

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADOS E INVESTIGACIÓN

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA EN
RED

**“ESTRÉS ANÍMICO CRÓNICO COMO INDUCTOR DE
LA COMUNICACIÓN DIRECTA EN CÉLULAS
NEURONALES E INMUNES A TRAVÉS DE
MOLÉCULAS DE ADHESIÓN”**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORADO
EN
CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA EN RED

PRESENTA:

VARGAS CARAVEO ALEJANDRA

DIRECTORES DE TESIS:

DR. DAVID GUILLERMO PÉREZ ISHIWARA
DR. MIGUEL ÁNGEL REYES LÓPEZ

MÉXICO D.F. A 17 DE JUNIO DE 2014



Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara

Dr. Miguel Ángel Reyes López

DIRECTORES

Dr. Alejandro Martínez Martínez

Dra. María del Consuelo Gómez García

Dr. Juan Salas Benito

COMITÉ TUTORIAL



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México D.F. siendo las 12:00 horas del día 17 del mes de Junio del 2014 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ENMH para examinar la tesis titulada:

Estrés anímico crónico como inductor de la comunicación directa en células neuronales e inmunes a través de moléculas de adhesión.

Presentada por el alumno:

Vargas Caraveo Alejandra
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)

Con registro:

B	1	0	2	4	0	1
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología en Red

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA Directores de tesis

Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara

Dr. Miguel Ángel Reyes López

Dr. Alejandro Martínez Martínez

Dra. María del Consuelo Gómez García

Dr. Juan Santiago Salas Benito

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA
Y HOMEOPATÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INVESTIGACIÓN

Dr. César Augusto Sandoval Reyes López



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 17 del mes de junio del año 2014, la que suscribe Alejandra Vargas Caraveo alumna del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología en Red con número de registro B102401, adscrito a la Escuela nacional de Medicina y Homeopatía, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara y del Dr. Miguel Ángel Reyes López, y cede los derechos del trabajo intitulado “Estrés anímico crónico como inductor de la comunicación directa en células neuronales e inmunes a través de moléculas de adhesión”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección alex_vargas24@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Alejandra Vargas Caraveo

ÍNDICE

ABREVIATURAS	III
Resumen	IV
<i>Abstract</i>	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Relación de los sistemas neuroendocrino e inmune	1
1.2 Barrera hematoencefálica: el paso de sustancias y células circulantes	2
1.2.1 El AP como interfase entre el SNC y el sistema inmune	5
1.3 Neuroinflamación por estrés	6
1.3.1 Molécula de adhesión de células neurales L1 como marcador de estrés	7
2. Justificación.....	9
3. Hipótesis.....	10
4. OBJETIVOS	11
4.1 Objetivos específicos	11
5. DISEÑO EXPERIMENTAL	12
6. MÉTODOS	13
6.1 Estrés anímico crónico.....	13
6.2 Disección del AP	14
6.2.1 Identificación del AP	15
6.3 Inmuno-histofluorescencia	16
6.3.1 Detección de células inmunes en el AP	16
6.3.2 Detección de interacción de células inmunes con neuronas en el AP	18
6.3.3 Molécula de adhesión neuronal L1CAM en leucocitos circulantes.....	19
6.4 Distribución de elementos en AP por microespectroscopía de fluorescencia de rayos X de fuente sincrotrón	20
6.5 Distribución de elementos en leucocitos circulantes por microespectroscopía de fluorescencia de rayos X de fuente sincrotrón	21
6.6 Estado orgánico del AP por SR- μ FTIR	22
6.7 Estado orgánico de leucocitos circulantes por SR- μ FTIR	22
7. RESULTADOS.....	24
7.1 Disección del AP	24

7.2 Identificación de células inmunes en AP bajo estrés anímico crónico a través de moléculas de adhesión	25
7.3 Detección de interacción de células inmunes con neuronas en el AP	33
7.3.1 Marcadores para células inmunes “CD45” y neuronas “TrkA” en AP	33
7.3.2 Marcadores para células inmunes “CD45” y neuronas “L1CAM” en AP	36
7.4 Molécula de adhesión neuronal L1CAM en leucocitos circulantes	39
7.5 Distribución de elementos en AP por microespectroscopía de fluorescencia de rayos X de fuente sincrotrón	40
7.6 Distribución de elementos en leucocitos circulantes por microespectroscopía de fluorescencia de rayos X de fuente sincrotrón	41
7.7 Estado orgánico del AP por SR- μ FTIR	42
7.8 Estado orgánico de leucocitos circulantes por SR- μ FTIR	44
7.8.1 Análisis en segunda derivada	45
8. DISCUSIÓN	48
8.1 células inmunes en el AP de ratas con estrés anímico crónico	49
8.2 Detección de interacción de células inmunes con neuronas en el AP.....	53
8.2.1 Marcaje de neuronas con TrkA y de células inmunes con CD45	53
8.2.2 Marcaje de neuronas con L1CAM y de células inmunes con CD45... 55	
8.3 Distribución de elementos en AP por microespectroscopía de fluorescencia de rayos X de fuente sincrotrón	57
8.4 Distribución de elementos leucocitos circulantes por microespectroscopía de fluorescencia de rayos X de fuente sincrotrón	59
8.5 Estado orgánico del AP por SR- μ FTIR	60
8.6 Estado orgánico de leucocitos circulantes por SR- μ FTIR	62
9. CONCLUSIONES	65
Bibliografía	67
ANEXOS	78
Plan de difusión	78
Estancias de investigación.....	82

ABREVIATURAS

AP	Área Postrema
BSA	Albúmina de suero de bovino
°C	Grados Celcius
CAM	Moléculas de adhesión celular
cm	Centímetros
cm⁻¹	Número de onda
CD11b	Antígeno 1 para macrófago
CD45	Antígeno común leucocitario
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
EAE	Encefalomiелitis autoinmune inducida
ESRF	<i>European Radiation Synchrotron Facility</i>
g	Gramos
h	Horas
IL	Interleucina
IR	Infrarrojo
Kg	Kilogramos
L1CAM	Molécula de adhesión neuronal L1
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetros
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
min	Minutos
OCV	Órganos circunventriculares
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos salina
pH	Potencial de Hidrógeno
PFA	solución fijadora de paraformaldehído
SNC	Sistema nervioso central
SR-µFTIR	Microespectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier de fuente sincrotrón
TrkA	Receptor neurotrófico tirosin cinasa 1
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

RESUMEN

El estrés anímico crónico crea una evidente comunicación entre el sistema inmune y el sistema nervioso, guiando a la mente, cerebro y cuerpo para comunicarse entre sí y sobrellevar el estímulo adverso, el cual si no es controlado puede llegar a ser uno de los principales factores en desarrollar enfermedad degenerativas. Una exposición crónica a un estresor conlleva a respuestas inflamatorias en el cerebro y en el resto del cuerpo. Ampliamente se han descrito intermediarios entre el cerebro y el sistema inmune durante una condición de estrés anímico crónico, como citocinas, hormonas y neuropéptidos pero pocos trabajos incluyen el papel de las células inmunes circulantes en la inflamación del cerebro por estrés. La mayoría de los estudios que relaciona el reclutamiento de células inmunes circulantes en el cerebro es a partir de la presencia de antígenos en el organismo.

En este trabajo se ha demostrado que la neuroinflamación generada por estrés anímico crónico, en una estructura del cerebro carente de barrera hematoencefálica como el Área postrema (AP), provoca el reclutamiento de células inmunes circulantes, cambios en la morfología de la microglía, contactos entre neuronas y células inmunes, así como también alteraciones en la química composicional de esta estructura y en células inmunes circulantes. Se utilizó un modelo en rata de estrés anímico crónico para estudiar en AP las expresiones por inmunohistofluorescencia de CD45 y CD11b, moléculas de adhesión celular utilizadas como marcadores para células inmunes; del receptor neuronal TrkA y de la molécula de adhesión neuronal L1CAM, estos dos últimos marcadores de neuronas. Se encontró que el estrés anímico crónico aumenta el número de células CD45⁺ y CD11b⁺ y la inducción de contactos entre neuronas y células inmunes, como leucocitos y microglía, por medio de moléculas de adhesión. Interesantemente, también se observó que algunas células inmunes circulantes reclutadas en el AP expresaron los marcadores neuronales TrkA y L1CAM en la superficie. Por otro lado, estudios con microespectroscopía de rayos X y de

infrarrojo con fuente sincrotrón mostraron que el estrés anímico crónico en AP y en células inmunes circulantes, promueve cambios químicos como aquellos relacionados con la oxidación. Este estudio provee a la Psiconeuroinmunología, nuevos conocimientos acerca de la respuesta inmune en el cerebro mediada por células del sistema inmune circulante hacia el daño provocado por el estrés, la cual es similar a la llevada a cabo ante la presencia de un antígeno en el organismo.

ABSTRACT

Chronic animic stress creates an evident cross-talk among immune and nervous systems guiding mind, brain and body to communicate and overcome this adverse stimulus, that if not controlled becomes one of the major factors in developing degenerative diseases. A chronic exposure to a stressor entails inflammatory responses in the brain and the rest of the body. Extensively, cytokines, hormones and neuropeptides have been described as intermediaries between the brain and immune system during an animic stress condition but only a few works includes the role of circulating immune cells in the inflammation of the brain by stress. Most of the studies that relate the circulating leukocyte recruitment into the brain are by the presence of antigens in the body.

In this work has been demonstrated the neuroinflammation caused by distress induces, in a lack of blood-brain-barrier structure such as Area postrema (AP), the immune cell recruitment, changes in microglial morphology, contacts between neurons and immune cells as well as disturbances in compositional chemistry of this structure and in circulating immune cells. It was used a chronic emotional distress model on rats to study in AP by immunohistofluorescence the expression of CD45 and CD11b, cell adhesion molecules used as immune cell markers; the neuronal receptor TrkA and the neuronal cell adhesion molecule L1CAM, both as neuronal markers. It was found that distress increases the number of CD45⁺ and CD11b⁺, the neuron-immune cell contact induction by adhesion molecules. Interestingly, also it was observed that some circulating immune cells were able to express TrkA and L1CAM on their surface. On the other hand, by synchrotron X ray an infrared microspectroscopy it was shown that chronic animic stress in AP and in circulating immune cells, promotes chemical changes such as the related ones with oxidation. This study provides to Psychoneuroimmunology new knowledge about immune response in the brain mediated by cells of the circulating immune system induced by stress, which is a similar response as the one to an antigen in the body.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Relación de los sistemas neuroendocrino e inmune

Las interacciones neuroendocrinoimmunológicas permiten mantener una homeostasis ante estímulos como infecciones, alteraciones psicológicas, lesiones tisulares y cáncer. En un principio se tenía considerado al sistema nervioso central (SNC) como un órgano con privilegio inmunológico pero varias investigaciones han confirmado lo contrario. El SNC por sí mismo puede inducir respuestas inmunológicas, a través de la activación de la glía, células de la respuesta adaptativa del cerebro similar al sistema inmune linfoide, que pueden ser activadas para participar en la respuesta inmune del SNC (Xiao y Link, 1998). El principal tipo de glía en generar una respuesta inmune para protección del SNC son los fagocitos mononucleares llamados microglía, (Chan *et al.*, 2007). Estas células han sido reconocidas mayormente por su participación en varias, si no en todas, las patologías que afectan al cerebro (Schlegelmilch *et al.*, 2011). La microglía deriva de un progenitor mieloide y coloniza en SNC durante periodos del desarrollo embrionario y fetal. En la etapa adulta, bajo condiciones patológicas llegan a activarse progresivamente junto con el incremento de la repoblación de estas células a partir de monocitos circulantes sanguíneos, los cuales son capaces de proliferar y autorrenovarse (Chan *et al.*, 2007).

Por otro lado, el sistema inmune innato constantemente está resguardando al organismo contra antígenos, cuando encuentra alguno de éstos, responde de manera inmediata, desencadenando la reacción inflamatoria. El balance de la inflamación es crucial, porque si es insuficiente se puede desencadenar una infección o cáncer; y una respuesta excesiva conlleva a enfermedades como artritis reumatoide, diabetes, aterosclerosis, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer e isquemia cardiaca o cerebral. Si la inflamación se dirige a circulación, se puede generalizar dando como consecuencia septicemia y meningitis, las cuales resultan más peligrosas que el atacante inicial. La

homeostasis y la salud se restablecen cuando se limita la inflamación a través de respuestas antiinflamatorias que son redundantes, rápidas, reversibles, localizadas, y adaptativas a cambios e integradas por el sistema nervioso. Se han identificado vías neuronales básicas que regulan la respuesta inflamatoria. Los estímulos inflamatorios activan vías sensoriales que llevan información al hipotálamo. Se puede considerar que el sistema nervioso integra la respuesta inflamatoria, reservando información sobre eventos invasivos de varios sitios localizados, moviliza defensas y crea memoria para promover oportunidades de sobrevivencia (Tracey, 2002).

El SNC desarrolla una serie de respuestas características ante la presencia de moléculas proinflamatorias como las citocinas. Investigaciones con roedores acerca del efecto de las citocinas en interacción con el SNC, muestran un decremento en la actividad exploratoria, social y sexual, baja ingesta de comida y agua, alteraciones en el sueño y aprendizaje. Dentro de las moléculas inductoras de estos comportamientos están identificados las interleucinas (IL) IL-2, IL-1 β , IL-6 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). La administración de citocinas puede conllevar a una sintomatología depresiva. En humanos sanos, se observó que la secreción de citocinas conlleva a endotoxemia, correlacionando este acontecimiento con la disminución de humor, apetito y memoria (Pollmächer *et al.*, 2002).

1.2 Barrera hematoencefálica: el paso de sustancias y células circulantes

La barrera hematoencefálica impide el flujo de componentes intravasculares de la sangre al cerebro. Pocas macromoléculas sanguíneas son llevadas al interior del cerebro porque la transcitosis vesicular en las células endoteliales es considerablemente limitada, debido a las uniones estrechas que se encuentran entre las células endoteliales. En la primera línea de la barrera hematoencefálica el glicocálix endotelial el cual está negativamente cargado, la capa superficial de proteoglicanos y las proteínas de plasma absorbidas,

contribuyen a los efectos protectores de las paredes de los vasos que están involucradas en mantener la permeabilidad vascular. En el citoplasma endotelial de los vasos del cerebro, existe una línea de defensas enzimáticas como la fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, la 5'nucleotidasa, trifosfatasa-adenosina, y la nucleósido difosfatasa todas estas enzimas colaboran en la activación de los sustratos. Además se cuenta con varios transportadores que permiten ingreso y liberación de ciertas moléculas no liposolubles como la P-glicoproteína, proteína asociada a la resistencia a drogas, proteína resistente a cáncer de mama, transportadores de aniones orgánicos, transportadores de cationes orgánicos, por mencionar algunos. Una gran cantidad de evidencias apoyan el transporte indeseable a circulación de sustancias como el péptido beta amiloideo, en donde su acumulo fuera del cerebro puede contribuir al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Estas mismas proteínas transmembranales son las responsables del paso de ciertos medicamentos hacia el cerebro (Ueno, 2009).

Se ha observado que condiciones como la fiebre, provocan una gran activación del SNC, modulando el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal, a nivel fisiológico se podría traducir como una "conducta de enfermedad", el cual incluye fatiga, anorexia y aislamiento social. Estos efectos son consecuencia de una abundante cantidad de citocinas capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y llegar hacia sus receptores en las neuronas. Por otro lado, además de moléculas de circulación, también células de origen mieloide pueden ingresar al SNC, tal es el caso de la infección del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), en la cual monocitos que cuentan con el ADN del virus son capaces de ingresar al sistema nervioso central y transfectar este material genético a la glía y astrocitos conduciendo a la producción de especies reactivas de oxígeno y moléculas inflamatorias lo que resulta en una disfunción y hasta la muerte neuronal. Por lo tanto esta es una de las causas de la demencia por VIH (Valcour *et al.*, 2010). Las células T CD8⁺ citotóxicas son consideradas un efector importante al daño neural en inflamación y desórdenes degenerativos del SNC. La evidencia que apoya este suceso fue a partir de

experimentos *in vitro* con cultivos de neuronas y rebanadas de cerebro de hipocampo, comprobándose la interacción directa entre el linfocito T CD8⁺ y neuronas, esta interacción esta mediada por lo menos a través del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I presente en la neuronas y el antígeno específico CD8⁺ de las células T. Estas células inmunes tienen la habilidad de provocar daño dendrítico e inducir la apoptosis neuronal, comprobado tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo* (Meuth *et al.*, 2009)

Durante condiciones inflamatorias del SNC como en la esclerosis múltiple y en el modelo animal de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), las células inmunes son capaces de migrar desde circulación al parénquima del cerebro a través de los espacios del fluido cerebroespinal. Se han descrito múltiples vías posibles para el ingreso de estas moléculas, una de ellas incluyen nervios aferentes como el vago, la unión estrecha de las células endoteliales de la vasculatura del cerebro y los órganos circunventriculares (OCV), estructuras carentes de barrera hematoencefálica, estos últimos considerados como el mejor acceso de entrada para los componentes de sangre hacia el cerebro. (Pittman y Mouihate, 2003 y Hosoi *et al.*, 2002). Los OCV son estructuras localizadas en las paredes de los ventrículos, tales como el órgano subfornical y el órgano vasculoso de la lámina terminal, ambos se encuentran en la pared anterior del tercer ventrículo, y por último el AP órgano situado en la zona caudal al final del cuarto ventrículo. La función primordial de los OCV es sensar los cambios en la composición sanguínea que generan estrés subsecuente a hipovolemia o fenómeno inflamatorio, cambios osmóticos, iónicos y de composición hormonal. Por lo tanto, a estos tejidos, gracias a su estructura y función, se les puede clasificar como mediadores en el cerebro de la información relacionada con el estado de equilibrio dinámico del medio interno (Gómez y Escobar *et al.*, 2002, Schulz y Engelhardt 2005).

Recientemente se ha sugerido que los plexos coroideos también podrían ser una entrada alternativa para los leucocitos hacia el fluido cerebroespinal. Los

plexos coroideos pertenecen a los OCV localizados en las paredes de los ventrículos, y es aquí donde se han encontrado abundantemente leucocitos CD45⁺, siendo la mayoría positivos a marcadores de macrófagos como F4/80 y CD11b. Las moléculas de adhesión celular (CAM) ICAM-I y VCAM-I fueron sobrerreguladas en los capilares de los vasos de los OCV. Una sobrerregulación del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I a través de lo OCV y la expresión de MHC clase II en células perivasculares indican la activación inmune de los OCV. Esto visto a partir de tratamientos con el modelo animal de la esclerosis múltiple la EAE (Schulz y Engelhardt 2005).

1.2.1 El AP como interfase entre el SNC y el sistema inmune

El AP es un OCV descrito como la interfase entre la sangre y el SNC debido a su carencia de barrera hematoencefálica (Maolood *et al.*, 2009). Localizada en el cuarto ventrículo, el AP tiene proyecciones eferentes principalmente a los núcleos del tracto solitario y parabrancial, además provee y recibe señales de una gran variedad de centros autónomos (Fry and Ferguson, 2007; Cottrell *et al.* 2004). Dentro de las funciones autónomas que regula están la ingesta de comida, homeostasis de fluidos del cuerpo y regulación cardiovascular. El AP también es conocida como una zona blanco del reflejo del vómito (Goehler *et al.*, 2006). Esta estructura cuenta con una vasta vasculatura fenestrada y con neuronas que sensan condiciones fisicoquímicas de la sangre como la presión osmótica, el tono cardiovascular, el estado metabólico y la activación inmune. Desde el estudio de la Neuroinmunología, el AP es una entrada para moléculas proinflamatorias debido a que cuenta con receptores en sus neuronas hacia estas moléculas. (Roth *et al.*, 2004). En un experimento con ratas tratadas con lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas se demostró la relación directa entre células inmunes y neuronas del AP. Por medio de ensayos con microscopía electrónica se logró identificar la presencia de células inmunes circulantes las cuales hacían contacto directo con las neuronas, posiblemente,

para ser activadas y poder realizar una respuesta para la defensa contra patógenos. (Goehler *et al.*, 2006) Observaciones similares de la presencia de células inmunes circulantes en el AP se han obtenido a partir de la inducción de EAE (Schulz and Engelhardt, 2005; Schmitt *et al.*, 2012). Estas evidencias proponen al AP también, como modulador de la respuesta de defensa inmune del huésped.

1.3 Neuroinflamación por estrés

El término “estrés” deriva del latín *stringere*, que significa originalmente oprimir, apretar o atar (Gómez y Escobar *et al.*, 2002). El estrés puede considerársele como la reacción más compleja para el organismo para asegurar la supervivencia y esto involucra al sistema neuroendocrino y una gran variedad de otros sistemas como el inmune, el cual juega un papel muy importante debido a la susceptibilidad de las células que lo componen a aquellas moléculas relacionadas con el estrés como la hormona liberadora de corticotropina, hormona adrenocorticotrópica, glucocorticoides, aminas biogénicas y citocinas, mismas moléculas que participan en reacciones frente a un antígeno (Ottaviani y Franceschi, 1996).

La respuesta al estrés es un mecanismo de supervivencia psicofisiológico adaptado evolutivamente, por ejemplo la reacción hacia un depredador. Sin embargo, los estresores han cambiado, no necesariamente incluyen acciones hacia la supervivencia, como sería el caso de cambios fisiopatológicos que irrumpen la homeostasis del organismo y pueden agravar la patogénesis de las enfermedades, como por ejemplo enfermedades inflamatorias, autoinmunes y alergias. En general, estrés, se puede incluir en el contexto de exposición a estresores ambientales (Arck *et al.*, 2006).

Al estrés se le puede denominar como un proceso fisicoquímico o emocional que promueve la liberación de variadas moléculas, como: citocinas, hormonas

como cortisol y neurotransmisores. El estrés físico o sistémico como lesiones tisulares, e infecciones, y el psicológico participan en procesos secundarios a la percepción de cada individuo. Tanto el estrés sistémico como el psicológico puede presentarse de manera aguda o crónica, el estrés agudo induce bajos niveles de cortisol y el efecto desaparece con la disipación del estresor, por otra parte, el estrés crónico provoca altos niveles de cortisol, y éste promueve desbalance en el sistema neuroendocrinoimmunológico (Pavón, *et al.*, 2004).

El estrés anímico crónico es una causa de una activación prolongada de la microglía, la cual resulta dañina hacia las funciones del cerebro y la conducta (Jurgens y Johnson, 2012). Este tipo de estrés puede incrementar el número de microglía en ciertas regiones del cerebro sensibles al estrés y también puede causar una marcada transición de la microglía de un estado en reposo a uno activado contribuyendo principalmente en la pérdida de ramificaciones (Tynan *et al.*, 2010). En experimentos con roedores utilizando un modelo de estrés social, se ha observado que monocitos de circulación pueden ser reclutados en el cerebro y estos desarrollar conducta de ansiedad (Wohleb *et al.*, 2013).

1.3.1 Molécula de adhesión de células neurales L1 como marcador de estrés

Las CAM en términos fisiológicos permiten el contacto célula-célula, y median la migración y transmigración a través de membranas por las paredes de los vasos sanguíneos. La CAM neuronal L1 (L1CAM) es una glicoproteína transmembranal expresada primordialmente en neuronas y la función que se ha establecido es para generar contacto con axones vecinos y en los conos crecientes donde modula varias funciones celulares. Mutaciones espontáneas en L1CAM producen varios síndromes neurológicos, como retraso mental. Se han demostrado cambios en la tasa de síntesis de L1CAM relacionado a la inducción de estrés. En estrés crónico aplicado a murinos se vio la alteración de en la expresión de transcritos de L1 observándose un aumento considerable. Bajo este tipo de estímulos, a nivel de morfología celular neuronal, los cambios

han sido evidentes como el de atrofia dendrítica y alteraciones sinápticas, esto acompañado de la sobreexpresión de L1CAM (Sandi, 2004).

En una investigación donde utilizaron cerebros postmortem de pacientes con desórdenes de humor demostró que L1CAM juega un papel muy importante en la plasticidad sináptica y estructural ya que su expresión se ve alterada, no obstante, no se sabe a qué obedecen tales cambios. En otro estudio realizado en pacientes con desorden de bipolaridad se extrajo sangre periférica y se midió en leucocitos la expresión de ARN mensajero de L1CAM encontrándose un aumento considerable respecto a pacientes sanos. Por lo tanto este estudio muestra la coexpresión de esta molécula de adhesión en células neuronales e inmunes (Wakabayashi *et al.*, 2008).

