sus niveles de IL-6 en el suero y disminuyen su actividad motora.
2. El antecedente de un estrés neonatal crónico en las ratonas adultas que son expuestas a un estrés agudo aumenta sus niveles de IL-6 en el suero y reduce su actividad motora así como su conducta exploratoria.
3. Existe una relación inversa entre la producción de IL-6 y la conducta de las ratonas estresadas neonatalmente y luego estresadas en su edad adulta.
4. Cada uno de los tipos de estrés utilizados en este trabajo incrementaron la producción de la IL-6 sérica, mientras que no tuvieron efecto sobre la producción de la IL-12 a las 4 horas de haber estimulado su producción con LPS.

## **PERSPECTIVAS**

Estudiar la expresión de citocinas inflamatorias en las amígdalas y en la corteza prefrontal, sobre muestras de estos mismos animales que han sido guardadas en congelación.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

Aisa B., Tordera R., Lasheras B., Del Rio J., Ramirez M. J. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinol.* 2007, 32: 256-266.

Akdis M, Simone Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, Klunker S, Meyer N, O'Mahony L, Palomares O, Rhyner C, Quaked N, Schaffartzik A, Van De Veen W, Sabine Zeller, Maya Zimmermann M, and Akdis CA. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- $\gamma$ : Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2011, 127: 701-21.

Bakshi VP, Smith-Roe S, Newman SM, Grigoriadis DE, Kalin NH. Reduction of stress-induced behavior by antagonism of corticotropin-releasing hormone 2 (CRH2) receptors in lateral septum or CRH1 receptors in amygdala. *J Neurosci.* 2002, 22: 2926-35.

Besedovsky HO, del Rey A. Central and peripheral cytokines mediate immune-brain connectivity. *Neurochem Res.* 2011, 36: 1-6.

Biala YN, Bogoch Y, Bejar C, Linial M, Weinstock M. Prenatal stress diminishes gender differences in behavior and in expression of hippocampal synaptic genes and proteins in rats. *Hippocampus.* 2011, 21: 1114-1125.

Blalock JE. The immune system as the sixth sense. *J Int Med.* 2005, 257: 126-138.

Brecher ME. Technical Manual AABB Press 14Th Ed Bethesda, 2003.

Bremner J, Southwick S, Johnson D, Yehuda R, Charney D. Childhood abuse and combat related posttraumatic stress disorder in Vietnam veterans. *Amer J Psychiatry*. 1993, 150: 235-239.

Bruce S. Rabin. Stress, immune function, and health. Wiley-Liss. 1999. Pp. 9-18, 64-66, 313-322.

Coe CL, Kramer M, Kirschbaum C. Netter P, Fuchs E. Prenatal stress diminishes the cytokine response of leukocytes to endotoxin stimulation in juvenile monkeys. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002, 87: 675-681.

Coe CL, Kramer M, Czeh B, Gould E, Reeves AJ, Kirschbaum C, Fuchs E. Prenatal stress diminishes neurogenesis in the dentate gyrus of juvenile Rhesus monkeys. *Biol Psychiatry*. 2003, 54: 1025-1034.

Cohen H, Geva AB, Matar MA, Zohar J, Kaplan Z. Post-traumatic stress behavioural responses in inbred mouse strains: can genetic predisposition explain phenotypic vulnerability? *International Journal of Neuropsychopharmacol*. 2008, 11: 331-49.

Dantzer R. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain Behav Immun*. 2001, 15: 7-24.

Dantzer, R., Bluthé, R., Castanon, N., Kelley, K.W, Konsman, J.P., Laye, S., Lestage, J., Parnet, P. Cytokines, sickness behavior and depression. In: Ader, R. (Ed.), *Psychoneuroimmunology*, 2007. Elsevier, pp. 281–318.

Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, Sobey CG. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2011; 10: 453-71.

Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress, cytokine patterns and susceptibility to disease. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 1999, 13: 583-95.

