

Tesis Doctoral

# Influencia del balance TH<sub>1</sub>/TH<sub>2</sub> en las alteraciones neuroinmunes y conductuales inducidas por estrés crónico moderado. Reversión con copaxone

Palumbo, María Laura

2011

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

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

Cita tipo APA:

Palumbo, María Laura. (2011). Influencia del balance TH<sub>1</sub>/TH<sub>2</sub> en las alteraciones neuroinmunes y conductuales inducidas por estrés crónico moderado. Reversión con copaxone. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Palumbo, María Laura. "Influencia del balance TH<sub>1</sub>/TH<sub>2</sub> en las alteraciones neuroinmunes y conductuales inducidas por estrés crónico moderado. Reversión con copaxone". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**INFLUENCIA DEL BALANCE TH1/TH2 EN LAS  
ALTERACIONES NEUROINMUNES Y CONDUCTUALES  
INDUCIDAS POR ESTRÉS CRÓNICO MODERADO.  
REVERSIÓN CON COPAXONE.**

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

**María Laura Palumbo**

Directora: Dra. Ana María Genaro  
Consejero de Estudios: Dr. Enrique Rodríguez

Lugar de trabajo: Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO-  
CONICET-UBA). Buenos Aires, Argentina.

Buenos Aires, 2011

## Influencia del balance Th1/Th2 en las alteraciones neuroinmunes y conductuales inducidas por estrés crónico moderado.

### Reversión con Copaxone.

El objetivo de este trabajo fue interrelacionar las alteraciones conductuales, neuroquímicas e inmunológicas inducidas por estrés crónico en dos cepas endocriadas de ratones, BALB/c y C57BL/6. Se utilizó un modelo de estrés crónico moderado (CMS) que consiste en la aplicación de varios estresores de moderada intensidad, de manera crónica, alternada e impredecible durante varias semanas. Se observó que los ratones BALB/c expuestos a CMS presentaron una menor capacidad de aprendizaje y memoria compatible con alteraciones estructurales y neuroquímicas observadas en el hipocampo, como disminución de la neurogénesis, disminución de la actividad y del nivel proteico de nNOS, perfil proteico diferencial de isoformas de PKC, entre otras. Estas alteraciones no fueron encontradas en los ratones C57BL/6 expuestos a CMS. En lo que respecta a la respuesta inmune, los BALB/c CMS presentaron una disminución en la proliferación de linfocitos T y un aumento en la proliferación de linfocitos B estimulada por mitógenos. Así como un desbalance de citoquinas hacia Th2. Por el contrario, los animales C57BL/6 CMS mostraron un aumento en la reactividad en los linfocitos T sin presentar cambios en la correspondiente a los linfocitos B y un desbalance de citoquinas hacia Th1. Respecto a la participación de las hormonas clásicamente relacionadas al estrés (catecolaminas y corticosterona), los resultados indicaron que no existe una coincidencia temporal entre el aumento de dichas hormonas y la aparición de las alteraciones mencionadas. Además, los cambios observados en los ratones BALB/c CMS pudieron ser revertidos por la administración de Copaxone®, que estimula débilmente la respuesta autoinmune induciendo un aumento de las citoquinas Th1. Estos hallazgos señalan que las terapias basadas en la modulación del sistema inmune podrían ser útiles para el tratamiento de déficit cognitivos inducidos por estrés.

Palabras claves: psiconeuroinmunología, ratones BALB/c y C57BL/6, estrés crónico, aprendizaje y memoria, neurogénesis, óxido nítrico sintasa, proteína quinasa C, balance Th1/Th2, Copaxone®.

## Influence of Th1/Th2 balance in behavioral and neuroimmune alterations induced by chronic mild stress. Reversion by Copaxone.

The aim of this work was to investigate the relationship between the behavioral, neurochemical and immunological alterations induced by chronic stress in two inbred mouse strains, BALB/c y C57BL/6. A chronic mild stress (CMS) model, consisting of the chronic application of several stressors of moderate intensity applied in an unpredictable manner for several weeks, was utilized.

CMS BALB/c mice showed an impaired learning and memory which are related to structural and neurochemical changes observed in the hippocampus, such us a decrease of neurogenesis, a decrease of NOS activity and protein levels, differential protein levels of PKC isoform, among others. These alterations were not found in C57BL/6 mice subjected to CMS. Respect to immune response, CMS BALB/c mice showed a decrease in the T- lymphocyte and an increase of B-lymphocyte mitogen-stimulated proliferation, and an imbalance towards Th2 cytokines. On the contrary, CMS C57BL/6 animals showed an increase in the reactivity of T-lymphocytes without changes in the B- lymphocytes reactivity, and an imbalance towards Th1 cytokines. Concerning to the participation of the classically stress-associated hormones (catecholamines and corticosterone) in the above mentioned findings, the results indicate that there was not a temporal coincidence between corticosterone and catecholamines increase and behavioral and immune alterations. The changes observed in CMS BALB/c mice were reverted by the administration of Copaxone®, which weakly stimulates the autoimmune response increasing Th1 cytokines.

These findings indicate that immune-based therapies could be useful for the treatment of cognitive deficits induced by stress.

Key words: psychoneuroimmunology, chronic stress, BALB/c and C57BL/6 mice, learning and memory, neurogenesis, nitric oxide synthase, protein kinase C, Th1/Th2 balance, Copaxone®.

---

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

**Palumbo M.L.**, Fosser N.S., Ríos H., Zorrilla Zubilete M.A., Guelman L.R., Cremaschi G.A., Genaro A.M. (2007). Loss of hippocampal neuronal nitric oxide synthase contributes to the stress-related deficit in learning and memory. *Journal of Neurochemistry* 102:261-274.

**Palumbo M.L.**, Zorrilla Zubilete M.A., Cremaschi G.A., Genaro A.M. (2009). Different effect of chronic stress on learning and memory in BALB/c and C57BL/6 inbred mice: Involvement of hippocampal NO production and PKC activity. *Stress* 12:350-361.

**Palumbo M.L.**, Canzobre M.C, Pascuan C.G., Ríos H., Wald M., Genaro A.M. (2010). Stress induced cognitive deficit is differentially modulated in BALB/c and C57Bl/6 mice Correlation with Th1/Th2 balance after stress exposure. *Journal of Neuroimmunology* 218:12-20.

Zorrilla-Zubilete M.A., Maur D.G., **Palumbo M.L.**, Genaro A.M. (2010). Role of nitric oxide signaling pathways in brain injuries. *Current Chemical Biology* 4:250-261.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ana María Genaro (mamá científica), por haberme dado la posibilidad de trabajar en su laboratorio, por enseñarme, acompañarme y cuidarme en el doctorado y en la vida. Por darme palabras de aliento y serenidad en el momento indicado. ¡¡¡MUCHAS MUCHAS GRACIAS!!!

A mis hijas Paloma y Manuela por darme tanto amor y las fuerzas necesarias para seguir adelante cada día. ¡¡¡LAS AMO!!!

A mami y papi por su apoyo incondicional, por sus consejos, por cuidar y darle tanto amor a mis dos soles para poder realizar esta tesis. ¡¡¡MIL GRACIAS!!!

A la Dra. Graciela Cremaschi (Tía científica), por ser tan atenta conmigo, por darme fuerzas y por su ayuda constante.

A la Dra. Miriam Wald por estar siempre presente, por su comprensión y sus palabras de aliento.

A la Dra. María Zorrilla por transmitirme su alegría y por su buena predisposición.

A la Lic. Cecilia Pascuan (hermana científica) por ser tan paciente conmigo y por ayudarme con mis últimos experimentos.

A María Rosa Gonzalez-Murano por su colaboración con los experimentos y por apoyarme siempre.

A toda la gente linda del laboratorio, María Laura, Alicia, Alejandra, Helena, Roxana, Berenice, Romina, Damián y Eduardo por su buena predisposición para ayudarme siempre, por sus charlas y consejos útiles.

A Daniel González, por su invaluable ayuda con el modelo de estrés crónico.

A la Dra. Ana Franchi por permitirme ser parte del CEFYBO.

A toda la gente del CEFYBO y de la Primera Cátedra de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires por su buena onda.

A la Dra. Laura Guelman, la Lic. Soledad Urán y la Lic. Lucila Caseres por su ayuda con las técnicas de defensas antioxidantes.

Al Dr. Hugo Ríos, Nicolás Fosser y Mariela Canzobre, por colaborar con las técnicas histológicas.

Al Dr. Alejandro Schinder por brindarme sus conocimientos y abrirme las puertas de su laboratorio para realizar los experimentos de neurogénesis.

A las Bioquímicas Mariela Trincherro y Mariela Veggetti por su buena predisposición para enseñarme la técnica de neurogénesis.

A la Lic. Belén Pardi, por su ayuda en el tiempo que estuvo en el laboratorio y por ser tan atenta.

A mis abuelos, Nilda y José, por su apoyo constante.

A mi amiga, Aldi, por estar siempre presente e incentivarme permanentemente.

A Cyn, Isa, Emi, Vicky, Sil y Sebas por escucharme, por sus consejos y palabras de aliento.

A la Farmacéutica Josefina Gaeta de los Laboratorios TEVA-TUTEUR S.A. Argentina por cedernos gentilmente el Copaxone®.

Al CONICET, por otorgarme las becas de posgrado tipo I y tipo II que hicieron posible realizar este trabajo de tesis.

Por último quisiera decirles GRACIAS nuevamente a Ana, Gra, Miriam, María, Ali, María Laura, Roxi, María Rosa y Ale, por darme tanto cariño, porque estuvieron cerca de mí y me contuvieron en momentos difíciles. Por haberme ayudado con Paloma cuando he tenido que hacer algún curso para el doctorado y por haber estado presentes en el parto de Manuela. ¡¡¡UN MILLON DE GRACIAS, LAS QUIERO MUCHO!!!

*A mis hijas,  
Paloma Y Manuela.*

*A mis padres,  
Elisa y Carlos.*

## Abreviaturas

<b>7-NI:</b> 7-nitroindasol	<b>CRH:</b> hormona liberadora de corticotropina
<b>AA:</b> ácido araquidónico	<b>D.O.:</b> densidad óptica
<b>Ac:</b> anticuerpo	<b>DAG:</b> diacilglicerol
<b>ACTH:</b> hormona adrenocorticotrópica	<b>DAPI:</b> 4'-6-diamidino-2-fenilindol
<b>ADN:</b> ácido desoxirribonucleico	<b>DCF:</b> diclorofluoresceína
<b>ADP:</b> adenosín difosfato	<b>DCFH:</b> diclorodihidrofluoresceína
<b>Ag:</b> antígeno	<b>DG:</b> giro dentado
<b>ANOVA:</b> análisis de la varianza	<b>DTH:</b> respuesta de hipersensibilidad retardada
<b>APC:</b> célula presentadora de antígeno	<b>DTNB:</b> ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
<b>ARN:</b> ácido ribonucleico	<b>DTT:</b> ditioneitol
<b>ARNm:</b> ácido ribonucleico mensajero	<b>EC:</b> corteza entorrinal
<b>AVP:</b> arginina vasopresina	<b>EDTA:</b> ácido etilendiaminotetraacético
<b>BCIP:</b> 5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato	<b>EGTA:</b> ácido etilenglicoltetraacético
<b>BCR:</b> receptor de linfocitos B	<b>ELISA:</b> enzimo inmuno ensayo
<b>BDNF:</b> factor neurotrófico derivado de cerebro	<b>eNOS:</b> óxido nítrico sintasa endotelial
<b>BH<sub>4</sub>:</b> tetrahidroxipterina	<b>FITC:</b> fluoresceína
<b>BLBP:</b> proteína de unión a lípidos del cerebro	<b>GABA:</b> ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>BrdU:</b> 5-bromo-2'-deoxiuridina	<b>GCR:</b> receptor de glucocorticoides
<b>CA:</b> área celular	<b>GCs:</b> glucocorticoides
<b>CaMK:</b> quinasa dependiente de calmodulina	<b>GFAP:</b> proteína ácida fibrilar glial
<b>cAMP:</b> adenosina-3',5'-monofosfato cíclico	<b>GMPc:</b> guanosín monofosfato cíclico
<b>CAPON:</b> proteína adaptadora específica de cerebro	<b>GPX:</b> glutatión peroxidasa
<b>CAT:</b> catalasa	<b>GRc:</b> glóbulo rojo de carnero
<b>CMS:</b> estrés crónico moderado	<b>GSH:</b> glutatión reducido
<b>CO<sup>-3</sup>:</b> anión radical carbonato	<b>GSSG:</b> glutatión disulfido
<b>Con A:</b> concanavalina A	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b> peróxido de hidrógeno
<b>COP:</b> Copaxone®	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:</b> ácido fosfórico
<b>CQs:</b> citoquinas	<b>HPA:</b> eje hipotálamo-pituitaria-adrenal
	<b>HPLC:</b> cromatografía líquida de alta presión
	<b>i.p.:</b> intraperitoneal
	<b>IFN:</b> interferón

<b>Ig:</b> inmunoglobulinas	<b>NTs:</b> neurotrofinas
<b>IL:</b> interleuquina	<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup>:</b> anión superóxido
<b>iNOS:</b> óxido nítrico sintasa inducible	<b>O<sub>2</sub>:</b> oxígeno molecular
<b>IκB:</b> inhibidor de NF-κB	<b>O<sub>2</sub><sup>1</sup>:</b> oxígeno singlete
<b>LB:</b> linfocitos B	<b>OH<sup>•</sup>:</b> radical oxhidrilo
<b>LEC:</b> corteza entorrinal lateral	<b>ONOO<sup>-</sup>:</b> peroxinitrito
<b>L-NAME:</b> L-Nitro Metil Arginina	<b>PB:</b> buffer fosfato
<b>L-NIO:</b> Clorohidrato de L-N5-I-Iminoetil-ornitina	<b>PBS:</b> buffer fosfato salino
<b>LPP:</b> vía perforante lateral	<b>PCR:</b> reacción en cadena de la polimerasa
<b>LPS:</b> lipopolisacáridos	<b>PE:</b> ficoeritrina
<b>LT:</b> linfocitos T	<b>PFA:</b> paraformaldehído
<b>LTD:</b> depresión a largo término	<b>PI3K:</b> fosfatidil inositol-3'-quinasa
<b>LTP:</b> potenciación a largo término	<b>PKA:</b> proteína quinasa A
<b>MAPK:</b> proteína quinasa activada por mitógenos	<b>PKC:</b> proteína quinasa C
<b>MEC:</b> corteza entorrinal media	<b>PLA<sub>2</sub>:</b> fosfolipasa A2
<b>MF:</b> <i>mossy fibres</i>	<b>PLC:</b> fosfolipasa C
<b>MHC:</b> complejo mayor de histocompatibilidad	<b>PNPP:</b> paranitrofenil fosfato
<b>MPP:</b> vía perforante media	<b>PMSF:</b> fenilmetilsulfonyl fluoruro
<b>MR:</b> receptor de mineralocorticoides	<b>PtdSer:</b> fosfatidilserina
<b>NA:</b> noradrenalina	<b>PVN:</b> núcleo paraventricular
<b>NBT:</b> azul nitro-tetrazolio	<b>REDOX:</b> óxido-reducción
<b>NeuN:</b> proteína nuclear neuronal específica	<b>RNS:</b> especies reactivas del nitrógeno
<b>NF-κB:</b> factor nuclear κB	<b>ROS:</b> especies reactivas del oxígeno
<b>NGF:</b> factor de crecimiento nervioso	<b>RT-PCR:</b> reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa
<b>NK:</b> células asesinas naturales	<b>RT-qPCR:</b> RT-PCR en tiempo real
<b>NMDA:</b> N-metil-D-aspartato	<b>Sb:</b> subiculum
<b>NMDAR:</b> receptor de N-metil-D-aspartato	<b>SE:</b> sistema endocrino
<b>nNOS:</b> óxido nítrico sintasa neuronal	<b>SGL:</b> capa subgranular
<b>NO<sup>•</sup>:</b> ión nitroxilo	<b>SI:</b> sistema inmune
<b>NO:</b> óxido nítrico	<b>SN:</b> sistema nervioso
<b>NO<sub>2</sub>:</b> dióxido de nitrógeno	<b>SNC:</b> sistema nervioso central
<b>NOS:</b> óxido nítrico sintasa	<b>SNP:</b> sistema nervioso parasimpático
<b>NT3:</b> neurotrofina 3	<b>SNP:</b> sistema nervioso periférico
<b>NTR:</b> receptor de neurotrofina	<b>SNS:</b> sistema nervioso simpático
	<b>SOD:</b> superóxido dismutasa

**SVZ:** zona subventricular  
**TBS:** buffer Tris salino  
**TCA:** ácido tricloroacético  
**TCR:** receptor de linfocitos T  
**TGF:** factor de crecimiento transformante  
**Th:** linfocito T colaborador o *helper*  
**TLRs:** receptores tipo Toll  
**T<sub>MC</sub>:** linfocitos T de memoria centrales  
**T<sub>ME</sub>:** linfocitos T de memoria efectores  
**TNB:** ácido 5-tio-2-nitrobenzoico  
**TNF:** factor de necrosis tumoral  
**T<sub>reg</sub>:** linfocito T regulatorio  
**XOD:** xantina oxidasa

# ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	16
1- El sistema nervioso.....	17
1.1- Anatomía del sistema nervioso.....	17
1.2- El hipocampo.....	21
1.2.1- Neurogénesis.....	23
1.3- Factores neurotróficos.....	25
1.3.1- Neurotrofinas.....	26
1.3.2- Receptores de neurotrofinas.....	26
1.3.3- Funciones de las neurotrofinas.....	27
1.4- NOS y NO.....	30
1.5- Proteína quinasa C.....	36
1.6- Receptores N-metil-D-aspartato (NMDA).....	38
1.7- Estrés oxidativo.....	39
1.7.1- Especies Reactivas del Oxígeno (ROS).....	41
1.7.2- Especies reactivas del nitrógeno (RNS).....	42
1.8- Defensas antioxidantes.....	43
1.8.1- Superóxido Dismutasa.....	44
1.8.2- Catalasa.....	45
1.8.3- Glutación.....	46
2- El sistema inmune.....	49
2.1- Anatomía del sistema inmune.....	49
2.2- Inmunidad innata y adquirida.....	50
2.3- Linfocitos B.....	50
2.4- Linfocitos T.....	51
2.5- Citoquinas.....	52
2.6- Memoria inmunitaria. Respuesta primaria y secundaria.....	55
3- Interacción entre el sistema inmune y el sistema nervioso. ....	57
3.1- Regulación del sistema inmune por el sistema neuroendocrino.....	58
3.2- Acción de las citoquinas en el sistema nervioso.....	60
3.3- Acción de las neurotrofinas en el sistema inmune.....	61
3.4- Evidencias que avalan la existencia de una autoinmunidad protectora. Nuevas perspectivas terapéuticas.....	62
4- Estrés.....	64
4.1- Mediadores involucrados.....	64

---

4.2- Modelos experimentales de estrés crónico.....	67
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	69
Hipótesis de trabajo.....	70
Objetivos de la investigación.....	71
Objetivos generales.....	71
Objetivos específicos.....	71
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
1- Animales.....	74
2- Modelo de estrés crónico moderado.....	74
3- Tratamiento con L-NAME.....	76
4- Tratamiento con Copaxone®.....	76
5- Pruebas para evaluar capacidad de aprendizaje y memoria.....	77
5.1- Prueba de habituación.....	77
5.2- Prueba de evitación condicionada por shock eléctrico plantal.....	78
5.3- Prueba en el laberinto en forma de Y.....	79
5.4- Prueba de reconocimiento de objetos.....	80
6- Histología del hipocampo.....	82
7- Determinación de la neurogénesis en ratones adultos.....	82
7.1- Esquema de inyección con 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU).....	82
7.2- Perfusión y corte del tejido.....	83
7.3- Inmunofluorescencia con BrdU.....	84
8- Determinación de la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS).....	85
8.1- Determinación de la NOS dependiente de calcio.....	85
9- Actividad de PKC.....	86
9.1- Purificación enzimática.....	86
9.2- Determinación de la actividad enzimática.....	86
10- <i>Western blot</i> .....	87
11- Determinación del estado de óxido-reducción (REDOX).....	88
11.1- Producción de ROS.....	88
11.2- Medición de la actividad de la catalasa.....	88
11.3- Determinación de la supeóxido dismutasa (SOD).....	89
11.4- Determinación del glutatión.....	90
12- Obtención de linfocitos.....	91
13- Evaluación de la proliferación linfocitaria.....	91
14- Determinación de subpoblaciones linfocitarias T.....	92

15- Medición de los niveles de citoquinas Th1 y Th2.....	92
16- Producción de anticuerpos frente a un desafío antigénico.....	93
15.1- Esquema de inmunización.....	93
15.2- Determinación del título de anticuerpos anti-GRc y anti-LPS.....	94
17- Determinación de niveles de corticosterona.....	95
18- Determinación de niveles de catecolaminas.....	96
19- Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	96
19.1- Extracción del ácido ribonucleico (ARN) y proteínas.....	96
19.2- Evaluación de los niveles de ARNm por RT-PCR.....	96
20- Análisis estadístico.....	98
IV. RESULTADOS.....	99
1- Efectos del estrés crónico sobre el hipocampo.....	100
1.1- Efectos del estrés crónico sobre el aprendizaje y la memoria.....	100
1.1.1- Efecto del estrés crónico en una prueba de habituación.....	100
1.1.2- Efecto del estrés crónico en una prueba de evitación condicionada por shock eléctrico plantal.....	103
1.1.3- Efecto del estrés crónico en el laberinto en forma de Y.....	104
1.1.4- Efecto del estrés crónico en una prueba de reconocimiento de objetos....	105
1.2- Efectos del estrés crónico sobre la morfología del hipocampo.....	106
1.3- Efectos del estrés crónico sobre la neurogénesis en ratones adultos.....	108
1.4- Determinación de los niveles de ARNm de neurotrofinas en hipocampo.....	110
1.5- Efectos del estrés crónico sobre la actividad y los niveles proteicos de enzimas	111
1.5.1- Efectos del estrés crónico sobre la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) en hipocampo de ratones BALB/c y C57BL/6.....	111
1.5.2- Efectos del estrés crónico sobre los niveles proteicos de la nNOS y la eNOS en hipocampo de ratones BALB/c y C57BL/6.....	114
1.5.3- Actividad de PKC en hipocampo de ratones BALB/c y C57BL/6 estresados.....	116
1.5.4- Niveles proteicos de PKC en hipocampo de ratones BALB/c y C57BL/6 estresados.....	117
1.5.5- Participación de la PKC en la regulación de la NOS en el hipocampo de animales BALB/c y C57BL/6, controles y estresados crónicamente.....	119
1.6- Efectos del estrés crónico sobre el estado REDOX del hipocampo en ratones BALB/c y C57BL/6.....	120
1.6.1- Producción de ROS en hipocampo de ratones BALB/c y C57BL/6, controles y CMS.....	120

1.6.2- Niveles de catalasa en hipocampo de ratones BALB/c y C57BL/6, controles y CMS.....	121
1.6.3- Niveles de superóxido dismutasa (SOD) en hipocampo de ratones BALB/c y C57BL/6, controles y CMS.....	122
1.6.4- Producción de glutatión en hipocampo de ratones BALB/c y C57BL/6, controles y CMS.....	123
1.6.5- Producción de ROS en presencia de 7-NI, un inhibidor específico de la nNOS, en hipocampos de ratones normales BALB/c y C57BL/6.....	124
1.7- Prueba de campo abierto en ratones BALB/c y C57BL/6 tratados con L-NAME.	125
2- Efectos del estrés crónico sobre el sistema inmune.....	128
2.1- Evaluación del sistema inmune <i>ex vivo</i> .....	128
2.1.1-Estudio de la proliferación de linfocitos inducida por mitógenos en ratones BALB/c y C57BL/6, control y CMS.....	128
2.1.2- Producción de citoquinas en ratones BALB/c y C57BL/6, controles y estresados crónicamente.....	130
2.2- Evaluación del sistema inmune <i>in vivo</i> .....	132
2.2.1- Análisis de la respuesta inmune humoral en ratones BALB/c y C57BL/6 controles y estresados crónicamente.....	132
2.2.2- Distribución de subpoblaciones linfocitarias.....	134
3- Participación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) y del sistema adrenérgico sobre los efectos del estrés crónico en el SI y SNC.....	135
3.1- Determinación de los niveles de corticosterona.....	135
3.2- Determinación de los niveles de catecolaminas.....	136
3.3- Correlación entre el comportamiento espontáneo de alternancia en el laberinto en Y y la relación Th2/Th1.....	137
4- Efecto del Copaxone® sobre los ratones BALB/c estresados crónicamente.....	138
4.1- Efecto del Copaxone® en ratones estresados sobre el aprendizaje y memoria.	138
4.1.1- Efecto del Copaxone® en ratones BALB/c estresados en una prueba de habituación.....	138
4.1.2- Comportamiento espontáneo de alternancia evaluado en ratones BALB/c estresados crónicamente y su reversión con Copaxone®.....	140
4.2- Efecto del estrés crónico en la neurogénesis y su reversión con Copaxone®....	140
4.3- Efecto del Copaxone® sobre la actividad de NOS en hipocampo de animales CMS y control.....	142
4.4- Efecto del Copaxone® sobre los niveles de ROS y las defensas antioxidantes en hipocampo de ratones BALB/c estresados y controles.....	143

---

4.4.1- Niveles de ROS en hipocampo de ratones controles y CMS inyectados con Copaxone®.....	143
4.4.2- Efecto del Copaxone® sobre las defensas antioxidantes en ratones BALB/c expuestos a CMS.....	144
4.5- Producción de citoquinas por linfocitos de ratones BALB/c sometidos al modelo de estrés crónico y su reversión con Copaxone®.....	146
V. DISCUSIÓN.....	148
VI. CONCLUSIONES.....	166
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	170

## **1- El sistema nervioso.**

### **1.1- Anatomía del sistema nervioso.**

El sistema nervioso de los mamíferos consta de dos partes fundamentales: el sistema nervioso central (SNC), que se aloja en el cráneo y el canal vertebral, y el sistema nervioso periférico (SNP), que está fuera de estas cavidades e integrado por numerosos nervios (los nervios espinales y craneales), los ganglios periféricos y los receptores sensoriales. Los nervios del SNP que llevan los impulsos hacia el SNC se llaman aferentes o sensitivos, y los que llevan impulsos del cerebro al SNP se llaman eferentes o motores.

El SNC está formado por el encéfalo y la médula espinal, que son centros de integración nerviosa. Surge, embriológicamente, de la placa ectodérmica central. Ya en las etapas tempranas el tubo neural muestra tres cámaras, que son las que darán origen a las estructuras cerebrales del adulto: el prosencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo. Las neuronas inician su ciclo vital en los ventrículos y luego emigran a su localización final, dirigidas por procesos genéticos.

En el encéfalo se distinguen dos sustancias, una sustancia gris (debido al predominio de cuerpos celulares, que son de color grisáceo) y la otra blanca (a causa de la gran concentración de mielina blanquecina, que cubre los axones). La sustancia gris está en la parte externa del encéfalo y se denomina corteza.

La corteza se divide en seis lóbulos, cuatro primarios: occipital, temporal, parietal y frontal y dos secundarios: la ínsula y el sistema límbico.

La corteza occipital es el área sensorial primaria para la entrada de datos visuales. Las funciones principales del lóbulo temporal son el lenguaje, la memoria y la emoción. La corteza parietal se caracteriza por encontrarse en ella la llamada corteza de asociación de las vías de entrada sensoriales. Además, el lóbulo parietal izquierdo ejerce un papel preferente en el proceso verbal. El lóbulo frontal es el área del cerebro que más ha evolucionado y es la sede de las conductas específicas de cada especie; son la base de la conducta compleja, de la autoconciencia y de la personalidad. La parte más posterior es el área o corteza motora frontal, implicada en el aprendizaje motor. La parte anterior, o corteza prefrontal, es la implicada en funciones cognitivas complejas, en la voluntad y la conciencia de sí, en la

organización de la conducta social, en la anticipación y planificación de tareas y acciones (figura 1 A).

El sistema límbico fue considerado inicialmente como sede de las emociones, pero después se ha visto que era importante para otras funciones, como la memoria y el aprendizaje. Los componentes de este sistema son la amígdala, el tálamo, el hipotálamo, la hipófisis, el hipocampo, el área septal (compuesta por el fórnix, cuerpo calloso y fibras de asociación), la corteza orbitofrontal y la circunvolución del cíngulo. Los estímulos emocionales son registrados por la amígdala, que es el sistema de alarma del cerebro y el generador de respuestas emocionales. Existe una serie de emociones básicas, primarias, como el miedo, la sorpresa, la cólera, entre otras, pero muchas de las emociones son secundarias, es decir, que la información generada ha sido reenviada a la corteza y elaborada por el córtex de asociación. Todo cuanto capta el cerebro consciente lo envía al sistema límbico donde se elabora una respuesta básica. Ésta se envía nuevamente a los hemisferios cerebrales y allí se transforma en las complejas sensaciones específicas para cada contexto particular.

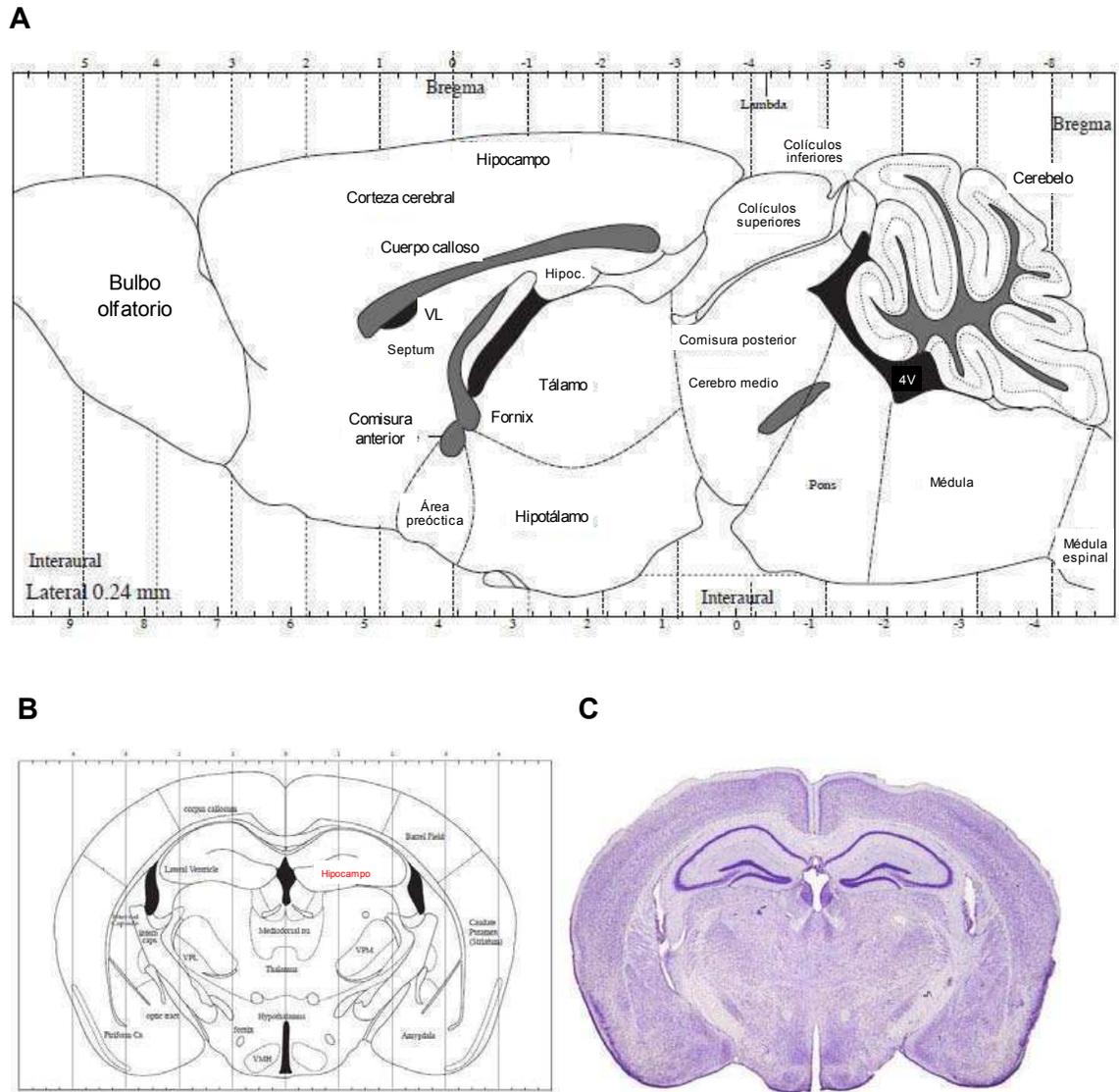
El hipocampo está situado en el lóbulo temporal medio. Por su forma plegada, que recuerda a un caballito de mar, recibió el nombre de hipocampo (figura 1 B y C). Su principal función es la consolidación de la memoria y el aprendizaje. Una lesión en esta zona produce amnesia anterógrada, es decir, de los acontecimientos ocurridos después de la lesión, afectando los recuerdos de hechos específicos, pero no al aprendizaje de nuevas capacidades o habilidades. Esto es así debido a que existen múltiples memorias y no todas son codificadas por el hipocampo. Éste almacena las memorias recientes conscientes, la memoria explícita o declarativa. Las memorias inconscientes emocionales son mediadas por la amígdala y las memorias procedimentales, por los ganglios basales y la corteza motora. El hipocampo no madura hasta los dos años, lo que explica por qué no tenemos recuerdos (memoria episódica) anteriores a los tres años.

El diencefalo está situado en la parte interna central del cerebro, entre los hemisferios y el tronco del encéfalo, y por él pasa la mayoría de fibras que se dirigen hacia la corteza cerebral. Las partes más importantes del diencefalo son el tálamo y el hipotálamo. El tálamo es una estructura bilobulada de gran tamaño en la parte superior del tronco-encéfalo. El tercer ventrículo separa entre sí ambos tálamos, aunque éstos permanecen unidos gracias a un puente de tejido talámico

denominado masa intermedia. Los tálamos son masas de sustancia gris, por lo que contienen cuerpos neuronales y numerosas conexiones sinápticas. El tálamo es funcionalmente muy complejo: algunas de sus estructuras hacen función de relevo sináptico, pero también tiene funciones de integración y en la expresión de emociones. El hipotálamo está situado debajo del tálamo, como su nombre indica. Controla el sistema nervioso autónomo y el sistema endócrino, y está implicado en conductas básicas de huida, lucha, apareamiento, ingesta, temperatura corporal y estado de vigilia.

El mesencéfalo está constituido por el tectum y el tegmentum. El primero tiene como principales estructuras los colículos superiores, que forman parte del sistema visual, y los colículos inferiores, que lo son del sistema auditivo. El segundo incluye estructuras como el núcleo rojo y la sustancia negra, que forman parte del sistema de control motor. La formación reticular es una compleja estructura formada por numerosos núcleos; es grande y se extiende desde el bulbo a través del puente y cerebro medio al tálamo y otras zonas diencefálicas. Interviene en funciones como el sueño, la atención, el tono muscular y el movimiento y en varios reflejos vitales.

Los dos hemisferios están separados medialmente por el cuerpo calloso, que es un conglomerado de fibras nerviosas blancas que los conectan y transfieren cantidades enormes de información de un lado a otro; de esta forma realizan una mutua regulación (Barbado Alonso y col., 2002).



**Figura 1.** (A) Esquema representativo de un corte transversal del cerebro de un ratón. (B) Esquema representativo de un corte coronal de cerebro de ratón en donde se observan los lóbulos del hipocampo. (C) Corte coronal del cerebro de un ratón teñido con acetilcolinesterasa. En violeta más oscuro se observa el hipocampo (Paxinos y Franklin, 2001).

## 1.2- El hipocampo.

El hipocampo es una estructura altamente relacionada con los procesos de aprendizaje y memoria (Florian y Rouillet, 2004), que junto con la amígdala forman el eje central del sistema límbico.

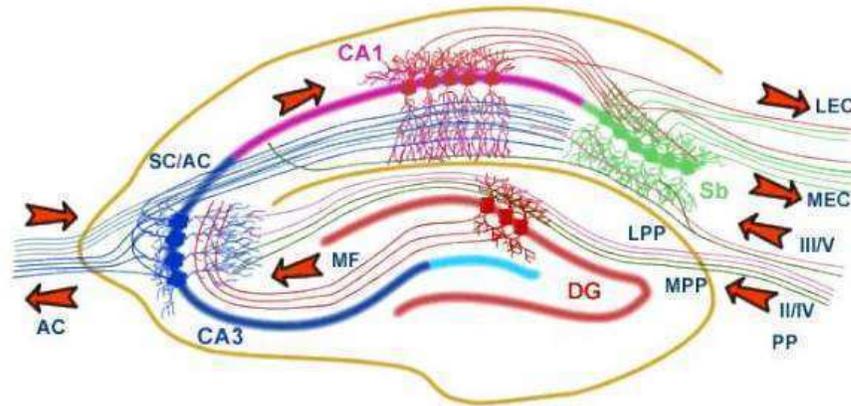
El hipocampo está formado por dos láminas de corteza y en corte transversal tiene una estructura laminar muy definida con capas visibles donde están organizadas filas de células piramidales. Las conexiones dentro del hipocampo generalmente siguen este formato laminar y son unidireccionales. Ellos forman *loops* cerrados bien caracterizados que se originan principalmente en la corteza entorrinal (EC) adyacente. De esta manera hay rutas definidas para el flujo de la información haciendo que el hipocampo sea el blanco más frecuente para el estudio de la función sináptica. Las diferentes capas de células y secciones están definidas por una serie de conexiones. Las principales capas de células piramidales están en las regiones CA1-4 (área celular 1-4), principalmente CA1 y CA3 y en el giro dentado (DG).

La vía perforante es la principal entrada al hipocampo. Los axones de la vía perforante se originan principalmente en las capas II y III de la corteza entorrinal, con una contribución menor desde las capas profundas IV y V. Los axones de las capas II/IV se proyectan a las células granulares del giro dentado y a las células piramidales de la región CA3, mientras que aquellos de las capas III/V proyectan con las células piramidales de la CA1 y el subiculum (Sb). La vía perforante puede ser separada en caminos lateral y medio (LPP y MPP, respectivamente), dependiendo si las fibras se originan desde la corteza entorrinal lateral o media (LEC y MEC, respectivamente).

Las *mossy fibres* (MF) son los axones de las células granulares del giro dentado. Estas se extienden desde el giro dentado a las células piramidales de CA3, formando su entrada principal. Las *mossy fibres*, que conectan con las neuronas CA, son grandes agregaciones de terminales con múltiples sitios de liberación de transmisores y densidades postsinápticas. Varias células granulares pueden hacer sinapsis en una célula piramidal simple de la CA3, la cual está involucrada especialmente en la memoria espacial de trabajo (Florian y Rouillet, 2004).

La vía colateral de Schaffer es derivada de los axones que se proyectan desde la región CA3 a la región CA1 del hipocampo. Cualquiera de los axones que vienen desde las neuronas CA3 (ipsilateral) o de una estructura equivalente en el hemisferio opuesto (contralateral) son llamadas más tarde fibras comisurales, por atravesar de un hemisferio a otro del cerebro. Esta vía es intensamente utilizada para estudiar los receptores NMDA LTP (potenciación a largo término) y LTD (depresión a largo término) dependientes.

La vía desde el CA1 al subiculum y entrando a la corteza entorrinal forman la salida principal del hipocampo. Sin embargo, esta no es una vía directa unidireccional. La conexión CA1-Sb sigue un diseño anatómico estricto. El extremo distal de la región CA1 proyecta con el extremo proximal del Sb. Las proyecciones a la EC siguen un patrón similar, con CA1 distal/Sb proximal proyectando hacia la EC lateral, mientras que CA1 proximal/Sb distal proyectan a la EC media. También podría notarse que la entrada de estas células desde la EC siguen el mismo patrón, por ejemplo, CA1 distal/Sb proximal reciben información desde la EC lateral, mientras que CA1 proximal/Sb distal reciben información desde la EC media. De esta manera, dos redes de *loops* cerrados están presentes dentro del conjunto de la red hipocampal. Estos *loops* además se extienden a la corteza perirrinal y postrrinal. La corteza perirrinal proyecta a la EC lateral y recibe proyecciones de retorno mientras la corteza postrrinal proyecta y recibe información de la EC media. En la figura 2 se muestra una representación gráfica de las conexiones presentes en el hipocampo.



**Figura 2.** La red hipocámpica: el hipocampo forma una red principalmente unidireccional, con entrada desde la corteza entorrinal (EC); esta forma conexiones con el giro dentado (DG) y las neuronas piramidales CA3 por la vía perforante (PP). Las neuronas CA3 también reciben información del giro dentado por la *mossy fibers* (MF). Ellos envían axones a las células piramidales CA1 por la vía colateral de Schaffer, como también a las células CA1 en el hipocampo contralateral por la vía comisural de asociación (AC). Las neuronas CA1 también reciben información directamente de la vía perforante y envían axones al subículo (Sb). Estas neuronas a su vez envían de regreso a la EC la información hipocámpica principal, formando un *loop*.

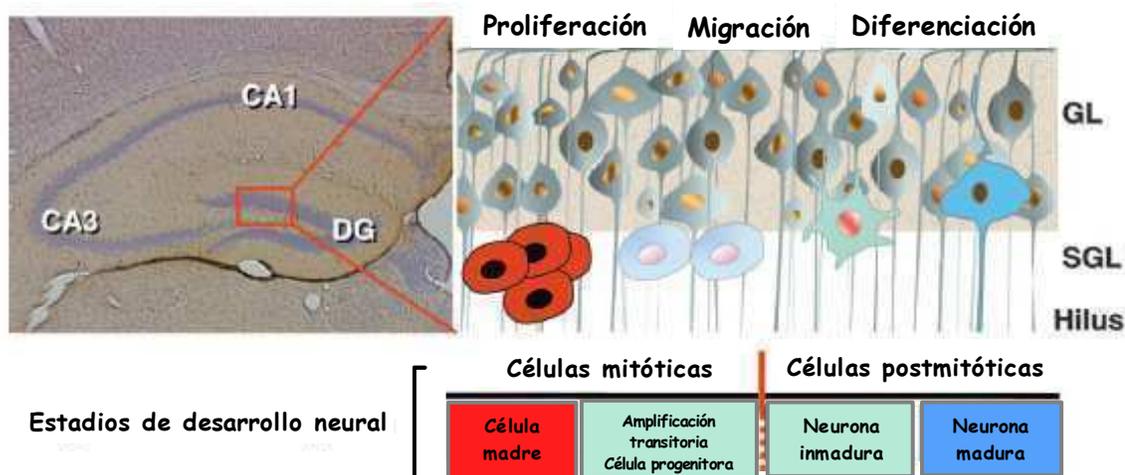
### 1.2.1- Neurogénesis.

Se denomina neurogénesis al proceso de diferenciación celular que, a partir de células neuroepiteliales, se generan neuronas muy activamente durante el desarrollo embrionario, y de forma restringida durante la vida adulta. La neurogénesis hipocámpica ha sido observada en animales adultos desde pájaros hasta humanos (Altman y Das, 1965; Kaplan y Hinds, 1977; Kuhn y col., 1996; Kornack y Rakic, 1999; Eriksson, 1998; Barnea y Nottebohm, 1994).

En el cerebro de ratones adultos las dos zonas mejor conocidas y donde está ampliamente confirmada la producción de nuevas neuronas en la vida adulta son: la zona subventricular (SVZ) de las paredes del tercer ventrículo y la capa subgranular (SGL) del giro dentado del hipocampo. En la SVZ los neuroblastos migran al bulbo olfatorio para luego reemplazar a las interneuronas locales (Gross, 2000; Lledo y col., 2008).

En el giro dentado de mamíferos adultos (Abrous y col., 2005) se estimó que cientos de células nuevas son generadas a diario (Cameron y McKay, 2001; Rao y Shetty,

2004). En esta zona, la neurogénesis es un proceso complejo que involucra diversas etapas, como la proliferación de las células pluripotenciales, la migración, la diferenciación, la sobrevivencia de las neuronas nuevas, así como la integración de éstas en los circuitos neuronales existentes (figura 3). En la zona subgranular del giro dentado, las células pluripotenciales expresan nestina, la proteína de unión a lípidos del cerebro (BLBP) y GFAP. Esta población celular se caracteriza por tener una baja tasa de división celular. Una vez que estas células se dividen, dan lugar a una población que se amplifica rápidamente, de la cual se generan por división simétrica las células progenitoras de tipo 2 y 3. Las células progenitoras tipo 2a y 2b presentan procesos neuríticos cortos paralelos a la zona granular del giro dentado; en cambio, las de tipo 3 presentan procesos largos integrados en la capa granular. Durante esta etapa se inician los eventos de migración y de diferenciación temprana, y las células expresan la proteína asociada a microtúbulos doblecortina, el factor de transcripción Prox1 y la proteína nuclear neuronal específica NeuN. Concluida esta fase, se generan las neuronas inmaduras caracterizadas por procesos dendríticos largos que cruzan la capa granular del giro dentado. Estas neuronas inmaduras van a diferenciarse en su totalidad para integrarse en los circuitos neuronales. En este estadio final, las nuevas neuronas expresan marcadores específicos, como la proteína de unión a calcio llamada calbindina. Además, reciben *inputs* (señal de entrada) sinápticos, extienden los axones a lo largo del tracto de las *mossy fiber* y muestran propiedades electrofisiológicas muy similares a la de las neuronas maduras ya existentes en el giro dentado (Hastings y Gould, 1999; Stanfield y Trice, 1988; van Praag y col., 2002; Zhao y col., 2006; Kempermann y col., 2003).



**Figura 3.** Neurogénesis en el hipocampo. *Panel de arriba izquierdo:* vista frontal de un cerebro de ratón mostrando los sitios de neurogénesis en el giro dentado (DG) de la formación hipocampal. *Panel de arriba derecho:* esquema de células proliferando en la capa subgranular (SGL) localizada en la interface entre el hilus y la capa granular (GL), donde migran y se diferencian en neuronas maduras. *Panel de abajo:* secuencia de tipos celulares involucrados en el desarrollo neuronal (Kempermann y col., 2004).

### 1.3- Factores neurotróficos.

Los factores neurotróficos son péptidos que promueven el desarrollo y la diferenciación neuronal (Vega y col., 2003), y son expresados en una región y período particular (Korsching, 1993). El tejido nervioso depende de ellos para su supervivencia y funcionamiento dado que participan en los procesos de remodelación, adaptación y plasticidad neuronal.

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

Al ser secretados por el tejido blanco, actúan de forma retrógrada favoreciendo su inervación por la neurona que es estimulada. Este mecanismo implica la secreción de factores neurotróficos al espacio extracelular, su captura por una neurona vía un receptor específico y la internalización del complejo receptor-péptido que es transportado por el axón hacia el soma (Korsching, 1993).

Los factores neurotróficos también pueden actuar de forma anterógrada, siendo secretados desde los axones. De hecho, algunos factores neurotróficos pueden actuar como neurotransmisores y, recíprocamente, algunos neurotransmisores pueden ejercer una función trófica (Korsching, 1993).

Un factor neurotrófico puede ejercer distintos efectos sobre una célula y puede influenciar diversos tipos neuronales y no neuronales, lo cual implica la competencia entre células por los factores (Korsching, 1993). Distintos factores neurotróficos cumplen diferentes funciones, pero se pueden superponer por la convergencia de caminos de transducción de señales (Korsching, 1993). Sin embargo, esto no siempre supone redundancia, ya que una neurona puede necesitar más de un factor para sobrevivir.

### **1.3.1- Neurotrofinas.**

La familia más conocida de factores neurotróficos es la de las neurotrofinas. A esta familia pertenecen el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT3) y la neurotrofina 4 (NT4). Las neurotrofinas son sintetizadas como pro-hormonas que luego son clivadas dando lugar a la forma madura de 14 kDa. Finalmente, dos de éstas se unen para formar un homo dímero mediante uniones no covalentes (Blum y Konnerth, 2005). El NGF, la NT3 y el BDNF actúan de manera retrógrada, mientras que la NT3 y el BDNF, también actúan de manera anterógrada (Korsching, 1993). Todas son expresadas en el hipocampo (Skup, 1994) pero el BDNF es particularmente abundante (Binder y Scharfman, 2004).

### **1.3.2- Receptores de neurotrofinas.**

Existen dos tipos de receptores de neurotrofinas: los Trk de alta afinidad y el p75 de baja afinidad, ambos, receptores de membrana. Los Trk, ubicados en neuronas y astrocitos, transmiten señales que aumentan la supervivencia y promueven el crecimiento celular (Klein, 1994). Son receptores del tipo troponina quinasa, o sea que poseen actividad quinasa. El TrkA reconoce principalmente al NGF y también a la NT3 y la NT4, el TrkB reconoce el BDNF y la NT4, y con menos afinidad la NT3, y el TrkC reconoce la NT3 (Tessarollo, 1998). El receptor p75 pertenece a la

superfamilia de receptores de TNF (factor de necrosis tumoral) y de Fas (quinasa de adhesión focal), por lo que posee actividad tirosina quinasa (Reinés y col., 2003). Tiene una afinidad similar por todas las neurotrofinas. A este receptor se le adjudican tanto funciones positivas para la supervivencia neuronal, como, en ciertas condiciones, la inducción de la muerte celular. Todos los receptores de neurotrofinas se expresan en el hipocampo (Klein, 1994). Los receptores Trk se distribuyen por el soma y las neuritas. La unión de la neurotrofina al receptor induce cambios conformacionales que llevan a la dimerización y activación del receptor (Blum y Konnerth, 2005). Éste puede desencadenar cascadas de señales desde la membrana pero también puede ser endocitado y activar cascadas de señales desde la vesícula que es transportada de forma retrógrada hacia el soma.

Las cascadas que pueden activarse son (Reinés y col., 2003, Huang y Reichardt, 2001):

- La cascada de las MAPK, la cual es responsable de un alto porcentaje de la supervivencia celular inducida por la neurotrofinas y es vital para proteger a las neuronas del estrés oxidativo y del daño por citoquinas. Mediante esta cascada pueden activarse factores de crecimiento o factores de transcripción, y también puede intervenir en los procesos de LTP.
- La vía de señalización que involucra a la fosfolipasa C ( $PLC\gamma$ ). Ésta lleva a la salida del  $Ca^{2+}$  de los reservorios y a la subsecuente activación de quinasas. Esta vía también podría intervenir en el proceso de LTP.
- La vía de la fosfatidil inositol-3'-quinasa (PI3K), la cual es la mayormente responsable de la supervivencia inducida por NGF. Esta cascada participa en fenómenos antiapoptóticos, inhibiendo a la procaspasa-9 y estimulando la síntesis del factor anti-apoptótico Bcl-2, entre otros.

La respuesta resultante de la interacción neurotrofina-receptor dependerá de que vía sea activada, lo cual puede depender de la duración y potencia de la activación de diversos receptores y la coexpresión de éstos.

### **1.3.3- Funciones de las neurotrofinas.**

En general, todas las neurotrofinas cumplen una función en la supervivencia, desarrollo y diferenciación de las neuronas, y en el crecimiento de neuritas, e

influyen en la expresión de proteínas esenciales para el funcionamiento normal de las neuronas.

El NGF, por ejemplo, estimula la supervivencia y la iniciación neurítica (Levi-Montalcini y Angeletti, 1963), la síntesis de diversos neuropéptidos (Heumann, 1987) y tiene un papel importante en el mantenimiento de un estado diferenciado de las neuronas sinápticas y sensoriales (Misko y col., 1987).

El BDNF promueve la supervivencia y el crecimiento en una variedad de neuronas. Por ejemplo, el BDNF contribuye al desarrollo dependiente de actividad de la corteza visual (Binder y Scharfman, 2004), lo cual sugiere un papel en el cableado de axones en el desarrollo. El BDNF también tiene importantes efectos en la morfología dendrítica (Murphy y col., 1998) y favorece la neurogénesis (Kato-Semba y col., 2002).

Entre las funciones de la NT3 se encontraría la facilitación del desarrollo y la supervivencia de neuronas (Huang y Reichardt, 2001), del desarrollo de precursores neuronales hipocámpales (Vicario-Abejón y col., 1995), y de la supervivencia y desarrollo de oligodendrocitos (Barres y col., 1994).

Tanto el BDNF como la NT3 cumplen un papel en las sinapsis. Ésta es una función muy importante del BDNF, dado que es promotor de la LTP. Cortes hipocámpales tratados con BDNF o NT3 y no con NGF mostraron un aumento persistente en la amplitud del potencial postsináptico, similar a lo que ocurre con la inducción de LTP (Kang y Schuman, 1995). Recíprocamente, en ratones *knockout* para BDNF no se pudo inducir LTP con la estimulación tetánica y esto fue revertido con la aplicación de BDNF exógeno (Korte y col., 1995; Patterson y col., 1996). Además, estímulos eléctricos que inducen LTP aumentan la expresión de BDNF y NGF (Patterson y col., 1992).

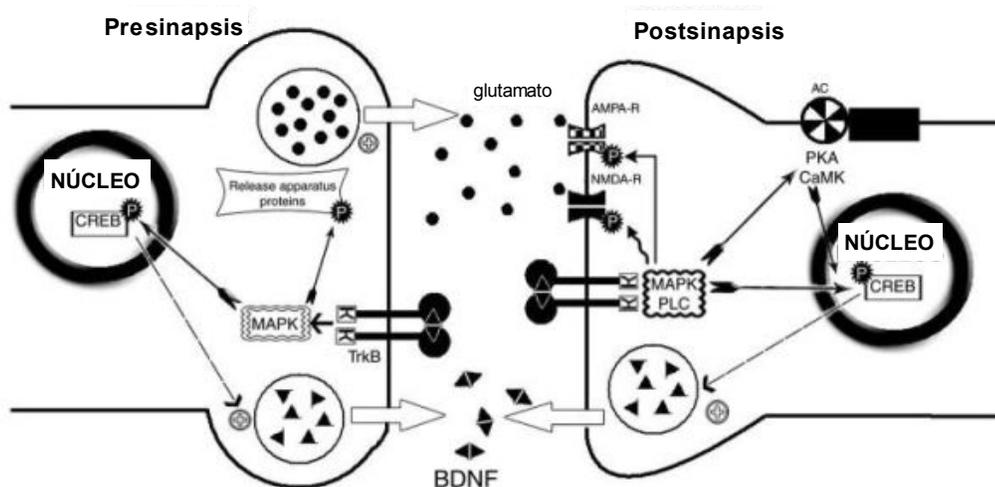
Algunos experimentos demuestran que el efecto del BDNF en el LTP sería a nivel de la presinapsis, en la liberación de neurotransmisores, pero también se presentan fuertes evidencias de efectos en la postsinapsis (McKay y col., 1999; Binder y Scharfman, 2004). En la postsinapsis, el BDNF modula a los canales tipo NMDA y GABA y además activa canales de sodio voltaje-dependientes que llevan a la liberación de neurotransmisores desde las dendritas (Blum y Konnerth, 2005).

Por otro lado, puede observarse el papel del BDNF en el aprendizaje (figura 4). Se ha demostrado que durante el aprendizaje contextual se induce la expresión de

BDNF en el hipocampo y que el bloqueo de la función del BDNF impide el aprendizaje espacial (Binder y Scharfman, 2004).

La desregulación de neurotrofinas está asociada con diversas patologías del sistema nervioso. En las enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson, el BDNF se encuentra disminuido en hipocampo y neocorteza (Schindowski y col., 2008) y en la sustancia negra, respectivamente (Binder y Scharfman, 2004). En el Alzheimer, en algunas zonas del cerebro se encuentra aumentada la pro-NGF y disminuido el TrkA. Además, el NGF estimula la transcripción del péptido APP (Schindowski y col., 2008).

Distintas investigaciones relacionan un aumento del BDNF en los cambios electrofisiológicos y comportamentales de la epilepsia (Binder y Scharfman, 2004). La expresión hipocampal del BDNF se vio aumentada en pacientes epilépticos (Mathern y col., 1997). Además, las convulsiones aumentan los niveles de mensajero de NGF (Gall y Isackson, 1989). Por otro lado, la expresión de BDNF hipocampal aumenta luego de un daño cerebral.

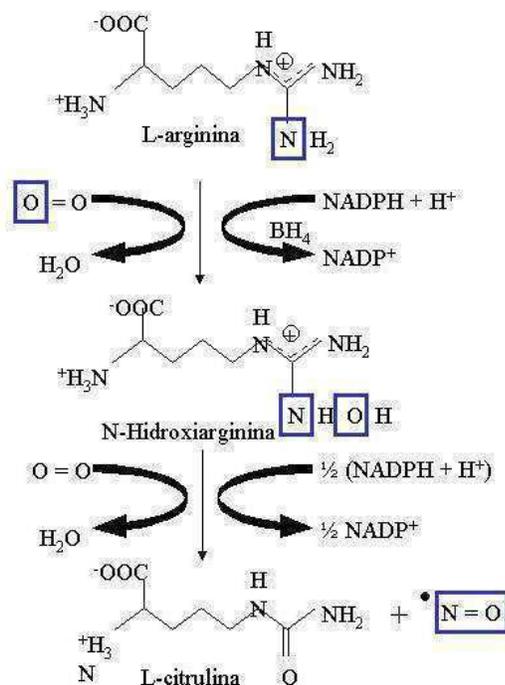


**Figura 4.** Vías de señalización por la activación del BDNF/TrkB en el aprendizaje y la memoria. La actividad aumenta la expresión de BDNF y liberación en sitios pre y postsinápticos. El BDNF se une a los receptores TrkB localizados sobre los axones presinápticos, llevando a éstos a autofosforilación y activación de la vía de transducción de señales de las MAPK, facilitando la liberación del neurotransmisor. El BDNF también se une a los receptos TrkB postsinápticos, conduciendo a la activación de los receptores AMPA y NMDA a través de la activación de las vías MAPK y PLC que llevan a la subsecuente fosforilación de PKA, CaMK y CREB (Yamada y col., 2002).

## 1.4- NOS y NO.

El óxido nítrico (NO) es una molécula pequeña, no cargada, con un electrón desapareado, que posee un carácter fuertemente hidrofóbico y alto coeficiente de difusión ( $3300 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) (Ledo y col., 2004). Las enzimas de la familia de la óxido nítrico sintasa (NOS) catalizan la oxidación del grupo guanidino del aminoácido L-arginina para generar NO y L-citrulina (Moncada y col., 1991). Esta reacción involucra dos pasos de mono-oxigenación. La N-hidroxiarginina es una especie intermediaria formada a partir de una reacción que requiere un  $\text{O}_2$  y un NADPH y la presencia de tetrahidrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ). El segundo paso de la reacción de síntesis del NO resulta de la oxidación de la N-hidroxiarginina para dar citrulina y NO (Knowles y Moncada, 1994). La reacción oxidativa implica 5 electrones y esta estequiometría impar de la transferencia de electrones permite la generación de un radical libre (Forstermann y col., 1994). (Ver figura 5).

Se han identificado tres isoformas de la NOS que son producto, de al menos, tres genes distintos, ubicados en diferentes cromosomas (Forstermann y col., 1994). Inicialmente estas isoformas se clonaron de cerebro de rata (nNOS o NOS-I), de macrófagos (iNOS o NOS-II) y de células endoteliales bovinas y humanas (eNOS o NOS-III). Trabajos posteriores han demostrado su expresión en otras células y tejidos: la nNOS, además de las células nerviosas, se localiza en ciertas áreas de la médula espinal, ganglios simpáticos, glándula adrenal, células epiteliales de pulmón, útero y estómago, músculo esquelético, islotes pancreáticos y en la mácula densa del riñón (Forstermann y col., 1994); la eNOS se expresa también en determinadas poblaciones neuronales (Nelson y col., 1997); y la iNOS puede expresarse en distintos tipos de células como hepatocitos, células endoteliales, condrocitos, células gliales y neuronas (Ledo y col., 2004). Las tres son homodímeros en su forma activa, con monómeros de peso molecular alrededor de 160 kDa para la nNOS y 130 kDa para iNOS y eNOS. Todas tienen FAD, FMN y hemo como grupos prostéticos y requieren tetrahidrobiopterina (Knowles y Moncada, 1994; Forstermann y col., 1994; Nelson y col., 1997).



**Figura 5.** Esquema de la reacción catalizada por la NOS.

Las isoformas de la NOS se pueden distinguir por la dependencia de calcio-calmodulina y por la inducibilidad. La nNOS y la eNOS se expresan constitutivamente y son dependientes de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina. A las concentraciones intracelulares de Ca<sup>2+</sup> en células en reposo ( $\cong 100$  nM), estas isoformas no unen calmodulina y por lo tanto, están inactivas, mientras que concentraciones mayores a 500 nM provocan la unión del complejo Ca<sup>2+</sup>/calmodulina y la consecuente activación de la enzima. Normalmente, generan niveles moderados de NO (del orden de picomoles) que modulan procesos rápidos como la neurotransmisión y la dilatación de los vasos sanguíneos respectivamente. Por el contrario, la isoforma iNOS prácticamente no se expresa en células no estimuladas, y es inducida a nivel transcripcional por endotoxinas como lipopolisacáridos (LPS) bacterianos o por citoquinas proinflamatorias (Forstermann y col., 1994), y aunque se une a calmodulina su actividad no es regulada por calcio (Knowles y Moncada, 1994). Esta isoforma puede generar cantidades importantes de NO (del orden de nanomoles) durante largos períodos de tiempo, que pueden causar efectos citotóxicos (Forstermann y col., 1994).

Las isoformas de NOS también difieren en su localización subcelular. Aunque la nNOS es una enzima soluble, puede aparecer parcialmente asociada a membrana.

Se ha identificado un dominio PDZ en el extremo N-terminal que sugiere su capacidad de interactuar con otras proteínas como la PSD-95 en células neurales. A su vez esta proteína (PSD-95) se une a los receptores de glutamato de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) también por un dominio PDZ. Estas interacciones permitirían una localización de la nNOS próxima a los receptores de NMDA, principales activadores de esta isoforma en neuronas, favoreciendo así una rápida activación (Ledo y col., 2004). A diferencia de la nNOS, la eNOS es una proteína particulada, asociada a la membrana por residuos de miristato (Knowles y Moncada, 1994) y la iNOS es una proteína citosólica (Forstermann y col., 1994).

Estudios *in vitro* indican que la actividad de la isoforma nNOS puede ser regulada mediante fosforilación también por otras proteínas quinasas como la proteína quinasa C (PKC) y la quinasa dependiente de calmodulina (CaMK) (Nakane y col., 1991; Knowles y Moncada, 1994). Además la nNOS también puede ser regulada por interacción con una proteína adaptadora específica de cerebro llamada CAPON, la cual compite por el dominio PDZ separando a la nNOS de los receptores de NMDA (Ledo y col., 2004) (figura 6). Otro mecanismo de regulación de la actividad es la inhibición directa de la actividad enzimática por el propio NO, probablemente por unión al grupo hemo (Colasanti y col., 1995). Además, el NO posee un efecto inhibitorio sobre la transcripción de la iNOS por dos mecanismos, ya sea suprimiendo la activación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) por inducción y estabilización del inhibidor de NF- $\kappa$ B, el factor inhibitorio I $\kappa$ B; o por interferir directamente en la unión de NF- $\kappa$ B a los elementos de respuesta presentes en la región promotora de los genes que codifican la iNOS (Colasanti y Susuki, 2000). Existen algunos factores que aumentan la actividad de la NOS constitutiva e inhiben la inducción de la iNOS. Por ejemplo pretratamientos de astrocitos con glutamato que aumentan la actividad de nNOS por activación de los receptores NMDA, suprimen la expresión de iNOS inducida por citoquinas; la dexametasona, un inhibidor de la expresión de iNOS, incrementa la actividad de nNOS en astrocitos (Colasanti y Susuki, 2000). Estos mecanismos son puntos de control importantes para la producción de NO.

La nNOS se ha detectado en numerosas regiones del SNC como el cerebelo, el bulbo olfatorio accesorio y principal, los colículos inferiores y superiores, el núcleo supraóptico, la corteza cerebral, el caudado putamen (Nelson y col., 1997) y las regiones CA1, CA2 y CA3 y el giro dentado de la formación hipocampal, entre otros (Nelson y col., 1997; de Oliveira y col., 2000). Esta amplia distribución indica que el

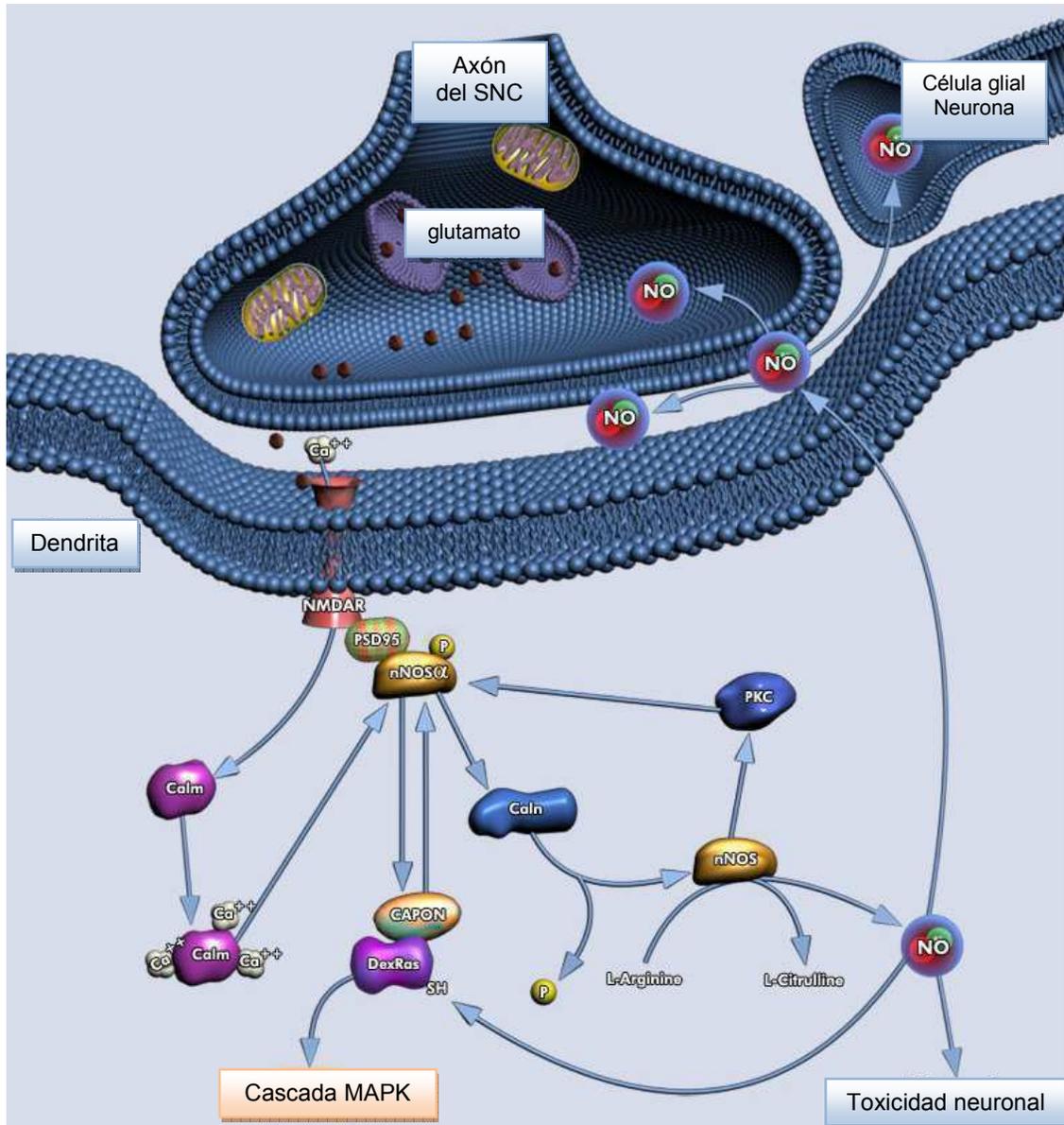
NO es un importante mensajero biológico de una gran cantidad de procesos que se llevan a cabo dentro del sistema nervioso. En cuanto a su localización celular, en cortes de cerebro la nNOS ha sido localizada tanto en astrocitos (Colasanti y Susuki, 2000) como en poblaciones neuronales (Ledo y col., 2004). Hay estudios que demuestran que la localización y expresión de nNOS en neuronas del hipocampo difiere fuertemente entre rata y ratón. En ratón se ha encontrado una importante expresión de nNOS en el citoplasma de células piramidales tanto en CA1 como en CA3, mientras que en rata la mayoría de los estudios revelan que la expresión de nNOS está confinada a interneuronas de CA1 o es limitada en células piramidales de esta subregión. Además se encontró que la expresión de nNOS en ratón es mucho mayor que en rata. Es llamativo que esta diferencia sólo se observa en hipocampo y no en otras áreas del cerebro (Blackshaw y col., 2003). La eNOS se expresa en determinadas poblaciones neuronales de diferentes regiones cerebrales como células piramidales del hipocampo, neuronas de la capa granular interna del bulbo olfatorio y cerebelo (Nelson y col., 1997), mientras que la iNOS puede ser activada en microglía y astrositos (Ledo y col., 2004).