2. JUSTIFICACIÓN

El estrés anímico crónico genera un “estado de inflamación” en el cerebro, que ocasionan desajustes en la comunicación bidireccional entre el SNC y el sistema inmune llevando a consecuencias como suprimir o exacerbar respuestas inmunes protectoras. Por otro lado, una neuroinflamación ocasionada por la presencia de antígenos en el cerebro, puede inducir el llamado del sistema inmune circulante hacia el cerebro reclutando a estas células a través de OVC como el AP el cual enlaza la relación estrecha entre el SNC y el sistema inmune por su función de sensor cambios fisicoquímicos bidireccionalmente, además de carecer de barrera hematoencefálica. Asumiendo que el estrés al igual que un antígeno en el cerebro es un estímulo adverso que desata respuestas inflamatorias similares; éste podría promover el reclutamiento células inmunes circulantes en el SNC a través del AP para establecer contactos célula-célula entre ambos sistemas, a su vez generando cambios químicos en el AP y en el sistema inmune circulante.

Por esto se justificó utilizar un modelo de estrés anímico crónico en rata para demostrar los cambios en el AP influidos por la neuroinflamación generada por el estrés, como: el ingreso de células inmunes al AP y como llevan a cabo una comunicación directa con neuronas, suceso mediado por ajustes en la expresión de CAM; y la evaluación de la distribución de elementos, la composición orgánica en el AP y sistema inmune circulante.

3. HIPÓTESIS

El estrés anímico crónico induce el reclutamiento de células inmunes circulante en el AP llevando a cabo el contacto directo con neuronas por medio de la expresión de CAM, además de cambios químicos en el AP y en sistema inmune circulante.

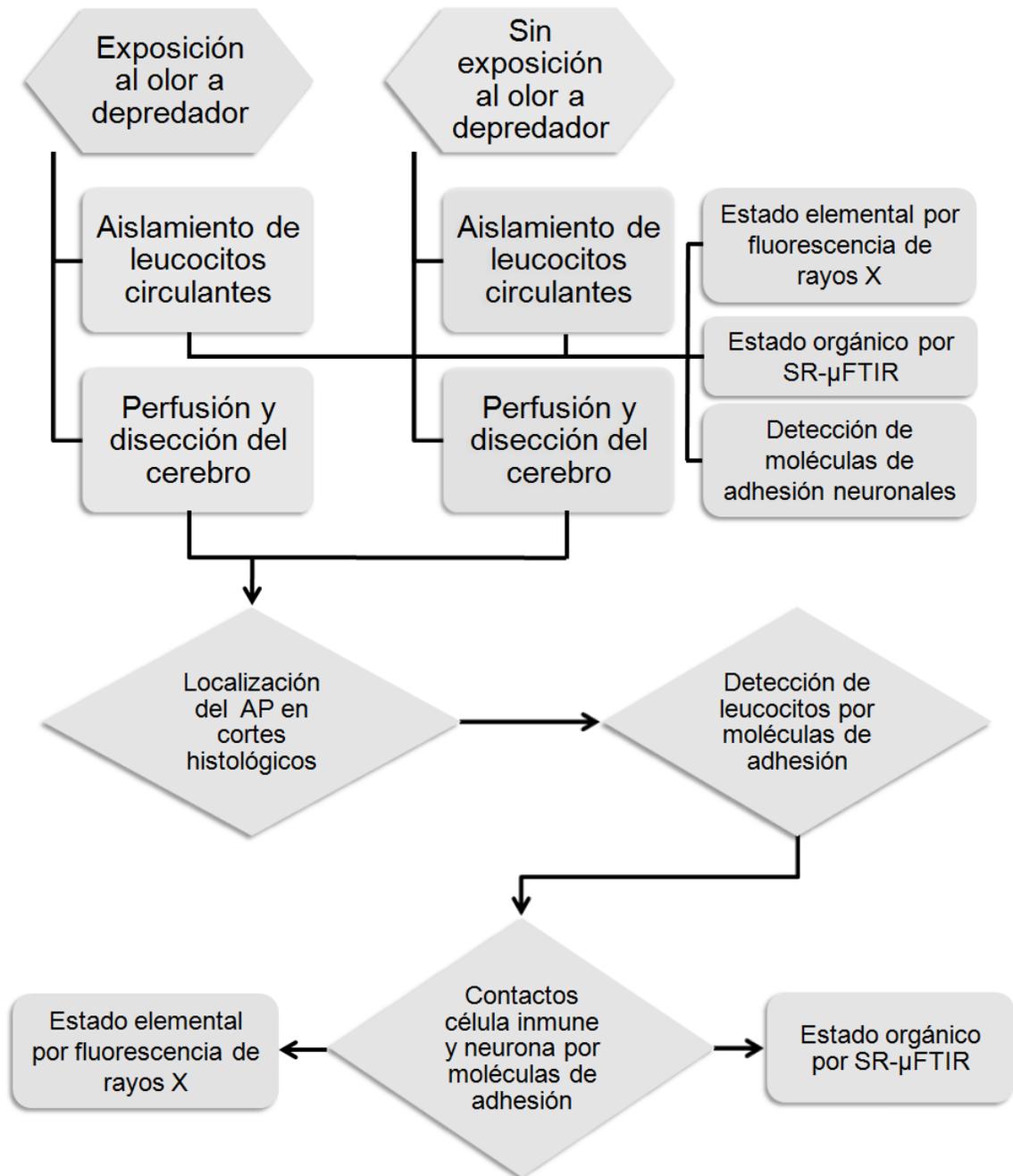
4. OBJETIVOS

Evaluar el reclutamiento de células inmunes circulantes en el AP de rata bajo estímulo de estrés anímico crónico y su interacción con neuronas por medio de moléculas adhesión celular, los cambios químicos en el AP y en sistema inmune circulante.

4.1 Objetivos específicos

- Identificar y cuantificar la presencia de células inmunes con marcadores para las CAM CD45 y CD11b para establecer la tipificación a través de expresión y morfología, por ensayos de inmunohistofluorescencia.
- Identificar por medio de marcadores neuronales e inmunes la interacción directa de células inmunes y neuronas del AP, por ensayos de inmunohistofluorescencia.
- Analizar la distribución de elementos en AP por microespectroscopía de fluorescencia de rayos X de fuente sincrotrón.
- Analizar la distribución de elementos en leucocitos circulantes de rata expuesta por microespectroscopía de fluorescencia de rayos X de fuente sincrotrón.
- Caracterizar el estado orgánico del AP por microespectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier de fuente sincrotrón (SR- μ FTIR).
- Caracterizar el estado orgánico de leucocitos circulantes de rata expuesta por SR- μ FTIR.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL



6. MÉTODOS

6.1 Estrés anímico crónico

Como modelo de estrés anímico crónico, se utilizó el método de rata expuesta a olor a depredador. Se utilizaron ratas macho Sprague Dawley de 250 a 280 g de peso. Durante la crianza los animales tuvieron libre acceso de agua y alimento, se controló el horario de luz y oscuridad de 12 X 12 h, respectivamente. Para el tratamiento se inició con un periodo de habituación que consistió en introducir a la rata en la caja de tratamiento (Figura 1) por 20 min, posterior se regresó el animal a la caja de crianza por otros 20 min para luego, en la caja de tratamiento, iniciar con la exposición de una tela impregnada con olor a gato casero, de nuevo por 20 min. Estos tratamientos se realizaban 5 días consecutivos a el mismo horario e iniciaban entre 8 y 9 am.

La tela con olor a depredador empleada para el tratamiento, era de material de algodón con dimensiones de 20 por 30 cm, la cual para adquirir el olor a gato, se colocó debajo de un gato casero mientras dormía y reposaba durante un día. Como control negativo se utilizó un grupo de ratas expuestas, a las mismas condiciones, incluyendo a una tela de las mismas características, a reserva del olor a gato (modificado de Dielenberg y McGregor, 2001).

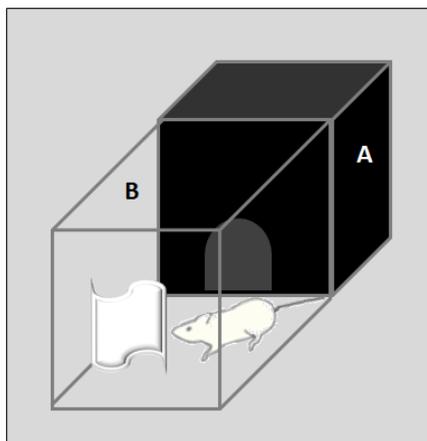


Figura 1. Cámara de tratamiento para las ratas. A. Área oscura designada para refugio con un orificio de entrada para el animal. B. En un área más amplia con paredes transparentes, en el fondo de la caja se coloca la tela con olor a gato.

6.2 Disección del AP

Concluidos los 5 días de imponer estrés a la rata, al sexto día se procedió con el sacrificio. Éste consistió en someter al animal a una dosis letal de anestesia con pentobarbital sódico (380 mg/kg) en la arteria femoral. Una vez que el animal perdió la pupilaridad y los reflejos en la cola y dedos, se procedió a la disección para la perfusión primeramente bloqueando el flujo sanguíneo a la parte inferior pinzando la vena porta. En la arteria aorta se insertó un catéter ingresando por el ventrículo izquierdo cardiaco y haciendo un corte en el atrio derecho para desalojar la sangre, a su vez, se hizo pasar solución amortiguadora de fosfatos salina (PBS) a pH 7.4 (NaCl 137 mM; Na₂HPO₄ 8.2 mM; KH₂PO₄ 1.5 mM) durante 10 min en un flujo de 10 mL/min, luego se agregaron 100 mL de solución fijadora de paraformaldehído (PFA) al 4% disuelto en PBS pH 7.4 en el mismo flujo tiempo de la solución anterior. El siguiente paso fue proceder con la decapitación, se separaron el encéfalo del hueso parietal retirando las membranas de meninges evitando fracturar el cerebro. Una vez aislada la porción anatómica correspondiente, ésta se sumergió en una solución de sacarosa al 30% disuelta en PBS pH 7.4 y se mantuvo a 4 °C durante toda la noche hasta precipitar el cerebro para luego sumergirlo en solución de Tissue tek[®] (OCT, Miles Inc., Vogel, Giessen, Germany), y después congelar el tejido a -25 °C. Una vez congelado el cerebro se procedió a la localización de la estructura del AP utilizando un criostato para realizar cortes histológicos coronales con un grosor de 10 micras, seccionados según las coordenadas Bregma de -13.68 a -14.16 mm. Los cortes se coloraron en portaobjetos con una cobertura de gelatina al 1% como adherente (Paxinos y Watson, 2005 y Schulz *et al.*, 2005). Los cortes se mantuvieron en congelación hasta su correspondiente aplicación.

6.2.1 Identificación del AP

En cortes coronales de cerebro de rata perfundido y fijado según se indica en el numeral 6.2, se corroboró la localización del AP, realizando tinciones. La primera de ellas fue la tinción de *Nissl*, utilizando violeta de cresilo, que en general permite identificar a las células por medio de los cuerpos de *Nissl* (retículos endoplasmáticos rugosos) a través de microscopía óptica. La segunda fue la tinción fluorescente con utilizando el 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), que permite identificar a las células por medio de los núcleos a través de interacción de éste con el ADN.

6.2.1.1 Tinción de *Nissl*

La técnica de tinción del tejido consistió en introducir las laminillas con las rebanadas de cerebro en varios baños con un tiempo determinado, cada uno (tabla 1) (Jones, 1996).

Tabla 1. Tinción de cortes de cerebro con violeta de cresilo. Secuencia de baños en distintas soluciones, cada una, por un tiempo determinado.

Solución	Tiempo
Etanol al 95%	15 min.
Etanol al 70%	1 min.
Etanol al 50%	1 min.
dH ₂ O	2 min.
dH ₂ O	1 min
Tinción de Violeta de cresilo	2 min.
dH ₂ O	1 min
Etanol al 50%	1 min
Etanol al 70%	2 min.
Etanol al 95%	2 min
Etanol al 95%	Algunas inmersiones
Etanol al 100%	1 min

Se dejaron evaporar los restos de etanol de los cortes para montar el cubreobjetos con resina y se dejó secar ésta por 12 h a 40°C. Las laminillas se conservaron a temperatura ambiente. Se adquirieron imágenes de los cortes utilizando un microscopio (Leica DM2000), en campo claro, con una cámara acoplada (Leica DFC420C) para luego procesarlas con el programa Leica application suite Microsystems Version 3.1.0. (Bennett *et al.*, 2009).

6.2.1.2 Tinción fluorescente con DAPI

La técnica de tinción del tejido consistió en depositar sobre los cada uno de los cortes, adheridos en la laminilla, aproximadamente 10 µL de una solución de DAPI con medio de montaje para preservación de la fluorescencia (Fluoroshield, Sigma) a una concentración de 1 µg/mL. Se colocó el cubreobjetos inmediatamente y se mantuvo en la oscuridad a temperatura ambiente al menos 3 min para permitir la unión del DAPI con el ADN. Se adquirieron imágenes de los cortes siguiendo el mismo protocolo que en el numeral 6.2.1.1, a reserva de que en este caso se utilizó la epifluorescencia del microscopio (Leica DM2000) que utiliza lámpara de mercurio como fuente de excitación. Las laminillas se conservaron, antes y después de uso a -30°C en oscuridad.

6.3 Inmunohistofluorescencia

6.3.1 Detección de células inmunes en el AP

La detección de células inmunes infiltradas en los cortes del AP se realizó por inmunohistofluorescencia simultánea. Se utilizaron anticuerpos primarios para detectar la presencia de CAM CD45 (antígeno común leucocitario) y CD11b (antígeno 1 para macrófago) que permiten reconocer distintos tipos leucocitos, entre ellos linfocitos y monocitos. El procedimiento consistió en agregar a cada sección solución de bloqueo que contenía albúmina de suero de bovino (BSA)

al 5% en PBS pH 7.4, dejando reposar 30 min, se retiró para luego incubar durante 2 h a temperatura ambiente con solución de mezcla de los anticuerpos primarios contra los antígenos CD45 (anticuerpo monoclonal de ratón contra rata, Abcam no. de cat. ab33923) a una dilución de 1:60 y CD11b diluido a 1:400 (anticuerpo policlonal de conejo contra rata Abcam no. de cat. ab75476) en solución de PBS/BSA al 1%. Se hicieron 3 lavados 3 por 10 min cada uno con PBS pH 7.4. Seguido se expuso por 2 h a temperatura ambiente a una mezcla de anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos que contenían: anticuerpo policlonal de cabra contra ratón IgG conjugado *Alexafluor*® 488 (Invitrogen No. de cat. A11001,) diluido a 1:2000 y anticuerpo policlonal de cabra contra conejo conjugado de *Alexafluor*® 594 (Invitrogen No. de cat. A11037) diluido 1:2000 ambos en solución de PBS/BSA al 1%, se realizaron 3 lavados con PBS pH 7.4 por 10 min cada uno, y por último se realizó un lavado con agua desionizada para retirar el exceso de sales. Después se agregaron sobre cada corte 10 µL de medio de montaje para fluorescencia (Fluoroshield, Sigma) con tinción para núcleos (DAPI) y se colocó el cubreobjetos. La visualización y adquisición de imágenes de los cortes se desarrolló como está descrito en el numeral 6.2.1.2 Los controles negativos de la inmunohistofluorescencia se hicieron utilizando un corte del tejido respectivo al cual se le hizo el mismo procedimiento a reserva de no agregar mezcla de anticuerpo primarios sustituyéndola por solución de bloqueo.

Las células positivas a los marcadores CD45 y CD11b fueron cuantificadas para determinar diferentes patrones de expresión, considerando cualquiera de las positividades o ambas en una misma célula. La tinción del núcleo con DAPI fue útil para determinar la señal de las células en el campo de visión. El número de células positivas se calculó como un promedio en al menos 3 cortes coronales de AP entre el Bregma -13.68 mm y -13.8 mm, La prueba de t de Student fue utilizada para comparar el grupo de estrés contra el grupo control, los valores de p menores al 5% fueron considerados como estadísticamente significativos. Todos los datos fueron expresados en promedios \pm el error estándar.

6.3.2 Detección de interacción de células inmunes con neuronas en el AP

Para observar la interacción entre células inmunes y neuronas en el AP se llevaron a cabo dos métodos de inmunohistofluorescencia con diferentes marcadores para neuronas.

6.3.2.1 Marcaje de de células inmunes con CD45 y neuronas con TrkA

Se realizó una inmunohistofluorescencia simultánea siguiendo un protocolo similar al numeral 6.3.1. Se identificaron leucocitos utilizando el anticuerpo monoclonal de ratón contra la molécula de adhesión CD45 de rata a una dilución de 1:60 (Abcam no. de cat. ab33923) y para identificar neuronas el anticuerpo policlonal de conejo contra el receptor neurotrófico tirosin cinasa 1 (TrkA) de rata a una dilución de 1:400 (Abcam no. de cat. ab8871) para identificar neuronas. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: el anticuerpo policlonal de cabra contra ratón IgG conjugado *Alexafluor*® 488 (Invitrogen No. de cat. A11001,) diluido a 1:2000 y anticuerpo policlonal de cabra contra conejo conjugado de *Alexafluor*® 594 (Invitrogen No. de cat. A11037) diluido 1:2000.

6.3.2.2 Marcaje de células inmunes con CD45 y de neuronas con L1CAM

Se realizó una inmunohistofluorescencia secuencial debido al mismo origen de las especies huésped de los anticuerpos utilizados. En el primer paso se identificaron neuronas con el anticuerpo monoclonal de ratón contra la molécula de adhesión neuronal L1CAM de rata a una dilución de 1:1000 (Abcam no. de cat. ab24345) y se utilizó el anticuerpo secundario policlonal de cabra contra ratón IgG conjugado *Alexafluor*® 488 a una dilución de 1:2000 (Invitrogen No. de cat. A11001) siguiendo el mismo protocolo del numeral 6.3.1. En el segundo paso se identificaron los leucocitos utilizando el anticuerpo monoclonal de ratón contra la molécula de adhesión CD45 de rata a una dilución de 1:60 (Abcam no.

de cat. ab33923) y se utilizó el anticuerpo secundario policlonal de cabra contra ratón IgG conjugado *Alexafluor*® 594 a una dilución de 1:2000 (Invitrogen No. de cat. A11005), de nuevo se utilizó el mismo protocolo del numeral 6.3.1.

6.3.3 Molécula de adhesión neuronal L1CAM en leucocitos circulantes

Para medir la expresión de moléculas neurales como L1CAM en sistema inmune circulante bajo estímulo de estrés anímico crónico, fue necesario llevar a cabo inmunocitofluorescencia a partir de leucocitos de sangre periférica. Para obtener un aislado de leucocitos, en el sexto día de tratamiento correspondiente al sacrificio de los animales, de acuerdo a como se describió en el numeral 6.2, una vez anestesiado el animal se tomó una muestra sanguínea por punción cardiaca. La sangre se recolectó en tubos vacutainer™ con EDTA, obteniéndose aproximadamente 4 mL por rata. El volumen de sangre de cada muestra fue diluida individualmente con un volumen de PBS con EDTA a pH 7.4 (NaCl 137 mM; Na₂HPO₄ 8.2 mM; KH₂PO₄ 1.5 mM; KCl 3.2 mM y EDTA 4 mM). Un volumen de 4 mL de la muestra diluida se depositó sobre una cama de 4 mL de solución isotónica de Percoll (40 % PBS-EDTA, 57.3 % Percoll™ y 2.7 % PBS 10X) y se centrifugó a 1000 g por 30 min. Los leucocitos aparecieron en la interfase del gradiente, se transfirieron a un nuevo tubo para realizar dos lavados cada uno homogenizando la células en 12 mL de PBS/EDTA y centrifugando a 1000 g por 10 min. El pellet resultante fue resuspendido en 1.5 mL de PBS/EDTA y una alícuota de 300 µL fue transferida a un nuevo tubo para fijar las células con solución de PFA al 4% en amortiguador de borato pH 9.5 dejando incubar a temperatura ambiente por 20 min. Las células fueron precipitadas con pulsos de 30 s y luego lavadas con 1 mL de agua desionizada y de centrifugas por 30 s. Por último, los leucocitos se resuspendieron en 200 µL de agua para tomar 15 µL y depositarlos sobre un portaobjetos con una cobertura de gelatina al 1% y hacer el frotis. Se dejó secar la muestra y se conservó a -30°C hasta su uso en el inmunoensayo.

La inmunocitofluorescencia se desarrolló delimitando con una barrera hidrofóbica el área a analizar y se agregó solución de bloqueo de PBS/BSA 5% dejando incubarse por 30 min. Se retiró la solución de bloqueo y se agregó la solución de anticuerpo monoclonal de ratón contra la molécula de adhesión neuronal L1CAM de rata a una dilución de 1:1000 (Abcam no. de cat. ab24345) diluido en PBS/BSA al 1% incubando a temperatura ambiente por 2 h. se realizaron 3 lavados con PBS de 10 min cada uno para agregarse la solución del anticuerpo secundario policlonal de cabra contra ratón IgG conjugado *Alexafluor*® 488 a una dilución de 1:2000 (Invitrogen No. de cat. A11001). Por último, se hicieron 3 lavados con PBS de 10 min cada uno y un último lavado con agua desionizada por 5 min. Se agregaron sobre el tejido una gota de medio de montaje para fluorescencia (Fluoroshield, Sigma) que contenía tinción para ácidos nucleicos (DAPI) y se colocó un cubreobjetos. Se observaron las células bajo un microscopio de epifluorescencia (Leica DM2000) las imágenes fueron tomadas con una cámara acoplada (Leica DFC420C) para luego procesarlas con el programa *Leica application suite Microsystems Version 3.1.0.* (Bennett *et al.*, 2009). Los controles negativos de la inmunocitofluorescencia se hicieron utilizando una laminilla con células a las cuales se les hizo el mismo procedimiento a reserva de no agregar mezcla de anticuerpo primarios sustituyéndola por solución de bloqueo.

6.4 Distribución de elementos en AP por microespectroscopía de fluorescencia de rayos X de fuente sincrotrón

Para determinar distribución de elementos como K, P, S, Na, Cl y Ca en AP se empleó la técnica de microespectroscopía de fluorescencia de rayos X de radiación sincrotrón en el *European Radiation Synchrotron Facility (ESRF)*. Ratas con y sin estímulo estrés anímico crónico fueron sacrificadas y perfundidas como está descrito en el numeral 6.2. Sin embargo en este ensayo para hacer desalojar la sangre se hizo pasar solución de NaCl al 0.9% durante

10 min a un flujo de 10 mL por min, para después introducir solución fijadora que contenía 4% de PFA en amortiguador de borato de sodio pH 9.5. Se disectó el cerebro y se dejó en solución de sacarosa al 10% en 0.9 % de NaCl toda la noche a 4 °C. Se embebió el tejido en Tissue-Tek[®], se congeló a -25 °C y se procedió a realizar cortes coronales de 10 μ m del AP los cuales se montaron en películas de Ultralene[®]. Las muestras se enviaron al ESRF en donde éstas se conservaron en un desecador hasta su uso en el microscopio. Cada muestra fue colocada en el porta muestras del microscopio de rayos X, en vacío, a temperatura ambiente y se seleccionó la región del AP de 4 μ m por pixel utilizando una energía de excitación de fotón de 4.1 KeV y un tiempo de permanencia por pixel 200 ms. Los datos fueron analizados por medio del programa PyMca desarrollado por el ESRF y se obtuvieron mapas de temperatura de la distribución de cada elemento.

6.5 Distribución de elementos en leucocitos circulantes por microespectroscopía de fluorescencia de rayos X de fuente sincrotrón

Para determinar la distribución de elementos en el sistema inmune circulante, bajo estímulo de estrés anímico crónico, se utilizó la técnica de microespectroscopía de fluorescencia de rayos X de fuente sincrotrón para obtener mapas en células individuales de leucocitos aislados de sangre periférica. Para obtener el aislado de leucocitos se realizó como se describió en el numeral 6.3.3. Una vez que los leucocitos fueron fijados, lavados y resuspendidos en agua desionizada se tomaron 15 μ L de éstos y se depositaron sobre una ventana de BaF₂ de 1 mm de grosor. Se dejó secar la muestra a temperatura ambiente hasta que el agua evaporó por completo. Las muestras fueron enviadas al ESRF en donde se conservaron en un desecador hasta su uso en el microscopio.