Elenkov IA, Wilder RL, Chrousos GP y Vizi S. The sympathetic nerve-an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev.* 2000, 52: 595-638.

García Tamayo F. *Fundamentos de Inmunobiología*. UNAM, México 1997.

García-Tamayo F, Reyes-García MG, García-Móntez M. De la estimulación temprana al control hormonal: efectos de la conducta de los padres en el desarrollo cerebral del recién nacido. *Ciencia.* 2004, 38-46.

Giannoni E, Guignard L, Knaup Reymond M, Perreau M, Roth-Kleiner M, Calandra T, Roger T. Estradiol and progesterone strongly inhibit the innate immune response of mononuclear cells in newborns. *Infect Immun.* 2011, 79: 2690-98.

Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. Cytokines. En: KUBY Immunology. Fourth Edition. WH Freeman and Company. New York, 1999. pp. 301-327.

Graham YP, Heim C, Goodman SH, Miller AH, Nemeroff CB. The effects of neonatal stress on brain development: implications for psychopathology. *Develop Psychopathol.* 1999, 11: 545-565.

Guzmán-Vázquez E. Las pruebas de Elisa. *Gac Méd Méx* Vol. 140, Suplemento No. 3, 2004.

Hogg S. A review of the validity and the variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 1996, 54: 21-30.

Kaplan, H. I. & Sadock, B. J. *Synopsis of psychiatry: behavioral sciences/clinical psychiatry* (6 ed.). Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins (1991).

Karl Goodkin y Adriaan P. Visser. *Psychoneuroimmunology, stress, mental disorders and health.* American psychiatric press, inc. Washington, DC. 1999. pp. 1-40.

Kent, S., Bluthé, R., Kelley, K., Dantzer, R. Sickness behavior as a new target for drug development. *Trends Pharmacol Sci.* 1992, 13: 24–28.

Kiecolt-Glaser, Janice K. Stress, personal relationships, and immune function: Health implications. *Brain, Behav Immun.* 1999, 13: 61-72.



Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int immunol.* 2010, 22: 347-52.

LeDoux, J. E. Emotion: clues from the brain. *Ann Rev Psychol.* 1995, 46: 209-235.

Leonard BE. The immune system, depresión and the action of antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2001, 25: 767-780.

Levi B, Benish M, Goldfarb Y, Sorski L, Melamed R, Rosenne E, Ben-Eliyahu S. Continuous stress disrupts immunostimulatory effects of IL-12. *Brain Behav Immun.* 2011, 25: 727-35.

Levine S, Haltmeyer G, Karas G. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiol Behav.* 1967, 2: 55-63.

Lister, R.G. Ethologically based models of anxiety disorders. *Pharmacol. Ther.* 1990, 46: 321–340.

Löwenberg M, Verhaar AP, van den Brink GR, Hommes DW. Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression. *Trends Mol Med.* 2007, 13: 158-63.

Mardomingo S. MJ. *Psiquiatría del niño y del adolescente: Método, fundamentos y síndromes.* Ediciones Díaz de Santos S. A. 1994, Madrid. Págs: 181-182.

Mc Gowan PO, Sasaki A, D'Alessio AC, Dymov S, Labonté B, Szy M, Turecki G, Meaney MJ. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat Neurosc.* 2009, 12: 342-348.

Moreno L; Lamprea M; Duenas Z. Diferencias en los comportamientos asociados con la ansiedad de ratas macho y hembra expuestas a un protocolo de estrés crónico por separación maternal temprana. Fundación Universitaria Konrad Lorenz Bogotá, Colombia. *Suma Psicológica*, 2009, 16: 31-43.

Pellow S, File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1986, 24: 525-529.

Porterfield VM, Zimomra ZR, Caldwell EA, Camp RM, Gabella KM, Johnson JD. Rat strain differences in restraint stress-induced brain cytokines. *Neurosci.* 2011, 188: 48-64.

Reyes García MG y García Tamayo F. Citocinas, inflamación y conducta. *Vertientes. Revista especializada en ciencias de la salud*, 2005, 4-13.