El NO es un importante regulador de la función neuronal. Así se ha descrito que el NO es un mensajero intracelular sintetizado endógenamente después de la activación de receptores NMDA. En el cerebro, el NO es una molécula de señalización retrógrada que transfiere información de las terminales nerviosas post a presinápticas. También actúa como segundo mensajero en la terminal postsináptica. El NO juega un rol importante en el LTP en el hipocampo y en el LTD en cerebelo y estaría involucrado en procesos de aprendizaje y memoria conservados a lo largo de la evolución (Bredt y Snyder, 1992).

La principal señal intracelular que desencadena el NO, es el aumento de los niveles de GMPc, que activaría la proteína quinasa dependiente de GMPc y la correspondiente cascada intracelular (Feil y Kleppisch, 2008). Existen evidencias de mecanismos independientes de GMPc, por ejemplo la ADP ribosilación de proteínas que regularían la transmisión sináptica (Sullivan y col., 1997). Asimismo, se ha descrito que el NO puede aumentar la liberación basal de neurotransmisores como la dopamina, glutamato y acetilcolina (Lonart y Johanson, 1992).

La producción de NO puede conducir a neuroprotección o neurotoxicidad dependiendo de su concentración, del lugar de producción y del entorno celular (Colasanti y Susuki, 2000). Miranda y col. (2000) sugieren que el NO a bajas

concentraciones, en el orden nanomolar, actúa directamente como un antioxidante. Se ha demostrado que el NO protege contra la injuria celular causada por peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), xantina oxidasa, y alquilhidroxiperóxidos. Ha sido propuesto que una controlada producción de NO podría constituir parte de la respuesta fisiopatológica de los tejidos a la noxa y la inhibición de esta respuesta podría interferir con los procesos normales de reparación (Khaldi y col., 2002). Sin embargo, altas concentraciones de NO, en el orden nanomolar, puede participar en eventos neurodestructivos. Entre los mecanismos propuestos, se incluyen la reacción del NO con el ión superóxido y la producción de peroxinitrito, un conocido compuesto tóxico (Przedborski y col., 2000).



**Figura 6:** Señalización de nNOS en las sinapsis neuronales. La estimulación de los receptores de NMDA (NMDAR) por glutamato, proveniente de las neuronas presinápticas, produce entrada de calcio en las neuronas postsinápticas. Los NMDAR produce la activación de la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), produciendo óxido nítrico (NO) y citrulina a partir de arginina. La nNOS está regulada por la proteína quinasa C (PKC) y por la proteína adaptadora específica de cerebro (CAPON), la cual compete por el dominio PDZ separando a la nNOS de los NMDAR. El NO actúa como un mensajero retrógrado y dependiendo de su concentración puede conducir a señales de sobrevida (cascada MAPK) o toxicidad neuronal.

## 1.5- Proteína quinasa C.

La PKC es una familia de 12 isoformas, nueve de las cuales están presentes en el cerebro (Hrabetova y Sacktor, 2001), que han sido clasificadas en 3 grupos: PKC convencionales ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ), son calcio dependientes y activadas por fosfatidilserina (PtdSer) y diacilglicerol (DAG); PKC nóveles ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ), son activadas por PtdSer, DAG pero no por calcio y PKC atípicas ( $\iota$ / $\lambda$ ,  $\zeta$ ,  $\mu$ ), las cuales requieren sólo PtdSer para su activación (Newton y Johnson, 1998). Cada isoforma presenta un dominio regulatorio amino-terminal, conteniendo una secuencia autoinhibitoria para un pseudosustrato y un sitio de unión a segundos mensajeros; y un dominio catalítico carboxilo-terminal. PKC está normalmente en un estado basal inactivo por interacciones entre estos dos dominios. Los segundos mensajeros activan transcientemente a PKC por unión al dominio regulatorio, translocando la enzima desde el citosol a membrana, y causando un cambio conformacional que temporariamente aumenta la autoinhibición (Hrabetova y Sacktor, 2001).

La activación de PKC por segundos mensajeros (por ejemplo DAG) o por ésteres de forbol (potente activador de PKC) involucra la translocación de la enzima a la membrana. Las diversas isoenzimas, las cuales muestran una distribución regional diferente, localización subcelular y perfiles de activación distintos, podrían tener especificidad por diferentes sustratos y participar en diversas funciones fisiológicas (Newton y Johnson, 1998).

Las distintas isoformas de PKC están involucradas en una extensa variedad de procesos fisiológicos y patofisiológicos en el cerebro y en el organismo entero (Oster y col., 2004). Su actividad es elevada en los sistemas en desarrollo como también en procesos de crecimiento, diferenciación y plasticidad neuronal (Hirono y col., 2001). En particular, regulan la conductancia de canales iónicos (Paubraj y Behari, 2004), la liberación de neurotransmisores y la dinámica de los receptores, eventos a largo término como expresión de genes y estarían implicadas en la LTP y LTD (Hrabetova y Sacktor, 2001), por lo que podrían jugar un papel importante en los procesos de aprendizaje y la memoria (Noguès y col., 1996).

Desde que se describió que PKC está involucrada en la plasticidad sináptica, se ha estudiado en el hipocampo la influencia de diferentes tipos de situaciones comportamentales sobre la actividad de PKC, qué isoformas están implicadas en

determinados procesos y cuál es su distribución celular. Así se demostró que la exposición a un ambiente enriquecido o a una actividad física crónica incrementa la actividad de PKC citosólica y decrece la actividad de PKC unida a membrana, respectivamente, mejorando el aprendizaje espacial (Noguès y col., 1996). También se demostró que PKC está críticamente involucrada en procesos que desencadenan desórdenes como la enfermedad de Alzheimer (Xu y col., 2005), a través de la excitotoxicidad por glutamato, cuyas dosis citotóxicas conducen a la redistribución de la PKC (Buchner y col., 1999). Estudios acerca del rol de las isoformas de PKC en hipocampos de ratas adultas son contradictorios. Colombo sostiene que en ratas de 6 meses de edad existe una correlación entre las altas concentraciones de PKC $\gamma$  en la fracción particulada y PKC $\beta$ II en la fracción soluble con una mejor memoria espacial. En ratas de 24 meses de edad el deterioro de la memoria fue correlacionado con altas concentraciones de PKC $\gamma$  en la fracción soluble (Colombo y col., 1997). Otros autores sostienen que no hay diferencias entre las fracciones citosólica, particulada y nuclear de hipocampo de ratas jóvenes y adultas para las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$  y  $\zeta$  de PKC (La Porta y Comolli, 1999).

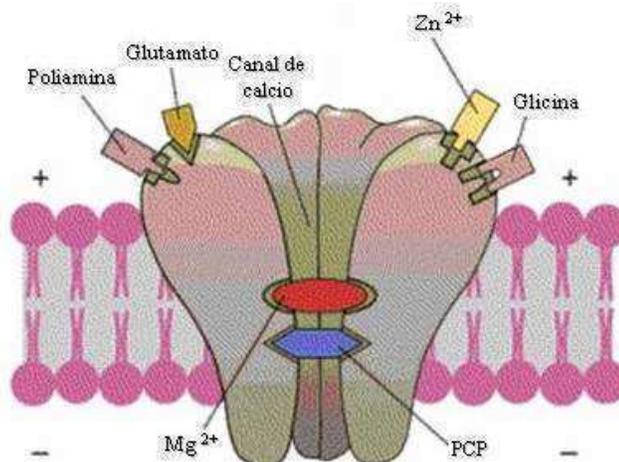
Estudios recientes sobre la función de PKM $\zeta$  indican un rol importante de esta forma activa de la isoforma atípica PKC $\zeta$  en la potenciación y/o depresión a largo término. Se cree que ambas constituyen los mecanismos principales de la formación del aprendizaje y la memoria. Es importante mencionar que estos autores no han detectado PKC $\zeta$  en el hipocampo, pero si han encontrado altos niveles de ARNm de PKC $\lambda$  y PKM $\zeta$ . La expresión de PKC $\lambda$  está ausente o altamente disminuida en la angosta región CA2 del giro hipocampal, separando las áreas CA1 de CA3. El giro dentado contiene altos niveles de transcritos de PKC $\lambda$  y PKM $\zeta$  mientras que el subiculum solamente expresa PKM $\zeta$ , indicando un rol específico de ambas isoformas en la adquisición de la memoria por el sistema límbico (Oster y col., 2004). En la LTD, inducida en la región CA1 del hipocampo, se observó que las isoformas convencionales de PKC ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ) se incrementaron en la fracción de membrana a los 45 segundos de ser estimulado; mientras que PKM $\zeta$  decreció en el citosol recién a los 15 minutos y luego a los 30 minutos lo hicieron PKC $\gamma$  y PKC $\varepsilon$ . Este decrecimiento fue persistente. Por lo tanto distintas isoformas de PKC participan en la inducción y el mantenimiento del LTD (Hrabetova y Sacktor, 2001).

El estudio acerca de la implicancia de las isoformas de PKC y su distribución celular en distintos procesos, tanto fisiológicos como patológicos, todavía no está claro y se desconocen muchos de los mecanismos involucrados.

### **1.6- Receptores N-metil-D-aspartato (NMDA).**

Los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), un subtipo de receptores de glutamato, actúan como detectores de coincidencia porque requieren tanto la actividad presináptica (glutamato liberado por el axón terminal) como postsináptica (despolarización que libera el  $Mg^{2+}$ , condición necesaria para la apertura del canal). Los canales de los receptores NMDA activos permiten el influjo de calcio hacia el interior de la célula postsináptica, la cual dispara una cascada de eventos bioquímicos resultando en un cambio sináptico (Tsien y col., 1996). En la figura 7 se muestra un esquema representando un receptor NMDA. La potenciación a largo término (LTP), un modelo de plasticidad neuronal implicado en el aprendizaje y la memoria, es fácilmente inducido en el hipocampo, y requiere la activación de estos receptores NMDA (Cain y col., 1997).

En el área CA1 del hipocampo, la inducción de la LTP más comúnmente estudiada es la dependiente de la activación del receptor NMDA. La excesiva estimulación de estos receptores provoca una elevada cantidad de  $Ca^{2+}$  libre en el citosol de la neurona postsináptica. Estos niveles de calcio provocan la activación de la fosfolipasa A2 ( $PLA_2$ ), llevando a la subsecuente liberación de ácido araquidónico (AA). El metabolismo del AA puede producir ROS libres y peroxidación lipídica conduciendo a la muerte celular. A estos mecanismos de muerte neuronal como consecuencia de la hiperestimulación del receptor de glutamato se lo denomina excitotoxicidad.



**Figura 7.** Esquema de un receptor de NMDA.

### 1.7- Estrés oxidativo.

En la bioquímica celular ocurren reacciones de óxido-reducción que determinan el estado redox de la célula. Este estado puede encontrarse o no en equilibrio, dependiendo de cuántos compuestos biológicos se encuentren reducidos y cuántos oxidados, lo cual a su vez depende del balance entre prooxidantes y antioxidantes. Un aumento de prooxidantes o una disminución de antioxidantes podrían llevar a un desbalance y por ende a un estado de estrés oxidativo. En un estado de estrés oxidativo el DNA, los lípidos y las proteínas pueden ser oxidados, lo que puede contribuir al desarrollo de patologías como el cáncer (Cerutti y col., 1994) o enfermedades neurodegenerativas (Bishop y Anderson, 2005).

Diversas reacciones fisiológicas generan componentes prooxidantes, encontrándose entre ellos el oxígeno molecular ( $O_2$ ) y sus sustancias reactivas derivadas, las especies reactivas de oxígeno (ROS), así como el óxido nítrico (NO) y sus sustancias reactivas derivadas, las especies reactivas de nitrógeno (RNS) (figura 8). Las más reactivas de estas especies son las de naturaleza de radicales libres ya que poseen uno o más electrones desapareados y, además, generan reacciones en cadena irreversibles (Reinés y col., 2003).

Los radicales libres se producen continuamente a altas velocidades como subproducto del metabolismo aeróbico. Por ejemplo, un importante proceso involucrado en la producción de radicales libres es la cadena respiratoria acoplada a

la fosforilación oxidativa (Reinés y col., 2003). Otro ejemplo son las reacciones llevadas a cabo por el complejo enzimático citocromo P450 (Gregus, 2008).

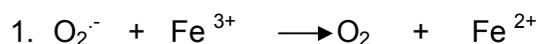


**Figura 8.** Esquema de las reacciones que generan componentes prooxidantes. En situaciones normales, la producción de prooxidantes se ve contrarrestada por diversos mecanismos celulares, tales como enzimas antioxidantes o vías metabólicas que mantienen un entorno reducido. Sin embargo, cuando la generación de prooxidantes supera a las defensas antioxidantes, se produce un estado de estrés oxidativo en el que el DNA, los lípidos y las proteínas son oxidados y por ende su estructura y funcionamiento son alterados, pudiéndose alcanzar, inclusive, la muerte celular (Schulz y col., 2000). Además, varios factores de transcripción están regulados por el estado REDOX, con lo cual una alteración en el balance de agentes reductores y oxidantes podría llevar a una expresión de genes alterada (Miao y St Clair, 2009). El estado de estrés oxidativo puede ser generado por diversos factores tales como la presencia de ciertos tóxicos (Gregus, 2008), la exposición a radiaciones, la presencia de metales de transición, la inflamación (Reinés y col., 2003), y el estrés (Chalmers y col., 2003; Epel, 2009). Además, el estrés oxidativo fue asociado a numerosas enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas, tales como el Parkinson, el Alzheimer (Bishop y Anderson, 2005) y la esquizofrenia (Smythies, 1999).

### 1.7.1- Especies Reactivas del Oxígeno (ROS).

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son un grupo de moléculas que derivan del oxígeno molecular (Thiels y Klann, 2002) y pueden inducir daño oxidativo en lípidos, proteínas y ADN, e incluso muerte neuronal, en ausencia de adecuada protección antioxidante. Las ROS cumplen varias funciones normales en las células actuando como segundos mensajeros regulando la expresión de genes en diversos campos como apoptosis, crecimiento celular y quimiotaxis. Las ROS también podrían actuar modulando la actividad de proteínas kinasas y fosfatasa durante la LTP. Así, niveles fisiológicos de peróxido de hidrógeno y superóxido son necesarios para la inducción y expresión de la LTP, mientras que altas concentraciones de estas ROS suprimen la expresión completa de LTP, posiblemente por ser tóxicas e inhibir la actividad de PKC (Klann y Thiels, 1999). Sólo cuando estas son producidas en exceso, o si las defensas antioxidantes están bajas, resulta en una patología (Smythies, 1999). En tal sentido, el hipocampo es una de las estructuras más vulnerables al daño por estrés oxidativo (Dubey y col., 1996).

Las principales especies reactivas de oxígeno son el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el radical oxhidrilo ( $OH^{\cdot}$ ), y el oxígeno singulete ( $O_2^1$ ). En reacciones como las que ocurren en la cadena respiratoria, el  $O_2$  recibe un electrón formándose así  $O_2^{\cdot-}$ . El  $O_2^{\cdot-}$  puede oxidar varias moléculas biológicas, como las catecolaminas y grupos prostéticos con hierro (Fe) de diversas enzimas, contribuyendo a la formación de  $OH^{\cdot}$  por la liberación del  $Fe^{2+}$  (Fridovich, 1997). El  $O_2^{\cdot-}$  puede recibir otro electrón, o el  $O_2$  puede recibir 2 electrones, formándose así  $H_2O_2$ , que no es un radical pero es oxidante y contribuye a la formación de  $OH^{\cdot}$ . El  $H_2O_2$  es producto de diversas reacciones enzimáticas, entre ellas la dismutación del  $O_2^{\cdot-}$  llevada a cabo por la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD) (McCord y Fridovich, 1969), y la beta peroxidación de ácidos grasos en peroxisomas (Reinés y col., 2003). Por su lado, el  $OH^{\cdot}$  es muy reactivo y puede originarse mediante dos reacciones sucesivas que dependen de la presencia de metales divalentes como el hierro (Graf y col., 1984):



El radical  $\text{OH}^{\cdot}$  resulta altamente tóxico debido a que reacciona tan rápidamente que la célula no posee defensas antioxidantes frente a él (Gregus, 2008). Al mismo tiempo, dado que las ROS pueden oxidar macromoléculas biológicas, se generan también radicales libres orgánicos (Harman, 1972).

El  $\text{Ca}^{2+}$  puede estar involucrado en la generación de ROS. Un aumento anormal de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular puede desacoplar la cadena respiratoria e inducir la apertura de poros mitocondriales (Reinés y col., 2003). Recíprocamente, las ROS pueden aumentar el  $\text{Ca}^{2+}$  libre y la excitotoxicidad. Como ya se mencionó anteriormente, un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular puede ser producto de la acumulación de glutamato en el espacio sináptico actuando vía los receptores tipo NMDA, lo cual gatilla una cascada de señalización que lleva al aumento de las ROS (Lafon-Cazal y col., 1993). Esto ha sido involucrado en distintas enfermedades neurodegenerativas (Sheehan y col., 1997).

### 1.7.2- Especies reactivas del nitrógeno (RNS).

Como se mencionó anteriormente, el NO es un gas radical libre producido por las óxido nítrico sintetas (NOS) que puede resultar benéfico o dañino, según en qué concentración y entorno se encuentre. Bajas concentraciones de NO en un ambiente libre de estrés oxidativo corresponderían al funcionamiento fisiológico normal (Marletta y Spiering, 2003). De hecho, a bajas concentraciones resulta protector contra el daño oxidativo (Wink y col., 1995). Sin embargo, altas concentraciones resultan oxidantes. Bajo estas condiciones se gatillan señales diferentes que llevan a caminos como la inhibición del BDNF (Canossa y col., 2002) y de proteínas reparadoras del ADN (Liu y col., 2002), e inducción la apoptosis (Bonfoco y col., 1995). El rol dañino del NO se debe a su propia acción oxidante y a la de las RNS que de él derivan. En condiciones de estrés oxidativo, al encontrarse con  $\text{O}_2^{\cdot -}$  puede reaccionar formando peroxinitrito ( $\text{ONOO}^{\cdot -}$ ), oxidante muy potente (Marletta y Spiering, 2003, Beckman y Koppenol, 1996). El peroxinitrito reacciona fácilmente

con el  $\text{CO}_2$  dando un compuesto intermediario que se hidroliza espontáneamente en dos radicales: dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2^\cdot$ ) y anión radical carbonato ( $\text{CO}_3^{\cdot-}$ ) (Gregus, 2008). Por otro lado, a partir del NO se forman iones nitroxilo ( $\text{NO}^\cdot$ ) y  $\text{N}_2\text{O}_3$  como intermediario en la reacción del NO con el  $\text{O}_2$  (Miranda y col., 2000, Marletta y Spiering, 2003).

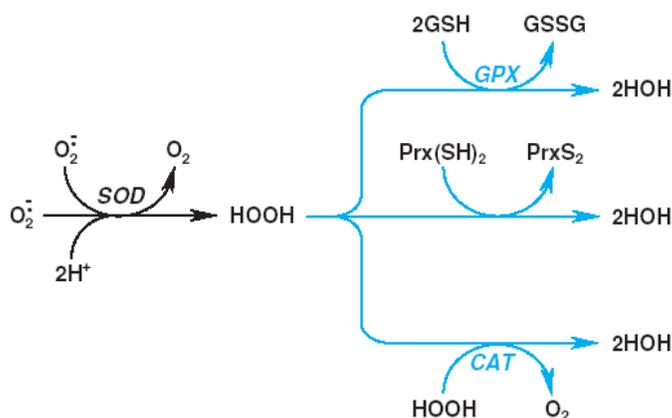
El NO es oxidante de sustratos tales como los grupos hemo (Miranda y col., 2000). Esto provoca la liberación de metales que podrían aumentar la producción de radicales hidroxilo. El  $\text{ONOO}^-$ , el  $\text{NO}_2^\cdot$ , el  $\text{CO}_3^{\cdot-}$  y el  $\text{NO}^\cdot$  son oxidantes de proteínas, lípidos y DNA (Miranda y col., 2000; Gregus, 2008; Bishop y Anderson, 2005). Un ejemplo es la nitración irreversible de residuos de tirosina frente al peroxinitrito (Guelman, 2003). Por otro lado, el  $\text{NO}_2^\cdot$  y el  $\text{N}_2\text{O}_3$  son donantes de  $\text{NO}^+$  que son transferidos a moléculas biológicas (Miranda y col., 2000).

La neurotoxicidad a partir de la estimulación del receptor de NMDA también estaría mediada por el NO producido por la nNOS (Culcasi y col., 1994; Dawson y Dawson, 1996). Al igual que para las ROS, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula a través de los canales NMDA provoca un aumento del NO, debido a que el ión activa las NOS. Al aumentar los niveles de ROS y NO conjuntamente, aumentan los niveles de peroxinitritos lo cual puede exacerbar el daño y llevar a la muerte celular (Reinés y col., 2003; Dawson y Dawson, 1996).

## 1.8- Defensas antioxidantes.

Como se mencionó, continuamente se producen especies reactivas con carácter oxidante. Sin ningún mecanismo de defensa frente a esto la supervivencia de un organismo aerobio no sería posible. Las defensas antioxidantes de una célula reducen la capacidad pro-oxidante. Estos mecanismos incluyen: la transformación de los compuestos pro-oxidantes a compuestos menos reactivos mediada por enzimas, la reducción de los compuestos mediada por moléculas atrapantes no enzimáticas, el secuestro de metales catalizadores de las reacciones de formación de radicales libres y el mantenimiento de un entorno reducido (Reinés y col., 2003).

Entre los antioxidantes cerebrales se encuentran el ácido ascórbico, las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) y el glutatión (GSH) (figura 9).

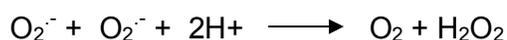


**Figura 9.** Esquema de las reacciones catalizadas por las principales enzimas antioxidantes. Enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa (CAT).

### 1.8.1- Superóxido Dismutasa.

Las SOD forman una familia de enzimas de la que se han caracterizado en eucariotas: la Mn-SOD mitocondrial, la Cu/Zn-SOD mayormente citosólica y la EC-SOD mayormente extracelular, esta última menos presente en tejido nervioso (Fridovich, 1997).

Como su nombre lo indica la SOD dismuta al superóxido en  $O_2$  y  $H_2O_2$  (McCord y Fridovich, 1969):



Por lo tanto las SOD cumplen un rol importante eliminando el  $O_2^-$  del medio y evitando, de esta manera, que se formen nuevas especies reactivas, como el peroxinitrito.

Cada SOD depende de ciertos iones metálicos divalentes. La tabla 1 muestra cuáles son los iones para cada una de las isoformas y, qué proteínas cumplen un rol importante en la donación de dichos iones, y por lo tanto en la actividad de las SOD (Miao y St Clair, 2009). Las SOD se expresan constitutivamente, pero pueden ser reguladas transcripcionalmente. Se cree que la Cu/Zn-SOD se expresa fundamentalmente de modo basal y muy poco de manera inducida (Miao y St Clair, 2009). En cambio la expresión de la Mn-SOD está altamente regulada, y en esto

cumple un papel importante la inducción de su transcripción por un estado de estrés oxidativo. Las SOD pueden ser reguladas, además, epigenéticamente o post-transcripcionalmente (Miao y St Clair, 2009).

**Tabla 1.** Isoformas de la enzima superóxido dismutasa (Miao y St Clair, 2009).

Isoforma	Localización	Masa molecular (KDa)	Subunidades de ensamblaje	Ión metálico
Cu/ZnSOD	Citoplasma, núcleo, membrana mitocondrial	88	Homodímero	Cu <sup>2+</sup> (catalíticamente activo)
MnSOD	Matriz mitocondrial	32	Homotetrámero	Zn <sup>2+</sup> (mantiene la estabilidad de la enzima), Mn <sup>2+</sup> (catalíticamente activo)
ECSOD	Membrana plasmática, fluidos extracelulares	135	Glicoproteína homotetramérica	Cu <sup>2+</sup> (catalíticamente activo), Zn <sup>2+</sup> (mantiene la estabilidad de la enzima)

Varios experimentos demuestran que las SOD cumplen un importante papel protector frente al estrés oxidativo, daño o neurotoxinas en el sistema nervioso central (Ischiropoulos y Beckman, 2003). Además, las SOD resultan protectoras frente a la excitotoxicidad mediada por el receptor NMDA (Dawson y Dawson, 1996). En distintos organismos se han reportado diversas anomalías provocadas por la falta de alguna de estas enzimas (Fridovich, 1997; Ischiropoulos y Beckman, 2003). Además las SOD parecerían estar altamente relacionadas con la esclerosis amiotrófica lateral familiar (FALS), en la cual los individuos presentarían una forma de la Zn/Cu-SOD mutada con función tóxica (Fridovich, 1997; Ischiropoulos y Beckman, 2003; Schulz y col., 2000).

### 1.8.2- Catalasa.

La catalasa (CAT) es una hemo-proteína asociada a NADPH con función peroxidasa (Chelikani y col., 2004). Se encuentra principalmente en los peroxisomas de las células de todos los órganos, especialmente en hígado y eritrocitos.

La CAT transforma el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua y  $\text{O}_2$ :

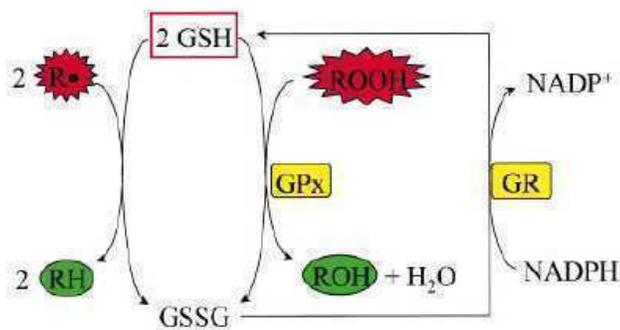


Es una enzima ubicua, muy resistente a la proteólisis y desnaturalización, y su expresión está modulada por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y especies reactivas del oxígeno (Chelikani y col., 2004).

### 1.8.3- Glutación.

El glutación (GSH) es el mayor antioxidante en el cerebro (Dringen, 2000). Es el principal antioxidante en los terminales presinápticos de las neuronas (Smythies, 1999). Sin embargo, la mayoría se encuentra en las células gliales (Philbert y col., 1991). Además se encuentra en el espacio extracelular porque es secretado por ambos tipos celulares.

El GSH es un tripéptido de glutamato, cisteína y glicina, mayormente citoplasmático (en menor medida mitocondrial), con alto número de tioles (Aoyama y col., 2008a), por lo tanto tiene un alto poder reductor. Actúa como secuestrador de radicales libres tales como el superóxido, el óxido nítrico, el radical hidroxilo y el peroxinitrito. Además, resulta cofactor de reacciones de reducción de peróxidos (como el  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), catalizada por la glutación peroxidasa (GPx) (Chance y col., 1979). Al reaccionar, el glutación reducido (GSH) pasa a su forma oxidada, glutación disulfuro (GSSG) (figura 10).



**Figura 10.** Vías de oxidación y reducción del glutación en su acción antioxidante. Glutación peroxidasa (GPx) y la glutación reductasa (GR) (Dringen, 2000).

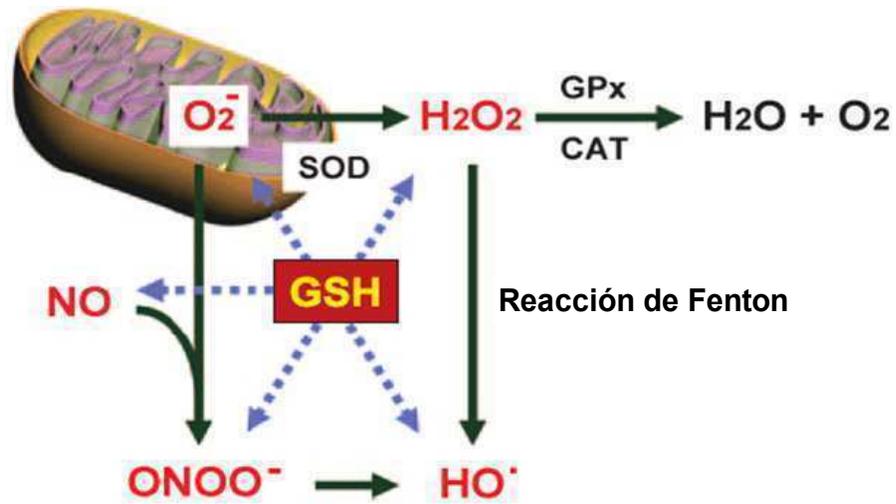
Normalmente, la mayoría del glutatión está en su forma reducida, por ello el sistema funciona como un buffer REDOX. La enzima glutatión reductasa (GR) dependiente de NADPH es la encargada de revertir el GSSG a GSH (Aoyama y col., 2008b).

Por otro lado, el glutatión forma conjugados con sustancias tóxicas, reacción catalizada por la glutatión-s-transferasa, y es liberado por las células e hidrolizado por la  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa (Dringen, 2000). Ambos fenómenos disminuyen la cantidad de glutatión, pero los valores son normalizados gracias a su síntesis de *novo*.

El GSH es formado a partir de la unión de glutamato y cisteína catalizada por la enzima  $\gamma$ -glutamilcisteína sintasa, formándose un dipéptido que luego se une a una glicina, reacción catalizada por la enzima GSH sintasa (Aoyama y col., 2008b). El GSH producido ejerce una retroalimentación negativa sobre su síntesis inhibiendo a la  $\gamma$ -glutamilcisteína sintasa. El sustrato limitante es la cisteína, la cual ingresa a las células gliales a través de los transportadores EAAT1 y EAAT2, y a las neuronas hipocámpales a través del transportador EAAC1 (Aoyama y col., 2008a). Además, el dipéptido, producto de la hidrólisis de GSH puede ser reutilizado como sustrato para la síntesis de *novo* (Dringen, 2000).

Además de su importancia como antioxidante, se le han adjudicado otras funciones, tales como un papel esencial en la proliferación celular, almacenamiento no tóxico de cisteína, neuromodulación sináptica y neurotransmisión (Cruz y col., 2003; Dringen, 2000).

Se ha documentado que una disminución de GSH puede desencadenar apoptosis, llevar a un aumento del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula, aumentar las ROS (figura 11), o conducir a la disfunción mitocondrial (Schulz y col., 2000). Se ha encontrado una disminución de GSH en el sistema nervioso de pacientes esquizofrénicos y en individuos con enfermedad de Parkinson (Schulz y col., 2000).



**Figura 11.** Protección dependiente del glutatión contra el estrés oxidativo. El glutatión reacciona con el superóxido, el óxido nítrico, el radical hidroxilo, y el peroxinitrito (flecha punteada). El glutatión también reacciona con el  $H_2O_2$  catalizados por la GPx/CAT. Abreviaturas:  $O_2^-$ : superóxido,  $H_2O_2$ : peróxido de hidrógeno, GPx: glutatión peroxidasa, CAT: catalasa, NO: óxido nítrico,  $ONOO^-$ : peroxinitrito,  $HO^\bullet$ : radical hidroxilo.

## **2- El sistema inmune.**

### **2.1- Anatomía del sistema inmune.**

Los seres superiores defienden constantemente su integridad biológica frente a agresiones, procedentes del exterior así como del propio organismo. De no ser así, morirían como consecuencia de tumores e infecciones por bacterias, virus, hongos, etc. Para que estos fenómenos de defensa se lleven a cabo, los organismos disponen de un conjunto de elementos especiales, conocido como sistema inmune. La capacidad de defensa se adquiere antes de nacer y se madura y consolida en los primeros años de la vida fuera del seno materno.

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

El rol primario del SI es entonces proteger al organismo de agentes perjudiciales externos. Juega además un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis antigénica del organismo eliminando clones autoreactivos, es decir que reconozcan antígenos propios (Fainboim y Geffner, 2005; Delves y Roitt, 2000a).

## **2.2- Inmunidad innata y adquirida.**

Existen dos tipos de inmunidad, la innata y la adquirida o adaptativa. La inmunidad innata es la primera línea de defensa ante una infección o un agente tóxico (Medzhitov y Janeway, 2000). Forman parte de ésta la piel y el epitelio de los tractos digestivo, respiratorio y genitourinario, así como también diversos tipos de células, como mastocitos, macrófagos, neutrófilos entre otras. Además involucra el sistema del complemento y proteínas de fase aguda. La respuesta inmune inespecífica es la primera barrera defensiva del organismo y no requiere sensibilización previa. Este tipo de respuesta es mediada por células con capacidad fagocítica y células asesinas naturales (NK).

El sistema inmune adaptativo evolucionó en los vertebrados primitivos y permite una respuesta inmunitaria mayor y específica, así como el establecimiento de la denominada memoria inmunológica que proporciona una respuesta mejorada a encuentros secundarios con ese mismo patógeno específico. La inmunidad adaptativa puede clasificarse en dos tipos: la inmunidad celular, mediada por linfocitos T (LT) y la inmunidad humoral mediada por linfocitos B (LB). Los LB y LT reconocen motivos particulares presentes en los patógenos. El linfocito B o T que reconoce su antígeno se activa y sufre un proceso de expansión clonal generando así una progenie de idéntica especificidad antigénica compuesta por miles de células (Delves y Roitt, 2000a).

## **2.3- Linfocitos B.**

Los linfocitos B cumplen la función de generar anticuerpos (Ac), función que llevan a cabo una vez diferenciados. Los LB responden a dos tipos distintos de antígenos (Ag), los Ag timo-independientes (T-independientes), como por ejemplo las estructuras poliméricas presentes en la pared de las bacterias Gram-negativas (lipopolisacárido de membrana, LPS), que inducen una respuesta sin necesidad de la colaboración de los LT y los Ag timo-dependientes (T-dependientes), como los glóbulos rojos de carnero (GRc) que necesitan de las células T para producir una óptima producción de Ac (Delves y Roitt, 2000b). La interacción de los Ag con sus receptores produce la activación del LB que prolifera y se diferencia en célula

plasmática, que es la célula efectora, y secreta activamente Ac específicos contra el Ag que las activó.

Los LB reconocen a su Ag a través de receptores de membrana. Para los Ag T-dependientes los receptores son inmunoglobulinas (Ig) de membrana de tipo IgD e IgM (BCR). El procesamiento y presentación de Ags T-dependientes a células T efectoras estimula la producción de citoquinas y la expresión en superficie de CD40, que actúa sobre las células B para inducir la progresión del ciclo celular y diferenciación celular. Existen dos tipos de Ag T-independientes, los Ag TI-1 que no estimulan las células B a través del BCR sino a través de receptores del tipo Toll (TLRs), como por ejemplo el LPS que estimula al LB a través del TLR-4 (Medzhitov, 2001); y los Ags TI-2 que reaccionan de forma cruzada con BCR (Fainboim y Geffner, 2005).

## **2.4- Linfocitos T.**

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

Existen diversos tipos de linfocitos T. En función de la expresión de moléculas de superficies CD4 y CD8 se clasifican en dos grupos. Las células T CD4<sup>+</sup> y células T CD8<sup>+</sup>. Las células CD4<sup>+</sup> a su vez se dividen en T helper 1 (Th1), T helper 2 (Th2), T helper 17 y T reguladores (T<sub>Reg</sub>) de acuerdo con su perfil funcional, determinado fundamentalmente por el patrón de citoquinas producido.

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> reconocen Ag procesados proteolíticamente y expuestos en el contexto de moléculas del MHC de clase II de las APC. Por otra parte, los linfocitos citotóxicos CD8<sup>+</sup> reconocen a los Ag que han sido procesados endógenamente en el

citosol de la célula infectada y presentados en superficie por moléculas MHC de clase I (Fainboim y Geffner, 2005).

La diferenciación de células T tanto en células efectoras Th1 como Th2 determina la naturaleza de la respuesta inmune adaptativa que se activa subsecuentemente.

## 2.5- Citoquinas.

Las citoquinas son moléculas de bajo peso molecular biológicamente activas que modulan la actividad del sistema inmune, secretadas por varios tipos celulares pertenecientes o no al sistema inmune. Sus acciones suelen ser pleiotrópicas y redundantes. En este sentido suelen observarse efectos sinérgicos o antagónicos. Algunas citoquinas se consideran anti-inflamatorias y otras pro-inflamatorias (Fainbom y Gefner, 2005).

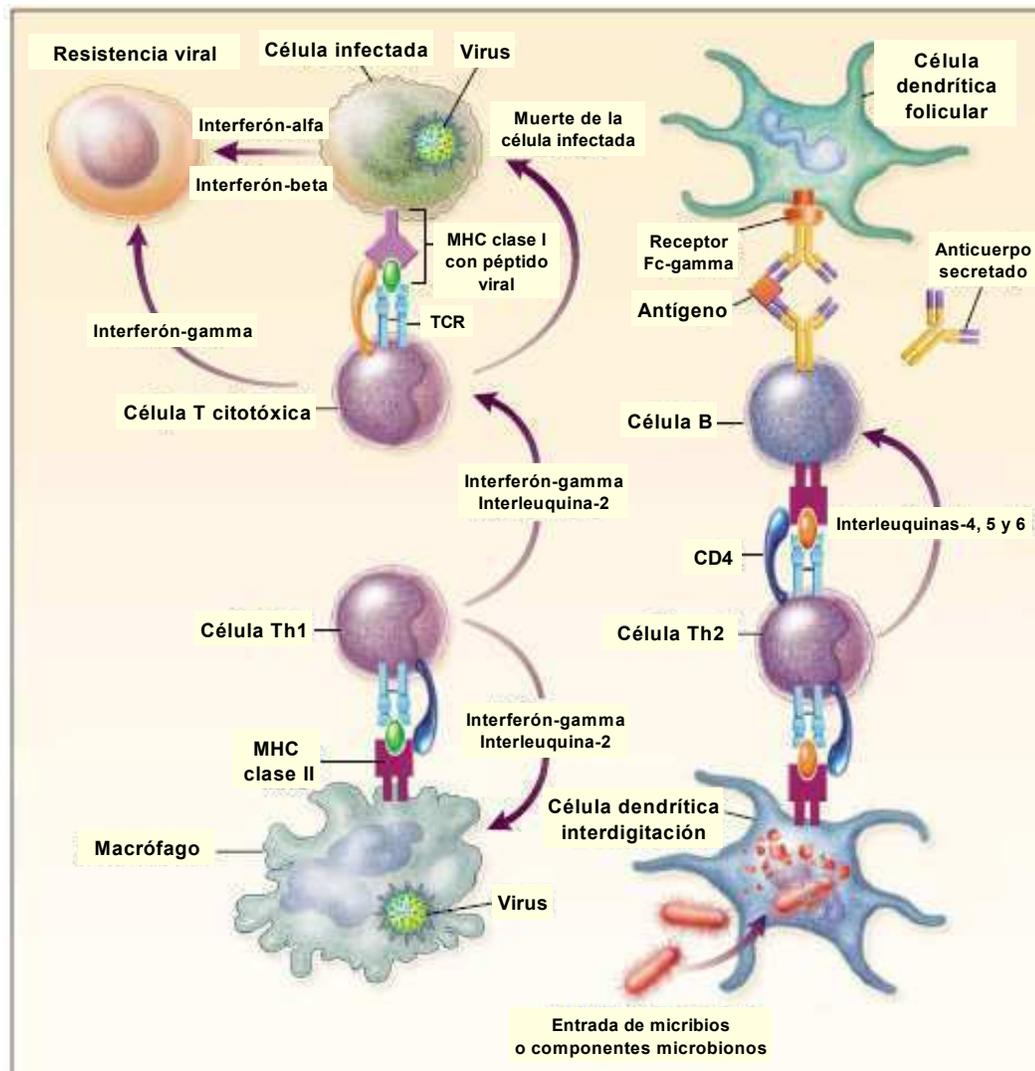
Las células Th1 cuando son estimuladas secretan IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF. Las células Th1 están involucradas en la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) que es la responsable del reclutamiento de otras células inflamatorias en los tejidos periféricos infectados y la diferenciación de células CD8<sup>+</sup> en células citotóxicas maduras. Un ejemplo de respuesta DTH mediada por células Th1 es la prueba de tuberculina cutánea. Además fueron implicadas como efectores de las enfermedades autoinmunes en general (Liblau y col., 1995; Romagnani, 1995), y en enfermedades del sistema nervioso central como por ejemplo la esclerosis múltiple (Olsson, 1995 a y b).

Las células Th2 secretan IL-4, IL-6, IL-10, IL5, IL-13 y TGF- $\beta$ . Cumplen un papel principal en la inmunidad frente a bacterias y parásitos extracelulares (Faimbon y Gefner, 2005). Estas células y sus citoquinas son necesarias para la estimulación y diferenciación de LB en células plasmáticas maduras secretoras de anticuerpos. También están implicadas en reacciones alérgicas: la IL-4 activa la producción de IgE y la IL-5 activa los eosinófilos (Elenkov, 2004).

La generación de respuesta Th1 y Th2 suele ser mutuamente excluyente. Existe una regulación cruzada entre Th1 y Th2. El IFN- $\gamma$  secretado por las Th1 inhibe la proliferación de las Th2. Por su lado, la IL-10 y la IL-4 secretadas por las Th2 inhiben la secreción de IL-2 e IFN- $\gamma$  por parte de las Th1. La inhibición ejercida por la IL-10 no es directa, la IL-10 reduce el número de moléculas de MHC-II de las APC por lo

cual ésta disminuyen su capacidad de activar a las Th1. El predominio de una u otra de las dos subpoblaciones de linfocitos Th depende a su vez del microambiente de citoquinas en que ocurre la activación y maduración inicial a partir de linfocitos en reposo (Faimbon y Geffner, 2005).

En la figura 12 puede verse un esquema general de la respuesta inmune.



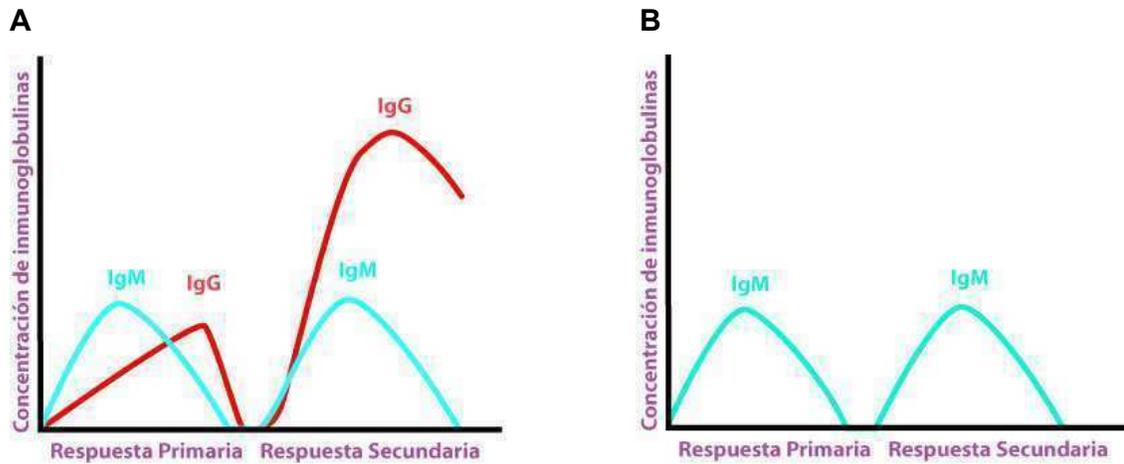
**Figura 12:** Esquema general de la respuesta de los linfocitos frente a una infección viral. Las células T se caracterizan por poseer receptores de células T (TCRs) que reconocen antígenos procesados presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), como se muestra en el lado izquierdo de la figura. La mayoría de las células T citotóxicas son  $CD8^+$ , reconocen un antígeno procesado presentado por las moléculas MHC de clase I, matan a la célula infectada, previniendo la replicación viral. Las células T citotóxicas activadas secretan interferón- $\gamma$ , que junto con el interferón- $\alpha$  y  $\beta$  producido por las células infectadas, crea un estado de resistencia celular a la infección viral. Como se muestra en el lado derecho de la figura, las células T colaboradoras (T *helper*) son generalmente  $CD4^+$ , reconociendo al antígeno procesado presentado por moléculas MHC de clase II, y puede ser dividido en dos poblaciones principales. Células T *helper* tipo 1 (Th1) que secretan interferon- $\gamma$  e interleuquina-2, las cuales activan macrófagos y células T citotóxicas para matar organismos intracelulares; células T *helper* tipo 2 (Th2) que secretan interleuquina 4, 5 y 6, las cuales ayudan a las células B a secretar anticuerpos. Las células B reconocen al antígeno directamente o en forma de complejo inmune sobre las células dendríticas foliculares en centros germinales (Delves y Roitt, 2000b).

## 2.6- Memoria inmunitaria. Respuesta primaria y secundaria.

Cuando un linfocito reconoce a su antígeno se activa y se produce una expansión clonal del mismo. Algunos de esos clones actuarán como células efectoras en la defensa contra el patógeno que despertó la respuesta, otras se diferenciarán en células de memoria que perdurarán en el organismo y podrán actuar frente a una reexposición al mismo patógeno, garantizando una respuesta más rápida y eficiente. Los LT  $CD4^+$  generan células de memoria que se pueden dividir en dos subpoblaciones los linfocitos T de memoria efectoras ( $T_{ME}$ ) y los linfocitos T de memoria centrales ( $T_{MC}$ ). Las  $T_{ME}$  expresan determinadas moléculas de adhesión y receptores para quimiocinas que les permiten ingresar a los tejidos periféricos, al ser activados secretan rápidamente las citoquinas efectoras. Los  $T_{MC}$  expresan moléculas de adhesión que les permiten entrar a los órganos linfáticos secundarios. Poseen mayor capacidad de proliferación frente a la reestimulación antigénica en relación con los  $T_{ME}$  (Fainboim y Geffner, 2005). Los linfocitos T  $CD8^+$  también poseen la capacidad de generar células de memoria.

En la inmunidad humoral deben distinguirse la respuesta inmune primaria de la secundaria. La respuesta inmune primaria se produce cuando el organismo se pone en contacto con un antígeno por primera vez. Es lenta, alcanza los niveles máximos de Ig tras un largo período de latencia (fase lag o de retardo) que es el tiempo requerido para la selección de un clon específico de células B y en la producción de células plasmáticas secretoras de anticuerpos y de células B de memoria. Luego se produce un aumento exponencial (hasta alcanzar un pico máximo) seguido de una meseta y un posterior declive. En total la respuesta puede durar desde unos días a varias semanas, dependiendo de la persistencia del antígeno. Para Ags T-dependientes, se produce primero IgM, y luego IgG, siendo la contribución global de la IgM más importante en el primer contacto con el antígeno. Para este tipo de antígeno, la respuesta secundaria posee diferencias importantes respecto a la respuesta primaria. Se inicia más rápidamente (menor fase lag), alcanza más intensidad (100 a 1000 veces mayor), dura más tiempo y se produce preferentemente IgG, aunque también IgA e IgE, en lugar de IgM (figura 13 A). Para Ags T-independientes, tanto en la respuesta primaria como en la secundaria, el Ac producido es de tipo IgM (figura 13 B).

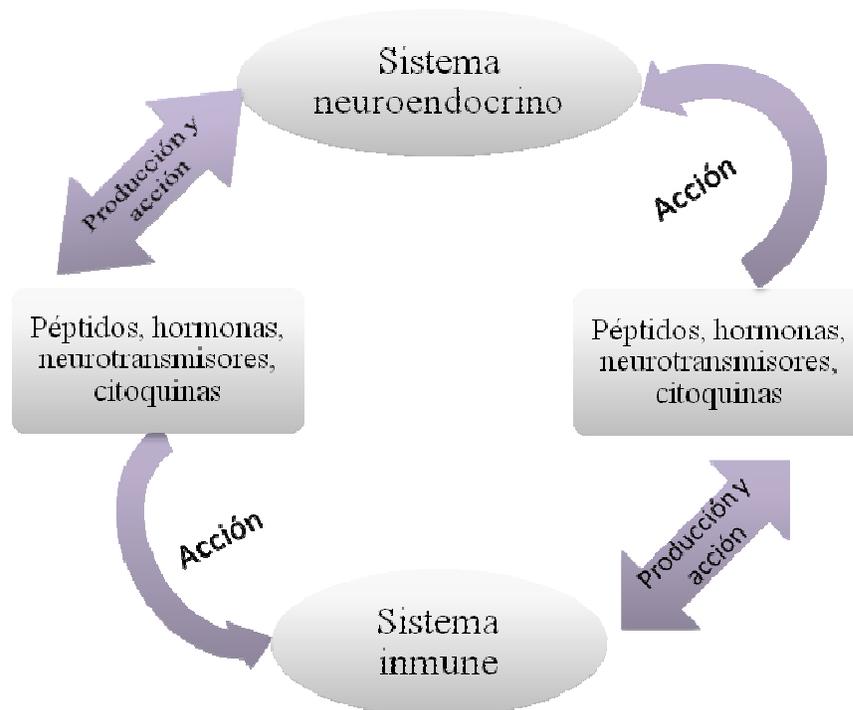
Por último cabe destacar que la memoria inmunitaria de los LB suele ser de mayor duración que la generada por LT (Fainboim y Geffner, 2005).



**Figura 13.** Respuesta primaria y secundaria. (A) Respuesta inmune inducida por un antígeno T-dependiente. (B) Respuesta inmune inducida por un antígeno T-independiente.

### 3- Interacción entre el sistema inmune y el sistema nervioso.

Durante los últimos veinte años se han realizado numerosos estudios para identificar los mecanismos responsables de la comunicación bidireccional entre los sistemas neuroendocrino e inmune. Una gran cantidad de estudios realizados *in vitro* e *in vivo*, indican que comparten ligandos y receptores que son usados como un lenguaje químico común dentro y entre el sistema inmune y neuroendocrino (Blalock, 1994). En la figura 14 se esquematiza la interacción entre ambos sistemas los cuales comparten ligandos y receptores.



**Figura 14:** Circuito de comunicación molecular dentro y entre el sistema inmune y el sistema neuroendocrino, compartiendo ligandos y sus receptores.

### 3.1- Regulación del sistema inmune por el sistema neuroendocrino.

Existe una estrecha relación entre el SI y el Sistema Nervioso (SN), estos dos sistemas junto al sistema endocrino (SE) mantienen la homeostasis del individuo y representan un mecanismo integral que contribuye a la adaptación del individuo y de las especies (Ader y Cohen, 1993). Entre estos sistemas existe una relación funcional para la adaptación fisiológica al estrés y es necesario un nivel óptimo de funcionamiento de los mismos para lograr una existencia duradera.

El sistema nervioso simpático (SNS), el cual inerva extensamente los órganos linfoides estableciendo conexiones anatómicas entre los sistemas nervioso e inmune (Felten y col., 1987; Felten y Felten, 1988), regula la función del SI principalmente por la vía de neurotransmisores adrenérgicos liberados a través de circuitos neuronales (Dantzer y Wollman, 2003 ; Webster y col., 2002).

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

La noradrenalina (NA) liberada por las terminales nerviosas ejerce su función a través de receptores adrenérgicos presentes tanto en LT como en LB. El principal subtipo de receptor adrenérgico descrito en los linfocitos es el  $\beta_2$  ( $\beta_2$ AR) (Bylund y col., 1994).

Las células T, las cuales expresan varios receptores para catecolaminas, pueden cambiar su fenotipo en respuesta a las señales recibidas. La noradrenalina, llevada a los órganos linfáticos vía inervación simpática, puede cambiar el perfil de producción de citoquinas y la respuesta proliferativa de las células T (Lyte y col., 1991), y movilizar las células madres hematopoyéticas de la médula ósea a la circulación de sangre periférica (Katayama y col., 2006). Diamond y col. (2001) publicaron un trabajo donde reportan que la estimulación mental en humanos aumenta el número de células T circulando en sangre. Otros resultados sugieren que las células T son movilizadas desde los nódulos linfáticos a la sangre periférica bajo condiciones fisiológicas en la cual la neurogénesis es aumentada por ambiente enriquecido y/o actividad física (Ziv y col., 2006).

La principal vía hormonal por la cual el SNC regula al SI es el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) a través de las hormonas de la respuesta neuroendocrina al estrés. A su vez las células del sistema inmune producen citoquinas que pueden alterar la función del eje HPA.

Existen dos tipos de receptores para los glucocorticoides (GCs), los receptores de glucocorticoides (GCR) y los receptores mineralocorticoides (MR) (Webster y col., 2002). La corticosterona tiene mayor afinidad por los MR que por los GCR (Sorrells y Sapolsky, 2007), por lo que a bajas concentraciones la hormona circulante se une preferentemente a MR. Sólo a altos niveles circulantes o altas concentraciones en el tejido los GCR son ocupados (DeRijk y col., 2002; Funder, 1997).

El principal receptor para GCs en células inmunes, como macrófagos y LT es el GCR por lo que la influencia de estas hormonas sobre la función inmune es mediada a través de este receptor (Marchetti y col., 2001).

Los GCs pueden regular al SI de muchas formas. Por ejemplo pueden modular la expresión de citoquinas, moléculas de adhesión, quimioattractantes y otros factores inflamatorios (Adcock e Ito, 2000; Atsuta y col., 1999; Nakagawa y col., 1999), bloquear la maduración linfocitaria (Wisniewska y col., 2004) e inducir apoptosis (Bishop y col., 2000).

Durante muchos años se pensó que los GCs eran inmunosupresores, sin embargo los estudios que llevan a estas conclusiones se realizaron utilizando dosis farmacológicas de éstos y moléculas sintéticas (Boumpas y col., 1993). Recientemente se postuló que a concentraciones fisiológicas, los GCs serían inmunomoduladores, ya que causan una supresión selectiva de la inmunidad celular Th1 y un cambio hacia la inmunidad celular Th2, más que una inmunosupresión generalizada (Elenkov, 2004). De hecho los GCs a nivel fisiológico estimularían varios aspectos de la función inmune. Por ejemplo, varios procesos relacionados a la función de células T son facilitados (Wilckens y De Rijk, 1997). También estimulan agudamente las reacciones de hipersensibilidad de tipo retardada, mientras que a concentraciones farmacológicas la suprimen (Dhabhar y McEwen, 1999).

### 3.2- Acción de las citoquinas en el sistema nervioso.

Se conoce que las citoquinas producen una serie de efectos sobre el comportamiento luego de su administración central o periférica (Dantzer y col., 1996; De Sarro y col., 1990). El animal que sufre una infección presenta una disminución en su alimentación, actividad locomotora y exploratoria, interacción social y actividad sexual, entre otras. El estado de somnolencia aumenta y las funciones cognitivas están disminuidas. Este comportamiento denominado "*sickness behavior*" ha sido asociado a la activación del sistema inmune y a la liberación de citoquinas (Dantzer, 2001). Las citoquinas proinflamatorias, el TNF- $\alpha$ , la IL-1 $\alpha/\beta$  y la IL-6 son las candidatas más firmes para mediar estos efectos. Se demostró experimentalmente que la administración central o periférica de IL-1 produce efectos sobre las funciones cognitivas (Bluthé y col., 1997). La administración de IL-6 o TNF- $\alpha$  no ejercen por si solas un efecto tan potente como el observado para la IL-1 aunque existen evidencias de su participación en la conducta denominada "*sickness-behavior*" (Bluthé y col., 2000). Asimismo, la IL-2 es capaz de inducir un efecto soporífero al ser inyectada en el locus coeruleus en ratones (Nistico y De Sarro, 1991). Por otro lado, se ha observado un aumento en la actividad locomotora y exploratoria luego de la administración de IL-2 en el hipocampo e hipotálamo (De Sarro y col, 1990; Nistico y De Sarro, 1991) y también luego de su administración periférica (De Sarro y col, 1990). Tanto la IL-2 como la IL-6 fueron asociadas con estados psicopatológicos como por ejemplo una serie de manifestaciones psiquiátricas, que incluyen el delirio, la paranoia, las alucinaciones y el estado de letargia, las cuales fueron observadas en pacientes que recibieron tratamiento inmunológico con IL-2 (Caraceni y col, 1993). Respecto al Alzheimer, se ha observado un aumento de las interleuquinas 1 y 6, que a su vez se han correlacionado con incrementos en la síntesis de proteínas amiloides, por lo que pueden considerarse uno de los factores determinantes de esta enfermedad.

Originalmente se pensó que las hormonas producidas en la periferia podían atravesar directamente la barrera hematoencefálica, ya que varias hormonas inmunoregulatorias, incluyendo IL-1, IL-2, IL-6 y TNF produjeron efectos sobre las funciones neuroendocrinas. Sin embargo como el tamaño de las hormonas era muy grande como para penetrar la barrera hematoencefálica, se sugirió la producción

local de las citoquinas en el tejido neuroendocrino (Vankelecom y col., 1989; Koenig y col., 1990).

Aún no queda claro cómo las interleuquinas alcanzan el SNC (Banks y col., 1995). Uno de los mecanismos propuestos sostiene que las citoquinas actúan a nivel de un órgano circunventricular, vagal u otro nervio aferente, liberando sustancias que estimulan la liberación de citoquinas dentro del SNC; las células de la microglía serían las principales productoras de las mismas. Otros mecanismos postulan la existencia de transportadores específicos de tal manera que las citoquinas ingresan a través de los mismos desde la sangre al SNC. Muchos de estos transportadores han sido identificados, aunque aún no está claro si la actividad de estos transportadores alcanza para obtener los niveles de citoquinas adecuados dentro del SNC para producir los efectos encontrados.

### **3.3- Acción de las neurotrofinas en el sistema inmune.**

Numerosos estudios se han hecho para dilucidar la función de las neurotrofinas (NTs) en otros sistemas, además del SN, incluyendo el SI (Otten y Gadiant, 1995; Tessarollo, 1998; Aloe y col., 1999; Aloe, 2001; Sariola, 2001).

Los linfocitos pueden secretar factores neurotróficos, factores que tienen la capacidad de aumentar la supervivencia neuronal. Como por ejemplo BDNF, NGF y la NT3 (Bronzetti y col., 2006). Los linfocitos además poseen receptores para estas NTs. Dean y col. (1987) fueron los primeros en demostrar que las neurotrofinas podían actuar sobre linfocitos, vieron que NGF puede incrementar la respuesta blastogénica en células esplénicas de ratón.

Además se vio que la expresión de neurotrofinas y sus receptores es dependiente de la activación celular (Kerschensteiner y col., 1999; Moalem y col., 2000).

Los niveles de BDNF en el giro dentado, los cuales son afectados por la actividad de las células inmunes (Ziv y col., 2006), podrían no sólo afectar la neurogénesis (Sairanen y col., 2005) sino también otras formas de plasticidad hipocampal como el LTD (Pang y col., 2004).

### **3.4- Evidencias que avalan la existencia de una autoinmunidad protectora. Nuevas perspectivas terapéuticas.**

En la última década, el área de la psiconeuroinmunología se ha desarrollado como una significativa disciplina biomédica. Es ahora posible ver al sistema nervioso, al sistema endócrino y al sistema inmune como parte de un sistema integrado de respuesta. El impacto de esta red psiconeuroinmunológica para la investigación en psiquiatría es obvio. Especialmente cuando la historia muestra la relevancia de infecciones e inmunidad en la práctica psiquiátrica, cerca del 30% de los pacientes con desórdenes psiquiátricos sufrieron de neurosífilis antes que una terapia para esta enfermedad fuera desarrollada hacia fines del siglo XIX. Más actual, es la aparición de trastornos neuropsiquiátricos en enfermos de SIDA. La inmunopsiquiatría es una incipiente rama de la medicina cuyo fin es el estudio de los mecanismos inmunológicos involucrados en la fisiopatología de los desórdenes psiquiátricos.

Sin embargo, a la hora de evaluar esta interacción las respuestas inmunológicas en el sistema nervioso central (SNC), especialmente aquellas con un importante componente inflamatorio, son consideradas como neurotóxicas. Esto es lógico si tomamos en cuenta que por años los inmunólogos han considerado la tolerancia hacia antígenos propios como la óptima condición para la salud del individuo y que además, las células inmunes tienen limitado acceso al SNC. Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que células T reactivas para autoantígenos del SNC son necesarias para la reparación post-injuria del tejido neural (Yoles y col., 2001; Kipnis y col., 2002; Schwartz y Kipnis, 2001) liberando neurotrofinas que estimulan la neurogénesis (Ziv y col., 2007). Asimismo, se ha sugerido que tendrían un papel en el aprendizaje espacial y la memoria (Ziv y col., 2006).

El grupo de Michael Schwartz introdujo el concepto de “autoinmunidad protectora” (*protective autoimmunity*). Lo definió como una respuesta fisiológica producida ante una situación amenazante en el SNC. La respuesta es beneficiosa pero, si su funcionamiento es afectado, esta puede llevar a una enfermedad autoinmune (Schwartz y col., 2003). Ellos demostraron en numerosos trabajos experimentales que la respuesta fisiológica de las células T autoreactivas juegan un papel crucial en

la neuroprotección después de una lesión en el SNC (Hauben y col., 2000b; Yoles y col., 2001). Uno de estos estudios fue realizado en ratas a las que se les lesionó parcialmente el nervio óptico donde mostraron que inyecciones sistémicas de células T que fueron específicas para péptidos asociados a mielina redujeron la pérdida de fibras y neuronas post-lesión. Así que, la supervivencia de las células ganglionares de retina lesionadas fue mayor para las ratas tratadas con células T específicas para mielina que para ratas tratadas con células T específicas para un antígeno irrelevante o ratas no tratadas (Moalem y col., 1999a). Resultados similares fueron obtenidos por recuperación de la actividad motora después de una lesión de la médula espinal (Moalem y col., 1999b; Hauben y col., 2000a; 2000b).

Existen discrepancias entre los modelos estudiados acerca de que las células T pueden conferir neuroprotección o exacerbar el daño causado previamente en el SNC. Esto refleja la complejidad de la respuesta inflamatoria, así como también la naturaleza del tejido dañado, la especie, la cepa, el sexo, la genética y el estado fisiológico de un determinado órgano o animal en el momento de estudio (Kipnis y col., 2001; Hauben y col., 2002; Hauben y Schwartz, 2003). Los resultados de Kipnis y col. (2000) sugieren que los mismos tipos de células T (Th1) pueden ser potencialmente destructivos o potencialmente protectores. La regulación de estas células autoinmunes evitando el riesgo de la aparición de una condición patológica de autoinmunidad, sería llevada a cabo por células T regulatorias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Kipnis y col., 2002).

Los resultados de los diversos estudios realizados por el grupo de Schwartz sugieren que estas células autoreactivas, presentes en los individuos sanos, podrían tener un papel fisiológico importante para mantener la integridad del SNC (Ziv y col., 2006).

El acetato de glatiramer (GA; Copaxone<sup>®</sup>, copolímero 1) consiste de sales de acetato de polipéptidos sintéticos que contienen cuatro aminoácidos: L-alanina, L-glutamato, L-lisina y L-tirosina (Teitelbaum y col., 1971). Fue aprobado por la Food and Drugs Administration (FDA) de U.S.A. para el tratamiento de la esclerosis múltiple (Schori y col., 2001; Kipnis y col., 2000). El GA puede tener una débil reacción cruzada con autoantígenos residentes en el SNC (Kipnis y col., 2000) y puede estimular los efectos protectores o de reparación de las células T autoreactivas (Kipnis y col., 2000; Angelov y col., 2003; Benner y col., 2004; Avidan y col., 2004). En tal sentido el grupo de Schwartz ha demostrado que una sola inyección de GA es protectora en un modelo agudo de injuria en el SNC (Angelov y col. 2003).

## **4- Estrés.**

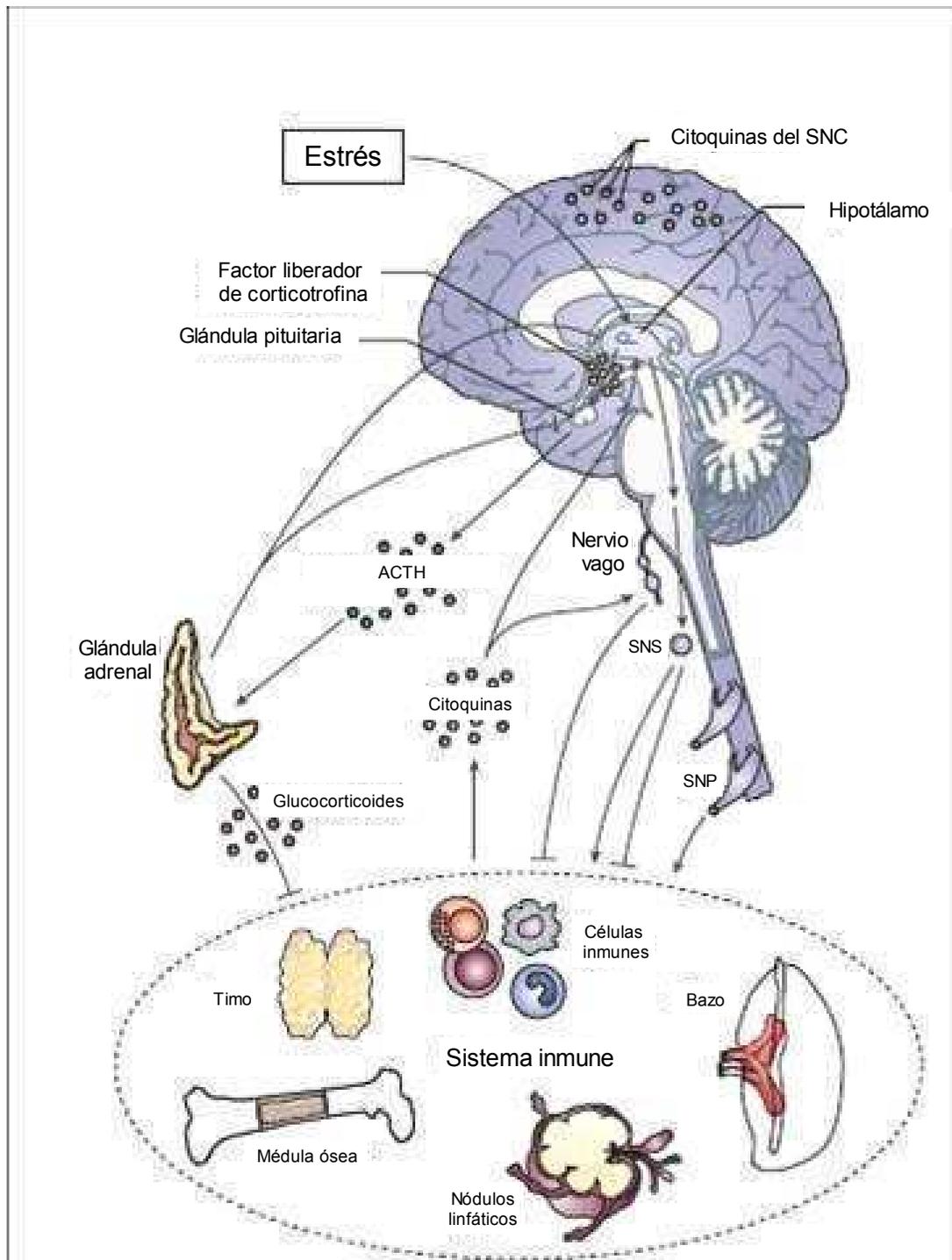
### **4.1- Mediadores involucrados.**

El estrés es definido como aquella condición que perturba severamente la homeostasis fisiológica y psicológica de un organismo (Levine y Ursin, 1991; Weiner, 1992). Mientras que el estrés es un mecanismo de supervivencia necesario, el estrés prolongado puede tener varios efectos deletéreos, incluyendo desde deterioro en el aprendizaje y la memoria hasta aumento de muerte de células neuronales.

La clásica respuesta fisiológica al estrés incluye la activación del sistema nervioso autónomo y el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA), con el consecuente aumento de los niveles de glucocorticoides (GC) y catecolaminas en sangre y tejidos. En lo que conforma el eje HPA, las neuronas del núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo secretan CRH (hormona liberadora de corticotropina) y AVP (arginina vasopresina), que estimulan en la glándula pituitaria la secreción de ACTH (hormona adrenocorticotrópica) hacia el torrente sanguíneo. La ACTH estimula la síntesis y secreción de GC (cortisol en primates y corticosterona en roedores) en la corteza de la glándula adrenal. Además, el PVN modula al sistema autónomo mediante proyecciones hacia neuronas preganglionares simpáticas y parasimpáticas. A través de la vía simpática se estimula en la médula adrenal la secreción de adrenalina.