La ventana fue colocada en el porta muestras del microscopio de rayos X, a temperatura ambiente y se aplicó el vacío, posteriormente las células fueron

seleccionadas en el medio para realizar mapas de 300 x 300 nm por pixel utilizando una energía de excitación de fotón de 5.0 KeV y un tiempo de permanencia por pixel 500 ms. Los datos fueron analizados por medio del programa PyMca y se obtuvieron mapas de temperatura de la distribución de cada elemento.

6.6 Estado orgánico del AP por SR- μ FTIR

El estado orgánico en el AP bajo estrés anímico crónico se evaluó por SR- μ FTIR en la estación de infrarrojo (IR) del ID21 en el ESRF. Para ello se obtuvieron cortes coronales de AP de 5 μ m de grosor, a partir de cerebro perfundido y fijado por el mismo procedimiento descrito en el numeral 6.2, a diferencia de que en este estudio el montaje de la muestra se hizo sobre portaobjetos de vidrio con recubrimiento de plata para realizar análisis de reflexión. La muestra se midió en el microscopio de IR (Thermo Nicolet Continuum) acoplado a un espectrómetro de FTIR (Thermo Nicolet Nexus), equipado con un objetivo de 32x, un portamuestras motorizado y un detector de telurio de cadmio y mercurio enfriado con nitrógeno líquido. Los mapas se realizaron con una apertura del rayo sincrotrón de 8 X 8 μ m, con 64 escaneos y pasos de 10 μ m en ciertas zonas de interés del AP como la periferia.

Los mapas espectrales obtenidos fueron analizados en el programa OmnicTM versión 8.1 y se obtuvieron mapas con la distribución de señales de interés relacionadas con biomoléculas que presentaron cambios en el grupo de ratas estresadas respecto al grupo control.

6.7 Estado orgánico de leucocitos circulantes por SR- μ FTIR

Para medir el estado orgánico del sistema inmune circulante, bajo estímulo de estrés anímico crónico, se utilizó la técnica de SR- μ FTIR para obtener espectros únicos en células individuales de leucocitos aislados de sangre

periférica. Para obtener el aislado de leucocitos se realizó como se describió en el numeral 6.3.3. Una vez los leucocitos ya fijados, lavados y resuspendidos en agua desionizada se tomaron 15 μL de la suspensión y se depositaron sobre una laminilla de reflexión. Se dejó secar la muestra aplicando 30 °C durante 5 min y posteriormente a temperatura ambiente hasta que el agua evaporó por completo. Se enviaron las muestras al ESRF en donde se conservaron en un desecador hasta su uso en el microscopio.

En un experimento preliminar de SR- μFTIR en célula única de leucocitos circulantes se adquirieron espectros llevados a cabo en el modo de reflexión utilizando el microscopio de IR antes mencionado en el numeral 6.4 bajo los siguientes parámetros. Para lograr equiparar el tamaño del rayo de la fuente sincrotrón sobre el tamaño de la célula se eligió apertura de éste de $9 \times 9 \mu\text{m}$. Los espectros fueron registrados desde una energía de 4000 a 900 cm^{-1} ; con una resolución espectral de 6 cm^{-1} y tomándose 128 escaneos por cada célula para luego promediar cada dato obtenido por muestra de células de cada rata. Fueron analizadas catorce y trece células de una rata control y una rata estresada, respectivamente.

Los datos fueron analizados con el programa OmnicTM v8.1. Todos los espectros fueron convertidos en segunda derivada utilizando el algoritmo de Savitzky/Golay a 21 puntos y un segundo orden del polinomio. Para demostrar las diferencias en composición orgánica entre los dos grupos fueron considerados cambios en: la posición de la banda, descrito como el cambio de la posición en el número de onda de máxima absorción de cada señal, e intensidad de absorbancia utilizando el valor mínimo obtenido en la segunda derivada de alguna región de interés del espectro. Los promedios y errores estándar fueron calculados para los espectros y la prueba de significancia *t* de *student* ($p \leq 0.05$) permitió demostrar las diferencias significativas de cambios en la posición de entre ambos grupos.

7. RESULTADOS

7.1 Disección del AP

Por tinción de Nissl con cristal violeta se disectó el AP en cortes coronales de cerebro de rata, basándose en las coordenadas Bregma -13.68 mm y -14.16 mm aproximadamente. Al término de la estructura del cuarto ventrículo en la médula oblongada se encuentra el inicio del AP, la cual se caracteriza por una forma triangular (Figura 2), contar con una mayor densidad celular al resto de la médula y ubicarse por arriba del canal central, vestigio del cuarto ventrículo (Figura 3).

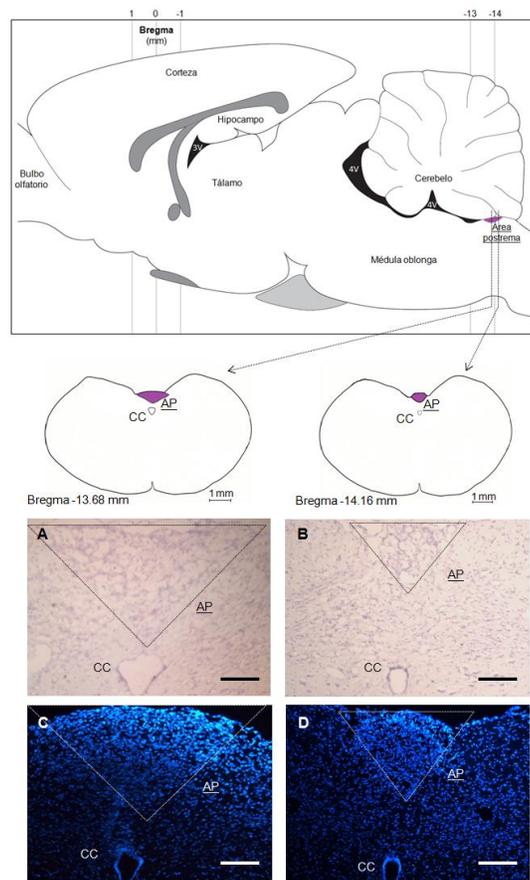


Figura 2. Tinción de Nissl y tinción fluorescente con DAPI en cortes coronales médula oblongada de rata. El esquema superior muestra las estructuras de un cerebro de rata en vista transversal. Las líneas enumeradas muestran las coordenadas de Bregma medidas en milímetros. La estructura señalada en violeta adentro de la médula oblongada muestra el AP y las flechas punteadas que pasan a través indican esquemas de cortes coronales de la médula oblongada

en dos coordenadas Bregma (-13.68 y -14.16 mm) que contienen el AP señalada en violeta. (A y B) Tinciones de Nissl (C y D) tinción fluorescente de DAPI de cortes coronales de la médula oblongada que contiene al AP señalado entre líneas punteadas AP y el canal central (CC). (A y C) cortes a -13.68 mm de coordenada Bregma y (B y D) cortes a -14.16 mm de coordenada Bregma. Barras de escala 100 μ m.

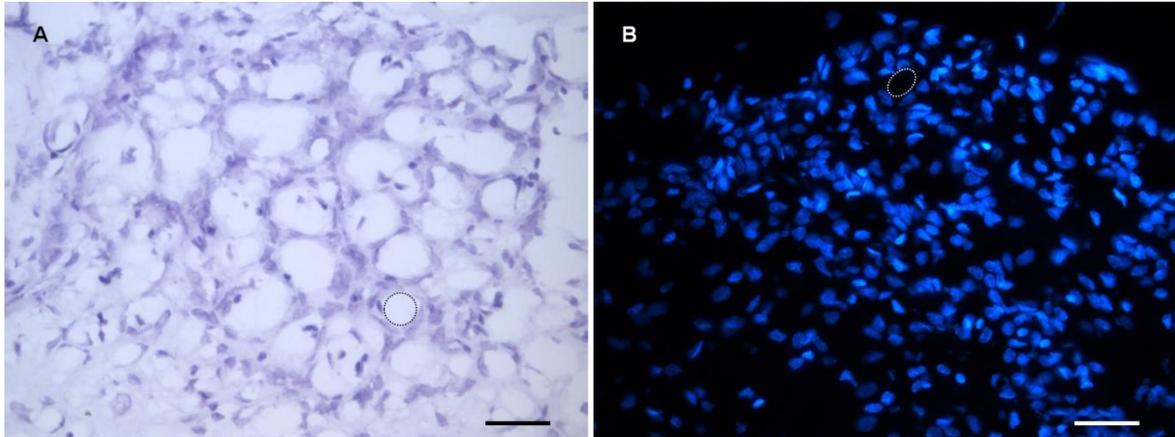


Figura 3. (A)Tinciones de Nissl y (B) fluorescente de DAPI de cortes coronales de AP de rata. Magnificaciones a 40X de la estructura del AP. En el óvalo punteado se señala la estructura de vaso característico del AP. Barras de escala 50 μ m.

7.2 Identificación de células inmunes en AP bajo estrés anímico crónico a través de moléculas de adhesión

Para observar la presencia de células que expresan en su superficie las CAM CD45 y CD11b dentro del AP, los cerebros de 7 ratas control y de 7 ratas bajo estrés anímico crónico fueron disectados para analizar el AP por inmunohistofluorescencia. Como se describió en los métodos las células positivas a CD45 y CD11b fueron contadas en 3 cortes consecutivos del AP de cada cerebro. Se determinaron tres inmunofenotipos sin considerar tamaño o morfología, estos fueron: CD45⁺/CD11b⁺, CD45⁺/CD11b⁻ y CD45⁻/CD11b⁺. Todas las señales fluorescentes se confirmaron como células a partir de la señal brindada por el núcleo teñido con DAPI. Como se puede apreciar en la Figura 4, el número de células CD45⁺ en cortes de AP en condición de estrés aumentó cerca de cuatro veces (A: 18 \pm 2 control Vs 89 \pm 3 estrés p<0.001), en contraste, las células CD11b⁺ fueron casi un 20% más abundantes que las CD45⁺ y también se incrementaron cerca de 5.5 veces en condición de estrés

(B: 21 ± 3 control Vs 114 ± 7 estrés $p < 0.01$). Los tres inmunofenotipos encontrados ($CD45^+/CD11b^+$, $CD45^+/CD11b^-$ y $CD45^-/CD11b^+$) también aumentaron, tres (Figura 4C: 7 ± 1 control Vs 24 ± 2 estrés $p < 0.01$), seis (Figura 4D: 11 ± 2 control Vs 65 ± 4 estrés $p < 0.01$) y siete veces (Figura 4E: 14 ± 2 control Vs 91 ± 8 estrés $p < 0.01$), respectivamente. La Figura 5 son imágenes representativas que muestra como las células $CD45^+$ y $CD11b^+$ aumentaron significativamente en AP de animales estresados en comparación al grupo control (Figura 5 control A, C, E, G Vs estrés B, D, F, H). También se puede observar un considerable aumento de la intensidad de la fluorescencia y cómo la mayoría de estas células inmunes se acumulan en la periferia del AP, especialmente en el borde cerca de las leptomeninges.

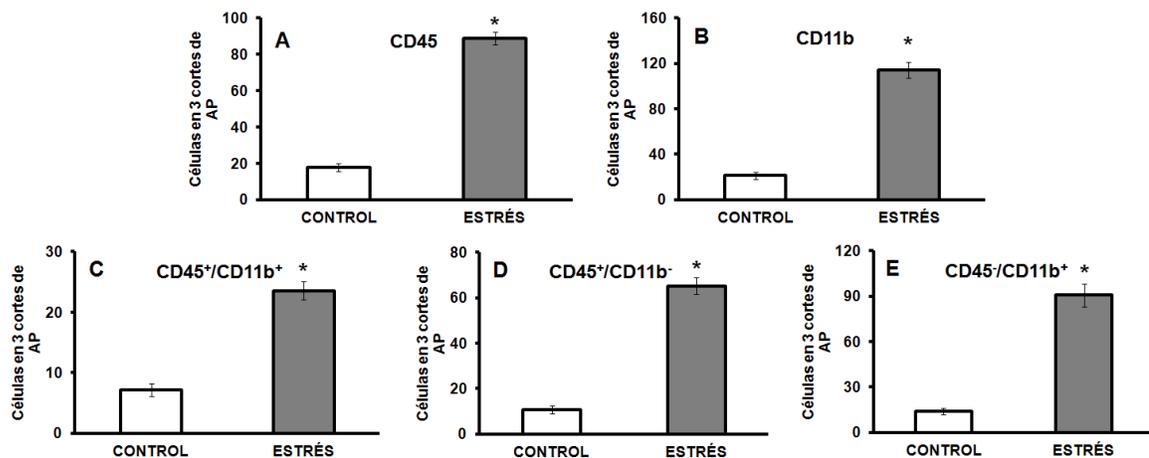


Figura 4. Promedios (\pm error estándar) del número de células positivas a las CAM CD45 y CD11b por inmunohistofluorescencia en cortes coronales de AP. Las células fueron contadas a partir de tres cortes coronales consecutivos de AP de ratas control ($n = 7$) y ratas bajo estrés anímico crónico ($n = 7$), determinándose tres fenotipos diferentes. El * indica las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$).

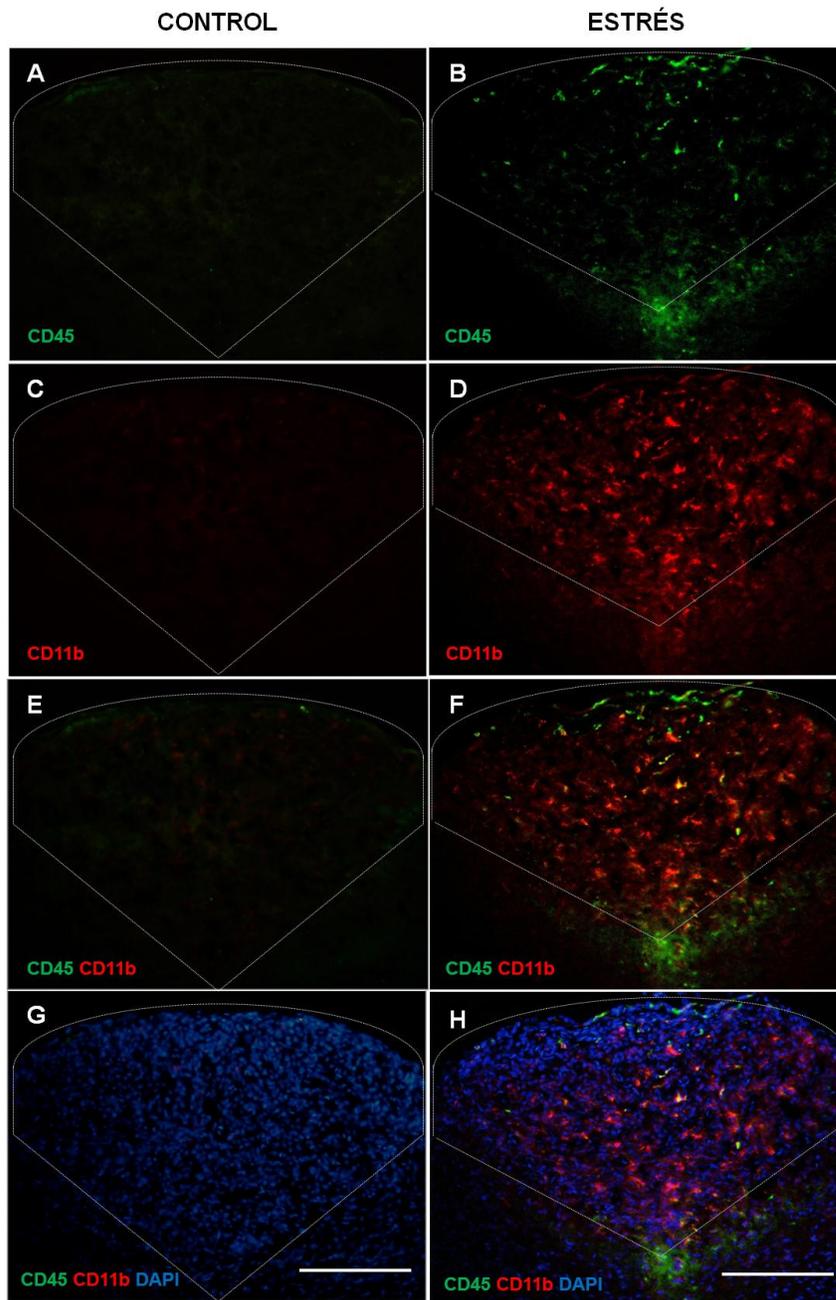


Figura 5. Inmunohistofluorescencia para las CAM CD45 y CD11b en AP de ratas control y bajo estrés anímico crónico. Imágenes representativas de cortes coronales de AP que muestra el marcaje para CD45 en verde (A control y B estrés), CD11b en rojo (C control y D estrés). Las imágenes E control y F estrés son la superposición de los marcadores para CD45 y CD11b, y las imágenes G control y H estrés son la superposición de los marcadores CD45, CD11b y DAPI (tinción para núcleos). Las líneas punteadas delimitan la estructura del AP. Barras de escala 100 μ m.

En una imagen representativa de un aumento de 40x de AP de ratas control y estresadas se muestran los diferentes inmunomorfotipos de las células positivas a CD45 y CD11b mismas que están resumidas en la tabla 2. Se encontró una variedad de morfologías en ambos grupos así como un aumento en la fluorescencia en el caso del grupo de estrés. Tres inmunomorfotipos se detectaron en AP del grupo control (Figura 5 A, C, E, G) microglía ramificada que expresó tanto CD45 como CD11b (rombo) y microglía longitudinal con fenotipos $CD45^+/CD11b^-$ (cabeza de flecha) y $CD45^-/CD11b^+$ (flecha). En comparación el grupo de estrés a pesar de mantenerse los tres inmunofenotipos ($CD45^+/CD11b^+$, $CD45^+/CD11b^-$, $CD45^-/CD11b^+$) se mostró un notable cambio en la morfología de células caracterizadas como la microglía a través de la pérdida de ramificaciones y obteniendo una estructura ameboidea, así como la aparición de células redondas con características de ser linfocitos y monocitos (Figura 5 B, D, F, H). El fenotipo $CD45^+/CD11b^+$ se observa una célula con ramificaciones cortas casi ameboidea y el fenotipo $CD45^-/CD11b^+$ una célula con total ausencia de ramificaciones ameboidea (triángulo y cuadrado, respectivamente en la Figura 5). Interesantemente el inmunofenotipo $CD45^+/CD11b^+$ con una estructura ramificada (rombo Figura 5 B, D, F, H) se observó igual que en el control, sin embargo en el caso del grupo estrés la intensidad de fluorescencia fue alta para ambos marcadores. También se localizaron células redondas con morfología similar a leucocitos de circulación como aquellas que expresaron únicamente $CD45^+$ con estructura de un linfocito (asterisco Figura 5 B, H), y células de morfología ovoide con expresión de $CD45^+/CD11b^+$ (círculo Figura 5 B, D, F, H), ambos tipos celulares con alta intensidad de fluorescencia. Este hallazgo sugiere que estas células se pudieron infiltrar de circulación hacia el AP y es necesario resaltar que estas células estuvieron casi ausentes en el grupo control.

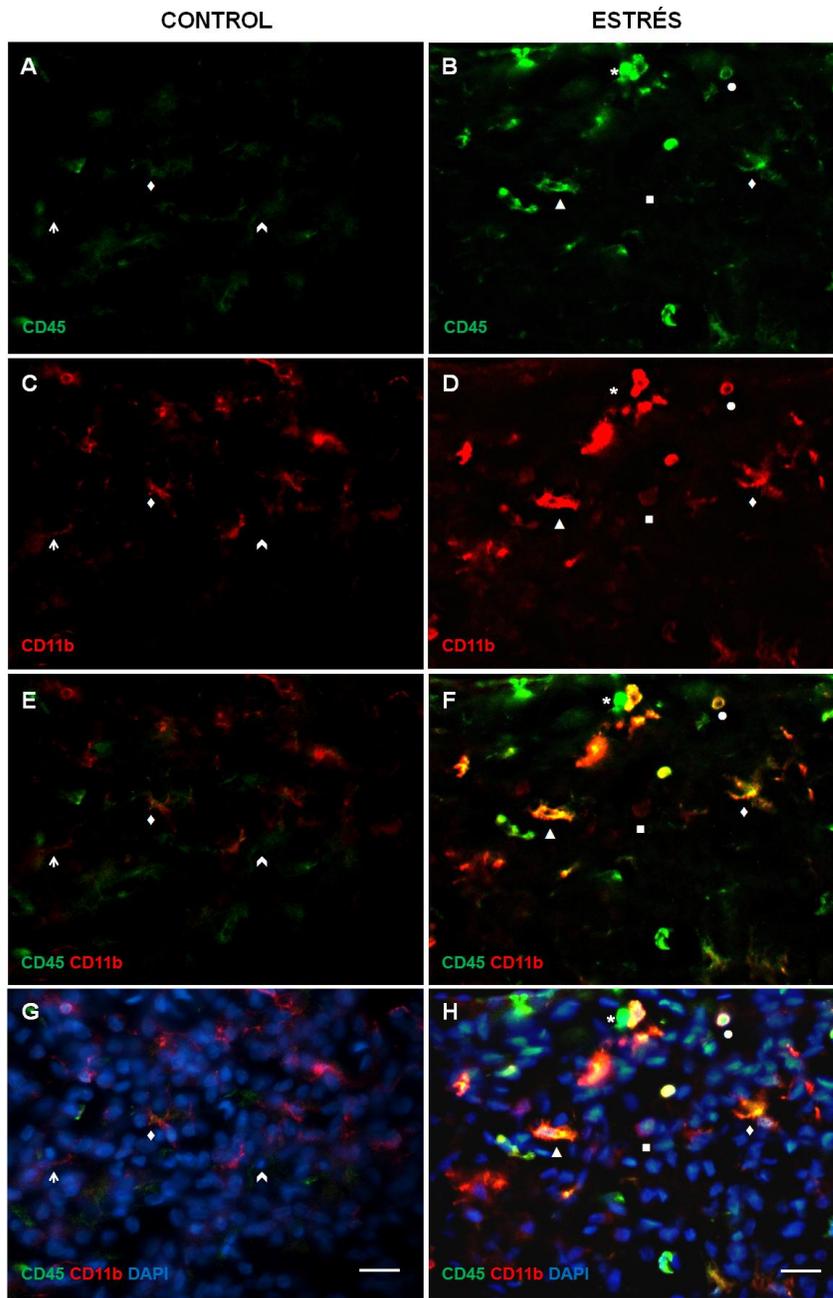
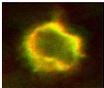
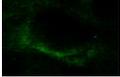


Figura 6. Magnificaciones 40x de inmunohistofluorescencia para las CAM CD45 y CD11b en AP de ratas control y bajo estrés anímico crónico. Marcador verde CD45 de A control y B estrés. Marcador rojo CD11b de C control y D estrés. Superposición de marcaje de CD45 y Cd11b en E control y F estrés. Superposición de marcaje de CD45, CD11b y DAPI (tinción para núcleo) en G control y H estrés. Símbolos utilizados para señalar los inmunomorfotipos de células inmunes fueron: * CD45⁺/CD11b⁻ linfocito, ● CD45⁺/CD11b⁺ monocito, ◻ CD45⁻/CD11b⁺ microglía ameboidea con pérdida de ramificaciones, ◄ CD45⁺/CD11b⁺ microglía ameboidea y ◊ CD45⁺/CD11b⁺ microglía ramificada o macrófago. Barras de escala 20 μm.

Tabla 2. Clasificación de los inmunomorfotipos para las CAM CD45 y CD11b en células inmunes en AP inducido por estrés anímico crónico. Se describen los diferentes fenotipos y morfologías de células inmunes, que incluyen microglía y leucocitos, encontrados en AP de grupos control y estrés de la figura 6.

	CD45	CD11b	Morfología	Intensidad de Fluorescencia	Símbolo en la Figura 6	Descripción
Control	+	+		Baja	Rombo	Microglía ramificada
Estrés	+	+		Alta	Rombo	Microglía ramificada o macrófago
	+	+		Alta	Triángulo	Microglía ameboidea
	+	+		Alta	Círculo	Monocito o neutrófilo
Control	+	-		Baja	Cabeza de flecha	Microglía longitudinal
Estrés	+	-		Alta	Asterisco	Linfocito
Control	-	+		Baja	Flecha	Microglía longitudinal
Estrés	-	+		Baja	Cuadrado	Microglía ameboidea

En el caso de aquellas células con morfologías similares a leucocitos de circulación, su localización se dio en puntos estratégicos lo cual sugiere que su acceso es a través de los vasos del AP y que posiblemente su dirección es hacia el cuarto ventrículo. Como se muestra en la Figura 5 A, y el amplificado de los insertos, se observan dos células alrededor de un vaso con morfología redonda parecida a la de linfocitos con inmunofenotipo $CD45^+/CD11b^-$ de alta fluorescencia junto a una célula alargada ameboidea con inmunofenotipo $CD45^+/CD11b^-$ de baja intensidad de fluorescencia. Gracias a que estos tipos celulares localizados se pueden diferenciar por medio de la morfología e intensidad, esta evidencia puede demostrar que el estrés anímico crónico induce el reclutamiento de leucocitos circulantes a través de los vasos AP. En la Figura 7 B se muestra una imagen representativa del evento más encontrado en casi cada corte de AP del grupo de estrés analizado, esto fue el marcaje para células $CD45^+/CD11b^-$ redondas con morfología de linfocito muy cercanas a las leptomeninges (I1 y I2, de la Figura 7 B) y dentro de las leptomeninges (I3 y I4, de la Figura 7 B). Por otro lado, en la Figura 7 C se muestran células redondas y alargadas en su mayoría con el inmunofenotipo $CD45^+/CD11b^+$, localizadas en alrededor de la periferia del AP en la zona superior, cercano a las leptomeninges hacia el cuarto ventrículo. Las evidencias mostradas en las Figura 7 B y C demuestran que las células con inmunomorfotipo de leucocitos de circulación como linfocitos y monocitos se podrían direccionar hacia meninges y hacia el cuarto ventrículo.

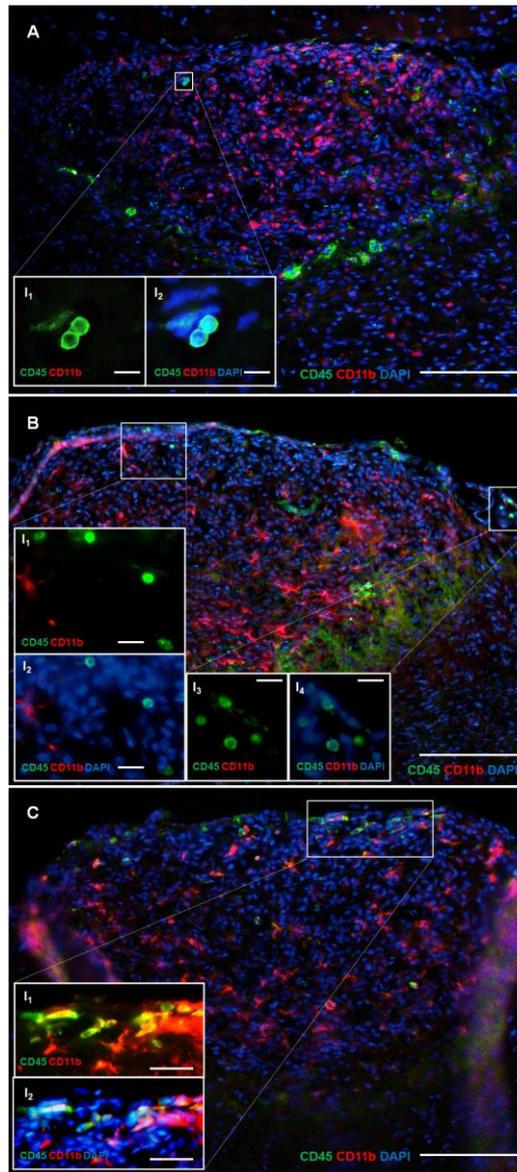


Figura 7. Inmunohistofluorescencia de AP para las CAM CD45 y CD11b en AP de ratas bajo estrés anímico crónico. (A) AP que muestra en los insertos de magnificaciones (I1 e I2) la superposición de los marcajes para CD45 y CD11b de tres células CD45⁺/CD11b⁻ dos de ellas redondas con morfología de linfocito al interior de un vaso enseguida de una célula ameboidea con morfología de microglía. (B) AP que muestra en los insertos de magnificaciones (I1 y I2) cuatro células redondas con morfología de linfocitos CD45⁺/CD11b⁻ próximas a leptomeninges, y cuatro células del mismo inmunomorfotipo acumuladas dentro de las leptomeninges (I3 e I4). (C) AP que muestra en los insertos de magnificaciones (I1 y I2) células en su mayoría CD45⁺/CD11b⁺ con morfología redonda y alargada aparentemente monocitos acumuladas en el borde del tejido transicional del AP a leptomeninges y el cuarto ventrículo. Barras de escala para A, B y C de 100 μ m y para los insertos de A, B y C de 10, 15 y 20 μ m, respectivamente.

7.3 Detección de interacción de células inmunes con neuronas en el AP

7.3.1 Marcadores para células inmunes “CD45” y neuronas “TrkA” en AP

Por ensayos de inmunofluorescencia fueron detectadas neuronas y células inmunes en el AP para corroborar contactos entre estos dos tipos de células de diferentes sistemas. Para identificar neuronas se utilizó un anticuerpo contra el receptor neuronal TrkA y para identificar células inmunes un anticuerpo contra molécula de adhesión CD45. De la misma manera que en los ensayos de inmunohistofluorescencia y mencionados se utilizó la tinción de núcleo con DAPI para comprobar la identificación de la señal de las células. Como se puede apreciar en la Figura 8 es una colección de imágenes del mismo corte del AP con inmunohistofluorescencia para los marcadores TrkA y CD45 y en las magnificaciones como de la Figura 8 A se puede observar un célula con morfología redonda similar a un leucocito circulante; en la Figura 8 B se observa en la magnificación el soma de una neurona identificado con TrkA; y en las Fig 8 C y D se observan el cercano contacto entre la neurona TrkA⁺ y el leucocito CD45⁺, corroborado por la señal con DAPI. Este contacto físico entre una neurona del SNC y un leucocito de circulación provocado por estrés anímico crónico, es hasta el conocimiento de la autora de este trabajo, observado por primera vez. Otro interesante hallazgo fue que células inmunes, como microglía y leucocitos circulantes en el AP, identificadas con el marcador CD45 fueron capaces de expresar a su vez el receptor neuronal TrkA. Como se muestra en la Figura 9 tanto una célula con morfología de microglía (insertos 1, 2, 3 de la Figura 9) como un leucocito circulante (14, 5, 6 de la Figura 9) expresaron ambos marcadores en la superficie. Este evento se incrementó estadísticamente de manera significativa en situación de estrés anímico crónico valorándolo a través de cuantificar la expresión relativa de células TrkA⁺/CD45⁺ en AP (Figura 10: 8 ± 0 -control Vs 13 ± 2 -estrés $p < 0.05$).

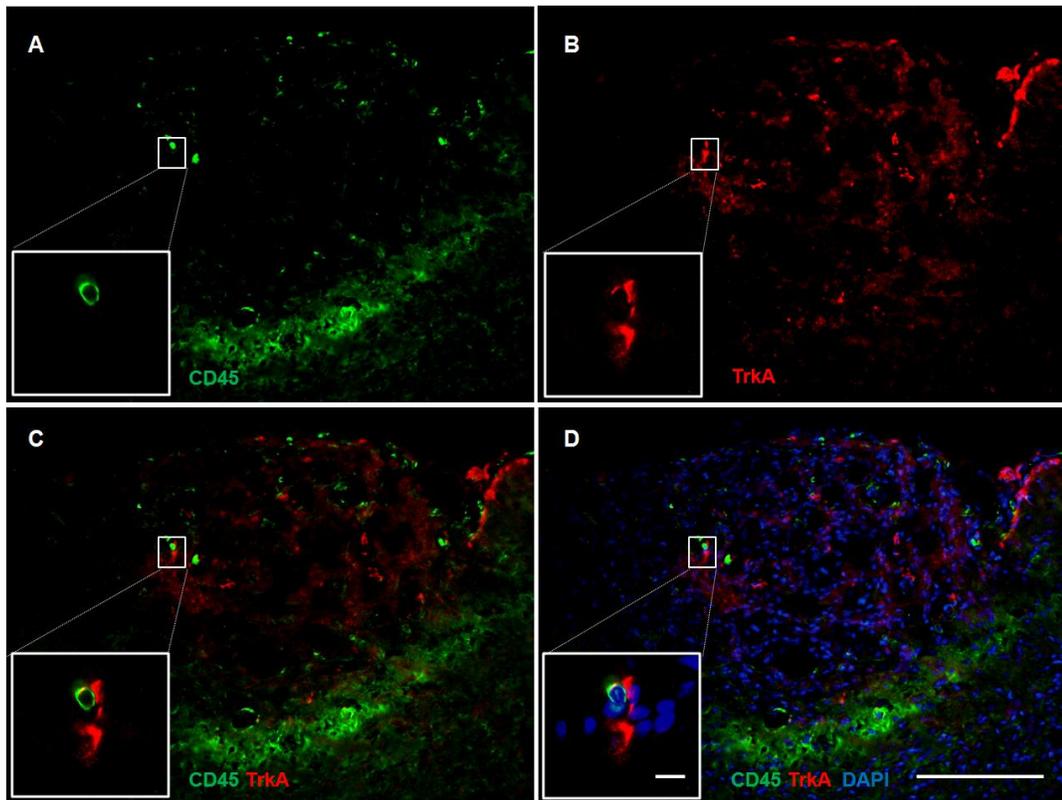


Figura 8. Inmunohistofluorescencia del contacto célula inmune neurona a través del receptor neuronal TrkA y la molécula de adhesión CD45 en AP de rata bajo estrés anímico crónico. Colección de imágenes que muestran el contacto directo entre células inmunes de origen circulatorio con neuronas del AP. (A) marcador CD45 en verde, el inserto de magnificación muestra una célula redonda de morfología similar a un leucocito. (B) marcador TrkA en rojo el inserto de magnificación muestra el soma teñido de una neurona. (C) superposición de marcadores para CD45 y TrkA. (D) superposición de marcadores CD45, TrkA y del núcleo teñido con DAPI en azul. Barras de escala 100 μm y 10 μm para los insertos.

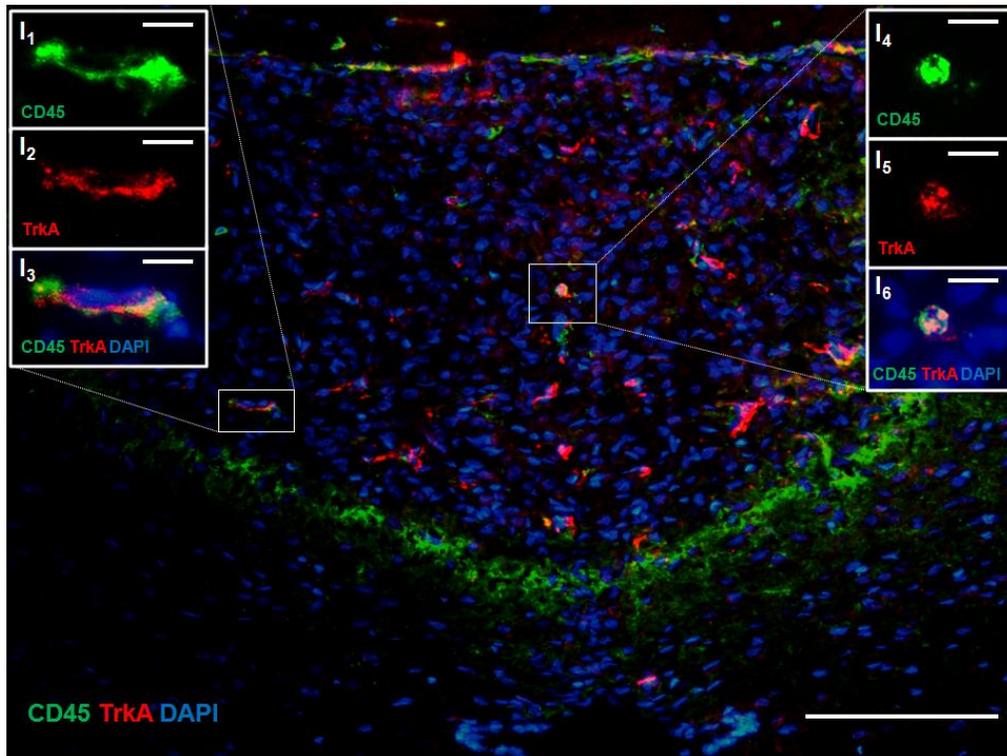


Figura 9. Inmunohistofluorescencia para la coexpresión de moléculas TrkA y CD45 en células inmunes de AP de rata bajo estrés anímico crónico. Imagen representativa de la coexpresión del receptor neuronal TrkA y de la molécula de adhesión CD45 en microglía y leucocitos circulantes en AP. (I1, I2 y I3) Insertos de magnificaciones de la coexpresión de TrkA y CD45 en una célula microglía. (I4, I5 y I6) Insertos de las magnificaciones de la coexpresión de TrkA y CD45 en un leucocito circulante. Barras de escala 100 μ m y 10 μ m para los insertos.

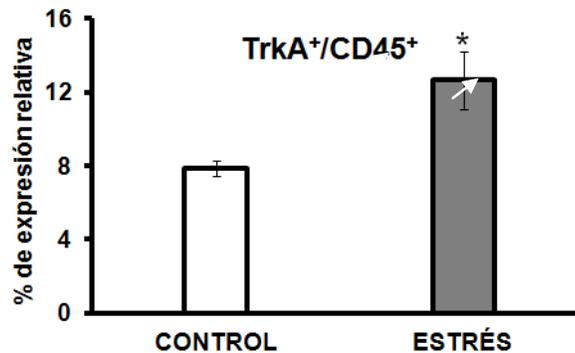


Figura 10. Expresión relativa de células TrkA+/CD45+. Proporción de células TrkA+/CD45+ (media en porcentaje \pm error estándar) en cortes coronales de AP. Animales control (n = 7) y animales bajo estrés anímico crónico (n = 7). El * indica diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$).

7.3.2 Marcadores para células inmunes “CD45” y neuronas “L1CAM” en AP

Por ensayos de inmunofluorescencia fueron detectadas neuronas y células utilizando esta vez como marcadores dos moléculas de adhesión, una de origen inmune (CD45) y otra de origen neuronal (L1CAM) en el AP para corroborar contactos entre estos dos tipos de células de diferentes sistemas. Estas moléculas se expresan en la membrana plasmática y en el caso de la molécula de adhesión neurona L1CAM se expresa en las extensiones citoplasmáticas de las neuronas. Al igual que en los ensayos inmunohistofluorescencia anteriormente mencionados se utilizó la tinción de núcleo con DAPI para comprobar la identificación de la señal de las células. Como se puede apreciar en la Figura 11 es una colección de imágenes del mismo corte del AP con inmunohistofluorescencia para los marcadores L1CAM y CD45 en la que se pueden observar interesantes eventos. El primero son los contactos mediados por ambas CAM como los existentes entre células redondas con morfología similar a un leucocito circulante CD45⁺ y células L1CAM⁺ (insertos I1 de Figura 11 A, B, C, D) así como también contactos entre células con ramificaciones con morfología similar a la microglía CD45⁺ y células L1CAM⁺ (insertos I2 de Figura 11 A, B, C, D). El segundo evento, de la misma manera en ocurrió con el marcador TrkA, es que ciertas células CD45⁺ expresaron también la superficie L1CAM como se observa en los señalamientos con flecha en la Figura 11, no obstante en las mismas imágenes del corte también se pueden observar que otras células CD45⁺ no expresaron L1CAM (señalamientos con asterisco). En la mayoría de los cortes analizados de AP de ratas estresadas (n=4) la coexpresión de ambas CAM en al menos una célula se observó, en su generalidad células redondas con morfología de leucocitos circulantes (Figura 12 B, D, F, H); sin embargo en los cortes de AP del grupo control (n=3) la mayoría no presentó este evento (Figura 12 A, C, E, G).

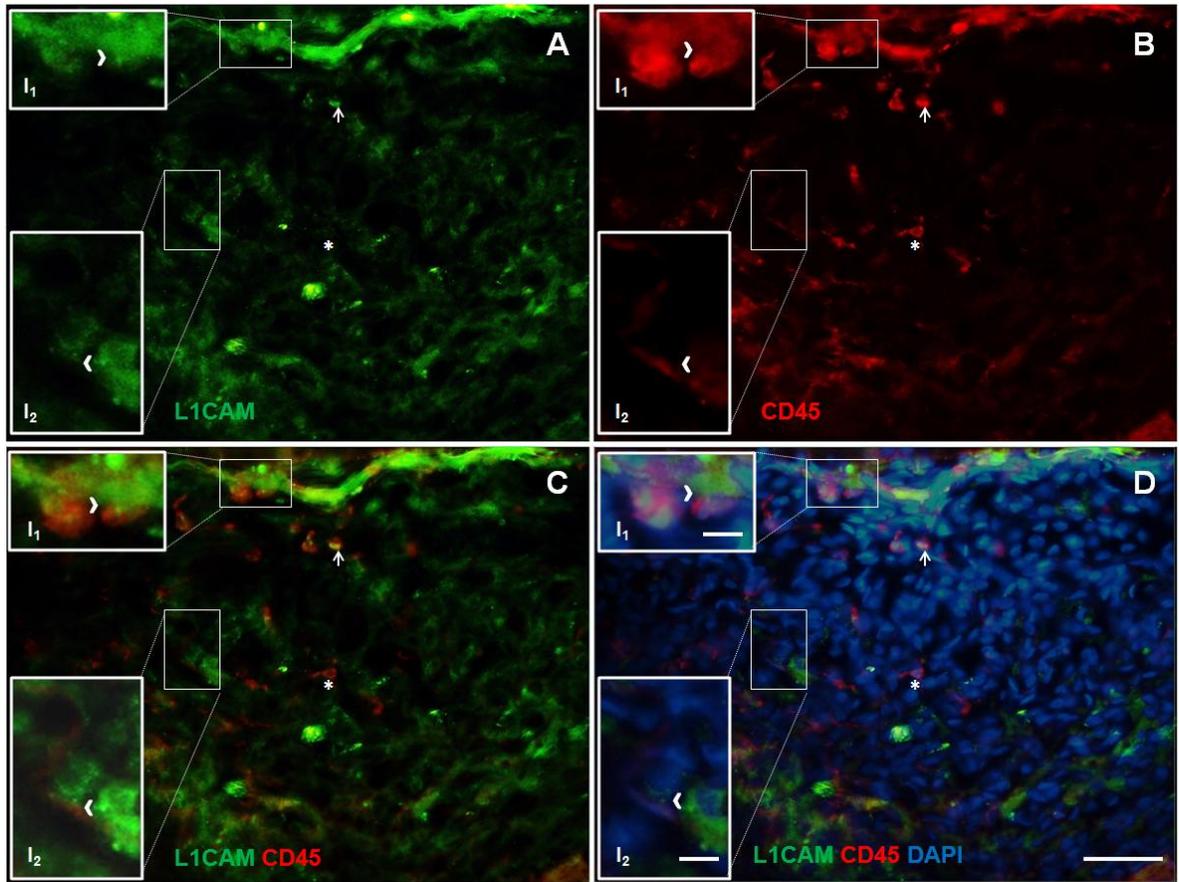


Figura 11. Inmunohistofluorescencia del contacto célula inmune neurona a través de las CAM L1CAM y CD45 en AP de rata bajo estrés anímico crónico. Colección de imágenes que muestran el contacto directo entre células inmunes con neuronas del AP. (A) marcador L1CAM en verde, (B) marcador CD45 en rojo (C) superposición de marcadores para L1CAM y CD45. (D) superposición de marcadores L1CAM, CD45 y DAPI. Insertos 1 (I1) muestran magnificaciones de células redondas CD45⁺ haciendo contacto con células L1CAM⁺, señalado con cabeza de flecha. Insertos 2 (I2) muestran magnificaciones de células con ramificaciones CD45⁺ haciendo contacto con células L1CAM⁺, señalado con cabeza de flecha. Flecha indica célula CD45⁺/L1CAM⁺ y asterisco indica célula CD45⁺/L1CAM⁻. Barras de escala 50 µm y 10 µm para los insertos.

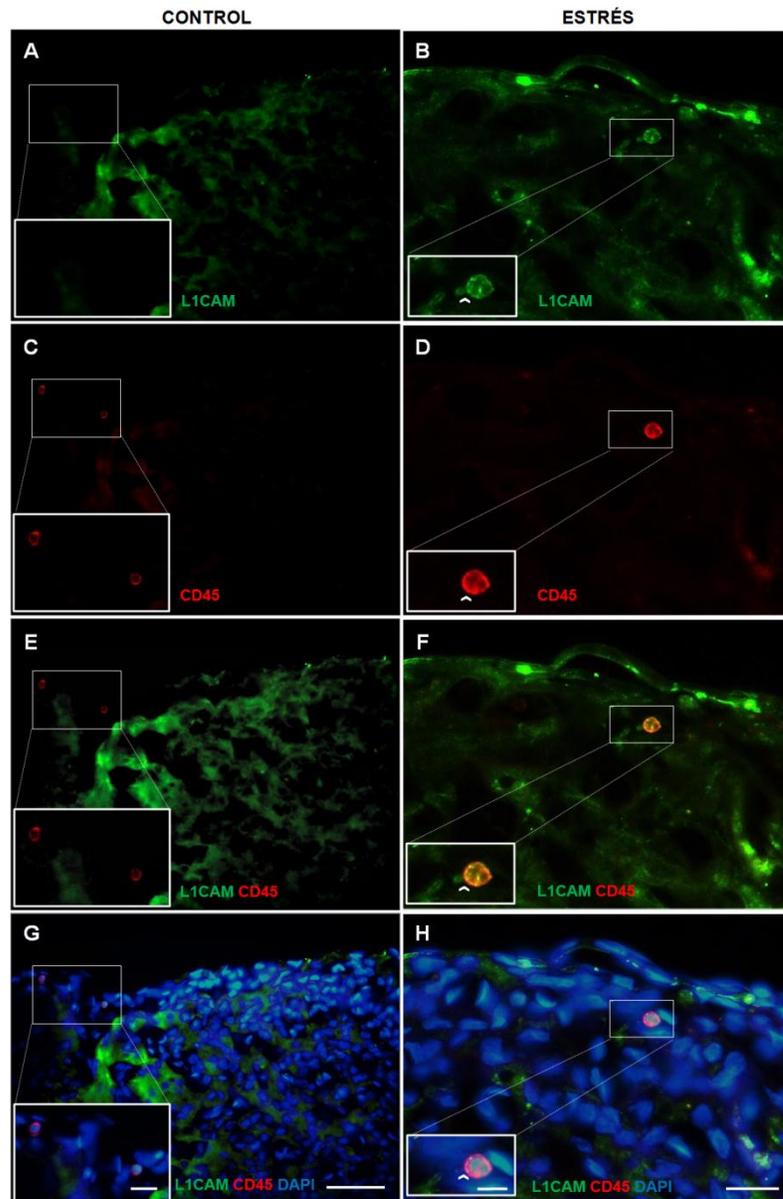


Figura 12. Inmunohistofluorescencia de la coexpresión de CAM L1CAM y CD45 en células inmunes de AP de rata bajo estrés anímico crónico. Acercamientos 40x y 63x para cortes de AP control y estrés, respectivamente. Insertos de magnificación en control señalan células redondas con morfología de leucocitos circulantes $CD45^+/L1CAM^-$ (A, C, E, G). Insertos de magnificación en estrés señalan una célula redonda con morfología de leucocito circulante $CD45^+/L1CAM^+$, la cabeza de flecha indica el contacto entre una neurona $L1CAM^+$ y la célula $CD45^+/L1CAM^+$ (B, D, F, H). Barras de escala para A, C, E, G 100 μm y 20 μm para los insertos. Barras de escala para B, D, F, H 25 μm y 10 μm para los insertos.

7.4 Molécula de adhesión neuronal L1CAM en leucocitos circulantes

En base a los resultados obtenidos de la coexpresión de la molécula de adhesión neuronal L1CAM en leucocitos circulantes reclutados en el AP, se verificó si este evento ocurría también en sistema inmune en circulación, bajo las mismas condiciones. Para dar respuesta a esta incógnita se realizaron ensayos de inmunocitofluorescencia en leucocitos circulantes aislados de sangre periférica utilizando los mismos anticuerpos que en la inmunofluorescencia para identificar L1CAM en AP. Los resultados arrojaron que efectivamente leucocitos circulantes expresan en la superficie L1CAM, sin embargo esto se observó tanto en leucocitos del grupo control como del grupo de ratas bajo estrés anímico crónico, siendo este último más elevado duplicándose el número de células que se localizan con la señal positiva por campo analizado (Figura 13).

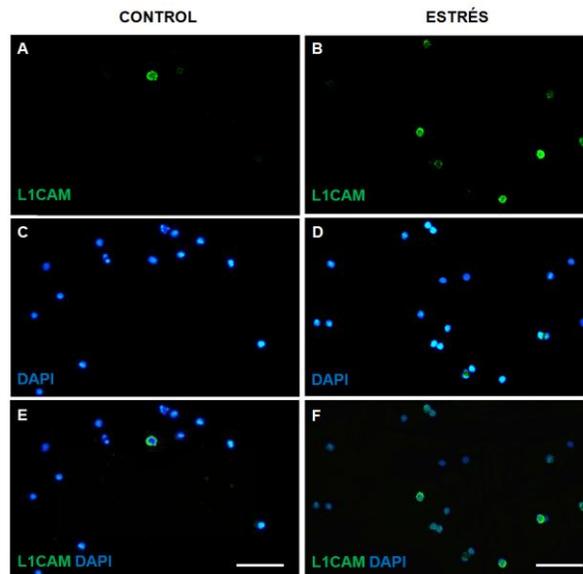


Figura 13. Inmunocitofluorescencia de la expresión de L1CAM en leucocitos circulantes de rata bajo estrés anímico crónico. Acercamientos 40x de frotis de leucocitos circulantes de rata control y estresadas. A, C y E son una colección de imágenes del mismo campo para identificar células que expresan L1CAM en la superficie (fluorescencia en verde) usando como control de señal de la célula la tinción de núcleo con DAPI (Fluorescencia en azul). Lo mismo para la colección de imágenes B, D y F para células de ratas estresadas. Barras de escala 50 μ m.

7.5 Distribución de elementos en AP por microespectroscopía de fluorescencia de rayos X de fuente sincrotrón

Para evaluar *in situ* la distribución de elementos como K, P, S, Na, Cl y Ca en el AP bajo estrés anímico crónico se realizaron ensayos de microespectroscopía de fluorescencia de rayos X de fuente sincrotrón en el ESRF para la obtención de mapas de temperatura. Fueron analizados un corte coronal de AP de control y uno de estrés y para demostrar cuantitativamente las diferencias en la distribución de un mismo elemento entre ambas muestras, se utilizó un solo número de cuentas en la escala de temperatura para hacer el comparativo. En la Figura 14 se puede apreciar en general una diferencia en la abundancia en todos los elementos analizados en la muestra bajo estrés anímico crónico la cual aumenta considerablemente respecto a la muestra control. Sin embargo, ciertos elementos como K, S, y Cl, al parecer son característicos en el AP los cuales se localizaron en mayor concentración al resto de la médula oblongada.

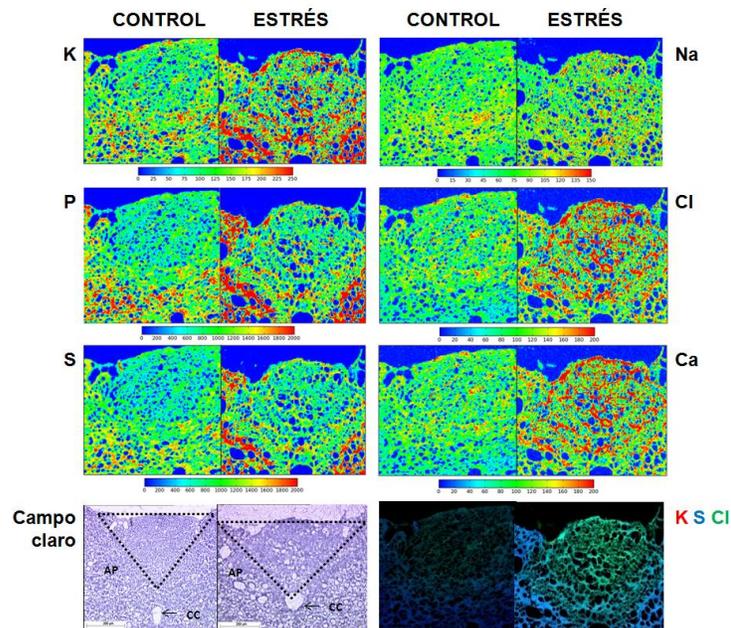


Figura 14. Microespectroscopía de fluorescencia por rayos X de fuente sincrotrón en AP de rata bajo estrés anímico crónico. Se ilustra la morfología y la correspondiente distribución elemental de un corte coronal de AP de ratas control y estresada en mapas de temperatura, un mapa con la suposición de la señal de los 3 elementos que resultaron característicos en el AP (K, S y Cl), así como una imagen de ambos cortes en campo claro.

7.6 Distribución de elementos en leucocitos circulantes por microespectroscopía de fluorescencia de rayos X de fuente sincrotrón

Para evaluar *in situ* la distribución de elementos como P, S, Cl y K en leucocitos circulantes bajo estrés anímico crónico se realizaron ensayos de microespectroscopía de fluorescencia de rayos X de fuente sincrotrón en el ESRF para la obtención de mapas de temperatura. Fueron analizados 15 leucocitos de cada muestra de dos animales control y dos de estrés y para demostrar cuantitativamente las diferencias en la distribución de un mismo elemento entre ambas muestras, se utilizó un solo número de cuentas en la escala de temperatura. En la Figura 15 se observan células representativas de cada grupo y se puede apreciar en general una diferencia en la abundancia en todos los elementos analizados en la muestra bajo estrés anímico crónico la cual disminuye considerablemente respecto a la muestra control.

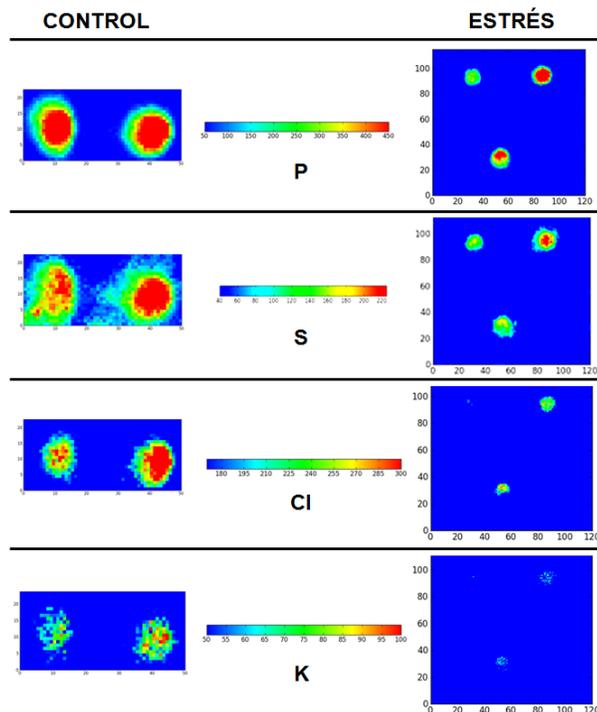


Figura 15. Microespectroscopía de fluorescencia por rayos X de fuente sincrotrón en leucocitos circulantes de rata bajo estrés anímico crónico. Se ilustra la morfología y la correspondiente distribución elemental en leucocitos circulantes por medio de mapas de temperatura. Los ejes de cada mapa representan escalas en nm.

7.7 Estado orgánico del AP por SR- μ FTIR

Para conocer el estado orgánico del AP de ratas bajo estrés anímico crónico se realizaron ensayos con SR- μ FTIR a partir de cortes coronales de AP de ratas control y estresadas. Se obtuvieron mapas de temperatura de la medición de espectros en una región delimitada del tejido de AP que se consideró de relevancia en base a los resultados de los ensayos de inmunohistofluorescencia de identificación de células inmunes. Estas regiones seleccionadas fueron la sección superior del AP próxima a las meninges en las cuales se localizaron la mayor parte de las células inmunes como leucocitos de circulación y microglía. Se utilizó el modo de reflexión para la medición de la señal vibracional con SR- μ FTIR. Los resultados brindaron la huella vibracional de moléculas biológicas como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos.

En la Figura 16 se muestran mapas representativos de muestras control y estrés en los que se señalan espectros que indican aquellos picos relacionados con componentes lipídicos que obtuvieron algún cambio. En el pico de 1467 cm^{-1} que corresponde a la vibración de la banda del grupo metilo del colesterol (Movasaghi *et al.*, 2008), en los mapas de la Figura 16 A se observa una abundancia de la señal en el mapa de estrés en la zona superior periférica cercano a la meninges del AP y menos en la zona central. En el caso del pico a 1740 cm^{-1} asociada al del grupo éster en los fosfolípidos que se ha relacionado con productos finales de la peroxidación lipídica (Vileno 2010), la muestra tuvo un cambio considerable en la intensidad del pico y se refleja en la abundancia de la señal en toda zona analizada del AP (Figura 16 B). En las señales de los picos a 2848 y 2916 cm^{-1} , ambas se relacionan con las vibraciones de grupos CH_3 y CH_2 de fosfolípidos y colesterol (Movasaghi *et al.*, 2008), en donde la muestra estrés disminuyó la abundancia de estas señales respecto a la muestra control (Figura 16 C y D).

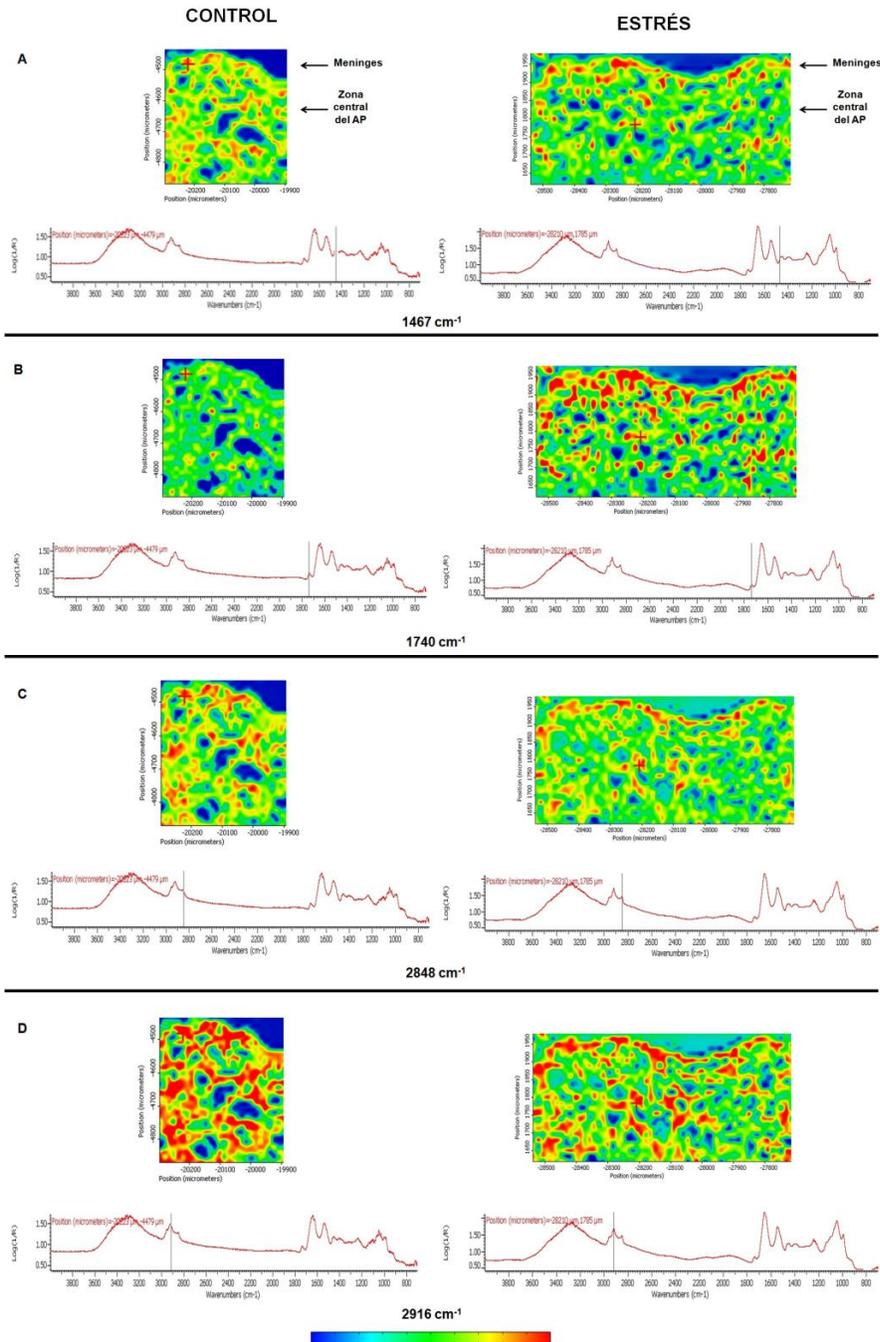


Figura 16. Mapas de temperatura a partir de espectros obtenidos por SR- μ FTIR de AP de ratas control y estresadas. Colección de imágenes de un mismo mapa en cuatro diferentes señales de vibraciones asociadas a moléculas lipídicas. A) Distribución de la señal del grupo metilo asociado a colesterol con un pico de 1467 cm^{-1} . B) Distribución de la señal del grupo éster en los fosfolípidos, con un pico de 1740 cm^{-1} . C) y D) Distribución de la señal de grupos CH_3 y CH_2 de fosfolípidos y colesterol, con un pico de 2848 cm^{-1} y de 2916 cm^{-1} , respectivamente⁻¹. Escala de temperatura indica, respecto al número de onda seleccionado, en azul la señal más baja y en rojo la más alta.

7.8 Estado orgánico de leucocitos circulantes por SR- μ FTIR

Para conocer el estado orgánico de leucocitos circulantes de ratas bajo estrés anímico crónico se realizaron ensayos con SR- μ FTIR. Se obtuvieron espectros en célula única que brindaron la huella vibracional de moléculas biológicas como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. Se utilizó el modo de reflexión para la medición de la señal vibracional con SR- μ FTIR. En la Figura 17 se muestran espectros representativos de muestras control y estrés en los que se indican aquellas regiones de bandas relacionadas con componentes bioquímicos.

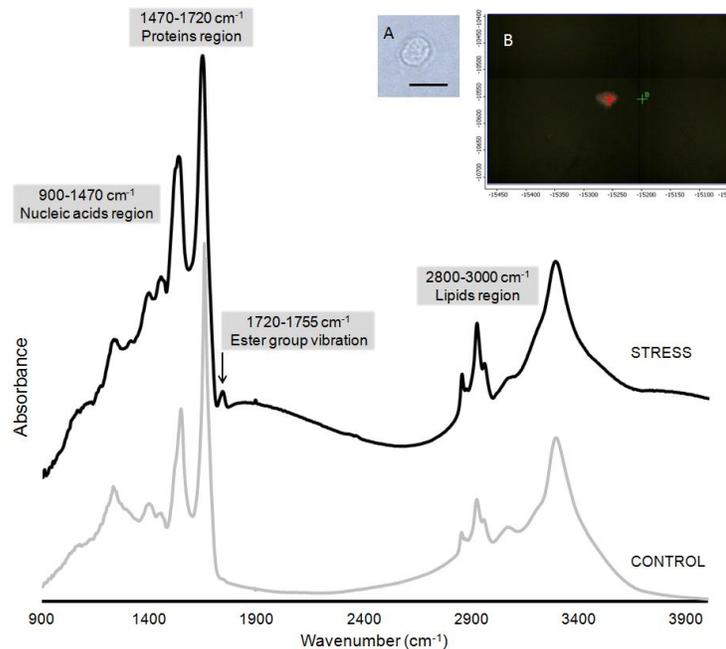


Figura 17. Espectros representativos de leucocitos de ratas control y ratas estresadas. Se indican las regiones de ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y la banda de vibración del grupo éster. Los insertos A y B son imágenes representativas de un leucocitos adquiridas con un microscopio óptico (barra de escala 10 μ m) y con el objetivo 32x de un microscopio de IR, respectivamente (Vargas-Caraveo *et al.*, 2014).

7.8.1 Análisis en segunda derivada

En el experimento preliminar en modo de reflexión se examinaron 14 y 37 células control y éster, respectivamente. Los espectros obtenidos se analizaron en segunda derivada a manera de normalizar los datos y poder detectar sutiles diferencias entre las muestras control y estrés. Para proveer una comparación estadística entre las bandas control y estrés, se calcularon promedios y errores estándar. La región de bandas relacionadas con ácidos nucleicos contuvo la mayoría los datos estadísticamente significativos entre grupos (Figura 18 A). En la banda de 915-950 cm^{-1} que corresponde a la vibración de estiramiento del enlace fosfodiéster, principalmente en la conformación del ADN de forma Z (Dovbeshko *et al.*, 2002), se encontró una diferencia significativa con el aumento en la absorción de la banda (Figura 18 B). En el caso de la banda que se origina de una vibración con estiramiento simétrico del enlace P-O-C (Dovbeshko *et al.*, 2000), tuvo un cambio en la posición de la intensidad del pico (número de onda, cm^{-1}) que se observó de 1150 a 1090 cm^{-1} . (Figura 18 C). También, otro cambio en la posición del pico de la banda que corresponde a 1200-1260 cm^{-1} de la vibración asimétrica de PO_2 (Nafisi *et al.*, 2012) en donde el grupo control tuvo el pico de máxima intensidad a 1236 cm^{-1} mientras que en el grupo estrés el pico se localizó a 1230 cm^{-1} (Figura 18 D). Las pruebas de t de student confirmaron la significancia estadística entre las muestras para ambas bandas correspondientes a grupos fosfato ($p < 0.01$). En contraste, en las bandas de las amidas I y II no se encontraron diferencias significativas entre grupos para la absorbancia o en las posiciones de los picos. Sin embargo dentro de esta región, en la banda de 1570-1610 cm^{-1} asociada con nucleótidos metilados, a bases nitrogenadas y varios grupos funcionales como C=C y C=N en grupos aromáticos, se encontró un aumento en la absorbancia y en la posición del pico; para control el pico de absorción fue en 1585 cm^{-1} contra estrés de 1587 cm^{-1} (Figura 19) (Dovbeshko *et al.*, 2000; Nafisi *et al.*, 2012; Boydston-White *et al.*, 1999; Welder, 2003). Por otro lado en la banda entre 1720 1755 cm^{-1} asociada al del grupo éster en los fosfolípidos que se ha

relacionado con productos finales de la peroxidación lipídica (Vileno 2010), incrementó significativamente en leucocitos de ratas estresadas (Figura 20)

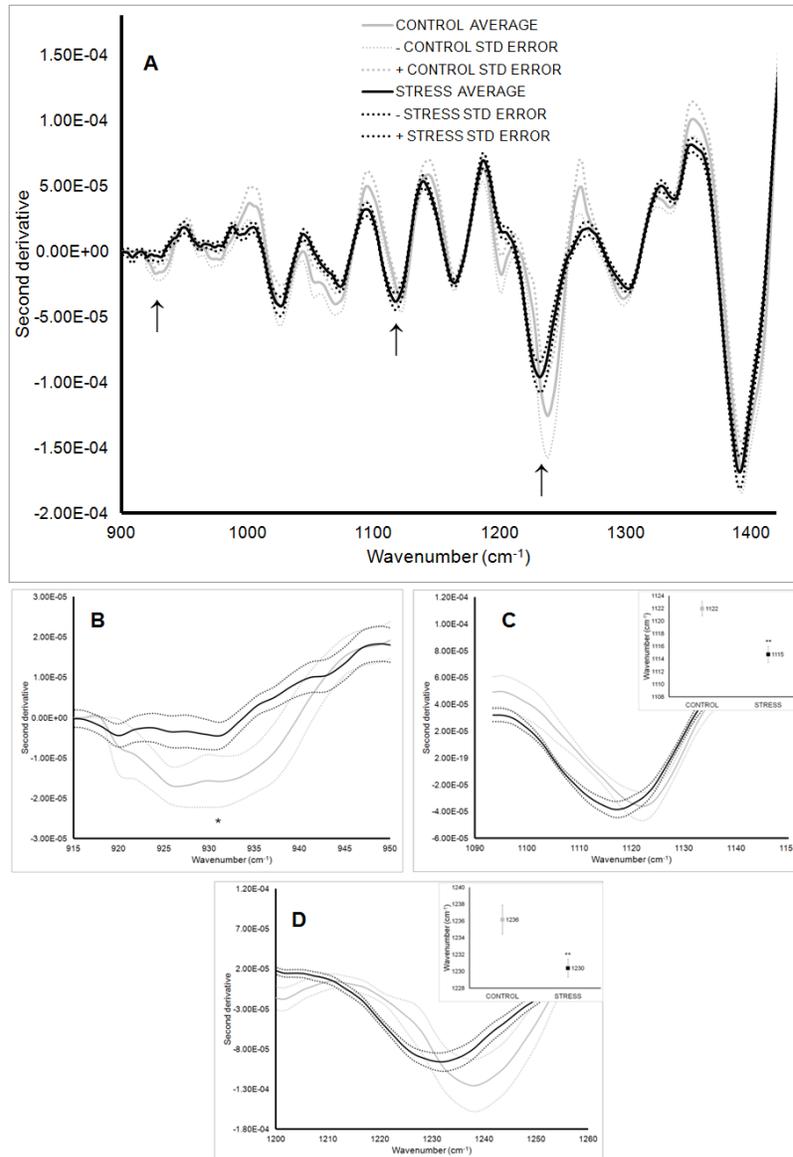


Figura 18. Espectros en segunda derivada de la región de ácido nucleicos para leucocitos de ratas control y estresadas. A) Las flechas señalan las bandas que presentaron cambios estadísticamente significativos. B) Banda relacionada con el ADN de forma Z, presentó un decremento en la intensidad del pico en la muestra estrés. C) Banda relacionada con estiramiento simétrico del enlace P-O-C. D) Banda relacionada con la vibración asimétrica de PO₂. A la derecha de las gráficas C y D se encuentran insertos que muestran el promedio y errores estándar del cambio en la posición del pico. Los valores son promedios ± el error estándar, control n = 14 estrés grupo n = 37 células. * indica diferencias estadísticas con grupo control, $p < 0.05$. **, $p < 0.01$ (Vargas-Caraveo *et al.*, 2014).

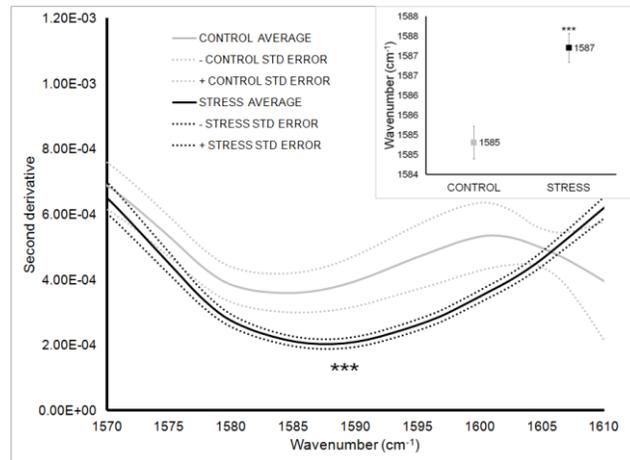


Figura 19. Espectros en segunda derivada de la banda de ADN metilado para leucocitos de ratas control y estresadas. La gráfica muestra el incremento en la intensidad el pico así como el cambio en la posición de éste por parte del grupo de estrés (inserto). Los valores son promedios \pm el error estándar, control $n = 14$ estrés grupo $n = 37$ células. *** indican diferencias estadísticas con grupo control, $p < 0.001$ (Vargas-Caraveo *et al.*, 2014).

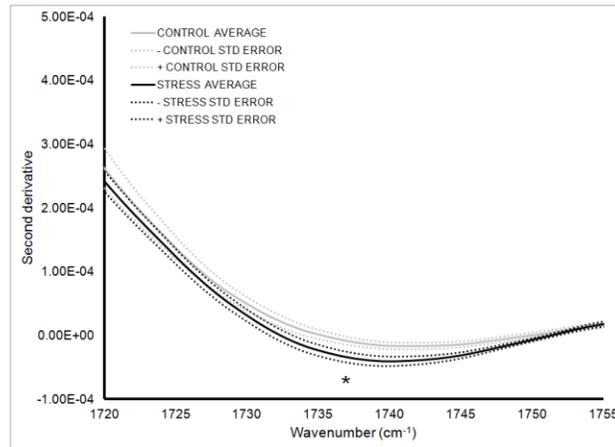


Figura 20. Espectros en segunda derivada de la banda del grupo éster para leucocitos de ratas control y estresadas. La gráfica muestra el incremento en la intensidad el pico por parte del grupo de estrés. Los valores son promedios \pm el error estándar, control $n = 14$, estrés grupo $n = 37$ células. * indica diferencias estadísticas con grupo control, $p < 0.05$ (Vargas-Caraveo *et al.*, 2014).

8. DISCUSIÓN

Los resultados a cerca de los efectos del estrés anímico crónico sobre la identificación de células inmunes a través de los marcadores de CAM CD45 y CD11b en el AP, han revelado que este estímulo puede llevar al incremento en el número de estas células (Figura 4). Los datos demuestran por primera vez cambios inmunomorfológicos y fenotípicos en microglía inducidos por estrés, yendo desde estructuras longitudinales observadas en las muestras control a estructuras ameboideas en muestras estrés, como también diferentes patrones en la expresión de los marcadores (Figura 5). Aún más interesante, la evidencia del reclutamiento de leucocitos circulantes como linfocitos (CD45⁺/CD11b⁻ células redondas) y monocitos (CD45⁺/CD11b⁺ células ovoides) (Figura 5 y tabla 2). Al igual se demostró que la mayoría de estos leucocitos se localizaron en la periferia del AP, cerca del borde superior compuesto por células de leptomeninges (Figura 6). Además, se comprobó la comunicación entre células neuronales e inmunes a través de moléculas de adhesión. Tal fue el caso del marcaje de neuronas a partir de receptor neuronal TrkA y el de células inmunes con la molécula de adhesión CD45 en donde se observó el contacto del soma neuronas TrkA⁺ con células redondas CD45⁺ con morfología de leucocito (Figura 8). En el caso de los experimentos realizados con el marcaje de la molécula de adhesión neural L1CAM y con CD45, también se observó el contacto de neuronas, en este caso con dendritas y terminales axónicas, con células inmunes de tipo microglía y leucocito circulante (Figura 11).

Interesantemente, dos eventos no esperados, una vez obtenidos los resultados del marcaje con TrkA y L1CAM para neuronas, fue que células CD45⁺ dentro del AP eran capaces de expresar en la superficie estas moléculas neuronales principalmente bajo estímulo de estrés anímico crónico (Figura 9 y 12). En el caso de la coexpresión de CD45⁺/TrkA⁺, ésta fue cuantificada y se encontró que bajo estímulo de estrés anímico crónico aumenta la población de estas células en el AP (Figura 10). Como un estudio confirmatorio de la coexpresión

CD45+/L1CAM⁺ en AP, se analizó la expresión de L1CAM en leucocitos circulantes aislados de sangre periférica y se comprobó si localización en superficie (Figura 13).

Por otra parte, los estudios con microespectroscopía de rayos X e infrarrojo fueron herramientas útiles para evaluar cambios en la química de la estructura del SNC que lleva a cabo el reclutamiento de células inmunes circulantes bajo estrés anímico crónico y si estas células en sangre periférica también sufrían cambios a causa de este estímulo adverso. Los resultados de microespectroscopía de fluorescencia de rayos X arrojaron que hay un aumento considerable en la distribución de los elementos K, P, S, Na, Cl y Ca en AP bajo estrés anímico crónico. Lo contrario sucedió en el análisis con la misma técnica en leucocitos circulantes donde se observó una disminución en la distribución de elementos P, S, Cl y K. Los análisis en AP con SR- μ FTIR en donde se evaluaron los cambios en las señales relacionadas con lípidos, mostró aumentos en la distribución y abundancia de moléculas como colesterol y ésteres de lípidos así como disminución en fosfolípidos a causa del estrés. En el caso de los análisis en leucocitos circulantes con SR- μ FTIR se observaron cambios significativos en las señales de ácidos nucleicos y ésteres de lípidos.

8.1 células inmunes en el AP de ratas con estrés anímico crónico

La identificación de ciertas poblaciones de células inmunes en el cerebro puede ser difícil por la variedad de morfología y expresión de marcadores moleculares que tienen estas células. (Goehler *et al.*, 2006). No obstante, en este estudio para identificación de células inmunes en el AP se utilizaron los marcadores de superficie de CAM CD45 y CD11b, los cuales son robustamente expresados en leucocitos circulantes (Bush *et al.*, 1999), al igual la microglía también puede expresar estas moléculas pero en menor intensidad que los leucocitos (Marques *et al.*, 2008). De acuerdo a la expresión de estos marcadores en el

AP por inmunohistofluorescencia se clasificaron tres subpoblaciones de inmunofenotipos en el AP ($CD45^+/CD11b^+$, $CD45^+/CD11b^-$, $CD45^-/CD11b^+$) los cuales fueron cuantificados. En base a esta clasificación de perfiles de expresión, también se elaboró una clasificación considerando la intensidad de fluorescencia en relación a la expresión y morfología la cual está resumida en la tabla 2. El fenotipo $CD45^+/CD11b^+$ con alta intensidad se clasificaron como monocitos, neutrófilos, macrófagos o microglía activada ameboidea; aquellos que presentaron una baja intensidad se clasificaron como microglía ramificada en reposo. El fenotipo $CD45^+/CD11b^-$ con una alta intensidad se clasificó como cualquier otro tipo de célula inmune circulante principalmente como linfocito por ser los leucocitos redondos con un amplio núcleo, las células con baja intensidad de este fenotipo se clasificaron como microglía longitudinal. Por último, el tercer fenotipo fue $CD45^-/CD11b^+$ descrito como microglía ameboidea (Marques *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010; van Loo *et al.*, 2006; Walker *et al.*, 2014). Sin embargo, basados en la apariencia morfológica y en la expresión de marcadores de CAM encontrados en el AP, la población de $CD45^+/CD11b^+$ considerados como monocitos, macrófagos o neutrófilos son células que se han relacionado con neuroinflamación cuando se localizan en el cerebro e inclusive contribuyen a una potenciamiento de este evento. (Bentivoglio *et al.*, 2010). Estas evidencias serían como en el modelo esclerosis múltiple, la EAE, la eliminación de monocitos que entran al cerebro retrasa los efectos adversos de esta condición, demostrando que los monocitos o macrófagos infiltrados en el cerebro juegan el principal papel en el desarrollo del daño del tejido neuronal inducido por desórdenes neurológicos (Huitinga *et al.*, 1990). En el caso de la neuropatología inducida por la infección por *Streptococcus pneumoniae*, los monocitos circulantes son considerados parte del daño al tejido nervioso, debido a que incrementa la actividad lisosomal en estrecha ubicación a células apoptóticas (Djukic *et al.*, 2006). Sin embargo, evidencia más reciente afirma que la entrada monocitos circulantes ($CD45^+/CD11b^+$) en el cerebro adulto murino ha sido considerada como un proceso de repoblación de microglía

(Varvel *et al.*, 2012). Otro ejemplo sería de como el reclutamiento de monocitos de médula ósea marcados con la proteína verde fluorescente (GFP) en el cerebro desarrolla conducta de ansiedad después de la exposición a estrés social, y estas células son capaces de convertirse en macrófagos (Wohleb *et al.*, 2013). En un estudio en el que se utilizó el trasplante de células de médula ósea marcadas con GFP, se demostró la migración de estas células hasta el cerebro y la mayoría de las todas la células infiltradas tuvieron una morfología ramificada y expresaban marcadores de microglía; interesantemente, la estructura del AP tuvo una gran cantidad de estas células GFP positivas (Simard y Rivest 2004). Estas dos últimas evidencias concuerdan con los resultados obtenidos de la localización de células inmunes en el AP bajo estrés anímico crónico, apoyando la teoría en el SNC el AP es un sitio para el reclutamiento de monocitos de origen sanguíneo los cuales pueden diferenciarse a microglía.

Por otro lado, el alto incremento de células CD45⁺ y CD11b⁺ en el AP, la mayoría con morfología de microglía, es consistente con un estudio en el que se observó que bajo estímulo de estrés había un incremento de activación y densidad de la microglía en quince regiones del cerebro que responden al estrés, como la corteza prefrontal medial y la amígdala; desafortunadamente el AP no fue sujeta a evaluación (Tynan *et al.*, 2010). El hallazgo de microglía con pérdida de ramificación o morfología ameboidea en el AP bajo estímulo de estrés (Figura 6 y Tabla 2), se clasificó de acuerdo a los trabajos de Jurgens y Johnson en el 2012, y Hinwood *et al.*, 2011, quienes indicaron que la inflamación generada por el estrés aumenta la activación de la microglía que consecuentemente puede desarrollar atrofia o daño neuronal, siendo el primer paso en la activación de la glía, la pérdida de ramificaciones (microglía reactiva) para llegar a convertirse en una célula fagocítica con apariencia ameboidea. La activación de la microglía y la sobrerregulación de monocitos circulantes dentro del cerebro es un evento importante en la mediación de la conducta depresiva.

La localización del AP debajo del cuarto ventrículo y con ausencia de barrera hematoencefálica la convierte en un sitio privilegiado para dar acceso a componentes de circulación. Esta teoría se apoya con la evidencia que se muestra en la Figura 7 A; la presencia de células clasificadas como linfocitos circulantes, por su fenotipo respecto a las CAM (CD45⁺/CD11b⁻) y morfología, adentro del AP, las cuales se observan introduciéndose a través de un vaso fenestrado característico del AP (Maaloud y Meister, 2009). En la Figura 7 B se puede apreciar que estas células redondas CD45⁺/CD11b⁻ con morfología de linfocitos circulantes se acumulan entre la periferia del AP y el tejido meníngeo (insertos I1 e I2 de la Figura 7 B) y el mismo tipo de células también aparecían en las esquinas superiores dentro del tejido de las meninges (insertos I3 e I4 de la Figura 7 B) sugiriendo un intercambio de linfocitos entre el tejido del AP y las meninges. La presencia de linfocitos circulantes CD45⁺/CD11b⁻ dentro del AP, lo cuales se introducen a través de los vasos fenestrados característicos de esta estructura del SNC que carece de barrera hematoencefálica (Maaloud y Meister, 2009), puede sugerir varios posibles eventos. Uno de ellos es que el reclutamiento de este tipo de células podrían estar generando una respuesta de supervivencia mediada específicamente por linfocitos T como lo demostraron Lewitus *et al.*, 2008. No obstante la mayoría de las evidencias indican que la presencia de linfocitos en el cerebro (en especial los linfocitos T) es crítica en muchas respuestas inflamatorias, como en la esclerosis múltiple y en el modelo de esta enfermedad la EAE (Barcia *et al.*, 2013), o por ejemplo se considera que el reclutamiento de linfocitos T después de un isquemia cerebral global desarrollan un respuesta inmune aguda y sostenida (Carter *et al.*, 2014).

Finalmente células CD45⁺/CD11b⁺ con morfología alargada que siguieren ser monocitos se distribuyeron en la periferia del AP y el tejido meníngeo (Figura 7 C). Estas evidencias apoyan la idea de que el AP es un sitio para el intercambio de células entre las leptomeninges y también una posible puerta de entrada para las células inmunes circulantes para acceder a cualquier sitio afectado en

el cerebro utilizando la proximidad de los ventrículos y el fluido cerebroespinal; misma idea que también se ha sugerido en el modelo de EAE descrito por Schulz y Engelhardt, 2005.

8.2 Detección de interacción de células inmunes con neuronas en el AP

8.2.1 Marcaje de neuronas con TrkA y de células inmunes con CD45

Ha sido demostrado que las neuronas del AP son capaces de expresar el receptor neuronal TrkA durante la etapa adulta en roedores (Holtzman *et al.*, 1995). Para analizar la distribución de neuronas y células inmunes en el AP se utilizó este receptor neuronal como marcador de neuronas en el AP y la molécula de adhesión CD45 como marcador de células inmunes. Se observó que algunas células redondas CD45⁺, clasificadas por su inmunomorfotipo como leucocitos circulantes, tuvieron contacto muy cercano con el soma de neuronas TrkA⁺ (Figura 8). Existen evidencias que sugieren la comunicación directa entre neuronas del SNC y leucocitos circulantes en eventos inflamatorios a partir del receptor TrkA, esto por parte de la señalización del factor de crecimiento nervioso (NGF), ligando del receptor TrkA, liberado a partir de leucocitos infiltrados en el SNC seguido de la inducción de EAE en ratones (Arredondo *et al.*, 2001). La presencia de antígenos como LPS induce una alta síntesis y liberación de NGF (Caroleo *et al.*, 2001) así como también puede ser liberada bajo situaciones de ansiedad relacionadas con estrés psicológico en humanos y en modelos con roedores (Hadjiconstantinou *et al.*, 2001; Aloe *et al.*, 2002). Por otra parte, los contactos de neuronas y células inmunes han sido demostrados en estados inflamatorios por la presencia de antígenos como en los experimentos con la inyección de LPS intraperitoneal en ratas en donde se observó que neuronas del AP tenían contacto con células inmunes ramificadas (Goehler *et al.*, 2006). También, se ha demostrado la interacción de astrogliá con linfocitos T a partir de la inyección de LPS (Barcia *et al.*, 2013). Estas evidencias indican que así como la neuroinflamación inducida por LPS

promueve la interacción directa entre células del cerebro y las células inmunes infiltradas, el estrés también lo provoca tal y como se ha demostrado en este trabajo. En otras palabras, la inflamación del SNC por estrés anímico crónico puede desarrollar la misma interacción neuroinmunológica al igual que los antígenos.

8.2.1.1 Expresión TrkA en células inmunes CD45⁺ del AP bajo estrés anímico crónico

La evidencia de la expresión de TrkA en células CD45⁺ dentro del AP (Figura 9) y el incremento de esta coexpresión en el grupo estrés (Figura 10), puede sugerir que los leucocitos circulantes infiltrados están activados para desarrollar una respuesta inflamatoria (insertos I4, I5 e I6 de la Figura 9), según evidencias descritas a continuación. La expresión de TrkA en monocitos está asociada a la actividad proinflamatoria y a la producción de ROS (El Zein *et al.*, 2010). El receptor TrkA actúa como un marcador de inflamación en leucocitos circulantes como monocitos y macrófagos expuestos al antígeno LPS y a su ligando natural NGF (Caroleo *et al.*, 2001). Este receptor también está presente en linfocitos de paciente con desórdenes psiquiátricos como esquizofrenia, la enfermedad de Alzheimer, depresión estrés (Gladkevich *et al.*, 2004). Además, ha sido documentado que la estimulación de TrkA promueve la supervivencia y la persistencia de células inflamatorias, como en monocitos protegiéndolos de la apoptosis, sugiriendo la persistencia de la respuesta inflamatoria en desordenes autoinmunes que incluyen a la esclerosis múltiple (la Sala *et al.*, 2000). Si los leucocitos que expresan TrkA en el AP estarían siendo activados a través de su receptor gracias a la liberación de NGF por parte de las neuronas, por ellas mismas o por otras células inmunes; esto incrementaría la vida del leucocito y entonces este evento podría ser una respuesta a la neuroinflamación prolongada durante episodios de estrés hasta concluir en enfermedades neurodegenerativas. En el caso de la CD45⁺/TrkA⁺ en microglía (insertos I1, I2

e I3 de la Figura 9) podría indicar que estas células llevan a cabo quimiotaxis a través de la activación del receptor TrkA como se ha descrito para la mayoría de las enfermedades en el cerebro que involucran la activación y movilización de la microglía (De Simone *et al.*, 2007).

Este trabajo provee nuevo conocimiento sobre el estrés anímico crónico como una causa proinflamatoria a través de la reacción celular de leucocitos circulantes y microglía fagocítica activada dentro del AP, el mayor OCV quimiosensorial en el SNC. La mayoría de las evidencias sobre el reclutamiento de leucocitos en el SNC han sido demostradas por la presencia de virus, protozoarios y antígenos bacterianos o por daños mecánicos tanto en humanos como en modelos animales (Penkowa *et al.*, 2003); como la demencia por VIH, enfermedades autoinmunes, isquemias cerebrales, etc y la EAE, la inyección de lipopolisacárido, virus, etc., respectivamente. Este es uno de los cuantos estudios que muestra el reclutamiento de leucocitos circulantes del SNC ocasionado por estrés anímico (Lewitus *et al.*, 2008; Wohleb *et al.*, 2013) y el primero en sugerir una posible puerta de acceso utilizada por los leucocitos, mostrando que el AP juega un papel importante durante el estrés. Estos hallazgos también sugieren múltiples papeles por parte de las células inmunes en el AP durante el estrés anímico crónico y puede proveer un potencial entendimiento sobre las subsecuentes afecciones causadas por situaciones estresantes como el síndrome de fatiga crónica y enfermedades degenerativas relacionadas con las funciones autónomas comandadas por el AP.

8.2.2 Marcaje de neuronas con L1CAM y de células inmunes con CD45

Para analizar la interacción y distribución de neuronas con las células inmunes presentes en el AP bajo estrés anímico crónico, se utilizaron la molécula de adhesión neuronal L1CAM y la molécula de adhesión CD45. Al igual que en los resultados obtenidos con el marcaje de neuronas con el receptor TrkA, en este

estudio también se observaron contactos entre células neuronas marcadas con L1CM y células CD45⁺ con morfología de redonda de leucocito circulante (I1 de la Figura 11) y con células alargadas con estructura de microglía (inserto I2 de la Figura 11). Esta proteína L1CAM es un importante mediador de la diferenciación neuronal, como el crecimiento axonal y la formación y mantenimiento sináptico (Hortsch *et al.*, 2009), esta molécula también puede alterarse bajo estímulo de estrés aumentando su expresión a nivel transcripcional y proteico (Sandi, 2004), debido a que es una molécula que regula conductas exploratorias y de ansiedad (Law *et al.*, 2003). Por estas características fue elegida esta molécula de adhesión para comprobar su interacción con células no neuronales que aumentan su población en el SNC bajo estímulo de estrés anímico crónico.

8.2.2.1 Expresión L1CAM en células inmunes CD45⁺ del AP bajo estrés anímico crónico

Un acontecimiento importante fue el observar que células CD45⁺ con morfología redonda de leucocitos circulantes expresaron también L1CAM (Figura 12). Si bien esta molécula caracterizada en muchos trabajos como marcador neuronal, en una contraparte, desde hace varios años, se ha visto que puede expresarse en otros tipos celulares tal como en células inmunes de distintos órganos como en médula ósea, bazo, y timo (Kowitz *et al.*, 1992). Una de las principales funciones que se le ha atribuido a L1CAM en leucocitos, la cual se detecta en superficie de linfocitos y monocitos como sucedió en este estudio, es la de adhesión y migración (Ebeling *et al.*, 1996), específicamente para la unión a laminina y la adhesión a la matriz extracelular al nervio ciático (Kadmon *et al.*, 1998). Como se mencionaba anteriormente, L1CAM a nivel neuronal establece la estructura y plasticidad sináptica, sin embargo su expresión se ve alterada en condiciones patofisiológicas en el SNC aumentado en la mayoría de las ocasiones su expresión en ciertas estructuras como la corteza prefrontal. En un

estudio en el que se utilizó a los leucocitos circulantes como marcadores de esta molécula de adhesión neuronal en pacientes con desorden bipolar y estado depresivo, los niveles de ARN mensajero incrementaron en ambas condiciones (Wakabayashi *et al.*, 2008). Esta evidencia es congruente con los hallazgos que se obtuvieron con los ensayos de inmunocitofluorescencia en leucocitos circulantes en donde se observó que se duplica la cantidad de células L1CAM bajo estrés anímico crónico (Figura 13).

Todas estas pruebas pueden ser la o las respuestas de cómo acceden y se establecen los leucocitos circulantes CD45⁺/L1CAM⁺ en el AP bajo estrés anímico crónico. Otra respuesta de esta coexpresión es mediar el contacto neurona-célula inmune, como se observa en los insertos de la Figura 12 B, D, F, H. Se sabe que L1CAM cuenta con múltiples ligandos como las CAM de tipo inmunoglobulina pero una de bastante relevancia es la que hace con ella misma, es decir, uniones homofílicas (Kadmon *et al.*, 1998; Sandi, 2004), por lo tanto la L1CAM expresada por células CD45⁺ podría establecer la unión con la L1CAM neuronas del AP.

8.3 Distribución de elementos en AP por microespectroscopía de fluorescencia de rayos X de fuente sincrotrón

El objetivo de desarrollar estudios en el AP bajo estrés anímico crónico con la técnica de microespectroscopía de fluorescencia de rayos X de fuente sincrotrón, es porque provee datos analíticos *in situ* sobre la distribución de ciertos elementos con la mínima y necesaria manipulación de la muestra a diferencia de técnicas bioquímicas que resultan demasiado invasivas y alteradoras a ésta. Además, la ventaja de utilizar una fuente sincrotrón provee de una mayor resolución, sobre todo en muestras micrométricas como lo es el AP. El principal elemento a estudiar con esta técnica fue el S, no obstante la ventaja que ofrece el uso de esta herramienta es la posibilidad de analizar a su

vez otros elementos que puedan fluorescer a la misma energía de excitación, como en este caso fue el observar cambios a 4. KeV, además del S con el K, P, Na, Cl y Ca, los cuales todos se vieron aumentados en el AP bajo estrés anímico crónico (Figura 14).

En el análisis del aumento del S en el AP se puede deber por la presencia de leucocitos que pueden modificar este entorno por los cambios necesarios que se tiene que sufrir al ingresar células ajenas a este medio y por la propia inflamación generada por el estrés anímico crónico. Por ejemplo, una región que se podría ver afectada es la matriz extracelular, siendo una estructura tan rica heteropolisacáridos y/o glicoproteínas que a la vez su composición contiene grandes cantidades de S (Di Cesare *et al.*, 2002), por lo tanto se podría alterar la distribución y concentración de este elemento a manera de adaptación del AP a un estímulo adverso constante como lo es el estrés. Es conocido que existe una relación causal entre el estrés oxidante y el estrés anímico, debido al alto consumo de oxígeno por parte del cerebro bajo esta situación, éste es susceptible de daño oxidante por la alta concentración de lípidos afectados por la presencia de ROS provocada por un desequilibrio óxido-reducción (Salim, 2014). El S es un elemento involucrado en el estado de óxido-reducción de todas la células, teniendo consideración el papel fundamental en la defensa antioxidante en el cerebro derivada del metabolismo del glutatión (Vitvitsky *et al.*, 2006). Evidencias con una técnica similar como lo es la espectroscopía de absorción de rayos X ha demostrado que la presencia en el cerebro de moléculas que contiene sulfuro como tioles, disulfuros, sulfóxidos, ácidos sulfónicos y sulfatos, todos ellos marcadores de estrés oxidante, estos puede contribuir a procesos neurodegenerativos (Hackett *et al.*, 2012). El uso de esta técnica para evaluar el estado del S del AP *in situ*, establece una relación entre los desórdenes mentales y sistémicos que pueden provocar la exposición a un estresor anímico crónicamente.

La señal de otros dos elementos resultaron característicos para la estructura del AP, estos fueron el K y Cl. A pesar de que la señal, en relación el número de cuentas (250 y 200 cuentas, respectivamente), fue considerablemente más baja que la señal dada por el S (2000 cuentas), según las escalas de temperatura. En definitiva esto puede ser argumentado con el hecho de que S forma parte de las proteínas y múltiples metabolitos, y el Cl y K son elementos que se encuentra en forma iónica. Se puede afirmar que la señal obtenida de estos dos elementos, pertenece únicamente al AP y la médula no a otro medio, como sangre, debido a que el tejido fue perfundido (numeral 6.2). En los mapas de temperatura (Figura 14) se observa que la distribución no cambio la muestra estrés con respecto al control e inclusive, la señal en masa de ambos es muy similar; lo cual se arguye que se debe a que ambos iones mantienen su neutralidad de fluidos extracelulares ya que ambos electrolitos son opuestos. El mismo evento fue demostrado con la misma técnica, también en cerebro de rata bajo un estímulo adverso como la exposición a arsénico (Rubio, 2008).

8.4 Distribución de elementos leucocitos circulantes por microespectroscopía de fluorescencia de rayos X de fuente sincrotrón

La ventaja del uso de una técnica de alta resolución como es la microespectroscopía de fluorescencia de rayos X de fuente sincrotrón, en leucocitos íntegros es porque provee datos analíticos *in situ* sobre la distribución de ciertos elementos. También, brinda una alta resolución en una muestra sumamente pequeña considerando que cada célula mide aproximadamente entre 7 y 10 μm de diámetro.

El objetivo de este estudio fue evaluar la distribución de elementos como P, S, Cl y K por medio de la obtención de mapas de temperatura. Se consideró como un control de la señal que brinda una célula al P, ya que éste forma parte de los ácidos nucleicos y se encuentra en altas concentraciones. En el caso del S

también es considerado en esta técnica como un control de la señal que brinda una célula por ser un elemento que forma parte de las proteínas. Por otra parte, el Cl y K son elementos, al igual que se describió en el numeral 8.3, que se encuentran en forma iónica y son movilizados a partir de canales. Se ha visto a partir de estudios electrofisiológicos que los leucocitos circulantes son células que cuentan con un gran número de conductancias como respuesta a un estímulo mediado principalmente por canales de Cl y K, y estas conductancias se ven incrementadas a medida que aumenta actividad fisiológica de estas células (Gallin, 1991). Respecto al efecto del estrés anímico crónico sobre el sistema inmune circulante, es conocido que este estímulo adverso a largo plazo puede suprimir las repuestas inmunes y puede incrementar la susceptibilidad al desarrollo de algunos tipo de cáncer suprimiendo la función de linfocitos T, por ejemplo (Dhabhar, 2014). Como se observa en la Figura 15 en los mapas de Cl y K las células estrés muestran una señal mucho menor de estos dos elementos. Si el estrés anímico crónico es un inductor de la supresión de la función inmune y ésta a su vez, en parte, es mediada a partir de la conductancia de estos electrolitos opuestos, se puede deducir que una menor señal, observada por fluorescencia de rayos X, de Cl y K en leucocitos circulantes es consecuencia de la exposición a un estresor anímico, crónicamente.

8.5 Estado orgánico del AP por SR- μ FTIR

Por medio del estudio por SR- μ FTIR en AP de ratas bajo estrés anímico crónico se pudo demostrar, a partir de mapas de temperatura de la distribución de señales vibracionales espectrales, los cambios inducidos por este estímulo. El análisis se realizó en las señales que emiten grupos funcionales de lípidos, teniendo como objetivo de este estudio observar los cambios inducidos por el estrés en un tejido con una abundancia de lípidos mayor el resto de los tejidos del organismo, mismo que son susceptibles de oxidación por la alta captación

de oxígeno en periodos de estrés (Salim, 2014). El pico analizado de la banda relacionada con el grupo metilo del colesterol (1637 cm^{-1}) se observa que la distribución no es homogénea en la muestra estrés en comparación al control, siendo que se acumula más en la zona cercana a las meninges (Figura 16 A). Al igual, se observó la misma redistribución y cambio, en los mapas de estrés en las señales de los picos de las bandas también asociadas a la señal vibracional de los grupos CH_2 y CH_3 de colesterol y fosfolípidos en 2848 y 2916 cm^{-1} (Figura 16 C y D). Ha sido publicado extensamente que la alteración de la homeostasis del colesterol en el cerebro juega un papel importante en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. Se conoce que la barrera hematoencefálica regula estrictamente los intercambios de esteroides entre el cerebro y la sangre periférica (Gosselet *et al.*, 2014). Siendo el AP una estructura carente de barrera hematoencefálica (Malood *et al.*, 2008) la hace más susceptible a desequilibrios en el metabolismo y homeostasis del colesterol. Se puede argumentar que la acumulación de células inmunes en la zona periférica del AP cercana a las meninges a causa del estrés, como se observa en la Figura 7, puede ser el evento responsable de los cambios en la distribución del colesterol en esta zona del AP. Todo esto en relación a que el estrés anímico crónico es un factor para la degeneración neuronal y el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (Johansson, 2014). Se encontró un cambio considerable en el aumento de la señal del pico a 1740cm^{-1} de la banda asociada a ésteres de lípidos que se relaciona con los productos finales de la peroxidación lipídica (Vileno *et al.*, 2010), en el corte analizado de estrés. Como se mencionaba anteriormente en el numeral 8.3, el cerebro es una estructura altamente vulnerable a los cambios de óxido-reducción por la alta captación de oxígeno y los lípidos que contiene susceptibles de oxidación (Salim, 2014). De nuevo se observa que la mayor intensidad de la señal de ésteres de lípidos está en la zona de mayor acumulación de células inmunes. Estas evidencias pueden argumentar que la presencia y acumulación de células inmunes alteran la

homeostasis del colesterol e inducen peroxidación lipídica en la zona periférica del AP cercana a las meninges.

8.6 Estado orgánico de leucocitos circulantes por SR- μ FTIR

Por medio del estudio por SR- μ FTIR en leucocitos circulantes de ratas bajo estrés anímico crónico se pudo demostrar a partir de células únicas los cambios inducidos por este estímulo. El marcador más significativo que indicó un cambio que afecta a estas células fue el incremento de la banda relacionada con productos finales de la peroxidación lipídica de 1720 a 1755 cm^{-1} (Figura 20). Un efecto similar fue observado en otros trabajos, que incluyen fibroblastos de mono expuestos a ROS inducidas por partículas de fullerol bajo iluminación de luz blanca (Vileno *et al.*, 2010); en otro estudio se analizaron las superficies de los labios que se correlacionan los ácidos grasos de la dieta con la salud y la enfermedad (Yoshida *et al.*, 2009); y por último el efecto biomateriales como polietileno utilizado en prótesis ortopédicas expuestas a peróxido de hidrógeno (Rocha *et al.*, 2009). La peroxidación lipídica identificada en los linfocitos aislados de animales estresados podría estar ocurriendo debido al estrés oxidante iniciado por el estrés mental. Efectos similares analizados en plasma y eritrocitos, han sido publicados, y se vinculan con enfermedades como la aterosclerosis (Morimoto *et al.*, 2008). Un estudio demostró que en estudiantes de Universidad el estrés anímico causado por el periodo de exámenes semestrales, producía peroxidación lipídica y daño oxidante en el ADN el cual incrementaba significativamente en muestras tomadas entre dos periodos exámenes contra aquellos periodos de no exámenes (Sivoňová *et al.*, 2004).

En contraste en el presente estudio, el análisis de la región asociada a ácidos nucleicos (900-1245 cm^{-1}) reveló que la banda de ADN de forma Z decreció en intensidad en las células estrés. Es sabido que los sitios promotores del ADN abundantes en en repeticiones de TG o GC permiten la conformación del ADN

de forma Z ene una doble hélice, con giro hacia la izquierda, exhibiendo un patrón en zig-zag. Esta estructura se forma *in vivo* bajo condiciones fisiológicas en regiones activas de la transcripción del genoma (Mulholland *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2007). De acuerdo con los cambios observados en los espectros en esta región puede asociarse con la regulación de la expresión génica e inestabilidad genética. Estas modificaciones fueron correlacionadas con el estrés anímico crónico sugiriendo que el efecto ocurrido en el SNC se traduce en cambios fisiológicos en los leucocitos circulantes. Además, la absorción incrementada que se observó a $1585\text{-}1587\text{ cm}^{-1}$ en el grupo estrés, relacionada con la metilación del ADN (Dovbeshko *et al.*, 2000) que ocurre en los sitios CpG, al igual aparecen en las regiones del ADN de forma Z (Temiz *et al.*, 2012). Los posibles efectos observados en ambas bandas podrían estar relacionados con el evento de metilación en el ADN el cual causa una acción de silenciamiento en los genes, por lo cual estaría decreciendo el ADN de forma Z. la metilación en sitios CpG asociados con la modificación de perfiles epigenéticos en el cerebro ha sido demostrado en respuesta a estrés anímico como experiencias traumáticas a temprana edad llevando a desórdenes emocionales que persisten en la edad adulta (Franklin *et al.*, 2010). Por otro lado, el cambio detectados en la posición del número de onda de los pico de la bandas de la vibración asimétrica de PO_2 (de 1236 cm^{-1} para el grupo control y 1230 cm^{-1} para el grupos estrés) puede ser atribuible a los mecanismos publicados por Nafisi *et al.*, 2012, quienes sugieren que el cambio de posición del pico que ellos observaron de 1226 a $1231\text{-}1233\text{ cm}^{-1}$ estaba relacionado con la coordinación del grupo PO_2 del ADN con la sal de $\text{Na}_2\text{-SeO}_4$ formando así un aducto. En consecuencia la presencia de potenciales aductos en el ADN como reguladores transcripcionales y complejos ADN-proteínas, también podrían producir este efecto (Nafisi *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2007). Esta evidencia apoya cómo el estrés anímico crónico podría modificar la expresión génica por una influencia epigenética en leucocitos circulantes, decreciendo la cantidad de proteínas unidas al ADN en los procesos transcripcionales bajo condiciones de

estrés, resultando en un cambio en la posición del pico de la banda de la vibración asimétrica PO_2 .

La banda de la vibración del grupo P-O-C ha sido caracterizada como una de las más representativas para los grupos del ARN (Dovbeshko *et al.*, 2000; Whelan *et al.*, 2011). En este estudio se observó también un cambio en la posición del número de onda de los pico de la bandas de P-O-C, de 1122 cm^{-1} en el grupo control a 1115 cm^{-1} en el grupo estrés, sin detectarse cambios en la absorbancia. El decremento de la señal del ADN de forma Z, junto con el incremento de la metilación de ADN sugiere un posible silenciamiento de genes en los leucocitos circulantes por estrés anímico crónico, no obstante estos hallazgos sugieren que la cantidad de ARN no se ve alterada. Esto puede ser representado por la sobreexpresión transcripcional de moléculas proinflamatorias que son liberadas por los leucocitos ante la exposición a un estresor anímico (Bailey *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2008). El cambio en la posición en el número de onda del pico de la banda de P-O-C puede dar respuesta debido a que existen cambios en la naturaleza de transcritos específicos.

La exposición crónica a un estresor anímico está acompañada por un alto consumo de O_2 , generando estrés oxidante producido por un exceso de ROS en el medio. Esto se ha demostrado que contribuye a una amplia gama de enfermedades que incluye cáncer, diabetes, infertilidad masculina, enfermedades autoinmunes, aterosclerosis, y desórdenes cardiovasculares (Bouayed *et al.*, 2009). La evidencia de peroxidación lipídica y cambios en la composición de ácidos nucleicos en los leucocitos afectados por estrés anímico crónico pueden ser debido a una sobreproducción de ROS que están implicados en efectos adversos sobre todo el organismo y el sistema inmune, como la supresión en la respuesta inmune o el decremento en la movilización a otros tejidos (Dhabhar *et al.*, 2002).

9. CONCLUSIONES

Los resultados mostrados sobre los efectos del estrés anímico crónico, demuestran que este estímulo induce en el AP y en el sistema inmune circulante diversos eventos como consecuencia de un estímulo adverso en contra de la supervivencia. Estos eventos fueron: el reclutamiento de leucocitos circulantes, la activación de la microglía, el contacto directo entre neuronas con células inmunes (leucocitos/microglía), la expresión de moléculas neuronales en el sistema inmune circulante por medio de CAM en el AP; y por último, cambios en la química del AP y de células inmunes circulantes que demostraron principalmente un daño oxidante. Por lo tanto, estas evidencias exponen al AP como una estructura más del cerebro sensible al estrés y como una única estructura, hasta ahora estudiada, que comunica al sistema inmune con el SNC.

Si estos resultados se comparan con otras investigaciones que tienen resultados similares pero en lugar de utilizar al estrés anímico crónico se utiliza un estímulo físico e invasivo como la inyección de LPS o el modelo de EAE. Esto apoya la teoría que describe que cualquier tipo de estrés, incluyendo ambos físicos (como los antígenos) y los anímicos son capaces de desarrollar la misma respuesta en el organismo contra el estímulo. Gracias a estas evidencias se puede afirmar que la única diferencia entre los antígenos y el estrés es sólo semántica (Franceschi *et al.*, 2000; Ottaviani y Franceschi 1996). Igual que otro tipo de insulto en el organismo, cuando un tejido es dañado, el sistema inmune tiene que estar preparado para reparar o evitar tal daño, esto ha sido claramente descrito para infecciones, e insultos físicos y químicos. (McCusker y Kelley 2013), pero no de la misma manera para las emociones. Este trabajo demuestra que el estímulo adverso del estrés anímico crónico es en primera instancia, sentido por el cerebro el cual se inflama, aparecen los daños neuronales y entonces acuden las células el sistema inmune con el objetivo de dar una respuesta. Es por esto que el sistema inmune es catalogado como el sexto sentido (Weigent, 2013; Rossi *et al.*, 2012; Blalock 2005) porque

es capaz de detectar cuando la vida está en riesgo, desde insultos físicos hasta antígenos microbianos; y el miedo es para el sistema inmune otro antígeno que limpiar.

La única diferencia que se puede resaltar entre la respuesta inmune hacia los antígenos y la respuesta inmune hacia estrés es, si el sistema inmune está sensando el estímulo hostil anímico en el cerebro ¿en realidad la respuesta inmune desarrollada será confiable si los leucocitos, al igual que el cerebro, están siendo afectados a nivel de oxidación?

BIBLIOGRAFÍA

- Aloe L, Alleva E, Fiore M, Stress and nerve growth factor: findings in animal models and humans. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002; 73: 159-66.
- Arck P, Slominski A, Theoharides T, Peters E, Paus R. Neuroimmunology of Stress: Skin Takes Center Stage. *J Invest Dermatol.* 2006; 126: 1697-1704.
- Arredondo LR, Deng C, Ratts RB, Lovett-Racke AE, Holtzman DM, Racke MK. Role of nerve growth factor in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol.* 2001; 31: 625-33.
- Barcia C Sr, Mitxitorena I, Carrillo-de Sauvage MA, Gallego JM, Pérez-Vallés A, Barcia C Jr. Imaging the microanatomy of astrocyte-T-cell interactions in immune-mediated inflammation. *Front Cell Neurosci.* 2013; 30: 58. doi: 10.3389/fncel.2013.00058.
- Bailey MT, Kinsey SG, Padgett DA, Sheridan JF, Leblebicioglu B. Social stress enhances IL-1beta and TNF-alpha production by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-stimulated CD11b+ cells. *Physiol. Behav.* 2009; 98: 351-358, doi: 10.1016/j.physbeh.2009.06.013.
- Bennett L, Yang M, Enikolopov G, Lacovitti L. Circumventricular organs: A novel site of neural stem cells in the adult brain. *Mol Cell Neurosci.* 2009; 41: 337-47.
- Bentivoglio M, Mariotti R, Bertini G. Neuroinflammation and brain infections: historical context and current perspectives. *Brain Res Rev.* 2011; 66: 152-73.
- Beumer W, Gibney SM, Drexhage RC, Pont-Lezica L, Doorduyn J, Klein HC, Steiner J, Connor TJ, Harkin A, Versnel MA, Drexhage HA. The immune theory of psychiatric diseases: a key role for activated microglia and circulating monocytes. *J Leukoc Biol.* 2012; 92: 959-75.

- Blalock JE. The immune system as the sixth sense. *J Intern Med.* 2005; 257: 126-38.
- Bouayed J, Rammal H, Soulimani R. Oxidative stress and anxiety: relationship and cellular pathways. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2009; 2: 63-67.
- Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostefeld T, Svendsen CN, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron.* 1999; 23: 297-308.
- Caroleo MC, Costa N, Bracci-Laudiero L, Aloe L. Human monocyte/macrophages activate by exposure to LPS overexpress NGF and NGF receptors. *J Neuroimmunol.* 2001; 11: 193-201.
- Carter J, Deng G, Wagner D, Herson P. Lymphocytes rapidly infiltrate into the brain following cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation (CA/CPR) (CAM5P.246). *The Journal of Immunology.* 2014; 192: Supplement 180.17s
- Chan W, Kohsaka S, Rezaie P. The origin and cell lineage of microglia—New concepts. *Brain Res Rev.* 2007; 53: 344-54.
- Cottrell GT, Ferguson AV. Sensory circumventricular organs: central roles in integrated autonomic regulation. *Regul Pept.* 2004; 117: 11-23.
- Dhabhar FS. Stress-induced augmentation of immune function--the role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. *Brain Behav. Immun.* 2002; 16: 785-798.
- Dhabhar FS. Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful *Immunol Res.* 2014; 58: 193-210.
- De Simone R, Ambrosini E, Carnevale D, Ajmone-Cat MA, Minghetti L. NGF promotes microglial migration through the activation of its high

affinity receptor: modulation by TGF-beta. *J Neuroimmunol.* 2007; 190: 53-60.

- Di Cesare PE, Chen FS, Moergelin M, Carlson CS, Leslie MP, Perris R, Fang C. Matrix-matrix interaction of cartilage oligomeric matrix protein and fibronectin. *Matrix Biol.* 2002; 21: 461-70.
- Djukic M., Mildner A., Schmidt H., Czesnik D., Brück W., Priller J., Nau R., Prinz M., 2006. Circulating monocytes engraft in the brain, differentiate into microglia and contribute to the pathology following meningitis in mice. *Brain.* 129, 2394-403.
- Ebeling O, Duczmal A, Aigner S, Geiger C, Schöllhammer S, Kemshead JT, Möller P, Schwartz-Albiez R, Altevogt P. L1 adhesion molecule on human lymphocytes and monocytes: expression and involvement in binding to alpha v beta 3 integrin. *Eur J Immunol.* 1996; 26: 2508-16.
- El Zein N. D'Hondt S, Sariban E. Crosstalks between the receptors tyrosine kinase EGFR and TrkA and the GPCR, FPR, in human monocytes are essential for receptors-mediated cell activation. *Cell Signal.* 2010; 22: 1437-47.
- Dovbeshko GI, Chegel VI, Gridina NY, Repnytska OP, Shirshov YM, Tryndiak VP, Todor IM, Solyanik GI. Surface enhanced IR absorption of nucleic acids from tumor cells: FTIR reflectance study. *Biopolymers.* 2002; 67: 470-486.
- Dovbeshko GI, Gridina NY, Kruglova EB, Pashchuk OP. FTIR spectroscopy studies of nucleic acid damage. *Talanta.* 2000) ; 53 : 233-246
- Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 908: 244-54.

- Franklin TB, Russig H, Weiss IC, Gräff J, Linder N, Michalon A, Vizi S, Mansuy IM. Epigenetic transmission of the impact of early stress across generations. *Biol. Psychiatry*. 2010; 68: 408-415, doi: 10.1016/j.biopsych.2010.05.036.
- Fratta P, Engel W, McFerrin J, Davies K, Lin S, Askanas V. Proteasome Inhibition and Aggresome Formation in Sporadic Inclusion-Body Myositis and in Amyloid-Precursor Protein-Overexpressing Cultured Human Muscle Fibers. *American Journal of Pathology*. 2005; 167: 517-26.
- Fry M, Smith P, Hoyda T, Duncan M, Ahima R, Sharkey K, Ferguson A. Area Postrema Neurons Are Modulated by the Adipocyte Hormone Adiponectin. *The Journal of Neuroscience*. 2006; 26(38):9695–702.
- Gallin EK. Ion channels in leukocytes. Defense Technical Information Center, 1991.
- Gladkevich A1, Kauffman HF, Korf J. Lymphocytes as a neural probe: potential for studying psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2004; 28: 559-76.
- Goehler L, Erisir A, Gaykema P. Neural-immune interface in the rat AP. *Neuroscience*. 2006; 140:1415-34.
- Goings G, Goings A, James R, Abram L, Smith W, Miller S, Szele F. Hematopoietic cell activation in the subventricular zone after Theiler's virus infection. *J Neuroinflammation*. 2008; 15: 44. doi: 10.1186/1742-2094-5-44.
- Gómez B, Escobar A. Neuroanatomía del estrés. *Revista Mexicana de Neurociencias*. 2002; 3: 273-82.
- Gosselet F, Saint-Pol J2, Fenart L2. Effects of oxysterols on the blood–brain barrier: Implications for Alzheimer’s disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 446: 687-91. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.11.059.

- Hadjiconstantinou M, McGuire L, Duchemin AM, Laskowski B, Kiecolt-Glaser J, Glaser R. Changes in plasma nerve growth factor levels in older adults associated with chronic stress. *J Neuroimmunol.* 2001; 16: 102-6.
- Hackett MJ, Smith SE, Paterson PG, Nichol H, Pickering IJ, George GN. X-ray Absorption Spectroscopy at the Sulfur K-Edge: A New Tool to Investigate the Biochemical Mechanisms of Neurodegeneration. *ACS Chem Neurosci.* 2012; 3:178-85. doi: 10.1021/cn200097s.
- Hinwood M, Morandini J, Day TA, Walker FR. Evidence that microglia mediate the neurobiological effects of chronic psychological stress on the medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex.* 2012; 22: 1442-54.
- Holtzman DM, Kilbridge J, Li Y, Cunningham ET Jr, Lenn NJ, Clary DO, Reichardt LF, Mobley WC. TrkA expression in the CNS: evidence for the existence of several novel NGF-responsive CNS neurons. *J Neurosci.* 1995; 15: 1567-76.
- Hosoi T, Okuma Y, Nomura Y. The Mechanisms of Immune-to-Brain Communication in Inflammation as a Drug Target. *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy.* 2002; 1: 257-62.
- Hortsch M, Kakanahalli N, Godenschwege TA. The interaction between L1-type proteins and ankyrins-a master switch for L1-type CAM function. *Cell Mol Biol Lett.* 2009; 14.1; 57-69.
- Huitinga I, van Rooijen N, de Groot CJ, Uitdehaag BM, Dijkstra CD. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats after elimination of macrophages. *J Exp Med.* 1990; 172: 1025-33.
- Johansson L. Can stress increase Alzheimer's disease risk in women?. *Expert Rev Neurother.* 2014; 14:123-5. doi: 10.1586/14737175.2014.878651.
- Jones M. *Neuroscience Methods VII. Histology I.* Spring, 1996

- Jurgens HA, Johnson RW. Dysregulated neuronal-microglial cross-talk during aging, stress and inflammation. *Exp Neurol*. 2012; 233: 40-8.
- Kadmon G, Montgomery AM, Altevogt P. L1 makes immunological progress by expanding its relations. *Dev Immunol*. 1998; 6: 205-13.
- Kowitz A, Kadmon G, Eckert M, Schirmmacher V, Schachner M, Altevogt P. Expression and function of the neural cell adhesion molecule L1 in mouse leukocytes. *Eur J Immunol*. 1992; 22: 1199-205.
- la Sala A, Corinti S, Federici M, Saragovi HU, Girolomoni G. Ligand activation of nerve growth factor receptor TrkA protects monocytes from apoptosis. *J Leukoc Biol*. 2000; 68: 104-10.
- Law JW, Lee AY, Sun M, Nikonenko AG, Chung SK, Dityatev A, Schachner M, Morellini F. Decreased anxiety, altered place learning, and increased CA1 basal excitatory synaptic transmission in mice with conditional ablation of the neural cell adhesion molecule L1. *J Neurosci*. 2003; 23: 10419-32.
- Lewitus GM, Cohen H, Schwartz M. Reducing post-traumatic anxiety by immunization. *Brain Behav Immun*. 2008; 22: 1108-14.
- McCusker RH, Kelley KW. Immune-neural connections: how the immune system's response to infectious agents influences behavior. *J Exp Biol*. 2013; 216: 84-98.
- Maolood N, Meister B. Protein components of the blood-brain barrier (BBB) in the brainstem area postrema-nucleus tractus solitarius region. *J Chem Neuroanat*. 2009; 37: 82-95.
- Marques CP, Cheeran MC, Palmquist JM, Hu S, Urban SL, Lokensgard JR. Prolonged microglial cell activation and lymphocyte infiltration following experimental herpes encephalitis. *J Immunol*. 2008; 181: 6417-26.
- Meuth S, Herrmann A, Simon O, Siffrin V, Melzer N, Bittner S, Meuth P, Langer H, Hallermann S, Boldakowa N, Herz J, Munsch T, Landgraf P,

Aktas O, Heckmann M, Lessmann V, Budde T, Kieseier B, Zipp F, Wiendl H. Cytotoxic CD8⁺ T Cell–Neuron Interactions: Perforin-Dependent Electrical Silencing Precedes But Is Not Causally Linked to Neuronal Cell Death. *J Neurosci*. 2009; 29: 15397–409.

- Miller GE, Chen E, Sze J, Marin T, Arevalo JM, Doll R, Ma R, Cole SW. A functional genomic fingerprint of chronic stress in humans: blunted glucocorticoid and increased NF-kappaB signaling. *Biol Psychiatry*. 2008; 64: 266-72. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.03.017.
- Morimoto K, Morikawa M, Kimura H, Ishii N, Takamata A, Hara Y, Uji M, Yoshida K. Mental stress induces sustained elevation of blood pressure and lipid peroxidation in postmenopausal women. *Life Sci*. 2008; 82: 99-107.
- Zanyar M, Rehman S, Rehman I. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2008; 43: 134-179.
- Mulholland N, Xu Y, Sugiyama H, Zhao K. SWI/SNF-mediated chromatin remodeling induces Z-DNA formation on a nucleosome. *Cell Biosci*. 2012; 2: 3. doi: 10.1186/2045-3701-2-3.
- Nafisi S, Montazeri M, Manouchehri F. The effect of Se salts on DNA structure. *J Photochem Photobiol B*. 2012 Aug 1;113:36-41. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2012.04.012.
- Ottaviani E, Franceschi C. The Neuroimmunology of Stress from Invertebrates to Man. *Prog Neurobiol*. 1996; 48: 421- 440.
- Pavón L, Hernández M, Salinas F, Sandoval G. Interacciones neuroendocrinoimmunológicas. *Salud Mental* 2004; 27: 19-25.
- Paxinos G. and Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Quinta ed. Academic Press. 2005.

- Penkowa M, Giralt M, Lago N, Camats J, Carrasco J, Hernández J, Molinero A, Campbell IL, Hidalgo J. Astrocyte-targeted expression of IL-6 protects the CNS against a focal brain injury. *Exp Neurol*. 2003; 181: 130-48.
- Pittman Q, Mouihate A. Immune signalling to the brain. *J Physiol*. 2003; 550: 1.
- Pollmächer T, Haack M, Schuld A, Reichenberg A, Yirmiya R. Low levels of circulating inflammatory cytokines—Do they affect human brain functions? *Brain Behav Immun*. 2002; 16: 525–32.
- Quan N, Banks W. Brain-immune communication pathways. *Brain Behav Immun*. 2007; 21: 727–35
- Rocha M, Mansur A, Mansur H. Characterization and accelerated ageing of UHMWPE used in orthopedic prosthesis by peroxide. *Materials*. 2009; 2: 562-576, doi:10.3390/ma2020562.
- Rossi L, Salvestrini V, Ferrari D, Di Virgilio F, Lemoli RM. The sixth sense: hematopoietic stem cells detect danger through purinergic signaling. *Blood*. 2012; 120: 2365-75.
- Rubio M, Perez RD, Perez CA, Eynard AH, Bongiovanni GA. Synchrotron microscopic X-ray fluorescence analysis of the effects of chronic arsenic exposure in rat brain. *Radiation Physics and Chemistry*, 2008; 77: 1-8.
- Salim S. Oxidative Stress and Psychological Disorders. *Current neuropharmacology*. 2014; 12: 140-147.
- Sandi C. Stress, Cognitive Impairment and Cell Adhesion Molecules. *Neuroscience*. 2004; 5: 1-14.
- Schlegelmilch T, Henke K, Peri F. Microglia in the developing brain: from immunity to behaviour. *Curr Opin Neurobiol*. 2011; 21: 5-10.

- Schulz M, Engelhardt B. The circumventricular organs participate in the immunopathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cerebrospinal Fluid Research*. 2005; 2: 1–14.
- Schmitt C, Strazielle N, Ghersi-Egea JF. Brain leukocyte infiltration initiated by peripheral inflammation or experimental autoimmune encephalomyelitis occurs through pathways connected to the CSF-filled compartments of the forebrain and midbrain. *J Neuroinflammation*. 2012; 9: 187.
- Simard AR, Rivest S. Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. *FASEB J*. 2004; 18: 998-1000.
- Sivonová M, Zitnanová I, Hlincíková L, Skodáček I, Trebatická J, Duracková Z. Oxidative stress in university students during examinations. *Stress* 2004; 7: 183-188, doi:10.1080/10253890400012685
- Temiz NA, Donohue DE, Bacolla A, Luke BT, Collins JR. The role of methylation in the intrinsic dynamics of B- and Z-DNA. *PLoS One*. 2012; 7: e35558. doi: 10.1371/journal.pone.0035558.
- Tracey K. The inflammatory reflex. *Nature*. 2002; 420.19: 853-59.
- Tynan RJ, Naicker S, Hinwood M, Nalivaiko E, Buller KM, Pow DV, Day TA, Walker FR. Chronic stress alters the density and morphology of microglia in a subset of stress-responsive brain regions. *Brain Behav Immun*. 2010; 24: 1058-68.
- Ueno M. Mechanisms of the Penetration of Blood-Borne Substances into the Brain. *Curr Neuropharmacol*. 2009; 7: 142-49.
- Valcour VG, Shiramizu BT, Shikuma CM. HIV DNA in circulating monocytes as a mechanism to dementia and other HIV complications. *J Leukoc Biol*. 2010; 87: 621-26.
- Van Loo G, De Lorenzi R, Schmidt H, Huth M, Mildner A, Schmidt-Supprian M, Lassmann H, Prinz MR, Pasparakis M. Inhibition of

transcription factor NF-kappaB in the central nervous system ameliorates autoimmune encephalomyelitis in mice. *Nat Immunol.* 2006; 7: 954-61.

- Vargas-Caraveo A, Castillo-Michel H, Mejia-Carmona GE, Pérez-Ishiwara DG, Cotte M, Martínez-Martínez A. Preliminary studies of the effects of psychological stress on circulating lymphocytes analyzed by synchrotron radiation based-Fourier transform infrared microspectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2014; 128: 141-6.
- Varvel NH, Grathwohl SA, Baumann F, Liebig C, Bosch A, Brawek B, Thal DR, Charo IF, Heppner FL, Aguzzi A, Garaschuk O, Ransohoff RM, Jucker M. Microglial repopulation model reveals a robust homeostatic process for replacing CNS myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109: 18150-5.
- Vileno B, Jeney S, Sienkiewicz A, Marcoux PR, Miller LM, Forró L. Evidence of lipid peroxidation and protein phosphorylation in cells upon oxidative stress photo-generated by fullerols. *Biophys Chem.* 2010; 152: 164-9. doi: 10.1016/j.bpc.2010.09.004.
- Vitvitsky V, Thomas M, Ghorpade A, Gendelman HE, Banerjee R. A functional transsulfuration pathway in the brain links to glutathione homeostasis. *J Biol Chem.* 2006; 281: 35785-93.
- Wakabayashi Y, Uchida S, Funato H, Matsubara T, Watanuki T, Otsuki K, Fujimoto M, Nishida A, Watanabe Y. State-dependent changes in the expression levels of NCAM-140 and L1 in the peripheral blood cells of bipolar disorders, but not in the major depressive disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008; 32: 1199–1205.
- Walker FR, Beynon SB, Jones KA, Zhao Z, Kongsui R, Cairns M, Nilsson M. Dynamic structural remodelling of microglia in health and disease: A review of the models, the signals and the mechanisms. *Brain Behav Immun.* 2014; 37: 1-14.

- Wang DB, Dayton RD, Henning PP, Cain CD, Zhao LR, Schrott LM, Orchard EA, Knight DS, Klein RL. Expansive gene transfer in the rat CNS rapidly produces amyotrophic lateral sclerosis relevant sequelae when TDP-43 is overexpressed. *Mol Ther.* 2010; 18: 2064-74.
- Wang G, Vasquez KM. Z-DNA, an active element in the genome. *Front Biosci.* 2007; 12: 4424-38.
- Weigent DA. Lymphocyte GH-axis hormones in immunity. *Cell Immunol.* 2013 ; 285: 118-32.
- Whelan DR, Bambery KR, Heraud P, Tobin MJ, Diem M, McNaughton D, Wood BR. Monitoring the reversible B to A-like transition of DNA in eukaryotic cells using Fourier transform infrared spectroscopy. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39 : 5439-5448, doi: 10.1093/nar/gkr175. Epub 2011 Mar 29
- Wohleb ES, Powell ND, Godbout JP, Sheridan JF. Stress-induced recruitment of bone marrow-derived monocytes to the brain promotes anxiety-like behavior. *J Neurosci.* 2013; 33: 13820-33.
- Xiao B, Link H. Immune regulation within the central nervous system. *J Neurol Sci.* 1998; 157: 1-12.
- Yoshida S, Zhang QZ, Sakuyama S, Matsushima S. Metabolism of fatty acids and lipid hydroperoxides in human body monitoring with Fourier transform Infrared Spectroscopy. *Lipids Health Dis.* 2009 Jul 24;8:28. doi: 10.1186/1476-511X-8-28.S.

ANEXOS

Plan de difusión

Presentación de un cartel en el *ESRF Science and Student Days 2013*, celebrado en Val Cenis, Francia del 14 al 16 de octubre del 2013, titulado: “*Neuroimmunological changes induced by chronic psychological stress evaluated by SR- μ FTIR*”. Autores: Vargas-Caraveo A.; Castillo-Michel H. y Martínez Martínez A.

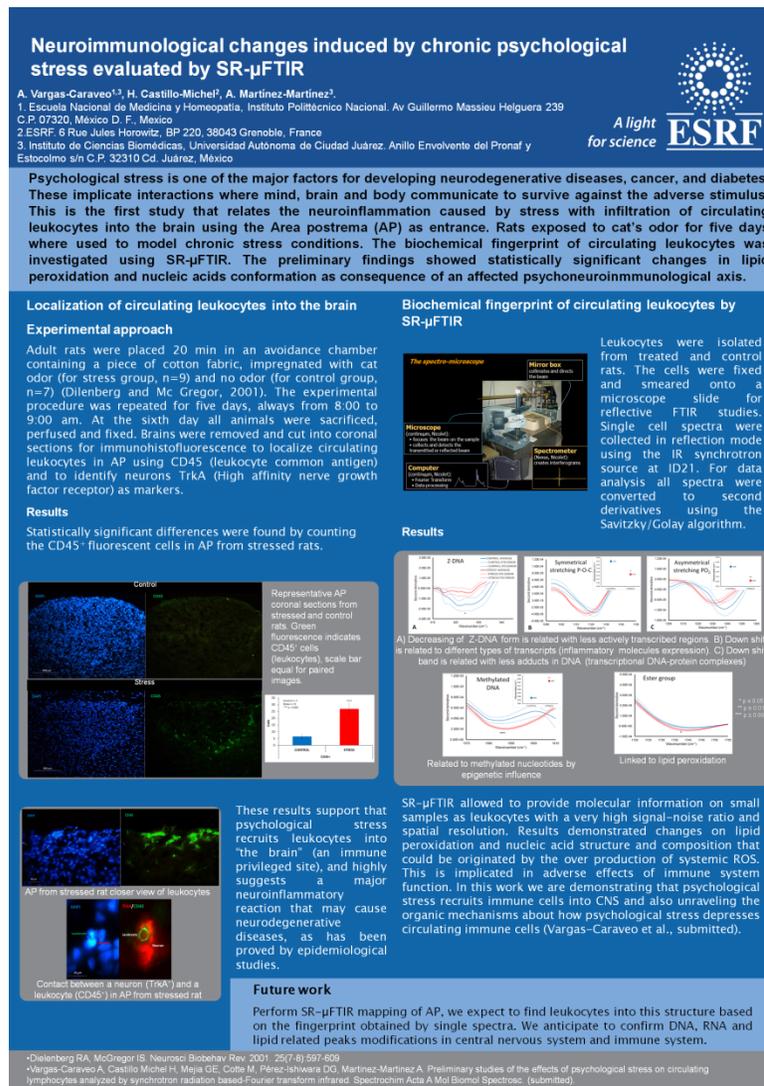


Figura 21. Cartel presentado en el *ESRF Science and Student Days 2013*.

Ponencia oral en el Taller Temático: Técnicas de Luz Sincrotrón en el Análisis de Materiales y Muestras de Interés Ambiental, de la Universidad de Guanajuato celebrado en León, Guanajuato el 11 agosto del 2013; presentado el tema: “Radiación sincrotrón en la evaluación de cambios inducidos por el estrés psicológico”.



Figura 22. Certificado de participación con una ponencia oral en el Taller Temático: Técnicas de Luz Sincrotrón en el Análisis de Materiales y Muestras de Interés Ambiental

Ponencia oral en el “V Congreso Internacional de Ciencias” Química y Biología: los Pilares de la Vida, del Instituto de Ciencias Biomédicas de la UACJ celebrado en Ciudad Juárez del 21 al 23 de marzo del 2012; presentando el tema: “Neuroinmunología del estrés: inducción de la relación fisicoquímica entre ambos sistemas”.



Figura 23. Certificado de participación con una ponencia oral en el “V Congreso Internacional de Ciencias” Química y Biología: los Pilares de la Vida

Publicación de un artículo en la revista *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, titulado: Preliminary studies of the effects of psychological stress on circulating lymphocytes analyzed by synchrotron radiation based-Fourier transform infrared microspectroscopy.



Preliminary studies of the effects of psychological stress on circulating lymphocytes analyzed by synchrotron radiation based-Fourier transform infrared microspectroscopy



Alejandra Vargas-Caraveo^{a,c,1}, Hiram Castillo-Michel^{b,1}, Gloria Erika Mejia-Carmona^{a,c}, David Guillermo Pérez-Ishiwara^a, Marine Cotte^b, Alejandro Martínez-Martínez^{c,*}

^a Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Instituto Politécnico Nacional, Guillermo Massieu Helguera, No. 239, Fraccionamiento "La Escalera", Ticomán, C.P. 07320 México DF, Mexico

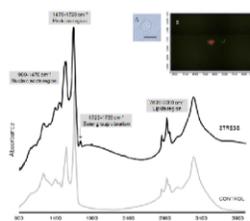
^b ID21, European Synchrotron Radiation Facility, 6 Rue Jules Horowitz, 38000 Grenoble, France

^c Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Anillo envolvente Profaf y Estocolmo s/n, 32310 Cd. Juárez, Mexico

HIGHLIGHTS

- Biochemical changes by psychological stress in lymphocytes investigated by vibrational spectroscopy at single cell level.
- The results showed an increased absorption at lipid peroxidation region in lymphocytes from stressed rats.
- Changes in peak position and absorbance in nucleic acids were observed suggesting reduction of transcriptional activity.
- Results unravel part of the mechanisms by which psychological stress affects immune system with systemic consequences.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:
Received 18 July 2013
Received in revised form 13 February 2014
Accepted 23 February 2014
Available online 12 March 2014

Keywords:
Chronic stress
Psychoneuroimmunology
Lipid peroxidation
Predator odor

ABSTRACT

Psychological stress is a condition that not only generates behavioral disorders but also disrupts homeostasis and immune activity that can exacerbate or lead to inflammatory diseases. The aim of this work was to study biochemical changes in circulating immune cells from rats under psychological stress by using vibrational spectroscopy. A stress model was used, where exposure to a stressor was repeated for 5 days. Subsequently, circulating lymphocytes were examined for their biomolecular vibrational fingerprints with synchrotron radiation based-Fourier transform infrared microspectroscopy. The results showed an increased absorption at the ester lipid region ($1720\text{--}1755\text{ cm}^{-1}$) in lymphocytes from stressed rats, suggesting lipid peroxidation. Statistical significant changes in wavenumber peak position and absorbance in the nucleic acid region were also observed ($915\text{--}950\text{ cm}^{-1}$ Z-DNA, $1090\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$ symmetric stretching of P=O-C, $1200\text{--}1260\text{ cm}^{-1}$ asymmetric PO₂ and $1570\text{--}1510\text{ cm}^{-1}$ methylated

* Corresponding author. Tel.: +52 (656) 6881621.
E-mail addresses: alejandra.vargas@uacj.mx (A. Vargas-Caraveo), hiram.castillo_michel@esrf.fr (H. Castillo-Michel), gloria.mejia@uacj.mx (G.E. Mejia-Carmona), dperez@ipn.mx (D.G. Pérez-Ishiwara), marine.cotte@esrf.fr (M. Cotte), alejandro.martinez@uacj.mx (A. Martínez-Martínez).
¹ These authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2014.02.148>
1386-1425/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Figura 24. Primera página del artículo titulado: Preliminary studies of the effects of psychological stress on circulating lymphocytes analyzed by synchrotron radiation based-Fourier transform infrared microspectroscopy.

Estancias de investigación

Estancia de investigación en el ID21 del ESRF, en Grenoble, Francia, realizando análisis de SR- μ FTIR y de microespectroscopia de rayos X, del 1 de septiembre al 28 de noviembre del 2013.

EUROPEAN SYNCHROTRON RADIATION FACILITY
INSTALLATION EUROPEENNE DE RAYONNEMENT SYNCHROTRON



Diciembre 3, 2013

A quien corresponda,

Esta carta es para certificar que la M. en C. Alejandra Vargas Caraveo realizó una estancia en la línea ID21 del ESRF en el periodo del 2 de Septiembre al 28 de Noviembre 2013. El trabajo que se realizó complementará perfectamente los resultados que serán la base de su tesis de doctorado. Los experimentos realizados incluyeron el análisis del perfil bioquímico de linfocitos y area postrema en cerebros de rata expuestos a un estresor psicológico. Mediante el uso de técnicas sincrotrón de absorción de Rayos X e infrarrojos se identificaron los principales cambios bioquímicos presentes en dichas muestras.

Como actividades extracurriculares, participó en una sesión de experimentación con la técnica XAFS en el sincrotrón de Elettra en Trieste, Italia; parte de la preparación y procesamiento de las muestras analizadas con luz sincrotrón fueron llevados a cabo en la Universidad de Ljubljana en Ljubljana, Eslovenia. Por último participó en el Science and Students days 2013 del ESRF celebrado del 14 al 16 de octubre en Val Cenis, Francia con la presentación de un cartel sobre su trabajo realizado con técnicas sincrotrón. Agradeciendo de antemano el apoyo brindado para esta estancia le saluda atentamente.



Dr. Hiram Castillo Michel
X-ray and Infrared Microscopy Beamline ID21
Infrared beamline responsible
European Synchrotron Radiation Facility
B.P. 220-38043 GRENOBLE Cedex, France
Phone: 33(0)4 76 88 29 48
Fax: 33(0)4 76 88 27 85
hiram.castillo_michel@esrf.fr
www.esrf.fr

Figura 25. Carta de certificación de la estancia en el ID21 del ESRF, del 1 de septiembre al 28 de noviembre del 2013.

Estancia de investigación en el ID21 del ESRF, en Grenoble, Francia, realizando análisis de microespectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier de fuente sincrotrón, del 14 al 30 de julio del 2012.



INTALLATION EUROPEENNE DE RAYONNEMENT SYNCHROTRON

To whom it may concern

July 31, 2012

The present is to address the participation of Alejandra Vargas Caraveo in an in-house experiment that involved the use of Infrared microscopy at beamline ID21, from July 14 to July 26.

The participant had an in-house experiment in which samples from area postrema, blood white cells and amygdala were analyzed by infrared microscopy to assess the distribution of molecules of biological importance as are lipids, lipid peroxides, proteins, nucleic acids and carbohydrates. Also, analysis of infrared spectra was performed using the programs OMNIC 8.1 and Unscrambler to assess the changes of the previously mentioned molecules in control and psychogenic stress samples.

The activities previously mentioned were under my direct supervision.

Sincerely

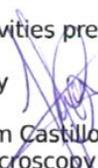

Dr. Hiram Castillo Michel
X-ray Microscopy Beamline ID21 Scientist personnel
European Synchrotron Radiation Facility
B.P. 220-38043 GRENOBLE Cedex, France
Phone: 33(0)4 76 88 29 48
Fax: 33(0)4 76 88 27 85
hiram.castillo_michel@esrf.fr
www.esrf.fr

Figura 26. Carta de certificación de la estancia en el ID21 del ESRF, del 14 al 30 de julio del 2012.

Estancia de investigación en el laboratorio de Genética y conducta del Brian Mind Institute de la Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, en Lausanne, Suiza, para el estudio de ensayos de conducta animal, del 7 al 14 de febrero del 2012.

BRAIN MIND INSTITUTE - BMI
LABORATORY OF BEHAVIORAL GENETICS - LGC

Prof. Carmen Sandi
EPFL-SV-BMI-LGC
SV 2810
Station 19
CH-1015 Lausanne - Switzerland

Phone : +4121 693 95 34
Fax : +4121 693 96 36
E-mail : carmen.sandi@epfl.ch
Website : <http://bmi.epfl.ch/LGC>



ÉCOLE POLYTECHNIQUE
FÉDÉRALE DE LAUSANNE

To Whom it may concern

Lausanne, February 20th, 2012

This is to verify that MD. Alejandra Vargas Caraveo was hosted as a visitor student from February the 7th to February the 14th, 2012, to the Laboratory of Behavioral Genetics (LGC) at Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL).

The activities were:

- 1) The learning of some behavioral techniques and paradigms we use at LGC.
- 2) The discussion of the project that she is doing for her Master in Science, after a Seminar to the LGC group.
- 3) A visit to the laboratory for the study of genetic and epigenetic basis of cognitive functions and behavior in mammals Dr. Isabelle Mansuy (PI) at Brain Research Institute (University of Zurich).
- 4) We discuss the potential collaboration for future studies.

Best Regards,

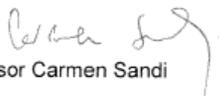

Professor Carmen Sandi

Figura 27. Carta de certificación de la estancia en el laboratorio de Genética y conducta del Brian Mind Institute de la École Polytechnique Fédérale de Lausanne, del 7 al 14 de febrero del 2012.

Estancia de investigación en el ID21 del ESRF, en Grenoble, Francia, realizando análisis de microscopía de rayos X y microespectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier de fuente sincrotrón, del 26 al 31 de octubre del 2011.

EUROPEAN SYNCHROTRON RADIATION FACILITY

INSTALLATION EUROPEENNE DE RAYONNEMENT SYNCHROTRON

To whom it may concern

November 15, 2011

The present is to address the participation of Alejandra Vargas Caraveo in a course and in-house experiment that involved the use of the X-ray and Infrared microscopes at beamline ID21, from October 26 to October 31.

The participant completed a 3 day training in which they review the following points:

- a. Principles of synchrotron technology:
 - i. Principles of X-ray microscope analysis
 - ii. Principles of Infrared microscope analysis
- b. Basic use of X-ray microscope
- c. Basic use of Infrared microscope
- d. Basic training in the following software:
 - i. PyMca 4.4.1
 - ii. OMNIC 8.1

Also the participants participated in an in-house experiment in which samples from area postrema were analyzed by X-ray and infrared microscope to assess the elemental distribution of F, Na, Mg, Al, Si, P, S, Cl, K, Ca.

The activities previously mentioned were under my direct supervision.

Sincerely


Dr. Hiram Castillo Michel
X-ray Microscopy Beamline ID21
European Synchrotron Radiation Facility
B.P. 220-38043 GRENOBLE Cedex, France
Phone: 33(0)4 76 88 29 48
Fax: 33(0)4 76 88 27 85
hiram.castillo_michel@esrf.fr
www.esrf.fr



Figura 28. Carta de certificación de la estancia en el ID21 del ESRF, del 26 al 31 de octubre del 2011.