Reyes García María Guadalupe. Tesis de Doctorado. Identificación de un receptor de GABA tipo A que modula la producción de IL-6/IL12 en macrófagos peritoneales de ratón. UNAM. 2007.

Rodgers RJ, Johnson NJ, Cole JC, Deward CV, Kidd GR, Kimpson PH. Plus maze retest profile in mice: importante of inicial stages of trial 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockade. *Pharmacol Biochem. Behav.* 1996, 54: 41-50.

Rodríguez AC. Estrés y respuesta inmune. *AVANCES, Asociación Colombiana de Psiquiatría Biológica.* 2002, 3: 18-29.

Schmidt, M., Enthoven, L., van der Mark, M., Levine, S., de Kloet, E.R., Oitzl, M. The postnatal development of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the mouse. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2003, 21: 125–132.

Seyle, H. The nature of stress. Journal Reprint Edition and a Professional/Researcher Edition. Available exclusively from ICNR.

Song C., Leonard B.E. *Fundamentals of Psychoneuroimmunology*. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, 2000.

Spooren A, Kolmus K, Laureys G, Clinckers R, De Keyser J, Haegeman G, Gerlo S. Interleukin-6, a mental cytokine. *Brain Res Rev.* 2011, 67: 157-183.

Straub RH, Westermann J, Schölmerich J, Falk W. Dialogue between the CNS and the immune system in lymphoid organs. *Immunol Today.* 1998, 19: 409-413.

Suzuki T, Imai J, Yamada T, Ishigaki Y, Kaneko K, Uno K, Hasegawa Y, Ishihara H, Oka Y, Katagiri H. Interleukin-6 enhances glucose-stimulated insulin secretion from pancreatic beta-cells: potential involvement of the PLC-IP3-dependent pathway. *Diabetes.* 2011, 60: 537-47.

Vidal Gómez J. *Psiconeuroinmunología*. Edicions Universitat Barcelona, 2006.

Wall AA and Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protocols.* 2007, 2: 322-328.

Watkins WM. The ABO blood group system: historical background. *Transfusion Med.* 2001,11: 243-65.

Wayne WD. *Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud.* Limusa, México, 2005. Cuarta edición.

Weiss SM, Wadsworth G, Fletcher A and Dourish CT. Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev.* 1998, 23: 265-71.

Wilson DR. Stress management for adult survivors of childhood sexual abuse: a holistic inquiry. *West J Nurs Res.* 2010; 32: 103-27.

Xu M, Mizoguchi I, Morishima N, Chiba Y, Mizuguchi J, Yoshimoto T. Regulation of antitumor immune responses by the IL-12 family cytokines, IL-12, IL-23, and IL-27. *Clin Dev Immunol.* 2010; 2010. pii: 832454.

Yamada K, Iida R, Miyamoto Y, Saito K, Sekikawa K, Seishima M, et al. Neurobehavioral alterations in mice with a targeted deletion of the tumor necrosis factor-alpha gene: implications for emotional behavior. *J Neuroimmunol.* 2000, 111: 131-38.

## VIII. APÉNDICE

### 1) Soluciones y Reactivos

#### Albúmina sérica bovina al 1%

Albúmina sérica bovina 1.0000 g

Solución de PBS estéril pH 7.2-7.4 100 ml

Preparar el día de su uso y mantener en refrigeración a 2-8 °C

#### Albúmina sérica bovina al 3%

Albúmina sérica bovina 3.0000 g

Solución de PBS estéril pH 7.2-7.4 100 ml

Preparar el día de su uso y mantener en refrigeración a 2-8 °C

#### Alcohol al 70 %

Alcohol etílico desnaturalizado 96% 72.9 ml

Agua destilada 27.1 ml

#### Anticuerpos de captura anti IL-6

mAb de rata IgG1 (MP5-20F3, PharMingen, San Diego, CA)

anti IL-6 de ratón. 2 µg/ml

Anticuerpos de detección anti IL-6

mAb IgG2a, de rata, biotinilado (MP5-32C11, PharMingen, San Diego, CA) anti IL-6 de ratón. 1 µg/ml