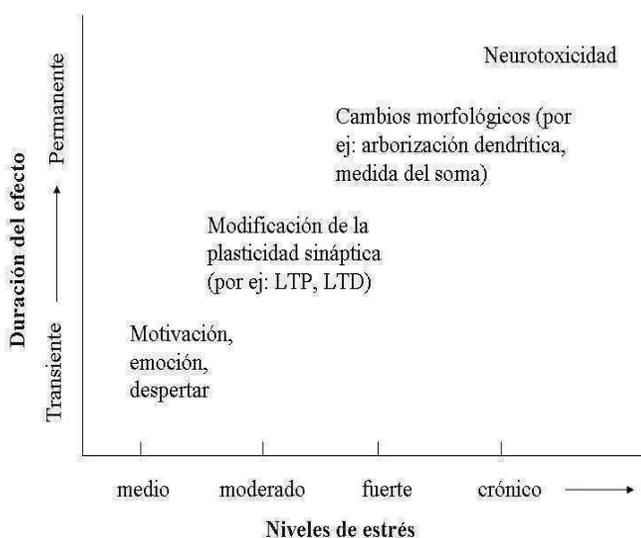
El hipocampo y la amígdala tienen un rol clave en la regulación de la respuesta al estrés. Estas regiones forman parte de un sistema integrador involucrado en el control neuroendocrino. Ambos, de manera indirecta o directa proyectan hacia el hipotálamo (Watts, 2007). El hipocampo está involucrado en el mecanismo de retroalimentación negativo sobre el eje HPA (Furay, 2008; Sapolsky y col., 1984). Esto ocurriría principalmente vía la estimulación por GC, aunque además existen evidencias de un tono inhibitorio sobre el eje, independientemente de los GC (Buckingham, 2007). Contrariamente, la amígdala tendría un papel excitatorio del eje HPA (Kollack-Walker y col., 2007).

Como ya fuera mencionado, las células del sistema inmune tienen receptores tanto para los glucocorticoides como para las catecolaminas, constituyéndose en mediadores de los efectos del estrés sobre el sistema inmune (figura 15).



**Figura 15.** Interacción entre el SN y el SI. Abreviaturas: **ACTH:** hormona adrenocorticotrófica, **SNC:** sistema nervioso central, **SNS:** sistema nervioso simpático, **SNP:** sistema nervioso parasimpático, Modificado de Webster y col. (2002).

Se ha demostrado que el estrés afecta la plasticidad sináptica, la morfología dendrítica, la neurotoxicidad y la neurogénesis dentro del hipocampo (Kim y Yoon, 1998; McEwen, 1999). El hipocampo es particularmente sensible a los efectos del estrés como se esquematiza en la figura 16. Se ha documentado que estas alteraciones, que incluyen la atrofia dendrítica de las neuronas piramidales de la región CA3, la supresión de la proliferación celular en el giro dentado, la reorganización de las vesículas sinápticas en las terminales de las fibras musgosas y la inhibición de la potenciación a largo plazo (LTP) en la zona CA3 y el giro dentado, con el consecuente deterioro cognitivo evidenciado por menores desempeños en pruebas de aprendizaje y memoria, se producen luego de la exposición crónica a la situación de estrés, pero no en el corto plazo. Los glucocorticoides han sido los mediadores principalmente involucrados en estos efectos deletéreos del estrés (McEwen, 2001).



**Figura 16.** Efectos fisiológicos comportamentales asociados con el estrés. Con un nivel medio de estrés, ocurren alteraciones como corta duración en los sistemas motivacional, emocional y del despertar que pueden tener influencia en los procesos de aprendizaje y memoria. Cuando el nivel de estrés se incrementa (en duración, intensidad o ambos), varios cambios transientes y permanentes son observados en el hipocampo, incluyendo modificaciones en la plasticidad sináptica, cambios morfológicos y muerte neuronal. Estos cambios inducidos por el estrés en el hipocampo pueden potencialmente contribuir a perjudicar el aprendizaje asociado con el estrés (Kim y Yoon, 1998).

Más recientemente, las citoquinas se han perfilado como importantes mediadores de la respuesta al estrés produciendo importantes cambios conductuales. Es importante tener en cuenta que estas interleuquinas tienen la capacidad de actuar a nivel del SNC produciendo cambios en el comportamiento y que además han sido implicados en procesos de inflamación y degeneración neuronal. Se ha demostrado que enfermedades relacionadas al estrés como la depresión mayor y el Alzheimer cursan con desbalances en la relación de citoquinas de tipo Th1/Th2 (Schwarz y col., 2001; Sperner-Unterweger, 2005).

#### **4.2- Modelos experimentales de estrés crónico.**

Existen diversas formas de inducir estrés en animales, el cual, dependiendo de la duración, puede clasificarse en agudo o crónico. Los esquemas de estrés por lo general involucran la exposición a diferentes agentes estresantes como inmovilización, shock eléctrico, frío, ejercicio y restricción de comida, entre otros. La aplicación de éstos por un período de tiempo prolongado (más de una semana) (Joëls y Baram, 2009), es considerado estrés crónico. Varios paradigmas de estrés crónico han sido utilizados en estudios preclínicos para evaluar la acción de fármacos antidepresivos, como el modelo de estrés psicosocial en el primate primitivo *Tupaia belangeri* (Fuchs y Flugge, 2002) y el estrés físico, social e impredecible en roedores (Alfonso y col., 2006; McEwen, 2001). Cuando se utiliza un solo tipo de estresor, por ejemplo inmovilización, el modelo se denomina de estrés crónico homotrópico. Cuando se utilizan una combinación de diferentes estresores, se denomina heterotrópico.

Un modelo de estrés heterotrópico es el modelo de estrés crónico moderado (CMS). El mismo consiste en someter a los animales a una serie de estresores considerados moderados que se aplican de manera crónica, secuencial y alternada para no producir acostumbamiento por parte del animal (Willner y col., 1992; Moreau, 1997). Este modelo implica un bajo grado de estrés ofreciendo una aproximación razonable a diversos estresores de la vida diaria. En este sentido, el modelo de estrés crónico moderado ofrece una simulación realista de los efectos biológicos del estrés crónico. Es importante tener en cuenta que la sensibilidad a este modelo puede variar de acuerdo a la cepa utilizada, el sexo, la edad e inclusive al proveedor de los animales.

Por otra parte, los cambios conductuales que se manifiestan en los animales sometidos al modelo pueden diferir entre laboratorios debido a diferencias mínimas en la implementación del modelo (Willner, 1997). Asimismo es importante tener en cuenta que se han utilizado cepas de ratones que por sus alteraciones conductuales y neuroquímicas han sido denominadas “reactivas” y “relativamente resistentes” al estrés, a saber: BALB/c y C57BL6 (Tannenbaum y Anisman, 2003; Lepicard y col., 2000). Interesantemente estas cepas frente a un desafío antigénico dan respuesta con un perfil diferente de citoquinas, los ratones BALB/c dan respuesta con predominio Th2 y los C57BL6 con predominio Th1. Esto determina diferencias tanto en su inmunidad innata (Watanabe y col., 2004) como adquirida (Guiñazú y col., 2004).

# I. INTRODUCCIÓN

## **1- El sistema nervioso.**

### **1.1- Anatomía del sistema nervioso.**

El sistema nervioso de los mamíferos consta de dos partes fundamentales: el sistema nervioso central (SNC), que se aloja en el cráneo y el canal vertebral, y el sistema nervioso periférico (SNP), que está fuera de estas cavidades e integrado por numerosos nervios (los nervios espinales y craneales), los ganglios periféricos y los receptores sensoriales. Los nervios del SNP que llevan los impulsos hacia el SNC se llaman aferentes o sensitivos, y los que llevan impulsos del cerebro al SNP se llaman eferentes o motores.

El SNC está formado por el encéfalo y la médula espinal, que son centros de integración nerviosa. Surge, embriológicamente, de la placa ectodérmica central. Ya en las etapas tempranas el tubo neural muestra tres cámaras, que son las que darán origen a las estructuras cerebrales del adulto: el prosencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo. Las neuronas inician su ciclo vital en los ventrículos y luego emigran a su localización final, dirigidas por procesos genéticos.

En el encéfalo se distinguen dos sustancias, una sustancia gris (debido al predominio de cuerpos celulares, que son de color grisáceo) y la otra blanca (a causa de la gran concentración de mielina blanquecina, que cubre los axones). La sustancia gris está en la parte externa del encéfalo y se denomina corteza.

La corteza se divide en seis lóbulos, cuatro primarios: occipital, temporal, parietal y frontal y dos secundarios: la ínsula y el sistema límbico.

La corteza occipital es el área sensorial primaria para la entrada de datos visuales. Las funciones principales del lóbulo temporal son el lenguaje, la memoria y la emoción. La corteza parietal se caracteriza por encontrarse en ella la llamada corteza de asociación de las vías de entrada sensoriales. Además, el lóbulo parietal izquierdo ejerce un papel preferente en el proceso verbal. El lóbulo frontal es el área del cerebro que más ha evolucionado y es la sede de las conductas específicas de cada especie; son la base de la conducta compleja, de la autoconciencia y de la personalidad. La parte más posterior es el área o corteza motora frontal, implicada en el aprendizaje motor. La parte anterior, o corteza prefrontal, es la implicada en funciones cognitivas complejas, en la voluntad y la conciencia de sí, en la

denominado masa intermedia. Los tálamos son masas de sustancia gris, por lo que contienen cuerpos neuronales y numerosas conexiones sinápticas. El tálamo es funcionalmente muy complejo: algunas de sus estructuras hacen función de relevo sináptico, pero también tiene funciones de integración y en la expresión de emociones. El hipotálamo está situado debajo del tálamo, como su nombre indica. Controla el sistema nervioso autónomo y el sistema endócrino, y está implicado en conductas básicas de huida, lucha, apareamiento, ingesta, temperatura corporal y estado de vigilia.

El mesencéfalo está constituido por el tectum y el tegmentum. El primero tiene como principales estructuras los colículos superiores, que forman parte del sistema visual, y los colículos inferiores, que lo son del sistema auditivo. El segundo incluye estructuras como el núcleo rojo y la sustancia negra, que forman parte del sistema de control motor. La formación reticular es una compleja estructura formada por numerosos núcleos; es grande y se extiende desde el bulbo a través del puente y cerebro medio al tálamo y otras zonas diencefálicas. Interviene en funciones como el sueño, la atención, el tono muscular y el movimiento y en varios reflejos vitales.

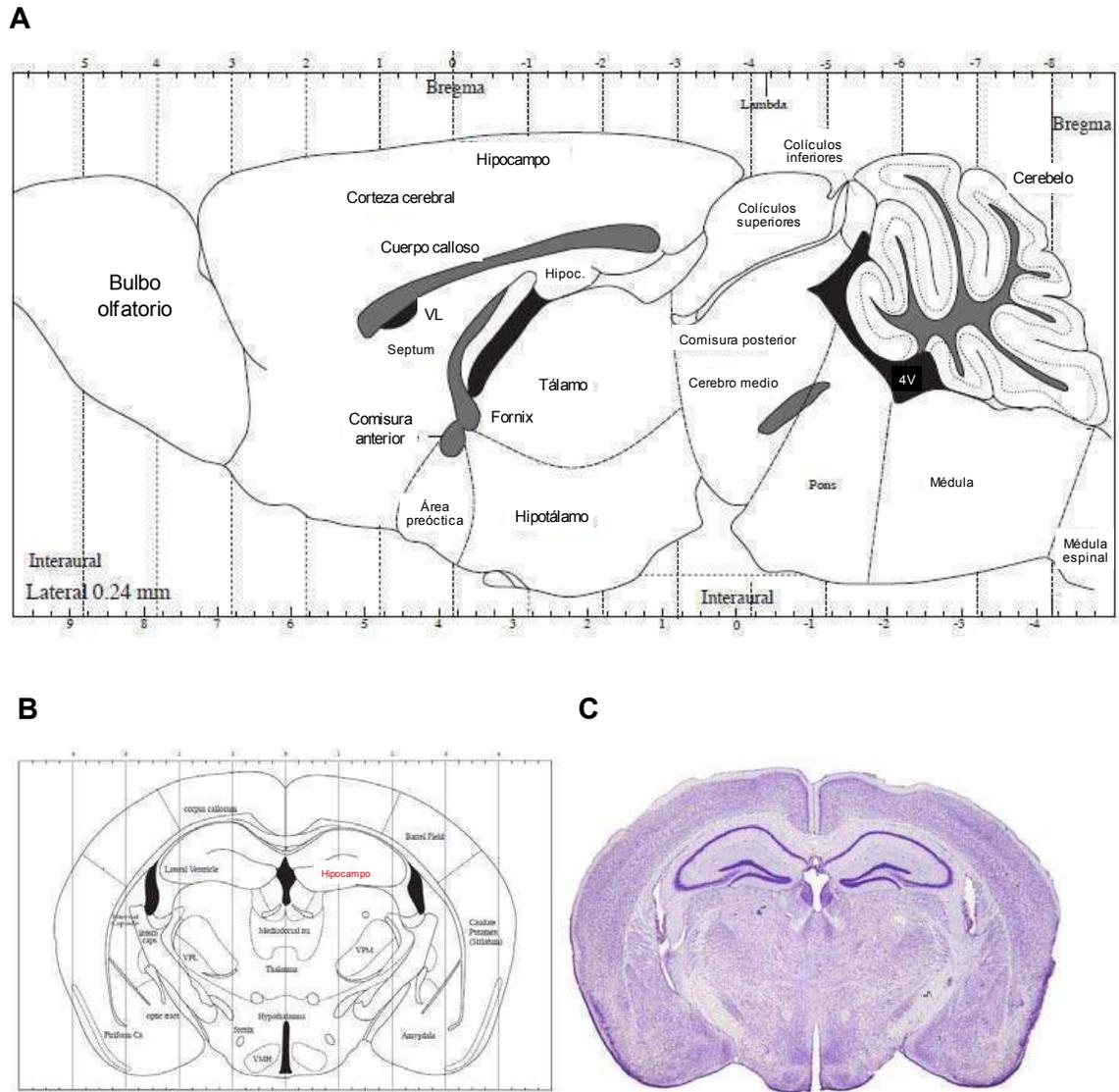
Los dos hemisferios están separados medialmente por el cuerpo caloso, que es un conglomerado de fibras nerviosas blancas que los conectan y transfieren cantidades enormes de información de un lado a otro; de esta forma realizan una mutua regulación (Barbado Alonso y col., 2002).

organización de la conducta social, en la anticipación y planificación de tareas y acciones (figura 1 A).

El sistema límbico fue considerado inicialmente como sede de las emociones, pero después se ha visto que era importante para otras funciones, como la memoria y el aprendizaje. Los componentes de este sistema son la amígdala, el tálamo, el hipotálamo, la hipófisis, el hipocampo, el área septal (compuesta por el fórnix, cuerpo calloso y fibras de asociación), la corteza orbitofrontal y la circunvolución del cíngulo. Los estímulos emocionales son registrados por la amígdala, que es el sistema de alarma del cerebro y el generador de respuestas emocionales. Existe una serie de emociones básicas, primarias, como el miedo, la sorpresa, la cólera, entre otras, pero muchas de las emociones son secundarias, es decir, que la información generada ha sido reenviada a la corteza y elaborada por el córtex de asociación. Todo cuanto capta el cerebro consciente lo envía al sistema límbico donde se elabora una respuesta básica. Ésta se envía nuevamente a los hemisferios cerebrales y allí se transforma en las complejas sensaciones específicas para cada contexto particular.

El hipocampo está situado en el lóbulo temporal medio. Por su forma plegada, que recuerda a un caballito de mar, recibió el nombre de hipocampo (figura 1 B y C). Su principal función es la consolidación de la memoria y el aprendizaje. Una lesión en esta zona produce amnesia anterógrada, es decir, de los acontecimientos ocurridos después de la lesión, afectando los recuerdos de hechos específicos, pero no al aprendizaje de nuevas capacidades o habilidades. Esto es así debido a que existen múltiples memorias y no todas son codificadas por el hipocampo. Éste almacena las memorias recientes conscientes, la memoria explícita o declarativa. Las memorias inconscientes emocionales son mediadas por la amígdala y las memorias procedimentales, por los ganglios basales y la corteza motora. El hipocampo no madura hasta los dos años, lo que explica por qué no tenemos recuerdos (memoria episódica) anteriores a los tres años.

El diencefalo está situado en la parte interna central del cerebro, entre los hemisferios y el tronco del encéfalo, y por él pasa la mayoría de fibras que se dirigen hacia la corteza cerebral. Las partes más importantes del diencefalo son el tálamo y el hipotálamo. El tálamo es una estructura bilobulada de gran tamaño en la parte superior del tronco-encéfalo. El tercer ventrículo separa entre sí ambos tálamos, aunque éstos permanecen unidos gracias a un puente de tejido talámico



**Figura 1.** (A) Esquema representativo de un corte transversal del cerebro de un ratón. (B) Esquema representativo de un corte coronal de cerebro de ratón en donde se observan los lóbulos del hipocampo. (C) Corte coronal del cerebro de un ratón teñido con acetilcolinesterasa. En violeta más oscuro se observa el hipocampo (Paxinos y Franklin, 2001).

## 1.2- El hipocampo.

El hipocampo es una estructura altamente relacionada con los procesos de aprendizaje y memoria (Florian y Rouillet, 2004), que junto con la amígdala forman el eje central del sistema límbico.

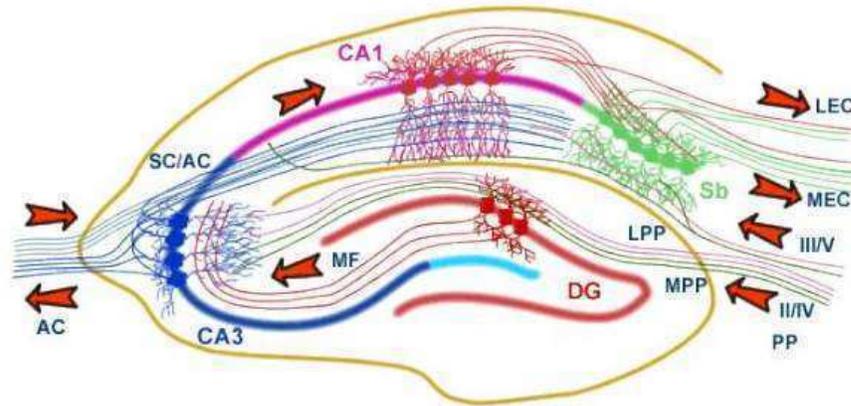
El hipocampo está formado por dos láminas de corteza y en corte transversal tiene una estructura laminar muy definida con capas visibles donde están organizadas filas de células piramidales. Las conexiones dentro del hipocampo generalmente siguen este formato laminar y son unidireccionales. Ellos forman *loops* cerrados bien caracterizados que se originan principalmente en la corteza entorrinal (EC) adyacente. De esta manera hay rutas definidas para el flujo de la información haciendo que el hipocampo sea el blanco más frecuente para el estudio de la función sináptica. Las diferentes capas de células y secciones están definidas por una serie de conexiones. Las principales capas de células piramidales están en las regiones CA1-4 (área celular 1-4), principalmente CA1 y CA3 y en el giro dentado (DG).

La vía perforante es la principal entrada al hipocampo. Los axones de la vía perforante se originan principalmente en las capas II y III de la corteza entorrinal, con una contribución menor desde las capas profundas IV y V. Los axones de las capas II/IV se proyectan a las células granulares del giro dentado y a las células piramidales de la región CA3, mientras que aquellos de las capas III/V proyectan con las células piramidales de la CA1 y el subiculum (Sb). La vía perforante puede ser separada en caminos lateral y medio (LPP y MPP, respectivamente), dependiendo si las fibras se originan desde la corteza entorrinal lateral o media (LEC y MEC, respectivamente).

Las *mossy fibres* (MF) son los axones de las células granulares del giro dentado. Estas se extienden desde el giro dentado a las células piramidales de CA3, formando su entrada principal. Las *mossy fibres*, que conectan con las neuronas CA, son grandes agregaciones de terminales con múltiples sitios de liberación de transmisores y densidades postsinápticas. Varias células granulares pueden hacer sinapsis en una célula piramidal simple de la CA3, la cual está involucrada especialmente en la memoria espacial de trabajo (Florian y Rouillet, 2004).

La vía colateral de Schaffer es derivada de los axones que se proyectan desde la región CA3 a la región CA1 del hipocampo. Cualquiera de los axones que vienen desde las neuronas CA3 (ipsilateral) o de una estructura equivalente en el hemisferio opuesto (contralateral) son llamadas más tarde fibras comisurales, por atravesar de un hemisferio a otro del cerebro. Esta vía es intensamente utilizada para estudiar los receptores NMDA LTP (potenciación a largo término) y LTD (depresión a largo término) dependientes.

La vía desde el CA1 al subiculum y entrando a la corteza entorrinal forman la salida principal del hipocampo. Sin embargo, esta no es una vía directa unidireccional. La conexión CA1-Sb sigue un diseño anatómico estricto. El extremo distal de la región CA1 proyecta con el extremo proximal del Sb. Las proyecciones a la EC siguen un patrón similar, con CA1 distal/Sb proximal proyectando hacia la EC lateral, mientras que CA1 proximal/Sb distal proyectan a la EC media. También podría notarse que la entrada de estas células desde la EC siguen el mismo patrón, por ejemplo, CA1 distal/Sb proximal reciben información desde la EC lateral, mientras que CA1 proximal/Sb distal reciben información desde la EC media. De esta manera, dos redes de *loops* cerrados están presentes dentro del conjunto de la red hipocampal. Estos *loops* además se extienden a la corteza perirrinal y postrrinal. La corteza perirrinal proyecta a la EC lateral y recibe proyecciones de retorno mientras la corteza postrrinal proyecta y recibe información de la EC media. En la figura 2 se muestra una representación gráfica de las conexiones presentes en el hipocampo.



**Figura 2.** La red hipocámpica: el hipocampo forma una red principalmente unidireccional, con entrada desde la corteza entorrinal (EC); esta forma conexiones con el giro dentado (DG) y las neuronas piramidales CA3 por la vía perforante (PP). Las neuronas CA3 también reciben información del giro dentado por la *mossy fibers* (MF). Ellos envían axones a las células piramidales CA1 por la vía colateral de Schaffer, como también a las células CA1 en el hipocampo contralateral por la vía comisural de asociación (AC). Las neuronas CA1 también reciben información directamente de la vía perforante y envían axones al subículo (Sb). Estas neuronas a su vez envían de regreso a la EC la información hipocámpica principal, formando un *loop*.

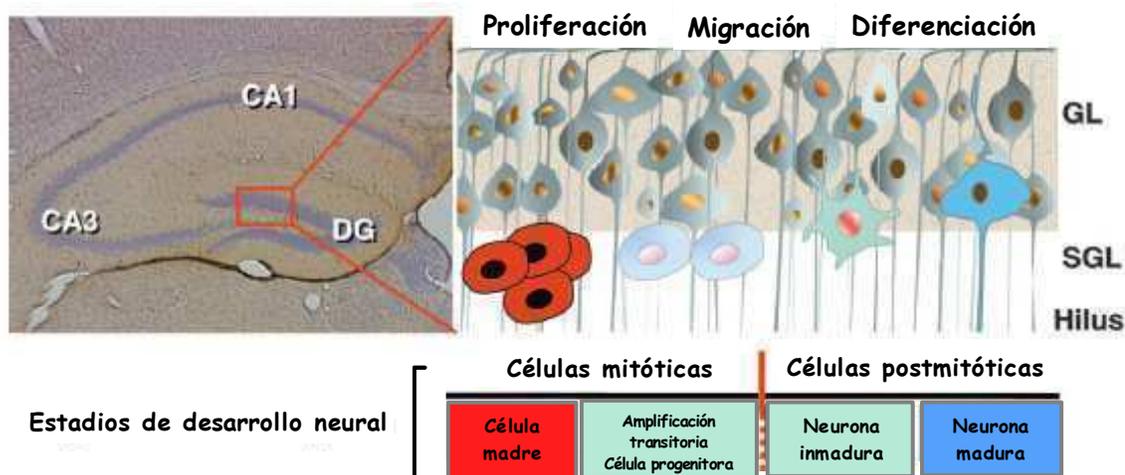
### 1.2.1- Neurogénesis.

Se denomina neurogénesis al proceso de diferenciación celular que, a partir de células neuroepiteliales, se generan neuronas muy activamente durante el desarrollo embrionario, y de forma restringida durante la vida adulta. La neurogénesis hipocámpica ha sido observada en animales adultos desde pájaros hasta humanos (Altman y Das, 1965; Kaplan y Hinds, 1977; Kuhn y col., 1996; Kornack y Rakic, 1999; Eriksson, 1998; Barnea y Nottebohm, 1994).

En el cerebro de ratones adultos las dos zonas mejor conocidas y donde está ampliamente confirmada la producción de nuevas neuronas en la vida adulta son: la zona subventricular (SVZ) de las paredes del tercer ventrículo y la capa subgranular (SGL) del giro dentado del hipocampo. En la SVZ los neuroblastos migran al bulbo olfatorio para luego reemplazar a las interneuronas locales (Gross, 2000; Lledo y col., 2008).

En el giro dentado de mamíferos adultos (Abrous y col., 2005) se estimó que cientos de células nuevas son generadas a diario (Cameron y McKay, 2001; Rao y Shetty,

2004). En esta zona, la neurogénesis es un proceso complejo que involucra diversas etapas, como la proliferación de las células pluripotenciales, la migración, la diferenciación, la sobrevivencia de las neuronas nuevas, así como la integración de éstas en los circuitos neuronales existentes (figura 3). En la zona subgranular del giro dentado, las células pluripotenciales expresan nestina, la proteína de unión a lípidos del cerebro (BLBP) y GFAP. Esta población celular se caracteriza por tener una baja tasa de división celular. Una vez que estas células se dividen, dan lugar a una población que se amplifica rápidamente, de la cual se generan por división simétrica las células progenitoras de tipo 2 y 3. Las células progenitoras tipo 2a y 2b presentan procesos neuríticos cortos paralelos a la zona granular del giro dentado; en cambio, las de tipo 3 presentan procesos largos integrados en la capa granular. Durante esta etapa se inician los eventos de migración y de diferenciación temprana, y las células expresan la proteína asociada a microtúbulos doblecortina, el factor de transcripción Prox1 y la proteína nuclear neuronal específica NeuN. Concluida esta fase, se generan las neuronas inmaduras caracterizadas por procesos dendríticos largos que cruzan la capa granular del giro dentado. Estas neuronas inmaduras van a diferenciarse en su totalidad para integrarse en los circuitos neuronales. En este estadio final, las nuevas neuronas expresan marcadores específicos, como la proteína de unión a calcio llamada calbindina. Además, reciben *inputs* (señal de entrada) sinápticos, extienden los axones a lo largo del tracto de las *mossy fiber* y muestran propiedades electrofisiológicas muy similares a la de las neuronas maduras ya existentes en el giro dentado (Hastings y Gould, 1999; Stanfield y Trice, 1988; van Praag y col., 2002; Zhao y col., 2006; Kempermann y col., 2003).



**Figura 3.** Neurogénesis en el hipocampo. *Panel de arriba izquierdo:* vista frontal de un cerebro de ratón mostrando los sitios de neurogénesis en el giro dentado (DG) de la formación hipocampal. *Panel de arriba derecho:* esquema de células proliferando en la capa subgranular (SGL) localizada en la interface entre el hilus y la capa granular (GL), donde migran y se diferencian en neuronas maduras. *Panel de abajo:* secuencia de tipos celulares involucrados en el desarrollo neuronal (Kempermann y col., 2004).

### 1.3- Factores neurotróficos.

Los factores neurotróficos son péptidos que promueven el desarrollo y la diferenciación neuronal (Vega y col., 2003), y son expresados en una región y período particular (Korsching, 1993). El tejido nervioso depende de ellos para su supervivencia y funcionamiento dado que participan en los procesos de remodelación, adaptación y plasticidad neuronal.

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

Al ser secretados por el tejido blanco, actúan de forma retrógrada favoreciendo su inervación por la neurona que es estimulada. Este mecanismo implica la secreción de factores neurotróficos al espacio extracelular, su captura por una neurona vía un receptor específico y la internalización del complejo receptor-péptido que es transportado por el axón hacia el soma (Korsching, 1993).

Los factores neurotróficos también pueden actuar de forma anterógrada, siendo secretados desde los axones. De hecho, algunos factores neurotróficos pueden actuar como neurotransmisores y, recíprocamente, algunos neurotransmisores pueden ejercer una función trófica (Korsching, 1993).

Un factor neurotrófico puede ejercer distintos efectos sobre una célula y puede influenciar diversos tipos neuronales y no neuronales, lo cual implica la competencia entre células por los factores (Korsching, 1993). Distintos factores neurotróficos cumplen diferentes funciones, pero se pueden superponer por la convergencia de caminos de transducción de señales (Korsching, 1993). Sin embargo, esto no siempre supone redundancia, ya que una neurona puede necesitar más de un factor para sobrevivir.

### **1.3.1- Neurotrofinas.**

La familia más conocida de factores neurotróficos es la de las neurotrofinas. A esta familia pertenecen el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT3) y la neurotrofina 4 (NT4). Las neurotrofinas son sintetizadas como pro-hormonas que luego son clivadas dando lugar a la forma madura de 14 kDa. Finalmente, dos de éstas se unen para formar un homo dímero mediante uniones no covalentes (Blum y Konnerth, 2005). El NGF, la NT3 y el BDNF actúan de manera retrógrada, mientras que la NT3 y el BDNF, también actúan de manera anterógrada (Korsching, 1993). Todas son expresadas en el hipocampo (Skup, 1994) pero el BDNF es particularmente abundante (Binder y Scharfman, 2004).

### **1.3.2- Receptores de neurotrofinas.**

Existen dos tipos de receptores de neurotrofinas: los Trk de alta afinidad y el p75 de baja afinidad, ambos, receptores de membrana. Los Trk, ubicados en neuronas y astrocitos, transmiten señales que aumentan la supervivencia y promueven el crecimiento celular (Klein, 1994). Son receptores del tipo troponina quinasa, o sea que poseen actividad quinasa. El TrkA reconoce principalmente al NGF y también a la NT3 y la NT4, el TrkB reconoce el BDNF y la NT4, y con menos afinidad la NT3, y el TrkC reconoce la NT3 (Tessarollo, 1998). El receptor p75 pertenece a la

superfamilia de receptores de TNF (factor de necrosis tumoral) y de Fas (quinasa de adhesión focal), por lo que posee actividad tirosina quinasa (Reinés y col., 2003). Tiene una afinidad similar por todas las neurotrofinas. A este receptor se le adjudican tanto funciones positivas para la supervivencia neuronal, como, en ciertas condiciones, la inducción de la muerte celular. Todos los receptores de neurotrofinas se expresan en el hipocampo (Klein, 1994). Los receptores Trk se distribuyen por el soma y las neuritas. La unión de la neurotrofina al receptor induce cambios conformacionales que llevan a la dimerización y activación del receptor (Blum y Konnerth, 2005). Éste puede desencadenar cascadas de señales desde la membrana pero también puede ser endocitado y activar cascadas de señales desde la vesícula que es transportada de forma retrógrada hacia el soma.

Las cascadas que pueden activarse son (Reinés y col., 2003, Huang y Reichardt, 2001):

- La cascada de las MAPK, la cual es responsable de un alto porcentaje de la supervivencia celular inducida por la neurotrofinas y es vital para proteger a las neuronas del estrés oxidativo y del daño por citoquinas. Mediante esta cascada pueden activarse factores de crecimiento o factores de transcripción, y también puede intervenir en los procesos de LTP.
- La vía de señalización que involucra a la fosfolipasa C ( $PLC\gamma$ ). Ésta lleva a la salida del  $Ca^{2+}$  de los reservorios y a la subsecuente activación de quinasas. Esta vía también podría intervenir en el proceso de LTP.
- La vía de la fosfatidil inositol-3'-quinasa (PI3K), la cual es la mayormente responsable de la supervivencia inducida por NGF. Esta cascada participa en fenómenos antiapoptóticos, inhibiendo a la procaspasa-9 y estimulando la síntesis del factor anti-apoptótico Bcl-2, entre otros.

La respuesta resultante de la interacción neurotrofina-receptor dependerá de que vía sea activada, lo cual puede depender de la duración y potencia de la activación de diversos receptores y la coexpresión de éstos.

### **1.3.3- Funciones de las neurotrofinas.**

En general, todas las neurotrofinas cumplen una función en la supervivencia, desarrollo y diferenciación de las neuronas, y en el crecimiento de neuritas, e

influyen en la expresión de proteínas esenciales para el funcionamiento normal de las neuronas.

El NGF, por ejemplo, estimula la supervivencia y la iniciación neurítica (Levi-Montalcini y Angeletti, 1963), la síntesis de diversos neuropéptidos (Heumann, 1987) y tiene un papel importante en el mantenimiento de un estado diferenciado de las neuronas sinápticas y sensoriales (Misko y col., 1987).

El BDNF promueve la supervivencia y el crecimiento en una variedad de neuronas. Por ejemplo, el BDNF contribuye al desarrollo dependiente de actividad de la corteza visual (Binder y Scharfman, 2004), lo cual sugiere un papel en el cableado de axones en el desarrollo. El BDNF también tiene importantes efectos en la morfología dendrítica (Murphy y col., 1998) y favorece la neurogénesis (Kato-Semba y col., 2002).

Entre las funciones de la NT3 se encontraría la facilitación del desarrollo y la supervivencia de neuronas (Huang y Reichardt, 2001), del desarrollo de precursores neuronales hipocampales (Vicario-Abejón y col., 1995), y de la supervivencia y desarrollo de oligodendrocitos (Barres y col., 1994).

Tanto el BDNF como la NT3 cumplen un papel en las sinapsis. Ésta es una función muy importante del BDNF, dado que es promotor de la LTP. Cortes hipocampales tratados con BDNF o NT3 y no con NGF mostraron un aumento persistente en la amplitud del potencial postsináptico, similar a lo que ocurre con la inducción de LTP (Kang y Schuman, 1995). Recíprocamente, en ratones *knockout* para BDNF no se pudo inducir LTP con la estimulación tetánica y esto fue revertido con la aplicación de BDNF exógeno (Korte y col., 1995; Patterson y col., 1996). Además, estímulos eléctricos que inducen LTP aumentan la expresión de BDNF y NGF (Patterson y col., 1992).

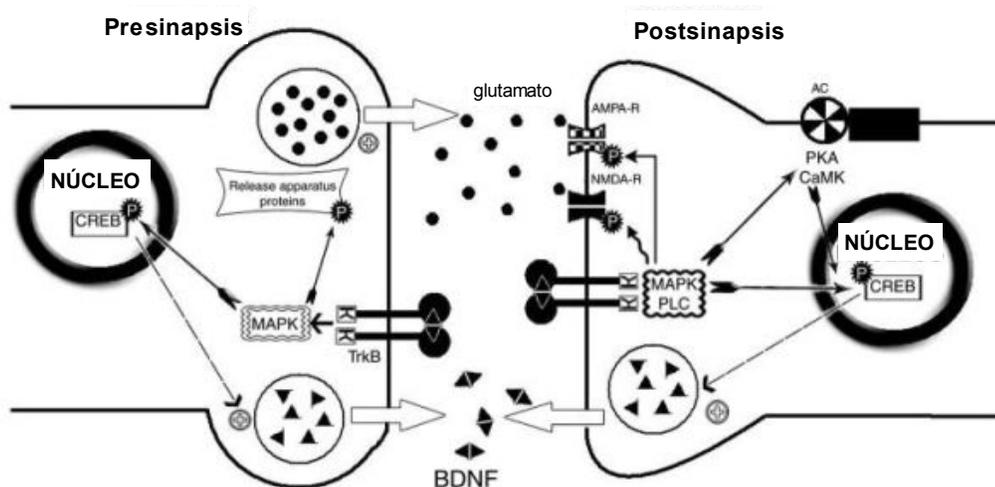
Algunos experimentos demuestran que el efecto del BDNF en el LTP sería a nivel de la presinapsis, en la liberación de neurotransmisores, pero también se presentan fuertes evidencias de efectos en la postsinapsis (McKay y col., 1999; Binder y Scharfman, 2004). En la postsinapsis, el BDNF modula a los canales tipo NMDA y GABA y además activa canales de sodio voltaje-dependientes que llevan a la liberación de neurotransmisores desde las dendritas (Blum y Konnerth, 2005).

Por otro lado, puede observarse el papel del BDNF en el aprendizaje (figura 4). Se ha demostrado que durante el aprendizaje contextual se induce la expresión de

BDNF en el hipocampo y que el bloqueo de la función del BDNF impide el aprendizaje espacial (Binder y Scharfman, 2004).

La desregulación de neurotrofinas está asociada con diversas patologías del sistema nervioso. En las enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson, el BDNF se encuentra disminuido en hipocampo y neocorteza (Schindowski y col., 2008) y en la sustancia negra, respectivamente (Binder y Scharfman, 2004). En el Alzheimer, en algunas zonas del cerebro se encuentra aumentada la pro-NGF y disminuido el TrkA. Además, el NGF estimula la transcripción del péptido APP (Schindowski y col., 2008).

Distintas investigaciones relacionan un aumento del BDNF en los cambios electrofisiológicos y comportamentales de la epilepsia (Binder y Scharfman, 2004). La expresión hipocampal del BDNF se vio aumentada en pacientes epilépticos (Mathern y col., 1997). Además, las convulsiones aumentan los niveles de mensajero de NGF (Gall y Isackson, 1989). Por otro lado, la expresión de BDNF hipocampal aumenta luego de un daño cerebral.

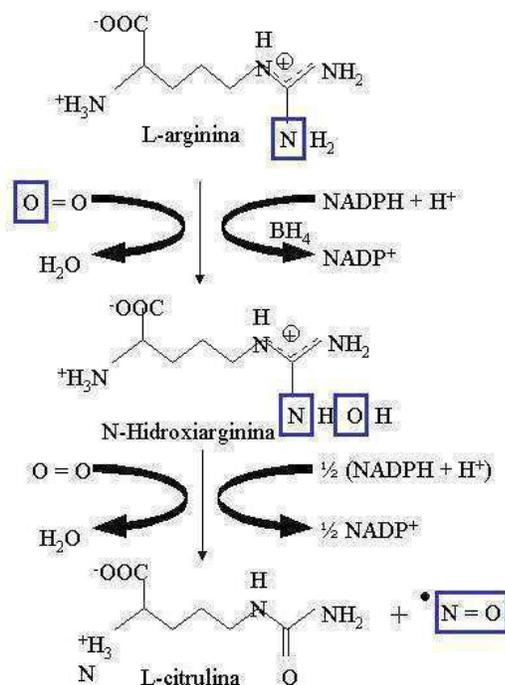


**Figura 4.** Vías de señalización por la activación del BDNF/TrkB en el aprendizaje y la memoria. La actividad aumenta la expresión de BDNF y liberación en sitios pre y postsinápticos. El BDNF se une a los receptores TrkB localizados sobre los axones presinápticos, llevando a éstos a autofosforilación y activación de la vía de transducción de señales de las MAPK, facilitando la liberación del neurotransmisor. El BDNF también se une a los receptos TrkB postsinápticos, conduciendo a la activación de los receptores AMPA y NMDA a través de la activación de las vías MAPK y PLC que llevan a la subsecuente fosforilación de PKA, CAMK y CREB (Yamada y col., 2002).

## 1.4- NOS y NO.

El óxido nítrico (NO) es una molécula pequeña, no cargada, con un electrón desapareado, que posee un carácter fuertemente hidrofóbico y alto coeficiente de difusión ( $3300 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) (Ledo y col., 2004). Las enzimas de la familia de la óxido nítrico sintasa (NOS) catalizan la oxidación del grupo guanidino del aminoácido L-arginina para generar NO y L-citrulina (Moncada y col., 1991). Esta reacción involucra dos pasos de mono-oxigenación. La N-hidroxiarginina es una especie intermediaria formada a partir de una reacción que requiere un  $\text{O}_2$  y un NADPH y la presencia de tetrahidrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ). El segundo paso de la reacción de síntesis del NO resulta de la oxidación de la N-hidroxiarginina para dar citrulina y NO (Knowles y Moncada, 1994). La reacción oxidativa implica 5 electrones y esta estequiometría impar de la transferencia de electrones permite la generación de un radical libre (Forstermann y col., 1994). (Ver figura 5).

Se han identificado tres isoformas de la NOS que son producto, de al menos, tres genes distintos, ubicados en diferentes cromosomas (Forstermann y col., 1994). Inicialmente estas isoformas se clonaron de cerebro de rata (nNOS o NOS-I), de macrófagos (iNOS o NOS-II) y de células endoteliales bovinas y humanas (eNOS o NOS-III). Trabajos posteriores han demostrado su expresión en otras células y tejidos: la nNOS, además de las células nerviosas, se localiza en ciertas áreas de la médula espinal, ganglios simpáticos, glándula adrenal, células epiteliales de pulmón, útero y estómago, músculo esquelético, islotes pancreáticos y en la mácula densa del riñón (Forstermann y col., 1994); la eNOS se expresa también en determinadas poblaciones neuronales (Nelson y col., 1997); y la iNOS puede expresarse en distintos tipos de células como hepatocitos, células endoteliales, condrocitos, células gliales y neuronas (Ledo y col., 2004). Las tres son homodímeros en su forma activa, con monómeros de peso molecular alrededor de 160 kDa para la nNOS y 130 kDa para iNOS y eNOS. Todas tienen FAD, FMN y hemo como grupos prostéticos y requieren tetrahidrobiopterina (Knowles y Moncada, 1994; Forstermann y col., 1994; Nelson y col., 1997).



**Figura 5.** Esquema de la reacción catalizada por la NOS.

Las isoformas de la NOS se pueden distinguir por la dependencia de calcio-calmodulina y por la inducibilidad. La nNOS y la eNOS se expresan constitutivamente y son dependientes de  $Ca^{2+}$ /calmodulina. A las concentraciones intracelulares de  $Ca^{2+}$  en células en reposo ( $\cong 100$  nM), estas isoformas no unen calmodulina y por lo tanto, están inactivas, mientras que concentraciones mayores a 500 nM provocan la unión del complejo  $Ca^{2+}$ /calmodulina y la consecuente activación de la enzima. Normalmente, generan niveles moderados de NO (del orden de picomoles) que modulan procesos rápidos como la neurotransmisión y la dilatación de los vasos sanguíneos respectivamente. Por el contrario, la isoforma iNOS prácticamente no se expresa en células no estimuladas, y es inducida a nivel transcripcional por endotoxinas como lipopolisacáridos (LPS) bacterianos o por citoquinas proinflamatorias (Forstermann y col., 1994), y aunque se une a calmodulina su actividad no es regulada por calcio (Knowles y Moncada, 1994). Esta isoforma puede generar cantidades importantes de NO (del orden de nanomoles) durante largos períodos de tiempo, que pueden causar efectos citotóxicos (Forstermann y col., 1994).

Las isoformas de NOS también difieren en su localización subcelular. Aunque la nNOS es una enzima soluble, puede aparecer parcialmente asociada a membrana.

Se ha identificado un dominio PDZ en el extremo N-terminal que sugiere su capacidad de interactuar con otras proteínas como la PSD-95 en células neurales. A su vez esta proteína (PSD-95) se une a los receptores de glutamato de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) también por un dominio PDZ. Estas interacciones permitirían una localización de la nNOS próxima a los receptores de NMDA, principales activadores de esta isoforma en neuronas, favoreciendo así una rápida activación (Ledo y col., 2004). A diferencia de la nNOS, la eNOS es una proteína particulada, asociada a la membrana por residuos de miristato (Knowles y Moncada, 1994) y la iNOS es una proteína citosólica (Forstermann y col., 1994).

Estudios *in vitro* indican que la actividad de la isoforma nNOS puede ser regulada mediante fosforilación también por otras proteínas quinasas como la proteína quinasa C (PKC) y la quinasa dependiente de calmodulina (CaMK) (Nakane y col., 1991; Knowles y Moncada, 1994). Además la nNOS también puede ser regulada por interacción con una proteína adaptadora específica de cerebro llamada CAPON, la cual compite por el dominio PDZ separando a la nNOS de los receptores de NMDA (Ledo y col., 2004) (figura 6). Otro mecanismo de regulación de la actividad es la inhibición directa de la actividad enzimática por el propio NO, probablemente por unión al grupo hemo (Colasanti y col., 1995). Además, el NO posee un efecto inhibitorio sobre la transcripción de la iNOS por dos mecanismos, ya sea suprimiendo la activación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) por inducción y estabilización del inhibidor de NF- $\kappa$ B, el factor inhibitorio I $\kappa$ B; o por interferir directamente en la unión de NF- $\kappa$ B a los elementos de respuesta presentes en la región promotora de los genes que codifican la iNOS (Colasanti y Susuki, 2000). Existen algunos factores que aumentan la actividad de la NOS constitutiva e inhiben la inducción de la iNOS. Por ejemplo pretratamientos de astrocitos con glutamato que aumentan la actividad de nNOS por activación de los receptores NMDA, suprimen la expresión de iNOS inducida por citoquinas; la dexametasona, un inhibidor de la expresión de iNOS, incrementa la actividad de nNOS en astrocitos (Colasanti y Susuki, 2000). Estos mecanismos son puntos de control importantes para la producción de NO.

La nNOS se ha detectado en numerosas regiones del SNC como el cerebelo, el bulbo olfatorio accesorio y principal, los colículos inferiores y superiores, el núcleo supraóptico, la corteza cerebral, el caudado putamen (Nelson y col., 1997) y las regiones CA1, CA2 y CA3 y el giro dentado de la formación hipocampal, entre otros (Nelson y col., 1997; de Oliveira y col., 2000). Esta amplia distribución indica que el

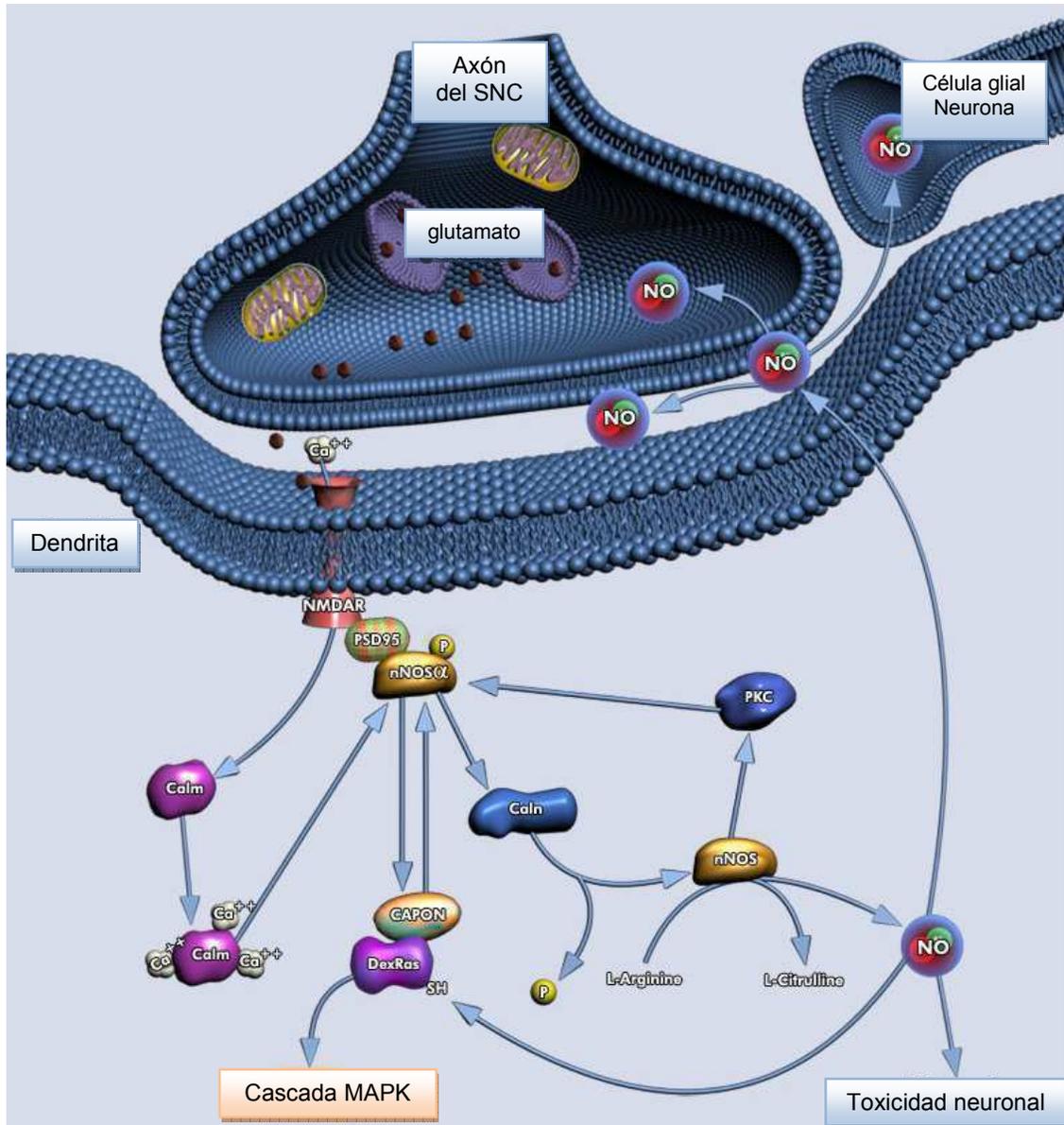
NO es un importante mensajero biológico de una gran cantidad de procesos que se llevan a cabo dentro del sistema nervioso. En cuanto a su localización celular, en cortes de cerebro la nNOS ha sido localizada tanto en astrocitos (Colasanti y Susuki, 2000) como en poblaciones neuronales (Ledo y col., 2004). Hay estudios que demuestran que la localización y expresión de nNOS en neuronas del hipocampo difiere fuertemente entre rata y ratón. En ratón se ha encontrado una importante expresión de nNOS en el citoplasma de células piramidales tanto en CA1 como en CA3, mientras que en rata la mayoría de los estudios revelan que la expresión de nNOS está confinada a interneuronas de CA1 o es limitada en células piramidales de esta subregión. Además se encontró que la expresión de nNOS en ratón es mucho mayor que en rata. Es llamativo que esta diferencia sólo se observa en hipocampo y no en otras áreas del cerebro (Blackshaw y col., 2003). La eNOS se expresa en determinadas poblaciones neuronales de diferentes regiones cerebrales como células piramidales del hipocampo, neuronas de la capa granular interna del bulbo olfatorio y cerebelo (Nelson y col., 1997), mientras que la iNOS puede ser activada en microglía y astrositos (Ledo y col., 2004).

El NO es un importante regulador de la función neuronal. Así se ha descrito que el NO es un mensajero intracelular sintetizado endógenamente después de la activación de receptores NMDA. En el cerebro, el NO es una molécula de señalización retrógrada que transfiere información de las terminales nerviosas post a presinápticas. También actúa como segundo mensajero en la terminal postsináptica. El NO juega un rol importante en el LTP en el hipocampo y en el LTD en cerebelo y estaría involucrado en procesos de aprendizaje y memoria conservados a lo largo de la evolución (Bredt y Snyder, 1992).

La principal señal intracelular que desencadena el NO, es el aumento de los niveles de GMPc, que activaría la proteína quinasa dependiente de GMPc y la correspondiente cascada intracelular (Feil y Kleppisch, 2008). Existen evidencias de mecanismos independientes de GMPc, por ejemplo la ADP ribosilación de proteínas que regularían la transmisión sináptica (Sullivan y col., 1997). Asimismo, se ha descrito que el NO puede aumentar la liberación basal de neurotransmisores como la dopamina, glutamato y acetilcolina (Lonart y Johanson, 1992).

La producción de NO puede conducir a neuroprotección o neurotoxicidad dependiendo de su concentración, del lugar de producción y del entorno celular (Colasanti y Susuki, 2000). Miranda y col. (2000) sugieren que el NO a bajas

concentraciones, en el orden nanomolar, actúa directamente como un antioxidante. Se ha demostrado que el NO protege contra la injuria celular causada por peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), xantina oxidasa, y alquilhidroxiperóxidos. Ha sido propuesto que una controlada producción de NO podría constituir parte de la respuesta fisiopatológica de los tejidos a la noxa y la inhibición de esta respuesta podría interferir con los procesos normales de reparación (Khaldi y col., 2002). Sin embargo, altas concentraciones de NO, en el orden nanomolar, puede participar en eventos neurodestructivos. Entre los mecanismos propuestos, se incluyen la reacción del NO con el ión superóxido y la producción de peroxinitrito, un conocido compuesto tóxico (Przedborski y col., 2000).



**Figura 6:** Señalización de nNOS en las sinapsis neuronales. La estimulación de los receptores de NMDA (NMDAR) por glutamato, proveniente de las neuronas presinápticas, produce entrada de calcio en las neuronas postsinápticas. Los NMDAR produce la activación de la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), produciendo óxido nítrico (NO) y citrulina a partir de arginina. La nNOS está regulada por la proteína quinasa C (PKC) y por la proteína adaptadora específica de cerebro (CAPON), la cual compite por el dominio PDZ separando a la nNOS de los NMDAR. El NO actúa como un mensajero retrógrado y dependiendo de su concentración puede conducir a señales de sobrevida (cascada MAPK) o toxicidad neuronal.

## 1.5- Proteína quinasa C.

La PKC es una familia de 12 isoformas, nueve de las cuales están presentes en el cerebro (Hrabetova y Sacktor, 2001), que han sido clasificadas en 3 grupos: PKC convencionales ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ), son calcio dependientes y activadas por fosfatidilserina (PtdSer) y diacilglicerol (DAG); PKC nóveles ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ), son activadas por PtdSer, DAG pero no por calcio y PKC atípicas ( $\iota$ / $\lambda$ ,  $\zeta$ ,  $\mu$ ), las cuales requieren sólo PtdSer para su activación (Newton y Johnson, 1998). Cada isoforma presenta un dominio regulatorio amino-terminal, conteniendo una secuencia autoinhibitoria para un pseudosustrato y un sitio de unión a segundos mensajeros; y un dominio catalítico carboxilo-terminal. PKC está normalmente en un estado basal inactivo por interacciones entre estos dos dominios. Los segundos mensajeros activan transcientemente a PKC por unión al dominio regulatorio, translocando la enzima desde el citosol a membrana, y causando un cambio conformacional que temporariamente aumenta la autoinhibición (Hrabetova y Sacktor, 2001).

La activación de PKC por segundos mensajeros (por ejemplo DAG) o por ésteres de forbol (potente activador de PKC) involucra la translocación de la enzima a la membrana. Las diversas isoenzimas, las cuales muestran una distribución regional diferente, localización subcelular y perfiles de activación distintos, podrían tener especificidad por diferentes sustratos y participar en diversas funciones fisiológicas (Newton y Johnson, 1998).

Las distintas isoformas de PKC están involucradas en una extensa variedad de procesos fisiológicos y patofisiológicos en el cerebro y en el organismo entero (Oster y col., 2004). Su actividad es elevada en los sistemas en desarrollo como también en procesos de crecimiento, diferenciación y plasticidad neuronal (Hirono y col., 2001). En particular, regulan la conductancia de canales iónicos (Paubraj y Behari, 2004), la liberación de neurotransmisores y la dinámica de los receptores, eventos a largo término como expresión de genes y estarían implicadas en la LTP y LTD (Hrabetova y Sacktor, 2001), por lo que podrían jugar un papel importante en los procesos de aprendizaje y la memoria (Noguès y col., 1996).

Desde que se describió que PKC está involucrada en la plasticidad sináptica, se ha estudiado en el hipocampo la influencia de diferentes tipos de situaciones comportamentales sobre la actividad de PKC, qué isoformas están implicadas en

determinados procesos y cuál es su distribución celular. Así se demostró que la exposición a un ambiente enriquecido o a una actividad física crónica incrementa la actividad de PKC citosólica y decrece la actividad de PKC unida a membrana, respectivamente, mejorando el aprendizaje espacial (Noguès y col., 1996). También se demostró que PKC está críticamente involucrada en procesos que desencadenan desórdenes como la enfermedad de Alzheimer (Xu y col., 2005), a través de la excitotoxicidad por glutamato, cuyas dosis citotóxicas conducen a la redistribución de la PKC (Buchner y col., 1999). Estudios acerca del rol de las isoformas de PKC en hipocampos de ratas adultas son contradictorios. Colombo sostiene que en ratas de 6 meses de edad existe una correlación entre las altas concentraciones de PKC $\gamma$  en la fracción particulada y PKC $\beta$ II en la fracción soluble con una mejor memoria espacial. En ratas de 24 meses de edad el deterioro de la memoria fue correlacionado con altas concentraciones de PKC $\gamma$  en la fracción soluble (Colombo y col., 1997). Otros autores sostienen que no hay diferencias entre las fracciones citosólica, particulada y nuclear de hipocampo de ratas jóvenes y adultas para las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$  y  $\zeta$  de PKC (La Porta y Comolli, 1999).

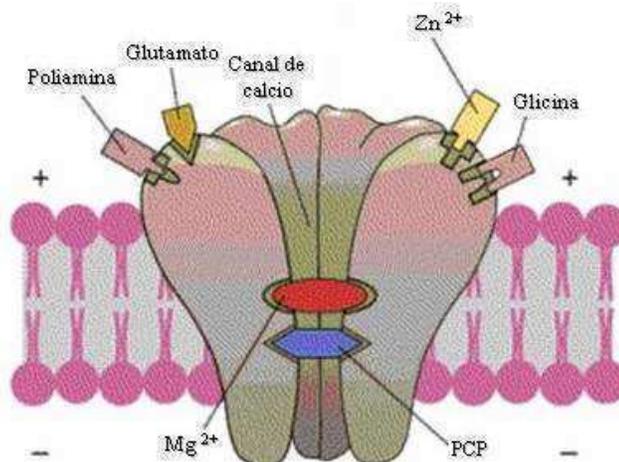
Estudios recientes sobre la función de PKM $\zeta$  indican un rol importante de esta forma activa de la isoforma atípica PKC $\zeta$  en la potenciación y/o depresión a largo término. Se cree que ambas constituyen los mecanismos principales de la formación del aprendizaje y la memoria. Es importante mencionar que estos autores no han detectado PKC $\zeta$  en el hipocampo, pero si han encontrado altos niveles de ARNm de PKC $\lambda$  y PKM $\zeta$ . La expresión de PKC $\lambda$  está ausente o altamente disminuida en la angosta región CA2 del giro hipocampal, separando las áreas CA1 de CA3. El giro dentado contiene altos niveles de transcritos de PKC $\lambda$  y PKM $\zeta$  mientras que el subiculum solamente expresa PKM $\zeta$ , indicando un rol específico de ambas isoformas en la adquisición de la memoria por el sistema límbico (Oster y col., 2004). En la LTD, inducida en la región CA1 del hipocampo, se observó que las isoformas convencionales de PKC ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ) se incrementaron en la fracción de membrana a los 45 segundos de ser estimulado; mientras que PKM $\zeta$  decreció en el citosol recién a los 15 minutos y luego a los 30 minutos lo hicieron PKC $\gamma$  y PKC $\varepsilon$ . Este decrecimiento fue persistente. Por lo tanto distintas isoformas de PKC participan en la inducción y el mantenimiento del LTD (Hrabetova y Sacktor, 2001).

El estudio acerca de la implicancia de las isoformas de PKC y su distribución celular en distintos procesos, tanto fisiológicos como patológicos, todavía no está claro y se desconocen muchos de los mecanismos involucrados.

### **1.6- Receptores N-metil-D-aspartato (NMDA).**

Los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), un subtipo de receptores de glutamato, actúan como detectores de coincidencia porque requieren tanto la actividad presináptica (glutamato liberado por el axón terminal) como postsináptica (despolarización que libera el  $Mg^{2+}$ , condición necesaria para la apertura del canal). Los canales de los receptores NMDA activos permiten el influjo de calcio hacia el interior de la célula postsináptica, la cual dispara una cascada de eventos bioquímicos resultando en un cambio sináptico (Tsien y col., 1996). En la figura 7 se muestra un esquema representando un receptor NMDA. La potenciación a largo término (LTP), un modelo de plasticidad neuronal implicado en el aprendizaje y la memoria, es fácilmente inducido en el hipocampo, y requiere la activación de estos receptores NMDA (Cain y col., 1997).

En el área CA1 del hipocampo, la inducción de la LTP más comúnmente estudiada es la dependiente de la activación del receptor NMDA. La excesiva estimulación de estos receptores provoca una elevada cantidad de  $Ca^{2+}$  libre en el citosol de la neurona postsináptica. Estos niveles de calcio provocan la activación de la fosfolipasa A2 ( $PLA_2$ ), llevando a la subsecuente liberación de ácido araquidónico (AA). El metabolismo del AA puede producir ROS libres y peroxidación lipídica conduciendo a la muerte celular. A estos mecanismos de muerte neuronal como consecuencia de la hiperestimulación del receptor de glutamato se lo denomina excitotoxicidad.



**Figura 7.** Esquema de un receptor de NMDA.

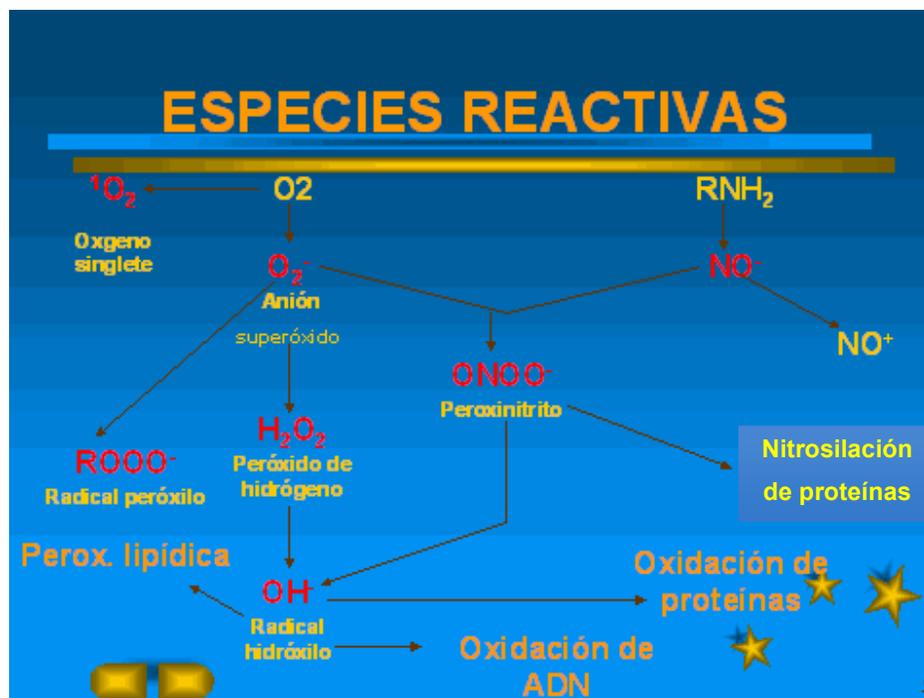
### 1.7- Estrés oxidativo.

En la bioquímica celular ocurren reacciones de óxido-reducción que determinan el estado redox de la célula. Este estado puede encontrarse o no en equilibrio, dependiendo de cuántos compuestos biológicos se encuentren reducidos y cuántos oxidados, lo cual a su vez depende del balance entre prooxidantes y antioxidantes. Un aumento de prooxidantes o una disminución de antioxidantes podrían llevar a un desbalance y por ende a un estado de estrés oxidativo. En un estado de estrés oxidativo el DNA, los lípidos y las proteínas pueden ser oxidados, lo que puede contribuir al desarrollo de patologías como el cáncer (Cerutti y col., 1994) o enfermedades neurodegenerativas (Bishop y Anderson, 2005).

Diversas reacciones fisiológicas generan componentes prooxidantes, encontrándose entre ellos el oxígeno molecular ( $O_2$ ) y sus sustancias reactivas derivadas, las especies reactivas de oxígeno (ROS), así como el óxido nítrico (NO) y sus sustancias reactivas derivadas, las especies reactivas de nitrógeno (RNS) (figura 8). Las más reactivas de estas especies son las de naturaleza de radicales libres ya que poseen uno o más electrones desapareados y, además, generan reacciones en cadena irreversibles (Reinés y col., 2003).

Los radicales libres se producen continuamente a altas velocidades como subproducto del metabolismo aeróbico. Por ejemplo, un importante proceso involucrado en la producción de radicales libres es la cadena respiratoria acoplada a

la fosforilación oxidativa (Reinés y col., 2003). Otro ejemplo son las reacciones llevadas a cabo por el complejo enzimático citocromo P450 (Gregus, 2008).

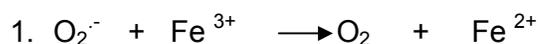


**Figura 8.** Esquema de las reacciones que generan componentes prooxidantes. En situaciones normales, la producción de prooxidantes se ve contrarrestada por diversos mecanismos celulares, tales como enzimas antioxidantes o vías metabólicas que mantienen un entorno reducido. Sin embargo, cuando la generación de prooxidantes supera a las defensas antioxidantes, se produce un estado de estrés oxidativo en el que el DNA, los lípidos y las proteínas son oxidados y por ende su estructura y funcionamiento son alterados, pudiéndose alcanzar, inclusive, la muerte celular (Schulz y col., 2000). Además, varios factores de transcripción están regulados por el estado REDOX, con lo cual una alteración en el balance de agentes reductores y oxidantes podría llevar a una expresión de genes alterada (Miao y St Clair, 2009). El estado de estrés oxidativo puede ser generado por diversos factores tales como la presencia de ciertos tóxicos (Gregus, 2008), la exposición a radiaciones, la presencia de metales de transición, la inflamación (Reinés y col., 2003), y el estrés (Chalmers y col., 2003; Epel, 2009). Además, el estrés oxidativo fue asociado a numerosas enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas, tales como el Parkinson, el Alzheimer (Bishop y Anderson, 2005) y la esquizofrenia (Smythies, 1999).

### 1.7.1- Especies Reactivas del Oxígeno (ROS).

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son un grupo de moléculas que derivan del oxígeno molecular (Thiels y Klann, 2002) y pueden inducir daño oxidativo en lípidos, proteínas y ADN, e incluso muerte neuronal, en ausencia de adecuada protección antioxidante. Las ROS cumplen varias funciones normales en las células actuando como segundos mensajeros regulando la expresión de genes en diversos campos como apoptosis, crecimiento celular y quimiotaxis. Las ROS también podrían actuar modulando la actividad de proteínas kinasas y fosfatasa durante la LTP. Así, niveles fisiológicos de peróxido de hidrógeno y superóxido son necesarios para la inducción y expresión de la LTP, mientras que altas concentraciones de estas ROS suprimen la expresión completa de LTP, posiblemente por ser tóxicas e inhibir la actividad de PKC (Klann y Thiels, 1999). Sólo cuando estas son producidas en exceso, o si las defensas antioxidantes están bajas, resulta en una patología (Smythies, 1999). En tal sentido, el hipocampo es una de las estructuras más vulnerables al daño por estrés oxidativo (Dubey y col., 1996).

Las principales especies reactivas de oxígeno son el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el radical oxhidrilo ( $OH^{\cdot}$ ), y el oxígeno singulete ( $O_2^1$ ). En reacciones como las que ocurren en la cadena respiratoria, el  $O_2$  recibe un electrón formándose así  $O_2^{\cdot-}$ . El  $O_2^{\cdot-}$  puede oxidar varias moléculas biológicas, como las catecolaminas y grupos prostéticos con hierro (Fe) de diversas enzimas, contribuyendo a la formación de  $OH^{\cdot}$  por la liberación del  $Fe^{2+}$  (Fridovich, 1997). El  $O_2^{\cdot-}$  puede recibir otro electrón, o el  $O_2$  puede recibir 2 electrones, formándose así  $H_2O_2$ , que no es un radical pero es oxidante y contribuye a la formación de  $OH^{\cdot}$ . El  $H_2O_2$  es producto de diversas reacciones enzimáticas, entre ellas la dismutación del  $O_2^{\cdot-}$  llevada a cabo por la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD) (McCord y Fridovich, 1969), y la beta peroxidación de ácidos grasos en peroxisomas (Reinés y col., 2003). Por su lado, el  $OH^{\cdot}$  es muy reactivo y puede originarse mediante dos reacciones sucesivas que dependen de la presencia de metales divalentes como el hierro (Graf y col., 1984):



El radical  $\text{OH}^{\cdot}$  resulta altamente tóxico debido a que reacciona tan rápidamente que la célula no posee defensas antioxidantes frente a él (Gregus, 2008). Al mismo tiempo, dado que las ROS pueden oxidar macromoléculas biológicas, se generan también radicales libres orgánicos (Harman, 1972).

El  $\text{Ca}^{2+}$  puede estar involucrado en la generación de ROS. Un aumento anormal de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular puede desacoplar la cadena respiratoria e inducir la apertura de poros mitocondriales (Reinés y col., 2003). Recíprocamente, las ROS pueden aumentar el  $\text{Ca}^{2+}$  libre y la excitotoxicidad. Como ya se mencionó anteriormente, un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular puede ser producto de la acumulación de glutamato en el espacio sináptico actuando vía los receptores tipo NMDA, lo cual gatilla una cascada de señalización que lleva al aumento de las ROS (Lafon-Cazal y col., 1993). Esto ha sido involucrado en distintas enfermedades neurodegenerativas (Sheehan y col., 1997).

### 1.7.2- Especies reactivas del nitrógeno (RNS).

Como se mencionó anteriormente, el NO es un gas radical libre producido por las óxido nítrico sintasas (NOS) que puede resultar benéfico o dañino, según en qué concentración y entorno se encuentre. Bajas concentraciones de NO en un ambiente libre de estrés oxidativo corresponderían al funcionamiento fisiológico normal (Marletta y Spiering, 2003). De hecho, a bajas concentraciones resulta protector contra el daño oxidativo (Wink y col., 1995). Sin embargo, altas concentraciones resultan oxidantes. Bajo estas condiciones se gatillan señales diferentes que llevan a caminos como la inhibición del BDNF (Canossa y col., 2002) y de proteínas reparadoras del ADN (Liu y col., 2002), e inducción la apoptosis (Bonfoco y col., 1995). El rol dañino del NO se debe a su propia acción oxidante y a la de las RNS que de él derivan. En condiciones de estrés oxidativo, al encontrarse con  $\text{O}_2^{\cdot -}$  puede reaccionar formando peroxinitrito ( $\text{ONOO}^{\cdot -}$ ), oxidante muy potente (Marletta y Spiering, 2003, Beckman y Koppenol, 1996). El peroxinitrito reacciona fácilmente

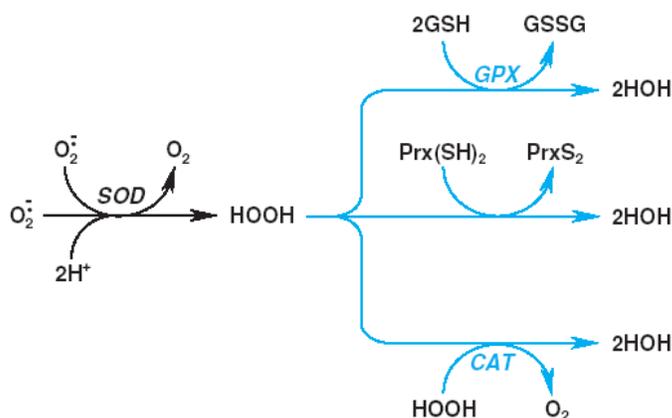
con el  $\text{CO}_2$  dando un compuesto intermediario que se hidroliza espontáneamente en dos radicales: dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2^\cdot$ ) y anión radical carbonato ( $\text{CO}_3^{\cdot-}$ ) (Gregus, 2008). Por otro lado, a partir del NO se forman iones nitroxilo ( $\text{NO}^\cdot$ ) y  $\text{N}_2\text{O}_3$  como intermediario en la reacción del NO con el  $\text{O}_2$  (Miranda y col., 2000, Marletta y Spiering, 2003).

El NO es oxidante de sustratos tales como los grupos hemo (Miranda y col., 2000). Esto provoca la liberación de metales que podrían aumentar la producción de radicales hidroxilo. El  $\text{ONOO}^-$ , el  $\text{NO}_2^\cdot$ , el  $\text{CO}_3^{\cdot-}$  y el  $\text{NO}^\cdot$  son oxidantes de proteínas, lípidos y DNA (Miranda y col., 2000; Gregus, 2008; Bishop y Anderson, 2005). Un ejemplo es la nitración irreversible de residuos de tirosina frente al peroxinitrito (Guelman, 2003). Por otro lado, el  $\text{NO}_2^\cdot$  y el  $\text{N}_2\text{O}_3$  son donantes de  $\text{NO}^+$  que son transferidos a moléculas biológicas (Miranda y col., 2000).

La neurotoxicidad a partir de la estimulación del receptor de NMDA también estaría mediada por el NO producido por la nNOS (Culcasi y col., 1994; Dawson y Dawson, 1996). Al igual que para las ROS, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula a través de los canales NMDA provoca un aumento del NO, debido a que el ión activa las NOS. Al aumentar los niveles de ROS y NO conjuntamente, aumentan los niveles de peroxinitritos lo cual puede exacerbar el daño y llevar a la muerte celular (Reinés y col., 2003; Dawson y Dawson, 1996).

## 1.8- Defensas antioxidantes.

Como se mencionó, continuamente se producen especies reactivas con carácter oxidante. Sin ningún mecanismo de defensa frente a esto la supervivencia de un organismo aerobio no sería posible. Las defensas antioxidantes de una célula reducen la capacidad pro-oxidante. Estos mecanismos incluyen: la transformación de los compuestos pro-oxidantes a compuestos menos reactivos mediada por enzimas, la reducción de los compuestos mediada por moléculas atrapantes no enzimáticas, el secuestro de metales catalizadores de las reacciones de formación de radicales libres y el mantenimiento de un entorno reducido (Reinés y col., 2003). Entre los antioxidantes cerebrales se encuentran el ácido ascórbico, las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) y el glutatión (GSH) (figura 9).

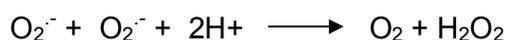


**Figura 9.** Esquema de las reacciones catalizadas por las principales enzimas antioxidantes. Enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa (CAT).

### 1.8.1- Superóxido Dismutasa.

Las SOD forman una familia de enzimas de la que se han caracterizado en eucariotas: la Mn-SOD mitocondrial, la Cu/Zn-SOD mayormente citosólica y la EC-SOD mayormente extracelular, esta última menos presente en tejido nervioso (Fridovich, 1997).

Como su nombre lo indica la SOD dismuta al superóxido en  $O_2$  y  $H_2O_2$  (McCord y Fridovich, 1969):



Por lo tanto las SOD cumplen un rol importante eliminando el  $O_2^-$  del medio y evitando, de esta manera, que se formen nuevas especies reactivas, como el peroxinitrito.

Cada SOD depende de ciertos iones metálicos divalentes. La tabla 1 muestra cuáles son los iones para cada una de las isoformas y, qué proteínas cumplen un rol importante en la donación de dichos iones, y por lo tanto en la actividad de las SOD (Miao y St Clair, 2009). Las SOD se expresan constitutivamente, pero pueden ser reguladas transcripcionalmente. Se cree que la Cu/Zn-SOD se expresa fundamentalmente de modo basal y muy poco de manera inducida (Miao y St Clair, 2009). En cambio la expresión de la Mn-SOD está altamente regulada, y en esto

cumple un papel importante la inducción de su transcripción por un estado de estrés oxidativo. Las SOD pueden ser reguladas, además, epigenéticamente o post-transcripcionalmente (Miao y St Clair, 2009).

**Tabla 1.** Isoformas de la enzima superóxido dismutasa (Miao y St Clair, 2009).

Isoforma	Localización	Masa molecular (KDa)	Subunidades de ensamblaje	Ión metálico
Cu/ZnSOD	Citoplasma, núcleo, membrana mitocondrial	88	Homodímero	Cu <sup>2+</sup> (catalíticamente activo)
MnSOD	Matriz mitocondrial	32	Homotetrámero	Zn <sup>2+</sup> (mantiene la estabilidad de la enzima), Mn <sup>2+</sup> (catalíticamente activo)
ECSOD	Membrana plasmática, fluidos extracelulares	135	Glicoproteína homotetramérica	Cu <sup>2+</sup> (catalíticamente activo), Zn <sup>2+</sup> (mantiene la estabilidad de la enzima)

Varios experimentos demuestran que las SOD cumplen un importante papel protector frente al estrés oxidativo, daño o neurotoxinas en el sistema nervioso central (Ischiropoulos y Beckman, 2003). Además, las SOD resultan protectoras frente a la excitotoxicidad mediada por el receptor NMDA (Dawson y Dawson, 1996). En distintos organismos se han reportado diversas anomalías provocadas por la falta de alguna de estas enzimas (Fridovich, 1997; Ischiropoulos y Beckman, 2003). Además las SOD parecerían estar altamente relacionadas con la esclerosis amiotrófica lateral familiar (FALS), en la cual los individuos presentarían una forma de la Zn/Cu-SOD mutada con función tóxica (Fridovich, 1997; Ischiropoulos y Beckman, 2003; Schulz y col., 2000).

### 1.8.2- Catalasa.

La catalasa (CAT) es una hemo-proteína asociada a NADPH con función peroxidasa (Chelikani y col., 2004). Se encuentra principalmente en los peroxisomas de las células de todos los órganos, especialmente en hígado y eritrocitos.

La CAT transforma el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua y  $\text{O}_2$ :

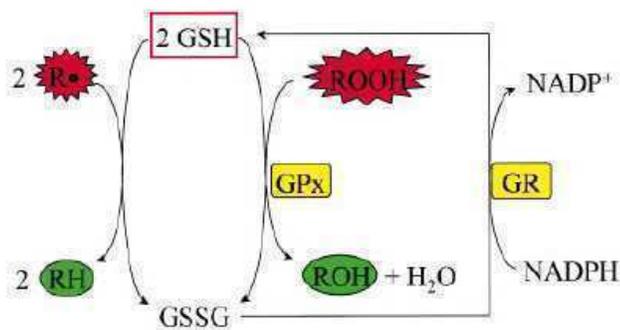


Es una enzima ubicua, muy resistente a la proteólisis y desnaturalización, y su expresión está modulada por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y especies reactivas del oxígeno (Chelikani y col., 2004).

### 1.8.3- Glutati3n.

El glutati3n (GSH) es el mayor antioxidante en el cerebro (Dringen, 2000). Es el principal antioxidante en los terminales presin3pticos de las neuronas (Smythies, 1999). Sin embargo, la mayor3a se encuentra en las c3lulas gliales (Philbert y col., 1991). Adem3s se encuentra en el espacio extracelular porque es secretado por ambos tipos celulares.

El GSH es un trip3ptido de glutamato, ciste3na y glicina, mayormente citoplasm3tico (en menor medida mitocondrial), con alto n3mero de tioles (Aoyama y col., 2008a), por lo tanto tiene un alto poder reductor. Act3a como secuestrador de radicales libres tales como el super3xido, el 3xido n3trico, el radical hidroxilo y el peroxinitrito. Adem3s, resulta cofactor de reacciones de reducci3n de per3xidos (como el  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), catalizada por la glutati3n peroxidasa (GPx) (Chance y col., 1979). Al reaccionar, el glutati3n reducido (GSH) pasa a su forma oxidada, glutati3n disulfuro (GSSG) (figura 10).



**Figura 10.** V3as de oxidaci3n y reducci3n del glutati3n en su acci3n antioxidante. Glutati3n peroxidasa (GPx) y la glutati3n reductasa (GR) (Dringen, 2000).

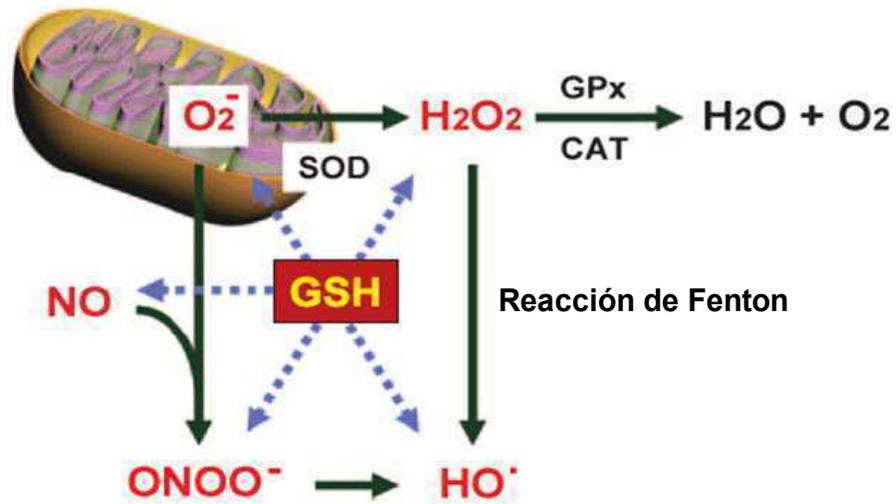
Normalmente, la mayoría del glutatión está en su forma reducida, por ello el sistema funciona como un buffer REDOX. La enzima glutatión reductasa (GR) dependiente de NADPH es la encargada de revertir el GSSG a GSH (Aoyama y col., 2008b).

Por otro lado, el glutatión forma conjugados con sustancias tóxicas, reacción catalizada por la glutatión-s-transferasa, y es liberado por las células e hidrolizado por la  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa (Dringen, 2000). Ambos fenómenos disminuyen la cantidad de glutatión, pero los valores son normalizados gracias a su síntesis de *novo*.

El GSH es formado a partir de la unión de glutamato y cisteína catalizada por la enzima  $\gamma$ -glutamilcisteína sintasa, formándose un dipéptido que luego se une a una glicina, reacción catalizada por la enzima GSH sintasa (Aoyama y col., 2008b). El GSH producido ejerce una retroalimentación negativa sobre su síntesis inhibiendo a la  $\gamma$ -glutamilcisteína sintasa. El sustrato limitante es la cisteína, la cual ingresa a las células gliales a través de los transportadores EAAT1 y EAAT2, y a las neuronas hipocámpales a través del transportador EAAC1 (Aoyama y col., 2008a). Además, el dipéptido, producto de la hidrólisis de GSH puede ser reutilizado como sustrato para la síntesis de *novo* (Dringen, 2000).

Además de su importancia como antioxidante, se le han adjudicado otras funciones, tales como un papel esencial en la proliferación celular, almacenamiento no tóxico de cisteína, neuromodulación sináptica y neurotransmisión (Cruz y col., 2003; Dringen, 2000).

Se ha documentado que una disminución de GSH puede desencadenar apoptosis, llevar a un aumento del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula, aumentar las ROS (figura 11), o conducir a la disfunción mitocondrial (Schulz y col., 2000). Se ha encontrado una disminución de GSH en el sistema nervioso de pacientes esquizofrénicos y en individuos con enfermedad de Parkinson (Schulz y col., 2000).



**Figura 11.** Protección dependiente del glutatión contra el estrés oxidativo. El glutatión reacciona con el superóxido, el óxido nítrico, el radical hidroxilo, y el peroxinitrito (flecha punteada). El glutatión también reacciona con el  $H_2O_2$  catalizados por la GPx/CAT. Abreviaturas:  $O_2^-$ : superóxido,  $H_2O_2$ : peróxido de hidrógeno, GPx: glutatión peroxidasa, CAT: catalasa, NO: óxido nítrico,  $ONOO^-$ : peroxinitrito,  $HO^{\cdot}$ : radical hidroxilo.

## **2- El sistema inmune.**

### **2.1- Anatomía del sistema inmune.**

Los seres superiores defienden constantemente su integridad biológica frente a agresiones, procedentes del exterior así como del propio organismo. De no ser así, morirían como consecuencia de tumores e infecciones por bacterias, virus, hongos, etc. Para que estos fenómenos de defensa se lleven a cabo, los organismos disponen de un conjunto de elementos especiales, conocido como sistema inmune. La capacidad de defensa se adquiere antes de nacer y se madura y consolida en los primeros años de la vida fuera del seno materno.

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

El rol primario del SI es entonces proteger al organismo de agentes perjudiciales externos. Juega además un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis antigénica del organismo eliminando clones autoreactivos, es decir que reconozcan antígenos propios (Fainboim y Geffner, 2005; Delves y Roitt, 2000a).

## **2.2- Inmunidad innata y adquirida.**

Existen dos tipos de inmunidad, la innata y la adquirida o adaptativa. La inmunidad innata es la primera línea de defensa ante una infección o un agente tóxico (Medzhitov y Janeway, 2000). Forman parte de ésta la piel y el epitelio de los tractos digestivo, respiratorio y genitourinario, así como también diversos tipos de células, como mastocitos, macrófagos, neutrófilos entre otras. Además involucra el sistema del complemento y proteínas de fase aguda. La respuesta inmune inespecífica es la primera barrera defensiva del organismo y no requiere sensibilización previa. Este tipo de respuesta es mediada por células con capacidad fagocítica y células asesinas naturales (NK).

El sistema inmune adaptativo evolucionó en los vertebrados primitivos y permite una respuesta inmunitaria mayor y específica, así como el establecimiento de la denominada memoria inmunológica que proporciona una respuesta mejorada a encuentros secundarios con ese mismo patógeno específico. La inmunidad adaptativa puede clasificarse en dos tipos: la inmunidad celular, mediada por linfocitos T (LT) y la inmunidad humoral mediada por linfocitos B (LB). Los LB y LT reconocen motivos particulares presentes en los patógenos. El linfocito B o T que reconoce su antígeno se activa y sufre un proceso de expansión clonal generando así una progenie de idéntica especificidad antigénica compuesta por miles de células (Delves y Roitt, 2000a).

## **2.3- Linfocitos B.**

Los linfocitos B cumplen la función de generar anticuerpos (Ac), función que llevan a cabo una vez diferenciados. Los LB responden a dos tipos distintos de antígenos (Ag), los Ag timo-independientes (T-independientes), como por ejemplo las estructuras poliméricas presentes en la pared de las bacterias Gram-negativas (lipopolisacárido de membrana, LPS), que inducen una respuesta sin necesidad de la colaboración de los LT y los Ag timo-dependientes (T-dependientes), como los glóbulos rojos de carnero (GRc) que necesitan de las células T para producir una óptima producción de Ac (Delves y Roitt, 2000b). La interacción de los Ag con sus receptores produce la activación del LB que prolifera y se diferencia en célula

plasmática, que es la célula efectora, y secreta activamente Ac específicos contra el Ag que las activó.

Los LB reconocen a su Ag a través de receptores de membrana. Para los Ag T-dependientes los receptores son inmunoglobulinas (Ig) de membrana de tipo IgD e IgM (BCR). El procesamiento y presentación de Ags T-dependientes a células T efectoras estimula la producción de citoquinas y la expresión en superficie de CD40, que actúa sobre las células B para inducir la progresión del ciclo celular y diferenciación celular. Existen dos tipos de Ag T-independientes, los Ag TI-1 que no estimulan las células B a través del BCR sino a través de receptores del tipo Toll (TLRs), como por ejemplo el LPS que estimula al LB a través del TLR-4 (Medzhitov, 2001); y los Ags TI-2 que reaccionan de forma cruzada con BCR (Fainboim y Geffner, 2005).

## **2.4- Linfocitos T.**

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

Existen diversos tipos de linfocitos T. En función de la expresión de moléculas de superficies CD4 y CD8 se clasifican en dos grupos. Las células T CD4<sup>+</sup> y células T CD8<sup>+</sup>. Las células CD4<sup>+</sup> a su vez se dividen en T helper 1 (Th1), T helper 2 (Th2), T helper 17 y T reguladores (T<sub>Reg</sub>) de acuerdo con su perfil funcional, determinado fundamentalmente por el patrón de citoquinas producido.

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> reconocen Ag procesados proteolíticamente y expuestos en el contexto de moléculas del MHC de clase II de las APC. Por otra parte, los linfocitos citotóxicos CD8<sup>+</sup> reconocen a los Ag que han sido procesados endógenamente en el

citosol de la célula infectada y presentados en superficie por moléculas MHC de clase I (Fainboim y Geffner, 2005).

La diferenciación de células T tanto en células efectoras Th1 como Th2 determina la naturaleza de la respuesta inmune adaptativa que se activa subsecuentemente.

## 2.5- Citoquinas.

Las citoquinas son moléculas de bajo peso molecular biológicamente activas que modulan la actividad del sistema inmune, secretadas por varios tipos celulares pertenecientes o no al sistema inmune. Sus acciones suelen ser pleiotrópicas y redundantes. En este sentido suelen observarse efectos sinérgicos o antagónicos. Algunas citoquinas se consideran anti-inflamatorias y otras pro-inflamatorias (Fainbom y Gefner, 2005).

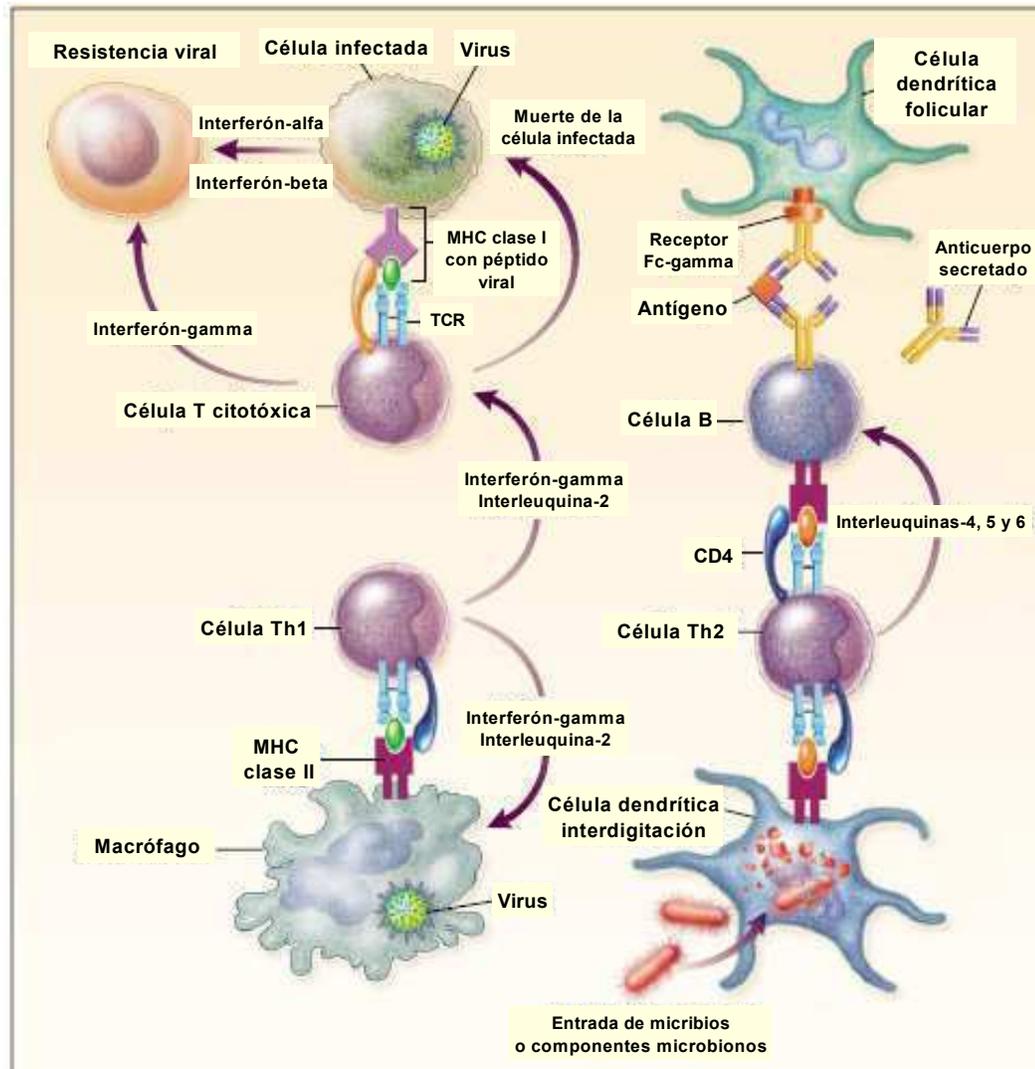
Las células Th1 cuando son estimuladas secretan IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF. Las células Th1 están involucradas en la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) que es la responsable del reclutamiento de otras células inflamatorias en los tejidos periféricos infectados y la diferenciación de células CD8<sup>+</sup> en células citotóxicas maduras. Un ejemplo de respuesta DTH mediada por células Th1 es la prueba de tuberculina cutánea. Además fueron implicadas como efectores de las enfermedades autoinmunes en general (Liblau y col., 1995; Romagnani, 1995), y en enfermedades del sistema nervioso central como por ejemplo la esclerosis múltiple (Olsson, 1995 a y b).

Las células Th2 secretan IL-4, IL-6, IL-10, IL5, IL-13 y TGF- $\beta$ . Cumplen un papel principal en la inmunidad frente a bacterias y parásitos extracelulares (Faimbon y Gefner, 2005). Estas células y sus citoquinas son necesarias para la estimulación y diferenciación de LB en células plasmáticas maduras secretoras de anticuerpos. También están implicadas en reacciones alérgicas: la IL-4 activa la producción de IgE y la IL-5 activa los eosinófilos (Elenkov, 2004).

La generación de respuesta Th1 y Th2 suele ser mutuamente excluyente. Existe una regulación cruzada entre Th1 y Th2. El IFN- $\gamma$  secretado por las Th1 inhibe la proliferación de las Th2. Por su lado, la IL-10 y la IL-4 secretadas por las Th2 inhiben la secreción de IL-2 e IFN- $\gamma$  por parte de las Th1. La inhibición ejercida por la IL-10 no es directa, la IL-10 reduce el número de moléculas de MHC-II de las APC por lo

cual ésta disminuyen su capacidad de activar a las Th1. El predominio de una u otra de las dos subpoblaciones de linfocitos Th depende a su vez del microambiente de citoquinas en que ocurre la activación y maduración inicial a partir de linfocitos en reposo (Faimbon y Geffner, 2005).

En la figura 12 puede verse un esquema general de la respuesta inmune.



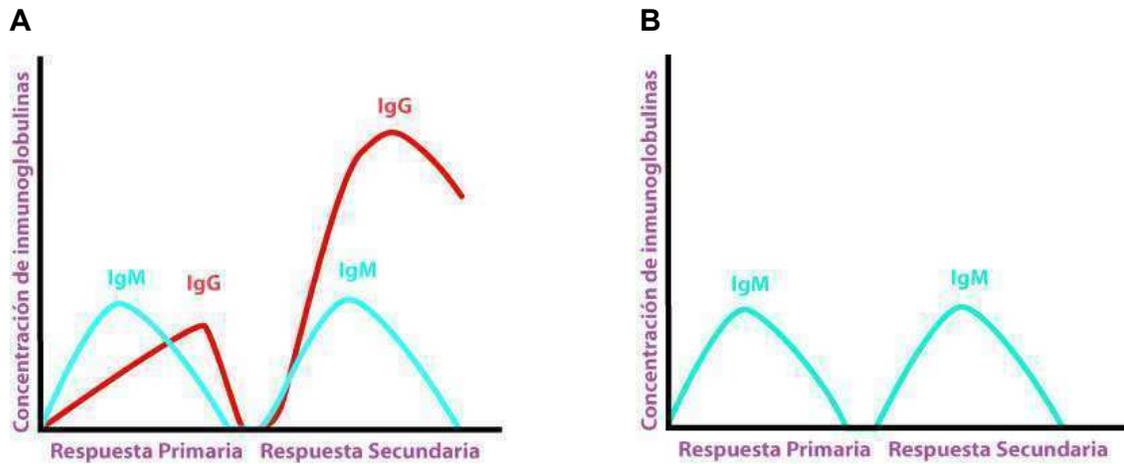
**Figura 12:** Esquema general de la respuesta de los linfocitos frente a una infección viral. Las células T se caracterizan por poseer receptores de células T (TCRs) que reconocen antígenos procesados presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), como se muestra en el lado izquierdo de la figura. La mayoría de las células T citotóxicas son  $CD8^+$ , reconocen un antígeno procesado presentado por las moléculas MHC de clase I, matan a la célula infectada, previniendo la replicación viral. Las células T citotóxicas activadas secretan interferón- $\gamma$ , que junto con el interferón- $\alpha$  y  $\beta$  producido por las células infectadas, crea un estado de resistencia celular a la infección viral. Como se muestra en el lado derecho de la figura, las células T colaboradoras (T *helper*) son generalmente  $CD4^+$ , reconociendo al antígeno procesado presentado por moléculas MHC de clase II, y puede ser dividido en dos poblaciones principales. Células T *helper* tipo 1 (Th1) que secretan interferon- $\gamma$  e interleuquina-2, las cuales activan macrófagos y células T citotóxicas para matar organismos intracelulares; células T *helper* tipo 2 (Th2) que secretan interleuquina 4, 5 y 6, las cuales ayudan a las células B a secretar anticuerpos. Las células B reconocen al antígeno directamente o en forma de complejo inmune sobre las células dendríticas foliculares en centros germinales (Delves y Roitt, 2000b).

## 2.6- Memoria inmunitaria. Respuesta primaria y secundaria.

Cuando un linfocito reconoce a su antígeno se activa y se produce una expansión clonal del mismo. Algunos de esos clones actuarán como células efectoras en la defensa contra el patógeno que despertó la respuesta, otras se diferenciarán en células de memoria que perdurarán en el organismo y podrán actuar frente a una reexposición al mismo patógeno, garantizando una respuesta más rápida y eficiente. Los LT  $CD4^+$  generan células de memoria que se pueden dividir en dos subpoblaciones los linfocitos T de memoria efectoras ( $T_{ME}$ ) y los linfocitos T de memoria centrales ( $T_{MC}$ ). Las  $T_{ME}$  expresan determinadas moléculas de adhesión y receptores para quimiocinas que les permiten ingresar a los tejidos periféricos, al ser activados secretan rápidamente las citoquinas efectoras. Los  $T_{MC}$  expresan moléculas de adhesión que les permiten entrar a los órganos linfáticos secundarios. Poseen mayor capacidad de proliferación frente a la reestimulación antigénica en relación con los  $T_{ME}$  (Fainboim y Geffner, 2005). Los linfocitos T  $CD8^+$  también poseen la capacidad de generar células de memoria.

En la inmunidad humoral deben distinguirse la respuesta inmune primaria de la secundaria. La respuesta inmune primaria se produce cuando el organismo se pone en contacto con un antígeno por primera vez. Es lenta, alcanza los niveles máximos de Ig tras un largo período de latencia (fase lag o de retardo) que es el tiempo requerido para la selección de un clon específico de células B y en la producción de células plasmáticas secretoras de anticuerpos y de células B de memoria. Luego se produce un aumento exponencial (hasta alcanzar un pico máximo) seguido de una meseta y un posterior declive. En total la respuesta puede durar desde unos días a varias semanas, dependiendo de la persistencia del antígeno. Para Ags T-dependientes, se produce primero IgM, y luego IgG, siendo la contribución global de la IgM más importante en el primer contacto con el antígeno. Para este tipo de antígeno, la respuesta secundaria posee diferencias importantes respecto a la respuesta primaria. Se inicia más rápidamente (menor fase lag), alcanza más intensidad (100 a 1000 veces mayor), dura más tiempo y se produce preferentemente IgG, aunque también IgA e IgE, en lugar de IgM (figura 13 A). Para Ags T-independientes, tanto en la respuesta primaria como en la secundaria, el Ac producido es de tipo IgM (figura 13 B).

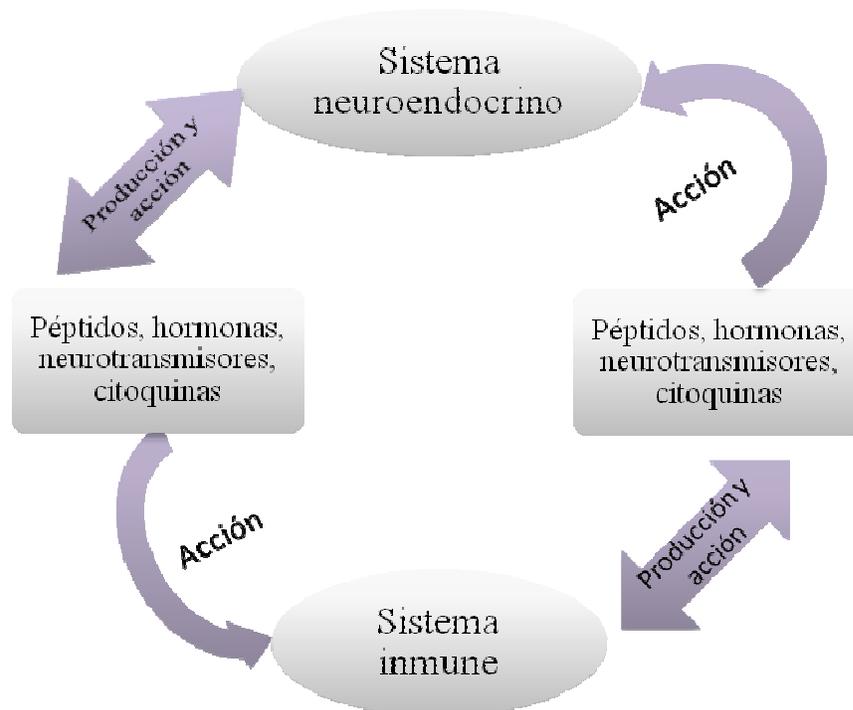
Por último cabe destacar que la memoria inmunitaria de los LB suele ser de mayor duración que la generada por LT (Fainboim y Geffner, 2005).



**Figura 13.** Respuesta primaria y secundaria. (A) Respuesta inmune inducida por un antígeno T-dependiente. (B) Respuesta inmune inducida por un antígeno T-independiente.

### 3- Interacción entre el sistema inmune y el sistema nervioso.

Durante los últimos veinte años se han realizado numerosos estudios para identificar los mecanismos responsables de la comunicación bidireccional entre los sistemas neuroendocrino e inmune. Una gran cantidad de estudios realizados *in vitro* e *in vivo*, indican que comparten ligandos y receptores que son usados como un lenguaje químico común dentro y entre el sistema inmune y neuroendocrino (Blalock, 1994). En la figura 14 se esquematiza la interacción entre ambos sistemas los cuales comparten ligandos y receptores.



**Figura 14:** Circuito de comunicación molecular dentro y entre el sistema inmune y el sistema neuroendocrino, compartiendo ligandos y sus receptores.

### **3.1- Regulación del sistema inmune por el sistema neuroendocrino.**

Existe una estrecha relación entre el SI y el Sistema Nervioso (SN), estos dos sistemas junto al sistema endocrino (SE) mantienen la homeostasis del individuo y representan un mecanismo integral que contribuye a la adaptación del individuo y de las especies (Ader y Cohen, 1993). Entre estos sistemas existe una relación funcional para la adaptación fisiológica al estrés y es necesario un nivel óptimo de funcionamiento de los mismos para lograr una existencia duradera.

El sistema nervioso simpático (SNS), el cual inerva extensamente los órganos linfoides estableciendo conexiones anatómicas entre los sistemas nervioso e inmune (Felten y col., 1987; Felten y Felten, 1988), regula la función del SI principalmente por la vía de neurotransmisores adrenérgicos liberados a través de circuitos neuronales (Dantzer y Wollman, 2003 ; Webster y col., 2002).

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

La noradrenalina (NA) liberada por las terminales nerviosas ejerce su función a través de receptores adrenérgicos presentes tanto en LT como en LB. El principal subtipo de receptor adrenérgico descrito en los linfocitos es el  $\beta_2$  ( $\beta_2$ AR) (Bylund y col., 1994).

Las células T, las cuales expresan varios receptores para catecolaminas, pueden cambiar su fenotipo en respuesta a las señales recibidas. La noradrenalina, llevada a los órganos linfáticos vía inervación simpática, puede cambiar el perfil de producción de citoquinas y la respuesta proliferativa de las células T (Lyte y col., 1991), y movilizar las células madres hematopoyéticas de la médula ósea a la circulación de sangre periférica (Katayama y col., 2006). Diamond y col. (2001) publicaron un trabajo donde reportan que la estimulación mental en humanos aumenta el número de células T circulando en sangre. Otros resultados sugieren que las células T son movilizadas desde los nódulos linfáticos a la sangre periférica bajo condiciones fisiológicas en la cual la neurogénesis es aumentada por ambiente enriquecido y/o actividad física (Ziv y col., 2006).

La principal vía hormonal por la cual el SNC regula al SI es el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) a través de las hormonas de la respuesta neuroendocrina al estrés. A su vez las células del sistema inmune producen citoquinas que pueden alterar la función del eje HPA.

Existen dos tipos de receptores para los glucocorticoides (GCs), los receptores de glucocorticoides (GCR) y los receptores mineralocorticoides (MR) (Webster y col., 2002). La corticosterona tiene mayor afinidad por los MR que por los GCR (Sorrells y Sapolsky, 2007), por lo que a bajas concentraciones la hormona circulante se une preferentemente a MR. Sólo a altos niveles circulantes o altas concentraciones en el tejido los GCR son ocupados (DeRijk y col., 2002; Funder, 1997).

El principal receptor para GCs en células inmunes, como macrófagos y LT es el GCR por lo que la influencia de estas hormonas sobre la función inmune es mediada a través de este receptor (Marchetti y col., 2001).

Los GCs pueden regular al SI de muchas formas. Por ejemplo pueden modular la expresión de citoquinas, moléculas de adhesión, quimioattractantes y otros factores inflamatorios (Adcock e Ito, 2000; Atsuta y col., 1999; Nakagawa y col., 1999), bloquear la maduración linfocitaria (Wisniewska y col., 2004) e inducir apoptosis (Bishop y col., 2000).

Durante muchos años se pensó que los GCs eran inmunosupresores, sin embargo los estudios que llevan a estas conclusiones se realizaron utilizando dosis farmacológicas de éstos y moléculas sintéticas (Boumpas y col., 1993). Recientemente se postuló que a concentraciones fisiológicas, los GCs serían inmunomoduladores, ya que causan una supresión selectiva de la inmunidad celular Th1 y un cambio hacia la inmunidad celular Th2, más que una inmunosupresión generalizada (Elenkov, 2004). De hecho los GCs a nivel fisiológico estimularían varios aspectos de la función inmune. Por ejemplo, varios procesos relacionados a la función de células T son facilitados (Wilckens y De Rijk, 1997). También estimulan agudamente las reacciones de hipersensibilidad de tipo retardada, mientras que a concentraciones farmacológicas la suprimen (Dhabhar y McEwen, 1999).

### 3.2- Acción de las citoquinas en el sistema nervioso.

Se conoce que las citoquinas producen una serie de efectos sobre el comportamiento luego de su administración central o periférica (Dantzer y col., 1996; De Sarro y col., 1990). El animal que sufre una infección presenta una disminución en su alimentación, actividad locomotora y exploratoria, interacción social y actividad sexual, entre otras. El estado de somnolencia aumenta y las funciones cognitivas están disminuidas. Este comportamiento denominado "*sickness behavior*" ha sido asociado a la activación del sistema inmune y a la liberación de citoquinas (Dantzer, 2001). Las citoquinas proinflamatorias, el TNF- $\alpha$ , la IL-1 $\alpha/\beta$  y la IL-6 son las candidatas más firmes para mediar estos efectos. Se demostró experimentalmente que la administración central o periférica de IL-1 produce efectos sobre las funciones cognitivas (Bluthé y col., 1997). La administración de IL-6 o TNF- $\alpha$  no ejercen por si solas un efecto tan potente como el observado para la IL-1 aunque existen evidencias de su participación en la conducta denominada "*sickness-behavior*" (Bluthé y col., 2000). Asimismo, la IL-2 es capaz de inducir un efecto soporífero al ser inyectada en el locus coeruleus en ratones (Nistico y De Sarro, 1991). Por otro lado, se ha observado un aumento en la actividad locomotora y exploratoria luego de la administración de IL-2 en el hipocampo e hipotálamo (De Sarro y col, 1990; Nistico y De Sarro, 1991) y también luego de su administración periférica (De Sarro y col, 1990). Tanto la IL-2 como la IL-6 fueron asociadas con estados psicopatológicos como por ejemplo una serie de manifestaciones psiquiátricas, que incluyen el delirio, la paranoia, las alucinaciones y el estado de letargia, las cuales fueron observadas en pacientes que recibieron tratamiento inmunológico con IL-2 (Caraceni y col, 1993). Respecto al Alzheimer, se ha observado un aumento de las interleuquinas 1 y 6, que a su vez se han correlacionado con incrementos en la síntesis de proteínas amiloides, por lo que pueden considerarse uno de los factores determinantes de esta enfermedad.

Originalmente se pensó que las hormonas producidas en la periferia podían atravesar directamente la barrera hematoencefálica, ya que varias hormonas inmunoregulatorias, incluyendo IL-1, IL-2, IL-6 y TNF produjeron efectos sobre las funciones neuroendocrinas. Sin embargo como el tamaño de las hormonas era muy grande como para penetrar la barrera hematoencefálica, se sugirió la producción

local de las citoquinas en el tejido neuroendocrino (Vankelecom y col., 1989; Koenig y col., 1990).

Aún no queda claro cómo las interleuquinas alcanzan el SNC (Banks y col., 1995). Uno de los mecanismos propuestos sostiene que las citoquinas actúan a nivel de un órgano circunventricular, vagal u otro nervio aferente, liberando sustancias que estimulan la liberación de citoquinas dentro del SNC; las células de la microglía serían las principales productoras de las mismas. Otros mecanismos postulan la existencia de transportadores específicos de tal manera que las citoquinas ingresan a través de los mismos desde la sangre al SNC. Muchos de estos transportadores han sido identificados, aunque aún no está claro si la actividad de estos transportadores alcanza para obtener los niveles de citoquinas adecuados dentro del SNC para producir los efectos encontrados.

### **3.3- Acción de las neurotrofinas en el sistema inmune.**

Numerosos estudios se han hecho para dilucidar la función de las neurotrofinas (NTs) en otros sistemas, además del SN, incluyendo el SI (Otten y Gadiant, 1995; Tessarollo, 1998; Aloe y col., 1999; Aloe, 2001; Sariola, 2001).

Los linfocitos pueden secretar factores neurotróficos, factores que tienen la capacidad de aumentar la supervivencia neuronal. Como por ejemplo BDNF, NGF y la NT3 (Bronzetti y col., 2006). Los linfocitos además poseen receptores para estas NTs. Dean y col. (1987) fueron los primeros en demostrar que las neurotrofinas podían actuar sobre linfocitos, vieron que NGF puede incrementar la respuesta blastogénica en células esplénicas de ratón.

Además se vio que la expresión de neurotrofinas y sus receptores es dependiente de la activación celular (Kerschensteiner y col., 1999; Moalem y col., 2000).

Los niveles de BDNF en el giro dentado, los cuales son afectados por la actividad de las células inmunes (Ziv y col., 2006), podrían no sólo afectar la neurogénesis (Sairanen y col., 2005) sino también otras formas de plasticidad hipocampal como el LTD (Pang y col., 2004).

### **3.4- Evidencias que avalan la existencia de una autoinmunidad protectora. Nuevas perspectivas terapéuticas.**

En la última década, el área de la psiconeuroinmunología se ha desarrollado como una significativa disciplina biomédica. Es ahora posible ver al sistema nervioso, al sistema endócrino y al sistema inmune como parte de un sistema integrado de respuesta. El impacto de esta red psiconeuroinmunológica para la investigación en psiquiatría es obvio. Especialmente cuando la historia muestra la relevancia de infecciones e inmunidad en la práctica psiquiátrica, cerca del 30% de los pacientes con desórdenes psiquiátricos sufrieron de neurosífilis antes que una terapia para esta enfermedad fuera desarrollada hacia fines del siglo XIX. Más actual, es la aparición de trastornos neuropsiquiátricos en enfermos de SIDA. La inmunopsiquiatría es una incipiente rama de la medicina cuyo fin es el estudio de los mecanismos inmunológicos involucrados en la fisiopatología de los desórdenes psiquiátricos.

Sin embargo, a la hora de evaluar esta interacción las respuestas inmunológicas en el sistema nervioso central (SNC), especialmente aquellas con un importante componente inflamatorio, son consideradas como neurotóxicas. Esto es lógico si tomamos en cuenta que por años los inmunólogos han considerado la tolerancia hacia antígenos propios como la óptima condición para la salud del individuo y que además, las células inmunes tienen limitado acceso al SNC. Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que células T reactivas para autoantígenos del SNC son necesarias para la reparación post-injuria del tejido neural (Yoles y col., 2001; Kipnis y col., 2002; Schwartz y Kipnis, 2001) liberando neurotrofinas que estimulan la neurogénesis (Ziv y col., 2007). Asimismo, se ha sugerido que tendrían un papel en el aprendizaje espacial y la memoria (Ziv y col., 2006).

El grupo de Michael Schwartz introdujo el concepto de “autoinmunidad protectora” (*protective autoimmunity*). Lo definió como una respuesta fisiológica producida ante una situación amenazante en el SNC. La respuesta es beneficiosa pero, si su funcionamiento es afectado, esta puede llevar a una enfermedad autoinmune (Schwartz y col., 2003). Ellos demostraron en numerosos trabajos experimentales que la respuesta fisiológica de las células T autoreactivas juegan un papel crucial en

la neuroprotección después de una lesión en el SNC (Hauben y col., 2000b; Yoles y col., 2001). Uno de estos estudios fue realizado en ratas a las que se les lesionó parcialmente el nervio óptico donde mostraron que inyecciones sistémicas de células T que fueron específicas para péptidos asociados a mielina redujeron la pérdida de fibras y neuronas post-lesión. Así que, la supervivencia de las células ganglionares de retina lesionadas fue mayor para las ratas tratadas con células T específicas para mielina que para ratas tratadas con células T específicas para un antígeno irrelevante o ratas no tratadas (Moalem y col., 1999a). Resultados similares fueron obtenidos por recuperación de la actividad motora después de una lesión de la médula espinal (Moalem y col., 1999b; Hauben y col., 2000a; 2000b).

Existen discrepancias entre los modelos estudiados acerca de que las células T pueden conferir neuroprotección o exacerbar el daño causado previamente en el SNC. Esto refleja la complejidad de la respuesta inflamatoria, así como también la naturaleza del tejido dañado, la especie, la cepa, el sexo, la genética y el estado fisiológico de un determinado órgano o animal en el momento de estudio (Kipnis y col., 2001; Hauben y col., 2002; Hauben y Schwartz, 2003). Los resultados de Kipnis y col. (2000) sugieren que los mismos tipos de células T (Th1) pueden ser potencialmente destructivos o potencialmente protectores. La regulación de estas células autoinmunes evitando el riesgo de la aparición de una condición patológica de autoinmunidad, sería llevada a cabo por células T regulatorias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Kipnis y col., 2002).

Los resultados de los diversos estudios realizados por el grupo de Schwartz sugieren que estas células autoreactivas, presentes en los individuos sanos, podrían tener un papel fisiológico importante para mantener la integridad del SNC (Ziv y col., 2006).

El acetato de glatiramer (GA; Copaxone<sup>®</sup>, copolímero 1) consiste de sales de acetato de polipéptidos sintéticos que contienen cuatro aminoácidos: L-alanina, L-glutamato, L-lisina y L-tirosina (Teitelbaum y col., 1971). Fue aprobado por la Food and Drugs Administration (FDA) de U.S.A. para el tratamiento de la esclerosis múltiple (Schori y col., 2001; Kipnis y col., 2000). El GA puede tener una débil reacción cruzada con autoantígenos residentes en el SNC (Kipnis y col., 2000) y puede estimular los efectos protectores o de reparación de las células T autoreactivas (Kipnis y col., 2000; Angelov y col., 2003; Benner y col., 2004; Avidan y col., 2004). En tal sentido el grupo de Schwartz ha demostrado que una sola inyección de GA es protectora en un modelo agudo de injuria en el SNC (Angelov y col. 2003).

## 4- Estrés.

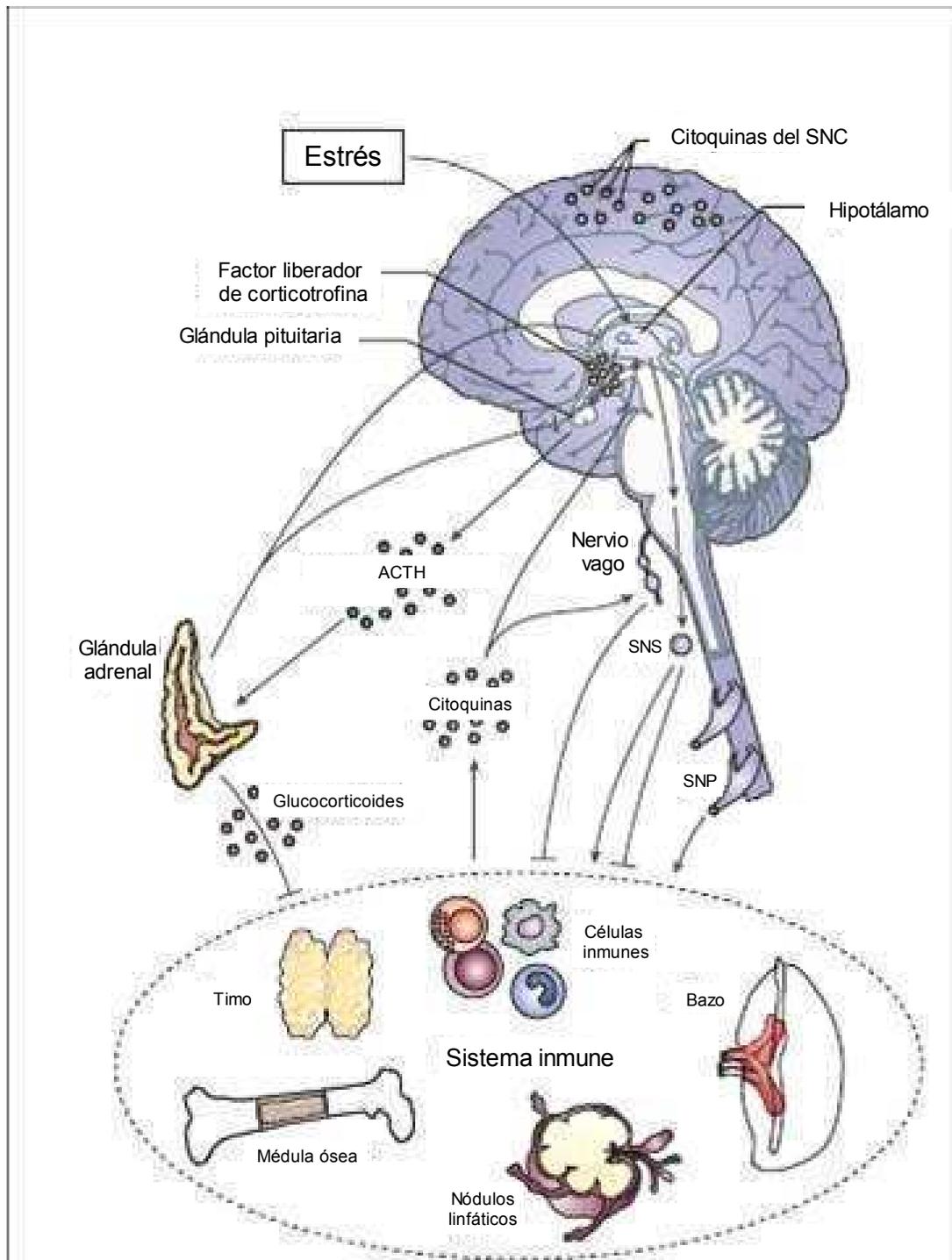
### 4.1- Mediadores involucrados.

El estrés es definido como aquella condición que perturba severamente la homeostasis fisiológica y psicológica de un organismo (Levine y Ursin, 1991; Weiner, 1992). Mientras que el estrés es un mecanismo de supervivencia necesario, el estrés prolongado puede tener varios efectos deletéreos, incluyendo desde deterioro en el aprendizaje y la memoria hasta aumento de muerte de células neuronales.

La clásica respuesta fisiológica al estrés incluye la activación del sistema nervioso autónomo y el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA), con el consecuente aumento de los niveles de glucocorticoides (GC) y catecolaminas en sangre y tejidos. En lo que conforma el eje HPA, las neuronas del núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo secretan CRH (hormona liberadora de corticotropina) y AVP (arginina vasopresina), que estimulan en la glándula pituitaria la secreción de ACTH (hormona adrenocorticotrópica) hacia el torrente sanguíneo. La ACTH estimula la síntesis y secreción de GC (cortisol en primates y corticosterona en roedores) en la corteza de la glándula adrenal. Además, el PVN modula al sistema autónomo mediante proyecciones hacia neuronas preganglionares simpáticas y parasimpáticas. A través de la vía simpática se estimula en la médula adrenal la secreción de adrenalina.

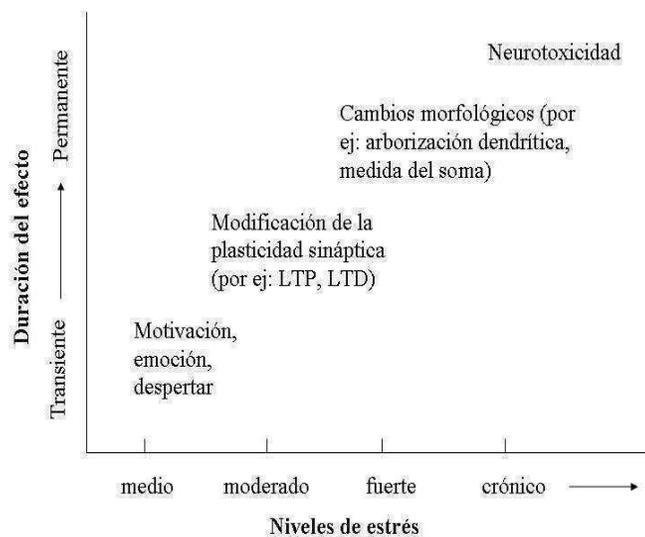
El hipocampo y la amígdala tienen un rol clave en la regulación de la respuesta al estrés. Estas regiones forman parte de un sistema integrador involucrado en el control neuroendocrino. Ambos, de manera indirecta o directa proyectan hacia el hipotálamo (Watts, 2007). El hipocampo está involucrado en el mecanismo de retroalimentación negativo sobre el eje HPA (Furay, 2008; Sapolsky y col., 1984). Esto ocurriría principalmente vía la estimulación por GC, aunque además existen evidencias de un tono inhibitorio sobre el eje, independientemente de los GC (Buckingham, 2007). Contrariamente, la amígdala tendría un papel excitatorio del eje HPA (Kollack-Walker y col., 2007).

Como ya fuera mencionado, las células del sistema inmune tienen receptores tanto para los glucocorticoides como para las catecolaminas, constituyéndose en mediadores de los efectos del estrés sobre el sistema inmune (figura 15).



**Figura 15.** Interacción entre el SN y el SI. Abreviaturas: **ACTH:** hormona adrenocorticotrófica, **SNC:** sistema nervioso central, **SNS:** sistema nervioso simpático, **SNP:** sistema nervioso parasimpático, Modificado de Webster y col. (2002).

Se ha demostrado que el estrés afecta la plasticidad sináptica, la morfología dendrítica, la neurotoxicidad y la neurogénesis dentro del hipocampo (Kim y Yoon, 1998; McEwen, 1999). El hipocampo es particularmente sensible a los efectos del estrés como se esquematiza en la figura 16. Se ha documentado que estas alteraciones, que incluyen la atrofia dendrítica de las neuronas piramidales de la región CA3, la supresión de la proliferación celular en el giro dentado, la reorganización de las vesículas sinápticas en las terminales de las fibras musgosas y la inhibición de la potenciación a largo plazo (LTP) en la zona CA3 y el giro dentado, con el consecuente deterioro cognitivo evidenciado por menores desempeños en pruebas de aprendizaje y memoria, se producen luego de la exposición crónica a la situación de estrés, pero no en el corto plazo. Los glucocorticoides han sido los mediadores principalmente involucrados en estos efectos deletéreos del estrés (McEwen, 2001).



**Figura 16.** Efectos fisiológicos comportamentales asociados con el estrés. Con un nivel medio de estrés, ocurren alteraciones como corta duración en los sistemas motivacional, emocional y del despertar que pueden tener influencia en los procesos de aprendizaje y memoria. Cuando el nivel de estrés se incrementa (en duración, intensidad o ambos), varios cambios transientes y permanentes son observados en el hipocampo, incluyendo modificaciones en la plasticidad sináptica, cambios morfológicos y muerte neuronal. Estos cambios inducidos por el estrés en el hipocampo pueden potencialmente contribuir a perjudicar el aprendizaje asociado con el estrés (Kim y Yoon, 1998).

Más recientemente, las citoquinas se han perfilado como importantes mediadores de la respuesta al estrés produciendo importantes cambios conductuales. Es importante tener en cuenta que estas interleuquinas tienen la capacidad de actuar a nivel del SNC produciendo cambios en el comportamiento y que además han sido implicados en procesos de inflamación y degeneración neuronal. Se ha demostrado que enfermedades relacionadas al estrés como la depresión mayor y el Alzheimer cursan con desbalances en la relación de citoquinas de tipo Th1/Th2 (Schwarz y col., 2001; Sperner-Unterweger, 2005).

#### **4.2- Modelos experimentales de estrés crónico.**

Existen diversas formas de inducir estrés en animales, el cual, dependiendo de la duración, puede clasificarse en agudo o crónico. Los esquemas de estrés por lo general involucran la exposición a diferentes agentes estresantes como inmovilización, shock eléctrico, frío, ejercicio y restricción de comida, entre otros. La aplicación de éstos por un período de tiempo prolongado (más de una semana) (Joëls y Baram, 2009), es considerado estrés crónico. Varios paradigmas de estrés crónico han sido utilizados en estudios preclínicos para evaluar la acción de fármacos antidepresivos, como el modelo de estrés psicosocial en el primate primitivo *Tupaia belangeri* (Fuchs y Flugge, 2002) y el estrés físico, social e impredecible en roedores (Alfonso y col., 2006; McEwen, 2001). Cuando se utiliza un solo tipo de estresor, por ejemplo inmovilización, el modelo se denomina de estrés crónico homotrópico. Cuando se utilizan una combinación de diferentes estresores, se denomina heterotrópico.

Un modelo de estrés heterotrópico es el modelo de estrés crónico moderado (CMS). El mismo consiste en someter a los animales a una serie de estresores considerados moderados que se aplican de manera crónica, secuencial y alternada para no producir acostumbamiento por parte del animal (Willner y col., 1992; Moreau, 1997). Este modelo implica un bajo grado de estrés ofreciendo una aproximación razonable a diversos estresores de la vida diaria. En este sentido, el modelo de estrés crónico moderado ofrece una simulación realista de los efectos biológicos del estrés crónico. Es importante tener en cuenta que la sensibilidad a este modelo puede variar de acuerdo a la cepa utilizada, el sexo, la edad e inclusive al proveedor de los animales.

Por otra parte, los cambios conductuales que se manifiestan en los animales sometidos al modelo pueden diferir entre laboratorios debido a diferencias mínimas en la implementación del modelo (Willner, 1997). Asimismo es importante tener en cuenta que se han utilizado cepas de ratones que por sus alteraciones conductuales y neuroquímicas han sido denominadas “reactivas” y “relativamente resistentes” al estrés, a saber: BALB/c y C57BL6 (Tannenbaum y Anisman, 2003; Lepicard y col., 2000). Interesantemente estas cepas frente a un desafío antigénico dan respuesta con un perfil diferente de citoquinas, los ratones BALB/c dan respuesta con predominio Th2 y los C57BL6 con predominio Th1. Esto determina diferencias tanto en su inmunidad innata (Watanabe y col., 2004) como adquirida (Guiñazú y col., 2004).

## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## Hipótesis de trabajo

Postulamos que el estrés crónico induce alteraciones inmunológicas, específicamente un desbalance en la relación Th1/Th2, que participan en la inducción de alteraciones en la neurogénesis, cambios neuroquímicos y estructurales en el hipocampo, lo que conlleva trastornos cognitivos, particularmente una disminución en la capacidad de aprendizaje y la memoria.

---

## Objetivos de la investigación.

### Objetivos generales.

El objetivo principal del presente trabajo de tesis es estudiar la influencia de la relación Th1/Th2 en las alteraciones inmunológicas y conductuales inducidas por exposición a estrés crónico. Asimismo, indagar si las alteraciones en la respuesta inmune inducida por la exposición a estrés crónico conllevan cambios neuroquímicos afectando la neurogénesis en el hipocampo (estructura límbica clásicamente involucrada en la plasticidad neuronal) resultando en trastornos cognitivos. Se propone además evaluar la eficacia de una manipulación inmunológica para la reversión y/o prevención de estos trastornos.

### Objetivos específicos.

1) Analizar si el estrés crónico induce el mismo tipo de alteración inmunológica (respuesta inmune y perfil de citoquinas) en cepas con predominio Th2 (BALB/c) o predominio Th1 (C57BL/6). Teniendo en cuenta que los ratones BALB/c y C57BL/6 presentan diferencias en su inmunidad innata, así como diferente respuesta inmunológica frente a un mismo desafío antigénico, es de interés indagar si este parámetro condiciona de alguna manera las alteraciones inducidas por el estrés.

En animales BALB/c como en C57BL/6 se procederá a:

2) Analizar si los animales expuestos al modelo de estrés crónico presentan el mismo tipo de alteraciones en el aprendizaje y la memoria, dependiendo de la cepa de origen.

3) Determinar si la concentración de corticosterona y catecolaminas varía a lo largo de las distintas semanas de exposición al modelo de estrés.

4) Analizar si los animales expuestos al estrés crónico presentan alteraciones morfológicas y neuroquímicas en el hipocampo (estructura relacionada con el aprendizaje y la memoria). En toda alteración psiquiátrica es esperable que existan cambios funcionales acompañados de cambios anatómicos resultantes por ejemplo de procesos inflamatorios o degenerativos. Así, es importante evaluar si hay pérdida neuronal, así como también analizar la producción de mediadores implicados tanto en la neuroprotección como en la toxicidad neuronal. Entre estos mediadores, es de especial interés determinar la producción de NO y su relación con la expresión de las diferentes isoformas de NOS, la actividad de PKC y sus isoformas. Además, se analizará el balance entre la producción de ROS y las defensas antioxidantes (glutatión, catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD)).

5) Evaluar alteraciones en la neurogénesis hipocampal inducidas por exposición a estrés crónico.

6) Evaluar en el hipocampo los niveles de ARNm para las siguientes neurotrofinas: factor de crecimiento neuronal, neurotrofina 3 y factor neurotrófico derivado de cerebro (NGF, NT3 y BDNF, respectivamente).

7) Evaluar el efecto de la inyección de COP (Ag que se comporta como un débil agonista de Ag propios del SNC) a fin de inducir una débil respuesta autoinmune, en aquellos animales en los que se haya manifestado los efectos nocivos del estrés.

8) Análisis y correlación de los resultados anteriores.

# **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

## **1- Animales.**

Se utilizaron ratones hembra endocriados de las cepas BALB/c y C57BL/6 provistos por el Bioterio Central de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires. Todos los animales fueron usados entre 60 y 100 días de edad, y mantenidos con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas a temperatura controlada entre 18 y 22 °C en el bioterio del CEFYBO. A excepción de cuando se indica, los ratones tuvieron libre acceso al agua y al alimento. Los animales fueron utilizados de acuerdo a los principios de la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, U.S. National Research Council, 1996. Cabe aclarar que todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional para Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.

## **2- Modelo de estrés crónico moderado.**

Los ratones fueron divididos al azar en dos grupos. Un grupo de animales fue mantenido en las condiciones especificadas anteriormente (grupo control) y otro grupo fue sometido al esquema de estrés crónico moderado (grupo CMS). Se utilizó el modelo de estrés crónico moderado desarrollado por Willner y col. (1992) en rata y modificado por Monleón y col. (1995) para ratón. Los estresores usados fueron los siguientes:

3 horas de privación de agua y comida;

1 período adicional (17 horas) de privación de agua;

2 períodos continuos de iluminación durante la noche;

2 períodos (7 y 17 horas) de inclinación de la jaula a 45°;

1 período de 17 horas con el aserrín de la jaula mojado con 100 ml de agua;

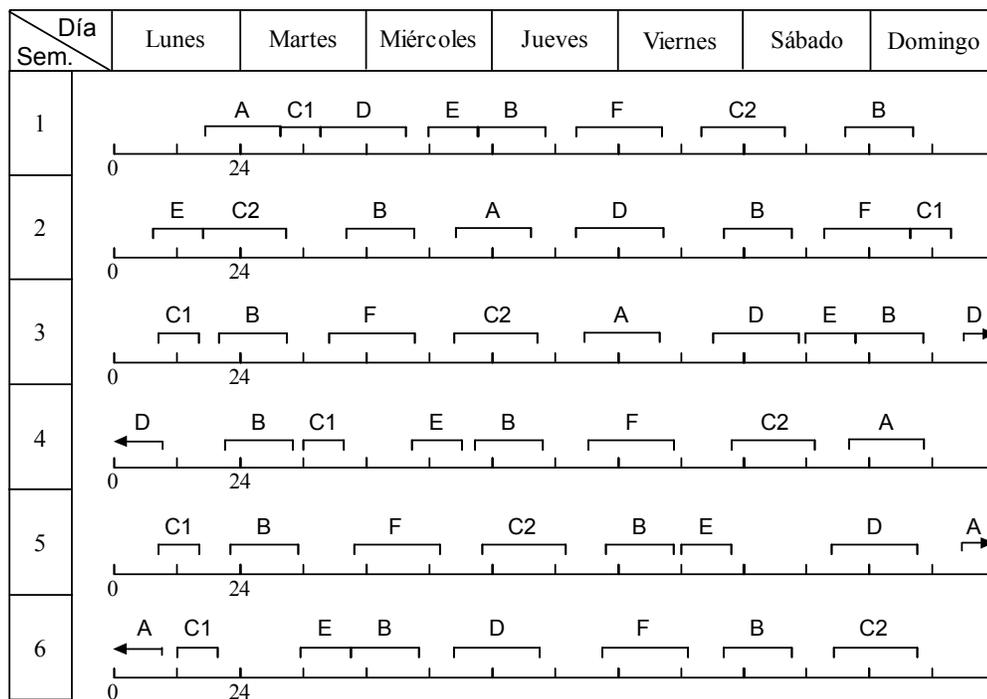
1 período de 8 horas de privación de alimento;

1 período de 17 horas compartiendo la jaula (se agrupa siempre el mismo par de animales alterando el orden de la jaula usada).

Estos estresores han sido clasificados como de intensidad moderada según el “Animals (Scientific Procedures) Act of 1986 (UK legislation)” y se aplican

alternadamente, sin seguir un orden determinado, de tal manera que el animal no se acostumbre a los mismos, es decir, son estresores impredecibles (figura 17).

Esta exposición conlleva cambios tales como la disminución de la masa corporal y la preferencia por la bebida dulce (Anhedonia) a partir de la cuarta semana. Estos parámetros alcanzan sus valores máximos después de las seis semanas, y permanecen altos durante las semanas subsecuentes (Edgar y col., 2002). Por este motivo en el presente trabajo de tesis los animales fueron utilizados entre las 6 y 9 semanas de exposición a este modelo de estrés.



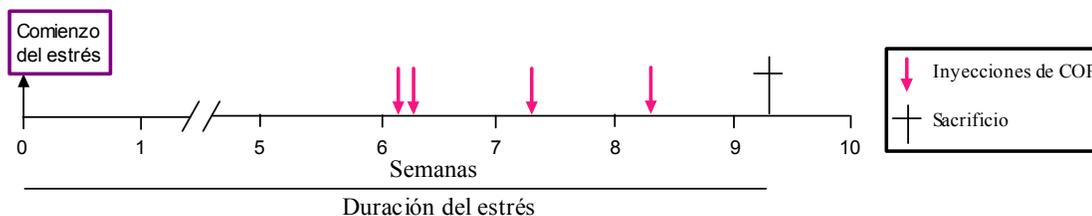
**Figura 17.** Esquema del modelo de estrés crónico moderado. El gráfico muestra cómo fueron usados los estresores. Los corchetes indican el tiempo en el cual fue aplicado el estresor a cada ratón. A- un período de 17 horas de privación de agua, B- dos períodos continuos de iluminación durante la noche, C1-un período de 7 horas de inclinación de la jaula a 45°, C2- un período de 17 horas de inclinación de la jaula a 45°, D- un período de 17 horas. con el aserrín de la jaula mojado con 100 ml de agua, E- un período de 8 horas de privación de alimento, F- un período de 17 horas. compartiendo la jaula.

### 3- Tratamiento con L-NAME.

Para investigar si la inhibición de NOS modifica el comportamiento de ratones BALB/c y C57BL/6, se les administró a los animales L-NAME (L-Nitro Metil Arginina) (500 mg/l) o 7-NI (7-nitroindasol) (80 mg/l) de forma oral en el agua de bebida como fue descrito previamente por Deckel y col. (2001) y Ollerstam y col. (1997).

### 4- Tratamiento con Copaxone®.

El acetato de glatiramer (Copaxone®) es una mezcla de polímeros sintéticos de 4 aminoácidos (Teitelbaum y col., 1971) que puede débilmente tener una reacción cruzada con autoantígenos residentes en el SNC y puede simular los efectos de protección y de reparación de las células T autoreactivas (Kipnis y col., 2000). A tal fin, los ratones recibieron 4 inyecciones subcutáneas conteniendo 100 µg de Copaxone® (323K253890604 Lotes N° 538655, 538768 y 538825 importado por Teva-Tuteur Argentina) en 150 µl de buffer fosfato salino (PBS) cada una, según el esquema de la figura 18 (Butovsky y col., 2006). Los ratones controles de cada grupo fueron inyectados con PBS.



**Figura 18.** Esquema del procedimiento utilizado para la aplicación de las inyecciones de Copaxone®. Los números indican las semanas. Las flechas rosas indican las inyecciones de Copaxone®.

## 5- Pruebas para evaluar capacidad de aprendizaje y memoria.

Los ratones fueron evaluados por su capacidad de aprendizaje y memoria, utilizando distintas pruebas. Los ensayos conductuales fueron realizados por la tarde (entre las 2 y 6 P.M.), en un cuarto destinado a ensayos de comportamiento, con ruido blanco y baja intensidad lumínica. Una hora antes de cada prueba, las jaulas con animales fueron colocadas en el cuarto, permitiéndole a los animales habituarse al lugar.

Durante los experimentos, los dispositivos fueron limpiados con alcohol 70% para remover rastros de olor y suciedad.

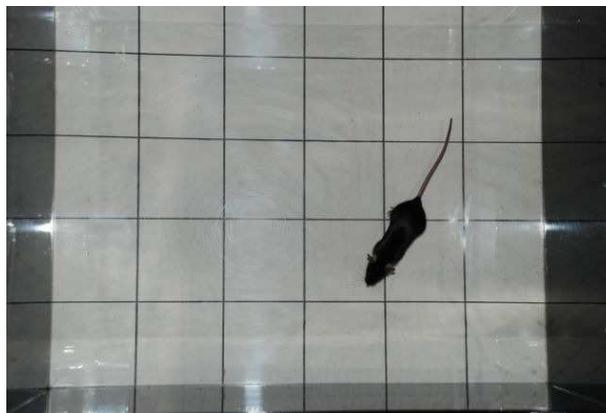
La actividad fue registrada con una cámara de video *Sony* modelo DCB-DVD810.

### 5.1- Prueba de habituación.

La observación de la actividad exploratoria en un campo abierto permite conocer si un determinado tratamiento tiene algún efecto en la respuesta a un entorno novedoso evaluando la actividad motora. Si se repite el ensayo exponiendo al animal al mismo ambiente y en las mismas condiciones, se espera observar una disminución de la conducta exploratoria ya que el entorno deja de ser novedoso. Este mecanismo se denomina **habituación**. Este tipo de prueba evalúa la memoria no asociativa.

Para ello se utiliza una caja acrílica rectangular (42 x 35 x 15 cm) dividida uniformemente en 30 cuadrados de 7 x 7 cm con sus paredes laterales opacas para evitar el contacto con el exterior (figura 19). En el primer día los ratones fueron colocados en el centro de la caja, observándose los patrones de comportamiento de los animales durante 5 minutos. Los parámetros considerados fueron la actividad locomotora horizontal (número de líneas cruzadas), la actividad vertical (número de veces que explora en posición vertical sobre las patas traseras, denominado *rearing*) y el tiempo que permanece quieto sin explorar.

Para evaluar la habituación se repitió la prueba 24 horas después de la primera exposición bajo idénticas condiciones y se registraron los parámetros antes mencionados.



**Figura 19.** Dispositivo utilizado en la prueba de habituación.

### **5.2- Prueba de evitación condicionada por shock eléctrico plantal.**

El aparato utilizado en este estudio consiste en dos compartimentos de iguales dimensiones, uno iluminado por una lámpara de 60 W y otro oscuro, divididos por una abertura (80 x 80 mm). El piso está conformado por una grilla de varillas metálicas y las del compartimento oscuro están electrificadas. El aparato está conectado a una computadora que permite regular la duración e intensidad del shock eléctrico (figura 20).

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

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

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

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

Este procedimiento evalúa la memoria asociativa y mide la capacidad de evocación de un aprendizaje o una memoria adquirida. Los pasos previos a dicha evocación son la adquisición y la consolidación. Cualquier fenómeno que interfiera en estos momentos del aprendizaje puede modificar la memoria evocada.



**Figura 20.** Fotografía del dispositivo utilizado en la prueba de evitación condicionada por shock eléctrico plantal.

### **5.3- Prueba en el laberinto en forma de Y.**

Los ratones presentan un comportamiento espontáneo de alternancia innato en un laberinto en forma de Y. Este tipo de prueba evalúa la memoria espacial. El aparato consiste de tres brazos rectangulares idénticos (28 x 10 x 20 cm) con paredes y piso de color negro y de un material de fácil limpieza. Este dispositivo se encuentra rodeado de claves espaciales, a fin de facilitar la ubicación espacial del animal (figura 21).

Esta prueba consiste en una sesión, donde el ratón es colocado al final de uno de los brazos fijados del laberinto en Y y se le permite explorar libremente durante 6 minutos. Una alternancia se define como tres visitas consecutivas a tres brazos

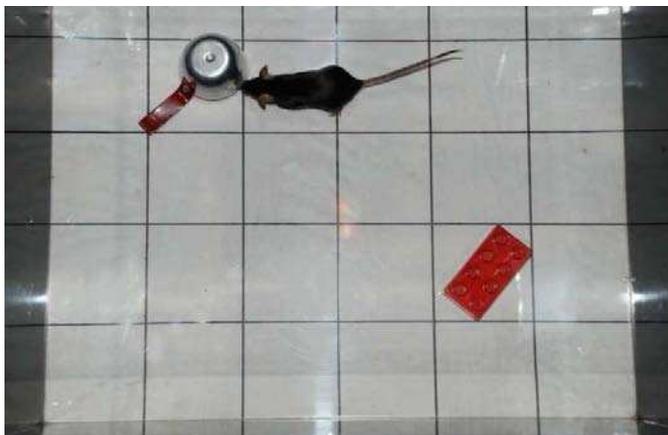
distintos del laberinto. El porcentaje de alternancia fue calculado como el número de alternancias dividido por el número total de entradas a los brazos menos 2, multiplicado por 100 (Dillon y col., 2008; Kim y col., 2008).



**Figura 21.** Laberinto en forma de Y utilizado para evaluar el comportamiento espontáneo de alternancia.

#### **5.4- Prueba de reconocimiento de objetos.**

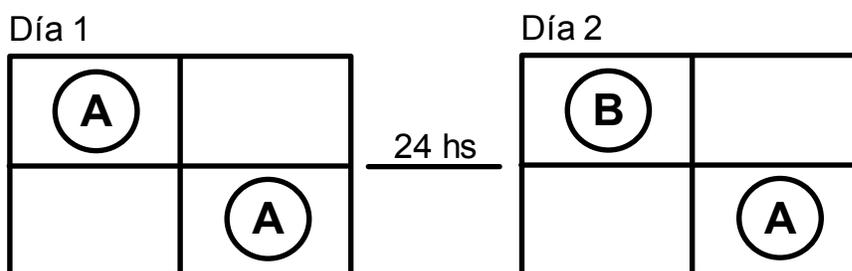
Esta prueba se realiza utilizando una caja de acrílico rectangular (42x35x15 cm) y tres objetos: dos idénticos y uno diferente. Previo al experimento los objetos fueron elegidos siendo evaluados en una prueba de preferencia, exponiendo los ratones a dos objetos diferentes en forma, tamaño y color, y buscando objetos para los cuales el índice de elección fuese el mismo. Los objetos elegidos fueron un rectángulo plástico rojo y una media esfera de metal (figura 22).



**Figura 22.** Fotografía de un ratón C57BL/6 explorando el objeto novedoso.

Esta prueba consta de 3 fases:

- Una fase de habituación, en la cual se coloca al ratón en el campo abierto vacío y se lo deja explorar 5 min. durante dos días consecutivos, a la misma hora.
- Una fase de entrenamiento, en la cual se coloca al ratón nuevamente en la caja de acrílico, que en esta fase, contiene dos objetos iguales, colocados equidistantes a las paredes y se lo deja explorar durante 10 minutos (figura 23).
- Una fase de testeo, realizada 24 horas después del entrenamiento, donde se coloca al ratón nuevamente en la caja con 2 objetos, uno igual al anterior y otro diferente, y se lo deja explorar durante 10 minutos (figura 23).



**Figura 23.** Esquema en el cual se representa la posición de los objetos en la caja en el día 1 (fase de entrenamiento) y el día 2 (fase de testeo). Las letras A y B representan los objetos utilizados (B= objeto novedoso).

Tanto en la fase de entrenamiento como la de testeo, se registra el tiempo que permanece olfateando cada objeto. Se calcula el porcentaje de tiempo que exploró cada objeto como: tiempo que exploró el objeto 1 / (tiempo que exploró el objeto 1 + tiempo que exploró el objeto 2) X 100 (Costa y col., 2008; Arqué y col., 2008).

## **6- Histología del hipocampo.**

La perfusión de los hipocampos se realizó según el método original de González-Aguilar y De Robertis (1963). Brevemente, los animales se anestesiaron con hidrato de cloral al 25 %, se perfundieron con paraformaldehído (PFA) 4% intracardiaco (p/v) in 0,1 mol/L buffer fosfato, pH 7,4 y se extrajo el cerebro. Los cerebros son fijados en la misma solución durante 6 horas a 4 °C. Luego fueron deshidratados en etanol, transferidos a una solución de etanol-tolueno 1:1 (v/v), blanqueados en tolueno e incluidos en parafina (Fischer Scientific). Se realizaron cortes coronales de 10 µm con micrótopo, se desparafinaron con tolueno, se hidrataron con concentraciones decrecientes de etanol y finalmente con agua destilada. Para la coloración se utilizó hematoxilina-eosina y se decoloraron parcialmente con alcohol 50% y 70%. Los cortes se observaron y fueron fotografiados en un microscopio Axiphot Carl Zeiss usándose una máquina fotográfica digital Nikon de 4,5 megapíxeles. Se evaluó el número de neuronas/área y el espesor de la zona CA3 y CA1 analizando campos al azar utilizando el software Image Pro versión 4.5.

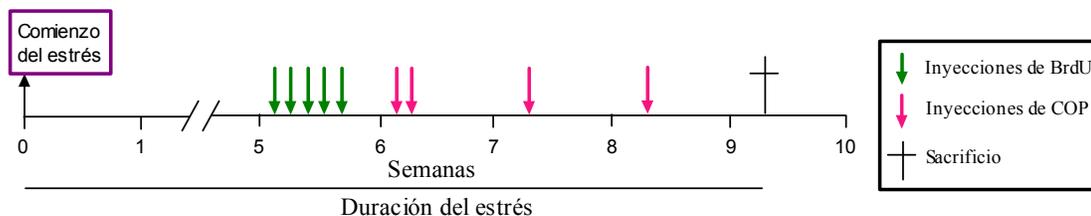
## **7- Determinación de la neurogénesis en ratones adultos.**

### **7.1- Esquema de inyección con 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU).**

La 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) es un análogo de la timidina que se incorpora en el ADN durante la fase S del ciclo celular y permite marcar tanto las células proliferativas como su progenie. Las inyecciones de BrdU son un método ampliamente utilizado para estudiar la proliferación y la formación de nuevas células tanto durante el desarrollo como en la neurogénesis adulta.

Los ratones recibieron un total de 10 inyecciones intraperitoneales de BrdU (SIGMA-ALDRICH), administradas a razón de dos veces al día cada 12 horas. Cada inyección contenía 50 µg de BrdU por g de peso (aproximadamente 1mg de BrdU por ratón), en un volumen de 100 µl de PBS. Las inyecciones de BrdU fueron suministradas durante 5 días consecutivos en la quinta semana de exposición al modelo de estrés crónico. Para estudiar el efecto del Copaxone®, se procedió al

tratamiento con Copaxone®, según el esquema especificado en el punto 4 una vez concluida la administración de BrdU (Figura 24).



**Figura 24.** Representación esquemática de los momentos en los cuales fueron aplicadas las inyecciones de BrdU y Copaxone®. Los números indican las semanas. Las flechas verdes indican las inyecciones de BrdU que fueron administradas durante 5 días consecutivos, dos inyecciones por día, cada 12 horas. Las flechas rosas indican las inyecciones de Copaxone®.

## 7.2- Perfusión y corte del tejido.

Los ratones fueron anestesiados con 300 µl de una solución de ketamina (10 mg/ml)/xilacina (4 mg/ml) disueltas en PBS 1X. Se perfundió a cada ratón con 50 ml de solución fisiológica y luego con 100 ml de solución fisiológica conteniendo 4% de PFA. La perfusión fue realizada con una bomba (Master Flex L/S) con un flujo constante de 5ml/min. Luego se extrajeron los cerebros, los cuales fueron guardados a 4°C en PFA 4% durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, los cerebros fueron lavados dos veces con buffer fosfato (PB) (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 5,52 g/l y NaHPO<sub>4</sub>: 21,9 g/l) 0,1M. Luego fueron pasados a sacarosa 30% (preparada en PB 0,1M) y guardados a 4°C durante 2 días hasta el momento de ser cortados. Los cortes correspondientes a la zona del hipocampo (placas 38-64; Paxinos y Franklin, 2001) fueron de 40 µm y realizados con un micrótomo (Leica SM2000R). Durante la obtención de los mismos, el tejido se mantuvo congelado con hielo seco. Las secciones correspondientes al hipocampo fueron guardadas en solución criopreservadora (glicerol: etilenglicol: PB 0,2M; 3:3:4 (v/v)) a -20°C.

### 7.3- Inmunofluorescencia con BrdU.

Las secciones criopreservadas fueron colocadas en placas de 12 pocillos contenidas en redes con buffer Tris salino (TBS) 0,1 M, para realizar 3 lavados de 5 minutos cada uno. Luego se incubaron las secciones en 50% formamida a 65°C por 2 horas. Luego se realizaron 2 lavados de 15 minutos con 2x SSC (NaCl: 0,3 M y citrato de Na: 30mM, pH 7) y se incubaron con HCl 2N a 37°C por 30 minutos, para desactivar la formamida y exponer el epitope. Luego se realizó un lavado con buffer borato 0,1M por 10 minutos para llevar a pH neutro. Se realizaron 6 lavados con TBS por un total de 90 minutos. Se bloquearon las secciones de hipocampo con 3% de suero normal en TBS con 0,25% tritón-X (buffer de bloqueo) durante 60 minutos. Se incubaron con el anticuerpo primario anti-BrdU origen rata (Abcam) diluído en buffer de bloqueo por 72 horas, en un cuarto frío (4°C).

Luego se realizaron 2 lavados de 15 minutos cada uno con TBS y se incubaron durante 15 minutos con buffer de bloqueo. Se incubaron los cortes con un anticuerpo secundario anti-rata-Cy3 (Abcam) diluído en buffer de bloqueo por 2 horas. Se realizaron 3 lavados con TBS de 5 minutos cada uno y se incubaron con DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol, que se une preferentemente a regiones del ADN ricas en AT) por 10 minutos a temperatura ambiente. Por último se realizaron 4 lavados con TBS de 5 minutos con uno. Todas las incubaciones y lavados se realizaron con agitación. Luego se montaron las secciones en portaobjetos y fueron observadas con un microscopio invertido de fluorescencia (Zeiss Axiovert 135M). Se tomaron fotografías con un aumento de 10X correspondientes al giro dentado del hipocampo, con una cámara (HAMAMATSU C474295) incorporada al microscopio. El ensamble de las fotos fue realizado con el programa Adobe Photoshop CS2. Finalmente, se contó el número de células BrdU positivas en el giro dentado del hipocampo.

Para cuantificar la neurogénesis nos basamos en la marcación con el anticuerpo anti-BrdU, ya que después de un mes de haberse inyectado la BrdU aproximadamente el 90% de las células marcadas en el giro dentado son neuronas maduras (Eriksson y col., 1998; Pereira y col., 2007).

## 8- Determinación de la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS).

### 8.1- Determinación de la NOS dependiente de calcio.

Se determinó la actividad de NOS por la formación en hipocampo de [ $^{14}\text{C}$ ] L-citrulina a partir de [ $^{14}\text{C}$ ] L-arginina (300 mCi/mmol) (Amersham Biosciences). Para tal fin se disecaron los hipocampos, se sonicaron en un medio conteniendo Hepes 200 mM (pH 7,4), DTT (ditiotreitolo) 1 mM, leupeptina 1  $\mu\text{M}$ , PMSF (fenilmetilsulfonil fluoruro) 0,2 mM y valina 25 mM. Finalmente se agregó 0,15  $\mu\text{Ci}$  de [ $^{14}\text{C}$ ] L-arginina y se incubaron solos o en presencia de EGTA (2 mM) 30 minutos a 37°C en 5%  $\text{CO}_2$ . Se frenó la reacción por centrifugación a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se pasaron por columnas de resina AG 50W-X8 (BioRad) y se determinó la radioactividad en el eluido. A fin de confirmar que la formación de citrulina fuera debida a la actividad de NOS se utilizó un inhibidor de la actividad de NOS, L-NAME (SIGMA-ALDRICH) ( $10^{-3}\text{M}$ ). La actividad de NOS calcio dependiente fue calculada por sustracción de la actividad en presencia de EGTA de la actividad total en ausencia de este quelante de calcio.

A fin de determinar la actividad de eNOS y nNOS, se utilizaron inhibidores de ambas isoformas. En presencia del inhibidor de la eNOS (L-NIO, Clorohidrato de L-N5-I-Iminoetil-ornitina, 0,8  $\mu\text{M}$ ) (SIGMA-ALDRICH) se estimó la actividad de nNOS. Asimismo, en presencia de 10  $\mu\text{M}$  de 7-NI se calculó la actividad de eNOS. Los resultados se expresan en pmoles de [ $^{14}\text{C}$ ] L-citrulina formados en 30 minutos de reacción por gramo de tejido. A fin de investigar la influencia de la actividad de PKC sobre la actividad de NOS, se determinó la actividad de NOS dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de un inhibidor de la actividad de PKC (GF 109203X, Bis-indolylmaleimida) (SIGMA-ALDRICH).

## **9- Actividad de PKC.**

### **9.1- Purificación enzimática.**

El tejido fue homogeneizado a 4 °C en 0,5 ml de un medio conteniendo EDTA 2 mM, EGTA 4 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM y Pipes 20 mM pH 6,6 suplementado con PMSF 1 mM y leupeptina 10  $\mu$ g/ml. Luego se centrifugó durante 30 minutos a 25000g a 4 °C. Se separó el sobrenadante que contiene la actividad de PKC correspondiente a la fracción soluble (fracción citosólica). El sedimento se resuspendió en 0,25 ml del medio de homogeneización conteniendo 0,4% del detergente no iónico tritón, para extraer la enzima de las membranas. Esta fracción se mantuvo en hielo durante 30 minutos y después de añadir 0,25 ml del buffer sin detergente se centrifugó como se indicó anteriormente. Este sobrenadante contiene la PKC correspondiente a la fracción particulada. Ambas fracciones fueron purificadas parcialmente por columnas de DEAE-celulosa (3,5 x 0,5 cm) (DE 52 Watman). A tal fin se sembró la muestra y se lavó con 10 volúmenes de un buffer conteniendo  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM, EGTA 0,5 mM y HEPES 10 mM, pH 7,4 para eliminar el detergente e inhibidores de la actividad enzimática. La enzima fue eluída en un buffer conteniendo NaCl 120 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM, EGTA 0,5 mM y HEPES 10 mM, pH 7,4. Todo este procedimiento fue realizado a 4 °C.

### **9.2- Determinación de la actividad enzimática.**

Para medir la actividad de la enzima purificada de las fracciones subcelulares del hipocampo se determinó la capacidad de fosforilar la histona H1. Ambas fracciones, citosólica y particulada, fueron sometidas a un ensayo con  $^{32}$ P-ATP a 37°C durante 30 minutos y luego se detuvo la reacción con ácido tricloroacético (TCA) 5% con 10mM de ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ). El precipitado macromolecular se retuvo en papel Whatman GF/A. El papel se colocó en un vial con solución centelladora (Optiphase "Hisafe" PerkinElmer) y se determinó la radioactividad por centelleo líquido. La actividad correspondiente a otras quinasas se determinó en ausencia de fosfatidilserina y  $Ca^{2+}$  y en presencia de EGTA (0,5 mM). La actividad de PKC fue calculada como la diferencia entre la actividad total y la actividad de otras quinasas.

## 10- Western blot.

A fin de determinar los niveles proteicos de isoenzimas de PKC y NOS se realizaron ensayos de *western blot*. Para ello se disecaron los hipocampos, se sonicaron y en los homogenatos se determinó la cantidad de proteínas según el método de Bradford (BioRad) (Bradford, 1976). Las muestras fueron suplementadas con buffer 3X SDS (SDS 2%, glicerol 10% (v/v), Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, azul de bromofenol 0,2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 1% (v/v)) e iguales cantidades de proteínas fueron separadas por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10%. Luego se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa y los sitios de pegado inespecíficos fueron bloqueados con buffer de bloqueo (5% leche descremada, conteniendo Tween-20 0,1% en Tris-HCl 100 mM, pH 7.5 y NaCl 0,9%) por 1 hora. Para las isoformas de NOS, las proteínas se revelaron con un anticuerpo primario específico anti-nNOS (1:1000), anti-eNOS (1:500) o anti-iNOS (1:500) (Santa Cruz Biotechnology Inc.), por 18 horas. Para PKC se utilizó un anticuerpo primario específico anti-PKC de las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , o  $\zeta$  (dil 1:500-1:2000) (Santa Cruz Biotechnology Inc.).

La membrana fue después incubada con un segundo anticuerpo monoclonal anti-IgG de conejo o ratón (1:5000) conjugado con fosfatasa alcalina (SIGMA-ALDRICH) durante 1 hora. Las bandas se visualizaron usando azul nitro-tetrazolio (NBT) y 5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato (BCIP). Para distinguir la banda correspondiente a cada isoforma de NOS se la comparó con las bandas de los marcadores de peso molecular (BioRad) que se corrieron en otra calle. Se realizó una incubación con un anticuerpo anti- $\beta$ -actina dil 1:2000 (Santa Cruz Biotechnology Inc.), para comparar la cantidad de proteína sembrada.

## **11- Determinación del estado de óxido-reducción (REDOX).**

### **11.1- Producción de ROS.**

Se determinó la producción de ROS en hipocampo por la producción de 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF) a partir de diclorodihidrofluoresceína (DCFH) (SIGMA-ALDRICH). Dado que la DCFH puede ser oxidada por varios intermediarios reactivos, no puede ser utilizado para determinar la presencia de una especie específica. Para ello se disecaron los hipocampos, se pesaron y se homogeneizaron en buffer de Locke (NaCl 154 mM, KCl 5,6 mM, NaHCO<sub>3</sub> 3,6 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,3 mM, glucosa 5,6 mM, Hepes 5mM). La homogeneización se realizó manualmente subiendo y bajando el émbolo del homogeneizador unas 15 veces y enjuagando el vástago del homogeneizador entre cada muestra con agua destilada. Se llevó el homogenato a una concentración de 0,5 mg de hipocampo/ ml de buffer de Locke. Se preparó una solución de DCFH de 0,97 mg/ml en metanol. Se tomaron 200 µl de homogenato, se incubaron con 10 µl de DCFH (de la solución antes mencionada) y se llevaron a 2 ml con buffer de Locke y se dejaron reaccionar durante 15 minutos. Luego se incubó 15 minutos en presencia o ausencia de NMDA (10<sup>-4</sup> M). Finalmente se determinó la producción de DCF por lectura en un espectrofluorómetro a una  $\lambda$  de excitación de 488 nm y con una  $\lambda$  de emisión de 525 nm, a una sensibilidad de 1. Se realizó la interpolación de los datos con una curva standard que se realizó utilizando como patrón DCF de concentraciones de 5, 10, 20, 40 y 80 nM.

Para medir la producción de ROS en presencia de un inhibidor de nNOS, los homogenatos se preincubaron con 7-NI durante 10 minutos y luego se agregó el DCFH. Las mediciones se realizaron a los 30 minutos, 2 horas y 24 horas después de haberse colocado el mismo.

### **11.2- Medición de la actividad de la catalasa.**

Se siguió el procedimiento descrito en Beers (1952). El mismo se basa en la detección de la descomposición del peróxido de hidrógeno monitoreado espectrofotométricamente a 240 nm.

Para ello, los hipocampos fueron homogeneizados mecánicamente, según la relación 20 mg de tejido: 300  $\mu$ l de buffer fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 50 mM pH 7. Los homogenatos fueron sonicados y centrifugados a 14000 rpm durante 25 minutos a 4°C.

Se preparó una solución de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 0,036% en buffer fosfato de potasio 50mM, pH 7 y se determinó la absorbancia de esta solución a 240 nm. Se comprobó que la absorbancia de la solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  menos la absorbancia del buffer estuviera entre 0,550 y 0,520 unidades de absorbancia.

Para cada muestra, se colocó una alícuota de sobrenadante en una solución 0,036 % (w/w) de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en buffer y se registró el tiempo en el que la absorbancia disminuía en 0,05 unidades. A partir de este valor se calcularon las unidades enzimáticas de catalasa por mg de tejido.

Se prepararon los siguientes tubos:

- tubo 1: 2 ml de buffer fosfato de potasio + muestra (tubo blanco)
- tubo 2: 2 ml de la solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  + muestra
- tubo 3: 2 ml de la solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  + muestra (duplicado del tubo 2)

Se midió primero el tubo 1 (blanco) y se calcularon los límites superior (LS) e inferior (LI) como se describe a continuación:

$$\text{LS} = \text{absorbancia} + 0,450$$

$$\text{LI} = \text{LS} - 0,050$$

Luego se midió la absorbancia en el tubo 2, en el cual se colocó la muestra inmediatamente antes del momento previo a la medición. Se observó que la absorbancia fue disminuyendo y se registró el tiempo entre el límite superior y el inferior. El mismo procedimiento se realizó para el tubo 3, duplicado.

### **11.3- Determinación de la supeóxido dismutasa (SOD).**

Se siguió el procedimiento descrito en McCord (1969). La actividad de las SOD se mide como la inhibición de la tasa de reducción de citocromo c por el radical superóxido, el cual es producido enzimáticamente por la reacción de la xantina con el  $\text{O}_2$  catalizada por la enzima xantina oxidasa (XOD).

Brevemente, los hipocampos fueron sonicados en buffer  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  216 mM pH 7,8 y centrifugados a  $4^\circ\text{C}$  10 minutos a 3000 rpm. Se registró la tasa máxima de reducción de citocromo c monitoreando la absorbancia a 550 nm de la mezcla de reacción (buffer  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  216 mM pH 7,8, EDTA 10,7 mM, citocromo c 1,1 mM (SIGMA-ALDRICH) y xantina 0,108 mM (SIGMA-ALDRICH) con xantina oxidasa 1U/ml (SIGMA-ALDRICH). De la misma manera, se registró la tasa de reducción de citocromo c para cada muestra agregando una alícuota de sobrenadante.

Para cada muestra se calculó un porcentaje de inhibición de la reducción de citocromo, respecto a la reducción máxima, y a partir de éste se calcularon las unidades enzimáticas de SOD por mg de tejido.

#### **11.4- Determinación del glutatión.**

Se siguió un procedimiento adaptado del previamente descrito por Tietze (1968). La técnica se basa en la cuantificación espectrofotométrica del ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) formado en presencia de GSH a partir del ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) (SIGMA-ALDRICH).

Los hipocampos fueron sonicados en buffer  $\text{NaPO}_4$  100 mM pH 7,5 con EDTA 1 mM. Se colocó TCA 5% para precipitar proteínas y se centrifugó a  $4^\circ\text{C}$  10 minutos a 3700 rpm. Con una alícuota del sobrenadante se cuantificó glutatión total y de otra fracción glutatión oxidado (GSSG), incubándola 1 hora con 3-vinil piridina 1 M (SIGMA-ALDRICH) para atrapar el GSH. Paralelamente, se realizaron 2 curvas con GSSG (SIGMA-ALDRICH), una de las cuales fue incubada con 3-vinil piridina 1 M.

Las muestras y la curva fueron cargadas en una placa de ELISA donde luego se colocó la mezcla de reacción (DTNB 1 mM (SIGMA-ALDRICH), GR 200 U/ml (SIGMA-ALDRICH), NADPH 1 mM (Calbiochem) y el buffer  $\text{NaPO}_4$  100 mM pH 7,5 con EDTA 1 mM).

La absorbancia fue determinada con un lector de ELISA (BioRad) a 405 nm inmediatamente luego de agregar la mezcla de reacción (tiempo 0) y cada 2 minutos hasta los 10 minutos inclusive.

Los valores de las muestras fueron interpolados en la curva y la cantidad de GSH fue calculada a partir de la diferencia entre glutatión total y GSSG.

## 12- Obtención de linfocitos.

Los nódulos linfáticos (axilares, inguinales y mesentéricos) y bazos fueron removidos, disgregados a través de una malla de metal de 1 mm. Los glóbulos rojos y las células muertas fueron eliminados de la suspensión por centrifugación con Ficoll/Hypaque (densidad 1,084; SIGMA-ALDRICH). Luego de tres lavados con RPMI 1640, por centrifugación a 300 g, las células fueron resuspendidas en RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 50 µM de β-mercaptoetanol (Edgar y col., 2002). La viabilidad celular se estimó de acuerdo al criterio de exclusión de azul tripán.

## 13- Evaluación de la proliferación linfocitaria.

La proliferación fue determinada cultivando  $2 \times 10^5$  células por pocillo en un volumen final de 200 µl por triplicado, en placas de 96 pocillos. A tal fin, se añadieron 100 µl de células en concentración de  $2 \times 10^6$  células por ml. Se añadieron 100 µl de los mitógenos en medio RPMI. Las lectinas mitogénicas utilizadas fueron Concanavalina A (Con A; SIGMA-ALDRICH) (0,5, 1 and 2 µg/ml) como mitógeno selectivo de linfocitos T y lipopolisacárido (LPS; SIGMA-ALDRICH) (30 µg/ml) como mitógeno selectivo de linfocitos B. Debido al bien conocido perfil linfoideo, las suspensiones celulares provenientes de los nódulos linfáticos fueron utilizadas para evaluar la proliferación de células T y las provenientes de bazo para estudiar la respuesta de células B. En cultivos controles los mitógenos fueron reemplazados por 100 µl de medio de cultivo. Luego las células fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido un período de 18 horas, se le agregó a cada pocillo 1 µCi de <sup>3</sup>H-timidina (PerkinElmer) para determinar la proliferación celular. Luego de 48 horas, a 37°C en una atmósfera 5% de CO<sub>2</sub>, la fase macromolecular insoluble en ácido fue retenida en papeles de filtro de fibra de vidrio (GF/C, Whatman). Los mismos fueron colocados en solución centelladora (Optiphase "Hisafe" PerkinElmer) y la actividad fue calculada en desintegraciones por minuto (dpm) en un contador de centelleo líquido (Tri-Carb 2800 TR). La media de los triplicados fue determinada para cada concentración de mitógeno. Las células que fueron estimuladas

mitogénicamente mostraron una cinética de proliferación con un pico al tercer día de cultivo.

#### **14- Determinación de subpoblaciones linfocitarias T.**

El porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> fueron determinados en suspensiones celulares de nódulos linfáticos por citometría de flujo. A tal fin, alícuotas de las suspensiones celulares fueron incubadas con anticuerpos monoclonales anti-CD4-de ratón conjugado con fluoresceína (FITC) o con anti-CD8-de ratón conjugado con ficoeritrina (PE). Las diferentes subpoblaciones de linfocitos fueron identificadas utilizando un citómetro de flujo (Becton Dickinson) con amplificación logarítmica y mediante el análisis con el software WinMDI 2.8. De esta manera se determinó el porcentaje de linfocitos que expresaron los marcadores CD4 y CD8, las células doble positivas y las doble negativas. Se realizaron controles de isotipo (IgG1-FITC/IgG2a-PE) en cada ensayo para determinar la marcación no específica.

#### **15- Medición de los niveles de citoquinas Th1 y Th2.**

Células linfoides ( $1 \times 10^6$ /ml) fueron estimuladas con Con A (1 µg/ml) por 24 horas a 37°C en una atmósfera 5% de CO<sub>2</sub> en placas de 24 pocillos en un volumen final de 1 ml. Después de la incubación, los sobrenadantes del cultivo celular fueron recolectados y guardados a -80°C.

Mediante la técnica de enzimo inmuno ensayo (ELISA kits, Amersham Biosciences) fueron determinadas las concentraciones de las siguientes citoquinas: IFN- $\gamma$ , IL-2 (citoquinas tipo Th1), IL-4, IL-10 e IL-6 (citoquinas tipo Th2).

## 16- Producción de anticuerpos frente a un desafío antigénico.

### 16.1- Esquema de inmunización.

Se utilizaron glóbulos rojos de carnero (GRc) como inmunógenos para evaluar la respuesta humoral T-dependiente y lipopolisacáridos bacterianos (LPS) para determinar la respuesta humoral T-independiente. Los animales fueron inmunizados con 200  $\mu$ l de una solución de glóbulos rojos de carnero (GRc) al 4% v/v en PBS. A tal fin se tomó un volumen de una solución de sangre estabilizada de carnero (Laboratorio Alfredo C. Gutierrez), se lavó tres veces con PBS por centrifugación durante 10 minutos a 300g y luego se tomó el volumen necesario del residuo (pellet) y se llevó a la concentración deseada. El esquema utilizado fue el siguiente (figura 25 A y B):

Día 0 : primera inyección intraperitoneal (i.p.).

Día 10: toma de muestra de sangre, por punción retro-orbital con capilar.

Día 11: segunda inyección intraperitoneal (refuerzo).

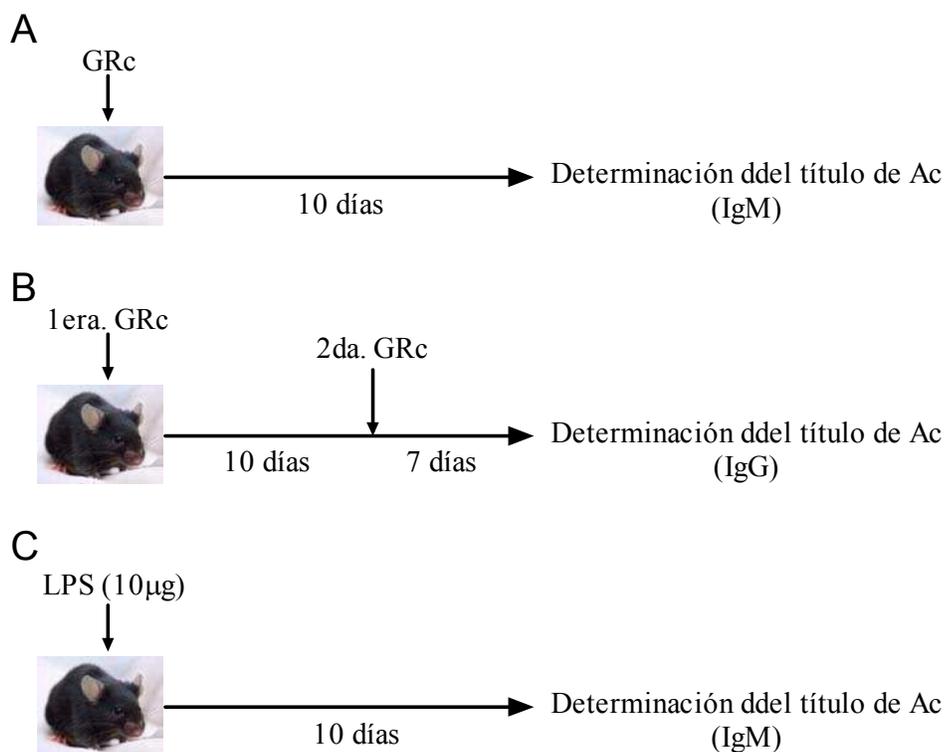
Día 18: toma de muestra de sangre.

Además ratones BALB/c y C57BL/6, controles y CMS fueron inmunizados con 200  $\mu$ l de una solución de LPS (10 $\mu$ g por ratón) (figura 25 C).

Día 0 : inyección intraperitoneal.

Día 10: toma de muestra de sangre.

Ratones inyectados con vehículo fueron usados como control.



**Figura 25.** Esquema de inmunización para evaluar respuesta primaria (A y C) y secundaria (B).

### 16.2- Determinación del título de anticuerpos anti-GRC y anti-LPS.

Se obtuvo suero a partir de sangre extraída por punción retroorbital y se mantuvo a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del ensayo. Se realizó un ELISA para determinar Ac específicos contra GRC y contra LPS.

Para la realización del ensayo, placas de ELISA (Greiner Bi-one) de 96 pocillos fueron sensibilizadas con  $7,5\ \mu\text{g}$  de proteínas de GRC o con  $1\ \mu\text{g}$  de LPS por pocillo, disueltos en  $50\ \mu\text{l}$  de buffer bicarbonato de sodio ( $\text{CO}_3\text{NA}_2$ ) 100 mM, pH 11-12. A fin de obtener membranas de GRC se tomó un volumen de sangre estabilizada de carnero (Laboratorio Alfredo C. Gutiérrez) y se lavaron tres veces con solución fisiológica, por centrifugación durante 10 minutos a 300g y se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  para romper las células. Posteriormente se descongelaron y se resuspendieron en agua destilada, se centrifugaron durante 30 minutos a 12000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ . Luego se realizaron tres lavados con buffer  $\text{CO}_3\text{NA}_2$  100 mM, pH 11-12 y se centrifugaron

durante 30 minutos a 12000 rpm a 4°C. Las proteínas se cuantificaron mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) y se guardaron a -80°C hasta el momento de ser utilizadas.

Las placas se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizaron tres lavados con PBS y se incubaron con PBS-albúmina al 2,5% a 37°C durante 1 hora, para bloquear sitios inespecíficos. Luego se realizaron tres lavados con PBS y se incubaron con 50 µl de suero anti-GRc o anti-LPS diluídos en PBS-albúmina al 1% durante 2 horas a 37°C. Posteriormente se realizaron cuatro lavados con PBS-Tween 0,05%, se incubaron durante 1 hora a 37°C con un anticuerpo de cabra conjugado con fosfatasa alcalina anti-IgG de ratón (SIGMA-ALDRICH) o anti-IgM de ratón (SIGMA-ALDRICH). Se lavaron cuatro veces con PBS-Tween 0,05%, se incubaron con paranitrofenilfosfato (PNPP, SIGMA-ALDRICH) 1 mg/ml en 100 µl de buffer CO<sub>3</sub>NA<sub>2</sub> 100 mM, pH 11-12 durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. La reacción fue detenida con 100 µl de NaOH 3N. La lectura se realizó a 405 nm en un lector para placas de ELISA (BioRad 3550).

El título del anticuerpo se estimó como la máxima dilución del suero capaz de dar una reacción positiva que es estadísticamente diferente del valor control (promedio de sueros provenientes de animales sin inmunizar).

## **17- Determinación de niveles de corticosterona.**

Para evitar variaciones en los niveles plasmáticos de corticosterona debido a los ritmos circadianos, los animales fueron sangrados siempre a las 12 PM del día del sacrificio. La sangre fue recolectada en un tubo que contenía 0,25M EDTA a 4°C. El plasma fue separado en una centrífuga refrigerada y guardado a -80°C hasta el momento del ensayo. Los niveles de corticosterona fueron determinados por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con un protocolo ligeramente modificado del usado previamente en ratas por Sargent (1985).

## **18- Determinación de niveles de catecolaminas.**

Se determinaron los niveles de catecolaminas en bazo por el método fluorimétrico de Laverty y Taylor (1968). Se homogeneizaron los bazos en una solución de sulfito alcalino 12,5 %, EDTA 10% y ácido perclórico 0,4N. Se incubaron 24 horas a 4°C y se centrifugaron a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes fueron llevados a pH 8,2 y colocados en columnas de alúmina pre-lavadas. Se eluyeron con ácido perclórico. El eluato fue oxidado con iodo en medio alcalino. Se determinó la fluorescencia a 375 nm en un espectrofluorómetro (JAZCO FP 770), con una longitud de excitación de 325 nm.

## **19- Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).**

### **19.1- Extracción del ácido ribonucleico (ARN).**

Los hipocampos fueron sonicados en 0,5 ml de Trizol Reagent (Invitrogen) de acuerdo con instrucciones del fabricante para la extracción de ARN. Se agregaron 0,1 ml de cloroformo, se agitó por 15 s y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó a 4°C 15 minutos a 12000 g obteniéndose una fase orgánica, una interfase y una fase acuosa.

La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo, dónde se la incubó por 10 minutos con 0,25 ml de isopropanol y se centrifugó a 4°C 10 minutos a 12000 g, obteniéndose un pellet de ARN que se lavó y guardó a -70°C con 1 ml de etanol 75% hasta su utilización.

### **19.2- Evaluación de los niveles de ARNm por RT-PCR.**

El pellet de ARN en etanol se centrifugó a 4°C 5 minutos a 7500 g. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar 10 minutos. El ARN se resuspendió en 15 µl de agua estéril y se incubó en un baño a 60°C durante 10 minutos. Se cuantificó el ARN por absorbancia a 260 nm con un Nano Drop (Eppendorf). Para descartar contaminación con ADN, la muestra de ARN fue tratada con DNAsa (Kit de Invitrogen). A cada tubo se le agregó agua estéril, 4µl de buffer 10X, la muestra de ARN y la DNAsa (1µg de

ARN por cada 1 µg de DNAsa); en un volumen final de 40 µl. Esta mezcla se realizó en hielo. Luego se incubó a 37°C durante 30 minutos y se agregó 4 µl de *stop solution*. Se incubó a 65°C durante 10 minutos y el ARN fue cuantificado nuevamente en el Nano Drop. Se tomaron alícuotas con 4 µg de ARN y se llevaron a 10,2 µl con agua estéril.

Para la obtención del cDNA se utilizó el kit MML-V (Invitrogen). A cada tubo se agregaron *random primers* (Invitrogen) y dNTPs (Invitrogen). Se incubó a 65°C por 5 minutos. Luego se agregó buffer *first strand* (Invitrogen), DTT (Invitrogen) y RNAsa-OUT (Invitrogen). Se incubó 2 minutos a 37°C en un termo-ciclador (Biometra, T-Personal) y se agregó 1 µl de MMLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Finalmente se incubó en el ciclador 10 minutos a 25°C, 50 minutos a 37°C y 15 minutos a 70°C, obteniéndose el cDNA.

Se realizó la amplificación del cDNA con GoTaq mix (Promega) utilizando *primers* específicos para NT3, NGF, BDNF o β-actina realizando ciclos de 45 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C en el ciclador. El producto fue corrido electroforéticamente junto con marcadores de peso molecular de cDNA (Invitrogen) en geles de agarosa con bromuro de etidio (SIGMA-ALDRICH). Las bandas se revelaron con luz UV (UVP), y su fotografía fue analizada con el software Image J 1.42.

Los valores de densidad óptica obtenidos para BDNF, NT3 y NGF mediante este programa fueron relativizados con los valores de β-actina.

A continuación se muestra la secuencia de los *primers* utilizados y el número de ciclos realizados:

	SENTIDO (5' - 3')	ANTISENTIDO (5' - 3')	N° de ciclos
<b>BDNF</b>	GGTTCGAGAGGTCTGACGAC	GCTCCAAAGGCAACTTGACTG	34
<b>NT3</b>	GATCCAGGCGGATATCTTGA	AGCGTCTCTGTTGCCGTAGT	40
<b>NGF</b>	CATGGGGGAGTTCTCAGTGT	GCACCCACTCTCAAGAGGAT	38
<b>β-actina</b>	CAACTTGATGTATGAAGGCTTGGT	ACTTTTATTGGTCTCAAGTCAGTGTACAG	30

## 20- Análisis estadístico.

Para realizar las pruebas estadísticas que se mencionan a continuación se utilizaron los siguientes programas estadísticos: InStat, InfoStat y GraphPad Prims 5.00.

Para verificar la distribución normal de los datos se utilizó la prueba de Shapiro-Wilks (modificado). En algunos casos se procedió a la transformación matemática de los datos para ajustarlos a una distribución normal.

Para determinar el nivel de significación entre dos grupos de datos con distribución normal se utilizó la prueba  $t$  de Student para valores no apareados ( $t$ ).

Las diferencias entre tres o más grupos de datos fueron evaluadas por análisis de varianza (ANOVA) de un factor seguido por el método de Bonferroni ( $t$ ) o de dos factores, seguido de una comparación múltiple utilizando el análisis de efectos simples ( $F$ ) o el método de Bonferroni ( $t$ ) dependiendo si hay o no interacción entre los factores, respectivamente.

Los resultados de la prueba de habituación fueron analizados por ANOVA de dos factores con mediciones repetidas.

En aquellos casos en que no fue posible ajustar los datos a una distribución normal, se utilizaron las pruebas no paramétricas de Friedman ( $T^2$ ) para comparar 3 o más grupos y de Mann-Whitney ( $U$ ) para comparar dos grupos.

Los datos fueron expresados como los valores medios  $\pm$  error estándar de la media ( $X \pm ES$ ). Las diferencias entre las medias se consideraron significativas cuando  $p < 0,05$ .

Para evaluar la correlación entre dos variables se utilizó la prueba de Pearson ( $r$ ).

## **IV. RESULTADOS**

## 1- Efectos del estrés crónico sobre el hipocampo.

### 1.1- Efectos del estrés crónico sobre el aprendizaje y la memoria.

A fin de investigar el efecto del estrés crónico sobre la capacidad de aprendizaje y memoria en las cepas de ratones BALB/c y C57BL/6, se realizaron diferentes test conductuales para evaluar distintos tipos de memorias dependientes del hipocampo.

#### 1.1.1- Efecto del estrés crónico en una prueba de habituación.

Con el fin de evaluar la memoria no asociativa, se utilizó la prueba de campo abierto para determinar la capacidad de habituarse a un ambiente novedoso. Ratones BALB/c y C57BL/6, control y CMS fueron colocados en el campo abierto durante 5 minutos en una primera fase y fueron expuestos nuevamente al mismo ambiente 24 horas después. Se evaluó la actividad exploratoria mediante el registro del número de líneas cruzadas, el número de exploraciones verticales (*rearing*) y el tiempo que el animal se quedó quieto.

En la primera etapa los ratones BALB/c CMS mostraron un aumento de la actividad locomotora horizontal ( $t = 3,56$ ;  $p < 0,01$ ) y vertical ( $t = 3,01$ ;  $p < 0,05$ ) y una disminución en el tiempo que se queda quieto ( $t = 4,52$ ;  $p < 0,01$ ) respecto a los BALB/c controles (figura 26 A, B y C respectivamente).

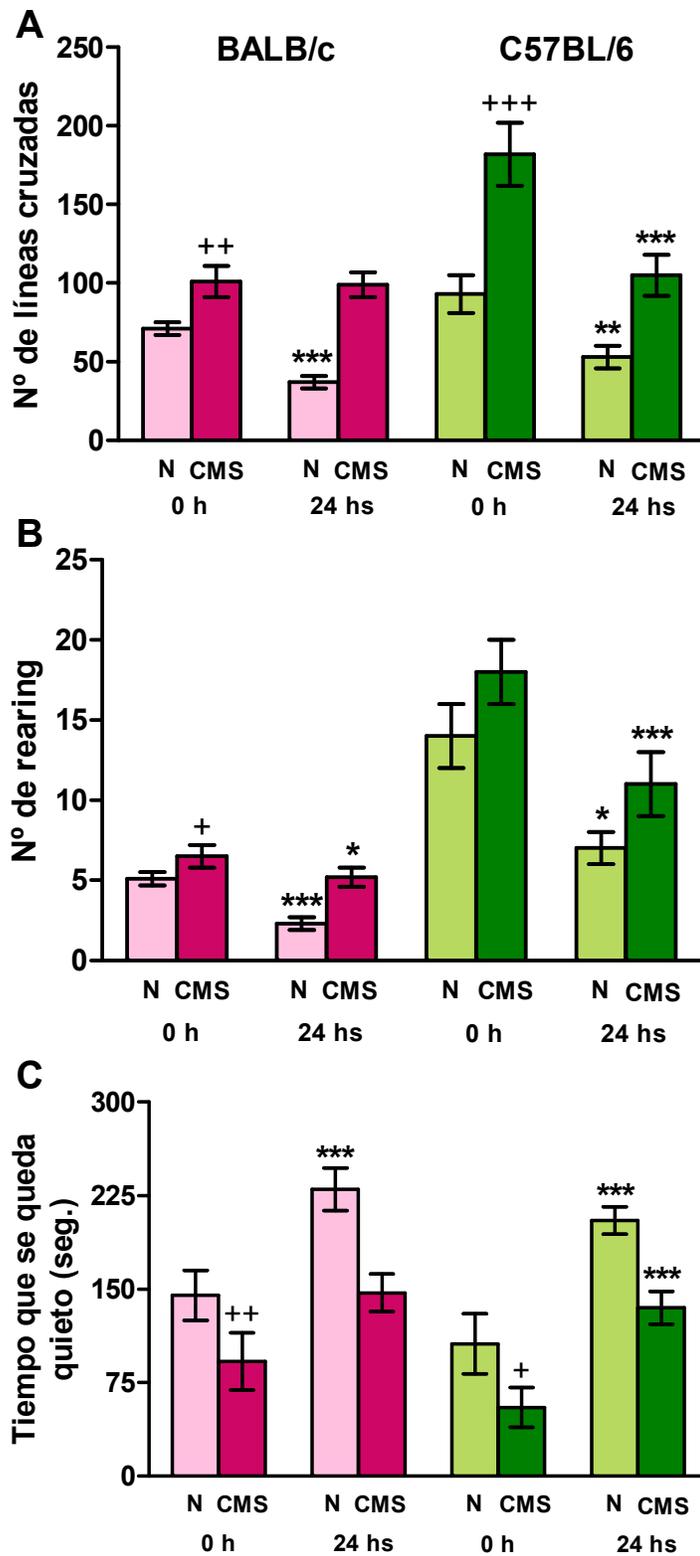
Los animales C57BL/6 CMS presentaron un aumento en la actividad locomotora horizontal ( $t = 4,33$ ;  $p < 0,001$ ) sin cambios en la actividad locomotora vertical ( $t = 1,51$ ; NS) y una disminución en el tiempo que se queda quieto ( $t = 2,99$ ;  $p < 0,05$ ) en la primera exposición al campo abierto con respecto a los C57BL/6 controles (figura 26 A, B y C respectivamente).

El análisis estadístico utilizando la prueba de ANOVA para mediciones repetidas, indicó que los animales BALB/c controles presentaron una disminución significativa del 51% en el número de líneas cruzadas ( $t = 5,92$ ;  $p < 0,001$ ; figura 26 A) y del 62% en el número de *rearing* ( $t = 6,12$ ;  $p < 0,001$ ; figura 26 B), y un aumento en el tiempo que se quedaron quietos del 62% ( $t = 5,90$ ;  $p < 0,001$ ; figura 26 C) en la fase de testeo (24 horas) respecto de la primera exposición (0 hora). Estos resultados

indican que los ratones BALB/c controles fueron capaces de habituarse al ambiente novedoso.

Sin embargo, los ratones BALB/c expuestos al CMS, mostraron una menor capacidad de habituación. No se observaron cambios significativos en el número de líneas cruzadas ( $t = 1,59$ ; NS; figura 26 A) y en el tiempo que se quedaron quietos ( $t = 2,04$ ; NS; figura 26 C) en el testeo respecto de la primera exposición. Si bien se observó una disminución significativa en los *rearing* a las 24 horas esta diferencia fue menor que la del grupo control ( $t = 2,70$ ;  $p < 0,01$ ; figura 26 B).

Por otra parte, los ratones C57BL/6, control y CMS, no mostraron diferencias en su capacidad de habituación. Tal como se muestra en la figura 26, pudo observarse una disminución significativa en el número de líneas cruzadas del 57% ( $t = 3,19$ ;  $p < 0,01$ ) para los controles y del 58% ( $t = 5,78$ ;  $p < 0,001$ ) para los CMS (figura 26 A), una disminución en el número de exploraciones verticales del 54% ( $t = 2,97$ ;  $p < 0,05$ ) en controles y de 60% ( $t = 4,56$ ;  $p < 0,001$ ) en los CMS (figura 26 B) y un aumento en el tiempo que se quedó quieto de 94% ( $t = 4,89$ ;  $p < 0,001$ ) y 144% ( $t = 5,34$ ;  $p < 0,001$ ) para los ratones controles y CMS respectivamente (figura 26 C) en el testeo con respecto a la primera etapa.



**Figura 26.** Prueba de habituación. Se grafica el número de líneas cruzadas (A), el número de *rearing* (B) y el tiempo que se queda quieto (C); para animales BALB/c (barras rosas) y C57BL/6 (barras verdes) en los grupos control (N) y CMS, para la primera exposición (0 h) y el testeo (24 hs). Los resultados expresan la media  $\pm$  ES de las determinaciones realizadas con doce animales de cada grupo. + $p < 0,05$ ; ++  $p < 0,01$  y +++ $p < 0,001$  respecto del correspondiente grupo control; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$  respecto de la primera exposición.

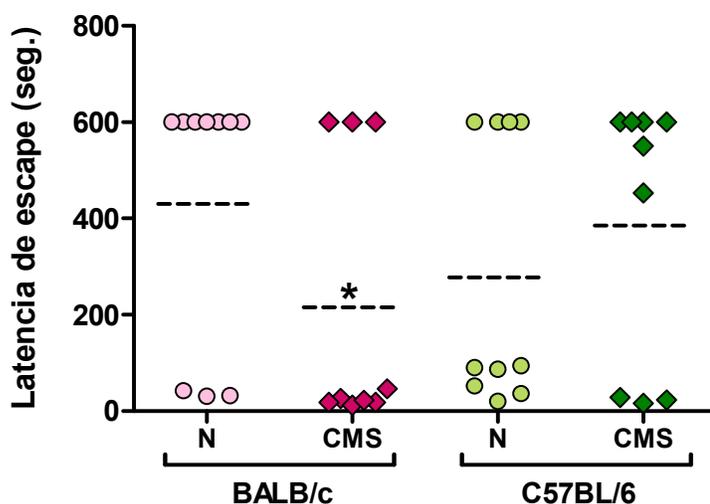
### 1.1.2- Efecto del estrés crónico en una prueba de evitación condicionada por shock eléctrico plantal.

Con el fin de evaluar si el estrés crónico afecta la memoria asociativa, se realizó la prueba de evitación condicionada por shock eléctrico plantal. Se registró el tiempo que tardó en entrar a la cámara oscura, en la fase de entrenamiento y en la fase de testeo.

En la fase de entrenamiento, ambos grupos (control y CMS), de las cepas BALB/c y C57BL/6, no mostraron diferencias significativas en la latencia de escape (entre 10 y 15 segundos) (datos no mostrados).

Sin embargo, en la fase de testeo, el porcentaje de ratones BALB/c CMS que mostraron la máxima latencia de escape hacia la cámara oscura fue menor que en los animales BALB/c control (CMS: 20%; control: 77%). El análisis estadístico realizado por la prueba no paramétrica de Mann-Whitney indicó que la latencia de escape en los ratones CMS fue significativamente menor que la observada para los controles ( $U = 21$ ;  $p < 0,05$ ) (figura 27).

Por el contrario, el porcentaje de ratones C57BL/6 CMS que mostraron una menor latencia de escape hacia la cámara oscura no fue significativamente diferente del grupo C57BL/6 control (CMS: 66,7%; control: 40%), siendo la latencia de escape similar en ambos grupos ( $U = 44$ ; NS) (figura 27).



**Figura 27.** Prueba de evitación condicionada por shock eléctrico plantal. Se grafica la latencia de escape en segundos para los ratones BALB/c (símbolos rosas) y C57BL/6 (símbolos verdes), control (N) (círculo) y estresado (CMS) (rombo), 24 horas después del entrenamiento. Cada punto representa un animal. La línea punteada indica el valor medio de cada grupo. \* $p < 0,05$  respecto del correspondiente control.

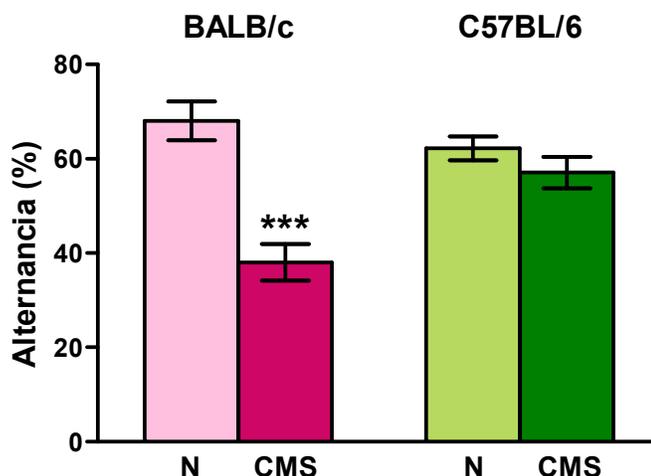
### 1.1.3- Efecto del estrés crónico en el laberinto en forma de Y.

Con el objetivo de evaluar si el estrés crónico produce cambios en la memoria espacial, se analizó el comportamiento espontáneo de alternancia en un laberinto en forma de Y.

En la figura 28 se muestran los porcentajes de alternancia espontánea obtenidos para ratones control y CMS, de ambas cepas.

La prueba de ANOVA de dos factores reveló que los ratones BALB/c CMS tuvieron una disminución significativa de la alternancia respecto a sus controles ( $F(1,33) = 35,25; p < 0,00001$ ).

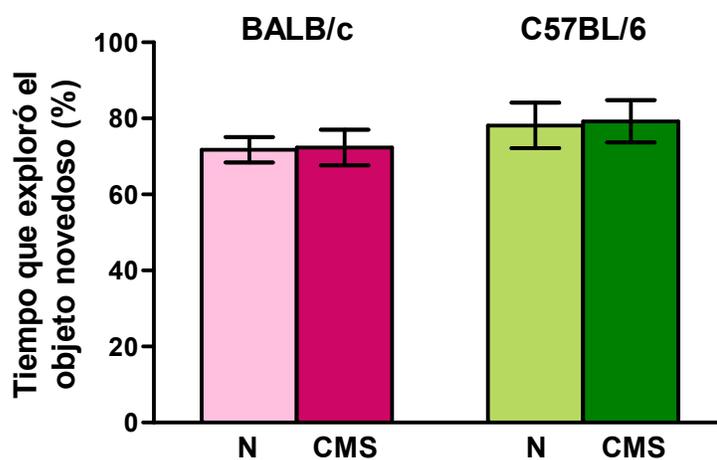
En los ratones C57BL/6 no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje espontáneo de alternancia entre el grupo estresado y el control ( $F(1,33) = 0,97; NS$ ).



**Figura 28.** Comportamiento de los ratones en el laberinto en forma de Y. El gráfico muestra el comportamiento espontáneo de alternancia en porcentaje en ratones BALB/c (barras rosas) y C57BL/6 (barras verdes) en los grupos control (N) y CMS. Los resultados expresan la media  $\pm$  ES de ocho animales de cada grupo. \*\*\* $p < 0,001$  respecto al correspondiente control.

#### 1.1.4- Efecto del estrés crónico en una prueba de reconocimiento de objetos.

Para evaluar el efecto del estrés crónico sobre la memoria de reconocimiento de objetos en ambas cepas de ratón, se realizó la prueba de reconocimiento de objetos. En esta prueba, no se encontraron diferencias significativas entre los animales estresados y controles, en ambas cepas de ratón (BALB/c y C57BL/6) ya que ambos grupos exploraron el objeto novedoso aproximadamente el mismo porcentaje de tiempo (figura 29).



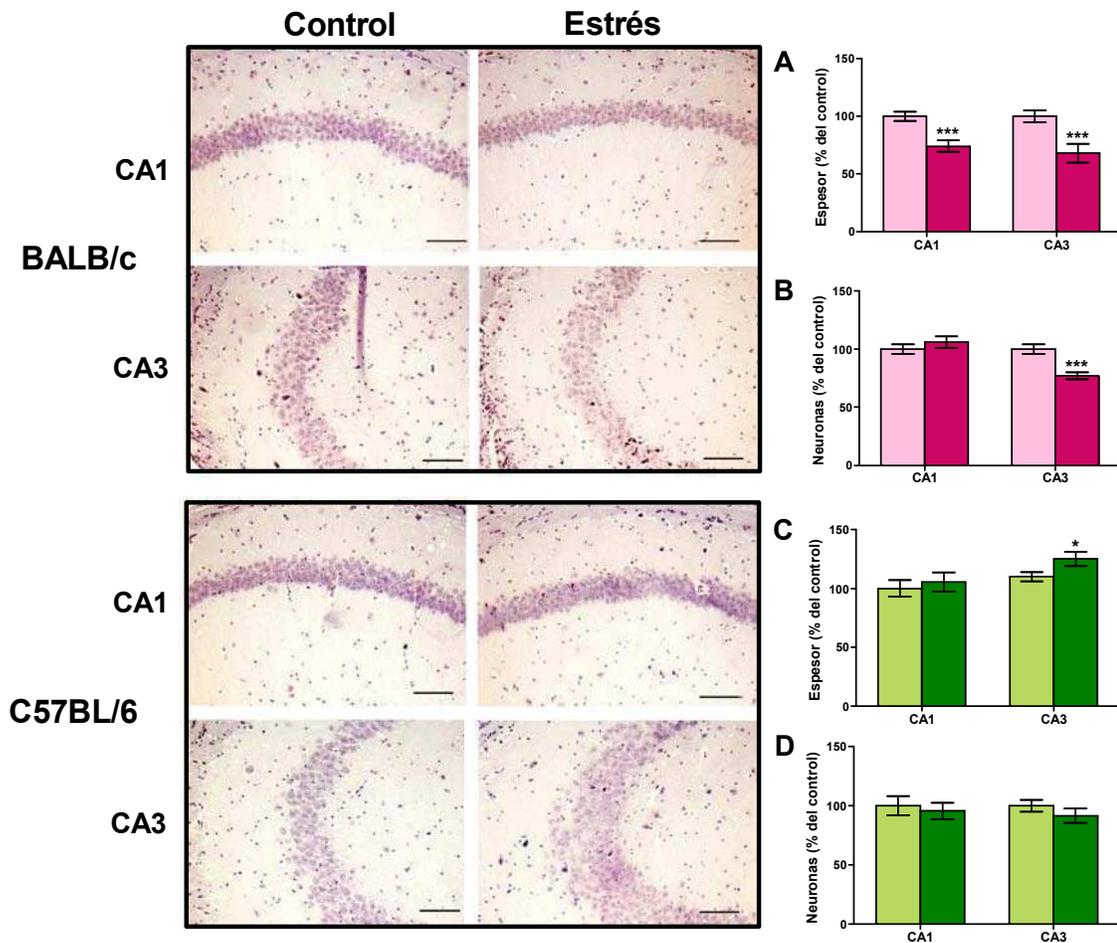
**Figura 29.** Comportamiento de los ratones en la prueba de reconocimiento de objetos. El gráfico muestra el promedio del porcentaje de tiempo que los ratones exploraron el objeto novedoso, en ratones BALB/c (barras rosas) y C57BL/6 (barras verdes) en los grupos control (N) y CMS. Los resultados expresan la media  $\pm$  ES de ocho animales de cada grupo.

## 1.2- Efectos del estrés crónico sobre la morfología del hipocampo.

Para evaluar si el estrés provoca cambios estructurales en el hipocampo se realizó una técnica de histoquímica que utiliza como colorante hematoxilina-eosina, el cual tiñe los núcleos de color violeta y el citoplasma de color rosado. De esta manera se pueden apreciar al microscopio los somas neuronales como se observa en la figura 30. Se determinó el espesor y la densidad neuronal en las regiones CA1, CA3 y el giro dentado del hipocampo.

En los ratones BALB/c estresados (CMS), se observaron modificaciones histológicas evidentes en las regiones CA1 y CA3 (figura 30 A y B), no encontrándose cambios en el giro dentado (datos no mostrados). El ANOVA de dos factores reveló que el estrés indujo una disminución significativa en el espesor de las regiones CA1 ( $F(1,47) = 16,33; p < 0,001$ ) y CA3 ( $F(1,45) = 21,55; p < 0,001$ ). La densidad neuronal sólo muestra diferencias significativas en la zona CA3 ( $F(1,45) = 32,55; p < 0,00001$ ).

Por otra parte, en los ratones C57BL/6 CMS no se encontraron estas alteraciones estructurales (figura 30 C y D). Se observó un aumento significativo en el espesor de la zona CA3 en los CMS respecto a los controles ( $F(1,45) = 9,96; p < 0,05$ ). En estos animales no se evidenciaron cambios respecto al espesor en la zona CA1 del hipocampo ni en el número de neuronas de ambas regiones. Tampoco se observaron cambios estructurales en el giro dentado (datos no mostrados).

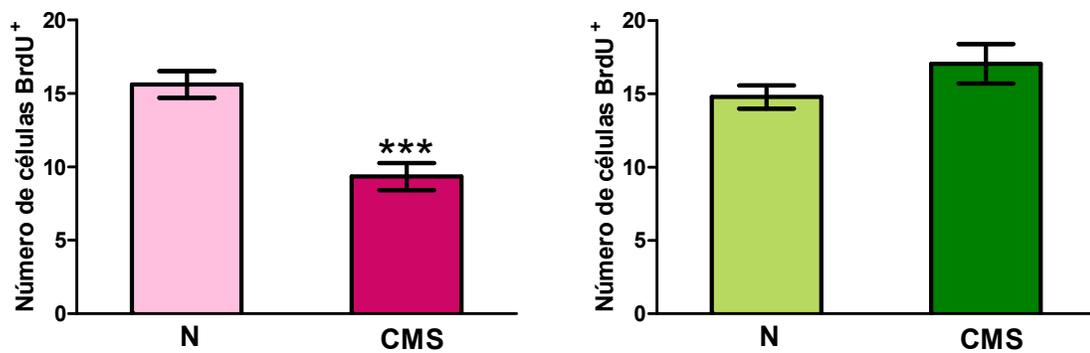
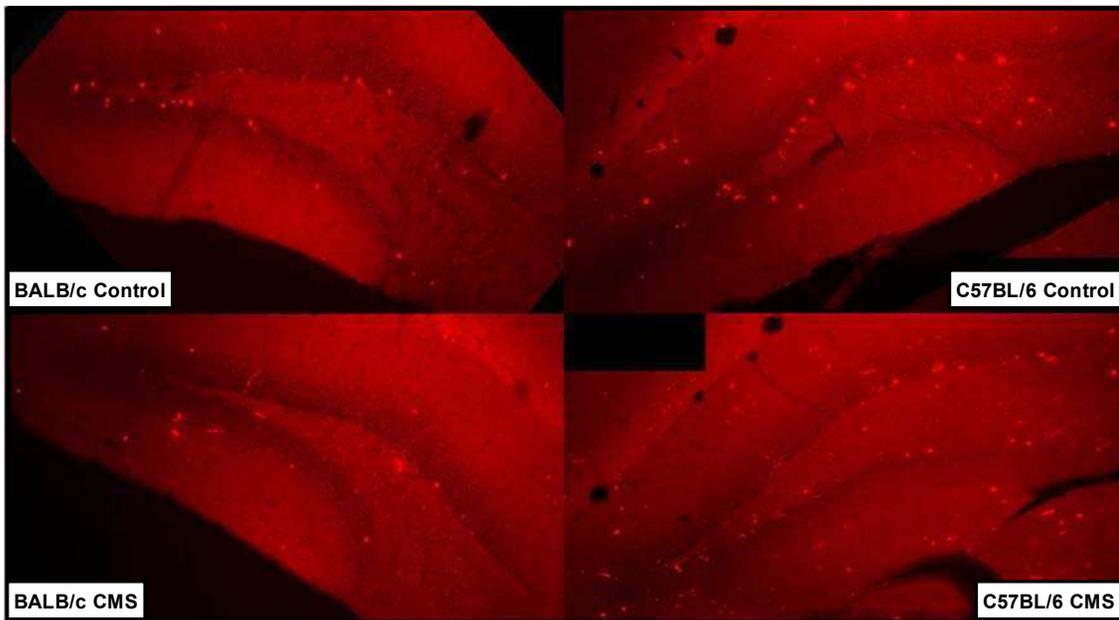


**Figura 30.** Histología del hipocampo. La figura muestra microfotografías representativas de secciones coronales las regiones CA1 y CA3 del hipocampo de ratones BALB/c (panel de arriba) y C57BL/6 (panel de abajo) en los grupos control y estresados. Barra: 100  $\mu$ m. La estructura del hipocampo fue evaluada en ratones BALB/c (barras rosas) y C57BL/6 (barras verdes), en los grupos control (barras claras) y CMS (barras oscuras). Los gráficos A y B muestran el espesor y el número de neuronas de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo en ratones BALB/c respectivamente. Los gráficos C y D muestran el espesor y el número de neuronas en ambas regiones del hipocampo en ratones C57BL/6 respectivamente. El espesor y el número de neuronas se representan como el porcentaje respecto del control. Los resultados expresan la media  $\pm$  ES de cinco animales de cada grupo. \* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,001$  con respecto a su control.

### **1.3- Efectos del estrés crónico sobre la neurogénesis en ratones adultos.**

Con el fin de evaluar el efecto del estrés crónico sobre la generación de neuronas, los ratones fueron inyectados con 5-bromo-2'-deoxiuridina bromo (BrdU) realizándose posteriormente la técnica de inmunohistoquímica en cortes de cerebros, utilizando un anticuerpo anti-BrdU, tal como se detalla en materiales y métodos. Se cuantificaron el número de células BrdU positivas en ratones CMS y controles tanto en BALB/c como en C57BL/6 (figura 31).

El ANOVA de dos factores indicó que los ratones BALB/c CMS presentaron una disminución significativa en el número de células BrdU positivas respecto de sus controles ( $F(1,17) = 23,69; p < 0,001$ ). Estas diferencias no fueron observadas entre los grupos control y CMS de los animales C57BL/6 ( $F(1,17) = 1,91; NS$ ).

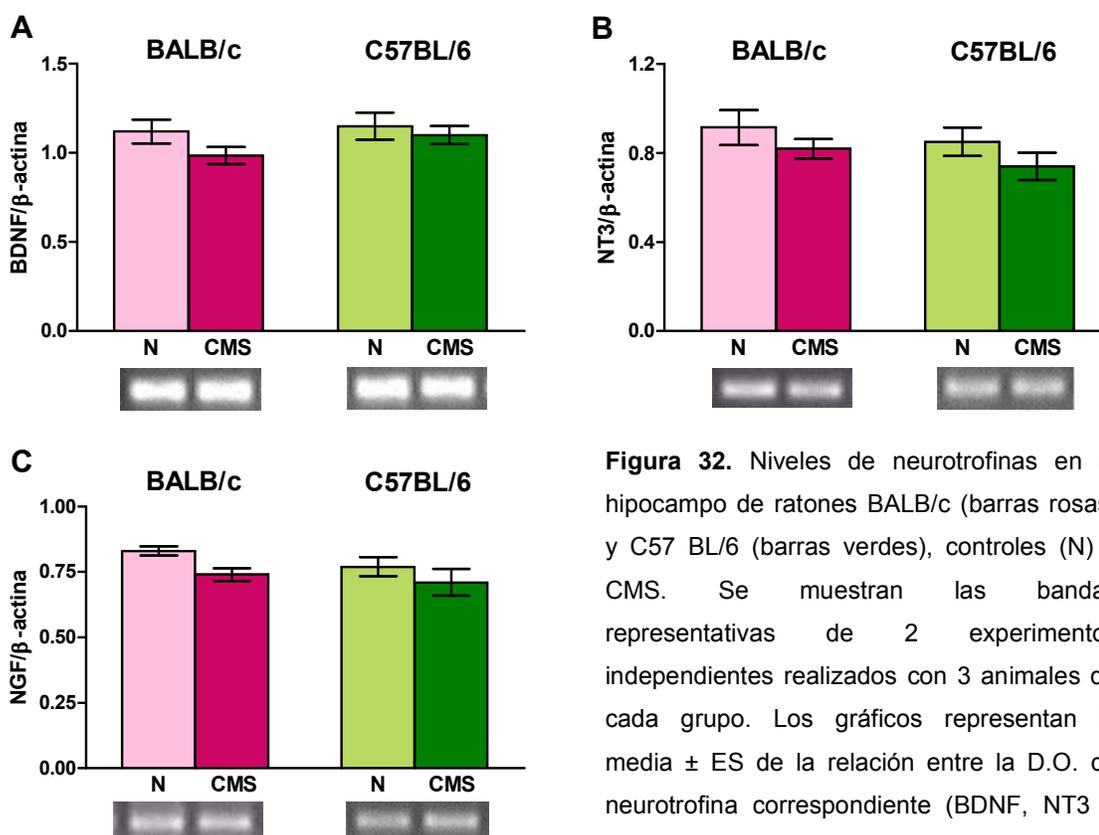


**Figura 31.** Fotografías representativas del giro dentado del hipocampo de ratones BALB/c (paneles izquierdos) y C57BL/6 (paneles derechos), control (paneles de arriba) y CMS (paneles de abajo). Los puntos más brillantes indican las células BrdU positivas. Los gráficos representan el número de células BrdU positivas para ratones BALB/c (barras rosas) y C57BL/6 (barras verdes), controles (N) y CMS. Los resultados expresan la media  $\pm$  ES de ocho cortes de diferentes partes del hipocampo, de al menos cuatro animales de cada grupo. \*\*\* $p < 0,001$  respecto a su control.

## 1.4- Determinación de los niveles de ARNm de neurotrofinas en hipocampo.

Para estudiar el efecto del estrés crónico sobre los niveles de ARNm de neurotrofinas (BDNF, NT3 y NGF) en el hipocampo, se cuantificaron los mismos mediante la técnica de RT-PCR en ratones BALB/c y C57BL/6.

Como puede observarse en la figura 32, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de ARNm de BDNF (panel A), NT3 (panel B) y NGF (panel C) entre los ratones controles y estresados en ninguna de las cepas estudiadas [ANOVA de 2 factores, BALB/c (BDNF:  $t = 1,57$ ; NS, NT3:  $t = 1,06$ ; NS y NGF:  $t = 1,83$ ; NS) y C57BL/6 (BDNF:  $t = 0,59$ ; NS, NT3:  $t = 1,18$ ; NS y NGF:  $t = 1,22$ ; NS)].



**Figura 32.** Niveles de neurotrofinas en el hipocampo de ratones BALB/c (barras rosas) y C57 BL/6 (barras verdes), controles (N) y CMS. Se muestran las bandas representativas de 2 experimentos independientes realizados con 3 animales de cada grupo. Los gráficos representan la media  $\pm$  ES de la relación entre la D.O. de neurotrofina correspondiente (BDNF, NT3 o NGF) sobre  $\beta$ -actina.

## **1.5- Efectos del estrés crónico sobre la actividad y los niveles proteicos de enzimas.**

Se decidió evaluar el efecto del estrés crónico sobre la actividad y los niveles proteicos de las enzimas, óxido nítrico sintasa (NOS) y proteína quinasa C (PKC), y sus isoformas, involucradas en los procesos de aprendizaje y memoria.

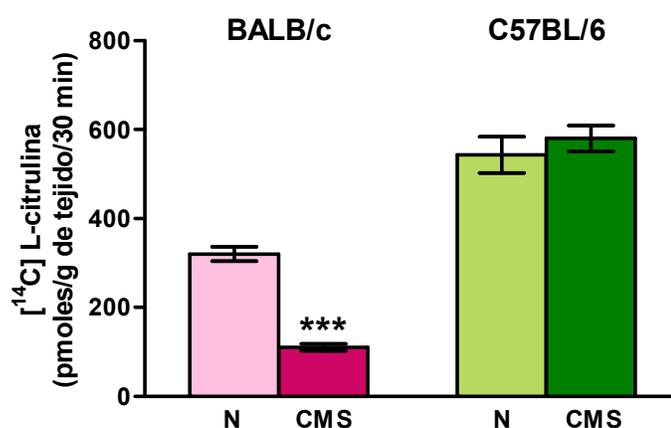
### **1.5.1- Efectos del estrés crónico sobre la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) en hipocampo de ratones BALB/c y C57BL/6.**

Para determinar si en los ratones estresados crónicamente (CMS) existen cambios en los niveles de la NOS, se evaluó la actividad de la misma por un método bioquímico en el cual se midió como producto final la producción de [ $^{14}\text{C}$ ] L-citrulina. En la figura 33 se grafica la producción de [ $^{14}\text{C}$ ] L-citrulina en pmoles formados en 30 minutos de reacción por gramo de tejido en hipocampos de ratones BALB/c y C57BL/6, controles (N) y estresados (CMS). Se observa que los ratones BALB/c estresados mostraron una disminución significativa de la actividad de NOS total con respecto a los ratones controles (ANOVA de dos factores,  $F(1,29) = 25,01$ ;  $p < 0,0001$ ). Por el contrario, los animales C57BL/6 estresados no presentaron diferencias significativas respecto de la actividad de NOS total comparado con su controles ( $F(1,29) = 2,03$ ; NS).

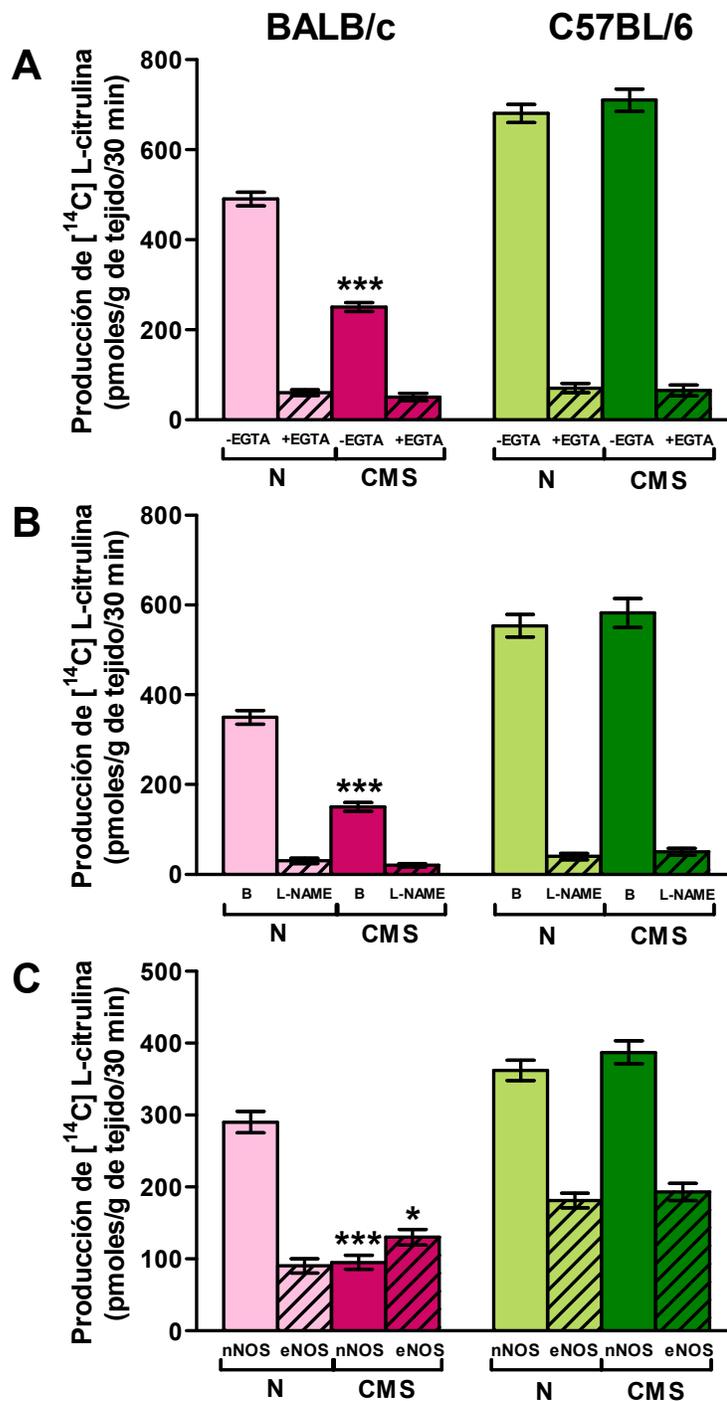
En presencia de EGTA, no se encontraron diferencias significativas, es decir que el estrés crónico no aumentaría la actividad de iNOS ni en ratones BALB/c ni en C57BL/6 (figura 34 A). Además si se toma en cuenta que la iNOS produce NO en un rango 1000 veces superior a la NOS constitutiva (nNOS y eNOS), puede apreciarse en la figura 34 A, que la actividad de iNOS es prácticamente despreciable tanto en ratones normales como en ratones CMS de ambas cepas. En la figura 34 B se muestra la actividad de NOS dependiente de calcio y su inhibición en presencia de L-NAME (inhibidor específico de NOS), verificando que la producción de citrulina es debida principalmente a la actividad de NOS.

Con el fin de investigar si es estrés crónico afecta de igual manera la actividad de las isoformas calcio dependiente (nNOS y eNOS), se realizaron experimentos en presencia de 7-NI o L-NIO (inhibidores específicos de la nNOS y eNOS,

respectivamente). Como se muestra en la figura 34 C, la actividad de nNOS disminuye significativamente (ANOVA de 2 factores,  $F(1,29) = 15,4$ ;  $p < 0,001$ ) mientras que la actividad de eNOS aumenta en los hipocampos de los animales BALB/c CMS con respecto a su control ( $F(1,29) = 6,10$ ;  $p < 0,05$ ). Por el contrario, los ratones C57BL/6 CMS no presentaron diferencias significativas en la actividad ni de nNOS ( $F(1,29) = 0,76$ ; NS) ni de eNOS ( $F(1,29) = 0,42$ ; NS) con respecto a sus controles (figura 34 C).



**Figura 33.** Producción total de [<sup>14</sup>C] L-citrulina expresada en pmoles/g de tejido/30 min en hipocampos de ratones BALB/c (barras rosas) y C57BL/6 (barras verdes), controles (N) y estresados (CMS). Los resultados expresan la media  $\pm$  ES de las determinaciones realizadas con 8 animales de cada grupo. \*\*\* $p < 0,001$  respecto a su control.



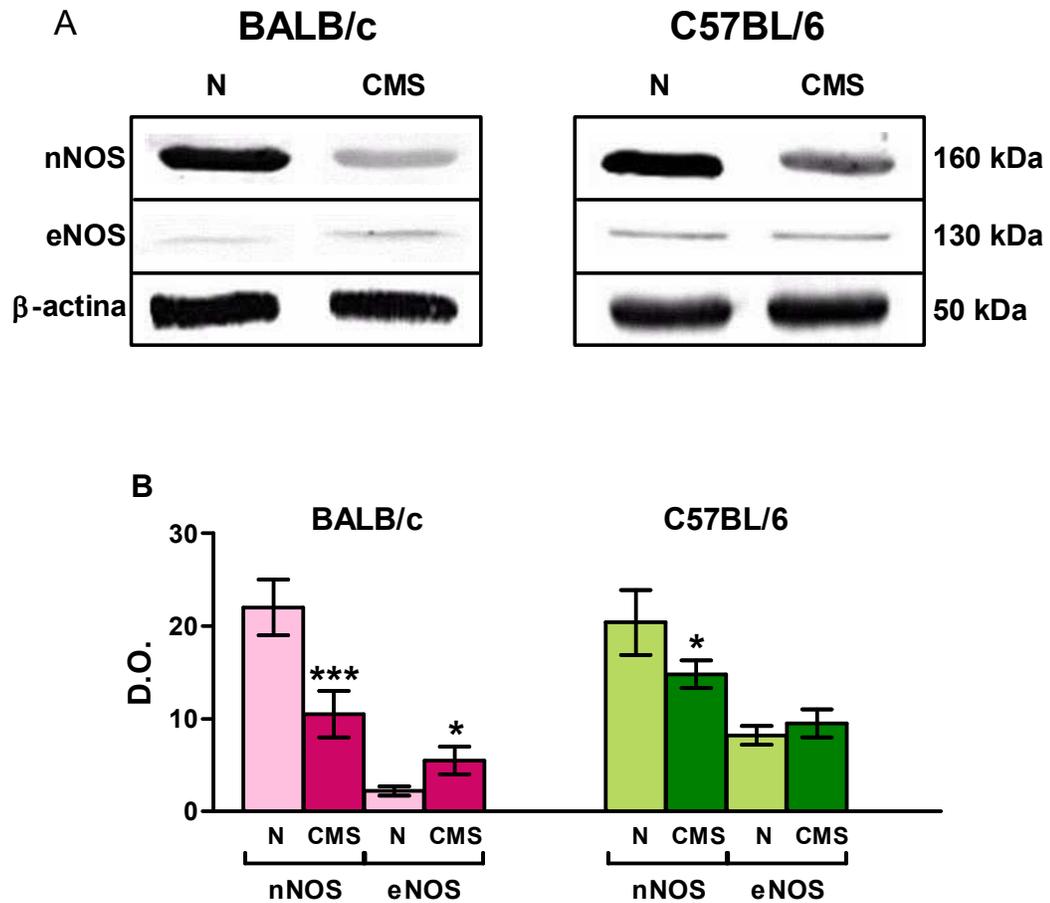
**Figura 34.** Producción de [ $^{14}\text{C}$ ] L-citrulina expresada en pmoles/g de tejido/30 min en hipocampus de ratones BALB/c (barras rosas) y C57BL/6 (barras verdes), controles (N) y estresados (CMS), en **A** incubados en presencia (+EGTA) y en ausencia (-EGTA) de EGTA; en **B** basales (B) y con el agregado de L-NAME (+L-NAME) y en **C** se grafica la actividad de nNOS y eNOS. Los resultados expresan la media  $\pm$  ES de 4 experimentos independientes realizados con 2 ratones de cada grupo. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  con respecto a su control.

### 1.5.2- Efectos del estrés crónico sobre los niveles proteicos de la nNOS y la eNOS en hipocampo de ratones BALB/c y C57BL/6.

Con el fin de investigar si la disminución en la actividad de nNOS inducida por exposición a estrés crónico en ratones BALB/c se relacionaba con los cambios en los niveles proteicos de nNOS en hipocampo, se analizó la misma mediante la técnica de *western blot*.

Como se muestra en la figura 35 los hipocampos de los ratones BALB/c CMS presentaron una banda de 160 kDa, correspondiente a la nNOS, de menor intensidad comparada con la banda que se obtuvo para los hipocampos de los ratones BALB/c controles (N). La banda de 130 kDa, correspondiente a la eNOS, a diferencia de lo que ocurre con la nNOS, es más intensa en los hipocampos de los ratones BALB/c CMS comparada con los controles. El análisis estadístico de los datos de la densidad óptica (D.O.) de las bandas normalizadas con respecto a la  $\beta$ -actina indicó una disminución significativa del nivel de nNOS (ANOVA de dos factores,  $F(1,37) = 17,21$ ;  $p < 0,001$ ) y un aumento de eNOS ( $F(1,37) = 5,90$ ;  $p < 0,05$ ) en los animales sometidos a estrés crónico.

Por otro lado, los ratones C57BL/6 estresados también presentaron una banda de menor intensidad correspondiente a la nNOS (ANOVA de dos factores,  $F(1,37) = 6,22$ ;  $p < 0,05$ ) con respecto a los animales C57BL/6 controles y no se observaron diferencias en las bandas correspondientes a la eNOS ( $F(1,37) = 1,14$ ; NS) entre los ratones C57BL/6.

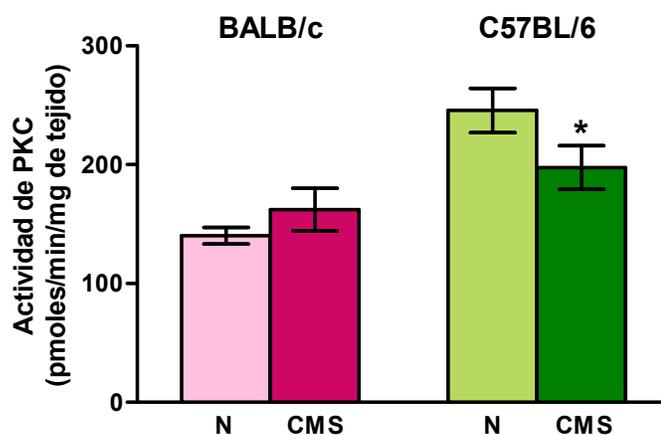


**Figura 35.** Western blot para nNOS, eNOS y  $\beta$ -actina en hipocampo de ratones BALB/c (barras rosas) y C57BL/6 (barras verdes), controles (N) y estresados (CMS). En **A** se muestra una banda representativa de las isoformas de NOS calcio dependientes y de  $\beta$ -actina con su peso en kDa (números que se encuentran a la derecha), para cada uno de los grupos estudiados. En **B** se gráfica la densidad óptica de las bandas para las isoformas eNOS y nNOS relativa a  $\beta$ -actina. Los resultados expresan la media  $\pm$  ES de 5 experimentos realizados independientemente con 2 muestras por grupo. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  con respecto a su control.

### 1.5.3- Actividad de PKC en hipocampo de ratones BALB/c y C57BL/6 estresados.

Con el fin de evaluar si existen diferencias en la actividad total de PKC en hipocampos de ratones BALB/c y C57BL/6, CMS y controles, se determinó mediante un método bioquímico la actividad de esta enzima. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 36. El ANOVA de dos factores indicó que no se encontraron diferencias significativas en la actividad total de PKC en el hipocampo de ratones BALB/c estresados (CMS) ( $F(1,17) = 0,85$ ; NS) comparados con el grupo BALB/c control (N). Por otro lado, los ratones C57BL/6 CMS muestran una disminución de la actividad de PKC cuando se los compara con su grupo control ( $F(1,17) = 5,53$ ;  $p < 0,05$ ).

No se encontraron diferencias significativas en la actividad de PKC en las fracciones citosólicas y de membrana entre controles y CMS de las cepas en estudio (tabla 2) ( $F(3,35) = 1,52$ ; NS).



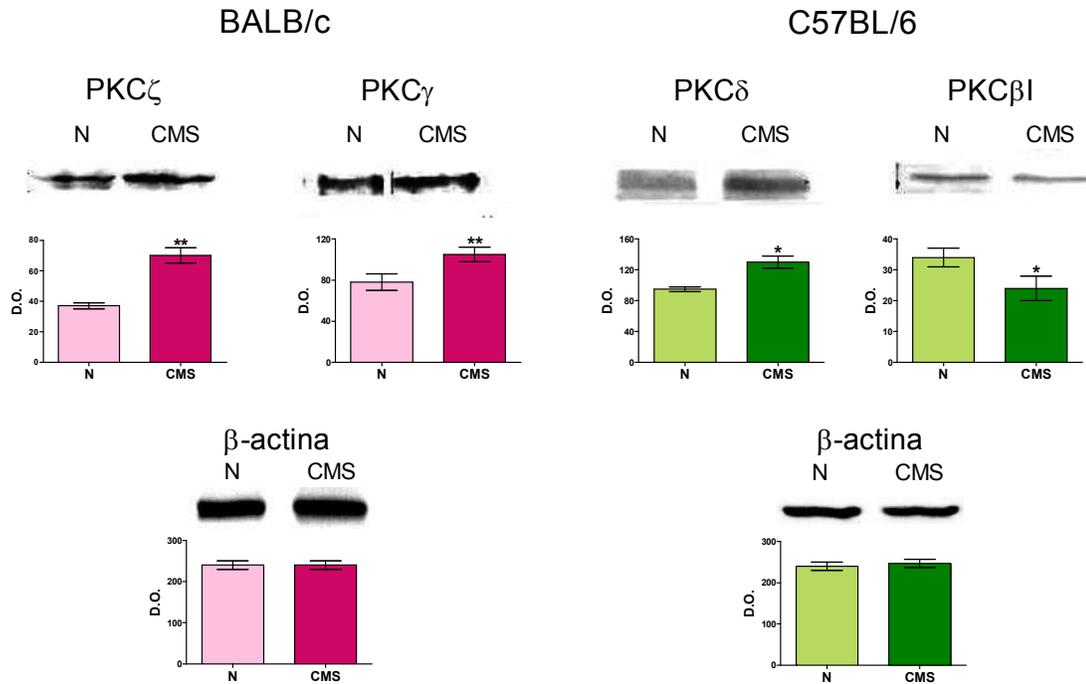
**Figura 36.** Actividad de PKC expresada en pmol/min/mg de tejido en hipocampo de ratones BALB/c (barras rosas) y C57BL/6 (barras verdes), controles (N) y estresados (CMS). El gráfico indica la media  $\pm$  ES de 3 experimentos realizados independientemente con 3 animales por grupo. \* $p < 0,05$ ; respecto a su correspondiente control.

Cepa	Grupo	% de PKC	
		Citosol	Membrana
BALB/c	N	69 ± 5	31 ± 5
	CMS	62 ± 7	38 ± 7
C57BL/6	N	53 ± 6	47 ± 6
	CMS	52 ± 8	48 ± 8

**Tabla 2.** Porcentaje de actividad de PKC en citosol y membrana en animales BALB/c y C57BL/6, control y CMS.

#### 1.5.4- Niveles proteicos de PKC en hipocampo de ratones BALB/c y C57BL/6 estresados.

Para determinar si el estrés provoca cambios en el nivel proteico de algunas de las isoformas de PKC, se realizó un *western blot* para siete de las isoformas de PKC en hipocampos de ratones BALB/c y C57BL/6, estresados (CMS) y controles (N). Como se observa en la figura 37 se encontró un aumento significativo del 49% y 55% para la PKC $\zeta$  y PKC $\gamma$  respectivamente, en hipocampos de ratones BALB/c estresados respecto del control (prueba *t* de Student,  $t = 3,63$ ;  $p < 0,01$  y  $t = 3,11$ ;  $p < 0,01$ , respectivamente). En los ratones C57BL/6 CMS se observó un aumento de 30% para PKC $\delta$  y una disminución del 29% de la PKC $\beta I$  con respecto a sus controles, ( $t = 2,06$ ;  $p < 0,05$  y  $t = 2,37$ ;  $p < 0,05$ , respectivamente). Para las demás isoformas analizadas no se encontraron diferencias significativas en hipocampos de ratones CMS respecto de los controles para ambas cepas estudiadas (datos no mostrados).



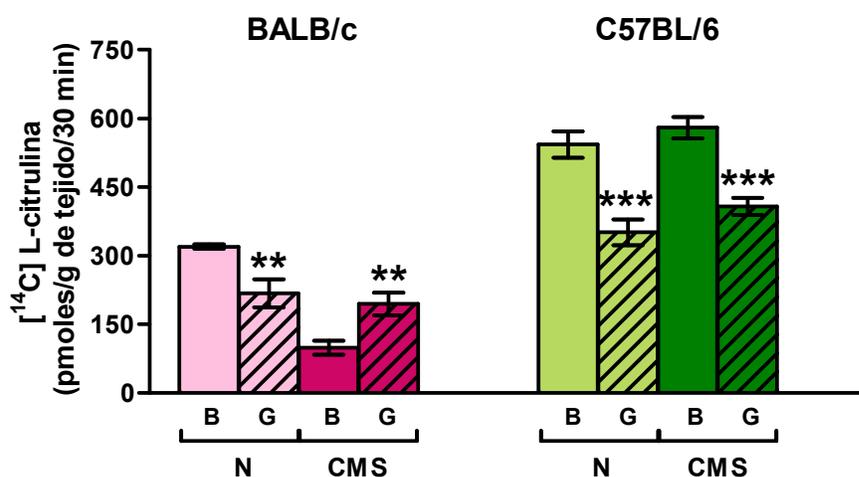
**Figura 37.** Niveles proteicos de las isoformas de PKC. *Western blot* para las diferentes isoformas de PKC en hipocampo de ratones BALB/c y C57BL/6, controles (N) y estresados (CMS). Las bandas mostradas son representativas de 5 experimentos realizados independientemente con 3 muestras de cada grupo. Los gráficos indican la media  $\pm$  ES de la densidad óptica (D.O.) para cada isoforma. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$  respecto de su correspondiente control.

### 1.5.5- Participación de la PKC en la regulación de la NOS en el hipocampo de animales BALB/c y C57BL/6, controles y estresados crónicamente.

Con el fin de evaluar si la PKC está implicada en la regulación de la actividad de NOS, se determinó la actividad de la misma en presencia y ausencia de GF 109203X (inhibidor de PKC), en hipocampos de ratones BALB/c y C57BL/6, CMS y controles.

En la figura 38 se observa que en presencia del inhibidor de PKC, la actividad de NOS calcio dependiente medida en homogenatos de hipocampos, disminuyó significativamente en ratones BALB/c control y se mostró incrementada en ratones BALB/c CMS (ANOVA de 2 factores,  $F(1,29) = 9,45$ ;  $p < 0,01$  y  $F(1,29) = 11,38$ ;  $p < 0,01$ , respectivamente).

En hipocampo de ratones C57BL/6 control y CMS la inhibición de PKC produjo una disminución significativa de la actividad de NOS ( $t = 4,67$ ;  $p < 0,001$  y  $t = 4,76$ ;  $p < 0,001$ ).



**Figura 38.** Producción de [<sup>14</sup>C] L-citrulina expresada en pmoles/g/30 min en hipocampos de ratones BALB/c (barras rosas) y C57BL/6 (barras verdes), normales (N) y estresados (CMS) en ausencia (B) y presencia de GF 109203X (G). El gráfico representa la media  $\pm$  ES de 4 experimentos realizados independiente con 2 animales por grupo. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  respecto a su correspondiente control.

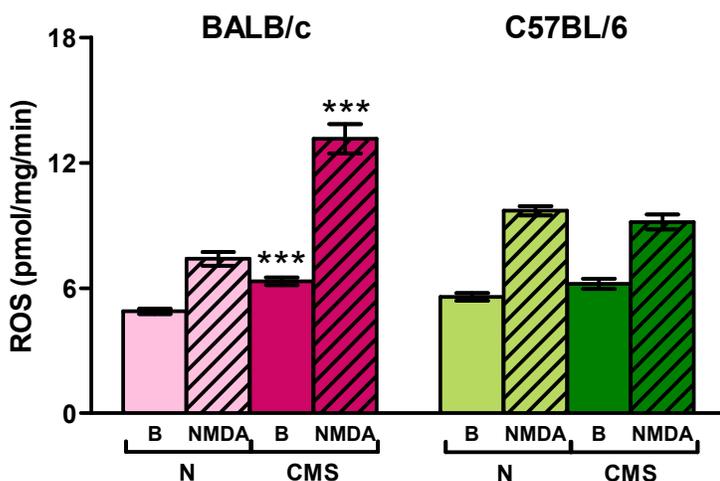
## 1.6- Efectos del estrés crónico sobre el estado REDOX del hipocampo en ratones BALB/c y C57BL/6.

### 1.6.1- Producción de ROS en hipocampo de ratones BALB/c y C57BL/6, controles y CMS.

Para determinar si los cambios morfológicos y neuroquímicos se relacionaban con una mayor sensibilidad al estrés oxidativo, se determinó la producción basal y con estimulación con NMDA en hipocampos de ratones BALB/c y C57BL/6, control y CMS. La misma se evaluó por un método bioquímico en el cual se midió como producto final la producción de DCF.

En hipocampos de animales BALB/c CMS se observaron diferencias significativas respecto a la producción de ROS tanto basal como estimulados con NMDA (ANOVA de 2 factores,  $F(1,20) = 28,00$ ;  $p < 0,0001$  y  $F(1,20) = 81,81$ ;  $p < 0,00001$ , respectivamente).

Cuando se midió la producción de ROS en hipocampo de ratones C57BL/6 no se observaron diferencias significativas entre controles y CMS tanto basal como cuando fueron estimulados con NMDA ( $F(1,20) = 3,98$ ; NS y  $F(1,20) = 0,90$ ; NS, respectivamente) (figura 39).

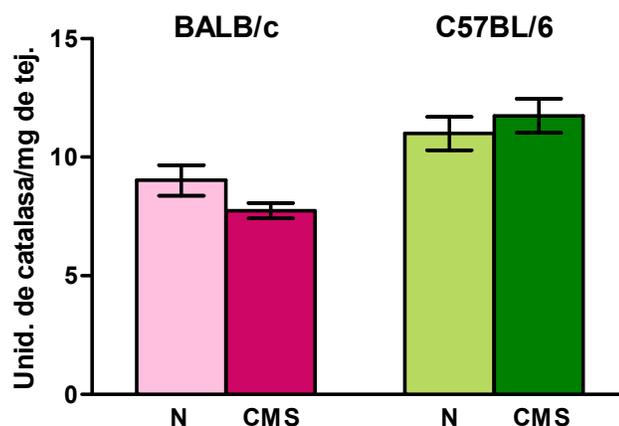


**Figura 39.** Niveles de ROS. Producción de ROS, expresada en pmoles/mg de tejido/min, basal (barras planas) y estimuladas con NMDA (barras rayadas) fueron determinadas en hipocampos de ratones BALB/c (barras rosas) y C57BL/6 (barras verdes), control (N) y CMS. Los resultados representan la media  $\pm$  ES de dos experimentos independientes realizados por duplicado con tres animales por grupo. \*\*\* $p < 0.001$  respecto a su correspondiente control.

### 1.6.2- Niveles de catalasa en hipocampo de ratones BALB/c y C57BL/6, controles y CMS.

Para evaluar si el estrés crónico produce alguna alteración en los niveles de catalasa, se determinaron los niveles de esta enzima en hipocampos de ratones BALB/c y C57BL/6, controles y sometidos a estrés crónico.

En los ratones BALB/c, el estrés crónico produjo una disminución en los niveles de la enzima catalasa, pero estos no fueron significativos. Similarmente en los ratones C57BL/6 no se encontraron diferencias en los niveles de catalasa entre animales controles y estresados (ANOVA de 2 factores, entre tratamiento: control y CMS,  $F(1,23) = 0,64$ ; NS) (figura 40).

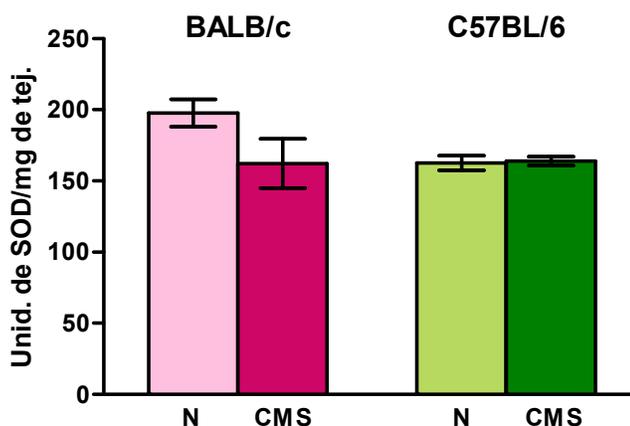


**Figura 40.** Niveles de catalasa. El gráfico representa las unidades enzimáticas de catalasa/mg de hipocampo en animales BALB/c (barras rosas) y C57BL/6 (barras verdes), control (N) y CMS. Los resultados representan la media  $\pm$  ES de dos experimentos independientes realizados por duplicado con tres animales por grupo.

### 1.6.3- Niveles de superóxido dismutasa (SOD) en hipocampo de ratones BALB/c y C57BL/6, controles y CMS.

Para determinar si el estrés provoca algún efecto en los niveles de la SOD, se estudió la misma en hipocampos de ratones BALB/c y C57BL/6, controles y sometidos a estrés crónico.

Como se muestra en la figura 41, si bien los niveles de SOD disminuyeron en los ratones CMS BALB/c respecto a los animales controles, esta diferencia no fue significativa. Tampoco se encontraron diferencias significativas respecto a los niveles de SOD en hipocampos de animales estresados C57BL/6 respecto de sus controles (ANOVA de 2 factores, entre tratamiento: control y CMS,  $F(1,23) = 1,03$ ; NS).



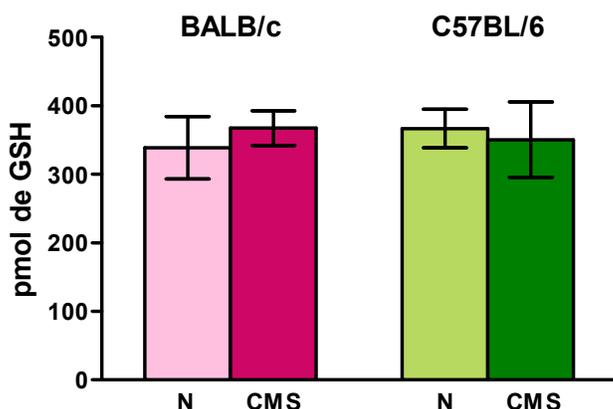
**Figura 41.** Niveles de SOD. El gráfico representa las unidades enzimáticas de SOD/ mg de hipocampo en animales BALB/c (barras rosas) y C57BL/6 (barras verdes), control (N) y CMS. Los resultados representan la media  $\pm$  ES de dos experimentos realizados independientemente por duplicado con tres animales por grupo.

### 1.6.4- Producción de glutatión en hipocampo de ratones BALB/c y C57BL/6, controles y CMS.

Para estudiar si el estrés afecta estas proporciones de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG), fueron medidos sus niveles en hipocampos de ratones BALB/c y C57BL/6.

En los ratones BALB/c y C57BL/6 sometidos a estrés crónico no se encontraron diferencias ni en los niveles de GSH total ni en los niveles de GSH y GSSG respecto a los controles (figura 42) (ANOVA de 2 factores, entre tratamiento: control y CMS,  $F(1,23) = 0,17$ ; NS).

Además los porcentajes correspondientes a los niveles de GSH y GSSG para animales estresados y controles de ambas cepas de ratones se encuentran dentro de los niveles normales esperados (tabla 3).



**Figura 42.** Niveles de glutatión. El gráfico representa los pmoles de glutatión reducido (GSH) en hipocampo en animales BALB/c (barras rosas) y C57BL/6 (barras verdes), control (N) y CMS. Los resultados representan la media  $\pm$  ES de dos experimentos independientes realizados por duplicado con tres animales por grupo.

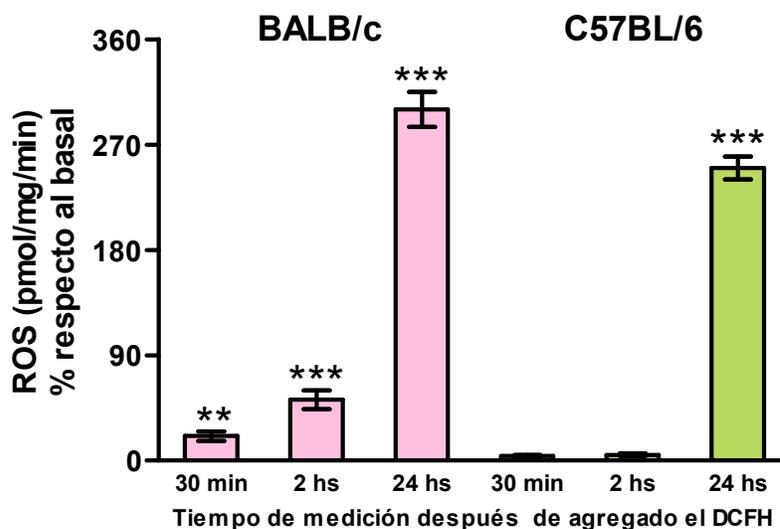
Cepa	Grupo	% de glutatión	
		GSH	GSSG
BALB/c	N	90,6 $\pm$ 3	9,4 $\pm$ 3
	CMS	91,8 $\pm$ 2	8,2 $\pm$ 2
C57BL/6	N	91,2 $\pm$ 1	8,8 $\pm$ 1
	CMS	91,3 $\pm$ 2	8,7 $\pm$ 2

**Tabla 3:** Porcentaje de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) en animales BALB/c y C57BL/6 control y CMS.

### 1.6.5- Producción de ROS en presencia de 7-NI, un inhibidor específico de la nNOS, en hipocampos de ratones normales BALB/c y C57BL/6.

Para estudiar la participación de la nNOS sobre la producción de especies reactivas del oxígeno, se determinaron las mismas en presencia de 7-NI, un inhibidor específico de la nNOS en ratones BALB/c y C57BL/6 normales.

En los animales BALB/c la inhibición de nNOS provocó un aumento paulatino de las ROS a medida que fue aumentando con el tiempo (ANOVA de 2 factores de medidas repetidas,  $t = 3,29$ ;  $p < 0,01$ ;  $t = 6,84$ ;  $p < 0,001$  y  $t = 66,99$ ;  $p < 0,00001$  para 30 minutos, 2 horas y 24 horas respectivamente), mientras que en los C57BL/6 sólo se observó un aumento 24 horas después de haber sido agregado el inhibidor ( $t = 66,21$ ;  $p < 0,00001$ ) (figura 43).



**Figura 43.** Niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS). Producción de ROS, expresada en pmoles/mg de tejido/min como porcentaje del valor basal, en hipocampo de ratones controles BALB/c (barras rosas) y C57BL/6 (barras verdes). Los resultados representan la media  $\pm$  ES de 2 experimentos independientes realizados con 3 animales de cada grupo. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  respecto a su correspondiente control.

### 1.7- Prueba de campo abierto en ratones BALB/c y C57BL/6 tratados con L-NAME.

Teniendo en cuenta que de acuerdo a nuestros resultados el estrés aumenta los niveles de ROS, que estarían relacionados con una disminución en la producción de NO, resultó de interés analizar el alcance *in vivo* de estos hallazgos. Para investigar si la inhibición de NOS modifica el comportamiento de ratones normales BALB/c y C57BL/6, se administró a los animales L-NAME por vía oral y se estudió el comportamiento durante 4 semanas.

La administración del inhibidor de NOS indujo en ratones BALB/c normales un incremento en la actividad locomotora como se muestra en la figura 44. A la semana de ser administrado el L-NAME, los ratones BALB/c mostraron un aumento en la actividad horizontal ( $t = 6,16$ ;  $p < 0,001$ ) y vertical ( $t = 4,64$ ;  $p < 0,001$ ) así como una disminución en el tiempo que se quedaron quietos ( $t = 6,52$ ;  $p < 0,001$ ) (paneles A, B y C respectivamente). Resultados similares se observaron con dos semanas de administración con L-NAME (paneles D, E y F).

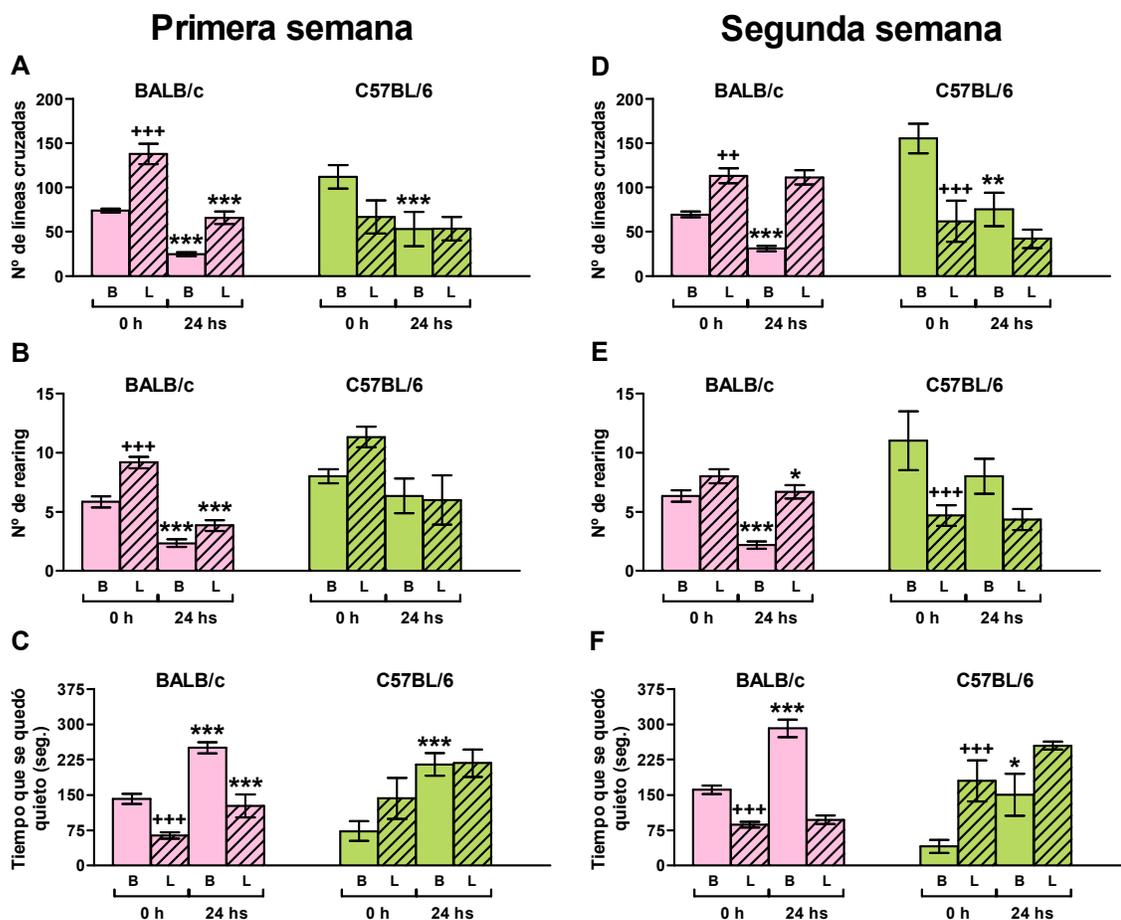
Por otra parte, después de dos semanas de administración con L-NAME, los animales BALB/c mostraron menor capacidad de habituación comparado con sus controles. Puede observarse en la figura 44 D, E y F, que los ratones controles mostraron una disminución en la actividad locomotora cuando fueron re-expuestos al campo abierto 24 horas después de la primera exposición (líneas cruzadas ( $t = 6,74$ ;  $p < 0,0001$ ), *rearing* ( $t = 7,67$ ;  $p < 0,001$ ) y tiempo que se queda quieto ( $t = 7,08$ ;  $p < 0,001$ ). Sin embargo, para los ratones tratados con L-NAME por dos semanas sólo se observó una disminución en el *rearing* [líneas cruzadas ( $t = 0,80$ ; NS), *rearing* ( $t = 2,51$ ;  $p < 0,05$ ) y tiempo que se queda quieto ( $t = 1,20$ ; NS)]. Resultados similares a los de la segunda semana fueron observados para animales BALB/c luego de cuatro semanas de tratamiento con L-NAME (datos no mostrados).

Por otro lado, en ratones C57BL/6 normales, la inhibición de la actividad de NOS con L-NAME indujo una disminución en la actividad exploratoria recién a las dos semanas de tratamiento [líneas cruzadas ( $t = 5,35$ ;  $p < 0,001$ ), *rearing* ( $t = 5,91$ ;  $p < 0,001$ ) y tiempo que se queda quieto ( $t = 4,75$ ;  $p < 0,001$ ); figura 44 D, E y F respectivamente]. Además, los animales controles mostraron una disminución en la

actividad locomotora cuando fueron re-expuestos a la prueba de campo abierto 24 horas después de la prueba inicial [líneas cruzadas ( $t = 13,47$ ;  $p < 0,0001$ ), *rearing* ( $t = 1,42$ ; NS) y tiempo que se queda quieto ( $t = 10,32$ ;  $p < 0,0001$ )]. Para los ratones tratados con L-NAME durante 1 semana, la disminución encontrada no fue significativa [líneas cruzadas ( $t = 1,10$ ; NS), *rearing* ( $t = 1,30$ ; NS) y tiempo que se queda quieto ( $t = 0,90$ ; NS)].

Cabe resaltar que resultados similares se obtuvieron al tratar con el inhibidor específico de la nNOS (7-NI) (datos no mostrados).

En conclusión, la inhibición de la actividad de nNOS indujo alteraciones en la actividad exploratoria y en la capacidad de habituación tanto en los ratones BALB/c como en los C57BL/6. Sin embargo, en los ratones BALB/c con una semana de tratamiento se produjo un aumento de la actividad locomotora y fueron necesarias dos semanas de tratamiento para afectar la capacidad de habituación a un ambiente novedoso. Por el contrario, con sólo una semana de tratamiento los ratones C57BL/6 mostraron una menor habituación y con dos semanas de tratamiento pudo observarse una disminución en la actividad exploratoria.



**Figura 44.** Comportamiento de los ratones en la prueba de campo abierto después de ser tratados una o dos semanas con L-NAME, un inhibidor de la óxido nítrico sintasa. El número de líneas cruzadas, el número de *rearing* y el tiempo que se quedó quieto fue determinado en ratones BALB/c normales (barras rosas) y C57BL/6 normales (barras verdes), tratados con L-NAME (L) y en animales no tratados (B), al finalizar la primera (A, B y C respectivamente) y segunda semana (D, E y F respectivamente) de tratamiento. Los resultados representan la media  $\pm$  ES de seis animales de cada grupo. Los resultados representan la media  $\pm$  ES de seis animales de cada grupo.  $^{**} p < 0,01$ ;  $^{+++} p < 0,001$  respecto al correspondiente control;  $^* p < 0,05$ ;  $^{**} p < 0,01$ ;  $^{***} p < 0,001$  respecto a la prueba inicial (0 h).

## **2- Efectos del estrés crónico sobre el sistema inmune.**

El segundo objetivo del trabajo fue evaluar el efecto del estrés crónico en el sistema inmune de los ratones BALB/c y C57BL/6.

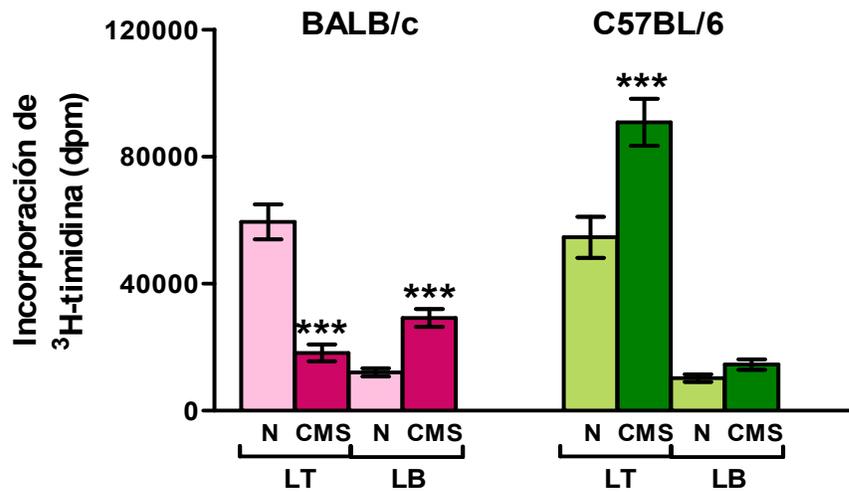
### **2.1- Evaluación del sistema inmune *ex vivo*.**

El análisis de la proliferación es una prueba de la reactividad linfocitaria que examina con qué eficacia se dividen las células estimuladas mitogénicamente. Se asume que una mayor proliferación indica una función celular más efectiva. Para evaluar la funcionalidad de los linfocitos T y B se utilizaron como mitógenos selectivos concanavalina A (Con A) y lipopolisacárido (LPS), respectivamente.

#### **2.1.1-Estudio de la proliferación de linfocitos inducida por mitógenos en ratones BALB/c y C57BL/6, control y CMS.**

Para investigar si el estrés produce diferencias en cuanto a la proliferación de los linfocitos T y B en las distintas cepas de ratón, los linfocitos de cada grupo de animales fueron estimulados con concentraciones óptimas de mitógenos T o B. La incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en linfocitos controles sin estimular fue similar para ambas cepas de ratón. Como se muestra en la figura 45, las células T provenientes de los animales BALB/c CMS presentaron una baja reactividad en respuesta al mitógeno Con A (ANOVA de 2 factores,  $F(1,44) = 41,18$ ;  $p < 0,00001$ ) mientras que las células B de estos animales mostraron una alta reactividad al LPS ( $F(1,44) = 32,83$ ;  $p < 0,00001$ ) (figura 45).

Por otra parte, en ratones C57BL/6 CMS, las células T tuvieron una alta respuesta proliferativa con respecto a las células T normales ( $F(1,44) = 16,64$ ;  $p < 0,001$ ) y no se encontraron diferencias significativas en la proliferación de células B ( $F(1,44) = 3,50$ ; NS) entre animales C57BL/6 controles y CMS (figura 45).



**Figura 45.** Ensayo de proliferación celular. La proliferación de linfocitos T y B (LT y LB, respectivamente) fue determinada por incorporación de timidina tritiada, medida en desintegraciones por minuto (dpm), en BALB/c (barras rosas) y C57BL/6 (barras verdes), en ratones controles (N) y CMS. Los resultados representan la media  $\pm$  ES de cuatro experimentos independientes con tres animales de cada grupo. \*\*\* $p < 0,001$  respecto a su correspondiente control. La incorporación de <sup>3</sup>H-timidina (dpm) para células no estimuladas fue: BALB/c, control:  $2194 \pm 442$  y CMS:  $2677 \pm 546$  y C57BL/6, control:  $3515 \pm 742$  y CMS:  $3251 \pm 546$ .

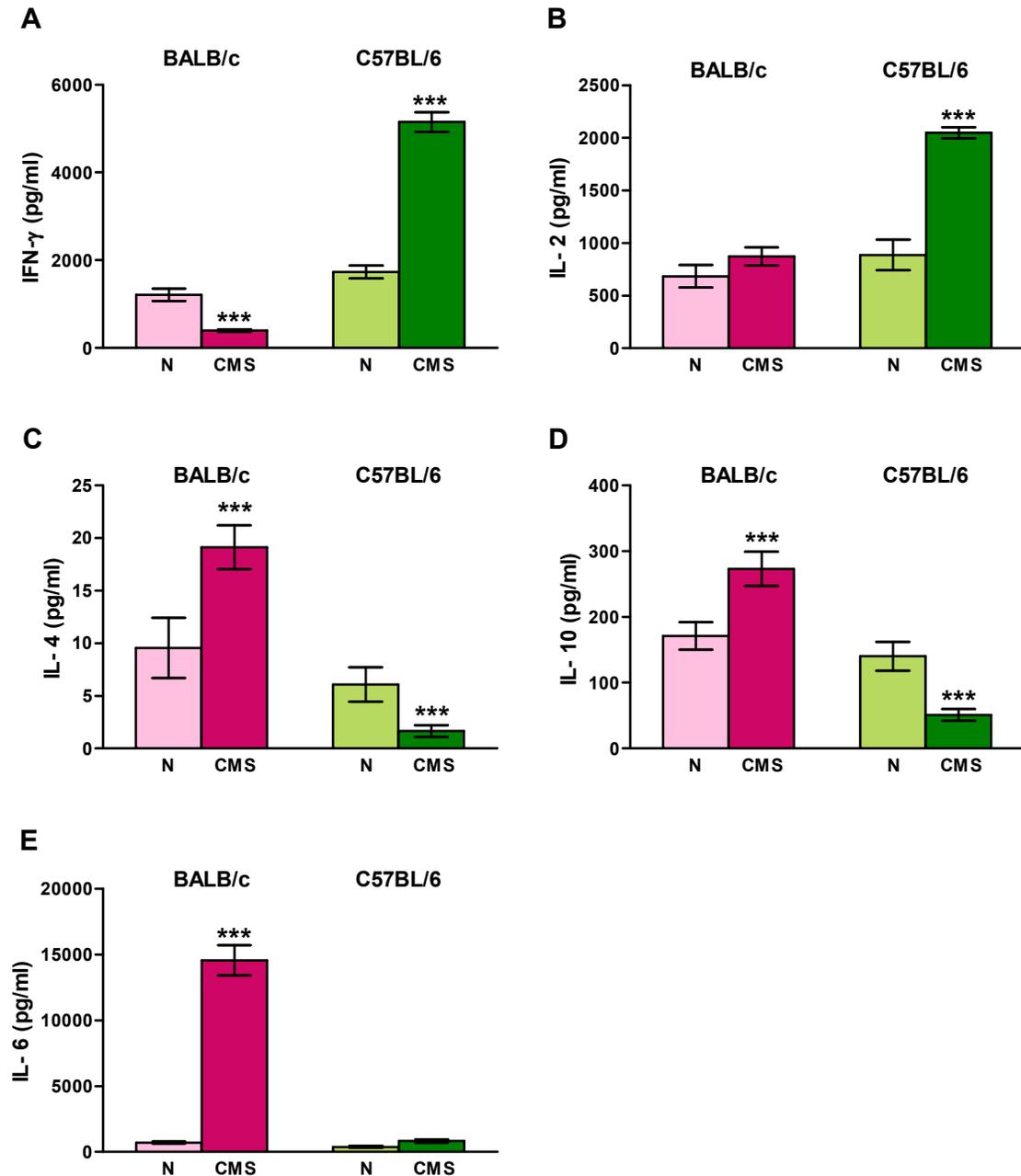
### 2.1.2- Producción de citoquinas en ratones BALB/c y C57BL/6, controles y estresados crónicamente.

Los ratones BALB/c y C57BL/6 normales poseen un perfil de citoquinas tipo Th2 y Th1 respectivamente. El objetivo fue estudiar si el estrés crónico modifica el balance Th1/Th2 en las dos cepas estudiadas. Para ello se determinó la liberación de IFN- $\gamma$  e IL-2 (citoquinas Th1) y de IL-4, IL-10 e IL-6 (citoquinas Th2) en sobrenadantes provenientes de linfocitos estimulados con Con A.

El ANOVA de 2 factores mostró en ratones BALB/c CMS una disminución significativa en la producción de IFN- $\gamma$  ( $F(1,20) = 22,89$ ;  $p < 0,001$ ; figura 46 A), no se encontraron diferencias en los niveles liberados de IL-2 ( $F(1,20) = 2,50$ ; NS; figura 46 B) y se observó un aumento significativo para la IL-4 ( $F(1,20) = 46,45$ ;  $p < 0,00001$ ; figura 46 C), IL-10 ( $F(1,20) = 265,63$ ;  $p < 0,00001$ ; figura 46 D) e IL-6 ( $F(1,20) = 287,26$ ;  $p < 0,00001$ ; figura 46 E).

En los C57BL/6 estresados se observó un aumento significativo en la producción de IFN- $\gamma$  ( $F(1,20) = 22,89$ ;  $p < 0,001$ ; figura 46 A) e IL-2 ( $F(1,20) = 24,00$ ;  $p < 0,001$ ; figura 46 B), una disminución en los niveles liberados de IL-4 ( $F(1,20) = 37,73$ ;  $p < 0,00001$ ; figura 46 C) e IL-10 ( $F(1,20) = 56,25$ ;  $p < 0,00001$ ; figura 46 D) y no se encontraron cambios en la producción de IL-6 ( $F(1,20) = 0,29$ ; NS; figura 46 E).

Por lo tanto el estrés indujo un aumento de las citoquinas tipo Th2 en los ratones BALB/c, mientras que en los C57BL/6 exacerbó el balance hacia Th1.



**Figura 46.** Niveles de citoquinas. Concentración de IFN $\gamma$  (A), IL-2 (B), IL-4 (C), IL-10 (D) e IL-6 (E) determinadas en sobrenadantes de linfocitos, provenientes de los nódulos linfáticos, estimulados con Con A por 24 horas en animales BALB/c (barras rosas) y C57BL/6 (barras verdes), control (N) y CMS. Los resultados representan la media  $\pm$  ES de tres experimentos realizados en forma independiente con dos animales por grupo. \*\*\*  $p < 0,001$  respecto de su correspondiente control.

## 2.2- Evaluación del sistema inmune *in vivo*.

### 2.2.1- Análisis de la respuesta inmune humoral en ratones BALB/c y C57BL/6 controles y estresados crónicamente.

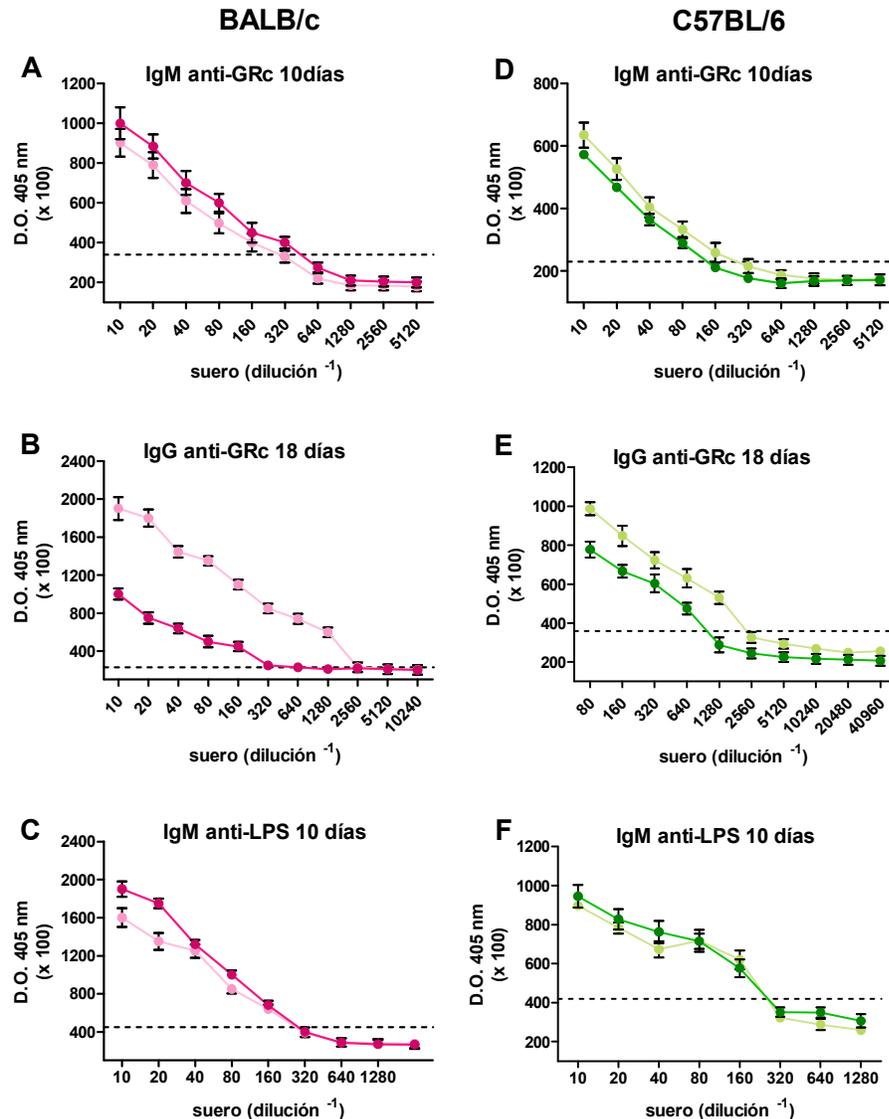
Para estudiar el correlato *in vivo* de los resultados obtenidos *in vitro*, se analizó la respuesta inmune humoral inducida por inoculación con antígenos T-dependientes (glóbulos rojos de carnero, GRc) y T-independientes (LPS).

Como se mencionó anteriormente, para antígenos T-dependientes, se produce primero IgM y luego IgG, siendo la contribución global de la IgM más importante. Tras una segunda inoculación (respuesta secundaria) el anticuerpo predominante es de tipo IgG. Para la producción de anticuerpos tipo IgG por parte de los linfocitos B (LB) es necesaria la colaboración de los linfocitos T (LT). Para los antígenos T-independientes, tanto si la respuesta es primaria o secundaria, el anticuerpo producido es de tipo IgM y no es necesaria la colaboración de los LT. Por este motivo tras la inoculación con GRc se determinó la producción de anticuerpos tipo IgM a los 10 días de inoculación (respuesta primaria) e IgG 18 días después de la primera inoculación (respuesta secundaria). Para analizar la respuesta a LPS se determinó la producción de anticuerpos tipo IgM siguiendo el esquema experimental detallado en materiales y métodos.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 47. Puede observarse que en los ratones BALB/c, el desafío antigénico con GRc indujo una producción de anticuerpos tipo IgM, que no mostró diferencias entre los grupos control y estresado (Mann-Whitney  $U = 26$ ; NS; figura 47 A). Contrariamente, la producción de anticuerpos tipo IgG se vio seriamente afectada en los animales CMS tras una segunda inmunización antigénica ( $U = 3$ ;  $p < 0,001$ ; Figura 47 B). Como puede observarse en la figura 47 C, el título de IgM anti-LPS fue similar en los ratones normales y CMS ( $U = 21,5$ ; NS). Es importante aclarar que la disminución en la producción de anticuerpos tipo IgG no se debió a un retardo en la cinética de la producción ya que no se observó un aumento del título, al menos hasta dos semanas post-inoculación (datos no mostrados).

Por otra parte, en los ratones C57BL/6 CMS el título de IgM tampoco se vio afectado ni para la inmunización con GRc ( $U = 27$ ; NS; figura 47 D) ni para LPS ( $U = 23$ ; NS;

figura 47 F). El título de anticuerpos tipo IgG anti-GRc fue menor en los ratones CMS que en los controles ( $U = 16$ ;  $p < 0,05$ ; figura 47 E). Cabe aclarar que en los ratones C57BL/6 estresados la disminución del título para anticuerpos tipo IgG no alcanzó la magnitud observada para los ratones BALB/c CMS.



**Figura 47.** Se determinaron los títulos de anticuerpos en ratones BALB/c (rosa) controles (●) y CMS (●) y C57BL/6 (verde), controles (●) y CMS (●) inmunizados con glóbulos rojos (GRc), y luego de un refuerzo dado al día 11 con GRc o inmunizados con LPS. Los sueros fueron recolectados al día 10 o al día 18 y se ensayó la presencia de IgM o IgG. Las curvas representan las densidades ópticas (D.O.) a las distintas diluciones de los sueros. Se realizaron 2 experimentos independientes con 4 animales de cada grupo. La línea punteada representa los valores de D.O. + 2 veces el desvío estándar respecto del suero de animales normales (sin inmunizar).

### 2.2.2- Distribución de subpoblaciones linfocitarias.

Para determinar si la alteración de la respuesta inmune tanto *in vitro* como *in vivo* era debida a cambios en la distribución de los subtipos celulares de linfocitos T se analizaron los porcentajes de células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> por citometría de flujo en ganglios de animales BALB/c y C57BL/6, control y CMS (ANOVA de 2 factores, entre tratamiento: control y CMS, CD4<sup>+</sup>:  $F(1,17) = 1,31$ ; NS, CD8<sup>+</sup>:  $F(1,17) = 0,99$ ; NS, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>:  $F(1,17) = 0,24$ ; NS, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>:  $F(1,17) = 1,31$ ; NS; tabla 4).

Los estudios demostraron que la alteración de la respuesta inmune observada no es debida a una alteración de la distribución de las subpoblaciones linfocitarias T.

Cepa	Grupo	Subpoblaciones linfocitarias (% de linfocitos totales)			
		CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup>
BALB/c	N	60±6	11±3	0,47±0,05	29±2
	CMS	66±5	9±3	0,49±0,05	25±2
C57BL/6	N	25±3	26±9	0,05±0,01	49±11
	CMS	24±2	23±6	0,08±0,02	53±8

**Tabla 4.** Porcentaje de subpoblaciones linfocitarias en animales BALB/c y C57BL/6 control y CMS. Análisis por citometría de flujo realizado en suspensiones celulares obtenidas de ganglios linfáticos de animales BALB/c y C57BL/6 control y estresados (CMS). Los resultados están expresados como el porcentaje de los linfocitos totales y representan la media ± ES de 2 experimentos realizados por separado utilizando dos animales de cada grupo experimental.

### **3- Participación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) y del sistema adrenérgico sobre los efectos del estrés crónico en el SI y SNC.**

Es bien conocido que el estrés involucra la activación del eje HPA y el SNC. Por tal motivo se decidió determinar dos hormonas clásicas relacionadas con el estrés, la corticosterona y las catecolaminas.

Por último evaluar si existe correlación entre el comportamiento observado y los niveles de citoquinas en ratones estresados BALB/c y C57BL/6.

#### **3.1- Determinación de los niveles de corticosterona.**

Se midieron los niveles de corticosterona en ratones BALB/c y C57BL/6 a lo largo de las 6 semanas de exposición al modelo de estrés crónico.

La prueba de Friedman reveló que existen diferencias significativas en los niveles de corticosterona de BALB/c ( $T^2 = 18,20$ ;  $p < 0,001$ ) y C57BL/6 ( $T^2 = 5,90$ ;  $p < 0,001$ ). Los animales BALB/c sometidos al modelo CMS mostraron un aumento significativo en los niveles de esta hormona durante las primeras dos semanas de estrés (CMS *versus* control,  $p < 0,01$  para 1 y 2 semanas de exposición al CMS). Después de la tercera semana de exposición, los niveles de corticosterona retornan al valor basal y no muestran diferencias significativas respecto a los animales controles (después de 6 semanas, NS).

Los ratones C57BL/6 estresados crónicamente mostraron un aumento significativo de corticosterona en la tercera y cuarta semana de exposición al modelo CMS ( $p < 0,01$ ). A la sexta semana se reestablecen los niveles de corticosterona (CMS *versus* control, NS) (tabla 5).

### 3.2- Determinación de los niveles de catecolaminas.

Se determinaron los niveles de catecolaminas en ratones BALB/c y C57BL/6 a lo largo de las 6 semanas de exposición al modelo de estrés crónico.

El ANOVA de 2 factores mostró que existen diferencias en los niveles de catecolaminas para los ratones BALB/c ( $F(5,72) = 12$ ;  $p < 0,00001$ ) y C57BL/6 ( $F(5,72) = 4$ ;  $p < 0,01$ ). Los animales BALB/c sometidos al modelo CMS mostraron un aumento significativo en los niveles de catecolaminas durante las primeras tres semanas de estrés (CMS *versus* control,  $p < 0,001$  para la 1, 2 y 3 semanas de CMS). Después de la cuarta semana de exposición, los niveles de catecolaminas retornan al valor basal y no muestran diferencias significativas respecto a sus controles (tabla 6).

En los animales C57BL/6 se observó un aumento significativo de catecolaminas a la cuarta semana de exposición a estrés crónico (CMS *versus* control,  $p < 0,01$ ). A la sexta semana estos niveles vuelven a los valores basales (tabla 5).

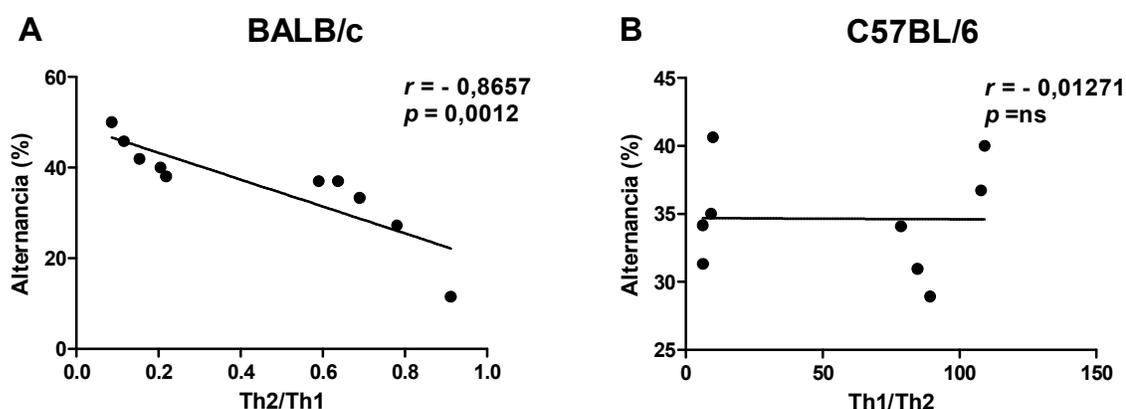
Tiempo de exposición al CMS	BALB/c		C57BL/6	
	[Corticosterona] (ng/ml)	[Catecolaminas] (pg/mg)	[Corticosterona] (ng/ml)	[Catecolaminas] (pg/mg)
Control	131 ± 5	760 ± 70	74 ± 6	405 ± 53
1 semana	432 ± 28 **	1338 ± 91***	73 ± 3	548 ± 37
2 semanas	392 ± 21 **	1248 ± 101***	79 ± 6	464 ± 48
3 semanas	181 ± 18	1314 ± 117***	102 ± 6 **	335 ± 67
4 semanas	140 ± 19	812 ± 73	135 ± 17 **	726 ± 96 **
6 semanas	143 ± 9	889 ± 93	85 ± 10	448 ± 46

**Tabla 5.** Concentración de corticosterona en sueros y de catecolaminas en muestras de bazo de animales BALB/c y C57BL/6, controles y expuestos al modelo de estrés crónico moderado. El análisis de corticosterona y catecolaminas se realizó en animales controles (no expuestos) y animales expuestos al modelo de CMS de 1 a 6 semanas. Los resultados expresan la media ± ES de tres experimentos independientes con tres animales de cada grupo. \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  con respecto a su control.

### 3.3- Correlación entre el comportamiento espontáneo de alternancia en el laberinto en Y y la relación Th2/Th1.

Para evaluar si existe o no una correlación entre el comportamiento espontáneo de alternancia observado en el laberinto en forma de Y y la relación Th2/Th1, se realizó una prueba de correlación en ratones BALB/c y C57BL/6, controles y CMS.

Como se muestra en la figura 48 la prueba de correlación de Pearson mostró una correlación negativa entre el porcentaje espontáneo de alternancia y la relación Th2/Th1 (definido como la relación entre IL-10/IFN- $\gamma$ ) en ratones BALB/c tomando los grupos control y CMS ( $r = -0,8657$ ;  $p = 0,0012$ ). En ratones C57BL/6 no se encontró correlación ( $r = -0,01271$ ;  $p = ns$ ).



**Figura 48.** Correlación entre el comportamiento espontáneo de alternancia en el laberinto en forma de Y y la relación Th2/Th1. La figura muestra un experimento representativo de 3 realizados de forma independiente en ratones BALB/c (A),  $r = -0,8657$ ;  $p = 0,0012$  y C57BL/6 (B),  $r = -0,01271$ ;  $p = ns$ .

## **4- Efecto del Copaxone® sobre los ratones BALB/c estresados crónicamente.**

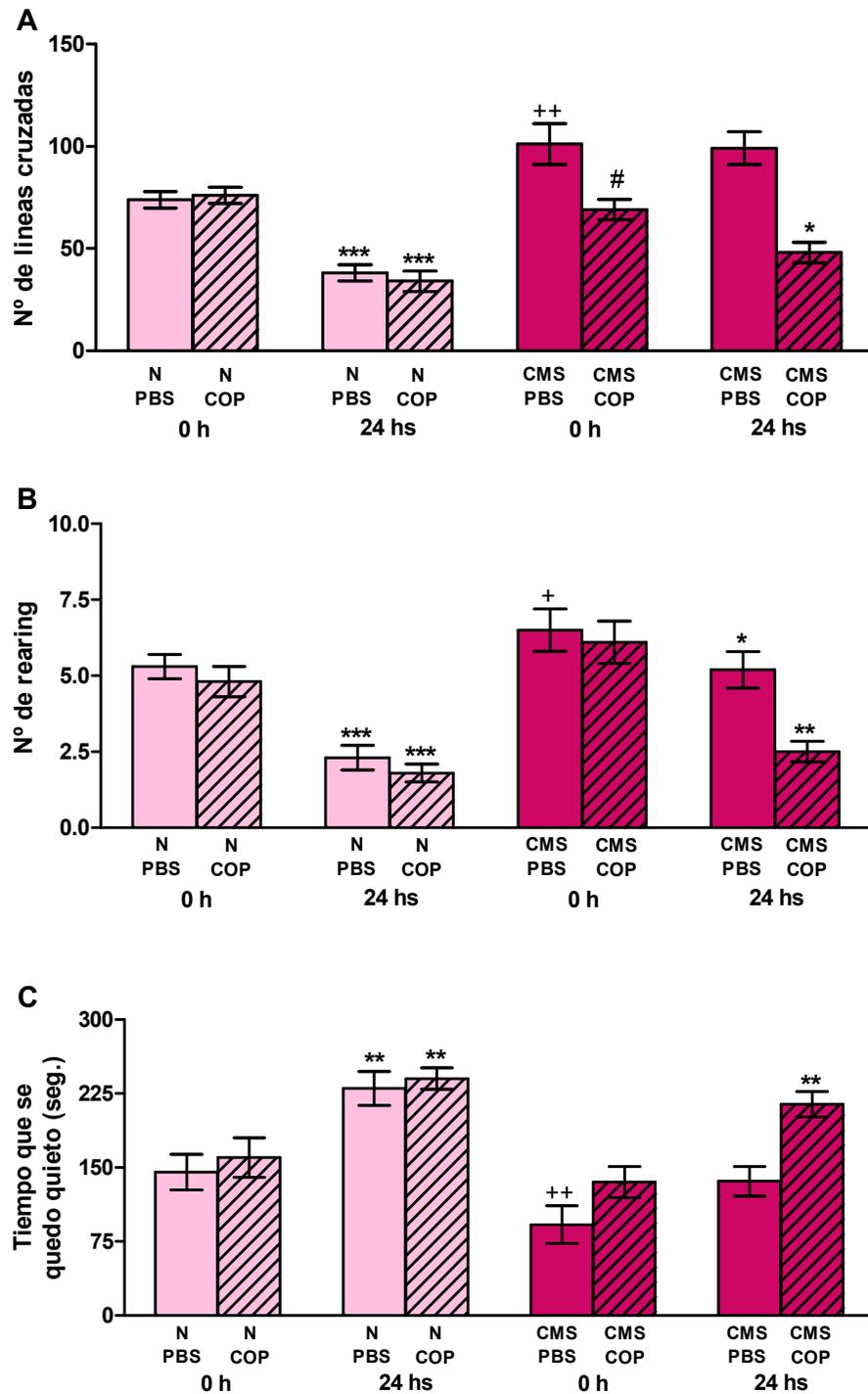
Como se mencionó en la introducción, el Copaxone® puede producir una débil reacción cruzada con autoantígenos residentes en el CNS y puede estimular los efectos de reparación y protección producidos por las células T autoreactivas. Por lo tanto, el siguiente objetivo fue evaluar la acción del Copaxone® sobre los efectos deletéreos del estrés observado en los ratones BALB/c.

### **4.1- Efecto del Copaxone® en ratones estresados sobre el aprendizaje y memoria.**

#### **4.1.1- Efecto del Copaxone® en ratones BALB/c estresados en una prueba de habituación.**

En el punto 1.1.1 se mostró que el estrés indujo un aumento en la actividad locomotora tanto horizontal como vertical y una menor habituación al ambiente novedoso al ser re-expuestos 24 horas después de la primera exposición.

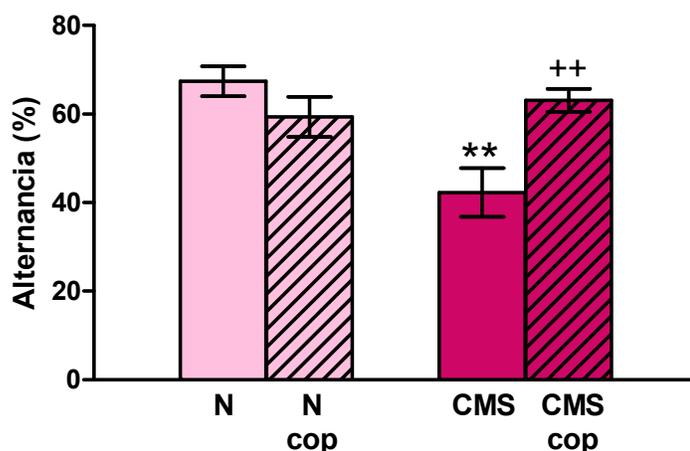
La administración de Copaxone® (COP) pudo revertir los efectos producidos por el estrés crónico. Los resultados representados en la figura 49 indican que estos ratones presentaron una disminución en la actividad locomotora horizontal ( $t = 2,24$ ;  $p < 0,05$ ; panel A) y tuvieron la capacidad de habituarse al ambiente novedoso de manera similar a los BALB/c controles. El ANOVA de 2 factores con mediciones repetidas mostró una disminución en el número de líneas cruzadas ( $t = 2,76$ ;  $p < 0,05$ ; panel A) y de *rearing* ( $t = 3,87$ ;  $p < 0,01$ ; panel B), así como un aumento en el tiempo que los animales se quedaron quietos ( $t = 4,51$ ;  $p < 0,01$ ; panel C) a las 24 horas respecto del entrenamiento. Cabe señalar que el tratamiento con COP no afectó el desempeño de los ratones controles (figura 49).



**Figura 49.** Comportamiento de los ratones en la prueba de campo abierto. Se grafica el número de líneas cruzadas (A), el número de *rearing* (B) y el tiempo que se queda quieto en segundos (C); para animales BALB/c inyectados con PBS (barras lisas) o Copaxone® (COP, barras rayadas), en los grupos control (N) y CMS, en la primera exposición (0h) y en la fase de testeo a las 24 hs. Los resultados expresan la media  $\pm$  ES de 10 animales de cada grupo. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  respecto a la primera etapa. + $p < 0,05$ ; ++ $p < 0,01$  respecto al correspondiente ratón no expuesto a CMS. #  $p < 0,05$  respecto al correspondiente ratón no tratado con Copaxone®.

#### 4.1.2- Comportamiento espontáneo de alternancia evaluado en ratones BALB/c estresados crónicamente y su reversión con Copaxone®.

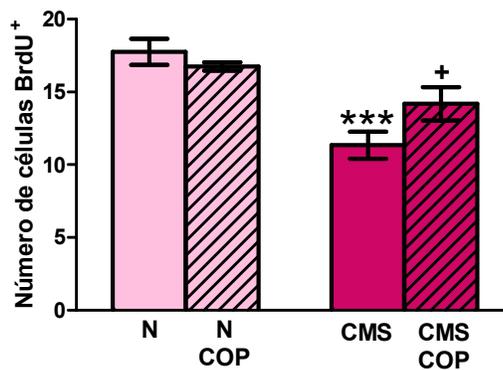
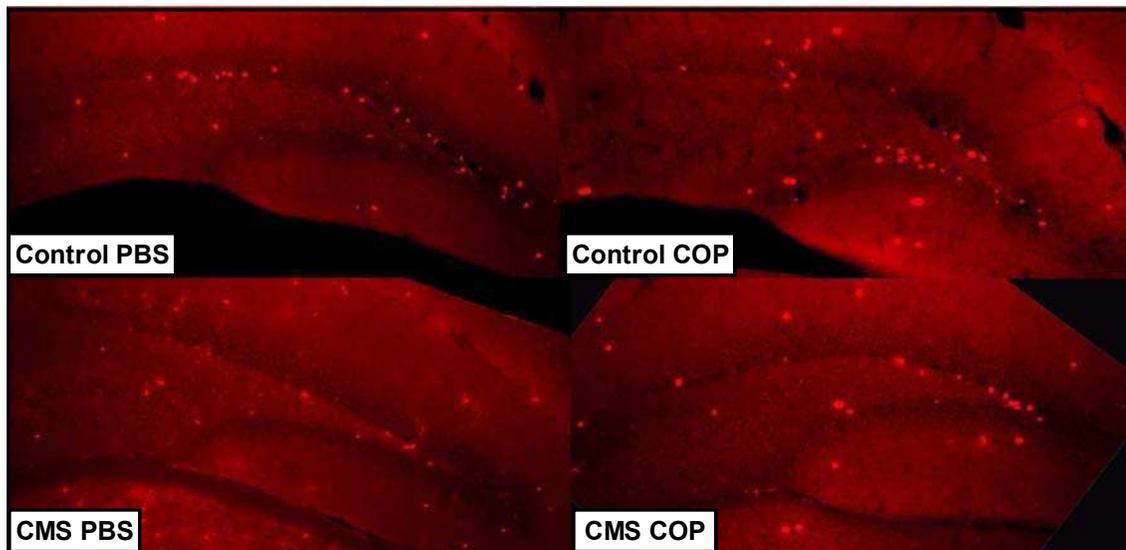
El tratamiento con Copaxone® revirtió la disminución en el porcentaje espontáneo de alternancia provocado por la exposición de los ratones BALB/c a CMS (ANOVA de 2 factores,  $F(1,17) = 9,36$ ;  $p < 0,01$ ; figura 50). La administración de COP no afectó el comportamiento de alternancia de ratones controles ( $F(1,17) = 2,42$ ; NS).



**Figura 50.** Comportamiento de los ratones en el laberinto en forma de Y. El gráfico muestra el comportamiento espontáneo de alternancia en porcentaje en ratones BALB/c inyectados con PBS (barras lisas) o Copaxone® (COP, barras rayadas), en los grupos control (N) y CMS. Los resultados expresan la media  $\pm$  ES de ocho animales de cada grupo. \*\* $p < 0,01$  respecto a su control (N), \*\* $p < 0,01$  respecto a su control (CMS).

#### 4.2- Efecto del estrés crónico en la neurogénesis y su reversión con Copaxone®.

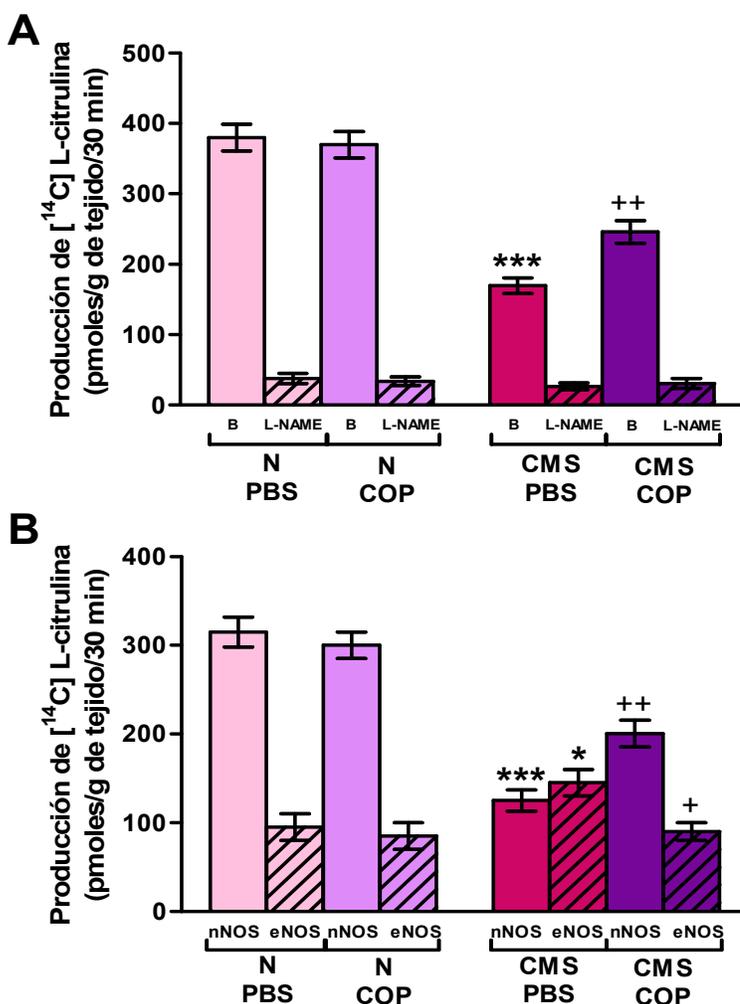
La administración de COP fue capaz de revertir parcialmente la disminución de la neurogénesis observada en ratones BALB/c CMS (ANOVA de 2 factores,  $F(1,20) = 5,32$ ;  $p < 0,05$ ), no modificando la neurogénesis en ratones controles ( $F(1,20) = 0,68$ ; NS) (figura 51).



**Figura 51.** Fotografías representativas del giro dentado del hipocampo de ratones BALB/c control (paneles de arriba) y CMS (paneles de abajo) inyectados con PBS (paneles izquierdos) o Copaxone® (paneles derechos). Los puntos más brillantes indican las células BrdU positivas. El gráfico representa el número de células BrdU positivas para ratones BALB/c controles (N) y CMS, inyectados con PBS (barras lisa) o Copaxone® (barras rayadas). Los resultados expresan la media  $\pm$  ES de ocho cortes de diferentes partes del hipocampo, de seis animales de cada grupo. \*\*\* $p < 0,001$  respecto a su control (N). + $p < 0,05$  respecto a su control (CMS).

### 4.3- Efecto del Copaxone® sobre la actividad de NOS en hipocampo de animales CMS y control.

El tratamiento con Copaxone® revirtió parcialmente la disminución de la actividad de NOS observada en los ratones estresados crónicamente (ANOVA de 2 factores,  $F(1,20) = 10,60$ ;  $p < 0,01$ ; figura 52 A), así como también, restableció la formación de [ $^{14}\text{C}$ ] L-citulina producida por ambas isoformas de NOS, nNOS ( $F(1,20) = 13,31$ ;  $p < 0,01$ ; figura 45 B) y eNOS ( $t = 2,98$ ;  $p < 0,05$ ; figura 52 B).



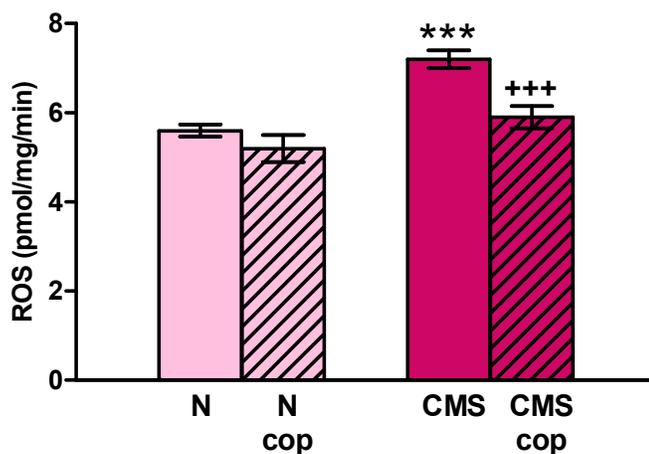
**Figura 52.** Producción de [ $^{14}\text{C}$ ] L-citrulina expresada en pmoles/g de tejido/30 min en hipocampos de ratones BALB/c inyectados con PBS (barras rosas) o Copaxone® (COP, barras violetas), en los grupos control (N) y CMS. Se grafica en **A** la actividad de NOS basal (B) y con el agregado de L-NAME (+L-NAME) y en **B** la actividad de nNOS y eNOS. Los resultados expresan la media  $\pm$  ES de 3 experimentos independientes realizadas con 2 animales de cada grupo. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  con respecto a los ratones no expuesto al CMS; + $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  con respecto a su control inyectado con PBS.

#### 4.4- Efecto del Copaxone® sobre los niveles de ROS y las defensas antioxidantes en hipocampo de ratones BALB/c estresados y controles.

##### 4.4.1- Niveles de ROS en hipocampo de ratones controles y CMS inyectados con Copaxone®.

En el punto 1.6.1 se mostró que los ratones BALB/c expuestos a CMS presentaron un aumento en los niveles de ROS.

El ANOVA de 2 factores indicó una disminución en los niveles de las especies reactivas del oxígeno en los ratones CMS cuando fueron inyectados con COP ( $F(1,20) = 18,78; p < 0,001$ ). Cabe señalar que el Copaxone® no indujo ningún efecto sobre los niveles de ROS en los ratones controles ( $F(1,20) = 1,78; NS$ ) (figura 53).



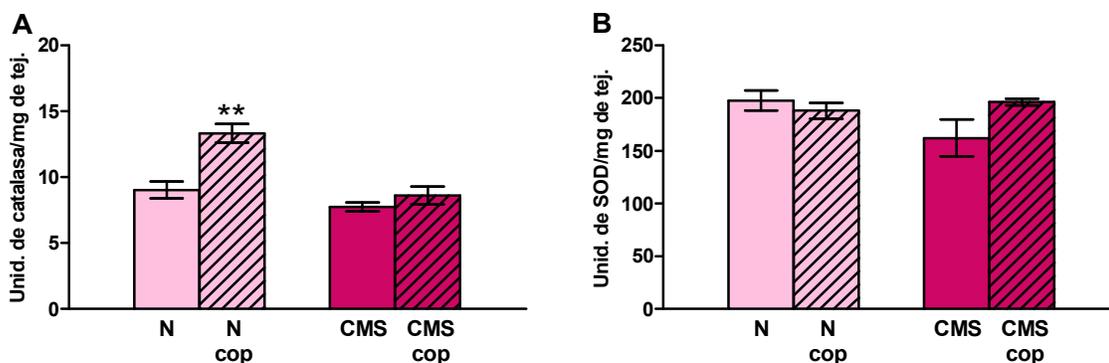
**Figura 53.** Efecto del COP sobre los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) en ratones CMS BALB/c. Producción de ROS, expresada en pmoles/mg de tejido/min, en ratones controles (barras claras) y CMS (barras oscuras), inyectados con PBS (barras lisas) o COP (barras rayadas). Los resultados representan la media  $\pm$  ES de dos experimentos independientes realizados por duplicado con tres animales por grupo. \*\*\* $p < 0.001$  respecto a su control (N); +++ $p < 0.001$  respecto a su control (CMS).

#### 4.4.2- Efecto del Copaxone® sobre las defensas antioxidantes en ratones BALB/c expuestos a CMS.

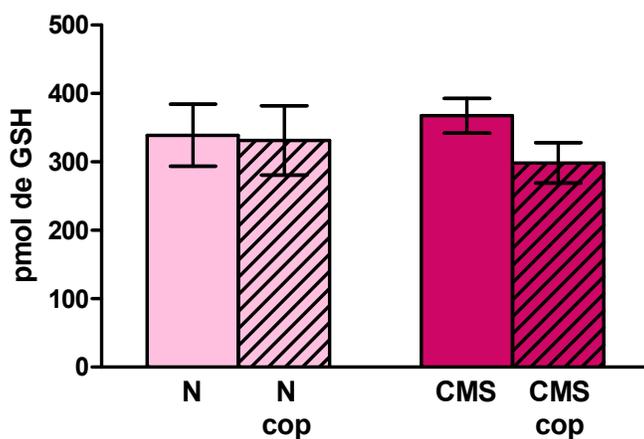
A pesar de no encontrar diferencias en la actividad de catalasa, SOD y en los niveles de glutatión entre los ratones controles y CMS, se investigó la posibilidad de que la acción del COP sobre los niveles de ROS fuera debida a un aumento de las defensas antioxidantes.

El ANOVA de 2 factores indicó que no existieron diferencias significativas en la actividad de catalasa ( $F(1,12) = 0,01$ ; NS; figura 54 A), en la actividad de SOD ( $t = 0,62$ ; NS; figura 54 B) y en los niveles de glutatión ( $t = 0,75$ ; NS; figura 55), para los ratones BALB/c CMS tratados con COP. Sólo se observó un aumento significativo en los ratones controles inyectados con Copaxone® respecto de los no tratados ( $F(1,12) = 13,73$ ;  $p < 0,01$ ).

Además los porcentajes correspondientes a los niveles de GSH y GSSG para ratones estresados y controles, inyectados con Copaxone® o PBS, se encontraron dentro de los niveles esperados (tabla 7).



**Figura 54.** Efecto del Copaxone® sobre la actividad de catalasa y SOD en ratones BALB/c CMS. En **A** se grafican las unidades enzimáticas de catalasa/ mg de hipocampo y en **B** las unidades enzimáticas de SOD/ mg de hipocampo en animales BALB/c control (N) y CMS, inyectados con PBS (barras lisas) o Copaxone® (COP, barras rayadas). Los resultados representan la media  $\pm$  ES de dos experimentos realizados por duplicado, con un total de  $n=4$  de cada grupo para el experimento de catalasa y con un total de  $n=5$  de cada grupo para el experimento de SOD. \*\* $p < 0,01$  con respecto a su control.



**Figura 55.** Niveles de glutatión. El gráfico representa los pmoles de glutatión reducido (GSH) en hipocampo en animales BALB/c control (N) y CMS, inyectados con PBS (barras lisas) o Copaxone® (COP, barras rayadas). Los resultados representan la media  $\pm$  ES de dos experimentos realizados por duplicado con dos animales por grupo.

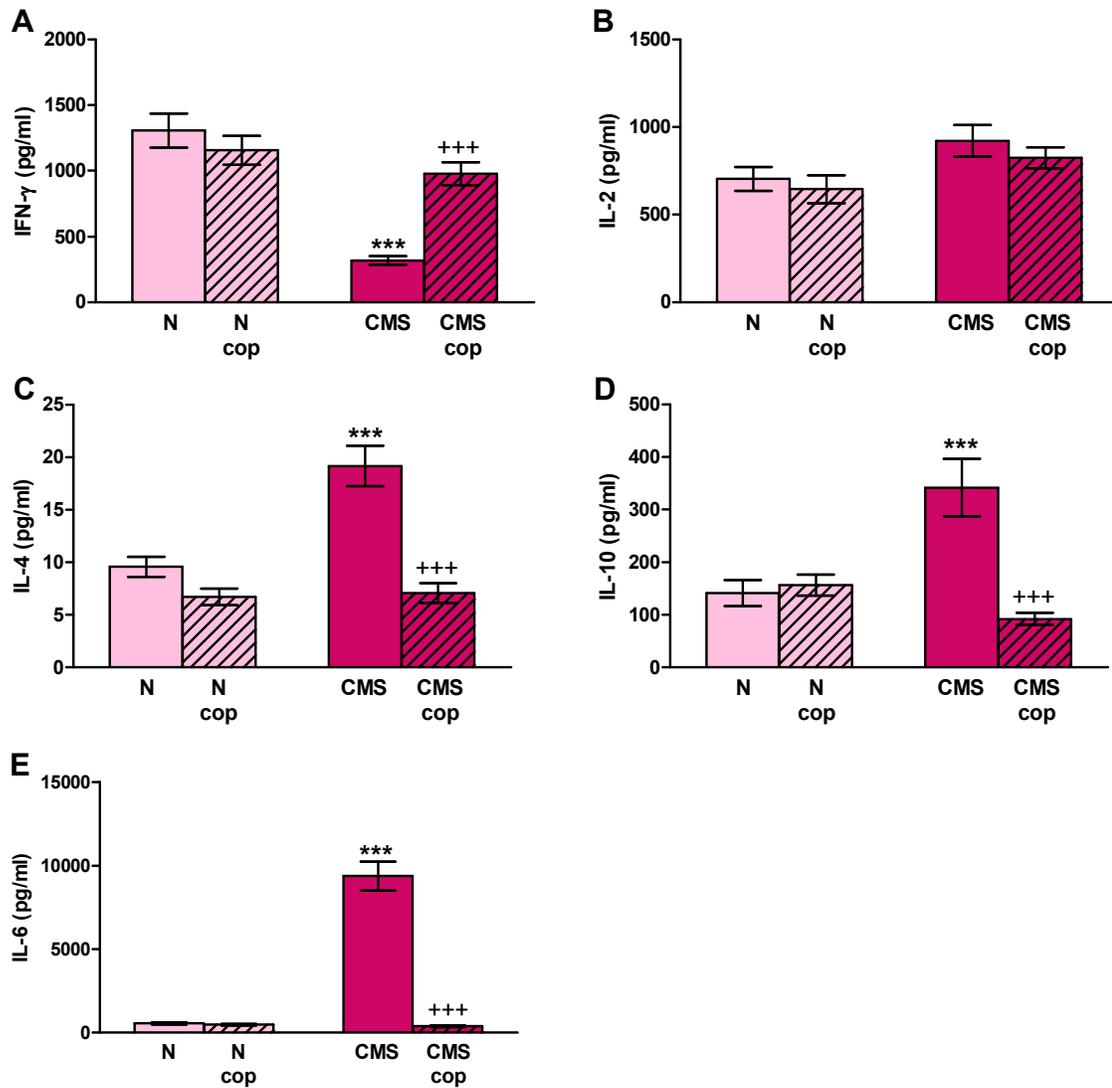
Grupo	inyectado	% de glutatión	
		GSH	GSSG
Control	PBS	91,1 $\pm$ 3	8,9 $\pm$ 3
	COP	92,4 $\pm$ 3	7,6 $\pm$ 3
CMS	PBS	91,5 $\pm$ 2	8,5 $\pm$ 2
	COP	92,3 $\pm$ 3	7,7 $\pm$ 3

**Tabla 6.** Porcentaje de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) en animales BALB/c control y CMS inyectados con Copaxone® o PBS.

#### **4.5- Producción de citoquinas por linfocitos de ratones BALB/c sometidos al modelo de estrés crónico y su reversión con Copaxone®.**

Para estudiar el efecto del Copaxone® sobre la liberación de citoquinas en animales CMS BALB/c, se evaluó la concentración de IFN- $\gamma$  e IL-2 (citoquinas tipo Th1) e IL-4, IL-10 e IL-6 (citoquinas tipo Th2) por enzimo inmuno ensayo (ELISA) en sobrenadantes de linfocitos provenientes de ganglios estimulados con Con A durante 24 horas.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 56. Puede observarse que el tratamiento con COP revirtió la disminución de los niveles de IFN- $\gamma$  producida por la exposición a CMS, no modificando la producción en los ratones controles (ANOVA de 2 factores,  $F(1,20) = 23,24$ ;  $p < 0,0001$  y  $F(1,20) = 1,21$ ; NS, respectivamente, panel A). Por otra parte, la administración de COP no modificó la producción de IL-2 tanto en ratones controles como en los CMS ( $t = 0,54$ ; NS y  $t = 0,91$ ; NS, respectivamente, panel B). Asimismo, se encontró que el tratamiento con COP disminuyó los niveles de IL-4 ( $F(1,20) = 49,33$ ;  $p < 0,00001$ ), IL-10 ( $F(1,20) = 31,67$ ;  $p < 0,0001$ ) e IL-6 ( $F(1,20) = 577$ ;  $p < 0,00001$ ) (paneles C, D y E, respectivamente) aumentados por la exposición a estrés crónico. Además, el tratamiento de animales controles con COP no modificó la producción de citoquinas tipo Th2 [IL-4 ( $F(1,20) = 4,28$ ; NS), IL-10 ( $F(1,20) = 0,33$ ; NS) e IL-6 ( $F(1,20) = 1,00$ ; NS)] (paneles C, D y E, respectivamente).



**Figura 56.** Niveles de citoquinas liberadas en sobrenadantes de linfocitos de ganglios estimulados con Con A en ratones BALB/c inyectados con PBS (barras lisas) o Copaxone® (COP, barras rayadas), en los grupos control (N) y CMS. Los resultados se expresan en pg/ml y representan la media  $\pm$  ES de dos experimentos independientes con 3 animales de cada grupo. \*\*\*p<0,001 respecto a su control (N); +++p<0,001 respecto a su control (CMS).

## **V. DISCUSIÓN**

Numerosas evidencias demuestran que el sistema neuroendocrino (SNE) modula la función inmunológica y, a su vez, mediadores solubles del sistema inmune (SI) son capaces de influenciar la función neuroendocrina. Asimismo, se ha demostrado que variables psicológicas pueden condicionar esta interrelación.

En estudios realizados en seres humanos el principal foco de atención ha sido establecer si existe una asociación entre las características psicológicas (rasgos o estados) y la inmunidad, qué circuitos de conexión, biológicos y conductuales, pueden explicar dicha relación y a través de qué vías las alteraciones inmunológicas pueden ser inducidas psicológicamente con la consecuente susceptibilidad a contraer enfermedades que afecten tanto el SI como el SNE.

En la última década el área de la psiconeuroinmunología se ha desarrollado como una significativa disciplina biomédica. Podemos hablar ahora del SI, el SNE y el sistema nervioso central (SNC) como parte de un sistema integrado de respuesta dado que comparten ligandos (hormonas, neurotransmisores y citoquinas) y receptores formando una compleja red de información bioquímica. Cada componente de esta red evoluciona para desempeñar funciones especializadas monitoreando y respondiendo a información derivada de los otros componentes. Cualquier factor que interrumpe este delicado equilibrio deriva en patologías cuyos signos clínicos pueden manifestarse predominantemente en uno de los sistemas pero, en realidad, toda la red se encuentra alterada. Entre los factores que pueden afectar la homeostasis del organismo, el estrés cobra especial importancia en la actualidad. El estrés puede ser definido como un síndrome o conjunto de reacciones fisiológicas no específicas del organismo a diferentes agentes del ambiente que son percibidos como nocivos. El resultado fisiológico de la respuesta al estrés involucra cambios en casi todos los órganos y funciones del cuerpo. Estos cambios preparan al organismo adecuadamente para enfrentar cualquier situación que represente un desafío. Es decir, que a corto plazo, el estrés resulta en un beneficio y no en un daño para los seres vivos. Pero si la situación persiste, las consecuencias a largo plazo pueden ser desfavorables para el organismo.

El efecto del estrés sobre el aprendizaje y la memoria ha sido bien documentado en diversas especies de animales que van desde los peces hasta el humano (Kim y Yoon, 1998). El hipocampo ha sido identificado como una estructura crucial involucrada en aspectos claves en los procesos de aprendizaje y memoria (Florian y

Roulet, 2004). Esta estructura es particularmente sensible a los efectos del estrés (Kim y Yoon, 1998). En diversos modelos animales se ha descrito que el estrés produce una retracción dendrítica de las neuronas piramidales CA3 (Watanabe y col., 1992; Fluchs and Flugge, 2002), inhibición de la neurogénesis de células granulares del giro dentado (McEwen, 2001) y disminución de la expresión de genes involucrados en la neurogénesis, diferenciación neuronal y remodelación neurítica (Alfonso y col., 2006).

En el presente trabajo de tesis analizamos el efecto del estrés sobre la capacidad de aprendizaje y memoria, su relación con cambios morfológicos y neuroquímicos a nivel del hipocampo y el correlato de estas alteraciones con cambios inmunológicos, específicamente con la secreción de citoquinas tipo Th1 y Th2. Además investigamos si la regulación del sistema inmune es capaz de mejorar las consecuencias deletéreas de la exposición a estrés crónico. Como estrategia experimental utilizamos dos cepas de ratón que difieren en el tipo de respuesta inmunológica frente a un desafío antigénico. La cepa BALB/c tiene respuestas con predominio de citoquinas tipo Th2, mientras que la cepa C57BL/6 tiene respuestas tipo Th1, presentando diferencias tanto en la inmunidad innata como en la adquirida (Watanabe y col., 2004; Guiñazú y col., 2004). Por otra parte, difieren en varias respuestas comportamentales, en el neurodesarrollo y en parámetros neuroquímicos. La cepa BALB/c es considerada emotiva y ansiogénica, con actividad locomotora basal baja y aumentada reactividad al estrés; mientras que la cepa C57BL/6 es considerada no emotiva, no ansiogénica y activa en diferentes situaciones experimentales, como la prueba de campo abierto y el laberinto elevado en forma de cruz (Tassin y col., 1980; Marona-Lewicka y Vertulani, 1989; Lepicard y col., 2000; Belzung y Griebel, 2001; Tang y col., 2002; Dulawa y col., 2004). En lo que respecta a los estudios neuroquímicos, los ratones BALB/c presentan la mitad de los niveles de serotonina en el prosencéfalo que los ratones C57BL/6 (Zhang y col., 2004). La concentración de 17-OH-pregnenolona, un neuroesteroide asociado con el comportamiento como la agresión, adaptación al estrés o aprendizaje en ratones, en el cerebro entero en C57BL/6 fue significativamente mayor que en los ratones BALB/c (Tagawa y col., 2006). Además, elevados niveles de corticosterona inducidos por estrés fueron observados en ratones BALB/c comparado con los C57BL/6 (Priebe y col., 2006).

A fin de estudiar los efectos producidos por el estrés crónico en ambas cepas de ratón, BALB/c y C57BL/6, elegimos el modelo de estrés crónico impredecible desarrollado por Willner y col. (1992) en rata y por Monleón y col. (1995) en ratón. Este es un modelo que utiliza estresores calificados como moderados implicando un bajo grado de estrés ofreciendo una aproximación razonable a los diversos estresores que enfrenta el ser humano en su vida cotidiana. Es decir, que ofrece una simulación realista de los efectos biológicos del estrés crónico (Willner y col., 1992).

En primer lugar analizamos si la exposición a este modelo era capaz de producir alteraciones en el aprendizaje y memoria en las dos cepas de ratón, BALB/c y C57BL/6. Comprobamos en la prueba de habituación, en la de evitación condicionada por *shock* eléctrico plantal y en el laberinto en forma de Y, que los ratones BALB/c estresados mostraron una menor capacidad de aprendizaje y memoria no asociativa, asociativa y espacial evaluadas respectivamente en estas pruebas. Los animales C57BL/6 estresados no presentaron diferencias respecto a los controles en cuanto a la capacidad de aprendizaje y memoria en las pruebas mencionadas anteriormente. En la prueba de reconocimiento de objetos, ni los ratones BALB/c ni los ratones C57BL/6 sometidos a CMS mostraron diferencias respecto a sus controles. Esto puede deberse a que en este tipo de procesamiento, no sólo está involucrado el hipocampo, sino también otras áreas cerebrales como la corteza inferotemporal (Hoffman y Logothetis, 2009). De hecho, ha sido demostrado que para alterar este tipo de memoria es necesaria una destrucción de alrededor del 75%-100% del hipocampo dorsal (Broadbent y col., 2004).

Asimismo observamos en los animales BALB/c que el estrés produjo cambios estructurales en el hipocampo, encontrándose una disminución en el espesor de las zonas CA1 y CA3. Además, encontramos una menor cantidad de neuronas, especialmente evidente en la zona CA3. Es posible que este menor número de neuronas sea principalmente debido a la disminución en la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo. Efectivamente comprobamos que se generaron alrededor de un 40% menos de neuronas en estos animales. Markakis and Gage (1999) han demostrado que las nuevas neuronas que se encuentran en la capa de células granulares envían sus axones a las células piramidales de la zona CA3, área apropiada de proyección para las células granulares. Las células maduras marcadas

con BrdU en la capa de células granulares están también rodeadas por vesículas sinápticas, indicando que ellas reciben *inputs* sinápticos (Gould y col., 1999; van Praag y col., 2002). Además, el aumento de la neurogénesis en respuesta a una carrera voluntaria ha sido correlacionado con un aumento en la potenciación a largo término (LTP) en las células granulares (van Praag y col., 1999). Estos estudios demuestran que las células recién formadas que se diferencian en neuronas maduras se integran en el circuito hipocampal existente y podrían aumentar la capacidad funcional de esta estructura.

Por el contrario, en los ratones C57BL/6 estresados no observamos cambios en el número de neuronas en las zonas CA1 y CA3. Interesantemente, hallamos un aumento significativo en el espesor de la región CA3 del hipocampo. Resultados similares fueron reportados por Duric y McCarson (2005) en un modelo de estrés y dolor en rata. Estos autores encuentran edema en el hipocampo en las etapas más tempranas de exposición a estrés que tiende a desaparecer con el tiempo, apareciendo atrofia celular en estadíos más avanzados. Es posible que dado que los ratones C57BL/6 son más resistentes a los efectos del estrés, este aumento de espesor se corresponda a una etapa más temprana de los cambios producidos por el estrés en el hipocampo.

Muchos estudios han demostrado la participación del hipocampo en los procesos de aprendizaje y memoria. En particular la zonas CA1 y CA3 constituyen importantes áreas involucradas en estos procesos (Daumas y col., 2005). La plasticidad de la zona CA3 actuaría como una matriz autoasociativa capaz de relacionar y almacenar patrones de información proyectados desde el hipocampo hacia la corteza entorrinal (Steffenach y col., 2002). Nuestros resultados están de acuerdo con estos y otros estudios que demuestran que la pérdida de volumen en el hipocampo tendría una significación funcional asociada a la pérdida de memoria (Sheline y col., 2002).

El estrés oxidativo, caracterizado por un aumento en los niveles de radicales libres y especies reactivas que no alcanza a ser compensado por los sistemas de defensa antioxidantes, ha sido fuertemente implicado en patologías que cursan con neurodegeneración. Entre las especies reactivas de mayor trascendencia en los sistemas biológicos se encuentran las especies reactivas del oxígeno (ROS) y las del nitrógeno (RNS). Entre estas especies, se encuentra el NO que al tener en su molécula un electrón no apareado, es altamente reactivo con diferentes moléculas

como los radicales superóxido, las hemoproteínas, los grupos tiol y amino, así como con el oxígeno, y consecuentemente participa en diferentes mecanismos de señalización al regular la actividad de varias proteínas y la expresión de genes.

El NO es un importante regulador de la función neural siendo neuroprotector a bajos niveles y neurotóxico a altas concentraciones (Colasanti y Susuki, 2000). El NO es una molécula de señalización retrógrada que transfiere información de los terminales nerviosos post a presinápticos y estaría involucrado en procesos de aprendizaje y memoria conservados a lo largo de la evolución (Bredt y Snyder, 1992; Blackshaw y col., 2003). La producción de este mensajero está regulada por una serie de quinasas entre las que está especialmente involucrada la proteína quinasa C. Además se ha propuesto que esta enzima podría jugar un papel importante en los procesos que participan en el aprendizaje y la memoria (Nogués y col., 1996).

Si bien los efectos del estrés crónico sobre el aprendizaje y la memoria, así como los cambios estructurales en el hipocampo han sido bien definidos, la participación de la NOS y la PKC en estos fenómenos no han sido estudiados.

A fin de analizar si el deterioro de la memoria provocado por el estrés se relaciona con la producción de NO, utilizamos dos estrategias: la producción de NO *in vitro* en el hipocampo y el efecto en el comportamiento producido por inhibición de la NOS *in vivo*.

Los resultados mostraron que los ratones BALB/c estresados presentan una marcada disminución en la actividad de la NOS calcio dependiente. Esta disminución fue debida principalmente a una importante disminución en la actividad de nNOS que no puede compensarse con el aumento de la actividad de la eNOS. Estos cambios en la actividad se relacionaron con la expresión proteica de estas isoenzimas (eNOS y nNOS). En los ratones C57BL/6 expuestos a estrés si bien disminuyeron los niveles proteicos de NOS en el hipocampo, la actividad de NOS no se alteró significativamente.

La producción de NO puede conducir tanto a neurotoxicidad como a neuroprotección dependiendo de la concentración, del sitio donde se produce, de la presencia de estrés oxidativo y del tipo de proceso neurodegenerativo implicado (Lipton, 1999; Iadecola, 1997; Chiueh, 1999). Así se ha descrito que bajas concentraciones de NO protegen contra la toxicidad mediada por especies reactivas del oxígeno (Wink y col., 1995). Además fue demostrado, tanto *in vitro* como *in vivo*, que durante la

injuria cerebral el NO puede ser parte de una respuesta fisiológica para contrarrestar el daño celular (Khaldi y col., 2002). Se ha propuesto que una respuesta fisiopatológica normal del tejido dañado puede involucrar una controlada producción de NO y la inhibición de esta respuesta podría interferir con el proceso de reparación tisular. Es posible que el aumento observado en la actividad de eNOS pudiera representar un mecanismo compensatorio para balancear la producción de NO en el hipocampo, tal como fuera encontrado por Zorrilla-Zubilete y col. (2005) en cerebelo de ratas irradiadas al nacimiento y como fuera sugerido por Hernández y col. (2004) para el cerebelo de ratas con cirrosis.

Sin embargo altas concentraciones de NO después de la inducción de iNOS participa en eventos neurodestrutivos a través de la formación de especies tóxicas y de la nitrosilación de proteínas (Szabo y col., 2007; Pacher y col., 2007). Así, ha sido sugerido que la inducción de iNOS juega un importante papel en el déficit cognitivo que aparece durante el envejecimiento (McCann y col., 2005). En tal sentido, Law y col. (2002) encuentra una significativa disminución de la actividad y expresión de nNOS y un incremento en la de iNOS en el hipocampo de ratas envejecidas, junto con un impedimento en la memoria espacial, sugiriendo una asociación entre déficit cognitivo y la variación en las isoformas de NOS. Asimismo en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Huntington y Parkinson existe un incremento en los genes que codifican para iNOS, conduciendo a un subsecuente aumento en la producción de NO que podría contribuir a la etiopatogénesis de estas enfermedades (Liberatore y col., 1999).

La posibilidad de un mecanismo de modulación de la producción de NO por el propio NO surge cuando Griscavage (1993) demuestra la inhibición de la actividad de iNOS por NO. Asimismo se ha demostrado que el NO fue capaz de suprimir la transcripción de genes que codifican la iNOS en una amplia variedad de tipos celulares (Mariotto y col., 1995; Colasanti y col., 1995). Sin embargo, en nuestro modelo no encontramos un aumento significativo en la actividad de iNOS inducido por la exposición a estrés crónico. Además los niveles de esta proteína fueron muy bajos tanto en el hipocampo normal como en el estresado, no pudiendo detectarse ni expresión proteica por técnicas de *western blot* ni presencia del ARN mensajero por técnicas de RT-qPCR (RT-PCR en tiempo real) (datos no mostrados). De manera similar otros autores (Necchi y col., 2002 y Liu y col., 2003) tampoco encontraron actividad detectable ni expresión proteica de iNOS en hipocampo de ratas

envejecidas. Además, Blum-Degen y col. (1999) reportaron que la iNOS no fue detectable en el cerebro humano durante el envejecimiento. Finalmente, Liu y col. (2003) proponen que es posible especular que la nNOS y la eNOS pueden tener un papel de mayor importancia en el proceso normal de envejecimiento que la iNOS.

En lo que respecta al efecto sobre la memoria producido por la administración de un inhibidor de nNOS, el déficit cognitivo fue observado en los animales BALB/c después de la segunda semana de tratamiento. De manera similar, los ratones C57BL/6 mostraron un deterioro en la memoria después de una semana de tratamiento con el inhibidor de NOS. Estos resultados indicarían que el desempeño en las pruebas de aprendizaje y memoria en los C57BL/6 no está afectado por el estrés porque la producción de NO no es alterada significativamente por el estrés. Además cuando la producción de NO fue inhibida, se observó un deterioro de la memoria tanto en los ratones C57BL/6 como en los BALB/c.

Estos resultados refuerzan el importante papel del NO en el aprendizaje y la memoria. Varios estudios sostienen la idea de que una producción deficiente de NO está relacionada con el deterioro en el aprendizaje y la memoria y con la neurodegeneración. Las neuronas que contienen NOS son resistentes a la neurodegeneración en la enfermedad de Huntington (HD) y la reducción de los niveles de ARNm de nNOS han sido encontrados en esta enfermedad (Norris y col., 1996). Estudios en los cuales se utilizaron ratones transgénicos como modelo para la HD también sugieren que la disminución en la producción de NO por la nNOS, participaría en la neurodegeneración característica de esta enfermedad (Deckel y col., 2001). Además, García-Arenas y col. (2004) indican que el déficit en la memoria por intoxicación con plomo en animales adultos podría ser relacionado con el efecto inhibitorio de la actividad de NOS constitutiva en una región específica del hipocampo. Baratti y col. (2008) demostraron que la administración de L-NAME después de la primera prueba de retención (reactivación de la memoria) de la respuesta de evitación inhibitoria deteriora el funcionamiento de la retención más de seis días consecutivos.

En conjunto, estos resultados indican que el NO tiene un papel biológico fundamental en los procesos de aprendizaje y memoria, ya que la inhibición de su síntesis conlleva a un déficit cognitivo tanto en ratones de la cepa BALB/c como de la C57BL/6. La diferente susceptibilidad a los efectos deletéreos del estrés sobre la

memoria de ambas cepas, podría estar relacionada a la regulación diferencial de la actividad de NOS en las mismas. Estudios *in vitro* o en células transfectadas han documentado claramente la fosforilación de la NOS constitutiva por diferentes quinasas, incluyendo la PKC, que inhibe la actividad catalítica de la enzima (Dimerman y col., 1994; Brown y col., 1999). Otros autores confirmaron similares efectos en neuronas intactas (Riccio y col., 1996; Kim y col., 2003). Además, la activación de la NOS por PKC ha sido estudiada en neuronas en cultivo (Marin y col., 1992) y en estudios *in vivo* (Hammer y col., 1993). Por otra parte, Okada (1995) demostró que la PKC es capaz de aumentar la actividad de la NOS a bajas concentraciones de calcio libre correspondientes a los niveles de células en reposo, concluyendo que la PKC regula la sensibilidad de la NOS al calcio.

La PKC representa una familia de al menos diez isoformas que juegan un papel central en la transducción de señales involucradas en el control de numerosos procesos celulares. La existencia de la gran familia de isoformas de PKC que se encuentran distribuidas de manera diferente en los tejidos, poseen distinta localización subcelular y diferentes propiedades bioquímicas, sugieren que cada isoforma podría jugar un papel específico en las funciones celulares. En algunos casos, las isoformas de PKC poseen distintos e incluso opuestas funciones celulares (Sossin, 2007).

Con el fin de estudiar el papel de la PKC y como ésta interviene regulando los niveles de NO, la actividad de esta enzima fue evaluada. Los BALB/c estresados y controles mostraron una actividad similar de PKC en hipocampo. En los ratones C57BL/6 CMS se observó una disminución en la actividad de PKC respecto a los C57BL/6 controles. Además, en los ratones BALB/c la inhibición de la actividad de PKC, llevó a la inhibición de la actividad de NOS en los ratones controles, pero produjo un incremento de la actividad de NOS en ratones estresados. Por el contrario, en animales C57BL/6, la inhibición de la actividad de la PKC produjo una disminución en la actividad de NOS tanto en ratones controles como expuestos a estrés crónico. Es decir, que la PKC podría estar regulando diferencialmente la actividad de NOS dependiendo de la cepa de ratón y de la exposición o no a estrés. Por tal motivo evaluamos si diferentes patrones en la expresión de isoformas de PKC pudieran estar participando en los efectos del estrés sobre la actividad de NOS. Para analizar esta alternativa, estudiamos por *western blot* las isoformas más importantes descritas en cerebro ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$ ). Los resultados mostraron un

aumento significativo de PKC $\zeta$  y PKC $\gamma$  en hipocampo de ratones BALB/c CMS, mientras que los animales C57BL/6 CMS presentaron un aumento de PKC $\delta$  y una disminución en PKC $\beta$ I.

A pesar de conocerse el papel para la familia de enzimas de PKC en varias formas de aprendizaje en mamíferos, las contribuciones específicas de los subtipos de PKC en el aprendizaje y la memoria aún no se conocen con exactitud. Algunos estudios utilizando estrategias farmacológicas o genéticas han investigado el papel específico de las isoformas de PKC en el aprendizaje y la memoria. Van der Zee y col. (1992) demostraron que la memoria espacial está relacionada con cambios en la PKC $\gamma$  hipocampal en ratones. Además, ratones mutantes para PKC $\gamma$  presentan un déficit en el LTP en el área CA1 del hipocampo, el cual se correlaciona con el déficit observado en la memoria espacial y contextual (Abeliovich y col., 1993). Sin embargo, Colombo y col. (1997) encontraron en ratas envejecidas una correlación entre el deterioro de la memoria y la alta expresión de PKC $\gamma$  en el hipocampo. Un incremento en la expresión de PKC $\gamma$  fue observado en el hipocampo de ratas sometidas a estrés por inmovilización durante 8 días (Krugers y col., 1997) o por tratamiento crónico con dexametasona (Dwivedi y Pandey, 1999). Además, varios autores han demostrado que las isoformas PKC $\beta$ II y  $\zeta$  intervienen promoviendo la muerte neuronal en hipocampo de rata (McNamara y col., 1999; Koponen y col., 2003; Tang y col., 2004; Bloch-Schilderman y col., 2005). Paratcha y col. (2000) mostraron que la PKC $\beta$ I es requerida en la fase temprana de formación de la memoria en una prueba de aprendizaje de evitación inhibitoria. Sin embargo, otros autores mostraron que los ratones C57BL/6 deficientes en PKC $\beta$  no presentan déficit en la transmisión sináptica hipocampal o en el LTP. No se han encontrado cambios en la plasticidad sináptica en ratones *knockout* para PKC $\delta$ .

Todas estas evidencias sugerirían la posibilidad de que el aumento en PKC $\gamma$  y  $\zeta$  observado en los ratones BALB/c sometidos a estrés crónico estuviera contribuyendo al déficit cognitivo. Por el contrario, la regulación de las isoformas de PKC durante la exposición a estrés, con una importante disminución en PKC $\beta$ I, podría estar protegiendo a los ratones C57BL/6 de los efectos del estrés.

Como ha sido mencionado, el estrés oxidativo ha sido implicado en la patogénesis de muchas enfermedades neurodegenerativas y neurológicas (Ischiropoulos y

Beckman, 2003) considerando a las ROS como parte de los efectores intracelulares del daño. Bajo condiciones normales, estas especies tóxicas son producidas por el metabolismo celular y neutralizadas por las defensas antioxidantes endógenas. Sin embargo, bajo condiciones adversas, estas defensas antioxidantes podrían resultar insuficientes para mantener los niveles de ROS fisiológicos llevando a un aumento de la vulnerabilidad y eventualmente a la muerte celular (Ischiropoulos y Beckman, 2003). Estudios previos han sugerido que la formación de ROS durante la exposición a NMDA está involucrada en el disparo de la cascada excitotóxica (Kishida y clan, 2007). Dentro de este contexto, encontramos un aumento en la producción de ROS tanto basal como estimulada por NMDA en hipocampo de ratones BALB/c CMS con respecto a los animales controles. En cuanto a las defensas antioxidantes, no se observaron diferencias significativas en las actividades de catalasa y SOD como así tampoco en los niveles de glutatión. En el hipocampo de los ratones C57BL/6 CMS el estrés no afectó significativamente ni la producción de ROS, tanto basal como estimulada con NMDA, ni los niveles de las defensas antioxidantes. Estos resultados estarían indicando que el estrés induce un aumento en la vulnerabilidad hacia los mecanismos neurotóxicos en el hipocampo de ratones BALB/c pero no en los C57BL/6.

Cabe destacar que, al inhibir la actividad de nNOS (principal productor de NO en el hipocampo), la producción de ROS aumenta tanto en los ratones BALB/c como en los C57BL/6, aunque en estos últimos el aumento fue más tardío. Estos resultados indicarían que el aumento basal de ROS inducido por el estrés en los ratones BALB/c podría ser debido a la disminución en la producción de NO y no por una disminución de las defensas antioxidantes. Estos hallazgos puntualizan el papel del NO como una importante defensa frente a estímulos neurotóxicos en condiciones fisiológicas.

Por otro lado, Koponen y col. (2003) han sugerido un papel para PKC $\zeta$  en la excitotoxicidad inducida por NMDA. Ellos demuestran que la inhibición de la actividad de PKC $\zeta$  confiere protección a las neuronas en cultivo expuestas a concentraciones tóxicas de NMDA capaces de producir muerte por excitotoxicidad. Al respecto en nuestro modelo encontramos una mayor producción de ROS inducida por concentraciones tóxicas de NMDA en el hipocampo de ratones BALB/c

sometidos a estrés crónico, conjuntamente con un aumento de los niveles de PKC $\zeta$ . Queda por dilucidar si el incremento de PKC $\zeta$  modula la producción de ROS de manera directa o a través de la regulación de la actividad de NOS, indicando una mayor susceptibilidad a un estímulo neurotóxico.

Por otra parte, muchos estudios han mostrado que los niveles basales de neurotrofinas son alterados en situaciones de estrés (Spillantini y col., 1989; Smith, 1996). Niveles anormales de neurotrofinas son también reportados en suero, líquido cefalorraquídeo, órganos periféricos y cerebro de roedores y humanos afectados por enfermedades neurológicas (Zochodne, 1996; Connor and Dragunow, 1998; Stuart and Apfel, 1999), inflamatorias y autoinmunes (Aloe y col., 1994; 1997).

Tanto los niveles de NGF como los de BDNF en el cerebro son marcadamente afectados por situaciones de estrés. Se ha hipotetizado que los niveles disminuidos de BDNF representa uno de los mecanismos moleculares responsables del daño y atrofia del hipocampo inducido por el estrés (Duman y Monteggia, 2006; Thoenen, 1995). Sin embargo, los cambios inducidos por el estrés en los niveles de BDNF varían según el área cerebral analizada (Cirulli y Alleva, 2009; Smith y col., 1995). Por ejemplo, se han encontrado niveles disminuidos de BDNF en el hipocampo (Duman y Monteggia, 2006; Smith, 1996; Vaidya y Duman, 2001; Yan y col., 2010), y niveles aumentados en el hipotálamo (Rage y col., 2002).

En varios modelos animales de depresión se han estudiado los efectos antidepresivos por la administración exógena de BDNF en regiones específicas del cerebro (Duman y Monteggia, 2006), demostrando que el aumento de BDNF en el hipocampo, es suficiente para producir una respuesta antidepresiva. También, la infusión de NT3, pero no de NGF, en el giro dentado induce una respuesta antidepresiva en dos modelos animales de depresión (prueba de nado forzado y desesperanza aprendida), sugiriendo especificidad en la acción de las neurotrofinas (Shirayama y col., 2002).

En este trabajo, no encontramos diferencias significativas en los niveles de ARNm de las neurotrofinas BDNF, NT3 y NGF en el hipocampo de ratones expuestos a CMS ni en la cepa BALB/c ni en la C57BL/6. Sin embargo, no podemos descartar la participación de las neurotrofinas en nuestro modelo de estrés crónico ya que no hemos determinado los niveles proteicos de neurotrofinas ni de receptores para las mismas.

Estudios sobre las interacciones entre el cerebro y el sistema inmune han revelado la conexión bidireccional entre el sistema nervioso, el neuroendocrino y el sistema inmune (Sternberg, 2000). Se han descrito alteraciones inmunológicas asociadas al estrés, tales como una disminución de la actividad citotóxica de células asesinas naturales (NK) (Nuñez y col., 2006), disminución de la respuesta T proliferativa (Frick y col., 2009), disminución de la actividad fagocítica de macrófagos (Palerno-Neto y col., 2003), cambios en la relación de las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (Stefanski y Engler, 1998) y cambios del patrón de citoquinas (Liu y col., 2007; Kiank y col., 2006). Por lo tanto, evaluamos el efecto del estrés crónico sobre el sistema inmune mediante un abordaje *ex vivo*, por la capacidad para proliferar de los linfocitos y de producir citoquinas Th1 y Th2; y un abordaje *in vivo* mediante el análisis de la respuesta inmune humoral y la determinación de las subpoblaciones de linfocitos T. En ratones BALB/c CMS encontramos una disminución en la proliferación de linfocitos T inducida por mitógenos, mientras que la proliferación de linfocitos B aumentó. Por el contrario, en ratones C57BL/6 CMS se observó un aumento en la proliferación de linfocitos T y no se encontraron cambios en la proliferación de linfocitos B.

Al estudiar *in vivo* la respuesta inmune humoral tras la inoculación de antígenos T-dependientes (GRc) o independientes (LPS), observamos que la exposición al estrés en ratones BALB/c y C57BL/6 tuvo un efecto inmunosupresor sobre la producción de anticuerpos tipo IgG. Este efecto fue especialmente importante en los ratones BALB/c expuestos a estrés, mientras que en los C57BL/6 CMS sólo se observó una leve disminución del título de anticuerpos comparados con sus respectivos controles. Además, el estrés no afectó la producción de anticuerpos tipo IgM en ninguna de estas cepas. Es importante señalar, que si bien el estrés produce en los ratones BALB/c un aumento en la producción de citoquinas tipo Th2, que favorece la inmunidad humoral, nuestros resultados no se corresponden con este supuesto. El hallazgo de que la síntesis de anticuerpos IgG frente a una inmunización con un antígeno T-dependiente es menor puede deberse a una falla en la estimulación de los linfocitos T, que se correlaciona con una menor reactividad medida *in vitro* y a una alteración en la señalización intracelular en estas células como fuera demostrado previamente por Silberman y col. (2005).

En lo referente a la distribución de subpoblaciones linfocitarias CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, no se encontraron cambios significativos inducidos por el estrés en las cepas de ratón en estudio.

Para determinar el balance Th1/Th2, se evaluó la producción de IFN- $\gamma$  e IL-2 como citoquinas Th1 e IL-4, IL-10 e IL-6 como citoquinas Th2 en sobrenadantes de linfocitos estimulados provenientes de ratones BALB/c y C57BL/6. Encontramos que la exposición al estrés crónico indujo en ratones BALB/c una disminución en la producción de IFN- $\gamma$  y un aumento en IL-4, IL-10 e IL-6. En ratones C57BL/6 estresados encontramos un aumento significativo para IFN- $\gamma$  e IL-2 y una disminución en la IL-4 e IL-10. Estos resultados sugieren que el estrés aumenta la respuesta tipo Th2 en ratones BALB/c y la respuesta tipo Th1 en ratones C57BL/6. Es importante aclarar que no se encontraron cambios significativos en la producción de IL-6 en macrófagos, bajo estas condiciones (datos no mostrados). Interesantemente encontramos una correlación entre el aumento de citoquinas tipo Th2 y el déficit cognitivo inducido por el estrés en ratones BALB/c.

El IFN- $\gamma$  fue sugerido para mejorar la neurodegeneración en un gran número de enfermedades neuroinflamatorias crónicas, incluyendo la esclerosis múltiple y la infección por HIV-1 (Benveniste, 1997; Popko y col., 1997). Sin embargo, Koustova y col. (2000) informaron en un modelo de encefalopatía retroviral que los procesos inmunes regulados por el IFN- $\gamma$  podrían ser requeridos para suprimir la neurodegeneración asociada con el estado inflamatorio crónico. Loewenbrueck y col. (2010) mostraron por primera vez que las células T de memoria tipo Th1 específicas para la proteína amiloide  $\beta$ 1-42 (A $\beta$ 1-42) están presentes en humanos jóvenes, produciendo altos niveles de IFN- $\gamma$  e IL-2. Por el contrario, en individuos con la enfermedad de Alzheimer se produce sólo IL-10 en ausencia de algún efector de citoquina. Estos autores postularon que esta respuesta Th1 específica para A $\beta$ 1-42 tiene un papel beneficioso en humanos removiendo la A $\beta$ 1-42. Además fue descripta una asociación entre el apoyo social percibido y la dominancia hacia Th1 (Miyazaki y col., 2005).

Considerando estos hallazgos, es posible sugerir que el aumento de IFN $\gamma$ , observado en ratones C57BL/6 CMS, podría constituir un mecanismo protector contra los efectos deletéreos del estrés. En los ratones BALB/c, la disminución de IFN $\gamma$  sumado a la importante disminución en la producción de IL-6, podrían

constituir un mecanismo que contribuya a procesos que lleven a la neurodegeneración. De hecho, el bloqueo de la IL-6 endógena después de un aprendizaje espacial de alternancia que depende del hipocampo dio como resultado una significativa mejora en la memoria a largo término (Balschun y col., 2004). Además, ratones *knockout* para IL-6 mostraron una facilitación en el aprendizaje en el laberinto radial durante 30 días, en términos de bajo número de errores en la memoria de trabajo (Braidá y col., 2004). Estudios recientes han sugerido que la IL-1 $\beta$  hipocampal es también requerida en el cerebro para la regulación fisiológica en los procesos de memoria (Goshen y col., 2007; Labrousse y col., 2009). Además, altos niveles de esta citoquina producen efectos que perjudican el funcionamiento de la memoria (Goshen y col., 2007). Probablemente, los niveles de IL-1 $\beta$  en el hipocampo y de otras citoquinas podrían estar alterados en los ratones expuestos a CMS, como lo describió Koo y Duman (2008). Sin embargo, parece ser improbable que el aumento de IL-1 $\beta$  esté involucrado, ya que se ha demostrado que la IL-1 media este efecto vía activación adrenocortical (Goshen y col., 2008) y en nuestro modelo CMS el deterioro de la memoria no está relacionado con el incremento de corticosterona. Está demostrado que el estrés involucra la activación del eje HPA y el SNC y a su vez modula la respuesta inmune. También fue demostrado que la administración de corticosterona induce atrofia neuronal en el área CA3 del hipocampo, el cual induce deterioro en la memoria (McEwen, 2001). En este contexto, se investigó la participación de la activación del eje HPA y del SNC en cuanto a los efectos inmunológicos y en el comportamiento inducidos por la exposición a CMS. Los animales BALB/c sometidos a CMS mostraron un aumento en los niveles de corticosterona y catecolaminas en las primeras tres semanas, volviendo a los niveles basales después de cuatro semanas de exposición a estrés. Sin embargo, tanto las alteraciones en la respuesta inmune como el deterioro de la memoria aparecen después de la cuarta semana de exposición a estrés. Teniendo en cuenta esto, no habría una relación temporal entre el incremento de corticosterona (en la primera y segunda semana de estrés) y las alteraciones en el comportamiento (a partir de la cuarta semana de estrés). Es importante aclarar que no descartamos que un aumento temprano de la hormona pudiera estar induciendo cambios tardíos a nivel inmunológico y comportamental. Por otra parte, en los ratones C57BL/6 CMS se observó un aumento de corticosterona en la tercera y

cuarta semana y de catecolaminas sólo a la cuarta semana, sin encontrarse deterioro en la memoria. Estos resultados apoyan la hipótesis de que no hay una relación directa entre el aumento de corticosterona y el déficit cognitivo. Sin embargo, cabe la posibilidad que esta diferencia en el perfil temporal de variación de estas hormonas pueda tener alguna relación con la diferente susceptibilidad al estrés.

Schwartz y su grupo de investigación han estado trabajando desde hace más de un década sobre las interacciones entre el sistema inmune y el sistema nervioso. Sus observaciones usando diversas estrategias lo llevaron a formular una interesante teoría en la cual propone que la propia inmunidad (inmunidad protectora) juega un papel importante en el mantenimiento, la protección y la reparación del SNC normal y dañado (Schwartz y col., 2009). Esta respuesta inmune beneficiosa es dependiente de la inmunidad innata y adaptativa, y la pérdida de la autoinmunidad podría acelerar las condiciones degenerativas en el SNC. Además, encontraron un efecto beneficioso en la vacunación con Cop-1 (Copaxone®), un fármaco apropiado para el tratamiento de la esclerosis múltiple. Este grupo propuso que este efecto beneficioso es obtenido a través de una reacción inflamatoria bien controlada, y que la actividad del Cop-1 conduce esta reacción por la capacidad de servir como un “antígeno universal” mediante la activación débil de un amplio espectro de células T autoreactivas. Llama la atención que el mismo compuesto (Cop-1) podría ser útil para el tratamiento de dos condiciones opuestas. Así, el Cop-1 regula la supresión inmune en enfermedades autoinmunes y la activación inmune en enfermedades neurodegenerativas. El éxito del tratamiento es encontrar los regímenes terapéuticos óptimos de Cop-1 para las diferentes condiciones. Un tratamiento corto conduce a una respuesta Th1 débil, regulada y beneficiosa para las enfermedades neurodegenerativas. Tratamientos crónicos conducen a una respuesta Th2 beneficiosa en enfermedades autoinmunes (Kipnis y Schwartz, 2002). En este contexto, este grupo encontró que el tratamiento inmune con un péptido relacionado con el SNC que activa débilmente las células T autoreactivas mejora el comportamiento depresivo en ratas expuestas al modelo de CMS. Esta mejora en la conducta fue acompañada por la restauración de los niveles de BDNF y de la neurogénesis en el hipocampo (Lewitus y col., 2008). Además, este enfoque terapéutico redujo la ansiedad inducida por el estrés y la respuesta de sobresalto

acústico, restableció los niveles de BDNF, demostrando ser importante para la resistencia al estrés (Lewitus y col., 2009). Es importante notar que en ambos trabajos el tratamiento fue aplicado una semana antes de la exposición a estrés, es decir que el Cop-1 previno los efectos producidos por el estrés.

En este trabajo demostramos, por primera vez, que el tratamiento con Copaxone® administrado después de la exposición al modelo de CMS es capaz de revertir el deterioro en la memoria producido por el estrés. Particularmente, los ratones BALB/c CMS tratados con Copaxone® pudieron revertir el déficit cognitivo, la disminución de la neurogénesis en el hipocampo, de la actividad de NOS y de los niveles de ROS y el balance de citoquinas hacia Th2 observado en los ratones BALB/c estresados.

Finalmente, teniendo en cuenta nuestros resultados podemos concluir que los ratones BALB/c son más vulnerables a los efectos del estrés que los ratones C57BL/6.

Los mecanismos que participan de esta diferente susceptibilidad serían múltiples. Por un lado podría deberse a una regulación diferencial de la actividad de PKC que daría como resultado efectos distintos sobre la actividad de NOS dependiendo de la cepa en estudio y de su exposición a estrés. Es posible que alguna isoforma de PKC pueda aumentar o disminuir la actividad de NOS. Asimismo demostramos con diferentes estrategias experimentales la importancia de la nNOS en los procesos de aprendizaje y memoria. La disminución de la actividad de esta enzima llevó a un aumento del estrés oxidativo que podría conducir a neurotoxicidad que llevaría a una disminución en la neurogénesis que finalmente produciría trastornos cognitivos.

Por otra parte, este déficit cognitivo se correlaciona con la regulación diferencial del balance de citoquinas Th1/Th2. En los C57BL/6 el estrés induce una respuesta hacia Th1 con un aumento en la producción de IFN- $\gamma$  que podría ser un mecanismo protector contra los procesos neurodegenerativos. De hecho, los C57BL/6 estresados no mostraron cambios significativos en la producción de ROS ni cambios en la estructura ni en la neurogénesis en el hipocampo. Por el contrario, el aumento de las citoquinas tipo Th2 y la disminución de IFN- $\gamma$  se correlaciona con el déficit cognitivo en ratones BALB/c CMS. En estos animales el estrés indujo toxicidad en el

tejido seguido de un aumento de estrés oxidativo, pérdida neuronal y disminución de la neurogénesis.

Además, los cambios observados en los ratones BALB/c expuestos a estrés crónico que llevaron al déficit cognitivo pudieron ser revertidos por la administración de Copaxone® que restablece el balance Th1/Th2. Faltaría establecer cuál sería el mecanismo molecular a través del cual estas citoquinas restablecen la homeostasis oxidativa regulando los niveles de NO.

Por último, estos hallazgos señalan que las terapias basadas en la modulación de la inmunidad podrían ser muy útiles para el tratamiento de déficit cognitivos inducidos por estrés. Y dejan abierta la posibilidad de que, la evaluación del perfil inmunológico de cada individuo constituiría una herramienta importante para elaborar estrategias más precisas para el tratamiento de pacientes que sufren patologías relacionadas al estrés crónico caracterizadas por déficit cognitivo y/o neurodegeneración.

## **VI. CONCLUSIONES**

En ratones BALB/c la exposición a estrés crónico moderado indujo:

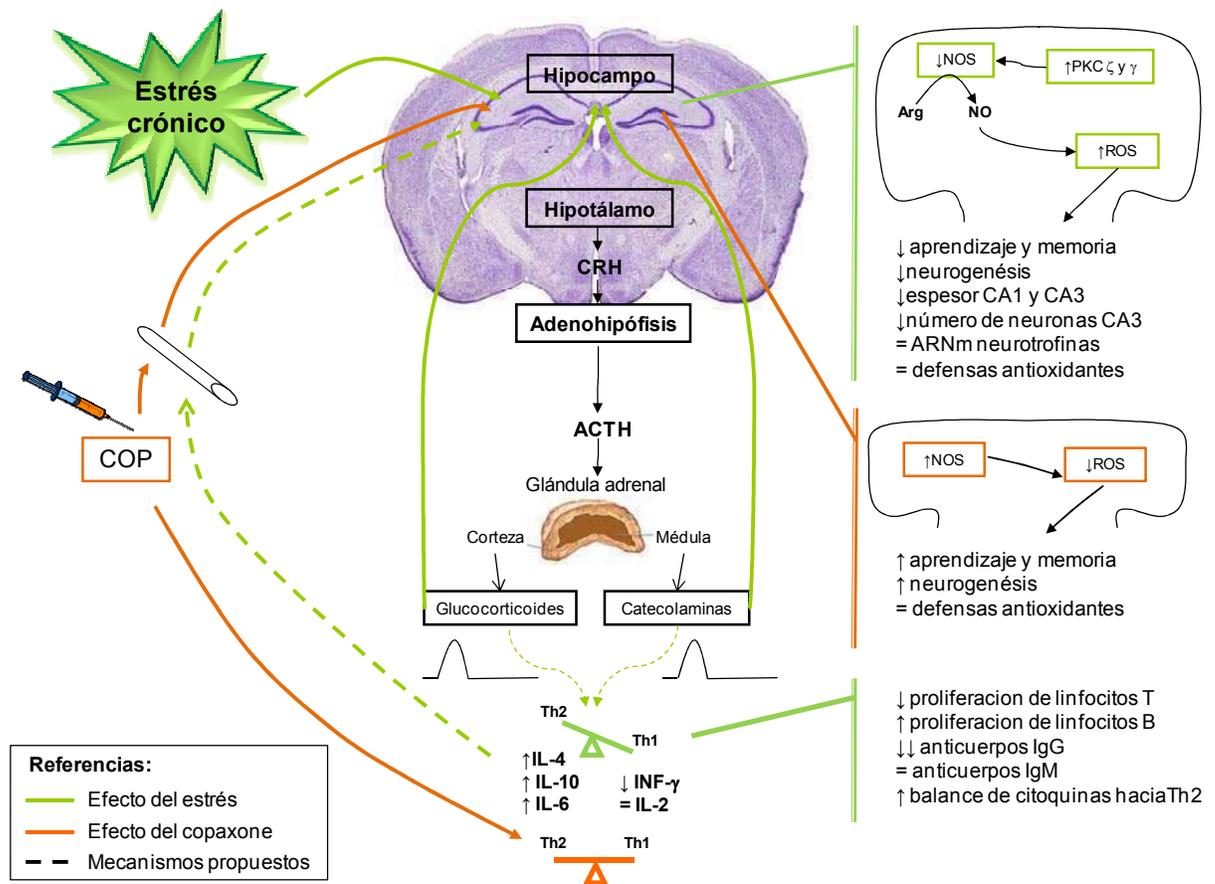
- una menor capacidad de aprendizaje y memoria;
- cambios estructurales en las zonas CA1 y CA3 del hipocampo;
- disminución de la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo;
- alteraciones en la actividad y niveles proteicos de nNOS;
- un aumento en la expresión de las isoformas de PKC $\zeta$  y  $\gamma$ ;
- un incremento en la producción de ROS, sin cambios en las defensas antioxidantes;
- una alteración en la respuesta inmune. Particularmente, disminuye la respuesta mediada por linfocitos T y aumenta la reactividad de linfocitos B;
- un aumento temprano en los niveles de corticosterona y catecolaminas;
- un desbalance de citoquinas hacia Th2, evidenciado por una disminución de IFN- $\gamma$  y aumento de IL-4, IL-6 e IL-10.
- La administración de Copaxone® restablece el balance Th1/Th2, revirtiendo los cambios neuroquímicos y cognitivos.

En ratones C57BL/6 la exposición a estrés crónico moderado:

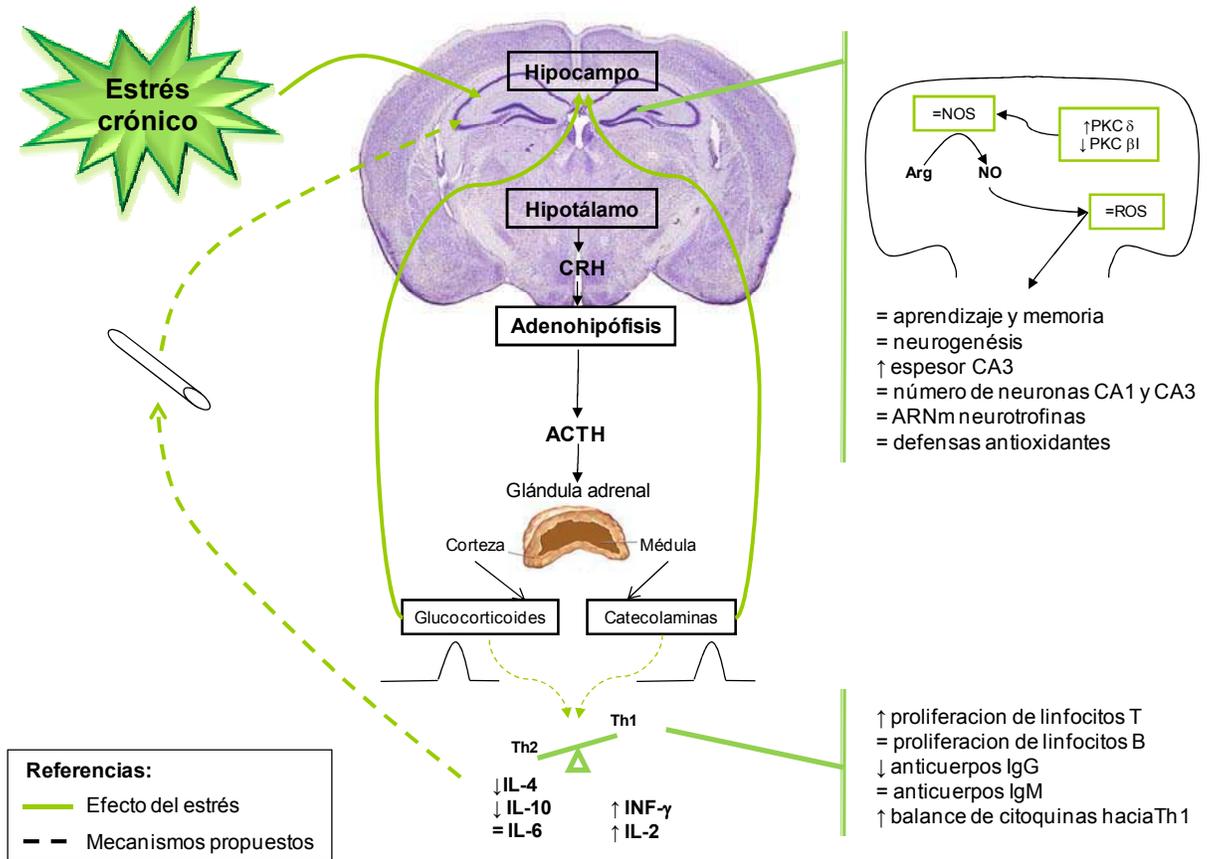
- no provocó cambios en el aprendizaje y la memoria;
- no indujo cambios estructurales en las zonas CA1 y CA3 del hipocampo;
- no alteró la neurogénesis en el hipocampo;
- no alteró la actividad ni los niveles proteicos de NOS;
- disminuyó la actividad de PKC y provocó cambios en los niveles proteicos de las isoformas de PKC. Puntualmente aumentó la PKC $\delta$  y disminuyó la PKC $\beta$ I;
- no provocó cambios en los niveles de ROS ni en las defensas antioxidantes;
- aumentó la reactividad de los linfocitos T sin cambios en la respuesta B;
- un aumento tardío en los niveles de corticosterona y catecolaminas;
- indujo un desbalance de citoquinas hacia Th1.

Finalmente, podemos concluir que los ratones BALB/c son más vulnerables a los efectos del estrés crónico que los ratones C57BL/6. Estas diferencias estarían relacionadas al perfil inmunológico propio de cada cepa. El restablecimiento de los parámetros inmunológicos, específicamente el balance Th1/Th2 mejora el déficit cognitivo que se observa en los ratones BALB/c. A continuación se muestra un esquema que resume estos resultados y los posibles mecanismos participantes luego de la exposición a estrés crónico en cada una de estas cepas.

**BALB/c:**



C57BL/6:



## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

- Abeliovich A., Paylor R., Chen C., Kim J.J., Wehner J.M., Tonegawa S. (1993). PKC gamma mutant mice exhibit mild deficits in spatial and contextual learning. *Cell* 75:1263-1271.
- Abrous D.N., Koehl M., Le Moal M. (2005). Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev.* 85:523-69.
- Adcock I.M., Ito K. (2000). Molecular mechanisms of corticosteroid actions. *Monaldi Arch Chest Dis* 55:256-266.
- Ader R., Cohen N. (1993). Psychoneuroimmunology: Conditioning and stress. *Ann Rev Psychol* 44:53-85.
- Alfonso J., Frick L.R., Silberman D.M., Palumbo M.L., Genaro A.M., Frasch A.C. (2006). Regulation of hippocampal gene expression is conserved in two species subjected to different stressors and antidepressant treatments. *Biol. Psychiatry* 59:244-251.
- Aloe L. (2001). Nerve growth factor and neuroimmune responses: basic and clinical observations. *Arch. Physiol. Biochem.* 109:354-356.
- Aloe L., Bracci-Laudiero L., Bonini S., Manni L. (1997). The expanding role of nerve growth factor: from neurotrophic activity to immunologic diseases. *Allergy* 52:883-894.
- Aloe L., de Simone M., Properzi F. (1999). Nerve growth factor: a neurotrophin with activity on cells of the immune system. *Microscope Res. Technique* 45:285-291.
- Aloe L., Skaper S.D., Leon A., Levi-Montalcini R. (1994). Nerve growth factor and autoimmune disease. *Autoimmunity* 19:141-150.
- Altman J., Das G.D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.* 124:319-335.
- Angelov D.N., Waibel S., Guntinas-Lichius O., Lenzen M., Neiss W.F., Tomov T.L., Yoles E., Kipnis J., Schori H., Reuter A., Ludolph A., Schwartz M. (2003). Therapeutic vaccine for acute and chronic motor neuron diseases: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:4790-4795.
- Aoyama K., Matsumura N., Watabe M., Nakaki T. (2008a). Oxidative stress on EAAC1 is involved in MPTP-induced glutathione depletion and motor dysfunction. *Eur J Neurosci.* 27:20-30.
- Aoyama K., Watabe M., Nakaki T. (2008b). Regulation of neuronal glutathione synthesis. *J Pharmacol Sci.* 108:227-238.
- Arqué G., Fotaki V., Fernández D., Martínez de Lagrán M., Arbonés M.L., Dierssen M. (2008). Impaired spatial learning strategies and novel object recognition in mice

- haploinsufficient for the dual specificity tyrosine-regulated kinase-1A (Dyrk1A). *PLoS One*. 3:e2575.
- Atsuta J., Plitt J., Bochner B.S., Schleimer R.P. (1999). Inhibition of VCAM-1 expression in human bronchial epithelial cells by glucocorticoids. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 20:643-650.
- Avidan H., Kipnis J., Butovsky O., Caspi R.R., Schwartz M. (2004). Vaccination with autoantigen protects against aggregated beta-amyloid and glutamate toxicity by controlling microglia: effect of CD4+CD25+ T cells. *Eur J Immunol.* 34:3434-3445.
- Balschun D., Wetzel W., Del Rey A., Pitossi F., Schneider H., Zuschratter W., Besedovsky H.O. (2004). Interleukin-6: a cytokine to forget. *FASEB J.* 18:1788-1790.
- Banks W.A., Kastin A.J., Broadwell R.D. (1995). Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation* 2:241-248.
- Baratti C.M., Boccia M.M., Blake M.G., Acosta G.B. (2008). Reactivated memory of an inhibitory avoidance response in mice is sensitive to a nitric oxide synthase inhibitor. *Neurobiol Learn Mem.* 89:426-440.
- Barbado Alonso J.A., Aizpiri Díaz J., Cañones Garzón P. J., Fernández Camacho A., Gonçalves Estella F., Rodríguez Sendín J. J., De la Serna de Pedro I., Solla Camino J. M. (2002). Aspectos sobre neurobiología de la conducta humana. *Medicina General* 45:500-513.
- Barnea A., Nottebohm F. (1994). Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:11217-11221.
- Barres B.A., Raff M.C., Gaese F., Bartke I., Dechant G., Barde Y.A. (1994). A crucial role for neurotrophin-3 in oligodendrocyte development. *Nature.* 367:371-375.
- Beckman J.S., Koppenol W.H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 271:1424-1437.
- Beers R.F. Jr., Sizer I.W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol. Chem.* 195:133-140.
- Belzung C., Griebel G. (2001). Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: A review. *Behav. Brain Res.* 125:141-149.
- Benner E.J., Mosley R.L., Destache C.J., Lewis T.B., Jackson-Lewis V., Gorantla S., Nemachek C., Green S.R., Przedborski S., Gendelman H.E. (2004). Therapeutic immunization protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:9435-9440.

- Benveniste E.N. (1997). Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J. Mol. Med.* 75:165-173.
- Binder D.K., Scharfman H.E. (2004). Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors* 22:123-131.
- Bishop A., Anderson J.E. (2005). NO signaling in the CNS: from the physiological to the pathological. *Toxicology* 208:193-205.
- Bishop G.R., Jaso-Friedmann L., Evans D.L. (2000). Activation-induced programmed cell death of nonspecific cytotoxic cells and inhibition by apoptosis regulatory factors. *Cell Immunol.* 199:126-137.
- Blackshaw S., Eliasson M.J., Sawa A., Watkins C.C., Krug D., Gupta , Arai T., Ferrante R.J., Snyder S.H. (2003). Species, strain and developmental variations in hippocampal neuronal and endothelial nitric oxide synthase clarify discrepancies in nitric oxide-dependent synaptic plasticity. *Neuroscience* 119: 979-990.
- Blalock J.E. (1994). The syntax of immune neuroendocrine communication. *Immunol. Today* 15:504-511.
- Bloch-Shilderman E., Kadar T., Levy A., Sahar R., Rabinovitz I., Gilat E. (2005). Subcellular alterations of protein kinase C isozymes in the rat brain after organophosphate poisoning. *J Pharmacol Exp Ther* 313:1082-1089.
- Blum R., Konnerth A. (2005). Neurotrophin-mediated rapid signaling in the central nervous system: mechanisms and functions. *Physiology (Bethesda)*. 20:70-78.
- Blum-Degen D., Heinemann T., Lan J., Pedersen V., Leblhuber F., Paulus W., Riederer P., Gerlach M. (1999). Characterization and regional distribution of nitric oxide synthase in the human brain during normal ageing. *Brain Res.* 834(1-2):128-35.
- Bluthé R.M., Dantzer R., Kelley K.W. (1997). Central mediation of the effects of interleukin-1 on social exploration and body weight in mice. *Psychoneuroendocrinology* 22:1-11.
- Bluthé R.M., Michaud B., Poli V., Dantzer R. (2000). Role of IL-6 in cytokine-induced sickness behavior: A study with IL-6 deficient mice. *Physiol Behav* 70:367-373.
- Bonfoco E., Krainc D., Ankarcrona M., Nicotera P., Lipton S.A. (1995). Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:7162-7166.

- Boumpas D.T., Chrousos G.P., Wilder R.L., Cupps T.R., Balow J.E. (1993). Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann. Intern. Med.* 119:1198-1208.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- Braida D., Sacerdote P., Panerai A.E., Bianchi M., Aloisi A.M., Iosue S., Sala M. (2004). Cognitive function in young and adult IL (interleukin)-6 deficient mice. *Behav. Brain Res.* 153:423-429.
- Bredt D.S., Snyder S.H. (1992). Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 8:3-11.
- Broadbent N.J., Squire L.R., Clark R.E. (2004). Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:14515-14520.
- Bronzetti E., Artico M., Pompili E., Felici L.M., Stringaro A., Bosco S., Magliulo G., Colone M., Arancia G., Vitale M., Fumagalli L. (2006). Neurotrophins and neurotransmitters in human palatine tonsils: An immunohistochemical and RT-PCR analysis. *Int J Mol Med* 18:49-58.
- Brown L.A., Key B.J., Lovick T.A. (1999). Bio-imaging of nitric oxide-producing neurones in slices of rat brain using 4,5-diaminofluorescein. *J. Neurosci. Methods* 15:101-110.
- Buchner K., Adamec E., Beermann M.L., Nixon R.A. (1999). Isoform-specific translocation of protein kinase C following glutamate administration in primary hippocampal neurons. *Mol Brain Res.* 64:222-235.
- Buckingham J.C. (2007). Glucocorticoids, role in stress. *Encyclopedia of Stress.* George Fink. 2nd ed. 2:210-217.
- Butovsky O., Koronyo-Hamaoui M., Kunis G., Ophir E., Landa G., Cohen H., Schwartz M. (2006). Glatiramer acetate fights against Alzheimer's disease by inducing dendritic-like microglia expressing insulin-like growth factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:11784-11789.
- Bylund D.B., Eikenberg D.C., Hieble J.P., Langer S.Z., Lefkowitz R.J., Minneman K.P., Molinoff P.B., Ruffolo R.R. Jr., Trendelenburg U. (1994). International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev.* 46:121-136.
- Cain D.P., Saucier D., Boon F. (1997). Testing hypotheses of spacial learning: the role of NMDA receptors and NMDA-mediated long-term potentiation. *Behav Brain Res.* 84:179-193.

- Cameron H.A., McKay R.D. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 435:406-417.
- Canossa M., Giordano E., Cappello S., Guarnieri C., Ferri S. (2002). Nitric oxide down-regulates brain-derived neurotrophic factor secretion in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:3282-3287.
- Caraceni A., Martini C., Belli F., Mascheroni L., Rivoltini L., Arienti F., Cascinelli N. (1993). Neuropsychological and neurophysiological assessment of the central effects of interleukin-2 administration. *Eur J Cancer* 29:1266-1269.
- Cerutti P., Ghosh R., Oya Y., Amstad P. (1994). The role of the cellular antioxidant defense in oxidant carcinogenesis. *Environ Health Perspect.* 10:123-129.
- Chalmers A.H., Blake-Mortimer J.S., Winefield A.H. (2003). The prooxidant state and psychologic stress. *Environ Health Perspect.* 111:16.
- Chance B., Sies H., Boveris A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 59:527-605.
- Chelikani P., Fita I., Loewen P.C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci.* 61:192-208.
- Chiueh C.C. (1999). Neuroprotective properties of nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci.* 890:301-311.
- Cirulli F., Alleva E. (2009). The NGF saga: from animal models of psychosocial stress to stress-related psychopathology. *Front Neuroendocrinol.* 30:379-95.
- Colasanti M., Persichini T., Menegazzi M., Mariotto S., Giordano M., Caldarera C. M., Sogos V., Lauro G. M., Suzuki H. (1995). Induction of nitric oxide synthase mRNA expression. *J Biol Chem.* 270:26731-26733.
- Colasanti M., Suzuki H. (2000). The dual personality of NO. *Trends Pharmacol Sci.* 21:249-252.
- Colombo P.J., Wetsel W.C., Gallagher M. (1997). Spatial memory is related to hippocampal subcellular concentrations of calcium-dependent protein kinase C isoforms in young and aged rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:14195-14199.
- Connor B., Dragunow M. (1998). The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res. Rev.* 27:1-39.
- Costa M.S., Botton P.H., Mioranza S., Ardais A.P., Moreira J.D., Souza D.O., Porciúncula L.O. (2008). Caffeine improves adult mice performance in the object recognition task

- and increases BDNF and TrkB independent on phospho-CREB immunocontent in the hippocampus. *Neurochem. Int.* 53:89-94.
- Cruz R., Almaguer Melian W., Bergado Rosado J.A. (2003). Glutathione in cognitive function and neurodegeneration. *Rev Neurol.* 36:877-886.
- Culcasi M., Lafon-Cazal M., Pietri S., Bockaert J. (1994). Glutamate receptors induce a burst of superoxide via activation of nitric oxide synthase in arginine-depleted neurons. *J Biol Chem.* 269:12589-12593.
- Dantzer R. (2001). Cytokine -induced sickness behavior: Where do we stand? *Brain Behav Immun* 15:7-24.
- Dantzer R., Bluthé R.M., Aubert A., Goodall G., Bret-Dibat J.L., Kent S., y col. (1996). Cytokine actions on behavior. *Cytokines in the nervous system.* NJ Rothwell. 117-145.
- Dantzer R., Wollman E.E. (2003). Relationship between the brain and the immune system. *J Soc Biol* 197:81-88.
- Daumas S., Halley H., Francés B., Lassalle J.M. (2005). Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: differential involvement of dorsal CA3 and CA1 hippocampal subregions. *Learn. Mem.* 12:375-382.
- Dawson V.L., Dawson T.M. (1996). Nitric oxide actions in neurochemistry. *Neurochem Int.* 29:97-110.
- de Oliveira R.M., Aparecida Del Bel E., Mamede-Rosa M.L., Padovan C.M., Deakin J.F., Guimarães F.S. (2000). Expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in stress-related brain areas alter restraint in rats. *Neurosci Lett.* 289:123-126.
- De Sarro C.B., Masuda Y., Ascoti C., Audino M.G., Nistico G. (1990). Behavioural and ECoG spectrum changes induced by intracerebral infusion of interferons and interleukin 2 in rats are antagonized by naloxone. *Neuropharmacology* 29:167-179.
- Dean D.H., Hiramoto R.N., Ghanta V.K. (1987). Modulation of immune responses. A possible role for murine salivary epidermal and nerve growth factors. *J. Periodontol.* 58:498-500.
- Deckel A.W., Gordinier A., Nuttal D., Tang V., Kuwada C., Freitas R., Gary K.A. (2001). Reduced activity and protein expression of NOS in R6/2 HD transgenic mice: effects of L-NAME on symptom progression. *Brain Res.* 919:70-81.
- Delves P.J., Roitt I.M. (2000a). The immune system. First of two parts. *N Engl J Med.* 343:37-49.

- Delves P.J., Roitt I.M. (2000b). The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med.* 343:108-117.
- DeRijk R.H., Schaaf M., de Kloet E.R. (2002). Glucocorticoid receptor variants: clinical implications. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 81:103-122.
- Dhabhar F.S., McEwen B.S. (1999). Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:1059-1064.
- Diamond M.C., Weidner J., Schow P., Grell S., Everett M. (2001). Mental stimulation increases circulating CD4-positive T lymphocytes: a preliminary study. *Brain Res Cogn Brain Res.* 12:329-331.
- Dillon G.M., Qu X., Marcus J.N., Dodart J.C. (2008). Excitotoxic lesions restricted to the dorsal CA1 field of the hippocampus impair spatial memory and extinction learning in C57BL/6 mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* 90:426-433.
- Dinerman J.L., Steiner J.P., Dawson T.M., Dawson V., Snyder S.H. (1994). Cyclic nucleotide dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase inhibits catalytic activity. *Neuropharmacology* 33:1245-1251.
- Dringen R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol.* 62:649-671.
- Dubey A., Forster M.J., Lal H., Sohal R.S. (1996). Effect of age and caloric intake on protein oxidation in different brain regions and on behavioral functions of the mouse. *Arch Biochem Biophys.* 333:189-197.
- Dulawa S.C., Holick K.A., Gundersen B., Hen R. 2004. Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology* 29:1321-1330.
- Duman R.S., Monteggia L.M. (2006). A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol. Psychiatry* 59:1116-1127.
- Duric V., McCarson K.E. (2005). Hippocampal neurokinin-1 receptor and brain-derived neurotrophic factor gene expression is decreased in rat model of pain and stress. *Neuroscience* 133:999-1006.
- Dwivedi Y., Pandey G.N. (1999). Administration of dexamethasone upregulates protein kinase C activity and the expression of  $\gamma$  and  $\epsilon$  protein kinase C isozymes in the rat brain. *J. Neurochem.* 72:380-397.
- Edgar V.A., Cremaschi G.A., Sterin-Borda L., Genaro A.M. (2002). Altered expression of autonomic neurotransmitter receptors and proliferative responses in lymphocytes

- from a chronic mild stress model of depression: effects of fluoxetine. *Brain Behav Immun.* 16:333-350.
- Elenkov I.J. (2004). Glucocorticoids and the Th1/Th2 Balance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1024:138-146.
- Epel E.S. (2009). Psychological and metabolic stress: a recipe for accelerated cellular aging?. *Hormones (Athens)* 8:7-22.
- Eriksson P.S., Perfilieva E., Björk-Eriksson T., Alborn A.M., Nordborg C., Peterson D.A., Gage F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.* 4:1313-1317.
- Eskandari F., Webster J.I., Sternberg E.M. (2003). Neural immune pathways and their connection to inflammatory diseases. *Arthritis Res Ther* 5:251-265.
- Fainboim L., Geffner J. (2005). *Introducción a la inmunología humana*. Editorial Médica Panamericana. 5ta ed.
- Feil R., Kleppisch T. (2008). NO/cGMP-dependent modulation of synaptic transmission. *Handb Exp Pharmacol.* 184:529-605.
- Felten D.L., Felten S.Y. (1988). Sympathetic noradrenergic innervation of immune organs. *Brain Behav. Immun.* 2:293-300.
- Felten D.L., Felten S.Y., Bellinger D.L., Carlson S.L., Ackerman K.D., Madden K.S., Olschowika J.A., Livnat S. (1987). Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. *Immunol. Rev.* 100:225-260.
- Florian C., Rouillet P. (2004). Hippocampal CA3-region is crucial for acquisition and memory consolidation in Morris water maze task in mice. *Behav Brain Res.* 154:365-374.
- Forstermann U., Closs E. L., Pollock J. S., Nakane M., Schwarz P., Gath I., Kleinert H. (1994). Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23:1121-1131.
- Frick L.R., Rapanelli M., Cremaschi G.A., Genaro A.M. (2009). Fluoxetine directly counteracts the adverse effects of chronic stress on T cell immunity by compensatory and specific mechanisms. *Brain Behav Immun.* 23:36-40.
- Fridovich I. (1997). Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem.* 272:18515-18517.
- Fuchs E., Flugge G. (2002). Social stress in tree shrews: effects on physiology, brain function, and behavior of subordinate individuals. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73:247-258.

- Funder J.W. (1997). Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors: biology and clinical relevance. *Annu. Rev. Med.* 48:231-240.
- Furay A.R., Bruestle A.E., Herman J.P. (2008). The Role of the Forebrain Glucocorticoid Receptor in Acute and Chronic Stress. *Endocrinology* 149:5482-5490.
- Gall C.M., Isackson P.J. (1989). Limbic seizures increase neuronal production of messenger RNA for nerve growth factor. *Science*. 245:758-761.
- Garcia-Arenas G., Ramirez-Amaya V., Balderas I., Sandoval J., Escobar M.L., Rios C., Bermudez-Rattoni F. (2004). Cognitive deficits in adult rats by lead intoxication are related with regional specific inhibition of cNOS. *Behav Brain Res.*149:49-59.
- Gonzalez-Aguilar F., De Robertis E. (1963). A formalin-perfusion method for histophysiological study of the central nervous system with the electron microscopy. *Neurology* 13:758-763.
- Goshen I., Kreisel T., Ben-Menachem-Zidon O., Licht T., Weidenfeld J., Ben-Hur T., Yirmiya R. (2008). Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. *Mol. Psychiatry* 13:717-728.
- Goshen I., Kreisel T., Ounallah-Saad H., Renbaum P., Zalstein Y., Ben-Hur T., Levy-Lahad E., Yirmiya R. (2007). A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes. *Psychoneuroendocrinology* 32:1106-1115.
- Gould E., Beylin A., Tanapat P., Reeves A., Shors T.J. (1999). Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 2:260-265.
- Graf E., Mahoney J.R., Bryant R.G., Eaton J.W. (1984). Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. Stringent requirement for free iron coordination site. *J Biol Chem.* 259:3620-3624.
- Gregus Z. (2008). Mechanisms of toxicity. Cassaret and Doull's Toxicology, *The Basic Science of Poisons*, Klaaseen CD. 7th ed. 50-55.
- Griscavage J.M., Rogers N.E., Sherman M.P., Ignarro L.J. (1993). Inducible nitric oxide synthase from a rat alveolar macrophage cell line is inhibited by nitric oxide. *J. Immunol.* 151:6329-6337.
- Gross C.G. (2000). Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci* 1:67-73.

- Guelman L.R. (2003). Bases bioquímicas del envejecimiento. *Colección de Farmacología, Psiconeurofarmacología Clínica y sus Bases Neurocientíficas*, Zieher LM. 3era ed. 421-432.
- Guiñazú N., Pellegrini A., Giordanengo L., Aoki M.P., Rivarola H.W., Cano R., Rodrigues M.M., Gea S. (2004). Immune response to a major Trypanosoma cruzi antigen, cruzipain, is differentially modulated in C57BL/6 and BALB/c mice. *Microbes Infect.* 6:1250-1258.
- Hammer B., Parker W.D. Jr., Bennett J.P. Jr. (1993). NMDA receptors increase OH radicals in vivo by using nitric oxide synthase and protein kinase C. *Neuroreport* 5:72-74.
- Harman D. (1972). Free radical theory of aging: dietary implications. *Am J Clin Nutr.* 25:839-843.
- Hastings N.B., Gould E. (1999). Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J Comp Neurol* 413:146-154.
- Hauben E., Butovsky O., Nevo U., Yoles E., Moalem G., Agranov E., Mor F., Leibowitz-Amit R., Pevsner E., Akselrod S., Neeman M., Cohen I.R., Schwartz M. (2000a). Passive or active immunization with myelin basic protein promotes recovery from spinal cord contusion. *J Neurosci.* 20:6421-6430.
- Hauben E., Mizrahi T., Agranov E., Schwartz M. (2002). Sexual dimorphism in the spontaneous recovery from spinal cord injury: a gender gap in beneficial autoimmunity? *Eur J Neurosci.* 16:1731-1740.
- Hauben E., Nevo U., Yoles E., Moalem G., Agranov E., Mor F., Akselrod S., Neeman M., Cohen I.R., Schwartz M. (2000b). Autoimmune T cells as potential neuroprotective therapy for spinal cord injury. *Lancet* 355:286-287.
- Hauben E., Schwartz M. (2003). Therapeutic vaccination for spinal cord injury: helping the body to cure itself. *Trends Pharmacol Sci.* 24:7-12.
- Hernandez R., Martinez-Lara E., Del Moral M.L., Blanco S., Cañuelo A., Siles E., Esteban F.J., Pedrosa J.A., Peinado M.A. (2004). Upregulation of endothelial nitric oxide synthase maintains nitric oxide production in the cerebellum of thioacetamide cirrhotic rats. *Neuroscience* 126:879-887.
- Heumann R. (1987). Regulation of the synthesis of nerve growth factor. *J Exp Biol.* 132:133-150.
- Hirono M., Sugiyama T., Kishimoto Y., Sakai Y., Miyasawa T., Kishio M., Inoue H., Nakao K., Ikeda M., Kawahara S., Kirino Y., Katsuki M., Horie H., Ishikawa Y., Yoshioka T.

- (2001). Phospholipase Cbeta4 and protein kinase Calpha and/or protein kinase Cbetal are involved in the induction of long term depression in cerebellar Purkinje cells. *J Biol Chem.* 276:45236-45242.
- Hoffman K.L., Logothetis N.K. (2009). Cortical mechanisms of sensory learning and object recognition. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 364:321-329.
- Hrabetova S., Sacktor T. C. (2001). Transient translocation of conventional protein kinase C isoforms and persistent downregulation of atypical protein kinase M $\zeta$  in long-term depression. *Mol Brain Res* 95:146-152.
- Huang E.J., Reichardt L.F. (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 24:677-736.
- Iadecolo C. (1997). Bright and dark sides of nitric oxide in ischaemic brain injury. *Trends Neurosci.* 20:132-139.
- Ischiropoulos H., Beckman J.S. (2003). Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *J Clin Invest.* 111:163-169.
- Joëls M., Baram T.Z. (2009). The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci.* 10:459-66.
- Kang H., Schuman E.M. (1995). Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science.* 267:1658-1662.
- Kaplan M.S., Hinds J.W. (1977). Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197:1092-1094.
- Katayama Y., Battista M., Kao W.M., Hidalgo A., Peired A.J., Thomas S.A., Frenette P.S. (2006). Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell* 124:407-421.
- Katoh-Semba R., Asano T., Ueda H., Morishita R., Takeuchi I.K., Inaguma Y., Kato K. (2002). Riluzole enhances expression of brain-derived neurotrophic factor with consequent proliferation of granule precursor cells in the rat hippocampus. *FASEB J* 16:1328-1330.
- Kemperman G., Jessberger S., Steiner B., Kronenberg G. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci.* 27:447-452.
- Kempermann G., Gast D., Kronenberg G., Yamaguchi M., Gage F.H. (2003). Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development.* 130:391-399.
- Kerschensteiner M., Gallmeier E., Behrens L., Leal V.V., Misgeld T., Klinkert W.E., Kolbeck R., Hoppe E., Oropeza-Wekerle R.L., Bartke I., Stadelmann C., Lassmann H.,

- Wekerle H., Hohlfeld R. (1999). Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J. Exp. Med.* 189:865-870.
- Khalidi A., Chiueh C. C., Ross Bollock M., Woodward J.J. (2002). The significance of nitric oxide production in the brain after injury. *Ann N Y Acad Sci.* 962:53-59.
- Kiank C., Holtfreter B., Starke A., Mundt A., Wilke C., Schütt C. (2006). Stress susceptibility predicts the severity of immune depression and the failure to combat bacterial infections in chronically stressed mice. *Brain Behav Immun.* 20:359-368.
- Kim H., Sasaki T., Maeda K., Koya D., Kashiwagi A., Yasuda H. (2003). Protein kinase C beta selective inhibitor LY333531 attenuates diabetic hyperalgesia through ameliorating cGMP level of dorsal root ganglion neurons. *Diabetes* 52:2102-2109.
- Kim J.J., Yoon K.S. (1998). Stress: metaplastic effects in the hippocampus. *Tins* 21:505-509.
- Kim M.J., Choi S.J., Lim S.T., Kim H.K., Kim Y.J., Yoon H.G., Shin D.H. (2008). Zeatin supplement improves scopolamine-induced memory impairment in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72: 577-581.
- Kipnis J., Mizrahi T., Hauben E., Shaked I., Shevach E., Schwartz M. (2002). Neuroprotective autoimmunity: naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells suppress the ability to withstand injury to the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:15620-15625.
- Kipnis J., Schwartz M. (2002). Dual action of glatiramer acetate (Cop-1) in the treatment of CNS autoimmune and neurodegenerative disorders. *Trends Mol Med.* 8:319-323.
- Kipnis J., Yoles E., Porat Z., Cohen A., Mor F., Sela M., Cohen I.R., Schwartz M. (2000). T cell immunity to copolymer 1 confers neuroprotection on the damaged optic nerve: possible therapy for optic neuropathies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:7446-7451.
- Kipnis J., Yoles E., Schori H., Hauben E., Shaked I., Schwartz M. (2001). Neuronal survival after CNS insult is determined by a genetically encoded autoimmune response. *J Neurosci.* 21:4564-4571.
- Kishida K.T., Klann E. (2007). Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory. *Antioxid. Redox Signal.* 9:233-244.
- Klann E., Thiels E. (1999). Modulation of protein kinases and protein phosphatases by reactive oxygen species: implications for hippocampal synaptic plasticity. *Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat* 23:359-376.

- Klein R. (1994). Role of neurotrophins in mouse neuronal development. *FASEB J.* 8:738-744.
- Knowles R.G., Moncada S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* 298:249-258.
- Koenig J.I., Snow K., Clark B.D., Toni R., Cannon J.G., Shaw A.R., Dinarello C.A., Reichlin S., Lee S.L., Lechan R.M. (1990). Intrinsic pituitary interleukin-1 beta is induced by bacterial lipopolysaccharide. *Endocrinology.* 126:3053-3058.
- Kollack-Walker S., Day H.E., Akil H. (2007). Central stress neurocircuits. *Encyclopedia of Stress.* George Fink. 2nd ed. 1:424-432.
- Koo J.W., Duman R.S. (2008). IL-1beta is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:751-756.
- Koponen S., Kurkinen K., Akerman K.E., Mochly-Rosen D., Chan P.H., Koistinaho J., (2003). Prevention of NMDA-induced death of cortical neurons by inhibition of protein kinase Czeta. *J Neurochem.* 86:442-450.
- Kornack D.R., Rakic P. (1999). Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:5768-5773.
- Korsching S. (1993). The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J Neurosci.* 13:2739-2748.
- Korte M., Carroll P., Wolf E., Brem G., Thoenen H., Bonhoeffer T. (1995). Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:8856-8860.
- Koustova E., Sei Y., McCarty T., Espey M.G., Ming R., Morse III H.C., Basile A.S., (2000). Accelerated development of neurochemical and behavioral deficits in LP-BM5 infected mice with targeted deletions of the IFN-gamma gene. *J. Neuroimmunol.* 108:112-121.
- Krugers H.J., Douma B.R., Andringa G., Bohus B., Korf J., Luiten P.G. (1997). Exposure to chronic psychosocial stress and corticosterone in the rat: effects on spatial discrimination learning and hippocampal protein kinase Cgamma immunoreactivity. *Hippocampus* 7:427-436.
- Kuhn H.G., Dickinson-Anson H., Gage F.H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci.* 16:2027-2033.

- La Porta C.A.M., Comolli R. (1999). Age-dependent modulation of PKC isoforms and NOS activity and expresión in rat cortex, striatum and hippocampus. *Exp Gerontol.* 34:863-874.
- Labrousse V.F., Costes L., Aubert A., Darnaudéry M., Ferreira G., Amédée T., Layé S. (2009). Impaired interleukin-1beta and c-Fos expression in the hippocampus is associated with a spatial memory deficit in P2X(7) receptor-deficient mice. *PLoS ONE* 4:6006.
- Lafon-Cazal M., Pietri S., Culcasi M., Bockaert J. (1993). NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 364:535-537.
- Laverty R., Taylor K.M. (1968). The fluorometric assay of catecholamines and related compounds: improvements and extensions to the hydroxyindole technique. *Anal. Biochem.* 22:269-279.
- Law A., O'Donnell J., Gauthier S., Quirion R. (2002). Neuronal and inducible nitric oxide synthase expressions and activities in the hippocampi and cortices of young adult, aged cognitively unimpaired, and impaired Long-Evans rats. *Neuroscience* 112:267-275.
- Ledo A., Frade J., Barbosa R. M., Laranjinha J. (2004). Nitric oxide in brain: difusión, targets and concentration dynamics in hippocampal subregions. *Mol Aspects Med.* 25:75-89.
- Lepicard E.M., Joubert C. Hagneau I., Perez-Diaz F., Chapouthier G. (2000). Differences in anxiety-related behavior and response to diazepam in BALB/cByJ and C57BL/6J strains of mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 67:739-748.
- Levi-Montalcini R., Angeletti P.U. (1963). Essential role of the nerve growth factor in the survival and maintenance of dissociated sensory and sympathetic embryonic nerve cells in vitro. *Dev Biol.* 7:653-659.
- Levine S., Ursin H. (1991) What is stress?. *Stress neurobiology and neuroendocrinology.* Brown MR, Koob G, Rivier C. 3-21.
- Lewitus G.M., Cohen H., Schwartz M. (2008). Reducing post-traumatic anxiety by immunization. *Brain Behav Immun.* 22:1108-1114.
- Lewitus G.M., Wilf-Yarkoni A., Ziv Y., Shabat-Simon M., Gersner R., Zangen A., Schwartz M. (2009). Vaccination as a novel approach for treating depressive behavior. *Biol Psychiatry.* 65:283-288.
- Liberatore G.T., Jackson-Lewis V., Vukosavic S., Mandir A.S., Vila M., McAuliffe W.G., Dawson V.L., Dawson T.M., Przedborski S. (1999). Inducible nitric oxide synthase

- stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med.* 5:1403-1409.
- Liblau R.S., Singer S.M., McDevitt H.O. (1995). Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today* 16:34-38.
- Lipton S.A. (1999). Neuronal protection and destruction by NO. *Cell Death Differ.* 6:943-951.
- Liu L., Xu-Welliver M., Kanugula S., Pegg A.E. (2002). Inactivation and degradation of O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase after reaction with nitric oxide. *Cancer Res.* 62:3037-3043.
- Liu P., Smith P.F., Appleton I., Darlington C.L., Bilkey D.K., (2003). Regional variations and age-related changes in nitric oxide synthase and arginase in the sub-regions of the hippocampus. *Neuroscience* 119:679-687.
- Liu Y.L., Bi H., Chi S.M., Fan R., Wang Y.M., Ma X.L., Chen Y.M., Luo W.J., Pei J.M., Chen J.Y. (2007). The effect of compound nutrients on stress-induced changes in serum IL-2, IL-6 and TNF-alpha levels in rats. *Cytokine* 37:14-21.
- Lledo P.M., Merkle F.T., Álvarez-Buylla A. (2008). Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends Neurosci* 31:392-400.
- Loewenbrueck K.F., Tigno-Aranjuez J.T., Boehm B.O., Lehmann P.V., Tary-Lehmann M. (2010). Th1 responses to beta-amyloid in young humans convert to regulatory IL-10 responses in Down syndrome and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 31:1732-1742.
- Lonart G., Johanson K.M. (1992). Inhibitory effects of nitric oxide on the uptake of [3H]dopamine and [3H] glutamate by striatal synaptosomes. *J Neurochem.* 63: 2108-2117.
- Lyte M., Ernst S., Driemeyer J., Baissa B. (1991). Strain-specific enhancement of splenic T cell mitogenesis and macrophage phagocytosis following peripheral axotomy. *J Neuroimmunol.* 31:1-8.
- Marchetti B., Morale M.C., Testa N., Tirolo C., Caniglia S., Amor S., Dijkstra C.D., Barden N. (2001). Stress, the immune system and vulnerability to degenerative disorders of the central nervous system in transgenic mice expressing glucocorticoid receptor antisense RNA. *Brain Res. Rev.* 37:259-272.
- Marin P., Lafon-Cazal M., Bockaert J. (1992). A nitric oxide synthase activity selectively stimulated by NMDA receptors depends on protein kinase C activation in mouse striatal neurons. *Eur J Neurosci* 4:425-432.

- Mariotto S., Cuzzolin L., Adami A., Del Soldato P., Suzuki H., Benoni G. (1995). Inhibition by sodium nitroprusside of the expression of inducible nitric oxide synthase in rat neutrophils. *Br. J. Pharmacol.* 114:1105-1106.
- Markakis E., Gage F.H. (1999). Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J Comp Neurol* 406:449-460.
- Marletta M.A., Spiering M.M. (2003). Trace elements and nitric oxide function. *J Nutr.* 133:1431-3.
- Marona-Lewicka D., Vetulani J. (1989). Neurochemical correlates of differences in responses to psychotropic drugs. I. Apomorphine and morphine effects on locomotor activity of C57/BL and Balb/C mice. *Pol J Pharmacol Pharm* 41:431-438.
- Mathern G.W., Babb T.L., Micevych P.E., Blanco C.E., Pretorius J.K. (1997). Granule cell mRNA levels for BDNF, NGF, and NT-3 correlate with neuron losses or supragranular mossy fiber sprouting in the chronically damaged and epileptic human hippocampus. *Mol Chem Neuropathol.* 30:53-76.
- McCann S.M., Mastronardi C, DE Laurentiis A, Rettori V. (2005). The nitric oxide theory of aging revisited. *Ann N Y Acad Sci.*1057:64-84.
- McCord J.M., Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 244:6049-6055.
- McEwen B.S. (1999). Stress and hippocampal plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 22:105-122.
- McEwen B.S. (2001). Plasticity of the hippocampus: Adaptation to chronic stress and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci.* 933:265–277.
- McKay S.E., Purcell A.L., Carew T.J. (1999). Regulation of synaptic function by neurotrophic factors in vertebrates and invertebrates: implications for development and learning. *Learn Mem.* 6:193-215.
- McNamara R.K., Wees E.A., Lenox R.H. (1999). Differential subcellular redistribution of protein kinase C isozymes in the rat hippocampus induced by kainic acid. *J Neurochem* 72:1735-1743.
- Medzhitov R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1:135-131.
- Medzhitov R., Janeway C. Jr. (2000). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 173: 89-97.
- Merlot E., Couret D., Otten W. (2008). Prenatal stress, fetal imprinting and immunity. *Brain Behav. Immun.* 22:42-51.

- Miao L., St Clair DK. (2009). Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med.* 47:344-356.
- Miranda K.M., Espey M.G., Wink D.A. (2000). A discussion of the chemistry of oxidative and nitrosative stress in cytotoxicity. *J Inorg Biochem.* 79:237-240.
- Misko T.P., Radeke M.J., Shooter E.M. (1987). Nerve growth factor in neuronal development and maintenance. *J Exp Biol.* 132:177-190.
- Miyazaki T., Ishikawa T., Nakata A., Sakurai T., Miki A., Fujita O., Kobayashi F., Haratani T., Iimori H., Sakami S., Fujioka Y., Kawamura N. (2005). Association between perceived social support and Th1 dominance. *Biol. Psychol.* 70:30-37.
- Moalem G., Gdalyahu A., Shani Y., Otten U., Lazarovici P., Cohen I.R., Schwartz M. (2000). Production of neurotrophins by activated T cells: implications for neuroprotective autoimmunity. *J. Autoimmunity* 15: 331-345.
- Moalem G., Leibowitz-Amit R., Yoles E., Mor F., Cohen I.R., Schwartz M. (1999a). Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med.* 5:49-55.
- Moalem G., Monsonogo A., Shani Y., Cohen I.R., Schwartz M. (1999b). Differential T cell response in central and peripheral nerve injury: connection with immune privilege. *FASEB J.* 13:1207-1217.
- Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43:109-142.
- Monleon S., Aquila P., Parra A., Simon V.M., Brain P.F., Willner P. (1995). Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine. *Psychopharmacology* 117:453-457.
- Moreau J.L. (1997). Validation of an animal model of anhedonia, a major symptom of depression. *Encephale.* 23:280-289.
- Murphy D.D., Cole N.B., Segal M. (1998). Brain-derived neurotrophic factor mediates estradiol-induced dendritic spine formation in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:11412-11417.
- Nakagawa M., Bondy G.P., Waisman D., Minshall D., Hogg J.C., van Eeden S.F. (1999). The effect of glucocorticoids on the expression of L-selectin on polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 93:2730-2737.

- Nakane N., Mitchell J., Forstermann U., Murad F. (1991). Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun*. 180:1396-1402.
- Necchi D., Virgili M., Monti B., Contestabile A., Scherini E. (2002). Regional alterations of the NO/NOS system in the aging brain: a biochemical, histochemical and immunochemical study in the rat. *Brain Res*. 933:31-41.
- Nelson R.J., Kriegsfeld L.J., Dawson V.L., Dawson T.D. (1997). Effects of nitric oxide on neuroendocrine function and behavior. *Front Neuroendocrin*. 18:463-491.
- Newton A.C., Johnson J.E. (1998). Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membranetargeting modules. *Biochim. Biophys.* 1376:155-172.
- Nistico G., De Sarro G. (1991). Behavioral and electrocortical spectrum power effects after microrinfusion of lymphokines in several areas of the rat brain. *Ann NY Acad Sci* 621:119-134.
- Noguès X., Jaffard R., Micheau J. (1996). Investigation on the role of hippocampal protein kinase C on memory processes : pharmacological approach. *Behav Brain Res* 75:139-146.
- Norris P.J., Waldvogel H.J., Faull R.L., Love D.R., Emson P.C. (1996). Decreased neuronal nitric oxide synthase messenger RNA and somatostatin messenger RNA in the striatum of Huntington's disease. *Neuroscience* 72:1037-1047.
- Núñez M.J., Balboa J., Rodrigo E., Brenlla J., González-Peteiro M., Freire-Garabal M. (2006). Effects of fluoxetine on cellular immune response in stressed mice. *Neurosci Lett*. 396:247-251.
- Okada D. (1995). Protein kinase C modulates calcium sensitivity of nitric oxide synthase in cerebellar slices. *J Neurochem* 64:1298-1304.
- Ollerstam A., Pittner J., Persson A.E., Thorup C. (1997). Increased blood pressure in rats after long-term inhibition of the neuronal isoform of nitric oxide synthase. *J Clin Invest*. 99:2212-2218.
- Olsson T. (1995a). Critical influences of the cytokine orchestration on the outcome of myelin antigen-specific T-cell autoimmunity in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunol Rev* 144: 245-268.
- Olsson T. (1995b). Cytokine-producing cells in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Neurology* 45:11-15.

- Oster H., Eichele G., Leitges M. (2004). Differential expression of atypical PKCs in the adult mouse brain. *Mol Brain Res* 127:79-88.
- Otten U., Gadiant R.A. (1995). Neurotrophins and cytokines-intermediaries between the immune and nervous systems. *Int. J. Dev Neurosci.* 13:147-151.
- Pacher P., Bechman J. S., Liaudet L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* 87:315-424.
- Palermo-Neto J., de Oliveira Massoco C., Robespierre de Souza W. (2003). Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. *Brain Behav Immun.* 17:43-54.
- Pang P.T., Teng H.K., Zaitsev E., Woo N.T., Sakata K., Zhen S., Teng K.K., Yung W.H., Hempstead B.L., Lu B. (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306:487-491.
- Paratcha G., Furman M., Bevilaqua L., Cammarota M., Vianna M., de Stein M.L., Izquierdo I., Medina J.H. (2000). Involvement of hippocampal PKC $\beta$  isoform in the early phase of memory formation of an inhibitory avoidance learning. *Brain Res* 855:199-205.
- Patterson S.L., Abel T., Deuel T.A., Martin K.C., Rose J.C., Kandel E.R. (1996). Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron* 16:1137-1145.
- Patterson S.L., Grover L.M., Schwartzkroin P.A., Bothwell M. (1992). Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: a stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs. *Neuron* 9:1081-1088.
- Paulraj R., Behari J. (2004). Radio frequency affects on protein kinase C activity in rats' brain. *Mutat Res.* 545:127-130.
- Paxinos G., Franklin K.B.J. (2001). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press. 2nd.
- Pereira A.C., Huddleston D.E., Brickman A.M., Sosunov A.A., Hen R., McKhann G.M., Sloan R., Gage F.H., Brown T.R., Small S.A. (2007). An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:5638-5643.
- Philbert M.A., Beiswanger C.M., Waters D.K., Reuhl K.R., Lowndes H.E. (1991). Cellular and regional distribution of reduced glutathione in the nervous system of the rat:

- histochemical localization by mercury orange and ophthaldialdehyde-induced histofluorescence. *Toxicol Appl Pharmacol.* 107:215-227.
- Popko B., Corbin J.G., Baerwald K.D., Dupree J., Garcia A.M. (1997). The effects of interferon-gamma on the central nervous system. *Mol. Neurobiol.* 14:19-35.
- Priebe K., Romeo R.D., Francis D.D., Sisti H.M., Mueller A., McEwen B.S., Brake W.G. (2006). Maternal influences on adult stress and anxiety-like behavior in C57BL/6J and BALB/cJ mice: A crossfostering study. *Dev Psychobiol* 48:95-96.
- Przedborski S., Vila M., Jackson-Lewis V., Dawson T. M. (2000). Reply: a new look at the pathogenesis of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 21:165-166.
- Rage F., Givalois L., Marmigere F., Tapia-Arancibia L., Arancibia S. (2002). Immobilization stress rapidly modulates BDNF mRNA expression in the hypothalamus of adult male rats. *Neuroscience* 112:309-318.
- Rao M.S., Shetty A.K. (2004). Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci.* 19:234-246.
- Reinés A., Ferrero A., Ceresetto M. (2003). Neurotrofinas. *Colección de Farmacología, Psiconeurofarmacología Clínica y sus Bases Neurocientíficas.* Zieher LM. 3era ed. 421-432.
- Riccio A., Esposito E., Eboli M.L. (1996). Modulation by protein kinase C of nitric oxide and cyclic GMP poffation in cultured cerebellar granule cells. *Brain Res* 718:159-164.
- Romagnani S. (1995). Biology of human TH1 and TH2 cells. *J Clin Immunol* 15:121-129.
- Sairanen M., Lucas G., Ernfors P., Castrén M., Castrén E. (2005). Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *J Neurosci.* 25:1089-1094.
- Sapolsky R.M., Krey L.C., McEwen B.S. (1984). Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81:6174-6177.
- Sargent R.N. (1985). Determination of corticosterone in rat plasma by HPLC. *J. Anal. Toxicol.* 9:20-23.
- Sariola H. (2001). The neurotrophic factors in non-neuronal tissues. *Cellular Mol. Life Sci.* 58:1061-1066.

- Schindowski K., Belarbi K., Buée L. (2008). Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. *Genes. Brain Behav.* 1:43-56.
- Schori H., Yoles E., Schwartz M. (2001). T-cell-based immunity counteracts the potential toxicity of glutamate in the central nervous system. *J Neuroimmunol.* 119:199-204.
- Schulz J.B., Lindenau J., Seyfried J., Dichgans J. (2000). Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem.* 267:4904-4911.
- Schwartz M., Kipnis J. (2001). Protective autoimmunity: regulation and prospects for vaccination after brain and spinal cord injuries. *Trends Mol Med.* 7:252-258.
- Schwartz M., London A., Shechter R. (2009). Boosting T-cell immunity as a therapeutic approach for neurodegenerative conditions: the role of innate immunity. *Neuroscience* 158:1133-1142.
- Schwartz M., Shaked I., Fisher J., Mizrahi T., Schori H. (2003). Protective autoimmunity against the enemy within: fighting glutamate toxicity. *Trends Neurosci.* 26:297-302.
- Schwarz M.J., Chiang S., Müller N., Ackenheil M. (2001). T-helper-1 and T-helper-2 responses in psychiatric disorders. *Brain Behav Immun.* 15:340-370.
- Sheehan J.P., Swerdlow R.H., Miller S.W., Davis R.E., Parks J.K., Parker W.D., Tuttle J.B. (1997). Calcium homeostasis and reactive oxygen species production in cells transformed by mitochondria from individuals with sporadic Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 17:4612-4622.
- Sheline Y.I., Mittler B.L., Mintun M.A. (2002). The hippocampus and depression. *Eur Psychiatry.* 3:300-305.
- Shirayama Y., Chen A.C., Nakagawa S., Russell D.S., Duman R.S. (2002). Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci.* 22:3251-3261.
- Silberman D.M., Zorrilla-Zubilete M., Cremaschi G.A., Genaro A.M. (2005). Protein kinase C-dependent NF-kappaB activation is altered in T cells by chronic stress. *Cell Mol Life Sci.* 62:1744-1754.
- Skup M.H. (1994). BDNF and NT-3 widen the scope of neurotrophin activity: pharmacological implications. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 54:81-94.
- Smith M.A. (1996). Hippocampal vulnerability to stress and aging: possible role of neurotrophic factors. *Behav. Brain Res.* 78:25-36.

- Smith M.A., Makino S., Kim S.Y., Kvetnansky R. (1995). Stress increases brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid in the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 136:3743-3750.
- Smythies J. (1999). The neurochemical basis of learning and neurocomputation: the redox theory. *Behav Brain Res.* 99:1-6.
- Sorrells S.F., Sapolsky R.M. (2007). An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain Behav Immun* 21:259-272.
- Sossin W.S. (2007). Isoform-specificity of protein kinase Cs in synaptic plasticity. *Learn Mem* 14:236-246.
- Sperner-Unterwieser B. (2005). Immunological aetiology of major psychiatric disorders: evidence and therapeutic implications. *Drugs* 65:1493-1520.
- Spillantini M.G., Aloe L., Alleva E., De Simone R., Goedert M., Levi-Montalcini R. (1989). Nerve growth factor mRNA and protein increase in a mouse model of aggression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8555-8559.
- Stanfield B.B., Trice J.E. (1988). Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Exp Brain Res* 72: 399-406.
- Stefanski V., Engler H. (1998). Effects of acute and chronic social stress on blood cellular immunity in rats. *Physiol Behav.* 64:733-741.
- Steffenach H.A., Sloviter R.S., Moser E.I., Moser M.B. (2002). Impaired retention of spatial memory after transection of longitudinally oriented axons of hippocampal CA3 pyramidal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:3194-3198.
- Sternberg E.M. (2000). Interactions between the immune and neuroendocrine systems. *Prog. Brain Res.* 122:35-42.
- Stuart C., Apfel M.D. (1999). Neurotrophic factors in peripheral neuropathies: therapeutic implications. *Brain Pathol.* 9:393-413.
- Sullivan B.M., Wong S., Schuman E.M. (1997). Modification of hippocampal synaptic proteins by nitric oxide-stimulated ADP-ribosylation. *Learn Mem* 3:414-424.
- Szabo C., Ischiropoulos H., Radi R. (2007). Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discovery* 6:662-680.
- Tagawa N., Sugimoto Y., Yamada J., Kobayashi Y. (2006). Strain differences of neurosteroid levels in mouse brain. *Steroids* 71:776-784.

- Tang F.R., Lee W.L., Gao H., Chen Y., Loh Y.T., Chia S.C. (2004). Expression of different isoforms of protein kinase C in the rat hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus with special reference to CA1 area and the dentate gyrus. *Hippocampus* 14:87-98.
- Tang X., Orchard S.M., Sanford L.D. (2002). Home cage activity and behavioral performance in inbred and hybrid mice. *Behav Brain Res* 136:555-569.
- Tannenbaum B., Anisman H. (2003). Impact of chronic intermittent challenges in stressor-susceptible and resilient strains of mice. *Biol Psychiatry*. 53:292-303.
- Tassin J.P., Herve D., Blanc G., Glowinski J. (1980). Differential effects of a two-minute open-field session on dopamine utilization in the frontal cortices of BALB/C and C57 BL/6 mice. *Neurosci Lett* (1-2):67-71.
- Teitelbaum D., Meshorer A., Hirshfeld T., Arnon R., Sela M. (1971). Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by a synthetic polypeptide. *Eur J Immunol*. 1:242-248.
- Tessarollo L. (1998). Pleiotropic functions of neurotrophins in development. *Cytokine Growth Factor Rev*. 9:125-137.
- Thiels E., Klann E. (2002). Hippocampal memory and plasticity in superoxide dimutase mutant mice. *Physiol Behav*. 77:601-605.
- Thoenen H. (1995). Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 270:593-598.
- Tietze F. (1968). Enzymic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of total and Oxidized Glutathione. *Analytical Biochemistry* 27:502-522.
- Tsien J.Z., Huerta P.T., Tonegawa S. (1996). The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spacial memory. *Cell* 87:1327-1338.
- Vaidya V.A., Duman R.S. (2001). Depression-emerging insights from neurobiology. *Br. Med. Bull*. 57:61-79.
- Van der Zee E.A., Compaan J.C., de Boer M., Luiten P.G. (1992). Changes in PKC gamma immunoreactivity in mouse hippocampus induced by spatial discrimination learning. *J Neurosci* 12:4808-4815.
- van Praag H., Christie B., Sejnowski T., Gage F. (1999). Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:13427-13431.
- van Praag H., Schinder A.F., Christie B.R., Toni N., Palmer T.D., Gage F.H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415:1030-1034.

- Van Praag H., Schinder A.F., Christie B.R., Toni N., Palmer T.D., Gage F.H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415:1030-1034.
- Vankelecom H., Carmeliet P., Van Damme J., Billiau A., Denef C. (1989). Production of interleukin-6 by folliculo-stellate cells of the anterior pituitary gland in a histiotypic cell aggregate culture system. *Neuroendocrinology*. 49:102-106.
- Vega J.A., García-Suárez O., Hannestad J., Pérez-Pérez M., Germaná A. (2003). Neurotrophins and the immune system. *J. Anat.* 203:1-19.
- Vicario-Abejón C., Johe K.K., Hazel T.G., Collazo D., McKay R.D. (1995). Functions of basic fibroblast growth factor and neurotrophins in the differentiation of hippocampal neurons. *Neuron* 15:105-114.
- Watanabe H., Numata K., Ito T., Takagi K., Matsukawa A. (2004). Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock*. 22:460-466.
- Watanabe Y., Gould E., McEwen B.S. (1992). Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res* 588: 341-345.
- Watts A.G. (2007). Brain and brain regions. *Encyclopedia of Stress*. George Fink. 2nd ed. 1:351-357.
- Webster J.I., Tonelli L., Sternberg E.M. (2002). Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol*.20:125-163.
- Weiner H. (1992). Perturbing the organism. *The biology of stressful experience*. University of Chicago Press.
- Wilckens T., De Rijk R. (1997). Glucocorticoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers. *Immunol. Today* 18:418-424.
- Willner P. (1997). Validity, reliability and utility of chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology*. 134:319-329.
- Willner P., Muscat R., Papp M. (1992). Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*. 16:525-34.
- Wink D.A., Cook J.A., Pacelli R., Liebmann J., Krishna M.C., Mitchell J.B. (1995). Nitric oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species. *Toxicol. Lett.* 82/83:221- 226.
- Wisniewska M., Pyrzynska B., Kaminska B. (2004). Impaired AP-1 dimers and NFAT complex formation in immature thymocytes during in vivo glucocorticoid-induced apoptosis. *Cell Biol Int*. 28:773-780.

- Xu G.G., Deng Y.Q., Liu S.J., Li H.L., Wang J.Z. (2005). Prolonged Alzheimer-like tau hyperphosphorylation induced by simultaneous inhibition of phosphoinositol-3 kinase and protein kinase C in N2a cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 37:349-354.
- Yamada K., Mizuno M., Nabeshima T. (2002). Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. *Life Sci.*70:735-744.
- Yan W., Zhang T., Jia W., Sun X., Liu X. (2010). Chronic stress impairs learning and hippocampal cell proliferation in senescence-accelerated prone mice. *Neurosci Lett.* doi:10.1016/j.neulet.2010.12.032
- Yoles E., Hauben E., Palgi O., Agranov E., Gothilf A., Cohen A., Kuchroo V., Cohen I.R., Weiner H., Schwartz M. (2001). Protective autoimmunity is a physiological response to CNS trauma. *J Neurosci.* 21:3740-3748.
- Zhang X., Beaulieu J.M., Sotnikova T.D., Gainetdinov R.R., Caron M.G. (2004). Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. *Science* 305:217.
- Zhao C., Teng E.M., Summers R.G. Jr., Ming G.L., Gage F.H. (2006). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci.* 26:3-11.
- Ziv Y., Finkelstein A., Geffen Y., Kipnis J., Smirnov I., Shpilman S., Vertkin I., Kimron M., Lange A., Hecht T., Reyman K.G., Marder J.B., Schwartz M., Yoles E. (2007). A Novel Immune-Based Therapy for Stroke Induces Neuroprotection and Supports Neurogenesis. *Stroke* 38:774-782.
- Ziv Y., Ron N., Butovsky O., Landa G., Sudai E., Greenberg N., Cohen H., Kipnis J., Schwartz M. (2006). Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci.* 9:268-275.
- Zochodne D.W. (1996). Neurotrophins and other growth factors in diabetic neuropathy. *Semin. Neurol.* 16:153-161.
- Zorrilla Zubilete M.A., Ríos H., Silberman D.M., Guelman L.R., Ricatti M.J., Genaro A.M., Zieher L.M. (2005). Altered nitric oxide synthase and PKC activities in cerebellum of gamma-irradiated neonatal rats. *Brain Research.* 1051:8-16.