Anticuerpos de captura anti IL-12

coctel de anticuerpos de hámster IgG e IgG2a de rata (Red-T G297-289, PharMingen, San Diego, CA) anti IL-12p40/p70 de ratón. 12 µg/ml

Anticuerpo de detección, anti IL-12

mAb, biotinilado (C17.8, PharMingen, San Diego, CA) anti IL-12p40/p70 de ratón. 1 µg/ml

Amortiguador de pegado (0.1M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.2)

NaHCO<sub>3</sub> 0.0840g

Disolver en agua destilada 8 ml

Ajustar pH con HCl 0.1 M

Aforar a 10 ml

Azul de tripano al 0.4%

Azul tripano	0.4000 g
NaCl	0.0425 g
H <sub>2</sub> O destilada	100 ml

Disolver NaCl en 5 mL de H<sub>2</sub>O destilada.

Disolver el azul tripano en la solución anterior y agitar bien.

Aforar a 100 mL.

Estreptoavidina peroxidasa 1:4000 en PBS/BSA al 1%

Estrepto-avidina peroxidasa (ZYMED)	1 µl
PBS/BSA al 1%	4 ml

Preparar antes de usar

IL-6 recombinante de ratón 19252V

(PharMingen, San Diego, CA)	2000-15 pg/ml
-----------------------------	---------------

IL-12 recombinante de ratón 19361V

(PharMingen, San Diego, CA)	2000-15 pg/ml
-----------------------------	---------------

### Lipopolisacáridos bacterianos

LPS (Escherichia coli serotipo O111:B4) (Sigma) 5 µg

SSI estéril 1 ml

Solubilizar y filtrar con membrana de 0.22 µm.

Guardar en congelador a -20 °C.

### PBS, pH 7.2-7.4

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.1689 g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> anhidro 0.2645 g

NaCl 9.0000 g

H<sub>2</sub>O 1000 ml

Disolver en 800 ml de agua destilada

Ajustar pH a 7.2-7.4 con HCl 0.1 M

Esterilizar por filtración con membrana de 0.22 µm.

Guardar en refrigeración 2-8 °C

### Solución de lavado (PBS/ Tween-20 (0.05%))

Tween-20 0.500 ml

PBS pH 7.2-7.4 1.000 ml

### Sustrato ABTS (Sigma-Aldrich)

ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) 12 ml



## 2) Abreviaturas

Abs	Anticuerpos
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbencetiazolin-6-sulfónico)
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
AMPc	Adenosínmonofosfato cíclico
BSA	Solución de suero albúmina bovina
cAMP	Adenosínmonofosfato cíclico
CCL5	Quimiocina (C-C) 5
CD	Células dendríticas
CNTF	Factor neurotrófico ciliar
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
CT-1	Cardiotrofina-1
Da	Dalton
EIA	Inmunoensayo enzimático
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
EMIS	Ensayo inmunológico multiplicado por enzimas
FasL	Ligando del receptor Fas
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GAS	Síndrome general de adaptación
HHA	Eje hipotálamo-hipofisario-adrenal
HLA	Antígeno de histocompatibilidad leucocitario humano
Igs	Inmunoglobulinas

IL	Interleucina
INF	Interferón
IP	Vía intraperitoneal
KDa	Kilo daltones
LAK	Células asesinas activadas por linfocinas
LHRH	Hormona liberadora de la hormona luteinizante
LIF	Factor inhibidor de leucemia
LPS	Lipopolisacáridos
M	Molar
mAb	Anticuerpo monoclonal
NA	Noradrenalina
NK	Células asesinas naturales
NOS	Especies reactivas del nitrógeno
OSM	Oncostatina M
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNC	Sistema nervioso central
SNS	Sistema nervioso simpático
TGF	Factor de crecimiento transformante
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAIL	Ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF