

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Farmacología y Toxicología



TESIS DOCTORAL

**Estudio del papel regulador de los macrófagos perivasculares
en modelos animales de activación inmune en sistema
nervioso central (SNC)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Aline Sayd Gaban

Directores

Borja García Bueno
Laura Orio Ortiz
Juan Carlos Leza

Madrid
Ed. electrónica 2019

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Farmacología y Toxicología



**Estudio del papel regulador de los macrófagos
perivasculares en modelos animales de activación
inmune en sistema nervioso central (SNC).**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA
PRESENTADA POR

Aline Sayd Gaban

Directores

Dr. Borja Garcia Bueno

Dra. Laura Orio Ortiz

Dr. Juan Carlos Leza

Tesis Doctoral

Septiembre 2018

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Farmacología y Toxicología



**Estudio del Papel regulador de los macrófagos
perivasculares en modelos animales de activación
inmune en sistema nervioso central (SNC).**

Aline Sayd Gaban

Directores

Dr. Borja Garcia Bueno

Dra. Laura Orio Ortiz

Dr. Juan Carlos Leza

Tesis Doctoral

Septiembre 2018



Los Dres. Juan Carlos Leza Cerro (catedrático de Universidad), Borja García Bueno (profesor contratado doctor), del dpto. Farmacología y toxicología, facultad de medicina y Dra. Laura Orio Ortiz (profesor contratado doctor) del departamento de psicobiología de la facultad de psicología de la Universidad Complutense de Madrid,

Certifican

Que la tesis doctoral que tiene por título **“Papel regulador de los macrófagos perivasculares en modelos animales de activación inmune en el sistema nervioso central (SNC).”** Ha sido realizada por Aline Sayd Gaban bajo su dirección en el Dpto. De Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Madrid, a 3 de septiembre de 2018.

Fdo. Juan Carlos Leza Cerro Fdo. Borja Garcia Bueno Fdo. Laura Orio Ortiz

ABREVIATURAS	10
RESUMEN	13
SUMMARY	16
1 . INTRODUCCIÓN	19
1.1 . ESTRÉS	21
1.1.1 . <i>Definición y conceptos</i>	21
1.1.2 . <i>Eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA)</i>	23
1.1.3 . <i>Mediadores del estrés</i>	25
1.2 . LA EXCITOTOXICIDAD Y EL ESTRÉS	29
1.3 . ESTRÉS Y NEUROINFLAMACIÓN	31
1.4 . MEDIADORES Y MECANISMOS IMPLICADOS EN LA NEUROINFLAMACIÓN INDUCIDA POR LA EXPOSICIÓN A ESTRÉS .	33
1.4.1 . <i>Citocinas</i>	33
1.4.2 . <i>Vía del NF-κB</i>	36
1.4.3 . <i>Estrés oxidativo y vía antioxidante</i>	38
1.4.4 . <i>Vía receptor toll-like</i>	41
1.4.5 . <i>Mediadores antiinflamatorios</i>	45
1.5 . COMUNICACIÓN BIDIRECCIONAL ENTRE EL SISTEMA INMUNE Y SNC.....	46
1.6 . EFECTO DEL ESTRÉS EN CÉLULAS INMUNES PERIFÉRICAS (TRÁFICO DE CÉLULAS INMUNES)	47
1.7 . PAPEL DE LOS MACRÓFAGOS PERIVASCULARES (PVM)	52
1.8 . FISIOPATOLOGÍA DE LOS MACRÓFAGOS PERIVASCULARES	54
1.9 . ESTRÉS, “ <i>SICKNESS BEHAVIOUR</i> ”, ALTERACIONES DE COMPORTAMIENTO Y DEPRESIÓN	59
2 . ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	63
2.1 . ANTECEDENTES	65
2.2 . HIPÓTESIS	69
2.3 . OBJETIVOS	70
3 . MATERIAL Y MÉTODOS	73
3.1 . MODELOS ANIMALES.....	77
3.1.1 . <i>Estrés agudo por inmovilización</i>	77
3.1.2 . <i>Estrés crónico leve o “chronic mild stress” (CMS)</i>	79
3.1.3 . <i>Administración subcrónica de LPS</i>	81
3.1.4 . <i>Administración aguda de LPS</i>	83
3.1.5 . <i>Estrés social “repeat social defeat” (RSD)</i>	84
3.2 . JUSTIFICACIÓN DE LA ELECCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS ESTUDIADAS.....	85
3.3 . OBTENCIÓN DE MUESTRAS, MÉTODOS Y ESTADÍSTICA.....	86
3.3.1 . <i>Depleción selectiva de PVM</i>	86
3.3.2 . <i>Inhibición génica selectiva en PVM: GapmeR encapsulado en liposoma</i>	87

3.3.3	. Hibridación “in situ” (ISH)	89
3.3.4	. Inyección intracerebroventricular (ICV)	90
3.3.5	. Extracción y preparación de extratos a partir de muestras y tejidos.....	91
3.3.6	. Cuantificación de proteínas y análisis por western blot (WB)	92
3.3.7	. Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	93
3.3.8	. Niveles de corticosterona plasmática	94
3.3.9	. Niveles de prostaglandinas.....	95
3.3.10	. Inmunofluorescencia.....	96
3.3.11	. Determinación de citocinas en tejido cerebral.....	97
3.3.12	. Citometría de flujo	97
3.3.13	. Test comportamental.....	98
3.3.14	. Análisis estadísticos	100
4	. RESULTADOS	101
4.1	. VALIDACIÓN DE LA DEPLECIÓN SELECTIVA Y EFECTOS SOBRE LA MICROGLÍA	103
4.2	. ESTRÉS AGUDO POR INMOVILIZACIÓN	106
4.2.1	. Niveles de corticosterona en plasma tras la exposición al estrés por inmovilización durante 6 horas.....	106
4.2.2	. Efectos de la depleción de PVM en la expresión de citocinas proinflamatorias clásicas y sus receptores en condiciones de estrés agudo por inmovilización.	106
4.2.3	. Efectos de la depleción de PVM en la expresión de mediadores pro-inflamatorios de la vía de señalización JAK/STAT.	109
4.2.4	. Efectos de la depleción de los PVM sobre la vía de señalización del receptor de inmunidad innata Toll-Like 4 (TLR-4) en condiciones de estrés agudo por inmovilización.	110
4.2.5	. Efectos de la depleción de PVM en la vía de señalización del factor Nuclear kappa B (NF- κ B) en condiciones de estrés agudo por inmovilización.	112
4.2.6	. Efecto de la depleción de los PVM en los marcadores de estrés oxidativo/nitrosativo y en sus mecanismos antioxidantes reguladores en un modelo de estrés agudo por inmovilización	114
4.3	. ESTRÉS CRÓNICO (CMS) EN RATAS	117
4.3.1	Niveles de corticosterona en plasma tras la exposición al estrés crónico durante 21 días. 117	
4.3.2	Efectos de la depleción de PVM en la expresión de citocinas proinflamatorias clásicas y sus receptores en condiciones de CMS durante 21 días.....	118
4.3.3	Efectos de la depleción de los PVM sobre la vía de señalización del receptor de inmunidad innata Toll-like 4 (TLR-4) en condiciones de CMS.....	120
4.3.4	Efectos de la depleción de PVM en la vía de señalización del factor nuclear kappa b (NF-KB) en condiciones de estrés crónico o CMS durante 21 días.	123
4.3.5	Efecto de la depleción de los PVM en los marcadores de estrés oxidativo/nitrosativo y en sus mecanismos antioxidantes reguladores en un modelo de 21 días de CMS.	125

4.4	ESTRÉS CRÓNICO “CMS” CURSO TEMPORAL: 7 Y 14 DÍAS	127
4.4.1	“Chronic mild stress” (CMS) 7 días.....	127
4.4.2	“Chronic mild stress” curso temporal 14 días	137
4.4.2.2	Efectos de la depleción de PVM en la expresión de citocinas pro-inflamatoria y sus receptores en condiciones de estrés crónico de 14 días.....	138
4.5	PAPEL DE LOS PVM EN EL TRÁFICO DE CÉLULAS INMUNES	146
4.5.1	Tráfico de células inmunes en un modelo agudo de administración de LPS y estrés social o “repeat social defeat”	146
4.6	PAPEL DE LOS PVM EN LA ACTIVACION DE LA VÍA ANTIINFLAMATORIA L-PGDS/15D-PGJ ₂ EN UN MODELO AGUDO DE NEUROINFLAMACIÓN INDUCIDO POR LPS.	161
4.6.1	Niveles de prostaglandinas en la medula ventrolateral.	163
4.7	EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS MODIFICADO ANTISENTIDO SILENCIADOR DE ARNm (GAPMER) SOBRE GENES ANTIINFLAMATORIOS.....	164
5	DISCUSIÓN	167
5.1	DISCUSIÓN: PAPEL DE LOS PVM EN UN MODELO DE ESTRÉS AGUDO POR INMOVILIZACIÓN.....	169
5.2	DISCUSIÓN: PAPEL DE LOS PVM EN UN MODELO DE ESTRÉS CRÓNICO “CMS”	173
5.3	DISCUSIÓN: PAPEL DE LOS PVM EN EL TRÁFICO DE CÉLULAS INMUNE Y EN EL COMPORTAMIENTO.....	175
5.4	DISCUSIÓN: PAPEL REGULADOR DE LOS PVM EN LA SINTESIS DE PROSTAGLANDINAS E INHIBICIÓN GÉNICA SELECTIVA EN LOS PVM.	182
5.5	DISCUSIÓN GLOBAL. LIMITACIONES DEL ESTUDIO. IDEAS DE FUTURO.....	183
6	CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS	189
6.1	CONCLUSIONES.....	191
6.2	CONCLUSIONS	192
7	BIBLIOGRAFÍA	193

ABREVIATURAS

- 15d-PGJ₂: 15d-prostaglandina J₂
- 4-HNE: 4-Hidroxinonenal
- 5-HT: Serotonina
- ACTH: hormona adenocorticotropa
- AP-1: Proteína activadora-1
- ARNinc: ARN de cadena larga no codificante
- ARNsn: ARN de tamaño pequeño
- ATP: Adenosina trifosfato
- BHE: Barrera hematoencefalica
- BM: Médula ósea
- CAM: Moléculas de adhesión celular
- CCL2/MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos 1
- CCR2: receptor de quimiocina tipo 2
- CD14: Cluster de diferenciación 14
- CHCL3: Cloroformo
- CLO: Clodronato
- CMS: Chronic mild stress
- COX: Ciclooxygenasa
- CPM: Macrófago del plexo coroideo
- CRF: Factor liberador de corticotropina
- Cu: cobre
- CX3CR1: receptor de fractalquina
- DAMP: Danger-associated molecular pattern molecules
- DJ-1: Parkinson's-associated protein
- EA: Enfermedad de Alzheimer
- EAAT: Transportadores de aminoácidos excitadores
- EAE: Encefalomiелitis alérgica experimental
- ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares
- GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GC: Glucocorticoide
GLUT: Transportador de glucosa
GR: receptor de glucocorticoides
GRS: Glutation reductasa
HHA: Eje hipotalámico-hipofisario-adrenal
HSP60: proteína de choque térmico 60
ICAM: Molécula de adhesión intercelular
IFN γ : Interferón gamma
IKB: Inhibidor de kappa B
IKK: Quinasa de I κ B
IL-1: Interleuquina 1
iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible
JAK: Janus Kinasas
KEAP-1: Proteína Asociada a ECH tipo-Kelch 1
LNA: Acido nucleico bloqueado
LPS: Lipopolisacárido
Ly6C: lymphocyte antigen 6 complex, locus C1
MAPK: Proteína/Quinasa Activada por Mitógenos
MD2: Myeloid differentiation 2 or lymphocyte antigen 96
MDA: Malonildialdehído
MGM: macrófagos meníngeo
MMP9: metaloproteasa de matriz 9
MSH: hormona estimuladora de melanocitos
MyD88: Myeloid differentiation 88
NA: Noradrenalina
NF- κ B: Factor nuclear kappa B
NMDA: Ácido N-metil-D-aspártico
NOX2: phagocyte NADPH oxidase
NQO-1: NAD(P)H quinona deshidrogenasa-1
Nrf2: Factor Nuclear tipo 2 (Derivado de eritroide 2)

O₂⁻: anión superóxido

ONOO: peroxinitrito

PAMP'S: Pathogen-associated molecular patterns

PGE₂: Prostaglandina E₂

POMC: proopiomelanocortina

PPAR γ : receptores nucleares activados por los proliferadores de peroxisomas y

PVM: Macrófagos perivasculares

RISC: RNA-induced silencing complex

RNS/ROS: especies reactivas de nitrógeno y de oxígeno

SEPT: Estrés post traumático

SNC: Sistema Nervioso Central

SNS: Sistema nervioso simpático

SOD: super óxido dismutasa

SR-BI: scavenger receptor class B type I

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

TEM: Microscopio electrónico de transmisión

TGF β : Factor de crecimiento transformante beta

TLR-4: toll like receptor 4

TNFR1: receptor de TNF α 1

TNFR2: receptor de TNF α 2

VCAM: Molécula de adhesión endotelial

YFP: Yellow fluorescent protein

RESUMEN

Introducción: El SNC y el sistema inmune periférico están en comunicación constante. Estímulos inflamatorios de distinta naturaleza como puede ser la administración periférica de LPS bacteriano o la exposición prolongada a estrés interrumpe la comunicación homeostática entre el SNC y el sistema inmune periférico, lo que conduce hacia un estado pro-inflamatorio. Muchos son los eventos relacionados con la alteración de esta homeostasis, como puede ser la activación del eje HHA, activación del sistema nervioso simpático, tráfico de células inmunes, etc. Muchas de estas respuestas llevan consigo un aumento en la señalización pro-inflamatoria y forman parte de la fisiopatología de enfermedades en el SNC. Gran parte de la investigación con respecto a respuesta inmune y el SNC se centra en la microglía. Sin embargo, se sabe mucho menos sobre otras células inmunes residentes en el cerebro, como los macrófagos perivasculares (PVM). Estas células son parte estructural de la barrera hematoencefálica, jugando un papel importante en la comunicación del sistema inmune al cerebro, transmitiendo y modulando señales inflamatorias periféricas.

Los PVM tienen una ubicación que se podría considerar estratégica para regular la respuesta inmune, rodeando las arterias y venas que penetran profundamente en el tejido cerebral conocido como espacio perivascular, lo que las hace excelentes candidatas para regular las interacciones SNC-periferia en condiciones de estrés.

Muchos de los estudios centrados en los PVM les atribuyen un papel regulador en el paso de macromoléculas al SNC, regulación del eje HHA, implicación en modelos de patologías de infección en SNC, entre otros. Con todo, su papel en el cerebro permanece poco claro tanto en una situación fisiológica como patológica debido a la diversidad de efectos que han demostrado en los estudios reportados hasta el día de hoy, así como los mecanismos implicados. Esta Tesis Doctoral plantea explorar en profundidad su papel en modelos de neuroinflamación asociados con la exposición a estrés.

Material y métodos: Para elucidar el papel de los PVM en el SNC, se ha utilizado la administración central de clodronato encapsulado en liposomas, induciéndoles a la apoptosis, y de esta manera verificar su papel en varios modelos de neuroinflamación, como la administración periférica de LPS, estrés agudo por inmovilización, estrés social (“*repeat social defeat*”) y estrés crónico (“*chronic mild stress*”), evaluando bioquímicamente los mediadores implicados en una respuesta inmune y la relación con los PVM. Además de esto, se ha validado una herramienta de silenciamiento génico direccionado a los PVM como metodología, que puede hacer posible un estudio más específico de los mecanismos implicados en su función/es.

Resultados: Se ha podido observar a los PVM como reguladores relevantes de la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo / nitrosativo en corteza frontal de ratas expuestas a un modelo agudo de estrés por inmovilización, concretamente se ha podido observar que la depleción selectiva de PVM: 1) disminuyó los niveles del factor de necrosis tumoral- α (TNF α) y de elementos de la vía JAK / STAT, aumentó los niveles de proteína de los receptores de interleuquina-1 y 6 en condiciones de estrés; 2) bloqueó la vía de señalización inducida por estrés TLR-4 / MyD88; 3) bloqueó la activación de la ruta proinflamatoria inducida por NF κ B / COX-2 y; 4) evitó la peroxidación lipídica inducida por estrés y el aumento concomitante de los elementos antioxidantes endógenos dependientes del factor nuclear tipo 2 (derivado de eritroide 2) (Nrf2), glutatión reductasa 1 y desglucasa asociada al parkinsonismo (PARK7) dependiente de TNF α . Se ha podido observar también un papel regulador menos relevante en un modelo de estrés crónico (CMS), regulando la síntesis y expresión de elementos implicados en la vía de TLR-4 como: TLR-4, CD14, MD2, MyD88 y NF- κ B. Otro mecanismo en que se ha observado una regulación de los PVM es el tráfico de células inmune al SNC en modelos de estrés social “*repeat social defeat*” (Linfocitos T y granulocitos) y en la administración subcrónica de LPS (células mieloides cerebrales CD45^{hi}CD11b y monocitos Ly6C^{hi}). En el modelo de LPS los PVM parecen regular los niveles de IL-1 β y MMP-9. En un curso temporal de 24 horas tras la administración de LPS se estudio el posible papel antiinflamatorio de los PVM, estando implicados en el balance de las prostaglandinas PGE₂ (pro-inflamatoria) y 15d-PGJ₂ (anti-inflamatoria). De manera novedosa se construyó

con éxito una herramienta metodológica para el estudio de los PVM que consistió en la modulación génica de moléculas antiinflamatorias que son expresadas por estas células y que podría representar una prometedora estrategia en el estudio de los PVM y para la evaluación del potencial de la manipulación de estas células en enfermedades relacionadas con alteraciones en la respuesta inmune en el SNC.

Conclusión: Los PVM presentan un perfil pro-inflamatorio / oxidante en un modelo de estrés agudo, podrían regular la respuesta inmune innata en condiciones de estrés crónico, y regulan el tráfico de células inmunes tras la exposición a un agente inflamatorio o estresante. El papel regulador de los PVM es por lo tanto complejo y puede cambiar en función del tiempo de exposición y naturaleza de un estímulo inmune. Aún se necesita mucho más esfuerzo científico para evaluar si su manipulación farmacológica / genética selectiva es una estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento de neuropsicopatologías que cursen con alteraciones de la comunicación sistema inmune-SNC.

SUMMARY

Introduction: The CNS and the peripheral immune system are in constant communication. Different nature of inflammatory stimuli such as peripheral bacterial LPS administration or prolonged exposure to stress interrupt homeostatic communication between the CNS and the peripheral immune system, which leads to a pro-inflammatory state. Many events are related to the alteration in this homeostasis, such as activation of the HHA axis and sympathetic nervous system, increased traffic of immune cells, etc. Many of these responses carry an increase in pro-inflammatory signaling and represent part of the physiopathology of CNS diseases. The majority of studies related to the immune response and the CNS are focused on microglia. However, less is known about other immune cells resident in the brain, such as perivascular macrophages (PVM). These cells are a structural part of the blood brain barrier, playing an important role in the communication between the immune system and brain, transmitting and modulating peripheral inflammatory signals to the brain.

The position of PVM could be considered strategic in immune response, surrounding the arteries and veins that penetrate deep into the brain tissue known as the perivascular space, make them excellent candidates to regulate SNC-periphery interactions in stress conditions.

Many of the studies focused on PVMs attribute a regulatory role in the passage of macromolecules to the CNS, regulation of the HHA axis, and involvement in models of infection in CNS, etc. However, the role of PVM in the brain remains unclear in a physiological and pathological situation, depending on the diversity of effects that has been shown in the studies reported to date, as well as the mechanisms involved, this doctoral thesis aims to explore in depth the role of these cells in neuroinflammation models associated with stress exposure.

Material and methods: To elucidate the role of PVM in the CNS, the central administration of clodronate encapsulated in liposomes has been used, inducing them to apoptosis, and in then checking their role in several models of neuroinflammation, such as the peripheral administration of LPS, acute restraint stress, social stress ("*repeat social defeat*") and chronic stress ("*Chronic mild stress*"), evaluating biochemically the mediators involved in an immune response

and the relationship with the PVM. In addition to this, a gene silencing tool driven to PVMs has been validated as methodology, which can make possible a more specific study in the mechanisms involved and their functions.

Results: PVMs have been observed as relevant regulators of the inflammatory response and oxidative / nitrosative stress in the frontal cortex of rats exposed to an acute model of restraint stress. Specifically, it has been observed that the selective depletion of PVM: 1) decreased levels of tumor necrosis factor- α and elements of the JAK / STAT pathway, increased protein levels of interleukin-1 and 6 receptors under stress conditions; 2) blocked stress-induced signaling pathway TLR4 / MyD88; 3) blocked the activation of the proinflammatory pathway induced by NF- κ B / COX-2 and; 4) prevented stress-induced lipid peroxidation and concomitant increase in the endogenous antioxidant elements dependent of type 2 nuclear factor (erythroid 2 derivative) (Nrf2), glutathione reductase 1 and parkinsonism-associated desglucase (PARK7) dependent on TNF α . It has also been observed a regulatory role in a chronic stress model, mainly at 21 days, regulating the synthesis and expression of elements involved in the TLR-4 pathway: TLR-4, CD14, MD2, MyD88 and NF- κ B. A regulatory role of PVM has been observed in the trafficking of immune cells to CNS both in social stress model "repeat social defeat" (T lymphocytes and granulocytes) and in the subchronic administration of LPS (cerebral myeloid cells CD4^{hi}CD11b and monocytes Ly6Chi). In this LPS model, PVM seem to regulate the levels of IL-1 β and MMP-9, chemokine receptors and matrix metalloproteinase 9. In a temporary course of 24 hours after the systemic administration of LPS, PVM presented a potential anti-inflammatory role, regulating the balance between the prostaglandins PGE₂ (pro-inflammatory), and 15d-PGJ₂ (anti-inflammatory). In a novel way, a methodological tool was built to produce a genetic inhibition of anti-inflammatory molecules expressed in PVM. This approach may represent a promising strategic in the study of PVM, and to evaluate the therapeutical potential of the manipulation of PVM for the treatment of CNS pathologies related to alterations in the immune system.

Conclusion: PVM showed a pro inflammatory / oxidant profile in an acute stress model, could regulate the innate immune response under conditions of chronic stress, and could regulate the trafficking of immune cells after exposure to an

inflammatory or stressful agent. The regulatory role of PVM is therefore complex and can change depending on the duration and nature of an immune stimulus. Much more scientific effort is still needed to evaluate whether its selective pharmacological / genetic manipulation is a promising therapeutic strategy for the treatment of neuropsychological diseases that occur with alterations of the immune system-CNS bi-directional communication.

1 .INTRODUCCIÓN

1.1 . Estrés

1.1.1 . Definición y conceptos

Según la Real Academia Española, el “estrés” se define como una *“Tensión provocada por situaciones agobiantes que originan reacciones psicósomáticas o trastornos psicológicos a veces graves”*.

Dentro del campo de la investigación biomédica, Hans Selye (rev1998), describe que una respuesta fisiológica particular a un estímulo estresante caracterizaría el “Síndrome General de adaptación”. Selye halló que el organismo busca una forma de adaptarse a un entorno novedoso, de ahí su etimología.

Una descripción más detallada fue la del Dr. Bruce McEwen (1993) que abarcaba componentes psicológicos y fisiológicos: “El estrés puede ser definido como una amenaza real o imaginaria, a la integridad fisiológica o psicológica y/o comportamental. En biomedicina, el estrés también se refiere a situaciones en las que los glucocorticoides (GCs) de origen adrenal y las catecolaminas se encuentran elevados como consecuencia de una experiencia estresante”.

Desde entonces han surgido muchas definiciones, pero ninguna es definitiva en todos los campos. Cabe puntualizar que la definición de un concepto tan complejo como el estrés puede dividirse en categorías, como, por ejemplo: estímulo estresante, estado de un organismo y también la respuesta general resultante al estrés.

Un estímulo estresante también es comúnmente clasificado en función de su duración (de menor a mayor): agudo, episódico o subagudo y repetido o crónico (Black & Garbutt, 2002), y también en función de su naturaleza, que puede ser psicológico, físico o mixto.

El estrés actúa sobre el estado de un organismo, alterando su homeostasis. La homeostasis puede ser definida como el equilibrio dinámico

de autorregulación corporal para mantener parámetros biológicos en condiciones estables, que permiten al organismo desempeñar sus funciones con normalidad (Cannon, 1929a). La alostasis es el proceso activo por el que el cuerpo responde a estímulos diarios para mantener el equilibrio interno u homeostasis (rev. McEwen, 1998).

La respuesta al estrés es un proceso complejo que se constituye por diversos factores cognitivos y/o emocionales, comportamentales y fisiológicos, garantizando la supervivencia del individuo en condiciones desfavorables (McEwen & Stellar, 1993). Algunos de los cambios fisiológicos más característicos que tienen lugar son: redistribución del flujo sanguíneo hacia al cerebro y músculos, aumento del tono muscular, frecuencia cardiaca, presión sanguínea, frecuencia respiratoria y motilidad intestinal, preparando el organismo para la respuesta tipo “lucha o huída”(Cannon, 1929b)

El síndrome general de adaptación, descrito por Selye, es una respuesta del organismo a una situación novedosa que se divide en tres fases:

La primera fase, la que llamó de alarma, en que el organismo detecta una amenaza, activa un mecanismo para la resolución a través de liberación de adrenalina por la médula adrenal y también de GCs por la corteza adrenal, ayudando ambos a restaurar la homeostasis. A continuación de esta fase vendría la fase llamada de resistencia, por la que el organismo ya se encuentra preparado para hacer frente a la amenaza, reorientando la prioridad de algunas funciones fisiológicas más necesarias frente al peligro. La tercera fase corresponde a la fase de agotamiento donde el factor estresante persistiría, el organismo se agota y la respuesta adaptativa cae. En esta fase se pueden desarrollar enfermedades o incluso puede acontecer la muerte.

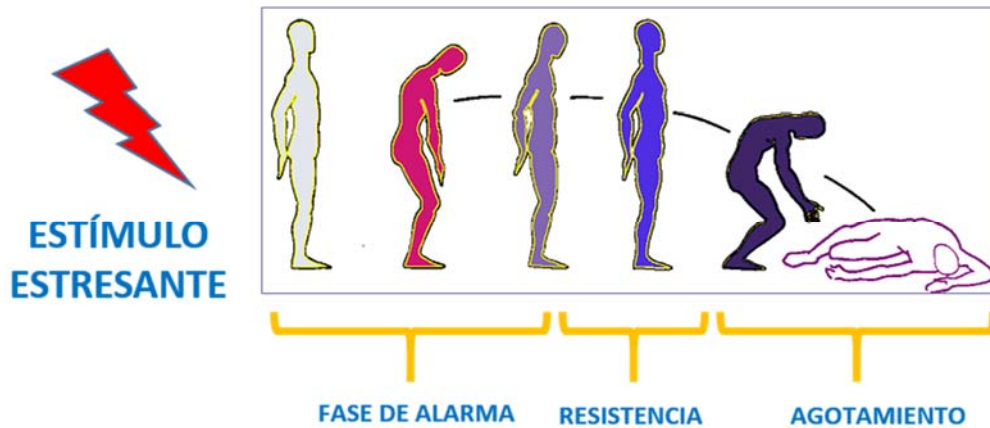


Fig. 1.- Esquema representativo de las Fases del estrés

No todos los tipos de estrés son necesariamente negativos o nocivos. Cuando el estrés es generado de forma breve, leve y controlada puede llegar contribuir al desarrollo intelectual y emocional de un individuo, y en muchos casos ser percibido como un estímulo placentero y excitante (“*eustress*”). En contrapartida, un estrés de mayor intensidad que presente una determinada duración podría suponer una amenaza no controlable, produciendo respuestas adaptativas deficientes (“*distress*”), pudiendo resultar en distintas patologías (Selye, 1976).

1.1.2 . Eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA)

El principio de una respuesta al estrés se da por la captación de estímulos estresantes desde las áreas sensoriales corticales del cerebro. A partir de ahí, esta información avanza hacia otras regiones cerebrales para su procesamiento. Las regiones de mayor relevancia son las cortezas cingulada y prefrontal, aunque también están implicadas el hipocampo y la amígdala que en la modulación de la respuesta al estrés pueden inhibir o activar las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo.

Una vez activadas las neuronas parvocelulares (PVN), secretan hormona liberadora de corticotropina (CRH) desde la eminencia media del hipotálamo al sistema venoso portal. La CRH alcanza la región anterior de la

hipófisis, o glándula pituitaria (Rock *et al.*, 1984; Dunn & Berridge, 1990), donde regula la expresión de proopiomelanocortina (POMC), un macropéptido que dará lugar a la hormona adenocorticotropa (ACTH), a beta endorfina y a la hormona estimuladora de melanocitos α (MSH) (Lightman & Young, 1988; rev. Cawley *et al.*, 2016)

Las neuronas paraventriculares también liberan arginina vasopresina (AVP) (Mouri *et al.*, 1993), que también es responsable por la liberación de ACTH, sin afectar a su síntesis. La ACTH a través del torrente sanguíneo llega a las glándulas suprarrenales donde actúa sobre las zonas *fasciculata* y *reticularis* de la corteza adrenal, para sintetizar glucocorticoides (GC), que serán secretados a la circulación sistémica (Axelrod & Reisine, 1984)

El glucocorticoide más representativo en humanos es el cortisol, siendo la corticosterona su análogo en roedores. Los glucocorticoides son las principales “hormonas del estrés” y pueden tener efectos a corto y también a largo plazo actuando sobre varias áreas cerebrales como el hipocampo o la corteza prefrontal (de Kloet *et al.*, 2005; Groeneweg *et al.*, 2011). Su síntesis y liberación están reguladas por un mecanismo de “*feedback*” negativo al eje HHA, lo que significa que cuando los GCs alcanzan niveles altos, inhiben por si mismos la secreción de CRH y ACTH en el hipotálamo y la hipófisis, respectivamente. (Cole *et al.*, 2000; Russell *et al.*, 2010). Esta retroinhibición también se ha descrito a nivel del hipocampo (Sapolsky *et al.*, 1984; Furay *et al.*, 2008) y de la corteza prefrontal (Hill *et al.*, 2011; Radley & Sawchenko, 2011).

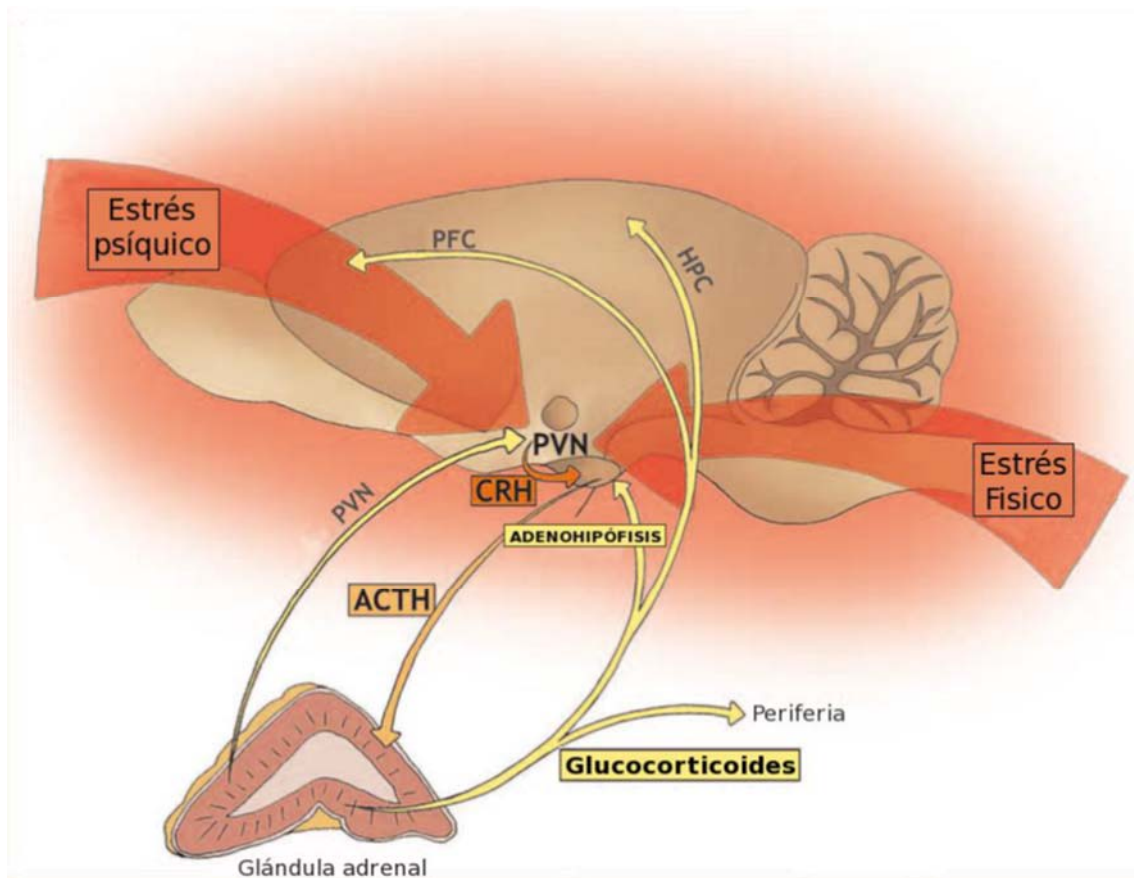


Fig.-. 2 Esquema representativo eje HHA y su mecanismo de regulación retroinhibitorio (imagen adaptada de Rebey y Worjaki, 2011.)

1.1.3 . Mediadores del estrés

Glucocorticoides y estrés:

Muchos son los mediadores implicados en la exposición al estrés, tanto en sistema nervioso central (SNC) como en la periferia (García-Bueno *et al.*, 2008a). Los principales mediadores del estrés son los GCs, de los que se conoce desde hace tiempo su potencial antiinflamatorio (Hench *et al.*, 1950), sobre todo en el sistema periférico. Recientemente se ha descrito que los GCs derivados de la exposición a estrés pueden tener efectos diferentes según el órgano diana, y al contrario de lo que se pensaba, en el SNC podrían ejercer efectos incluso proinflamatorios, siempre en función del tipo de estrés y su duración. Estos dos

perfiles de acción contrapuestos son conocidos como la “paradoja glucocorticoidea del estrés” (Sorrells *et al.*, 2009). Además, los GCs derivados de un estímulo estresante puede producir alteraciones en la expresión y liberación de mediadores inflamatorios tanto en periferia como en el SNC de forma independiente pero también de forma conjunta, regulando las propias interacciones neuroinmunes (Madrigal *et al.*, 2002b).

Como ha sido comentado anteriormente, los GC poseen un perfil antiinflamatorio e inmunosupresor a nivel sistémico, siendo su aumento un mecanismo endógeno de respuesta frente a diversos eventos inflamatorios como pueden ser el caso de enfermedades autoinmunes, alergias, sepsis, etc.). Por este motivo los GC sintéticos son prescritos para diversas patologías que tienen un componente inflamatorio crónico y exacerbado. Sus acciones antiinflamatorias son muy diversas, inhibiendo los mecanismos responsables de la activación de macrófagos, presentación de antígenos, migración y adhesión celular, activación de linfocitos B y T (Sorrells & Sapolsky, 2007).

En la actualidad, es creciente el número de estudios que describen el desarrollo de leucocitos resistentes al efecto de los glucocorticoides, especialmente en modelos murinos de estrés social y estrés crónico, esta resistencia tendría como consecuencia un aumento sistémico en el tráfico de células inmunes y al SNC, una vez que los GC (Weber *et al.*, 2017) no retendrían su efecto antiinflamatorio como respuesta temprana clásica.

Uno de los mecanismos de acción clásicos por los que los GC ejercen su función antiinflamatoria es el bloqueo de la vía del factor nuclear de transcripción kappa B (NF- κ B), bloqueando su unión al ADN al activar a los receptores para glucocorticoides tipo GR. Otro mecanismo complementario es producir un aumento en la expresión de la proteína inhibitoria del NF- κ B, I κ B (De Bosscher *et al.*, 2000; 2003).

En el SNC, los mecanismos de acción de los GCs son muy complejos y han sido implicados en la regulación de eventos tales como el aprendizaje, memoria, neurodegeneración, neuroinflamación, neurogénesis, y mecanismos de adaptación (McEwen *et al.*, 1999).

Un ejemplo de esta complejidad es el que tiene lugar a nivel de las neuronas del hipocampo, que expresan niveles elevados de GR y MR, resultando en una de las primeras dianas en respuesta a los GC (Jankord & Herman, 2008). Entre estos efectos, incluirían funciones fisiológicas mediadas por el MR y un aumento del GR observado al principio de una respuesta a un estímulo estresante (de Kloet, 2000). En un principio de la respuesta al estrés se percibe un incremento en expresión de GR, contribuyendo de forma positiva al prevenir la muerte neuronal, proporcionando mayor plasticidad sináptica, y mejorando el aprendizaje. Por otro lado el exceso en los niveles de GC, y alta ocupación de GR, en función de una exposición a un estímulo prolongado presenta un efecto deletéreo (Pavlidis *et al.*, 1996; Bremner, 1999).

Por lo tanto, los GC pueden presentar acciones diferentes según la duración del estímulo estresante. En un estímulo agudo, su liberación permite un incremento de la memoria, lo que ayuda al reconocimiento de situaciones futuras de peligro. No obstante, cuando este estímulo persiste durante más tiempo (una semana, por ejemplo), esta liberación sostenida puede atrofiar algunas neuronas del hipocampo, conllevando a un déficit de memoria del suceso estresante que permite la habituación y adaptación del organismo (McEwen, 2004).

Este patrón de respuesta podría explicar las diferencias interpersonales a las respuestas frente a los estímulos estresantes (Sapolsky, 2015).

Por otro lado, un daño en la función y estructura del hipocampo como propone la hipótesis de la cascada de los glucocorticoides, resultaría en una disminución de la expresión de GR en las neuronas de esta estructura, lo que implicaría un fallo en el control del feedback negativo del eje HHA, elevando los niveles de GC a largo plazo (Sapolsky, 1996), lo que podría producir disfunciones cognitivas, alteraciones de la plasticidad neuronal, disminución de la neurogénesis, densidad de las espinas y ramificaciones dendríticas (McEwen & Magarinos, 2001).

Este efecto deletéreo de los GC, ha sido demostrado también en pacientes depresivos, y en pacientes con síndrome de estrés post traumático (SEPT). En particular, a través de técnicas de neuroimagen, se ha podido relacionar la pérdida neuronal en el hipocampo y en otras áreas cerebrales en condiciones de

niveles elevados de GC con la duración y el grado de sintomatología depresiva en humanos (rev. Sapolsky, 1996).

La elevación en los niveles de GC puede ser observada en otras estructuras del cerebro (aunque no tan pronunciada), como por ejemplo la corteza, núcleos basales y estriado, afectando a la función neuronal en estas estructuras (Abraham *et al.*, 1997; Iyer *et al.*, 1998).

Otro de los mecanismos por los que los GC afectan negativamente el cerebro son su capacidad para inhibir la utilización de la glucosa por las células del SNC. Esto podría ocurrir de dos maneras: disociando el transportador de glucosa GLUT desde la membrana celular hacia al citoplasma (Horner *et al.*, 1987), y también a través de la inhibición transcripcional del gen de este transportador (Garvey *et al.*, 1989). Finalmente, los GC pueden producir muerte neuronal por excitotoxicidad al aumentar los niveles intercelulares del aminoácido excitador glutamato y alterar sus mecanismos de recaptación (Lowy *et al.*, 1994; Moghaddam *et al.*, 1994).

En resumen, el asumir un papel definitivo para los GCs es una aproximación simplista de la realidad, ya que al final dependerá de muchos factores, como el tiempo y magnitud de la exposición al estrés, la concentración alcanzada en los distintos órganos afectados, y los distintos mecanismos de acción dependientes implicados (Sorrells & Sapolsky, 2007).

Catecolaminas y estrés:

La activación del sistema nervioso simpático tras un estímulo estresante ocasiona la liberación de catecolaminas. En el SNC estas moléculas activan determinadas regiones del sistema límbico (amígdala, hipocampo, hipotálamo) e inhiben otras, como por ejemplo la corteza prefrontal (Aggleton *et al.*, 1992). En la amígdala ciertas catecolaminas, como la noradrenalina (NA), actúan sobre los receptores β -adrenérgicos potenciando la memoria, dando lugar a la rememoración de un evento estresante, como ocurre en pacientes con SEPT (Charney *et al.*, 1993). En corteza prefrontal, las catecolaminas liberadas tras estrés afectan a la atención, comportamiento y respuestas adecuadas frente a

cualquier situación (Goldman-Rakic, 1987; Winklewski *et al.*, 2017). La NA también está implicada en la respuesta al miedo y en el estado de alarma. Estudios en animales sugieren la activación de sistemas catecolaminérgicos en el estado de alerta, lo que también se observa en pacientes con SEPT (Abercrombie & Jacobs, 1987). Un incremento de la concentración de dopamina ocurre después de una situación de estrés, evento que coincide con la aparición de síntomas psicóticos en pacientes con SEPT (Hamner & Gold, 1998).

Las células inmunes son capaces de producir catecolaminas y a su vez de expresar receptores adrenérgicos, susceptibles a la acción de estas moléculas, tanto de manera autocrina como paracrina (Josefsson *et al.*, 1996; Qiu *et al.*, 2004). Las catecolaminas son responsables de su propia regulación, influyendo sobre la tirosina hidroxilasa y también en la distribución de sus receptores (Stanojevic *et al.*, 2013). Las células de origen linfocítico expresan principalmente receptores β -adrenérgicos, mientras que las células de origen mielocítico expresan tanto receptores α como β adrenérgicos (Padro & Sanders, 2014). El efecto resultante de una activación de los receptores β -adrenérgicos parece ser inmunosupresor, regulando la polarización de algunos tipos celulares a M2, un perfil considerado antiinflamatorio (Brown *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2013). Por el contrario, la activación de los receptores α parece presentar efectos más proinflamatorios (Spengler *et al.*, 1994; Grisanti *et al.*, 2011). Muchos son los estudios que apuntan que las catecolaminas ejercen un efecto mayoritariamente proinflamatorio a nivel central (Johnson *et al.*, 2005; Garcia-Bueno *et al.*, 2008b; Sorrells *et al.*, 2009), pero aun así, hay estudios donde se observan un posible perfil antiinflamatorio, como por ejemplo en el caso de los efectos de noradrenalina en la actividad glial en enfermedades neurodegenerativas a través del receptor β_2 , así como ocurre en periferia (Madrigal *et al.*, 2010; Gyoneva & Traynelis, 2013). Estos efectos coincidirían con que los efectos inmediatos del estrés pudieran ser proinflamatorios, una vez que el efecto de las catecolaminas es de acción más rápida que los GC.

1.2 . La excitotoxicidad y el estrés

Uno de los primeros eventos que ocurren en la respuesta general al estrés es la liberación al espacio extracelular de aminoácidos excitadores como el

glutamato y el aspartato en diferentes regiones del cerebro. (Moghaddam, 1993). La unión del glutamato con su receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) es responsable de una masiva entrada de calcio (Ca^{2+}) dentro de la célula, produciendo un proceso conocido como excitotoxicidad (Lipton, 1999; Lee *et al.*, 2002). Un exceso de la concentración de estos iones es responsable de la activación de señales provenientes de segundos mensajeros que median daño celular. Se ha observado que la entrada de Ca^{2+} estimula la actividad por un lado de enzimas que actúan en la degradación de fosfolípidos, ácidos nucleicos y proteínas, y por otro impide la producción de energía en forma de ATP (Sattler & Tymianski, 2000)

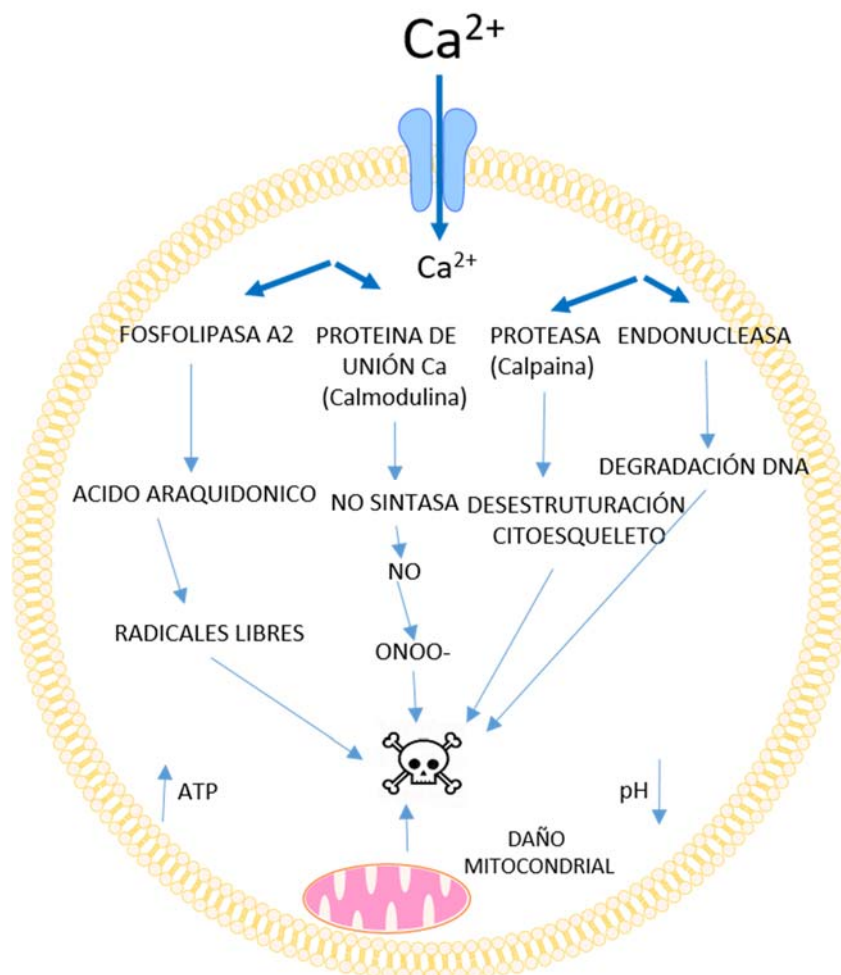


Fig.-3 Esquema representativo de la neurotoxicidad inducida por el aumento de Ca^{2+} intercelular, fig. adaptada de Sattler, R. & Tymianski, M. (2000).

Los GC liberados tras el estrés actúan en el proceso de excitotoxicidad a diferentes niveles:

1.- Provocan cambios en las subunidades de los canales de Ca^{2+} que pueden tener como consecuencia el aumento de la entrada de Ca^{2+} , inhibiendo su recaptación a través del intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ (McEwen & Sapolsky, 1995) y de la bomba $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPasa}$ (Bhargava *et al.*, 2000).

2.- Una liberación de glutamato en la hendidura sináptica se regula mediante un proceso parecido a un “aclarado”, evitando la activación en masa de los receptores NMDA y la potencial excitotoxicidad. Algunos estudios describen que, tras diferentes estímulos estresantes en respuestas a los GC, hay una disminución de la expresión de los transportadores EAAT-2 y EAAT-3 responsables de ese “aclarado” (Madrigal *et al.*, 2003a). También se ha descrito como en modelos animales de estrés se produce una inhibición de la recaptación del glutamato en una preparación *ex vivo* de sinaptosomas (Leza *et al.*, 1998).

3.- Otro efecto en respuesta a los GC es una caída de los niveles de adenosina trifosfato (ATP) en cerebro (Tombaugh & Sapolsky, 1992; De Cristobal *et al.*, 2001) Se ha demostrado que, tras estímulos estresantes, cuando ocurre esta disminución de ATP, tiene lugar una reversión de los transportadores de glutamato, produciendo un efecto contrario de la liberación, aumentando la excitotoxicidad. (Lawrence & Sapolsky, 1994; Jabaudon *et al.*, 2000; Rossi *et al.*, 2000b).

Todos los eventos anteriormente citados conducen a un aumento extracelular de los niveles de glutamato, que puede tener como consecuencia la muerte neuronal por excitotoxicidad. La desregulación glutamatérgica está involucrada en cambios morfológicos y funcionales de neuropatologías asociadas al estrés, como la depresión (Petty *et al.*, 1985; Grahn *et al.*, 2000; Zink *et al.*, 2010; Graybeal *et al.*, 2012; Sanacora *et al.*, 2012).

1.3 . Estrés y neuroinflamación

Los primeros estudios sobre los efectos del estrés en el sistema inmune sugirieron que un estímulo estresante podía producir inmunosupresión y que esto estaría relacionado con la susceptibilidad a que un organismo pudiera sufrir patologías infecciosas de naturaleza viral o bacteriana, donde los GC tendrían un efecto antiinflamatorio, frenando la activación del eje HHA, en respuesta a

una activación excesiva del sistema inmune (Rhen & Cidlowski, 2005). Después de muchos años estudiando el perfil antiinflamatorio de los GC, se observó que su papel no podría ser definido exclusivamente como tal, ya que se describieron situaciones y modelos de estrés en los que estos mediadores podrían realizar acciones predominantemente pro-inflamatorias (rev. Raison *et al.*, 2006).

La inflamación es una respuesta innata, que permite a un organismo reaccionar frente a infecciones o lesiones de diverso tipo. No obstante, cuando esta respuesta es excesiva en intensidad o duración puede llegar a ser deletérea. Este evento involucra varios mecanismos que se regulan por la interacción de mediadores de distinta naturaleza. Estas complejas interacciones resultan en un mecanismo no específico, caracterizado por la activación de respuestas de fase aguda como la fiebre, activación del eje HHA y un comportamiento “tipo depresivo” (conocido como “*sickness behaviour*”) que será explicado más adelante (Allan & Rothwell, 2003).

La respuesta inflamatoria que ocurre a nivel del SNC se conoce como neuroinflamación, aunque los estímulos que conllevan a este evento pueden ser tanto locales como periféricos. De la misma manera que una respuesta inflamatoria periférica, un proceso neuroinflamatorio descontrolado puede ser dañino sobre la estructura y función del SNC. De este modo, enfermedades tanto neurodegenerativas como neuropsiquiátricas cursan con neuroinflamación en su fisiopatología (García-Bueno *et al.*, 2008a). A este respecto, queda aún por determinar si la neuroinflamación es una causa o consecuencia de estas patologías. En cualquier caso, existe una concurrencia entre la neuroinflamación y las distintas alteraciones fisiopatológicas en el SNC.

La relación entre el estrés y el sistema inmune es bidireccional. De este modo, durante una infección, trauma o daño tisular el organismo libera de catecolaminas y GC como respuesta homeostática. Por otro lado, la exposición prolongada al estrés produce la liberación de mediadores proinflamatorios (García-Bueno *et al.*, 2008a). Durante los últimos años en el grupo de investigación donde se ha desarrollado esta Tesis Doctoral se ha podido demostrar que en modelos animales de exposición a estrés por inmovilización de duración variable en los se produce un aumento los niveles de GC también

tiene lugar una sobre-acumulación de mediadores inflamatorios como: citocinas, quimiocinas, factores nucleares como NF- κ B, enzimas proinflamatorias como iNOS y COX-2 y sus respectivos productos óxido nítrico (NO) y la prostaglandina inflamatoria PGE₂, (rev. Madrigal *et al.*, 2003a). En estudios posteriores utilizando un protocolo de estrés crónico leve o CMS (*chronic mild stress*) utilizado como modelo animal para el estudio de la depresión mayor, también se observó la puesta en marcha de una respuesta pro-inflamatoria en condiciones de hipercortisolemia (Garate *et al.*, 2011).

En todos estos modelos, la exposición en tiempo e intensidad a estos mediadores neuroinflamatorios podría explicar el daño celular que tiene lugar en diversas neuropatologías relacionadas con el estrés (Garcia-Bueno *et al.*, 2008a).

1.4 . Mediadores y mecanismos implicados en la neuroinflamación inducida por la exposición a estrés

1.4.1 . Citocinas

Las citocinas son uno de los mediadores inflamatorios más importantes tras la exposición a un evento estresante. Son moléculas bioactivas solubles, producidas por varios tipos celulares, como macrófagos y linfocitos en periferia, y astrocitos y microglia en el SNC. Su liberación podría regular diferentes respuestas tanto fisiológicas como comportamentales en el SNC: por ejemplo, actúan activando el eje HHA y el SNS, (Katsuura *et al.*, 1988), la hipertermia, nocicepción, reducción de la ingesta, exploración social, “*depressive-like symptoms*”, anomalías del sueño y déficits cognitivos (Kronfol & Remick, 2000).

Las citocinas producidas por los linfocitos T pueden tener dos perfiles diferentes: las producidas por los linfocitos tipo 1 (Th1) son las responsables de activar a otros tipos de linfocitos, células *Natural Killer* y macrófagos para amplificar la producción de citocinas como el interferón gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral (TNF- α) y la interleuquina-2 (IL-2). Por otro lado, los linfocitos tipo 2 (Th2) favorecen la inmunidad adquirida humoral, siendo responsables de

la producción de anticuerpos y de citocinas como las interleuquinas 4, 5, 6 y 10 (Kim & Maes, 2003).

Algunos estudios sugieren que la exposición a diversos tipos de estrés altera el balance Th1 / Th2. Concretamente, los GC y las catecolaminas por un lado potencian la respuesta Th2, activando la producción de citoquinas antiinflamatorias como interleuquinas 10, 4 (IL-10, IL-4) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), y por otro suprimen la respuesta de Th1, al inhibir la liberación de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , interleuquina-12 (IL-12) e IFN- γ (Raison & Miller, 2003). Estos efectos protegen al organismo del acúmulo de citocinas proinflamatorias liberadas principalmente por macrófagos (Raison & Miller, 2003).

Sin embargo, muchas evidencias complican la relación entre citocinas y estrés, ya que, cada vez más estudios relacionados con diferentes tipos de estrés (físico, psicológico y mixto) en roedores, primates y humanos muestran un aumento de los niveles plasmáticos de muchas citocinas de perfil proinflamatorio (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ) (Dunn *et al.*, 1999), lo que demostraría que el efecto aislado de las hormonas del estrés, podría ser diferente de cuando actúan junto a otros mecanismos, como pueden darse por la respuesta general al estrés, a la vez que depender del tipo de estímulo y de su duración.

Interleucina 1 beta (IL-1 β): es una citocina con un perfil proinflamatorio que presenta un papel fundamental en distintos modelos de neuroinflamación y en muchos procesos neurodegenerativos (Rothwell & Luheshi, 2000).

Muchos agentes estresantes pueden ser responsables de su inducción a nivel sistémico (Minami *et al.*, 1991; Nguyen *et al.*, 1998). Es una citocina “temprana”, responsable de orquestar la inducción de otras citocinas a posteriori, como IL-2, IL-6, TNF- α , que amplifican la respuesta inflamatoria (Lucas *et al.*, 2006). También es responsable de la producción de catecolaminas y GC (Nguyen *et al.*, 1998), y se ha visto involucrada en síntomas de depresión y déficits cognitivos inducidos por estrés (Maier & Watkins, 1998), ya que su administración exógena induce *sickness behaviour* (Dantzer *et al.*, 2008).

Interleucina 6 (IL-6): Es producida a nivel periférico y también en el SNC por la microglia, neuronas y astrocitos (rev. Erta *et al.*, 2012). En situaciones de inflamación local y sepsis, la IL-6 puede ser considerada un mediador clave

relacionado con la hipertermia (Chai *et al.*, 1996). El daño tisular, la exposición a estrés psicológico y físico también aumentan la producción de esta citocina, tanto en humanos como en roedores (Takaki *et al.*, 1994). Como otras citocinas proinflamatorias, la IL-6 está implicada en la activación del eje HHA a diferentes niveles: hipotálamo, glándulas adrenales y pituitaria, produciendo la liberación de GC (Busbridge & Grossman, 1991) y promoviendo una respuesta de fase aguda (Jones, 2005).

La IL-6 actúa como neuromodulador en el SNC, y es capaz de inhibir algunos componentes de la respuesta al estrés, como por ejemplo la ansiedad tras la exposición a estrés psicológico (Butterweck *et al.*, 2003), indicando que esta citocina tiene un papel complejo en lo se refiere al estrés, pues presenta efectos tanto beneficiosos como nocivos a nivel celular en el SNC.

Factor de necrosis tumoral (TNF α): es una citocina típicamente proinflamatoria que presenta dos isoformas α y β , siendo su isoforma α la más estudiada a nivel del SNC. Esta isoforma se ve elevada tras isquemia, trauma cerebral agudo y enfermedades neurodegenerativas (Wang & Shuaib, 2002).

En nuestro grupo de investigación se ha demostrado que la exposición a 30 minutos de estrés por inmovilización es capaz de aumentar la actividad de TACE (enzima convertidora de TNF α) en corteza prefrontal de rata, aumentando en consecuencia los niveles de TNF α (Madrigal *et al.*, 2002a). Se ha observado en estudios posteriores que el glutamato estaría regulando este aumento en los niveles de TNF α a través de su receptor NMDA (Madrigal *et al.*, 2002a)

El TNF α actúa sobre dos receptores funcionalmente diferentes. El receptor tipo 1 (TNFR-1) y el receptor tipo 2 (TNFR-2), que son responsables de vías de señalización distintas (Bazzoni & Beutler, 1996). La activación del TNFR-1 por el TNF α activa una vía de señalización directamente relacionada con procesos proinflamatorios, teniendo como consecuencia la translocación del factor de transcripción NF- κ B al núcleo y poniendo en marcha una respuesta inmune clásicamente proinflamatoria. Además, se ha reportado un aumento de la síntesis de TNFR-2 en modelos de depresión, relacionado con déficits cognitivos, memoria, atención y procesos de aprendizaje (Bobinska *et al.*, 2017).

1.4.2 . Vía del NF-κB

Un mediador clásicamente proinflamatorio implicado en una respuesta inmune tras un estímulo estresante es el factor de transcripción kappa B o NF-κB. El NF-κB es un heterodímero que presenta dos subunidades principales, p50 y p65, que se expresan en prácticamente todo en SNC. En un estado basal el NF-κB se encuentra en el citosol unido a su proteína inhibidora (IκB), en condición inactiva. La activación del NF-κB ocurre tras la fosforilación de IκB por las kinasas de IκB (IKK), cuando esto ocurre el IκB se degrada, y su subunidad p65 queda libre, translocándose al núcleo y uniéndose a regiones específicas de ADN responsables, principalmente, de la transcripción de genes implicados en el daño oxidativo/proinflamatorio, como puede ser los genes que codifican para los enzimas óxido nítrico sintasa inducible (NOS-2 o iNOS) y ciclooxigenasa en su isoforma 2 (COX-2).

En el grupo de investigación en el que se desarrolló esta tesis doctoral, se ha observado una activación y translocación al núcleo por parte de esta proteína tras un protocolo de estrés por inmovilización de 4 horas en cerebro de rata (Madrigal *et al.*, 2003a; Garcia-Bueno *et al.*, 2008a) Esta activación es dependiente de la activación del receptor TNFR1. Estudios posteriores relacionan la activación de NF-κB con la estimulación del receptor de inmunidad innata toll like receptor 4 (TLR-4) en modelos de estrés en roedores (Garate *et al.*, 2011) .

CICLOOXIGENASA 2 (COX-2): Las distintas isoformas de la ciclooxigenasa son responsables de la producción de los endoperóxidos PGG₂ y PGH₂ a partir del ácido araquidónico de membrana. Posteriormente, estas moléculas serán transformadas en los diferentes prostanoïdes por acción de enzimas prostaglandina sintasas específicas de tejido. Uno de los productos principales de las COXs, es la prostaglandina PGE₂, molécula con un alto potencial proinflamatorio en distintos procesos patológicos (Aid & Bosetti, 2011). Algunos estímulos como por ejemplo IL-1β o LPS, pueden inducir la producción de COX-2, que es considerada inducible menos en regiones del cerebro como la corteza prefrontal, hipotálamo o amígdala, donde su expresión es constitutiva (Hoffman

et al., 2000). La actividad COX-2 puede ser deletérea en cerebro, al formar altos niveles de PGE₂, que a su vez induce una alta liberación de glutamato provocando muerte celular por apoptosis en astrocitos (Takadera *et al.*, 2002), y generando también en consecuencia de su actividad especies reactivas de oxígeno que contribuyen al daño oxidativo/nitrosativo (Egan *et al.*, 1976). Tras un estímulo estresante, uno de los primeros estudios en este ámbito demostró un incremento de los niveles de ARNm de COX-2 en cerebro de rata, en un modelo de estrés por natación forzada (Yamagata *et al.*, 1993). El estrés también aumenta la expresión de COX-2 en el tracto gastrointestinal y miocardio (Nie *et al.*, 2004). En un modelo de inmovilización, nuestro grupo de investigación demostró un aumento de expresión y actividad de COX-2, en corteza tras 4-6 horas (Madrigal *et al.*, 2003b). La actividad de COX-2 se ve regulada por glutamato y por NF-κB. En estudios donde se administró un inhibidor de COX-2 (naproxeno), se ha podido observar que se producen alteraciones bioquímicas y comportamentales, esencialmente relacionadas con ansiedad, que se originan tras un modelo de estrés por inmovilización (Dhir *et al.*, 2006).

Óxido nítrico sintasa inducible (iNOS): peroxinitrito (ONOO⁻) y óxido nítrico (NO): Han sido descritas tres isoformas para esta enzima: sus isoformas endotelial (eNOS o NOS3) y neuronal (nNOS), ambas constitutivas, y la inducible (iNOS), que puede ser liberada por células inmunes y también por neuronas tras recibir estímulos como citocinas, LPS u otros agentes patógenos (Nathan & Xie, 1994). El NO es una molécula gaseosa, con una alta capacidad reactiva, que reacciona con moléculas como por ejemplo anión superóxido (O₂⁻) formando el peroxinitrito (ONOO⁻), que a su vez, es uno de los principales mediadores implicados en el estrés oxidativo, al producir peroxidación lipídica, un proceso citotóxico que conlleva a la muerte celular a través de la desestabilización y degradación de la membrana plasmática, liberando productos tóxicos en consecuencia de la degradación de fosfolípidos de membrana como el malonildialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (4-HNE), además de alterar proteínas y el ADN (Szabo, 2003). Estudios clásicos describen que tras la exposición a estrés hay un aumento de los niveles de NO y de sus metabolitos estables en el SNC y a nivel periférico (Leza *et al.*, 1998). Tanto los niveles como la actividad de iNOS se han visto aumentadas en estrés agudo por inmovilización

(seis horas) y también en estrés crónico (tres semanas, seis horas al día) (Olivenza *et al.*, 2000; Madrigal *et al.*, 2001a). En estrés, esta molécula también fue relacionada con una disrupción de la barrera hematoencefálica (BHE) y con una disminución de la función mitocondrial (Madrigal *et al.*, 2001b; Madrigal *et al.*, 2002b)

La expresión y actividad de iNOS, depende del NF- κ B, activado por la liberación de glutamato, y también por la acumulación de citocinas pro-inflamatorias como TNF α y IL1 β en distintos modelos de estrés (Madrigal *et al.*, 2002a; Pacher *et al.*, 2007).

1.4.3 . Estrés oxidativo y vía antioxidante

Hasta la fecha, numerosos estudios han sugerido el importante papel del estrés oxidativo en la patogénesis y progresión de la depresión mayor y otras patologías neuropsiquiátricas (Eren *et al.*, 2007), (Halliwell, 2006).

El estrés oxidativo es el resultado del desequilibrio entre los niveles de especies reactivas de nitrógeno y de oxígeno (RNS/ROS) y los sistemas antioxidantes endógenos. En condiciones fisiológicas, estas moléculas son también señalizadoras de proliferación, supervivencia celular, diferenciación y apoptosis (Droge, 2002), pero su exceso resulta en el estrés oxidativo, teniendo como resultado el daño neuronal. Mediadores inflamatorios como COX-2 e iNOS y algunas moléculas de adhesión están asociadas al estrés oxidativo por la generación de ROS. Sin embargo, la mayor producción de ROS es generada a partir del metabolismo mitocondrial dependiente de oxígeno, principal fuente de ATP en la célula. Tal evento sucede cuando este oxígeno no es reducido a moléculas de agua para generar el gradiente de protones necesario para la síntesis de ATP, y es reducido parcialmente convirtiéndose en el anión superóxido, radical altamente reactivo con potencial oxidante. El cerebro, al tener un alto consumo de oxígeno es altamente sensible a la producción endógena de ROS por este mecanismo, y por ende al estrés oxidativo, siendo el principal objetivo la gran cantidad lípidos que posee.

El cerebro cuenta con dos líneas de defensa contra las RNS/ROS, una mediada por enzimas antioxidantes y otra por moléculas de bajo peso molecular. Las principales enzimas antioxidantes incluyen a la superóxido dismutasa 1 ó citosólica (SOD-1) dependiente de Cu y Zn, SOD-2 o mitocondrial dependiente de Mn, glutatión peroxidasa y catalasa. Las dos primeras se encargan de la conversión del anión superóxido a peróxido de hidrógeno, mientras que las dos últimas convierten el peróxido de hidrógeno en moléculas de agua.

La línea de defensa mediada por moléculas de bajo peso molecular está formada principalmente por el glutatión, ácido ascórbico, ácido úrico y melatonina. El glutatión en su forma reducida es el antioxidante no enzimático más importante, y éste en el momento de reaccionar y convertirse en su forma oxidada es regenerado por la enzima glutatión reductasa (GR)(Salim, 2017)

La síntesis de las enzimas antioxidantes es dependiente de la activación del Factor Nuclear tipo 2 (derivado de eritroide) (Nrf2). El Nrf2 es un factor de transcripción que pertenece a la familia “*Cap'n'collar*” con estructura de cremallera de leucina con un importante papel en la eritropoyesis (Chan et al., 1996). Su mecanismo de protección celular frente a mediadores oxidativos que comprometen la integridad celular le aporta un papel protector antioxidante en condiciones de respuesta inmune crónica, como la descrita en las patologías del SNC.

La presencia de RNS/ROS es responsable de la inducción rápida de Nrf2, que se encuentra a niveles basales inactivo en citoplasma y unido a su principal inhibidor, la proteína asociada a ECH tipo-Kelch 1 (Keap-1) que forma homodímeros capaces de conectar su dominio Kelch C-terminal al Neh2 N-terminal de Nrf2 (Itoh *et al.*, 1997). Existen diversas teorías acerca del mecanismo bioquímico por el que se produce la disociación entre Nrf2 y Keap-1 para permitir la acción de Nrf2 en el núcleo (Dinkova-Kostova *et al.*, 2002; Levonen *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2014). La autorregulación del sistema Keap-1/Nrf2 parece estar controlada por retroalimentación negativa en la expresión de sus componentes (Kaspar & Jaiswal, 2010), la habilidad de Keap-1 para translocar al núcleo y degradar a Nrf2 y la inducción de genes del proteasoma (Ma, 2013).

Tras este evento Nrf2 se transloca al núcleo, uniéndose a la secuencia consenso conocida como elemento de respuesta antioxidante (ARE por sus siglas en inglés), 5'-TGACnnnGC-3' (n = cualquier base), presente en los promotores de genes de detoxificación, antioxidantes y antiinflamatorios, como NAD(P)H quinona deshidrogenasa 1 (NQO-1), superóxido dismutasa 2 (SOD-2), glutatión reductasa (GSR) y catalasa (Itoh *et al.*, 1997) (Tanigawa *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 2009).

Pero este factor de transcripción presenta una regulación aún más compleja. La proteína desglucasa DJ-1 (o PARK7) activa a Nrf2 y, a su vez, es inducida por los oxidantes. Esta proteína tiene una función protectora en la célula debido a que actúa como un sensor de oxidantes, incluyendo las ROS, mediante los grupos tioles presentes en su sitio catalítico (Wilson, 2011). La actividad de DJ-1 como sensor redox permite a su vez regular positivamente a Nrf2, evitando su unión con Keap1 y su posterior degradación. Una alta actividad de DJ-1 incrementa los niveles de enzimas antioxidantes. (Clements *et al.*, 2006b; Wilson, 2011).

Por otra parte, las ROS pueden ser responsables de la activación de una respuesta inflamatoria en el SNC, a través de la activación de factores de transcripción como NF- κ B y AP-1 (Valko *et al.*, 2007). La translocación de NF- κ B al núcleo, como ya ha sido citado, es responsable de la expresión de mediadores proinflamatorios, amplificando aún más el ambiente perjudicial para las células. Algunos estudios describen que la unión del NF- κ B al ADN podría modular el estado redox de la célula (Nishi *et al.*, 2002).

El Nrf2 presenta por lo tanto una relación contrapuesta con la vía de señalización proinflamatoria de NF- κ B (Liu *et al.*, 2008; Nair *et al.*, 2008). Uno de los mecanismos que se ha relacionado con el papel neuroprotector atribuido al Nrf2 es a través del receptor activado por proliferadores de peroxisomas *gamma* (PPAR- γ), que inhibe la respuesta inflamatoria y su toxicidad asociada (Ricote *et al.*, 1998) a través de la 15-deoxi-12,14-prostaglandina J₂ (15d-PGJ₂), su agonista endógeno, que es a su vez producida por deshidratación no enzimática a partir de la prostaglandina D₂, producto derivado de la actividad de las

ciclooxigenasas 1 y 2 (COX-1, COX-2), siendo la COX-2 inducida por el factor proinflamatorio NF- κ B.

1.4.4 . Vía receptor *toll-like*

La inmunidad innata es la primera línea de defensa del organismo frente a los patógenos, estando altamente conservada a nivel filogenético. Los receptores toll-like (TLR), principales reguladores del sistema inmune innato, forman parte de la familia de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Esta familia consta de varios miembros, habiendo sido descritos en mamíferos 10 subtipos (TLR-1 al TLR-10) (Beutler & Rietschel, 2003). En general, reconocen patrones moleculares específicos asociados a patógenos (PAMPs) (rev. Takeda *et al.*, 2003) y también diversos ligandos endógenos liberados en consecuencia a daño tisular, denominados patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) o alarminas (Seong & Matzinger, 2004). El SNC es capaz de organizar respuestas inmunes innatas contra infecciones o daño celular a través de la activación de los TLRs (Bsibsi *et al.*, 2002). De hecho, el subtipo TLR-4 está altamente expresado en microglia, las células inmunes residentes en el SNC (Lehnardt *et al.*, 2003). Además, las neuronas (Tang *et al.*, 2008) astrogliia (Jou *et al.*, 2006), oligodendroglia (Kigerl *et al.*, 2007), y el endotelio vascular cerebral también expresan TLR-4, aunque en menor medida (Nagyoszi *et al.*, 2010; rev. García Bueno *et al.*, 2016). A pesar de que muchos tipos celulares expresen receptores de inmunidad innata es sabido que su expresión es mayor en regiones que carecen de BHE (área postrema, eminencia media, órgano subfornical) y en meninges y el plexo coroideo (Lacroix *et al.*, 1998; Laflamme & Rivest, 2001). Su activación en estas zonas podría regular las interacciones entre sistema inmune y SNC, ya que su activación directa por estímulos periféricos podría resultar en la expresión de mediadores pro-inflamatorios que activan la microglia, amplificando las señales características de la inflamación (Dantzer *et al.*, 2008) y causando estrés oxidativo y daño celular principalmente en neuronas (Block & Hong, 2007).

Toll like 4 (TLR-4), fue el primer receptor que se describió en humanos, siendo identificado como el receptor para el LPS (Takeuchi & Akira, 2001), componente de la membrana de bacterias Gram negativas (Gram -). Otros ligandos también presentan afinidad por este receptor, como por ejemplo las proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*, HSP) 60-70 (HSP60-70), el fibrinógeno, y la proteína de caja de grupo de alta movilidad 1 (HGMB-1) (Piccinini & Midwood, 2010). La implicación de los DAMPs en el proceso llamado "inflamación estéril" respalda la idea de considerar al TLR-4 como un receptor centinela que se activa por algunas señales de peligro / daño en ausencia de patógenos (Mollen *et al.*, 2006).

En concreto, es el lípido A la región endotóxica de la molécula de LPS que activa la señalización dependiente por TLR-4 (Poltorak *et al.*, 1998). El LPS circulante es capturado por la proteína de unión LPS (LBP) y el dímero resultante se une a una tercera proteína llamada cluster de diferenciación 14 (CD14), que está presente en la membrana de células inmunes innatas o en plasma en su forma soluble (Tobias *et al.*, 1995). Una función para CD14 es el transporte de TLR-4 a las regiones ricas en quinasas en los "lipid raft", amplificando su señalización (Triantafilou *et al.*, 2002).

El siguiente paso es el reclutamiento del co-receptor factor de diferenciación mieloide-2 (MD-2) (Shimazu *et al.*, 1999). La unión con MD-2 es fundamental para facilitar la translocación de TLR-4 a la membrana celular (Nagai *et al.*, 2002). Una vez estimulado, el complejo TLR-4 / MD-2 es endocitado, en un mecanismo que controla la respuesta inflamatoria, evitando que sea excesiva, (Fujihara *et al.*, 2003) ya que una sobreactivación de esta vía podría conllevar a shock séptico. Cuando CD14 / TLR-4 / MD-2 se asocia con LPS, se pueden activar dos rutas de señalización alternativas (da Silva Correia *et al.*, 2001) una dependiente y otra independiente de MyD88.

VÍA TLR-4

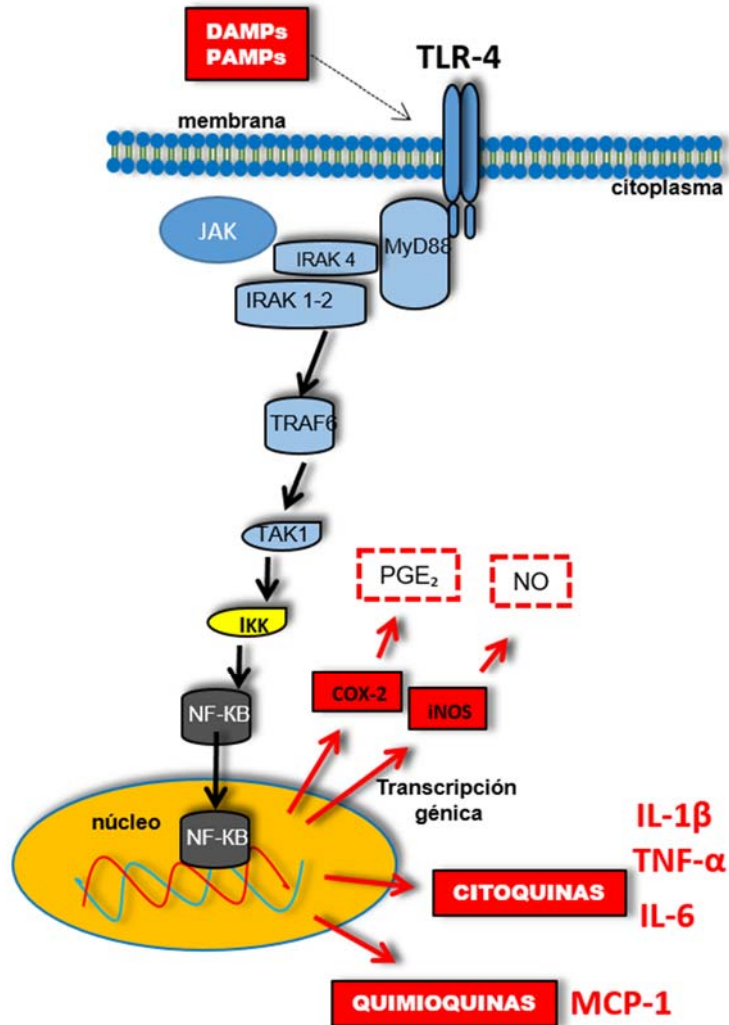


Fig.-4 Vía de señalización inflamatoria dependiente de TLR-4.

Por otro lado, cabe señalar lo complejas que pueden llegar a ser las relaciones moleculares que involucran esta señalización, ya que han sido descritos polimorfismos de respuesta negativa a la señalización al LPS (Ohto *et al.*, 2012). También se ha demostrado la existencia de ciertas moléculas derivadas del lípido A como por ejemplo el lípido IVa y eritodan, que presentan un efecto antagonista como consecuencia de presentar modificaciones estructurales específicas (Ohto *et al.*, 2007; Shirey *et al.*, 2013). También ha sido descrito que algunos tipos de LPS en función de una diferenciación en el grupo

acilo de su estructura molecular podrían actuar antagonizando la señalización a consecuencia de una formación errónea del complejo de reconocimiento (Erridge *et al.*, 2004; Triantafilou *et al.*, 2004; Popa *et al.*, 2007).

Vía dependiente de MyD88:

TLR-4 se une a la proteína adaptadora MyD88 a través de su dominio citoplásmico TIR (receptor de interleuquina 1 (IL-1)) y luego recluta la quinasa IRAK4 asociada al receptor de IL-1. IRAK4 se une y activa el factor 6 asociado al receptor de TNF (TRAF6). Esta triple asociación es llamada Complejo 1 (Cao *et al.*, 1996).

El complejo 1 es disociado de TLR-4 y recluta un grupo de proteínas: TAK-1 (quinasa relacionada con TGF α) y TAB (proteína de unión a TAK1) 1-3, que constituyen el complejo-2. Las interacciones entre estas proteínas producen la fosforilación de algunas de ellas, lo que permite la activación de dos posibles vías secundarias:

1. TAK-1 fosforilada activa IKK (complejo I κ B quinasas), que fosforila las proteínas I κ B (inhibidor de NF- κ B), induciendo su degradación a través del proteosoma y permitiendo la translocación de NF- κ B al núcleo (Delaney *et al.*, 2006). NF- κ B regula la expresión de genes que codifican proteínas proinflamatorias, como COX-2 e iNOS o las citocinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α .

2. TRAF6 produce la activación de las proteína-quinatas activadas por mitógeno (MAPK): ERK1/2, p38 y JNK a través de su fosforilación. Las MAPK son capaces de regular la activación del factor de transcripción proinflamatorio denominado proteína activadora-1 (AP-1) (Plotnikov *et al.*, 2011).

Otras Vías independientes de MyD88:

Diferentes proteínas adaptadoras desencadenan una transducción de señales independiente de MyD88, que son, TRAM (molécula asociada al receptor toll) y TRIF (Activador de interferón asociado al receptor toll). Estas dos proteínas adaptadoras dimerizan de diferentes maneras, teniendo como consecuencia la activación de distintas vías de señalización:

A través de la formación del heterodímero TRAM-TRIF: activando la vía de señalización TRAF6-TAK1-IKK, etc., como ya ha sido descrito.

A partir de la formación del homodímero TRIF-TRIF: la activación del factor de regulación del interferón 3 (IRF3), a través de la quinasa TBK1, que activa la producción de interferón 1 (IFN1) y más concretamente su isoforma β , activando el factor de transcripción transductor de señal (STAT)), caspasas y moléculas co-estimuladoras (rev. García Bueno *et al.*, 2016).

1.4.5 . Mediadores antiinflamatorios

No todos los mecanismos activados por un estímulo estresante tienen características proinflamatorias. En respuesta a estrés se pone en marcha un mecanismo de carácter antiinflamatorio derivado de la activación de COX-2 que consiste en la síntesis y liberación del mediador 15-deoxi-prostaglandina J₂, principal ligando endógeno de los receptores nucleares activados por los proliferadores de peroxisoma γ (PPAR γ). Estos receptores participan directamente en la regulación de la respuesta inflamatoria en diversos modelos de patologías del SNC (Feinstein, 2003; Shie *et al.*, 2009; Sodhi *et al.*, 2011), y tras la exposición a estrés, poniendo en marcha mecanismos antiinflamatorios, antioxidantes, antiexcitotóxicos y pro-energéticos (García-Bueno *et al.*, 2008a)

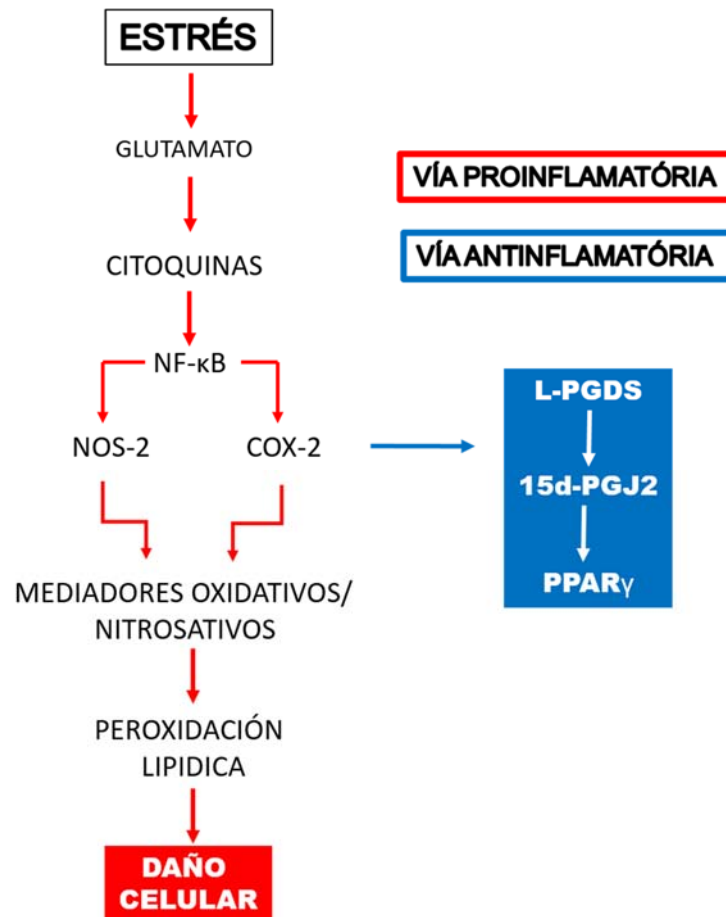


Fig.-5. Esquema de las vías proinflamatorias y antiinflamatorias puestas en marcha en el SNC tras la exposición a estrés agudo, figura adaptada de Garcia-Bueno, B, 2008.

1.5 . Comunicación bidireccional entre el sistema inmune y SNC

El SNC y el sistema inmune periférico están en comunicación constante e influyen en la forma en que los que uno y otro responden a un estímulo estresante. La exposición prolongada al estrés interrumpe la comunicación homeostática, es decir “un estado sano”, entre el SNC y el sistema inmunitario periférico, lo que conduce a la señalización inmune hacia un estado proinflamatorio. Parte de esta respuesta incluye una señalización proinflamatoria elevada y prolongada en el SNC, que varios autores han relacionado con trastornos psiquiátricos relacionados con el estrés (Miller & Raison, 2016). Esta relación está también basada en la observación de que la activación de moléculas de señalización proinflamatorias interactúan con mecanismos

neurales que median cambios en el estado de ánimo, la cognición y la fisiología y que funcionan como una defensa adaptativa del individuo contra infección o lesión (Dantzer *et al.*, 1998; Maier & Watkins, 1998).

Uno de los efectos provocado por el estrés está relacionado con un aumento en la permeabilidad de la BHE en determinadas zonas del SNC, permitiendo un eventual paso de moléculas que en condiciones fisiológicas no ocurriría (Madrigal *et al.*, 2002b). Mediadores como citocinas proporcionan un estímulo inflamatorio sostenido, al actuar sobre el eje del estrés estimulando la producción de CRF y consecuentemente desregulando el eje HHA a través de su acción sobre los GR (Raison *et al.*, 2006).

Merece la pena indicar que el estrés también induce una disfunción intestinal, abriendo las uniones intercelulares estrechas epiteliales del intestino, permitiendo el paso de moléculas al torrente sanguíneo como el LPS bacteriano, que representarían otro mecanismo más propuesto para la comunicación entre periferia y SNC tras la exposición a estrés (Ponferrada *et al.*, 2007; Samak *et al.*, 2010).

1.6 . Efecto del estrés en células inmunes periféricas (tráfico de células inmunes)

Como ya se comentó anteriormente una característica de la respuesta al estrés es la activación del sistema nervioso simpático (SNS). Las fibras nerviosas simpáticas inervan el tejido linfoide inmune periférico que incluye el timo, el bazo, los ganglios linfáticos y la médula ósea (BM), proporcionando así una vía de señalización directa para regular los procesos inmunes periféricos (Felten *et al.*, 1985). La activación del SNS inducida por el estrés provoca la liberación directa de catecolaminas en estos órganos inmunes, que actúa sobre los receptores para NA expresados por las células inmunes periféricas produciendo respuestas funcionales que influyen en su desarrollo, fenotipo inflamatorio y capacidad migratoria (Bierhaus *et al.*, 2003; Nance & Sanders, 2007; Grisanti *et al.*, 2010). Una activación prolongada o repetida del SNS, como tiene lugar en la exposición a estrés crónico, promueve la producción en la BM y liberación de células

mieloides, incluidos monocitos y granulocitos (CD11b⁺, CD45^{hi}, Ly6G⁺) (Dhabhar *et al.*, 2012; Hanke *et al.*, 2012). Estos monocitos tienen un perfil "proinflamatorio" porque son capaces de circular por todo el cuerpo, entrar en el tejido afectado y convertirse en células efectoras gracias a su alta capacidad para liberar citocinas proinflamatorias. En nuestro contexto, esto es muy relevante, ya que el tráfico de monocitos inflamatorios inducido por el estrés contribuye al deterioro de las condiciones físicas y mentales de un individuo (Dutta *et al.*, 2012; Hanke *et al.*, 2012; Seifert *et al.*, 2012; Wohleb *et al.*, 2013; Heidt *et al.*, 2014; Wohleb *et al.*, 2014a).

La población de monocitos que son inducidos por el estrés crónico son menos maduros y más inflamatorios que los monocitos "homeostáticos". Los monocitos recientemente diferenciados expresan altos niveles del marcador de monocitos Ly6C (Ly6Chi) (Rose *et al.*, 2012) y presentan una gran capacidad para desencadenar procesos proinflamatorios, incluida una potente capacidad fagocítica y una mayor secreción de especies reactivas de oxígeno (ROS), NO y citocinas proinflamatorias (Weber *et al.*, 2017). Estas células también son positivas para el receptor de quimiocina C-C tipo 2 (CCR2), que detecta a la quimiocina CCL2 para regular el tráfico celular al tejido inflamado (Audoy-Remus *et al.*, 2008). Este tipo de monocitos tiende a reducir la expresión de Ly6C^{low} y CCR2 a medida que se diferencian hacia un fenotipo antiinflamatorio, contribuyendo a la reparación de los tejidos. Esto incluye una expresión aumentada del receptor de fractalquina (CX3CR1) y la secreción de moléculas antiinflamatorias tales como IL-10 (Auffray *et al.*, 2007).

El estudio del tráfico de monocitos de perfil inflamatorio en el cerebro es de extrema relevancia una vez que diversos estudios demostraron que estos se diferencian en macrófagos (CD11b⁺CD45^{hi}) en cerebro, promoviendo una amplificación de la señalización inflamatoria (Brevet *et al.*, 2010; Wohleb *et al.*, 2011; Ataka *et al.*, 2013; Wohleb *et al.*, 2013; Sawada *et al.*, 2014; Wohleb *et al.*, 2014a).

Regulación del tráfico de células inmunes por señalización en la BHE:

El reclutamiento de leucocitos al SNC puede ser un evento modulado por las células endoteliales vasculares que comprenden la BHE. El reclutamiento

de leucocitos al SNC es un proceso de pasos múltiples que se regula mediante la expresión de moléculas de superficie adherentes en los leucocitos y en las células endoteliales (Ransohoff *et al.*, 2003).

El primer paso para este evento consistiría en la captura de leucocitos en la superficie de las células endoteliales. Esto ocurre a través de la expresión de las moléculas de captura L-selectina y ligando 1 de la glicoproteína P-selectina (PSGL1) en los leucocitos, y selectina E y P en la superficie luminal de las células endoteliales. El contacto entre los leucocitos y las células endoteliales permite el tráfico de leucocitos. En este punto, la activación de los leucocitos mediante quimioquinas inicia la reubicación y los cambios conformacionales de las integrinas, el antígeno 1 asociado a la función de linfocito (LFA-1) y el antígeno 4 muy tardío (VLA4), que forman sitios de unión de alta afinidad para la adhesión firme a las células endoteliales (Kim *et al.*, 2003). El eje quimiotáctico CCL2-CCR2, en particular, está implicado en la infiltración mediada de leucocitos en el SNC en muchos estados patológicos, que incluyen encefalitis por VIH (Eugenin *et al.*, 2006), isquemia (Dimitrijevic *et al.*, 2006), y estrés (Wohleb *et al.*, 2013). A continuación, las interacciones dinámicas entre las integrinas y las moléculas de adhesión celular (CAM), la CAM intercelular (ICAM) y la CAM vascular (VCAM) detienen al leucocito en la superficie de la célula endotelial. Una vez que el leucocito se ha detenido en la superficie endotelial, se pueden polarizar y migrar a través de mecanismos estrechamente regulados por integrinas/CAM para entrar en el espacio perivascular (Greenwood *et al.*, 2011). Por lo tanto, si la exposición a factores estresantes aumenta la expresión de moléculas de adhesión, esto promovería el tráfico de células inmunes circulantes al SNC (Weber *et al.*, 2017).

Además del papel de las células endoteliales de BHE para "atrapar" y reclutar células inmunes periféricas en el cerebro, un concepto interesante es que la BHE retransmite la señalización inflamatoria de la circulación al SNC. Por ejemplo, las células endoteliales de BHE expresan receptores clave de citocinas (IL-1R1, IL-6, receptores de TNF α) y la unión de estos receptores conduce al transporte o secreción de citocinas proinflamatorias adicionales y mediadores secundarios (prostaglandinas) que propagan la señalización inflamatoria hacia el SNC (Bebo & Linthicum, 1995; Ericsson *et al.*, 1995; Vallieres & Rivest, 1999).

Después de la activación por las citocinas, la microglia residente secreta más citocinas proinflamatorias todavía, pudiendo influir directamente en las vías neuronales e incluso el comportamiento (Quan & Banks, 2007). Este evento atribuye a la microglia un papel muy relevante en el tráfico de células inmunes, una vez que es activada tras la exposición al estrés, al amplificar la señalización de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α , IL-6) y quimioquinas (CCL2) (Wohleb *et al.*, 2012), proporcionando así una vía reguladora directa de las moléculas de adhesión.

Otro aspecto a tener en cuenta es que algunos estudios evidencian que la expresión de moléculas de adhesión de células inmunes (CAM) se produce en regiones cerebrales específicas después de la exposición estrés. Por ejemplo, ICAM-1 y VCAM-1, moléculas de adhesión consideradas marcadores de tráfico celular (monocito) tempranos a nivel vascular, se incrementaron en las células endoteliales en el PFC y PVN después de estrés social (Sawicki *et al.*, 2015). De manera similar a los patrones de tráfico de macrófagos (Wohleb *et al.*, 2013), el aumento de CAM-1 y VCAM-1 se correlacionaron regionalmente con activación neuronal y glial dentro de regiones cerebrales sensibles al estrés. Estos datos sugieren que una relación neuronal-glial-endotelial, en regiones específicas del cerebro podría facilitar del tráfico de células inmune en un mecanismo dependiente de expresión de estas moléculas de adhesión (CAM's) a nivel neurovascular. Estas dinámicas son importantes porque la presencia de estos monocitos / macrófagos infiltrados ha sido directamente implicada en la patogénesis de patologías neuropsiquiátricas relacionadas con el estrés, como por ejemplo la depresión, como ha sido citado anteriormente. (Beumer *et al.*, 2012; Torres-Platas *et al.*, 2014).

Resistencia a GC:

Algunos tipos de estrés social conllevan la diferenciación de monocitos que son insensibles a los GC. Los niveles de GC elevados es uno de los mecanismos por los que el estrés inhibe los procesos inflamatorios al reducir la viabilidad de las células inmunitarias (Coutinho & Chapman, 2011).

La resistencia a GC probablemente esté mediada por la pérdida de retroalimentación antiinflamatoria del receptor GR para GC. Típicamente,

cuando los GC se unen a sus receptores, estos se traslocan al núcleo para activar los elementos sensibles a los glucocorticoides (GRE). Los GRE activados promueven efectos antiinflamatorios mediante la inhibición del factor de transcripción proinflamatorio NF- κ B y la transcripción de moléculas de señalización antiinflamatorias (De Bosscher *et al.*, 2003). La translocación del receptor de GC está alterada en los esplenocitos después un estímulo por estrés social (Quan *et al.*, 2003), reduciendo así la capacidad de los GC para inhibir la transcripción dependiente de NF- κ B.

Se tiende a generalizar la respuesta mielopoyética a todos los modelos de estrés crónico en roedores. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el "estrés" no produce una respuesta homóloga a través de mecanismos comunes entre todos los tipos de estrés. Por ejemplo, varios estudios investigaron la respuesta inmune al estrés crónico por restricción de movimiento y reportaron una disminución de la función de las células asesinas naturales (NK), secreción de citocinas y replicación viral mejorada (Hunzeker *et al.*, 2004; Tseng *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2013). Los efectos inmunes opuestos sobre las células mieloides entre estrés social y la restricción crónica pueden explicarse por las diferencias en los GC circulantes. De este modo, en algunos modelos de estrés social, el estímulo es realizado justo antes del ciclo de oscuridad lo que produce un aumento importante en los GC circulantes, pero que baja sus niveles basales unas pocas horas después de la aplicación del estímulo, sin afectar su ritmo circadiano de síntesis.

Muchos estudios citados en este apartado evidencian de que el tráfico de leucocitos con un perfil proinflamatorio al cerebro en modelos de estrés e inflamación periférica promueve resultados conductuales negativos, en el estado de ánimo y el comportamiento, como "sickness behaviour" y ansiedad, pudiendo ser un evento clave en el eje de la señalización inmune al cerebro, haciéndose necesario elucidar los diferentes componentes que pudieran estar implicados en el tráfico inmune celular. (D'Mello *et al.*, 2009; Hasegawa-Ishii *et al.*, 2013; Sawada *et al.*, 2014).

1.7 . Papel de los macrófagos perivasculares (PVM)

Existe una evidencia creciente indicando que las células del sistema inmune innato, como las células mieloides, desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis cerebral y en los mecanismos fisiopatológicos de las enfermedades del SNC (Engelhardt *et al.*, 2017; Herz *et al.*, 2017; Prinz *et al.*, 2017). Gran parte de la investigación en esta área se ha centrado en la microglía, células mieloides residentes del cerebro, que han sido implicadas en una amplia variedad de procesos en el desarrollo, la función y la enfermedad del cerebro (Saijo & Glass, 2011). Sin embargo, se sabe mucho menos sobre otras células inmunes innatas que residen en el cerebro, como los macrófagos perivasculares (PVM). Los PVM son células mieloides ubicadas en el compartimiento perivascular que rodea las arterias y venas, ya que penetran profundamente en el tejido cerebral (espacio perivascular o espacio de Virchow-Robin). Aunque las células mieloides asociadas a los vasos sanguíneos cerebrales se han descrito durante varias décadas, su origen, identidad de linaje y función no se han dilucidado completamente.

Los PVM presentan una morfología alargada o ameboide con procesos de ramificación que envuelven a los vasos sanguíneos en los que residen. Los PVM poseen capacidad fagocítica constitutiva (Kida *et al.*, 1993) y expresan numerosos marcadores de activación como MHC tipo II de superficie que se encuentran típicamente en los macrófagos periféricos. Aunque a un ritmo reducido, en condiciones basales, son continuamente reemplazados por monocitos sanguíneos, que como se verá más adelante, se caracterizarán por tener un origen diferente. Después de la estimulación inflamatoria, su tasa de reposición aumenta sustancialmente. Estas células son parte estructural de la BHE, jugando un papel importante en la comunicación del sistema inmune al cerebro, al transmitir y modular señales inflamatorias periféricas al cerebro (Williams *et al.*, 2001a; Kongsman *et al.*, 2007).

En 1988, Hickey y Kimura describieron unas células perivasculares, a las que denominaron "células microglías perivasculares", derivadas de la médula ósea (BM) y capaces de presentar antígenos a los linfocitos. Estas

células, positivas para la glicoproteína ED2 de la superficie celular, mostraron una forma alargada y una ubicación alrededor de los vasos sanguíneos cerebrales (Hickey & Kimura, 1988). Otras células con características similares también se encontraron en asociación con las leptomeninges. Sin embargo, Graeber et al. sugirieron que estas células perivasculares ED2 + eran distintas de la microglia, que no son positivas para ED2 (Graeber *et al.*, 1989). Después de la purificación y secuenciación, el antígeno ED2 se identificó como CD163, una glicoproteína de membrana que pertenece al grupo B de la superfamilia rica en cisteína del receptor *scavenger* (SRCR), que funciona como receptor de alta afinidad para el complejo hemoglobina-haptoglobina (Fabriek *et al.*, 2005). Las células CD163+ también fueron positivas para el marcador fagocítico CD68 y negativas para la actina del músculo liso, lo que confirma que estas células perivasculares eran macrófagos y no pericitos o células musculares lisas (Fabriek *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006). Estos hallazgos, colectivamente establecieron a los PVM como una población distinta de células mieloides ubicadas en el espacio perivascular que envuelve los vasos sanguíneos cerebrales.

En modelos murinos, PVM también se caracterizan por expresar el receptor de manosa (CD206) (Galea *et al.*, 2005; Faraco *et al.*, 2016). CD206 se expresa por poblaciones específicas de macrófagos (Linehan *et al.*, 1999) y está involucrado en el reconocimiento de patógenos y endocitosis mediada por receptores (Linehan *et al.*, 1999). La expresión de CD206 se observa en PVM, macrófagos meníngeos (MGM) y macrófagos del plexo coroideo (CPM), pero no está presente en la microglía (Goldmann *et al.*, 2016) ni en los leucocitos que se infiltran en el parénquima cerebral (Galea *et al.*, 2005). A diferencia de CD163, CD206 no se expresa en monocitos infiltrantes, lo que indica que es un marcador más específico de PVM (Holder *et al.*, 2014). Los niveles de expresión de CD45 son más altos en PVM en comparación con la microglía, que se puede utilizar para diferenciar estos tipos de células mediante citometría de flujo (Goldmann *et al.*, 2016).

El origen de PVM todavía se está debatiendo. Hickey y Kimura sugirieron que derivan de BM y se reemplazan continuamente por monocitos sanguíneos (1988). Algunos estudios aprovecharon la capacidad de PVM para

fagocitar el dextrano para investigar el recambio de PVM tras su depleción. Estos estudios revelaron que, después de 1 mes, aproximadamente el 6% de PVM eran solo positivos para el marcador inyectado, es decir, "nuevos" macrófagos (Bechmann *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2006). Estos datos sugieren que los PVM se renuevan continuamente, aunque a un ritmo relativamente lento, pero no se pudo determinar la fuente de los nuevos PVM.

Otros estudios también respaldan la idea de que los PVM y MGM no son reemplazados por monocitos circulantes. Sabiendo que el receptor de fractalquina Cx3cr1 se expresa en células mieloides residentes en el cerebro, incluyendo la microglía, CPM, PVM y MGM, Goldman y col. utilizaron ratones quiméricos con la recombinación de los genes de la proteína amarilla fluorescente (YFP) y del CX3CR1, mediada por la CRE-recombinasa inducible por tamoxifeno, obteniendo la expresión de YFP en células positivas a CX3CR1 en periodos embrionarios. Teniendo en cuenta que, en esta etapa de desarrollo, el linaje hematopoyético que proporcionan las células sanguíneas después del nacimiento aún no se ha desarrollado, se puede suponer que todas las células que expresan CX3CR1 se derivan de precursores eritromieloides del saco vitelino, la principal fuente de células embrionarias hematopoyéticas. Al usar este enfoque, los autores de este estudio pudieron demostrar que los CPM, PVM y MGM positivos a YFP están presentes en el cerebro embrionario, además de comprobar a través de imágenes de microscopía electrónica su presencia alrededor de los vasos en el espacio perivascular, meninges y plexos coroideos. Tanto los PVM como los MGM mantuvieron la expresión de YFP inclusive hasta las 6 semanas de edad de los ratones, confirmando que en la etapa adulta estas células no son reemplazadas por monocitos circulantes infiltrados. Sin embargo, en los CPM este evento no se siguió observando (Goldmann *et al.*, 2016), lo que puede sugerir una reposición desde diferente origen.

1.8 . Fisiopatología de los macrófagos perivasculares

Los PVM están implicados en una amplia variedad de estados patológicos en SNC:

Activación del eje HHA y PVM: Los PVM se han implicado en la activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HHA) en una amplia variedad de entornos. La inflamación sistémica se asocia con la activación del eje HHA y la fiebre, respuestas que requieren la prostaglandina E₂ (PGE₂) vascular (Turnbull & Rivier, 1999). La administración sistémica de IL-1 β o LPS aumenta la enzimas ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la PGE₂ sintasa microsomal-1 (m-PGES-1) en las células endoteliales cerebrales (Elmquist *et al.*, 1997). A su vez, la liberación de PGE₂ es responsable de la activación del eje HHA, lo que lleva a la liberación de las hormonas del estrés, la ACTH y la corticosterona, y la inducción de fiebre. Esta respuesta implica la sinergia entre PVM y las células endoteliales cerebrales, pero depende críticamente de las características del estímulo inflamatorio (Vasilache *et al.*, 2015). Por ejemplo, en la inflamación sistémica inducida por IL-1, la depleción de PVM suprime el aumento en la COX-2, endotelial y la activación de PGE₂ y HHA, mientras que en la inflamación inducida por LPS, la depleción de PVM aumenta esta respuesta (Serrats, *et al.*, 2010). Por lo tanto, PVM parecen promover o suprimir la activación del eje HHP inducida por la inflamación sistémica dependiendo de la naturaleza y la complejidad del estímulo inflamatorio (Schiltz & Sawchenko, 2002).

Alzheimer y PVM: La enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia relacionada con la edad y se caracteriza patológicamente por la acumulación del péptido amiloide- β (A β) en el cerebro (placas amiloides) y los vasos sanguíneos cerebrales (angiopatía amiloide cerebral) (De Strooper & Karran, 2016). Enriquecidos con receptores scavenger, los PVM pueden estar involucrados en la eliminación de productos de desecho del parénquima cerebral (Mato *et al.*, 1982; Kida *et al.*, 1993). En ratones que expresan una forma mutante de la proteína precursora amiloide (APP) (ratones TgCRND8), un modelo de acumulación de amiloide cerebral, tras la depleción de los PVM por Clodronato encapsulado en liposomas, aumentó la deposición de amiloide- β alrededor de los vasos sanguíneos cerebrales (Hawkes & McLaurin, 2009). La depleción selectiva de PVM inhibió el estrés oxidativo vascular y las alteraciones

neurovasculares inducidas por A β , ya sea aplicadas directamente a la neocorteza de ratones de tipo salvaje o producidas endógenamente en ratones Tg2576 que sobreexpresan la APP mutada (Park *et al.*, 2017). Estos hallazgos, colectivamente, podrían implicar a PVM en la fisiopatología de la EA y sugieren que los receptores de PVM, como por ejemplo SR-BI, son cruciales para modular la acumulación de A β en el cerebro suponen algunos efectos dentro de un contexto neurovascular.

Infecciones del SNC y PVM: En un modelo de meningitis estreptocócica en rata, la depleción de los PVM a través del CLO encapsulado en liposomas se asoció con un empeoramiento de los síntomas y una mayor carga de bacterias en el líquido cefalorraquídeo (LCR), un efecto atribuido a la reducción del influjo de neutrófilos en el parénquima cerebral. En otro estudio se observa que PVM y MGM pueden jugar un papel protector en la meningitis bacteriana promoviendo la afluencia de neutrófilos en el cerebro necesaria para contrarrestar las bacterias invasoras (Polfliet *et al.*, 2001). Del mismo modo, la depleción de PVM es beneficiosa en la encefalitis inducida por la administración intranasal del virus de la estomatitis vesicular (VSV). Por lo tanto, la depleción de PVM y MGM por CLO suprimió la acumulación cerebral de neutrófilos y células T, redujo la carga de VSV y mejoró los déficits motores (Steel *et al.*, 2010).

Alrededor del 60% de las personas infectadas con VIH presentan evidencias de disfunciones neurológicas, 30-40% desarrollan déficits cognitivos graves (demencia asociada al SIDA) (Williams & Hickey, 2002). Diversos estudios sugieren que los PVM son la principal población de células infectadas por el VIH o el virus de la inmunodeficiencia simia (SIV), un modelo de primates del SIDA (Williams *et al.*, 2001b). Se propuso que el virus podría ingresar al SNC en monocitos infectados destinados a convertirse en PVM (Williams & Hickey, 2002). Sin embargo, más del 80% de los PVM en las lesiones están presentes en el cerebro antes del desarrollo de la patología, lo que sugiere que los PVM residentes en el cerebro, en lugar de los monocitos periféricos reclutados en la lesión, pueden ser la diana de la infección (Nowlin *et al.*, 2015). En este contexto, las células que expresan Ki-67, un marcador de la proliferación celular, se encontraron en las lesiones SIV. La mayoría de estas células eran CD163 + y se localizaban en el espacio perivascular. Por lo tanto, la proliferación de los PVM,

en lugar del reclutamiento de monocitos de la periferia, podría ser el principal mecanismo de formación de lesión encefalítica y la persistencia del reservorio viral en el cerebro (Filipowicz *et al.*, 2016).

Esclerosis múltiple y PVM: Los PVM aumentan en número en las lesiones de esclerosis múltiple activas y son positivos para la proteína básica de mielina y para el complejo de histocompatibilidad principal HLA-DR, lo que sugiere que podrían procesar y presentar antígenos (Zhang *et al.*, 2011). En la encefalomiелitis alérgica experimental aguda (EAE), un modelo de esclerosis múltiple en ratas, el número de PVM aumenta antes del inicio de la enfermedad, y su depleción mejora los síntomas neurológicos. Aunque los mecanismos de este efecto no son claros, los PVM pueden actuar como células presentadoras de antígenos y reactivar las células T una vez que cruzan la BHE para infiltrarse en el cerebro (Polfliet *et al.*, 2001). Además, los PVM pueden exacerbar la EAE promoviendo el reclutamiento de monocitos a través de la expresión de quimiocinas como MCP-1 y MIP-1 α (proteína inflamatoria de macrófagos 1 α) (Hofmann *et al.*, 2002).

Factores de riesgo cerebrovasculares y deterioro cognitivo: los PVM han sido recientemente implicados en las alteraciones cerebrovasculares y neurocognitivas inducidas por la hipertensión arterial. La hipertensión induce cambios en la estructura de los vasos sanguíneos cerebrales que conducen a una reducción en el diámetro vascular (hipertrofia y remodelación). También altera los mecanismos reguladores neurovasculares, como el aumento del flujo sanguíneo cerebral (CBF) producido por los vasodilatadores dependientes del endotelio o por la actividad neuronal, que conduce a la disfunción cognitiva (Faraco & Iadecola, 2013). Estos efectos son, en su mayor parte, mediados por especies de oxígeno reactivo (ROS) producidas por una NADPH oxidasa (NOX2) (Capone *et al.*, 2011). La depleción de PVM en ratas espontáneamente hipertensas propensas a ACV compensa algunos de los cambios en la estructura vascular inducidos por la hipertensión crónica y mejora la vasodilatación inducida por la acetilcolina, un vasodilatador dependiente del endotelio (Pires *et al.*, 2013).

Lesión cerebral traumática y PVM: La acumulación de células CD163+ alrededor de los vasos sanguíneos cerebrales se ha demostrado en muestras de

autopsias de pacientes con lesión cerebral traumática, hemorragia intracerebral, isquemia cerebral focal y encefalopatía hipóxica. Su número aumenta con el tiempo y se observa incluso en pacientes con lesiones crónicas (Holfelder *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012). Sin embargo, dado que no se realizó ninguna caracterización adicional, no está claro si éstas células son monocitos derivados de sangre o PVM. Las células CD163+ aumentan con el tiempo también en un modelo de rata de lesión cerebral traumática (Zhang *et al.*, 2012), pero la identidad de estas células no se ha definido, y el papel de PVM aún no se ha establecido.

Depresión y PVM: Torres-Plata (Torres-Platas *et al.*, 2014), ha realizado un estudio en el que observó la morfología y la distribución de células inmunes (macrófagos y microglia) en la corteza blanca cingulada dorsal (dACC), región conocida por su implicación en los trastornos del estado de ánimo, en pacientes deprimidos y consecuente suicidio. Además, este estudio revela que la proporción de microglia en "reposo" sobre la ramificada aumentó significativamente en los individuos deprimidos y suicidas, la proporción de vasos sanguíneos rodeados por una alta densidad de macrófagos fue más del doble en los individuos deprimidos y suicidas que en los controles, y esta diferencia fue muy significativa. También se percibió un aumento de la expresión de mRNA de CD45, un marcador enriquecido en los PVM, sobre todo en su localización junto a los vasos observados por inmunohistoquímica (IHC), y también se pudo observar un aumento significativo de MCP-1, una quimiocina implicada en el reclutamiento de monocitos circulantes. Estos datos histológicos y moleculares sugieren que el acúmulo de macrófagos asociados con los vasos sanguíneos puede estar relacionado con el reclutamiento de monocitos en la sustancia blanca del núcleo *accumbens* dorsal de pacientes deprimidos que han sufrido suicidio, aunque no puede excluirse que otros mecanismos puedan ser responsables de esta acumulación.

Las evidencias citadas (Faraco *et al.*, 2017) sustentan la idea de que los PVM son un componente clave del sistema inmune residente en el cerebro, con amplias implicaciones para la fisiopatología de diferentes enfermedades del SNC. Una mejor comprensión de los PVM podría conducir al conocimiento de nuevas estrategias terapéuticas.

1.9 . Estrés, “*sickness behaviour*”, alteraciones de comportamiento y depresión.

La exposición al estrés crónico o los eventos traumáticos aumentan el riesgo a desarrollar trastornos del estado de ánimo o ansiedad y puede afectar gravemente la calidad de vida del individuo (Kessler, 1997; Gilman *et al.*, 2013). No todas las personas que experimentan un evento estresante padecen de efectos negativos y experimentan un estado patológico. Los mecanismos biológicos subyacentes a los efectos nocivos del estrés en la salud mental son de importancia clínica para identificar los factores que promueven la resistencia individual frente a la patología o resiliencia. Los avances hacia el entendimiento de cómo los procesos neuroinmunes median las funciones conductuales, afectivas y neuroquímicas ofrece una nueva perspectiva para comprender la etiología de los trastornos psiquiátricos.

“Sickness Behaviour” o comportamiento tipo depresivo:

Los procesos inflamatorios inducen cambios conductuales caracterizados por letargo, anorexia, dolor hipersensibilidad e interacción social reducida, conocidos colectivamente como “Sickness Behaviour”. Estos síntomas se pueden equiparar de cierta forma a los que se observan en la depresión mayor (DM), y a partir de ahí se empezó a pensar que los mecanismos inmunes o relacionados con la inflamación podrían estar involucrados en la fisiopatología de los trastornos del ánimo (Miller *et al.*, 2009).

Un modelo muy utilizado y estandarizado para inducir el “Sickness Behaviour” es a través de un estímulo inmune periférico (como por ejemplo la administración sistémica de una endotoxina como el lipopolisacárido bacteriano (LPS). Además de estas respuestas conductuales, los individuos afectados, experimentan fiebre y muestran elevación de los niveles plasmáticos de citocinas y cortisol, y un aumento en el número de leucocitos circundantes (monocitos y granulocitos). Una de las características distintivas importantes es la duración de los síntomas: para ser clasificado como “Sickness Behaviour”, deben estar presentes después de la resolución de los déficits locomotores, típicamente 48

horas después de la administración de LPS. Por otra parte, las diferencias en los cambios en los niveles de glucocorticoides y citocinas proinflamatorias pueden diferenciar enfermedad y “Sickness Behaviour”. Por ejemplo, en roedores, “Sickness Behaviour” a menudo coincide con aumentos hasta 100 veces de los niveles plasmáticos de citocinas como TNF α , mientras que, en un modelo inducido por estrés o en pacientes depresivos, estos niveles plasmáticos son apenas 10 veces superiores (DellaGioia & Hannestad, 2010). Del mismo modo, los síntomas comportamentales de la DM incluyen letargo, anhedonia y desmotivación, niveles elevados de citocinas plasmáticas y niveles de cortisol, así como un mayor número de monocitos y granulocitos circulantes. Sin embargo, mientras que el “Sickness Behaviour” es temporal y adaptativo (promueve la inmunidad para erradicar procesos patógenos) (Dantzer & Kelley, 2007), la DM es persistente y está asociado con alteraciones en neuroplasticidad y neurotransmisión en casos específicos estructuras corticolímbicas que conducen a un estado de ánimo disminuido (Duman, 2009).

DM es una enfermedad heterogénea que causa una discapacidad profunda en todo el mundo, que afecta entre 7 a 12% de los hombres y 20 a 25% de las mujeres (Kessler, 2003; Kessler *et al.*, 2005; Murray *et al.*, 2013). Los síntomas de DM se asocian con déficits estructurales y neuroquímicos en regiones cerebrales corticolímbicas y esto podría ser el punto de partida al desarrollo de diferentes enfermedades mentales (Lupien *et al.*, 2000; Krishnan & Nestler, 2008; Schmidt *et al.*, 2011; Duman & Aghajanian, 2012; Russo & Nestler, 2013). Los mecanismos implicados podrían ser una superproducción de CRF (Rachal Pugh *et al.*, 2001), hipercortisolemia (Burt *et al.*, 1995) y degeneración catecolaminérgica central (Kitayama *et al.*, 1997). Aunque los factores genéticos representan un cierto factor de riesgo de desarrollo de la depresión (Sullivan *et al.*, 2000; Foley *et al.*, 2003), se sabe que más de dos tercios de los pacientes depresivos experimentaron una situación de estrés relevante antes de la aparición de síntomas (Kendler *et al.*, 1999; Mitchell *et al.*, 2003). Sin embargo, esta respuesta se parece mucho a varias características observadas en los trastornos del estado de ánimo, incluida rechazo a entornos sociales, anhedonia y las alteraciones del sueño (Dantzer *et al.*, 2008). Se discute que la

neuroinflamación afecta al estado de ánimo, particularmente en pacientes deprimidos resistentes al tratamiento (Hodes *et al.*, 2015).

Se sabe que la serotonina (5-HT) es el neurotransmisor por excelencia implicado en la fisiopatología de la depresión. Un concepto clásico para esta enfermedad consiste en el desbalance químico de este neurotransmisor dando origen a la “Hipótesis monoaminérgica de la depresión”, donde se hipotetiza sobre una disminución en la transmisión de la 5-HT, pero también de otras catecolaminas, especialmente NA. Evidencias farmacológicas suportan esta teoría, una vez que los tratamientos antidepresivos que presentan mejores resultados compensan estos sistemas de neurotransmisión. Desde un punto de vista anatómico existe una relación entre las fibras serotoninérgicas y estructuras cerebrales implicadas en la respuesta al estrés, como por ejemplo hipocampo y PVN, evidenciando así una relación entre el eje HHA y el sistema serotoninérgico. (Joseph & Kennett, 1983).

Uno de los mecanismos propuestos para la relación entre 5-HT y GC sería a través de una interacción entre sus receptores. Después de la administración de 5-HT ocurre un aumento en la expresión de GR, y tras una disrupción farmacológica en las proyecciones serotoninérgicas, se reduce la expresión génica de los receptores de GR y MR en hipocampo (Seckl *et al.*, 1990). También se ha podido observar una reacción inversa, donde, determinados modelos de estrés crónico disminuyen la expresión del receptor 5-HT en hipocampo (Lopez *et al.*, 1997).

Como hemos visto la activación del eje HHA es responsable de activar una respuesta de fase aguda muy similar a una respuesta inflamatoria de un organismo frente a una infección o traumatismo: activación glial, síntesis y liberación de mediadores pr-inflamatorios, sobre todo en SNC (Garcia-Bueno *et al.*, 2008a). En la depresión se observa una situación muy similar, en las que las citocinas juegan un papel muy importante (Miller *et al.*, 2009).

De la relación de la activación del sistema inmune y el papel que podría tener en esta enfermedad se ha desarrollado la “Teoría inflamatoria y neurodegenerativa de la depresión” (Maes *et al.*, 2009), que consiste en la implicación directa de los mediadores inflamatorios y su relación con alteraciones

de comportamiento, conllevando a un estado depresivo, aspecto este que será abordado en esta tesis doctoral.

Estudios en modelos murinos han observado que el estrés psicosocial o ambiental repetido causa un déficit de plasticidad sináptica y una desregulación de los neurotransmisores, lo que lleva a un comportamiento depresivo (Duman, 2009; Christoffel *et al.*, 2011). Coincidiendo con estas respuestas neurobiológicas, la exposición al estrés tiene considerables consecuencias fisiológicas e inmunológicas; dicha exposición conduce a aumentos en la expresión de citocinas proinflamatorias como la IL-1 β , TNF α y IL-6 en la sangre y el cerebro (Wohleb *et al.*, 2014b; Hodes *et al.*, 2015). Además, los estudios clínicos han demostrado que los marcadores circulantes de la activación inmune, como el aumento del número de granulocitos y monocitos (Maes, 1995) y los niveles elevados de TNF- α e IL-6, se observan en la sangre de individuos con DM (Howren *et al.*, 2009; Dowlati *et al.*, 2010). En conjunto, estos hallazgos implican una desregulación (relacionada con el estrés) del sistema inmune innato en la fisiopatología de la depresión.

2 . ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 . Antecedentes

El SNC y el sistema inmune periférico están en comunicación constante e influyen en la forma en que uno y otro responden a un estímulo estresante. Como ha sido comentado anteriormente, existen evidencias que indican que la exposición al estrés interrumpe la comunicación normal entre el SNC y el sistema inmunitario periférico, lo que conduce a la señalización inmune hacia un estado predominantemente pro-inflamatorio. Esta respuesta incluye una señalización proinflamatoria elevada y prolongada en el SNC, que varios autores han relacionado estrechamente con la fisiopatología de los trastornos psiquiátricos asociados al estrés (Miller & Raison, 2016). Esta relación es consecuencia de la observación de que la activación de moléculas de señalización proinflamatorias interactúa con sustratos neurales que median cambios en el estado de ánimo, la cognición y la fisiología que funcionan como una defensa adaptativa del individuo contra el daño (Dantzer *et al.*, 1998; Maier & Watkins, 1998).

Existe una evidencia creciente que sugiere que las células del sistema inmune innato, como las de origen mieloide, desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis cerebral y en los mecanismos fisiopatológicos de las enfermedades del SNC (Engelhardt *et al.*, 2017; Herz *et al.*, 2017; Prinz *et al.*, 2017). Gran parte de la investigación en esta área se ha centrado en la microglía, células mieloides residentes del cerebro (Saijo & Glass, 2011). Sin embargo, se sabe mucho menos sobre el papel de otras células inmunes innatas que residen en el cerebro, como son los macrófagos perivasculares (PVM).

Los PVM son células de origen mieloide, cuya ubicación en el espacio perivascular las hace excelentes candidatas para regular las interacciones SNC-periferia en condiciones de estrés. Además, los PVMs son las únicas células con actividad fagocítica basal y una tasa de reposición lenta pero constante en el SNC, y pueden ser considerados como centinelas del sistema inmune en el cerebro regulando el paso de de macromoléculas (β -amiloide), virus, bacterias y células polimorfonucleares periféricas (Hawkes and McLaurin, 2009; Polfriet *et al.*, 2002; Pedragosa *et al.*, 2018).

Un ejemplo de señal inmune que debe de ser detectada e interpretada por el SNC para organizar las respuestas de fase aguda adecuadas es el aumento en los niveles plasmáticos de citocinas proinflamatorias tales como IL-1 β o TNF- α (como ocurre en muchos individuos con patologías psiquiátricas).

Se han propuesto varios mecanismos (que no deben ser excluyentes entre sí teniendo en cuenta la complejidad de los sistemas inmune y nervioso) por los que las citocinas pueden acceder o activar respuestas al nivel del SNC.

Uno de ellos implica a varios tipos celulares asociados a la microvasculatura cerebral por su capacidad para producir prostaglandinas (PGE₂), que actuarían como moléculas señalizadoras a nivel local y paracrino activand otras áreas cerebrales como la médula ventrolateral o el núcleo del tracto solitario que a su vez regulan la actividad del eje HHA del estrés y la subsiguiente liberación de las hormonas del estrés (rev. en Schiltz y Sawchenko, 2003).

Inicialmente se asumió que solo el endotelio vascular tenía la capacidad de producir prostaglandinas, pero estudios recientes han identificado a los PVMs, como posibles fuentes celulares de prostaglandinas tras un estímulo inmune-inflamatorio al expresar las enzimas COX-2) y mPGES1 (Schiltz *et al.*, 2002).

Como ya se ha comentado con anterioridad, los PVM son las únicas células residentes en cerebro con capacidad fagocítica basal. Esta característica particular ha servido para producir su depleción selectiva tras la administración central de la molécula pro-apoptótica clodronato encapsulada en liposomas (Van Rooijen and Sanders, 1994).

Estudios previos utilizando esta metodología han sugerido que el papel de los PVM en las interacciones neuro-inmunes puede variar en función del estímulo inmune aplicado. De este modo, tras la administración intravenosa de IL-1 β , o tras la exposición a 30 minutos de estrés por inmovilización, la depleción selectiva de los PVM bloqueaba la activación del eje HHA del estrés (Serrats *et al.*, 2017; Serrats *et al.*, 2010). Por el contrario, la eliminación de los PVM potenciaba la producción de PGE₂ por las células endoteliales y la subsiguiente

activación del eje HHA del estrés y la respuesta febril en un modelo de administración intravenosa de LPS, sugiriéndose un papel antiinflamatorio de los PVM a nivel vascular en estas condiciones experimentales (Serrats *et al.*, 2010). Un excelente candidato a estudiar para explicar este perfil antiinflamatorio sería la vía L-PGDS/15d-PGJ₂/PPAR γ que regula la actividad COX-2 y la síntesis de PGE₂ en modelos experimentales relacionados, como el estrés agudo (García-Bueno *et al.*, 2005) o la estimulación de cultivos celulares de microglia con LPS (Bernardo *et al.*, 2003).

En un intento de caracterizar el transcriptoma inflamatorio tras la administración de LPS de las distintas células que forman la BHE (endotelio, pericitos y PVM) a través de la técnica de “cell sorting” se ha sugerido que los PVM activan la maquinaria para producir PGE₂ en concierto con las células endoteliales, inhibiendo la expresión de enzimas responsables de la síntesis de otras prostaglandinas y regulado al alza la señalización dependiente de IL-6 (Vasilache *et al.*, 2014). Por el momento se desconoce si otros estímulos inmunes de diferente naturaleza y duración producen las mismas alteraciones moleculares a nivel de la BHE y en concreto en las PVM.

Más recientemente, se ha propuesto a los PVM como una importante frente de estrés oxidativo y de disfunción de la vasculatura cerebral producida por la acumulación de niveles suprafisiológicos del péptido β -amiloide en la corteza cerebral de ratón (Park *et al.*, 2017), y en modelos de hipertensión arterial, llegando incluso a afectar al dominio cognitivo (Faraco *et al.*, 2016).

Por último, han aparecido evidencias desde la arena clínica que indican la existencia de alteraciones en el número de PVM en el tejido cerebral postmortem de pacientes diagnosticados con depresión y esquizofrenia, alteraciones a las que tienen aún que encontrar su papel en la fisiopatología de estos trastornos (Torres-Platas *et al.*, 2014; Cai *et al.*, 2018)

Con estos antecedentes, decidimos caracterizar el papel que los PVM podrían desempeñar en los mecanismos neuroinflamatorios inducidos por la exposición a diferentes estímulos inmune como el estrés físico, psicológico y mixto, como por ejemplo el estrés crónico de mediana intensidad (CMS), un modelo con perfil traslacional, al haber sido ampliamente validado para el estudio

del comportamiento depresivo inducido por estrés (Willner, 1997) y que se explicará más adelante con detalle.

2.2 . Hipótesis

Considerando estos antecedentes nos planteamos la siguiente hipótesis:

“Los macrófagos perivasculares regulan a distintos niveles la respuesta neuroinflamatoria, balance oxidativo/nitrosativo inducida en modelos animales de exposición a estrés”.

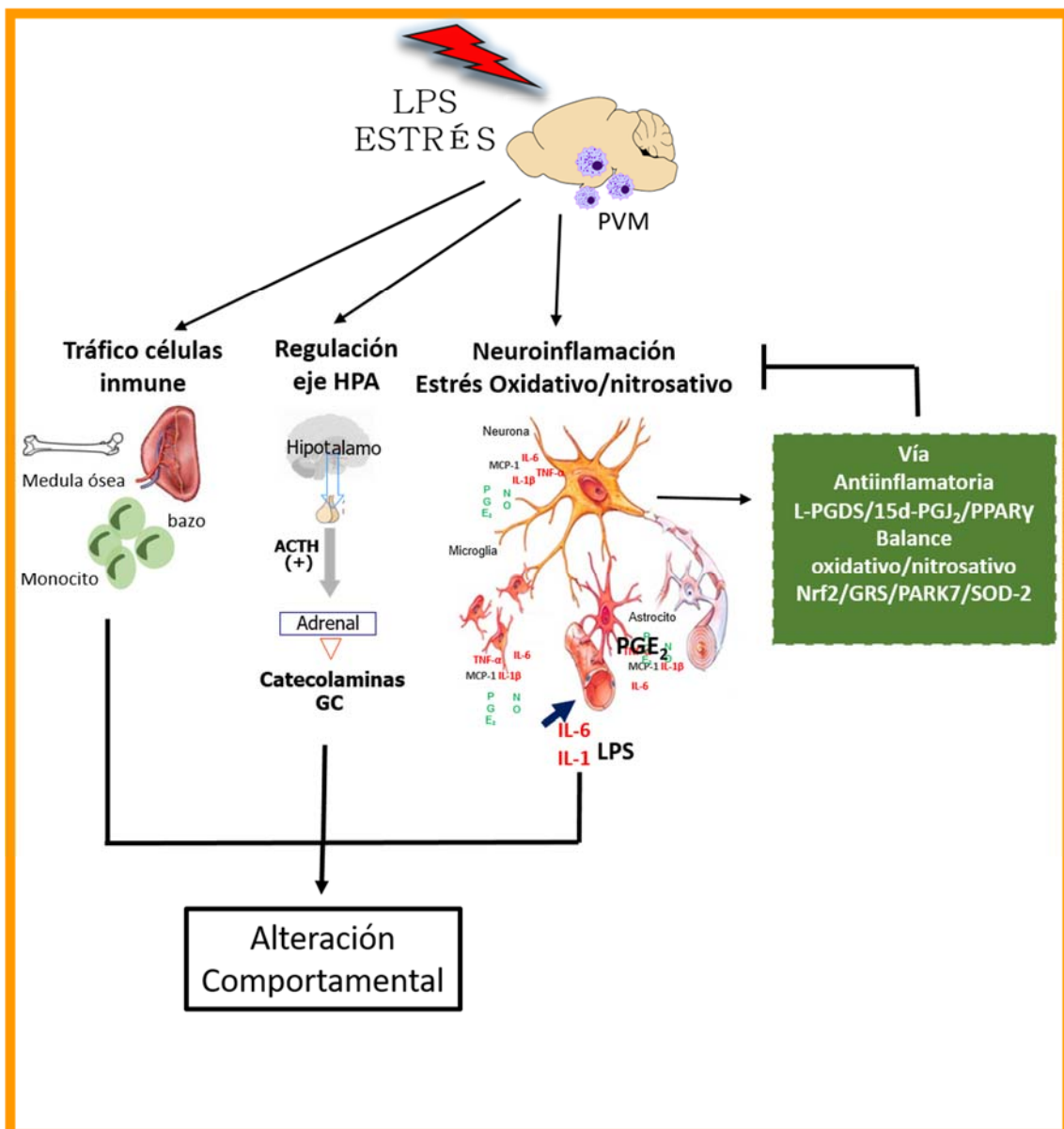


Fig.-6. Esquema de posibles eventos regulados por los PVM.

2.3 . Objetivos

Los objetivos generales de esta tesis doctoral son estudiar el papel de los PVM en:

1) Las alteraciones producidas a nivel molecular en la expresión de diferentes mediadores pro/antiinflamatorios/oxidantes en modelos animales de exposición a estrés agudo y crónico;

2) La regulación o modulación del tráfico de células inmunes desde la periferia al SNC en modelos animales de activación inmune. La exposición al estrés influye en el desarrollo, la distribución y la activación de las células inmunitarias y estas a su vez han sido relacionadas con la fisiopatología de los trastornos de salud mental (Beumer et al., 2012, Hodes et al., 2015, Wohleb et al., 2015);

3) Las alteraciones en el comportamiento y la cognición inducidas por la exposición a un modelo subcrónico de neuroinflamación inducido por LPS.

4) En la expresión y actividad de la vía antiinflamatoria L-PGDS/15d-PGJ₂/PPAR γ .

Los objetivos particulares en relación con el objetivo 1 son:

1. Describir el papel de los PVM en un modelo de neuroinflamación y estrés oxidativo/nitrosativo inducido por estrés agudo por inmovilización.

2. Describir el papel de los PVM en un modelo de depresión inducido por la exposición a estrés crónico moderado (CMS).

Los objetivos particulares en relación con el objetivo 2 son:

1. Estudiar el papel de PVM en el tráfico de células inmunes y sus mecanismos de regulación en un modelo estrés social: “*Repeat social defeat*”

2. Estudiar el papel de PVM en el tráfico de células inmunes y sus mecanismos de regulación en un modelo subcrónico de neuroinflamación inducido por LPS.

Los objetivos particulares en relación con el objetivo 4 son:

3. Describir el papel de los PVM en la activación de la vía antiinflamatoria L-PGDS/15d-PGJ₂/PPAR γ en un modelo agudo de neuroinflamación inducido por LPS.

4. Validar una metodología basada en la administración a nivel central de un Oligonucleótido antisentido silenciador de ARNm tipo Gapmer[®] encapsulados en liposomas con el fin de inhibir la expresión de genes antiinflamatorios expresados en PVM.

3 . MATERIAL Y MÉTODOS

En este apartado se describe los protocolos utilizados en el desarrollo de esta tesis doctoral.

Todos los protocolos experimentales llevados a cabo se aprobaron y siguieron las directrices del Comité de Bienestar Animal de la Universidad Complutense de Madrid según la legislación europea (2010/63 / UE) (PROEX 419/15)

En adjunto una copia de la “acreditación para la utilización de animales en experimentación: categoría B” de la autora de la presente Tesis Doctoral.

DIPLOMA



CURSO

UTILIZACIÓN DE ANIMALES EN EXPERIMENTACIÓN: CATEGORÍA B.

Dña. Aline Sayd Gaban

Ha asistido a las lecciones teóricas y prácticas, habiendo demostrado su aprovechamiento y competencia. El citado Curso está Acreditado por la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio, Subdirección General de Recursos Agrarios, Área de Protección Animal de la CAM. Y para que pueda acreditarlo donde fuera necesario se le expide el presente

Madrid, del 09 al 13 de junio de 2014



Fdo. El Director del Curso
Juan Carlos Illera del Portal

Dpto. FISILOGIA

3.1 . Modelos animales

En el caso de los experimentos realizados en ratas tanto estrés agudo por inmovilización como la exposición a estrés crónico moderado, los animales fueron colocados en jaulas individuales una semana antes del inicio de la experimentación. En el caso de los experimentos realizados en ratones los animales fueron dispuestos de forma conjunta.

En todos los casos los animales fueron expuestos a condiciones estándares de temperatura y humedad constante (24 ± 2 °C), ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (empezando 08:00 a.m.) con acceso a comida y agua *ad libitum*, los animales estuvieron en condiciones constantes durante 7 días antes de los experimentos en el CAI Animalario de la Facultad de Medicina de la UCM.

3.1.1 . Estrés agudo por inmovilización

Para este estudio fueron utilizadas ratas Wistars Hannover (no consanguíneas) macho con pesos comprendidos entre 350-400 g. Los animales fueron alojados individualmente durante 7 días después de la administración icv, sobre la base de estudios previos que lograron la depleción máxima de PVM en este momento y antes de la repoblación de progenitores derivados de médula ósea (Serrats *et al.*, 2010). El protocolo de estrés agudo comenzó el séptimo día después de la administración icv a las 0900 a.m. La restricción se realizó introduciendo a los animales de manera individual en bolsas de plástico durante 6 h (Leza *et al.*, 1998). Los animales control no fueron sometidos a estrés, fueron mínimamente manipulados hasta séptimo día después de la inyección icv. Los animales fueron sacrificados inmediatamente después de la restricción utilizando una sobredosis de pentobarbital sódico (300mg/kg, intraperitoneal (ip), (Dolethal[®], España). Después de la decapitación, se extrajo el cerebro y se aislaron ambas áreas corticales que fueron inmediatamente congeladas a -80°C hasta los análisis posteriores.

Justificación del modelo

Los modelos de estrés son ampliamente utilizados en experimentación animal, y son clasificados según algunos criterios como por ejemplo su naturaleza (puede ser físico, psicológico o mixto), la duración (agudo, subagudo, sincrónico y crónico), la posibilidad de fuga del estímulo, pudiendo ser escapable o inescapable y finalmente la posibilidad que el animal tiene de predecir cuando el estímulo se realizará o se repetirá (pudiendo ser predecible o impredecible).

El estrés utilizado por inmovilización o restricción de movimientos (en inglés “restraint stress”) puede ser clasificado como un modelo de estrés agudo, inescapable, impredecible y mixto físico- psicológico.

Este modelo de estrés presenta un efecto más acentuado que otros tipos de estrés, lo que le convierte en más fácilmente interpretable que otros, como el estrés social, por ejemplo. El estrés por inmovilización también es recomendado por el Centro Nacional para el estudio del PTSD de los EEUU como modelo más indicado para el estudio de patologías como: PTSD, depresión y procesos neurodegenerativos relacionados en humanos (Telner y Singhal, 1984; Bremner y col., 1999). La reproducibilidad relativamente fácil de este modelo es esencial para la realización de protocolos de estrés crónico (Poland y col., 1999). Finalmente, la mayoría de los estudios sobre el estrés utilizan este modelo, incluido los estudios antecedentes realizados en este grupo de investigación, con una gran cantidad de datos, utilizados para plantear e interpretar los experimentos y resultados incluidos en esta tesis doctoral.

Diseño experimental

Para este estudio se usaron cuatro grupos experimentales: animales expuestos a estrés por restricción de movimiento que reciben la administración icv de liposomas que contienen clodronato (CLO + STRESS) o su vehículo tampón fostato o PBS (PBS + STRESS) y sus respectivos grupos control: CLO + CONTROL y PBS + CONTROL (n = 3-5).

3.1.2 . Estrés crónico leve o “*chronic mild stress*” (CMS)

Para este estudio como en el anterior fueron utilizadas ratas Wistar-Hannover (no consanguíneas) macho con pesos comprendidos entre los 350-400 g. Los animales fueron alojados individualmente durante 7 días después de la administración icv, según estudios previos que lograron el agotamiento máximo de PVM en este momento y antes de la repoblación de progenitores derivados de médula ósea (Serrats *et al.*, 2010).

El CMS se describe como un modelo crónico en el que durante 21 días los animales son sometidos a distintos estímulos estresantes y no consecutivos, con la intención de evitar la habituación. Los estímulos son realizados dos veces al día con un intervalo de 12 horas entre ellos. Además de los animales sometidos a 21 días de estrés, se ha llevado a cabo un curso temporal incluyendo grupos de animales sometidos a estrés durante los primeros 7 y 14 días, respectivamente.

Estímulos aplicados:

1. Emparejamiento: consiste en colocar dos animales en la misma jaula, en la siguiente repetición de este estímulo el animal visitado al primer día, visitará en el segundo turno de este estrés.
2. Inclinación de la jaula: Las jaulas que contienen los animales son inclinadas a un ángulo de 45°.

3. Serrín con agua: se añaden 250mL de agua en el serrín de cada una de las jaulas.
4. Iluminación Estroboscópica: 150 flashes /min.
5. Luz intermitente: 2h luz/2h oscuridad durante las 12 horas
6. Privación Agua/Comida: Retirada de los biberones y la comida.

	lunes	martes	miércoles	jueves	viernes	Sábado	Domingo
08.00	Emparejar A visita B	Serrín húmedo	Emparejar B visita A	Ni Agua Ni comida	Jaula inclinada	Descanso	Descanso
20.00	Luz intermitente	Ni Agua Ni comida	Jaula inclinada	Serrín húmedo	Luz estroboscópica	Luz intermitente	Ni Agua Ni comida

Fig.-7. Ciclo de estrés administrados en el protocolo de estrés crónico “*chronic mild stress*”.

Justificación del modelo

El CMS es un estrés crónico que puede clasificarse mixto físico y psicológico, inescapable e impredecible. Es un modelo ampliamente aceptado para el estudio de la depresión desde que se utilizó por primera vez por Willner y sus colaboradores (Willner, 1997), pues ha demostrado validez de constructo, aparente y predictiva. En esta tesis es un modelo muy indicado debido a su representatividad como modelo de neuroinflamación inducido por estrés (Farooq *et al.*, 2012).

1. Validez de constructo consiste en la aparición de síntomas depresivos que aparecen tras una exposición crónica a estímulos estresantes. Así mismo, este modelo está relacionado con la aparición de síntomas depresivos en humanos.

2. Validez aparente puede ser demostrada a partir de comportamientos que tienen una disminución clara y son característicos de la depresión como por ejemplo el sexual, agresión (D'Aquila *et al.*, 1994), trastornos del sueño, actividad motriz y anhedonia (Moreau *et al.*, 1995; Gorka *et al.*, 1996). Otro carácter aparente observado en los animales sometidos al CMS es el

aumento de citocinas proinflamatorias (Grippo *et al.*, 2005); daño oxidativo (Lucca *et al.*, 2009), apoptosis (Kosten *et al.*, 2008) y desregulación del eje HHA (Christiansen *et al.*, 2012).

3. Validez predictiva: Los cambios comportamentales que se dan en el CMS se revierten con un tratamiento con distintos tipos de antidepresivos (Antidepresivos tricíclicos, inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina (SSRI), inhibidores de la recaptación de Noradrenalina, inhibidores de la Monoamino oxidasa A (IMAO-A) o agonistas de 5-HT1A (Farooq *et al.*, 2012).

Diseño experimental

Para este estudio se usaron cuatro grupos experimentales: animales de estrés por CMS (21 días) que reciben la administración icv de liposomas que contienen clodronato (CLO + CMS 21 DIAS) o su vehículo PBS (PBS + CMS 21 DIAS) y sus respectivos grupos control: CLO + CONTROL y PBS + CONTROL (n = 4-6). Se ha realizado experimentos complementarios basados en el sacrificio de animales a los 7 y 14 días de estrés, con el objetivo de realizar un curso temporal más detallado.

3.1.3 . Administración subcrónica de LPS

Para este estudio se utilizaron ratones CL57/BL6 macho, con pesos comprendidos entre 25-30g. Todos los animales fueron mantenidos en condiciones constantes y estándar durante 7 días antes de los experimentos, ciclo de luz y oscuridad de 12 horas, con acceso a comida y agua *ad libitum*, en el CAI Animalario de la Facultad de Medicina de la UCM. De la misma manera que los anteriores experimentos, todos los protocolos experimentales se aprobaron y siguieron las directrices del Comité de Bienestar Animal de la Universidad Complutense de Madrid según la legislación europea (2010/63 / UE) (PROEX 419/15).

La administración de LPS fue realizada tras el 7º día de la administración icv de los liposomas que encapsulaban clodronato o su vehículo PBS (en el caso

de los controles). Los animales control fueron manejados hasta el séptimo día después de la inyección icv. Los animales fueron sacrificados 14 horas tras la última administración de LPS, utilizando una dosis letal de pentobarbital sódico (300mg/kg, intraperitoneal (ip), (Dolethal®, España). La administración de LPS se realizó durante 3 días consecutivos a dosis crecientes de LPS en las siguientes concentraciones: 0.208/0.415/0.83 mg/kg, ip, los animales controles recibieron salino estéril (solución vehículo del LPS) (Wickens *et al.*, 2017).

Justificación del modelo

La administración de LPS bacteriano produce una activación del sistema inmune en forma dosis dependiente, incrementando las respuestas de fase aguda y la producción de mediadores proinflamatorios (Miller *et al.*, 2005). La administración sistémica de LPS como modelo de activación inmune ha sido utilizada ampliamente en la inducción tanto de inflamación periférica como neuroinflamación, comprobándose su capacidad para provocar la rápida activación de la microglía, incrementar los niveles de citocinas pr-inflamatorias, aumento del tráfico de células inmune en el SNC y neurodegeneración (Qin *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2009; Wohleb *et al.*, 2012).

El modelo de administración de 3 días con dosis progresiva fue elegido porque se buscaba un efecto más sostenido con respecto a la activación inmune, pero a la vez evitando el fenómeno de tolerancia que ha sido recientemente descrito con respecto a la administración del LPS (Wickens *et al.*, 2017). Este modelo es muy útil desde un punto de vista bioquímico y también debido a que produce un comportamiento de tipo depresivo o “*sickness behaviour*” (Wickens *et al.*, 2017), así como un comportamiento similar a la ansiedad. Más específicamente, en este modelo tienen lugar un aumento en el tráfico de células inmune al SNC (datos no publicados), en estudios pilotos realizados en el laboratorio donde se ha desarrollado parte de esta tesis doctoral (en USA).

Diseño experimental

Para este estudio se utilizarán los mismos cuatro grupos experimentales: como se describen en los modelos anteriores, los animales reciben la primera inyección de LPS una semana después de haber recibido la administración icv de liposomas que contienen clodronato (CLO + LPS 3 DIAS) o su vehículo PBS (PBS + LPS 3 DIAS) y sus respectivos grupos control: CLO + CONTROL y PBS + CONTROL (n =9).

3.1.4 . Administración aguda de LPS

Para este estudio se utilizaron ratas Wistar, pesando entre 250 y 275 g separadas en dos grupos: un grupo PBS+LPS (n=22) y otro grupo CLO+LPS (n=23). Todos los animales fueron mantenidos en condiciones constantes y estándar durante 7 días antes de los experimentos, ciclo de luz y oscuridad de 12 horas, con acceso a comida y agua *ad libitum*. La administración ip de 2µg/kg de LPS (dosis elegida en función a estudios previos (Serrats et al., 2010) fue realizada tras el 7º día de la administración por icv de los liposomas que encapsulaban clodronato en liposomas o su vehículo PBS. El sacrificio y toma de muestras se realizó a las 0, 1/2, 1, 3, 5, 8, 12 y 24 horas tras la inyección de LPS, utilizando una dosis letal de pentobarbital sódico (300 mg/kg, (ip). El tejido cerebral fue congelado a -80°C, hasta el momento de los ensayos. El procesamiento del tejido fue procesado según el protocolo para la extracción de prostaglandinas y posterior realización de kit comercial para la detección de PGE₂ y 15d-PGJ₂ en médula ventrolateral, por ser un área fundamental en la regulación del eje HHA del estrés por LPS.

Justificación del modelo:

Como se ha visto en estudios previos, los PVM parecen regular la expresión del eje HHA, y otras respuestas de fase aguda dependientes de la PGE₂ vascular tras la administración aguda de LPS y posiblemente en otros modelos de activación inmune de manera diferencial, (Serrats *et al.*, 2010; Serrats *et al.*, 2017). La PGE₂ es producida por una vía multienzimática que es regulada por la producción de la 15d-PGJ₂, una prostaglandina con un perfil

antiinflamatorio en diversos modelos de patologías en SNC (García-Bueno *et al.*, 2008a). Se optó por la realización de una curva temporal para evaluar los niveles de la prostaglandina PGE₂ y 15d-PGJ₂ y las posibles relaciones existentes entre ellas, así como el posible papel regulador de los PVM en este proceso.

3.1.5 . Estrés social “repeat social defeat” (RSD)

Se introduce un ratón *agresor* CD-1 en la jaula establecida conteniendo (3 ratones C57BL / 6) durante 2 horas (17:00 a 19:00 h) diariamente durante 6 noches consecutivas. Si el ratón intruso no atacó en los primeros 5 minutos, fue reemplazado por un nuevo intruso. Se usaron diferentes ratones intrusos en días consecutivos. Durante cada episodio de estrés, los ratones residentes fueron monitorizados en busca de comportamientos sumisos que incluyen agacharse, huida y posición decúbito supino. Al final del período de 2h, los ratones intrusos fueron devueltos a sus jaulas originales, y los ratones residentes permanecieron sin ser molestados hasta el siguiente episodio de estrés al día siguiente. El estado de salud de los ratones se examinó cuidadosamente durante todo el experimento. En caso de una lesión, los ratones fueron retirados del experimento. De acuerdo con nuestros estudios previos, menos del 5% de los ratones cumplió los criterios de eliminación temprana. Los ratones control se dejaron en jaulas aparte y fueron manipulados todos los días del curso del experimento.

Justificación del modelo

El modelo de estrés social utilizado o “Repeat social defeat” (RSD) implica provocar la lucha entre ratones residentes y un intruso agresivo. Además, agrega un componente social clave que incluye el estrés psicológico causado por la interrupción de la jerarquía social dentro de una jaula establecida de ratones residentes. En el presente estudio, realizamos RSD como ha sido descrito anteriormente (Avitsur *et al.*, 2001; Wohleb *et al.*, 2013). Además, este modelo ha sido validado previamente como inductor de diversos eventos relacionados

con una respuesta inmune en sistema nervioso central, como tráfico de células inmunes al cerebro, activación del SNS, regulación del eje HHA y alteraciones comportamentales como ansiedad (Weber *et al.*, 2017).

Diseño experimental: Para este experimento se utilizaron cuatro grupos experimentales: clodronato en liposomas (CLO+CONTROL) o su vehículo (PBS+CONTROL) en condiciones de CONTROL y ambos sometidos a estrés social PBS+RSD y CLO+RSD una semana después de la administración icv (n=6).

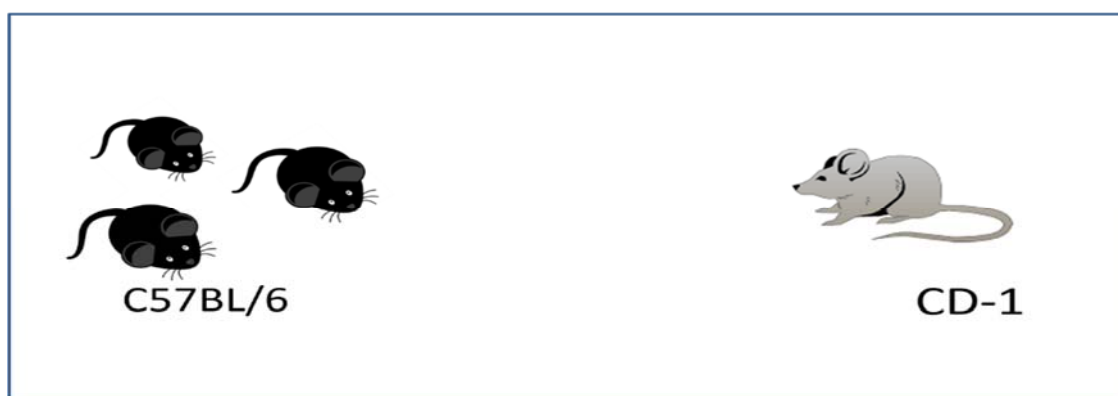


Fig. – 8. Esquema representativo del estrés social “Repeat social defeat” (RSD).

3.2 . Justificación de la elección de las estructuras estudiadas

La corteza frontal de rata fue utilizada en los estudios de estrés agudo y crónico, debido a la evidencia previa de que es un área muy susceptible a desarrollar un proceso neuroinflamatorio inducido por estrés y estrés oxidativo / nitrosativo (García-Bueno *et al.*, 2008a). Además de presentar un papel importante en la regulación del eje HHA en respuesta al estrés (Radley *et al.*, 2006). Los experimentos bioquímicos fueron realizados del lado izquierdo del cerebro, para intentar minimizar los posibles efectos producidos por la técnica de administración intracerebroventricular.

Por otro lado, en el experimento de citometría realizado en ratones, se ha utilizado todo el cerebro, una vez que se ha descrito la implicación del tráfico de células inmune como importante señalizador en una respuesta inmune de

todo este órgano, frente a modelos de estrés y LPS además de su implicación en el “*sickness behaviour*”. La bioquímica necesaria para complementar este estudio fue realizada en un corte coronal de 1mm³ (aproximadamente e-0.34 mm to -1.34 mm desde bregma), abarcando áreas cerebrales implicadas en el control de la ansiedad, comportamiento tipo depresivo y la actividad motora como corteza, hipotálamo, hipocampo y estriado (Weber *et al.*, 2017; Niraula *et al.*, 2018).

En el modelo de administración aguda de LPS, en el que se realizó un curso temporal tras la administración de LPS para comprobar alteraciones en los niveles de 15d-PGJ₂ y de la prostaglandina proinflamatoria PGE₂ el área cerebral elegida fue la médula ventrolateral, por ser una zona clave en la transducción de señales desde la periferia al SNC y en la activación del eje del estrés tras LPS.

3.3 . Obtención de muestras, métodos y estadística.

3.3.1 . Depleción selectiva de PVM

Los liposomas que encapsulan clodronato entran en contacto con macrófagos y otras células fagocíticas. El fagocito reconoce inmediatamente los liposomas como partículas extrañas y procede a destruir estas partículas invasoras. El primer paso en esta destrucción es la fagocitosis en la que los liposomas son engullidos por la célula hacia una vesícula interna conocida como fagosoma, como se muestra en la figura a continuación. Los lisosomas, que contienen muchos tipos de enzimas destructivas, incluidas las fosfolipasas, se fusionan con el fagosoma formando un fagolisosoma. La membrana lisosómica contiene bombas de protones que disminuirán el pH interno del fagolisosoma. El bajo pH, las fosfolipasas y otras interacciones macromoleculares contribuyen a comprometer la membrana liposómica, liberando así el clodronato encapsulado. El bajo pH interno del fagolisosoma puede contribuir a la capacidad del clodronato para atravesar la membrana del fagolisosoma hacia el citosol del macrófago. Una vez en el medio citosólico, el clodronato se reconoce erróneamente como pirofosfato celular y es utilizado por varias aminoacil-tRNA sintetasas de clase II para producir un análogo

de ATP no hidrolizable, adenosina 5'- β , γ -diclorometileno) trifosfato (AppCCI 2 p) (Rogers *et al.*, 1992; J. *et al.*, 1994; C. *et al.*, 1997). Básicamente, implica la aplicación citosólica de AppCCI 2 p que atraviesa la membrana externa mitocondrial y se une irreversiblemente a la translocasa ATP / ADP que atraviesa la membrana interna mitocondrial. Inhibir esta enzima inicia aperturas de poro en la membrana interna mitocondrial. La pérdida de la integridad de la membrana interna mitocondrial, a su vez, da como resultado la despolarización y permite que se liberen señales moleculares de la mitocondria que inician la muerte celular a través de la apoptosis (Lehenkari *et al.*, 2002).

Para la depleción selectiva de los PVM, se administró una solución de la molécula pro-apoptótica clodronato (250mg/kg) encapsulado en una película de liposoma multilamelar, según Van Rooijen (1994) y Serrats (Serrats *et al.*, 2010). Una parte de la composición de estos liposomas está constituida por manosa. Como la expresión del receptor de este carbohidrato (CD206) está presente en los macrófagos perivasculares y meníngeos, la adicción de manosa aumenta la especificidad y la direccionalidad de los liposomas hacia los ellos. La administración se realizó por vía icv, como se detalla a continuación.

3.3.2 . Inhibición génica selectiva en PVM: GapmeR encapsulado en liposoma

Uno de los objetivos planteados en esta tesis doctoral se relaciona con la inhibición de un gen de interés dentro de los PVM. Actualmente, la única metodología que permite el estudio de este tipo celular *in vivo* es a través de su depleción, mediante la encapsulación de clodronato en vesículas de componentes lipídicos. Los estudios realizados en este sentido permiten verificar el papel de los PVM, en los modelos propuestos, pero no permite elucidar el mecanismo regulador responsable por su efecto. A partir de ahí, nos hemos planteado la construcción de un liposoma que pudiera encapsular una herramienta inhibitoria dirigida a los PVM.

LNA™ ANTISENTIDO GapmeR:

Teniendo en cuenta el tiempo necesario para que los liposomas liberen su contenido dentro de las células diana (PVM), se ha optado por buscar una herramienta génica que presentara un tiempo de inhibición más extendido, se ha optado por la utilización de los GapmeRs, comercializado por Exiqon®. Los GapmeRs son una nueva herramienta para la inactivación de ARNm o ARNinc. A diferencia de los, ARN de interferencia (siRNA) los GapmeRs no solo alcanzan dianas citoplasmáticas, sino también nucleares, como ARN de cadena larga no codificante (ARNinc) y todos los ARN de tamaño pequeño (ARNsn). Además, producen menos efectos indeseados, ya que no se unen al complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*), ni lo saturan. El diseño de los GapmeRs consiste en una cadena de 14-16 nt de DNA monocatenario cuyas regiones flanqueantes están modificadas con nucleótidos LNA™ para aumentar la afinidad por el ARN diana. De esta forma, al hibridarse con el ARN, se generaría un "hueco" en la región central de DNA-RNA que activaría la RNAsa H endógena, la cual degradaría el ARN diana. Sus principales ventajas son su alta estabilidad, debido al que todo su esqueleto es de fosforotioato, disminuyendo los efectos secundarios. La secuencia utilizada para la inhibición del enzima L-PGDS, responsable de la síntesis de la prostaglandina antiinflamatoria 15d-PGJ₂ fue: 5'-3'- FAM/TACTCTTGAATGCAT, marcada en 3' ó 5' con fluoresceína emitiendo a 488nm.

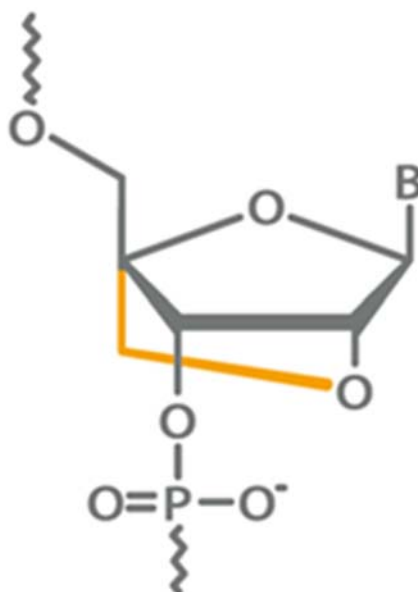


Fig. -9 Estructura de LNA, el anillo de ribosa está conectado por un puente de metileno (naranja) entre los átomos 2'-O y 4'-c, lo que "bloquea el anillo de ribosa en la conformación ideal para la unión de Watson-Crick". Cuando se incorpora a un ADN o ARN, el oligonucleótido LNA hace que el emparejamiento con una cadena de nucleótidos complementaria sea más rápido y aumenta la estabilidad del dúplex resultante.

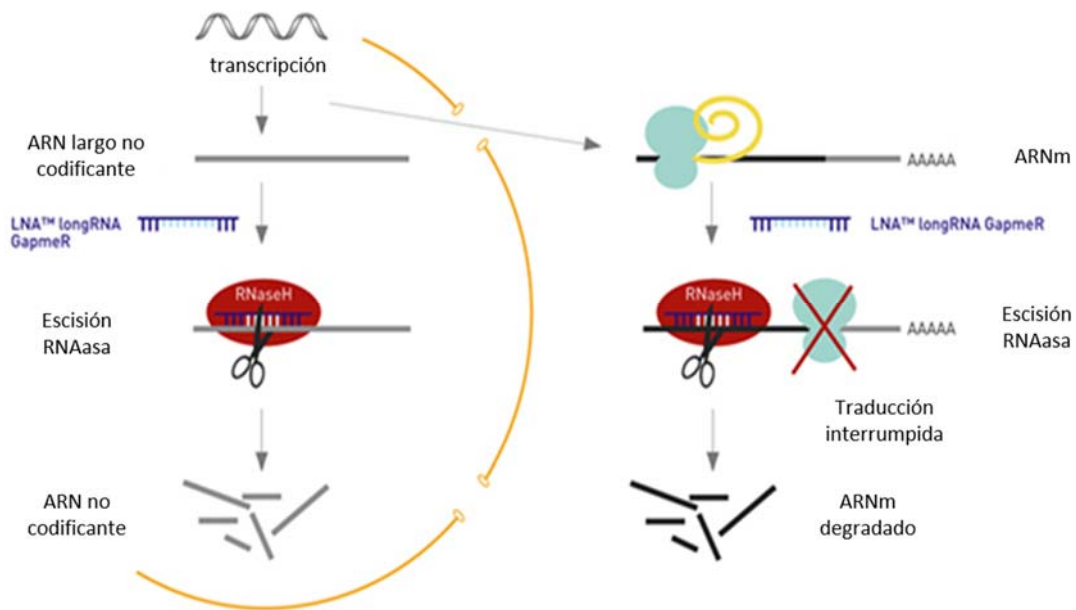


Fig. – 9. Mecanismo de acción de LNA™ ANTISENIDO GapmeR.

Liposoma:

Los liposomas construidos constituyen nanovehículos para la liberación de oligonucleótidos antisentido, en particular de GapmeRs, direccionados a PVM y permiten así llevar a cabo el silenciamiento selectivo de genes de estos macrófagos.

3.3.3 . Hibridación “*in situ*” (ISH)

Para la validación directa de la inhibición de ARNm en el experimento GapmeR, se ha optado por la utilización de la técnica de hibridación “*in situ*” (ISH). Para ello, los animales (ratas Wistar) fueron sacrificados con una

sobredosis de pentobarbital. Inmediatamente después el cerebro fue extraído, congelado en hielo seco y almacenado a -80°C. Secciones coronales de tejido cerebral de 14 µm de espesor fueron cortadas y colocadas en portaobjetos tratados con 3-aminopropil-trietoxisilano y preservadas a -40°C. Las sondas de oligonucleótidos contra los ARNm de interés fueron marcadas en el extremo 3' con 33P-dATP mediante una enzima deoxinucleotidil transferasa terminal. Para el procedimiento de la ISH, los tejidos fueron fijados con paraformaldehído (PFA) al 4% y tratados con la proteasa pronasa para facilitar la accesibilidad de la sonda al ARNm de interés. A continuación, los tejidos fueron cubiertos con el tampón de hibridación que contiene aproximadamente 1.5 nM de la sonda de oligonucleótido radioactiva y fueron incubados en cajas humedecidas a 42°C durante 24 h. Después, las secciones hibridadas fueron lavadas y expuestas a una película fotográfica durante 1-4 semanas. A continuación, los autoradiogramas fueron analizados y la densidad óptica relativa (ROD; relative optical density) en el área cerebral de interés fue obtenida utilizando un analizador de imágenes asistido por ordenador (MCID). El fondo y las inespecificidades fueron sustraídas. Las RODs se evaluaron en dos o tres secciones adyacentes por duplicado para cada rata y se promediaron para obtener los valores individuales. El analizador se usó también para la obtención de las imágenes en un pseudocolor proporcional a las RODs. Las imágenes en blanco y negro fueron tomadas en un microscopio Leica Wild 420 equipado con una cámara Nikon DXM1200F conectada al programa ACT-1. En las imágenes obtenidas se aprecian diferencias en el marcado de la sonda, en el grupo CONTROL y ausencia de este marcaje en el grupo GapmeR.

3.3.4 . Inyección intracerebroventricular (ICV)

Experimentos realizados en ratas Wistar

Para la realización de las inyecciones icv se utilizaron como referencia las coordenadas estereotáxicas previamente descritas (Galea *et al.*, 2005) y referentes al ventrículo lateral derecho.

Los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de ketamina y xilacina (2,5: 1, mg / kg, s.c.) y se emplazaron en el marco estereotáxico. Los liposomas que contienen clodronato o su vehículo de solución salina tamponada con fosfato (PBS) se infundieron lentamente en un volumen de 25 μ L (volumen adaptado del protocolo utilizado por (Serrats *et al.*, 2010) durante 10 minutos usando una jeringa Hamilton (Bonaduz, AG Switzerland®) y una aguja 26 GA a través de un inyector estereotáxico motorizado (Stoelting 53311®) en el ventrículo lateral derecho.

Experimentos realizados en ratones CL57/BL6

Para la realización de las inyecciones icv, se utilizaron las coordenadas estereotáxicas en ventrículo lateral derecho, según se ha descrito previamente (Galea *et al.*, 2005). Los animales fueron anestesiados con isofluorano.

Los liposomas que contenían clodronato o solución salina tamponada con fosfato (PBS) se infundieron lentamente en un volumen de 10 μ L (volumen adaptado del protocolo utilizado por (Galea *et al.*, 2005), durante 12,5 minutos usando una jeringa Hamilton (Bonaduz, AG Switzerland®) y una aguja 30 GA a través de un inyector estereotáxico motorizado (Stoelting 53311®) en el ventrículo lateral derecho.

3.3.5 . Extracción y preparación de extratos a partir de muestras y tejidos.

Las muestras de corteza frontal se homogeneizaron por sonicación en PBS mezclado con un cóctel de inhibidor de proteasa (Complete®, Roche Farma) (pH = 7), seguido de centrifugación a 12000 g durante 10 min a 4°C. Para

el estudio de las fracciones de proteínas nucleares o citosólicas, se llevó a cabo un procedimiento modificado basado en el método de Schreiber et al. (1989). Los tejidos se homogeneizaron con 250 μ L de tampón (composición, en mM; HEPES, 10; EDTA, 1; EGTA, 1; KCl, 10; DTT, 1; fenilmetilsulfonil fluoruro, 0,5; NaF, 5; NaVO₄, 1; sacarosa, 0.5 y Na₂MoO₄, 10, con aprotinina, 0.1 μ g / L, leupeptina, 1 μ g / L y N α -p-tosil-L-lisina-clorometilcetona, 1 μ g / mL, pH 7.9). Después de 15 minutos, se añadió Nonipet P-40 (Roche®, Mannheim, Alemania) a una concentración final de 0,5%. Los tubos se agitaron suavemente durante 15s, y los sedimentos resultantes se recogieron mediante centrifugación a 8000g durante 5 minutos. Los sobrenadantes se tomaron como una fracción citosólica y se usaron para la determinación de los niveles de proteína. El pellet se resuspendió en 70 μ L de tampón suplementado con 20% de glicerol y 0,4 mol/l de KCl, y se agitaron suavemente durante 30 minutos a 4°C. Los extractos de proteína nuclear se obtuvieron por centrifugación a 13000 g durante 5 min, y el sobrenadante se almaceno a -80°C hasta la realización de los experimentos. Todos los pasos del fraccionamiento se llevaron a cabo a 4°C.

3.3.6 . Cuantificación de proteínas y análisis por western blot (WB)

Después de ajustar los niveles de proteína en los sobrenadantes mediante el protocolo de Bradford (Bradford, 1976), se mezclaron los homogeneizados de las muestras con Laemmli (Bio Rad, CA, EE. UU.) y β -mercaptoetanol, se cargaron 15 μ l (1 μ g/ μ l) en un gel de electroforesis.

Las membranas se bloquearon en solución salina tamponada con Tris 10mM que contenía Tween-20 al 0,1% y albúmina sérica bovina al 5% (BSA) y se incubaron con anticuerpos primarios específicos a 4°C: I κ B α , HMGB-1, HSP60, p65, COX-1, Nrf2 (dilución 1 : 1000 en BSA al 1% en TBS-Tween, Santa Cruz Biotechnology, CA, EE. UU.); iNOS, COX-2 (dilución 1: 500 en BSA al 2,5% en TBS-Tween, Santa Cruz Biotechnology, CA, EE. UU.); IL-1R, IL-6R, TNFR1, TNFR2, CD14 (dilución 1: 1000 en BSA al 1% en TBS-Tween, Abcam® Cambridge, Reino Unido); TLR-4, Myd88 (dilución 1: 750 en BSA al 2,5% en

TBS-Tween, Santa Cruz Biotechnology, CA, EE. UU.); 4-HNE (dilución 1: 1000 en BSA al 1% en TBS-tween, R & D Systems[®], MN, EE. UU.), SOCS3 (dilución 1: 1000 en BSA al 1% en TBS-tween, Cell Signaling, Danvers, MA); p-STAT-3 (dilución 1: 1000 en BSA al 1% en TBS-tween, Cell Signaling, Danvers, MA). Después de lavar con TBS Tween 20, las membranas fueron con los respectivos anticuerpos secundarios durante 90 minutos a temperatura ambiente. Se tomaron imágenes de las transferencias usando un sistema Odyssey Fc (Li-COR Biosciences[®]), cuantificadas por densitometría (software NIH ImageJ[®]) y expresadas en unidades arbitrarias de densidad óptica. β -actina (dilución 1: 10000 en TBS-Tween, Sigma, Madrid, España) y GAPDH (dilución 1: 15000 en BSA al 1% en TBS-tween, SIGMA, Madrid, España) o GAPDH (dilución 1: 1000 en 1 % BSA en TBS-Tween, Santa Cruz Biotechnology, CA, EE. UU.) se usaron como control de carga.

3.3.7 . Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

El ARN total se extrajo a partir de muestras de corteza frontal usando el reactivo TRIZOL[®] (Invitrogen[®], Life Technologies, Carlsbag, CA, EE. UU) (Siguiendo la hoja de datos TRIZOL[®]); las alícuotas se convirtieron en ADN complementario usando primers hexámeros aleatorios. Los cambios semicuantitativos en los niveles de ARN mensajero (ARNm) se estimaron mediante PCR semicuantitativa.

Los cambios semicuantitativos en los niveles de ARNm se estimaron utilizando las siguientes condiciones cíclicas: 35-40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 10 segundos, hibridación entre 58 y 66°C durante 15 segundos y extensión a 72°C durante 20-50 segundos, dependiendo de la especificidad del conjunto de primers. Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de SYBR *green* presente en el mix comercial (Biotools), Llevadas a cabo en un Rotor-Gene (Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia). Las secuencias de los primers usadas para la PCR para ratón fueron:

	Forward	Reverse
<i>CCR2</i>	CACACCCTGTTTCGCTGTAG	GCAGCAGTGTGTCATTCCAA
<i>CX3CL1</i>	CATGTGCGACAAGATGACCT	TGGTGATCCAGATGCTTCAT
<i>CX3CR1</i>	CGTCACCC AGTTCATGTTC	CTCTGGCCTTCTTGCGATTC
<i>GAPDH</i>	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	ACACATTGGGGGTAGGAACA
<i>ICAM</i>	CGAAGGTGTTCTTCTGAGC	GTCTGCTGAGACCCCTCTTG
<i>IL-1</i>	TGAAATGCCACCTTTTGACA	TGTCCTCATCTGG AGGTC
<i>IL-6</i>	CTGATGCTGGTGACAACCAC	CAGAATTGCCATTGCACAAC
<i>CCL2</i>	AGGTGTCCCAAAGAAGCTGT	ACAGAAGTGCTTGAGGTGGT
<i>MMP-9</i>	CGTCGTGATCCCCACTTACT	AACACACAGGGTTTGCCTTC
<i>TNFα</i>	AGATGTGGAAGTGGCAGAGG	CCCATTTGGGAAGTCTCCT
<i>VCAM</i>	TACCAGTCCCAAATCCTG	TCTGCTAATTCAGCCTCGT

Secuencia de los primers usadas para PCR para rata fueron:

<i>IKBα</i>	TGAGGATGAGGAGAGCTATGACA	CCTCCAAACACACAGTCATCGT
<i>COX-2</i>	TGACGAGCGACTGTTCCAAA	AATGTTGAAGGTGTCGGCA
<i>m-PGES-1</i>	ACTTCCCTGGGTTTGGTGAT	GATCGTCTCCATGTCGTTGC
<i>GRS-1</i>	CAACATCCCTACCGTGGTCT	CATTCGTCTTCTCGTGGT
<i>PARK7</i>	TGGCTCACGAAGTAGGCTTT	AGGACTTTTCTTCCCCAGAGA
<i>SOD-2</i>	CCGAGGAGAAGTACCACGAG	GCTTGATAGCTCCAGCAAC

Las concentraciones relativas de ARNm se calcularon a partir del punto de despegue de las reacciones utilizando el software incluido, y los niveles de ARNm de tubulina o GAPDH se utilizaron para para normalizar los datos.

3.3.8 . Niveles de corticosterona plasmática

Los niveles de corticosterona plasmática fueron medidos a través de ELISA por un kit comercial de ENZO Life Sciences[®], La lectura óptica a través de absorbancia fue medida a través de un lector de placa Synergy 2 (BioTek[®]). Los datos se analizaron posteriormente con su software incorporado Gen5 Data Analysis Software. Los niveles de detección comprenden un rango entre 32pg/ml y 20000pg/ml con sensibilidad de 27pg/mL

3.3.9 . Niveles de prostaglandinas

Niveles de 15d-PGJ₂:

Se utilizó un kit comercial (15d-PGJ₂ EIA Kit, Assay Designs) (Forman *et al.*, 1995) basado en el método inmuno-enzimático de adsorción (EIA) La concentración de 15d-PGJ₂ presente en las muestras aisladas en las columnas se determinó por espectrofotometría en Synergy 2 (BioTek®) a 450nm, con corrección a 570nm y 590nm, según el protocolo del kit. Rango de sensibilidad del ensayo es de 36pg/mL.

Niveles de PGE₂:

La determinación de los niveles de PGE₂, (principal metabolito resultante de la acción de las ciclooxigenasas), fue realizada mediante un ensayo inmunoenzimático EIA), se utilizó un kit comercial (PGE₂ enzyme immunoassay, Amersham) (Bishai & Coceani, 1992). La concentración de PGE₂ se determinó por espectrofotometría en Synergy 2 (BioTek®) a 405nm, según las indicaciones del fabricante. Rango de sensibilidad del ensayo es de 15pg/mL.

3.3.10 . Inmunofluorescencia

Con el fin de validar el modelo de depleción de los PVM, y comprobar que no hay depleción de otros tipos celulares con capacidad fagocítica en determinadas condiciones como la microglia, se han realizado experimentos de inmunofluorescencia.

Los cerebros fueron perfundidos con solución salina y paraformaldehído (PFA) al 4%, cortados histológicamente a 30µm, embebidos en líquido anticongelante a -40°C, hasta su posterior utilización. En un primer momento los cortes recibieron tres lavados con KPBS 0,02M (pH= 7,4), por 5 minutos a RT. Para eliminar la autofluorescencia fueron incubados con glicina 10mM, durante 20 minutos a RT, recibieron otros tres lavados de KPBS e inmediatamente fueron bloqueados con BSA 10%, disuelta en KPBS con tritón 0,1%, por 30 minutos. Los cortes fueron incubados con los correspondientes anticuerpos primarios "*over night*" (O.N.), diluidos en la solución de bloqueo, tras 3 lavados de KPBS recibieron los correspondientes anticuerpos secundarios durante una hora a RT. Finalmente recibieron tres lavados con KPBS, y un último lavado con agua desionizada, durante 5 minutos. Después de secarlos, los cortes recibieron medios de montaje Fluoroshield® (Sigma Aldrich). Conteniendo 4', 6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI). Las secciones se cubren con cubreobjetos y se congelan a -20°C o se visualizan inmediatamente en un microscopio de epifluorescencia TI-FL Epi-fl Illuminator® de alto rendimiento Nikon Eclipse Ti Series. Se obtuvieron imágenes confocales en el microscopio confocal Olympus FV1200. Las imágenes se procesaron para ajustar el brillo, el contraste y fusionar imágenes en el paquete de procesamiento "Fiji". Anticuerpos primarios: CD163(sc 58965) 1:1000, IBA1(ab5076) 1:500. Anticuerpos secundarios: AlexaFluor®488 IgG Goat Donkey Life Technologies (A11055) 1:1000, AlexaFluor®555 IgG Mouse Donkey Life Technologies (A31570) 1:1000.

3.3.11 . Determinación de citocinas en tejido cerebral.

Los niveles de citocinas en muestras de la corteza frontal se determinaron usando ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas comerciales (RayBiotech®) siguiendo las directrices del fabricante. La cuantificación se realizó usando una curva estándar de aumento de las concentraciones de citocinas. La densidad óptica se midió usando un lector de microplacas (Synergy 2; BioTek Instruments) ajustado a 450 nm. IL-1 β (Cat. ELR-IL1b-CL, dilución 1: 3), TNF- α , (Cat. ELR-TNF α -CL, dilución 1: 3), e IL-6 (Cat. ELR-IL6-CL, sin dilución).

3.3.12 . Citometría de flujo

Para la identificación de las células procedentes del tráfico de células inmunes por citometría de flujo en ratones (C57/BL6) tanto en tejido cerebral como en sangre, se adaptó un protocolo descrito previamente por (McKim *et al.*, 2017).

Cerebro: Los cerebros fueron previamente perfundidos con una solución de PBS (pH 7,4) fría. Posteriormente se homogeneizaron en PBS, pH 7,4. Los homogeneizados resultantes se centrifugaron a 900g durante 6 minutos. Los sobrenadantes se eliminaron y los sedimentos celulares se volvieron a suspender en Percoll isotónico al 35% (GE-Healthcare). Se centrifugó a 2000g durante 20 minutos. Estudios previos han demostrado que las células aisladas por gradiente de densidad de Percoll producen una viabilidad de alrededor de 90% para células CD11b+(células de origen mieloide) (Wohleb *et al.*, 2011; Wohleb *et al.*, 2013). Las células fueran incubadas con los anticuerpos por 15 minutos en RT, luego lavadas con una solución de PBS conteniendo 0,2% de BSA y 0,09% de azida de sodio, posteriormente fijadas a PFA 1%, durante 15 minutos a 4°C en oscuridad, lavadas y resuspendidas en la misma solución conteniendo BSA y azida de sodio, fueron mantenidas a 4°C, hasta el momento del ensayo en el citómetro de flujo (*Beckman Coulter* Galios).

Sangre: La sangre utilizada para el estudio de citometría fue extraída por punción cardiaca, para prevenir la coagulación y agregación celular se utilizó EDTA 0,342M. La sangre fue fijada en transfix[®] y mantenidas a 4°C, (100µl/ml) para preservar la integridad celular hasta el momento del ensayo. Los anticuerpos conjugados utilizados tanto para tejido como para sangre, fueron diluidos en PBS 1x (pH 7,4) (dilución utilizada 1:50): LY6G -APC-CY7 BioLegend, Cat 127624, LY6C PE-Cy7 BioLegend Cat 128018, CD11b- APC (eBioscience 17-0112-82), CD206-PE (eBioscience 12-0452-82), CD3-FITC (eBioscience 11-0032-82), CD45-PerCP-Cy5.5 (eBioscience 45-0451-82). Para el bloqueo de las uniones inespecíficas fueron utilizados Fc Block Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (BioLegend Cat 553141) contenido en el mismo mix de los anticuerpos. Para la compensación de las fluorescencias conjugadas a los anticuerpos fue utilizada la metodología “*UltraComp Beads*” (ThermoFisher Cat 01-2222-42).

3.3.13 . Test comportamental

“Open field” o campo abierto (ansiedad y locomoción)

El “*Open field*” como test de comportamiento fue utilizado para evaluar un comportamiento similar al de la ansiedad, así como la actividad locomotora. Este test presenta alto grado de validez para demostrar ambos parámetros. (Seibenhener & Wooten, 2015). Para la prueba del campo abierto, los ratones fueron colocados en la lateral de una arena, midiendo (45cmx 45cm) y su actividad fue grabada durante 5 minutos.

Los ratones con comportamiento similar a la ansiedad gastan menos tiempo en la zona central de la caja (zona del centro delimitada de 36 cm x 36 cm) y/o de igual manera, mayor tiempo en las esquinas (con una zona delimitada de 9cm x 9 cm), además de entrar al centro del campo abierto más lentamente. La actividad locomotora se mide a partir de la distancia recorrida por el animal, que suele ser reducida. El comportamiento fue analizado utilizando el programa ANY-Maze Behavioural tracking software[®].

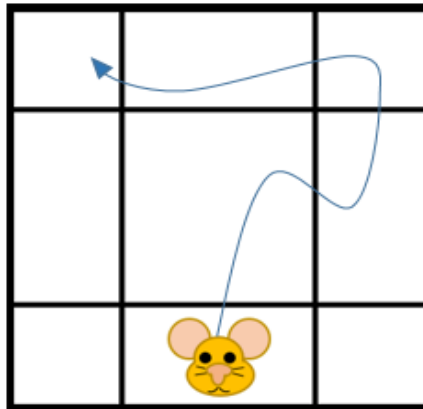


Fig.12- Figura representativa de zonas demarcadas en el test “open field”

“Social interaction” o interacción social (“sickness behaviour”)

Para evaluar el “sickness behaviour” se ha realizado el test “*Social interaction*”, utilizando una arena con dimensiones 45cm x 45cm, donde al fondo de manera centralizada se coloca una caja de metacrilato perforada conteniendo un individuo joven (aproximadamente 3 semanas) de la misma especie y se establece una zona de contacto de alrededor de la caja de 6,5 cm. La actividad del animal estudiado es grabada durante 5 minutos, y el tiempo de interacción entre los dos individuos es considerada para la evaluación de un comportamiento de tipo depresivo. De la misma manera que en el test anterior, el tiempo transcurrido en las esquinas también es un parámetro a considerar (Corona *et al.*, 2010). El comportamiento fue analizado utilizando el programa ANY-Maze Behavioural tracking software®.

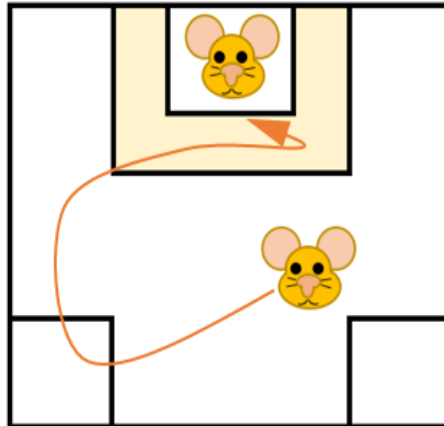


Fig.13- Figura representativa de las zonas demarcadas marcadas en el test de interacción social.

3.3.14 . Análisis estadísticos

Los datos se expresan como media \pm EEM (error estándar de la media). Para comparaciones múltiples, se utilizó un ANOVA de dos vías y se aplicó la prueba post hoc de Tukey en caso de interacción significativa, considerando como el primer factor la presencia o ausencia de estrés o LPS, y como segundo, la presencia o ausencia de clodronato icv. Un valor de $p < 0.05$ se definió como estadísticamente significativo.

También se realizó ANOVA de una vía para el estudio de los cursos temporales de prostaglandinas tras la administración aguda de LPS. En el caso de haber diferencias entre los grupos, se realizó un post hoc Tukey. Un valor de $p < 0.05$ se definió como estadísticamente significativo.

4 . RESULTADOS

4.1 . Validación de la depleción selectiva y efectos sobre la microglía

Depleción selectiva PVM:

La depleción de los macrófagos perivasculares a través de la encapsulación de clodronato en liposomas y su administración icv es un protocolo estandarizado y de utilización extendida en los trabajos previos realizados que investigan el origen, naturaleza y función de estas células (Faraco *et al.*, 2017). La validación de este modelo en el laboratorio en el que se ha desarrollado esta Tesis Doctoral puede ser observada en las siguientes imágenes obtenidas con el microscopio confocal (Fig.14), en las que se recoge la inmunotinción del marcador celular para PVM CD163 en cortes cerebrales de los distintos grupos de animales.

Se puede apreciar la ausencia de macrófagos perivasculares y meníngeos en ratas tratadas con clodronato icv en liposomas en condiciones control. Inmunofluorescencia del marcador celular CD163 (rojo) en las meninges (Fig.14A, C) y la vasculatura parenquimal (Fig.14B, D). En todos los casos, tinción con DAPI azul en el núcleo. Las flechas indican la detección de macrófagos meníngeos (Fig.14A) y perivasculares (Fig.14B) en animales control sin administración de clodronato.

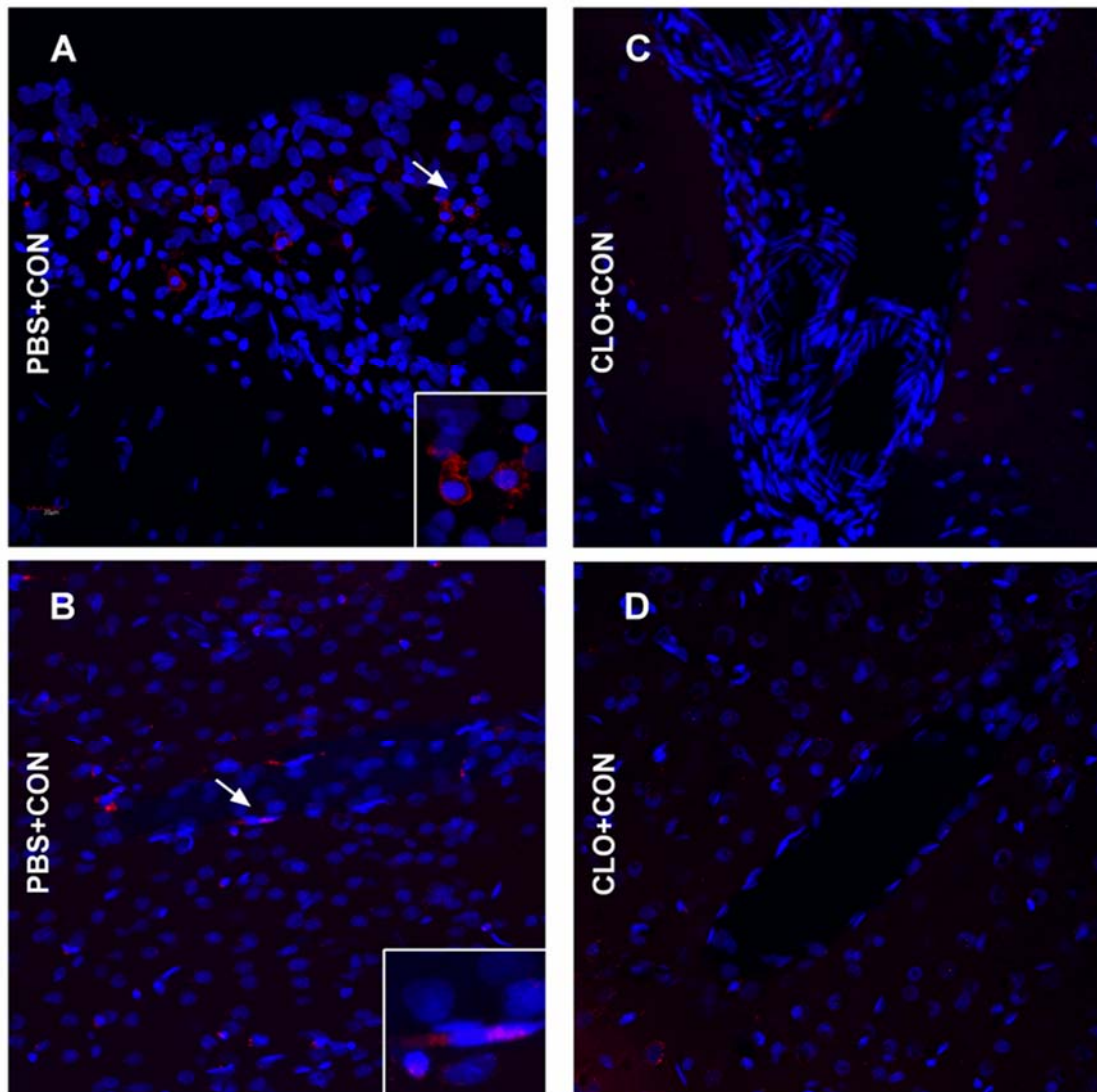


Fig.14. Inmunofluorescencia del marcador celular CD163 (rojo) en las meninges (A, C) y la vasculatura parenquimal (B, D). Tinción con DAPI azul en el núcleo. Las flechas indican la detección de macrófagos meníngeos (A) y perivasculares (B).

Efecto sobre la microglía:

En este estudio y en estudios previos de otros autores no se han detectado alteraciones muy evidentes en el número de células microgliales que expresan su típico marcador iba1 después de la administración de CLO (Polfliet *et al.*, 2001; Faraco *et al.*, 2017; Pedragosa *et al.*, 2018). Un aspecto que contribuye a la selectividad en la depleción de los macrófagos perivasculares con respecto a la microglía además de la presencia de manosa en su composición, está relacionado con las características físicas en la construcción de los liposomas.

Estos liposomas poseen un diámetro de $3 \mu\text{m}^3$, lo que provoca que solo una célula con capacidad fagocítica constitutiva como los PVMs sea capaz de fagocitar dichas vesículas (Galea *et al.*, 2005). En nuestras condiciones experimentales hemos podido observar la falta de alteraciones evidentes en el número de células microgliales después de la administración central de clodronato, a través de inmunofluorescencia del marcador microglial iba1 (verde) en ratas tratadas con la administración central de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en CONTROL (Fig. 15A, C) y condiciones de estrés agudo inmovilización (ESTRÉS 6 H) (Fig. 15B, D).

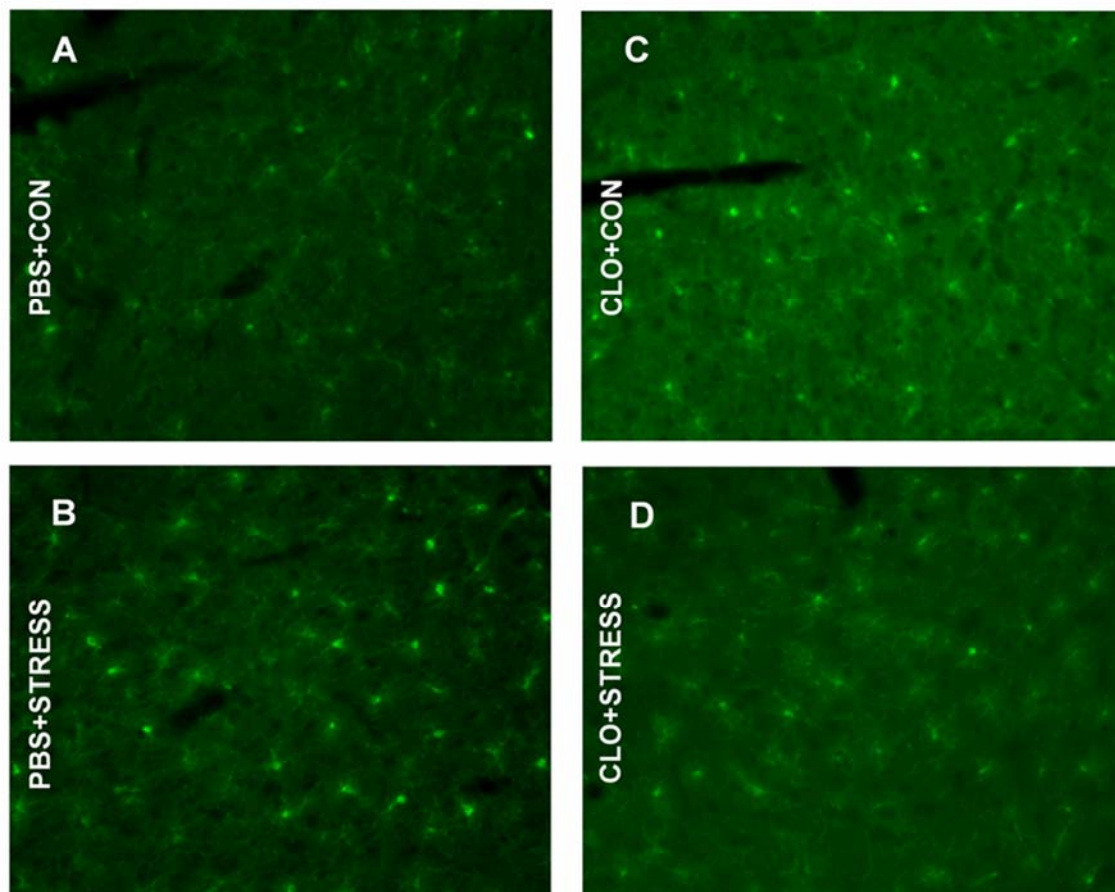


Fig. 15- Inmunofluorescencia del marcador microglial iba1 (verde) en ratas tratadas con la administración central de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en condiciones CONTROL (2A, 2C) y tras la exposición a estrés agudo (6h) por inmovilización (STRESS) (2B, 2D).

4.2 . Estrés agudo por inmovilización

4.2.1 . Niveles de corticosterona en plasma tras la exposición al estrés por inmovilización durante 6 horas.

Los niveles de corticosterona son habitualmente utilizados como marcador de activación del eje HHA del estrés. Se ha evaluado sus niveles tras 6 horas de estrés agudo por inmovilización. Se ha podido observar una tendencia al aumento de los niveles del grupo ESTRÉS 6 H, con respecto al grupo control, aunque no significativo. (Fig. 16 y tabla 1).

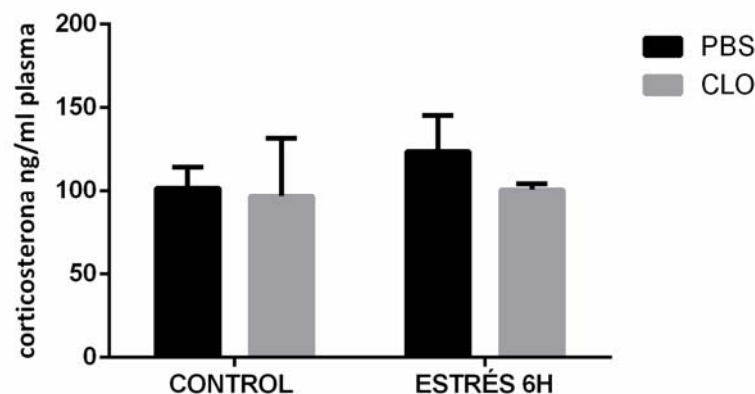


Fig.16. Niveles de corticosterona plasmática E ratas tratadas con clodronato encapsulado en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en CONTROL y condiciones de estrés agudo por inmovilización (ESTRÉS 6H), Los datos representan la media muestral + EEM de 3-5 animales por grupo

4.2.2 . Efectos de la depleción de PVM en la expresión de citocinas proinflamatorias clásicas y sus receptores en condiciones de estrés agudo por inmovilización.

Una de los primeros eventos de la neuroinflamación inducida por el estrés agudo es la activación de citocinas proinflamatorias, como por ejemplo TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Garcia-Bueno *et al.*, 2008a). En nuestras condiciones experimentales, los niveles de IL-1 β e IL-6 aparecieron sin diferencias significativas entre los distintos grupos (según ANOVA de dos vías (Figuras 17A-B). Sin embargo, en el caso de TNF α se encontró un efecto principal para el tratamiento con CLO (Fig. 17C y Tabla 1). Los niveles de TNF α aparecieron disminuidos en animales sin PVM tanto en condiciones control como tras estrés agudo (Fig. 17C).

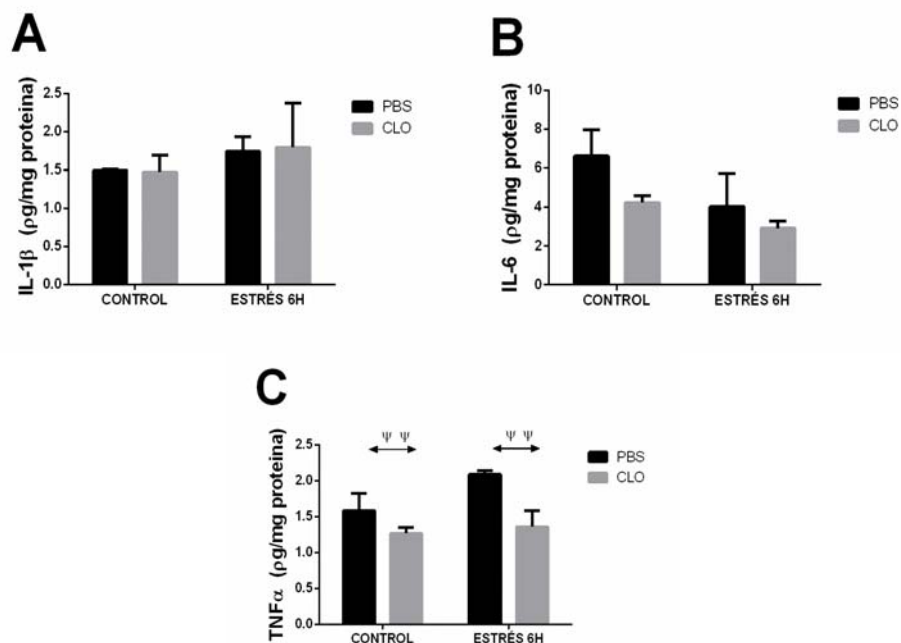


Fig.17- Niveles de citocinas proinflamatorias de IL-1 β (A), IL-6 (B) y TNF α (C). Análisis realizado a través de ELISA en muestras de corteza frontal de ratas tratadas con clodronato encapsulado en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en CONTROL y condiciones de estrés agudo por inmovilización (ESTRÉS 6H), Los datos representan la media muestra +EEM de 3-5 animales por grupo ; Ψ $p < 0,05$ efecto del tratamiento CLO en análisis ANOVA de dos vías.

Se observó un efecto principal del estrés para el receptor de IL-1 β , IL-1R, en sus niveles de proteína (Figura 18A y Tabla 1). En el caso del receptor de IL-6, IL-6R, se observó un efecto del tratamiento con CLO y una interacción entre factores (estrés x tratamiento con CLO) (Fig. 18B y Tabla 1). Post-tests complementarios de comparaciones múltiples para la expresión de la proteína IL-6R mostraron que el grupo CLO + ESTRÉS 6H presentó niveles aumentados de manera significativa en comparación con el resto de los grupos (Fig. 18B y

Tabla 1). Para los receptores de TNF α , se observó una interacción (estrés x tratamiento CLO) para los niveles de proteína de TNFR1 y efectos principales para el estrés, tratamiento CLO e interacción en el caso de la proteína TNFR2 (Figs. 18C, D y Tabla 1). El análisis post-test de comparaciones múltiples mostró que los niveles de proteína TNFR2 fueron significativamente más bajos en el grupo PBS + CONTROL en comparación con el resto de grupos de animales, sin diferencias entre ellos (Fig. 18D y tabla 1).

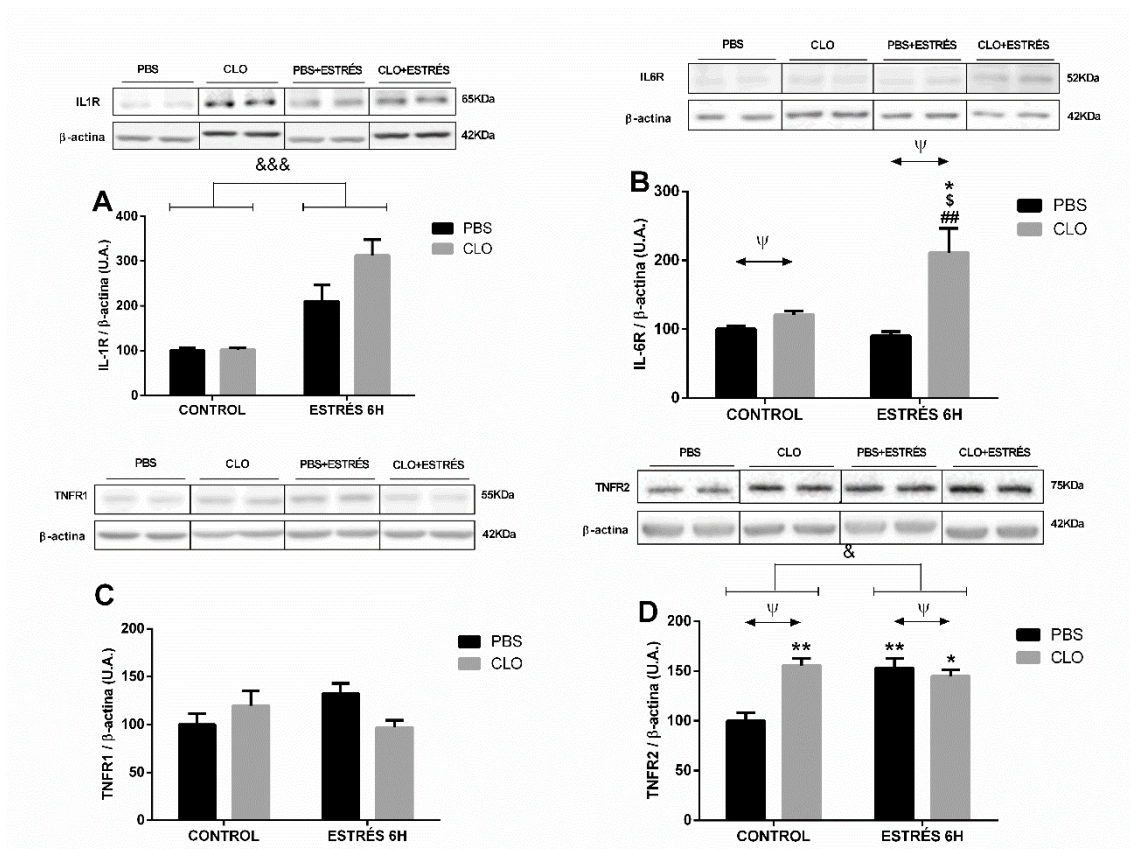


Fig.18 - Niveles de expresión proteica de los receptores IL-1R(A), IL-6R(B), TNFR1 (C) y TNFR2 (D) en corteza frontal de ratas tratadas con la administración de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en condiciones de CONTROL y estrés agudo por inmovilización (ESTRÉS 6H), los datos densitométricos de las respectivas bandas de interés están normalizados con respecto a la β -actina (banda inferior). Se recortaron las imágenes del Western Blot (líneas negras) para mejorar la claridad y la concisión de la presentación. Los datos representan la media muestral + EEM de 3-5 animales por grupo. & p < 0.05, &&& p < 0.001 efecto del estrés en el análisis ANOVA de dos vías entre grupos; Ψ p < 0.05 efecto principal del tratamiento CLO en análisis ANOVA de dos vías entre grupos; En caso de interacción, post test de Tukey: * p < 0.05 Vs grupo PBS + CONTROL; ** p < 0.01 Vs grupo PBS + CONTROL; \$ p < 0.05 Vs grupo CLO + CONTROL y ## p < 0.01 Vs PBS + ESTRÉS 6H.

4.2.3 . Efectos de la depleción de PVM en la expresión de mediadores pro-inflamatorios de la vía de señalización JAK/STAT.

Para seguir estudiando la señalización de citocinas proinflamatorias, se exploró el estado de los elementos de la vía JAK / STAT, clásicamente implicada en respuestas agudas a estímulos inflamatorios relacionados con la producción de citocinas a nivel vascular (Rivest *et al.*, 2000). En el análisis de la expresión proteica de pSTAT-3 a nivel nuclear se encontró un efecto principal para el tratamiento con CLO y una interacción entre los factores (Fig. 19A y Tabla 1). El análisis complementario de comparaciones múltiples mostró que la exposición a estrés agudo aumentó pSTAT-3 en el grupo de animales con macrófagos perivasculares intactos, pero no en los animales sin PVM. Además, los animales CLO+CONTROL presentaron los niveles más altos de pSTAT-3 en comparación con el resto de los grupos. En el caso de la proteína inhibidora de esta vía, SOCS3, el ANOVA de dos vías también encontró un efecto principal para el tratamiento con CLO e interacción (Fig. 19B y Tabla 1). La expresión de SOCS3 fue menor en el grupo CLO + ESTRÉS 6H comparado con los animales PBS + ESTRÉS 6H.

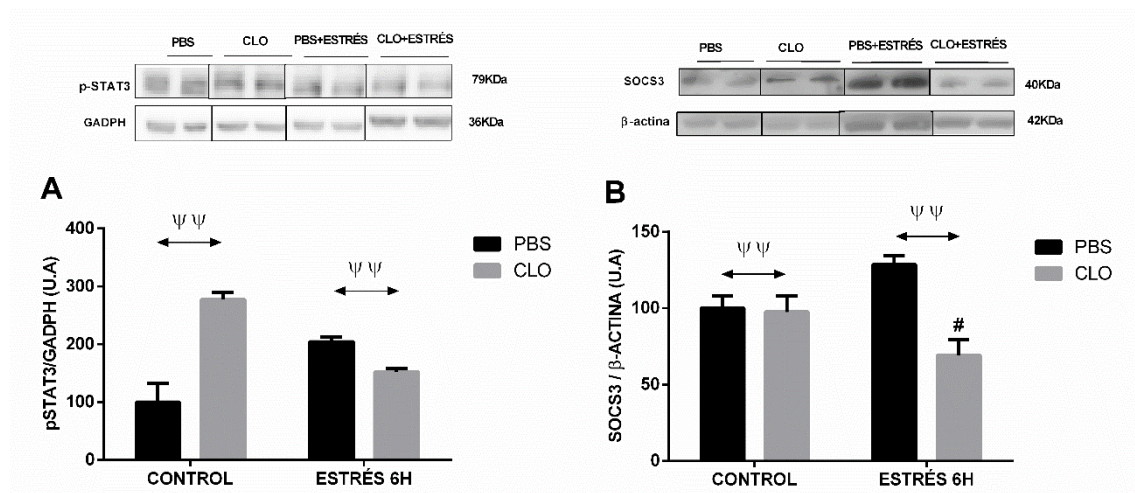


Fig.19- Niveles de expresión proteica a través WB de los elementos de la vía de señalización JAK/STAT, pSTAT-3 (A) y SOCS3 (B) en muestras de corteza frontal de ratas tratadas con la administración de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en condiciones de CONTROL y tras estrés agudo por inmovilización (ESTRÉS 6H). Los datos densitométricos de las respectivas bandas de interés están normalizados con respecto a la β -actina (banda inferior) y GAPDH en el caso de núcleo. Se recortaron las imágenes del Western Blot (líneas negras) para mejorar la claridad y la concisión de la presentación. Los datos representan la media muestral + EEM de 3-5 animales por grupo, Ψ $p < 0,05$ efecto principal del tratamiento CLO en análisis

ANOVA de dos vías entre grupos; En caso de interacción, post test de Tukey: #p <0,05 Vs grupo PBS + ESTRÉS 6H.

4.2.4 . Efectos de la depleción de los PVM sobre la vía de señalización del receptor de inmunidad innata Toll-Like 4 (TLR-4) en condiciones de estrés agudo por inmovilización.

La activación de la vía de señalización de TLR-4 después de la exposición aguda al estrés por inmovilización (Garate *et al.*, 2013) se ha relacionado con la secreción de diferentes mediadores inflamatorios. Por lo tanto, exploramos a distintos niveles si la depleción selectiva de PVM podría estar relacionada con los cambios en esta importante vía de señalización proinflamatoria.

En primer lugar, estudiamos los niveles de proteína de TLR-4, del receptor para la diferenciación del clúster dímero LPS/proteína de unión (LBP) 14 (CD14), del co-receptor factor de diferenciación mieloide-2 (MD-2) y de la proteína adaptadora de diferenciación mieloide respuesta primaria 88 (MyD88). El ANOVA de dos vías de la expresión proteica de TLR-4 encontró un efecto principal del estrés (figura 20A y Tabla 1). En el caso de CD14, se encontraron efectos del estrés y del tratamiento con CLO (Fig. 20B y Tabla 1). Para MD-2 se detectó un efecto del tratamiento con CLO (Fig. 20C y Tabla 1) y finalmente, se observó efecto del tratamiento con CLO e interacción con respecto a los niveles proteicos de MyD88 (Fig. 20D y Tabla 1). El análisis adicional de esta interacción mostró que los niveles de proteína MyD88 se incrementaron en el grupo ESTRÉS 6H + PBS en comparación con los grupos PBS + CONTROL y CLO + ESTRÉS (Fig. 20D).

TLR-4 también puede ser estimulado por la acción de patrones moleculares endógenos asociados a daño (DAMP), tales como la proteína del grupo de alta movilidad 1 (HMGB-1) y la proteína de choque térmico 60 (HSP60). El ANOVA de dos vías aplicado para el estudio de los niveles de proteína de ambos mediadores mostró un efecto para el tratamiento con CLO solo para HMGB-1. Los niveles de HMGB-1 aparecieron disminuidos en animales sin PVM en control y tras estrés agudo (Fig. 20E y Tabla 1).

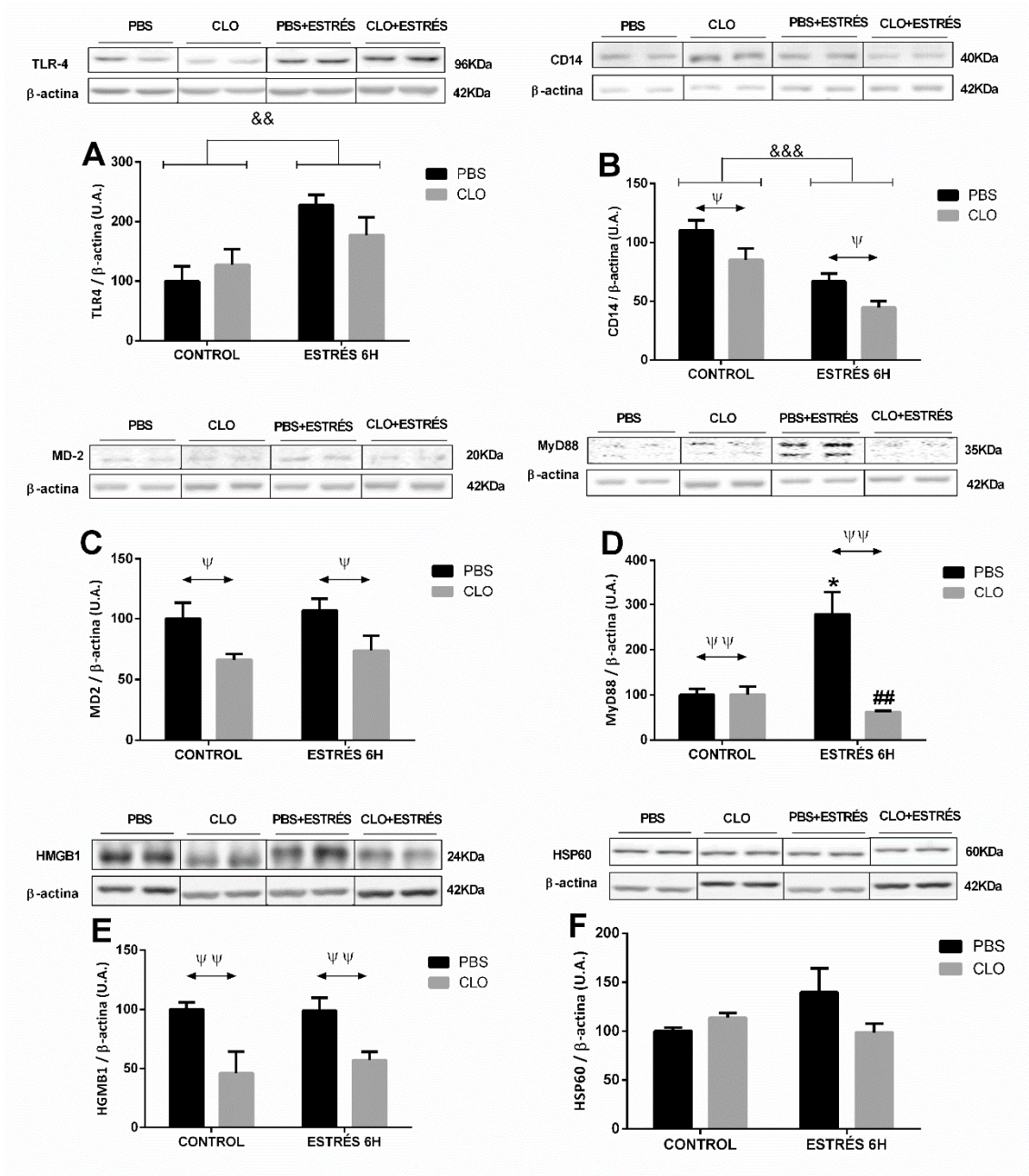


Fig.20- Niveles de expresión proteica de TLR-4 (A), CD14 (B), MD-2 (C), MyD88 (D), HMGB-1 (E) y HSP60 (F) en la corteza frontal de ratas tratadas con la administración de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en condiciones de Control (CONTROL) y estrés agudo por inmovilización (STRESS). Los datos densitométricos de las respectivas bandas de interés están normalizados con respecto a la β -actina (banda inferior). Se recortaron las imágenes del Western Blot (líneas negras) para mejorar la claridad y la concisión de la presentación. Los datos representan la media muestral + EEM de 3-5 animales por grupo. $\Psi\Psi$ p < 0.01, $\Psi\Psi\Psi$ p < 0.001 efecto principal del estrés en el análisis ANOVA de dos vías entre grupos; Ψ p < 0.05, $\Psi\Psi$ p < 0.01 efecto principal del tratamiento CLO en análisis ANOVA de dos vías entre grupos; En caso de interacción, post test de Tukey; ## p < 0.01 Vs grupo PBS + ESTRÉS 6H.

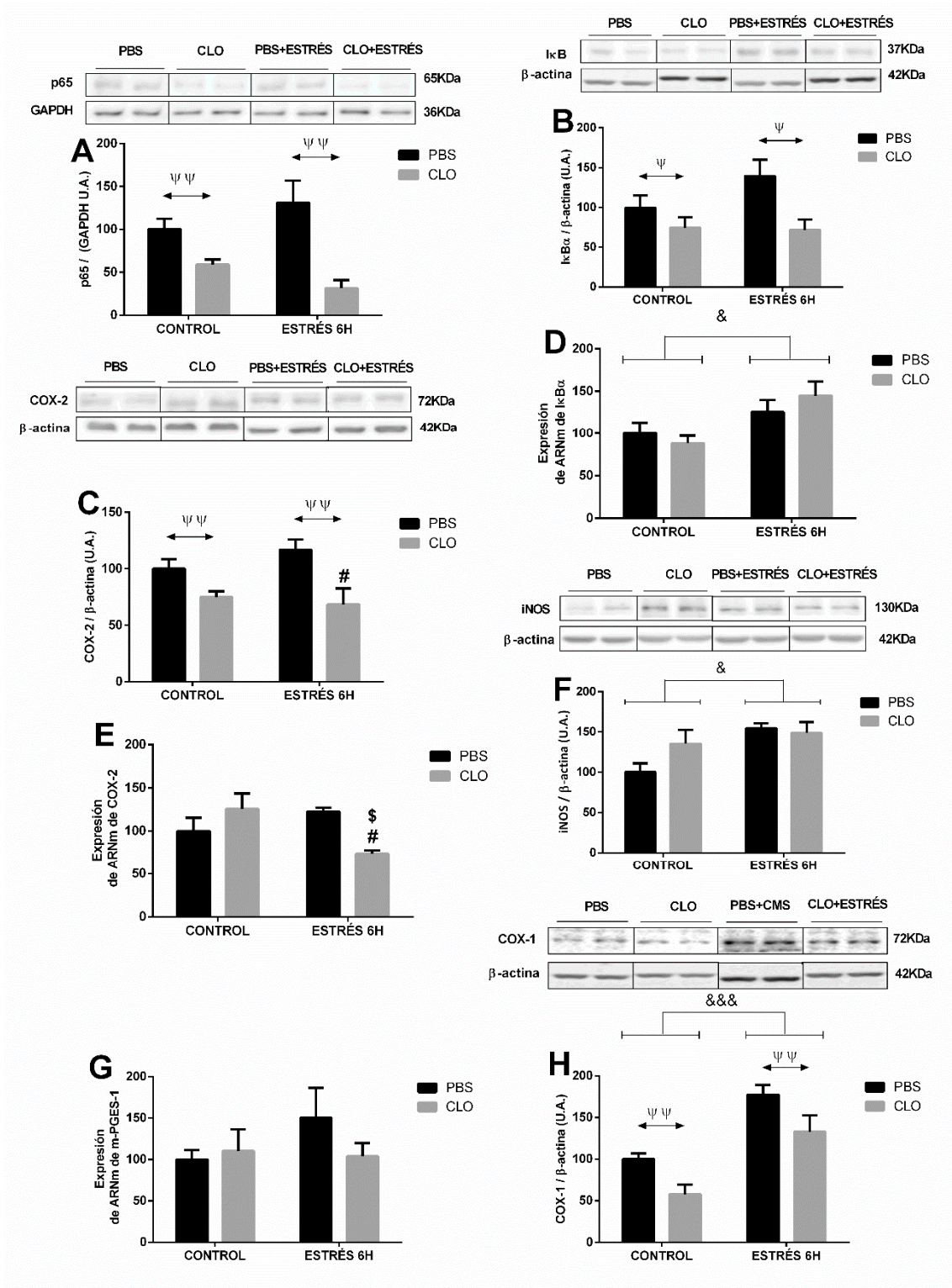
4.2.5 . Efectos de la depleción de PVM en la vía de señalización del factor Nuclear kappa B (NF- κ B) en condiciones de estrés agudo por inmovilización.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta ahora, se evaluó si las posibles alteraciones en la vía pr-inflamatoria dependiente de TLR-4 / Myd88 también estaban presentes a nivel de NF- κ B. Por lo tanto, analizamos la expresión de ARNm y proteína de la subunidad p65 de NF- κ B, su proteína inhibidora I κ B α y las enzimas proinflamatorias dependientes de NF- κ B, ciclooxigenasa 2 (COX-2) y la NO sintasa inducible (iNOS) y finalmente, los niveles de prostaglandinas pro y antiinflamatorias derivadas de la actividad conjunta de las enzimas ciclooxigenasas y de las respectivas enzimas prostaglandina sintasas específicas de tejido.

El ANOVA de dos vías mostró un efecto principal del tratamiento con CLO en los niveles de proteína de NF- κ B, I κ B α y COX-2, respectivamente (figuras 21A, B, C y Tabla 1). Se encontró un efecto principal del estrés para el ARNm de I κ B α y la proteína de iNOS (figuras 21D, F y Tabla 1). Finalmente, se pudo observar una interacción entre factores para los niveles de ARNm de COX-2 (figura 21E y Tabla 1). El análisis complementario de comparaciones múltiples para esta interacción mostró que los niveles de ARNm de COX-2 fueron significativamente más bajos en el grupo CLO+ESTRÉS 6H en comparación con los grupos CLO+CONTROL y PBS+ESTRÉS 6H, respectivamente (Fig. 21E y Tabla 1).

Como describen algunos estudios, los PVM son los principales reguladores de la producción de la prostaglandina proinflamatoria PGE₂ (Faraco *et al.*, 2017) y, en consecuencia, también estudiamos la expresión de las otras enzimas implicadas en su síntesis, ciclooxigenasa 1 (COX-1) y Prostaglandina E₂ sintasa-1 microsomal (m-PGES-1) en nuestros grupos experimentales. El ANOVA de dos vías no encontró cambios en la expresión de mPGES-1 entre todos los grupos analizados, sin embargo, se encontraron efectos principales del estrés y el tratamiento con CLO para los niveles de proteína COX-1 (Figuras 21G, H y Tabla 1). Con respecto a las prostaglandinas se ha observado un efecto

del estrés en los niveles de la prostaglandina antiinflamatoria 15d-PGJ₂ en corteza (Fig. 21I y Tabla 1) y no se encontraron cambios significativos en los niveles de PGE₂ entre los distintos grupos a estudio. (Fig. 21J y Tabla 1).



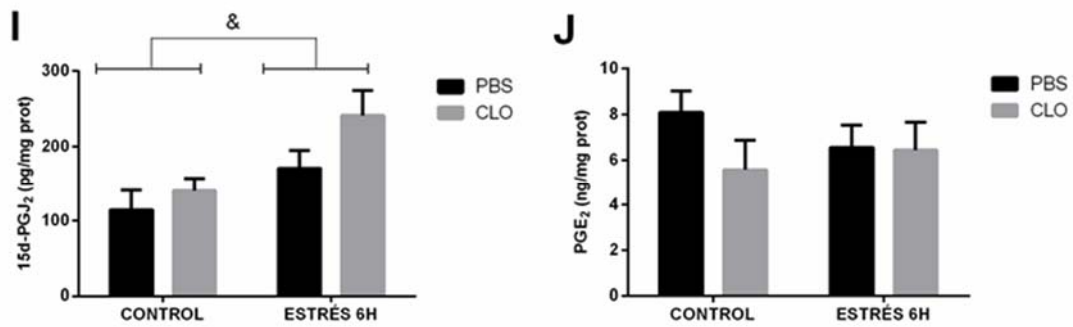


Fig.21- Expresión proteica de la subunidad p65 de NF-κB en extractos nucleares (A), IκBα en extractos citosólicos (B), COX-2 (C), iNOS (F) y COX-1 (H) en la corteza pre frontal de ratas tratadas con la administración de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en condiciones de CONTROL y estrés agudo de restricción (ESTRÉS 6H), Expresión de ARNm de IκBα (D), COX-2 (E) y mPGES-1 (G) en la corteza frontal de ratas tratadas con la administración de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en CONTROL y condiciones de estrés agudo por inmovilización (ESTRÉS 6H). Análisis realizado a través de WB, los datos densitométricos de las respectivas bandas de interés están normalizados con respecto a la β-actina, excepto por la subunidad (A) de p65 de NF-κB en la que se utilizó la proteína nuclear GAPDH1 (banda inferior). Niveles de 15d-PGJ₂ (I) y de PGE₂ (J) en corteza frontal en los diferentes grupos estudiado. Se recortaron las imágenes del Western Blot (líneas negras) para mejorar la claridad y la concisión de la presentación. Los datos representan la media muestral+ EEM de 3-5 animales por grupo. & p < 0.05; &&& p < 0.001 efecto del estrés en el análisis ANOVA de dos vías entre grupos; Ψ p < 0,05; ΨΨ p < 0,01 efecto del tratamiento CLO en el análisis ANOVA de dos vías entre los grupos. En caso de interacción, post test de Tukey: \$ p < 0,05 Vs grupo CLO + CONTROL y #p < 0,05 Vs grupo PBS + ESTRÉS 6H.

4.2.6 . Efecto de la depleción de los PVM en los marcadores de estrés oxidativo/nitrosativo y en sus mecanismos antioxidantes reguladores en un modelo de estrés agudo por inmovilización

Teniendo en cuenta el potencial previamente sugerido de los PVM en la regulación de los mecanismos antioxidantes endógenos, intentamos explorar su papel en nuestro modelo de restricción de movimiento agudo, una condición en la que la sobreactivación de las enzimas proinflamatorias produce estrés oxidativo/nitrosativo.

Primero, verificamos los niveles del marcador de estrés oxidativo/nitrosativo, 4-hidroxinonenal (4-HNE). El ANOVA de dos vías encontró una interacción entre factores (Fig. 22A y Tabla 1). El análisis de comparaciones múltiples complementarias mostró que los animales PBS+ESTRÉS 6H

presentaban niveles significativamente más altos de grupos 4-HNE que PBS + CONTROL y CLO + ESTRÉS 6H, respectivamente (Fig. 22A y Tabla 1).

Posteriormente, se exploró la expresión proteica del factor nuclear tipo 2 (derivado de eritroide 2) (Nrf2) de perfil antioxidante y la expresión de ARNm de enzimas antioxidantes endógenas que dependen de su activación. El ANOVA de dos vías mostró efectos principales del estrés y el tratamiento con CLO para la expresión de la proteína Nrf2 (figura 8B y tabla 1). El ANOVA de dos vías también mostró un efecto principal del estrés en la expresión de los enzimas glutatión reductasa (GSR-1), desglucasa asociada al parkinsonismo (PARK7) y superóxido dismutasa 2 (SOD-2) (Figuras 22C-E y Tabla 1). Además, se encontró un efecto del tratamiento CLO para GRS y una interacción para PARK7. El análisis adicional de esta interacción entre los grupos mostró que la expresión de ARNm de PARK7 en animales CLO + ESTRÉS 6H fue mayor que el resto de los grupos estudiados (Fig 22D y Tabla 1). No hubo diferencias significativas en la expresión de mRNA de catalasa entre los grupos (datos no mostrados).

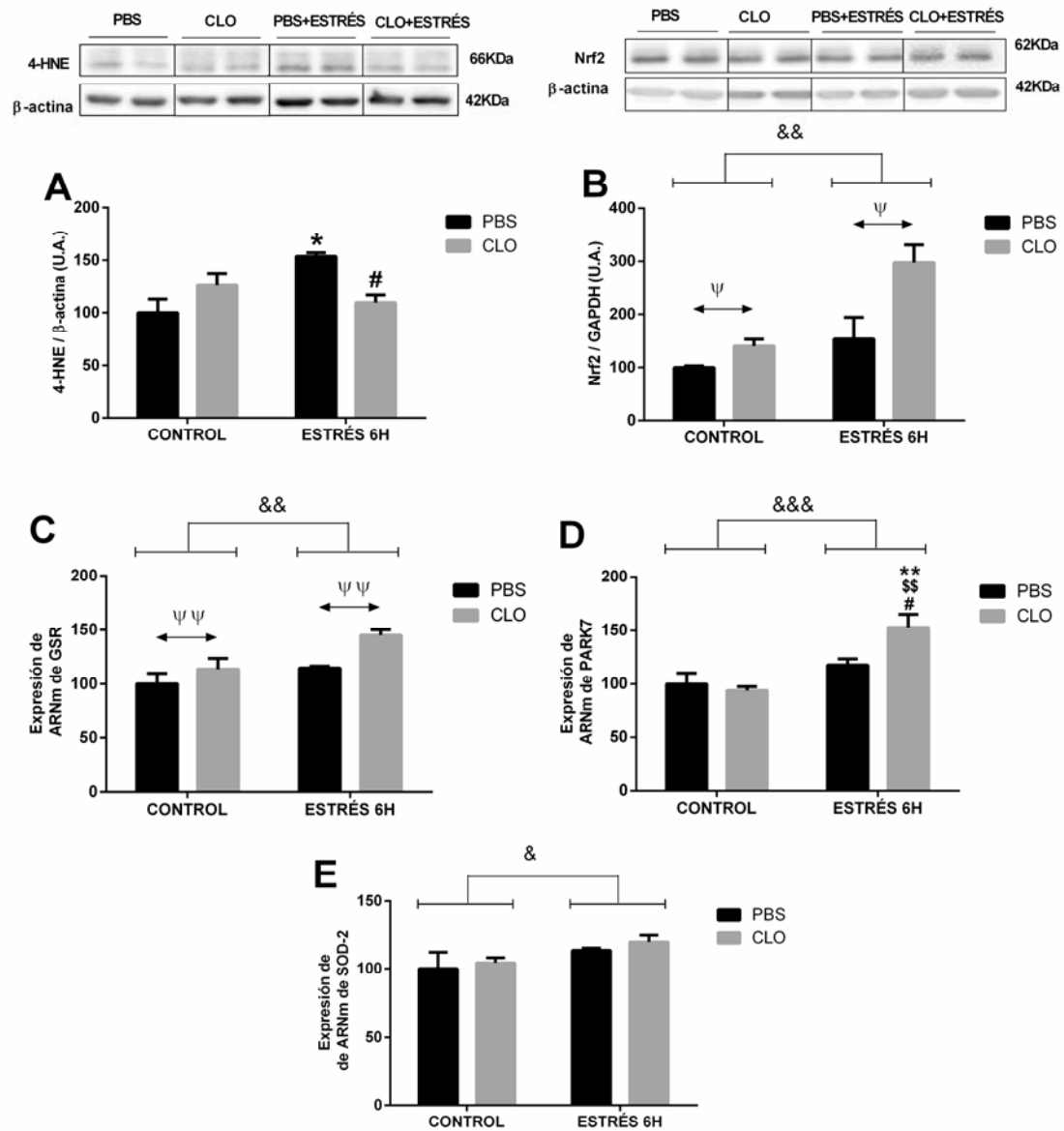


Fig.22- Expresión proteica de 4-HNE (A) y Nrf2 en extractos nucleares (B) y expresión de ARNm de GRS-1 (C), PARK7 (D) y SOD-2 (E) en la corteza pre frontal de ratas tratadas con la administración central de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en condiciones de CONTROL y estrés agudo de restricción (ESTRÉS 6H). En el análisis de transferencia western para la expresión de proteínas, los datos densitométricos de la banda 4-HNE se normalizan con respecto a la β -actina, y para la proteína nuclear Nrf2 (A) se utilizó GAPDH1 (banda inferior). Se recortaron blots (líneas negras) para mejorar la claridad y la concisión de la presentación. Las barras representan la media + EEM de 3-5 animales por grupo. & p <0.05, && p <0.01, &&& p <0.001 efecto principal del estrés en el análisis ANOVA de dos vías entre grupos; Ψ p <0.05, $\Psi\Psi$ p <0.01 efecto principal del tratamiento CLO en análisis ANOVA de dos vías entre grupos; En caso de interacción, post test de Tukey: * p <0.05; ** p <0,01 Vs grupo PBS + CONTROL; \$\$ p <0,01 Vs grupo CLO + CONTROL y #p <0,05 Vs grupo PBS + ESTRÉS 6H.

ESTRÉS 6H						
Parametros	Estrés		Tratamiento CLO		Interacción	
TNF α	F(1,9)=3.61	p=0.089	<u>F(1,9)=10.94</u>	<u>p=0.009</u>	F(1,9)=1.74	p=0.22
WB IL-1R	<u>F(1,12)=28.54</u>	<u>p=0.0002</u>	F(1,12)=3.04	p=0.10	F(1,12)=2.78	p=0.12
WB IL-6R	F(1,12)= 4.46	p=0.056	<u>F(1,12)=13.91</u>	<u>p=0.003</u>	<u>F(1,12)=6.91</u>	<u>p=0.022</u>
WB TNFR1	F(1,12)=0.27	p=0.6083	F(1,12)=0.75	p=0.401	<u>F(1,12)=9.08</u>	<u>p=0.0108</u>
WB TNFR2	<u>F(1,12)=6.10</u>	<u>p=0.03</u>	F(1,12)=7.63	p= 0.017	<u>F(1,12)=13.81</u>	<u>p=0.003</u>
WB pSTAT3	F(1, 12)=0.5	p=0.5	<u>F(1,12)=18.15</u>	<u>p=0.0011</u>	<u>F(1,12)=60.1</u>	<u>p=0.0001</u>
WB SOCS3	F(1, 12)=0.0002	p=0.98	<u>F(1,12)=11.73</u>	<u>p=0.005</u>	<u>F(1,12)=9.9</u>	<u>p=0.008</u>
WB TLR-4	<u>F(1, 12)=12.88</u>	<u>p=0.003</u>	F(1,12)=0.22	p=0.64	F(1,12)=2.43	p=0.14
WB CD14	<u>F(1, 12)=28.58</u>	<u>p=0.0002</u>	<u>F(1,12)=9.06</u>	<u>p=0.010</u>	F(1,12)=0.038	p=0.85
WB MD-2	F(1,12)=0.45	p=0.5	<u>F(1,12)=10.3</u>	<u>p=0.0075</u>	F(1,12)=0.0017	p=0.96
WB MyD88	F(1,12)=4.22	p=0.06	<u>F(1,12)=10</u>	<u>p=0.008</u>	<u>F(1,12)=10.12</u>	<u>p=0.008</u>
WB HMGB-1	F(1,12)=0.16	p=0.7	<u>F(1,12)=14.86</u>	<u>p=0.002</u>	F(1,12)=0.22	p=0.64
WB p65	F(1,12)=0.006	p=0.93	<u>F(1,12)=14.41</u>	<u>p=0.002</u>	F(1,12)=2.51	p=0.14
WB I κ B α	F(1,12)=1.12	p=0.30	<u>F(1,12)=7.17</u>	<u>p=0.02</u>	F(1,12)=1.46	p=0.25
WB COX-2	F(1,12)=0.26	p=0.61	<u>F(1,12)=13.13</u>	<u>p=0.0033</u>	F(1,12)=1.3	p=0.27
ARNm I κ B α	<u>F(1,12)=8.36</u>	<u>p=0.013</u>	F(1,12)=0.068	p=0.79	F(1,12)=1.2	p=0.29
ARNm COX-2	F(1,12)=1.7	p=0.21	F(1,12)=1.05	p=0.32	<u>F(1,12)=10.83</u>	<u>p=0.0065</u>
WB iNOS	<u>F(1,12)=7.57</u>	<u>p=0.017</u>	F(1,12)=1.44	p=0.25	F(1,12)=2.73	p=0.12
WB COX-1	<u>F(1,12)=28.86</u>	<u>p=0.0002</u>	<u>F(1,12)=9.4</u>	<u>p=0.0098</u>	F(1,12)=0.007	p=0.93
15d-PGJ2	<u>F(1, 7) = 8,646</u>	<u>P = 0,0217</u>	F (1, 7) = 3,186	P = 0,1174	F (1, 7) = 0,7064	P = 0,4284
WB 4-HNE	F(1,11)=4.07	p=0.06	F(1,11)=0.98	p=0.34	<u>F(1,11)=14.31</u>	<u>p=0.003</u>
WB Nrf2	<u>F(1,12)=10.52</u>	<u>p=0.007</u>	<u>F(1,12)=8.01</u>	<u>p=0.015</u>	F(1,12)=2.56	p=0.13
ARNm GSR	<u>F(1,12)=11.6</u>	<u>p=0.005</u>	<u>F(1,12)=10.66</u>	<u>p=0.006</u>	F(1,12)=1.5	p=0.25
ARNm PARK7	<u>F(1,12)=21.4</u>	<u>p=0.0006</u>	F(1,12)=3.12	p=0.10	<u>F(1,12)=6.23</u>	<u>p=0.0028</u>
ARNm SOD-2	<u>F(1,12)=6.89</u>	<u>p=0.02</u>	F(1,12)=0.94	p=0.35	F(1,12)=0.027	p=0.87

Tabla1. Analices ANOVA de dos víasanalyses (valores F y dfs).

4.3 . Estrés crónico (CMS) en ratas

Teniendo en cuenta todos los antecedentes y los resultados del estudio anterior (estrés agudo por inmovilización), se ha realizado el siguiente experimento en un modelo que pudiera tener una representación más traslacional, como por ejemplo un modelo de estrés crónico o “CMS” durante 21 días.

4.3.1 Niveles de corticosterona en plasma tras la exposición al estrés crónico durante 21 días.

Para estudiar el efecto de la depleción de PVMs en la actividad del eje HHA tras la exposición a estrés crónico se midieron los niveles de corticosterona en plasma en los distintos grupos a estudio, observándose un efecto estimulador del estrés en los niveles plasmáticos de corticosterona (Fig. 23A y Tabla 2).

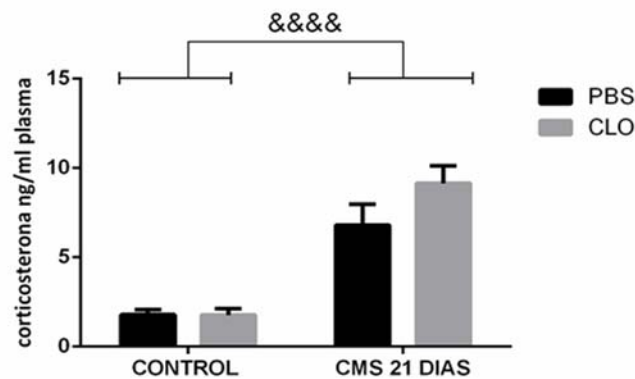


Fig.23- Niveles de corticosterona plasmática en ratas tratadas con clodronato encapsulado en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en condiciones CONTROL y de CMS 21 DIAS. Los datos representan la media muestral + EEM de 4-6 animales por grupo. &&&&p <0.0001 efecto principal del estrés en el análisis ANOVA de dos vías entre grupos.

4.3.2 Efectos de la depleción de PVM en la expresión de citocinas proinflamatorias clásicas y sus receptores en condiciones de CMS durante 21 días.

Las citocinas representan uno de los mediadores proinflamatorios, implicados en muchos tipos de estrés, como principal activador de diversas cascadas de señalización responsable de la neuroinflamación (García-Bueno *et al.*, 2008a). En el caso de los niveles de ARNm de IL-1 β , se observó un efecto del tratamiento con CLO y una interacción entre factores (estrés x tratamiento con CLO) según el ANOVA de dos vías. El post test de comparaciones múltiples mostró que los grupos, CLO+CONTROL, PBS+CMS 21 DIAS y CLO+CMS 21 DÍAS presentaron niveles aumentados de manera significativa en comparación al grupo CONTROL (Fig. 24A y Tabla 2). Se ha detectado una disminución en los niveles de ARNm de IL-6, por el efecto del estrés crónico (Fig. 24B y Tabla 2). No se ha observado diferencias significativas de los niveles de ARNm de TNF α entre los grupos experimentales estudiados (Fig. 24C y Tabla 2).

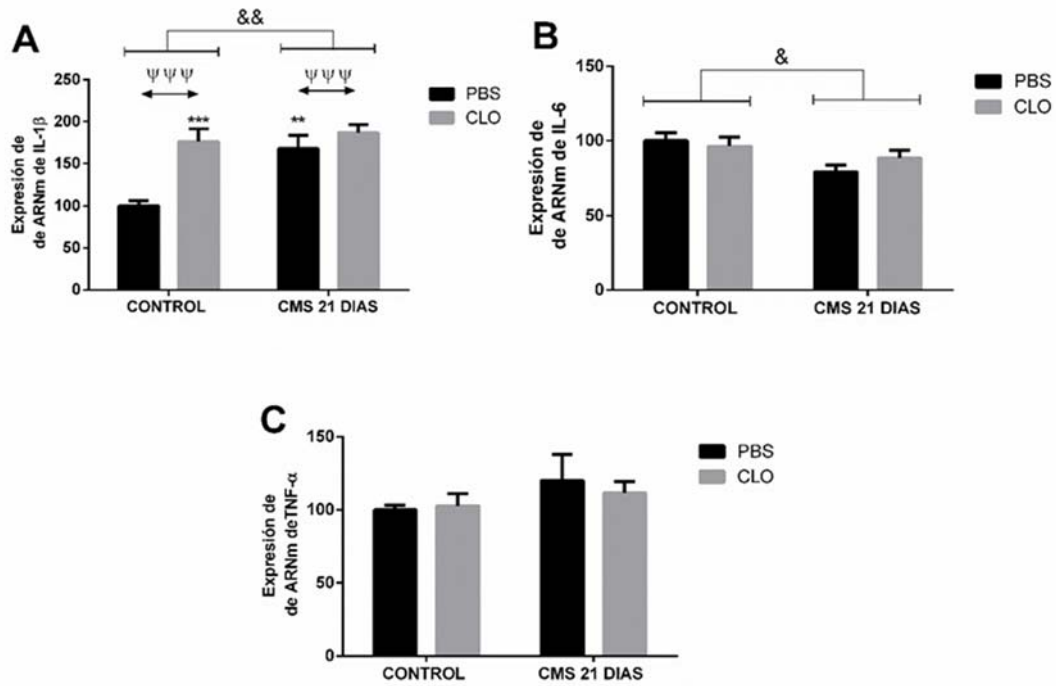


Fig.24- Expresión génica de IL-1 β (A), IL-6 (B) y TNF α (C), en la corteza frontal de ratas tratadas con la administración central de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en condiciones de CONTROL y estrés crónico (CMS 21 DIAS). Las barras representan la media + EEM de 4-6 animales por grupo. & p <0.05, && p <0.01 efecto principal del estrés en el análisis ANOVA de dos vías entre grupos; ΨΨΨ p <0.001 efecto principal del tratamiento CLO en análisis ANOVA de dos vías entre grupos; En caso de interacción, post test de Tukey: ** p <0,01 Vs grupo PBS + CONTROL; *** p <0,001 Vs grupo PBS + CONTROL.

No se observó un efecto del estrés para los receptores de citocinas IL-1R, IL-6R, TNFR1 y TNFR2 en sus niveles de proteína (Figuras 25A-D y Tabla 2). En el caso del receptor de IL-1 β , IL-1R, se observó una interacción entre factores (estrés x tratamiento con CLO) (Fig.25B y Tabla 2). Post-tests complementarios de comparaciones múltiples para la expresión de la proteína IL-1R mostraron que el grupo PBS + CMS 21 DIAS presentó niveles aumentados de manera significativa en comparación con el grupo PBS+CONTROL y CLO+CONTROL, y el grupo CLO+CMS 21 DIAS mostró diferencias significativas con respecto al grupo PBS+CMS 21 DIAS (Fig. 25A y Tabla 2). Para el receptor de IL-6 IL-6R se observó un efecto estimulador del tratamiento con CLO (Fig. 25B y Tabla 2). Ningún efecto fue observado en los receptores de TNF α (Fig. 25C y D; Tabla 2).

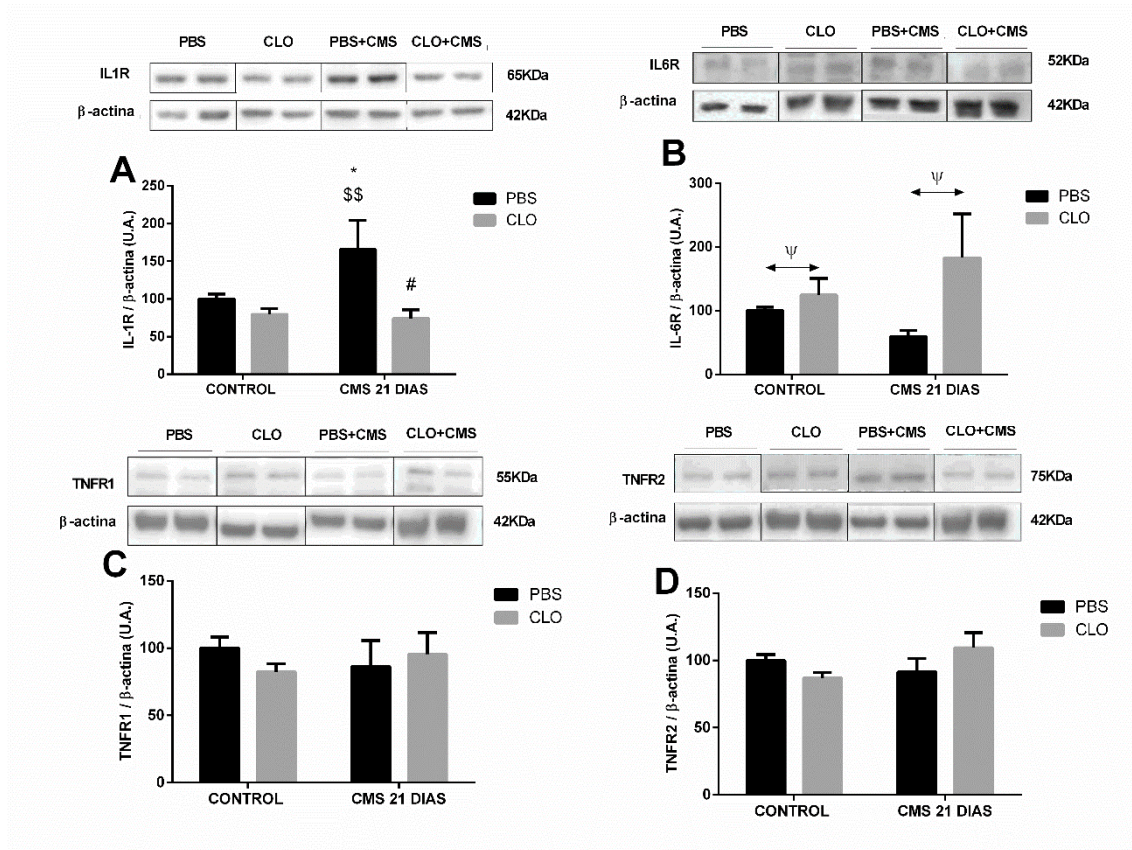


Fig.25- Niveles de expresión proteica de los receptores IL-1R(A), IL-6R(B), TNFR1 (C) y TNFR2 (D) en corteza frontal de ratas tratadas con la administración de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en condiciones de CONTROL y estrés crónico (CMS 21 DIAS), los datos densitométricos de las respectivas bandas de interés están normalizados con respecto a la β-actina (banda inferior). Se recortaron las imágenes del Western Blot (líneas negras) para mejorar la claridad y la concisión de la presentación. Los datos representan la media muestral + EEM de 4-6 animales por grupo Ψ $p < 0,05$ efecto principal del tratamiento CLO en análisis ANOVA de dos vías entre grupos; En caso de interacción, post test de Tukey: * $p < 0,05$ Vs grupo PBS + CONTROL; \$\$ $p < 0,01$ Vs grupo CLO + CONTROL; y # $p < 0,05$ Vs PBS + CMS 21 DIAS.

4.3.3 Efectos de la depleción de los PVM sobre la vía de señalización del receptor de inmunidad innata Toll-like 4 (TLR-4) en condiciones de CMS.

La activación de la vía de señalización de TLR-4 después de la exposición aguda al estrés por inmovilización (Garate *et al.*, 2013) y también su regulación en un modelo de estrés crónico (Garate *et al.*, 2011) se ha relacionado con la secreción de diferentes mediadores inflamatorios. Se exploró a distintos niveles si la depleción selectiva de PVM podría estar relacionada con los cambios en esta importante vía proinflamatoria.

De igual manera que en el estrés agudo por inmovilización, estudiamos los niveles de proteína de TLR-4, del receptor para la diferenciación del clúster dímero LPS/proteína de unión (LBP)/ (CD14), el co-receptor factor de diferenciación mieloide-2 (MD-2) y la proteína adaptadora de diferenciación mieloide respuesta primaria 88 (MyD88). El ANOVA de dos vías encontró una interacción entre los factores (estrés y tratamiento con CLO) en la expresión proteica de TLR-4, CD14 y MD-2 (Fig.26 A, B, C y Tabla 2). El análisis adicional mostro una disminución de los niveles proteicos de TLR-4 en el grupo CLO+CMS 21 DIAS con respecto a PBS+ CMS 21 DIAS. Se vieron disminuidos también los niveles proteicos de CD14 y MD-2 del grupo CLO+CMS 21 DIAS con respecto a CONTROL, CLO y CLO+CMS 21 DIAS. En el caso de CD14, se encontraron efectos del tratamiento con CLO (Fig. 26B y Tabla 2). Para MD-2 se detectó un efecto del tratamiento con CLO y también un efecto del estrés en su expresión proteica (Fig. 26C y Tabla 2) y finalmente, se observó efecto del tratamiento con CLO con respecto a los niveles proteicos de MyD88 (Fig. 26D y Tabla 2).

Con respecto a los DAMPs, responsables por la activación del TLR-4, no se obervaron diferencias en los niveles proteicos de HMGB-1 (Fig. 26E y Tabla 2), pero se encontró un efecto del estrés, que resulta en la disminución de los niveles proteicos de HSP60 (Fig. 26F y Tabla 2).

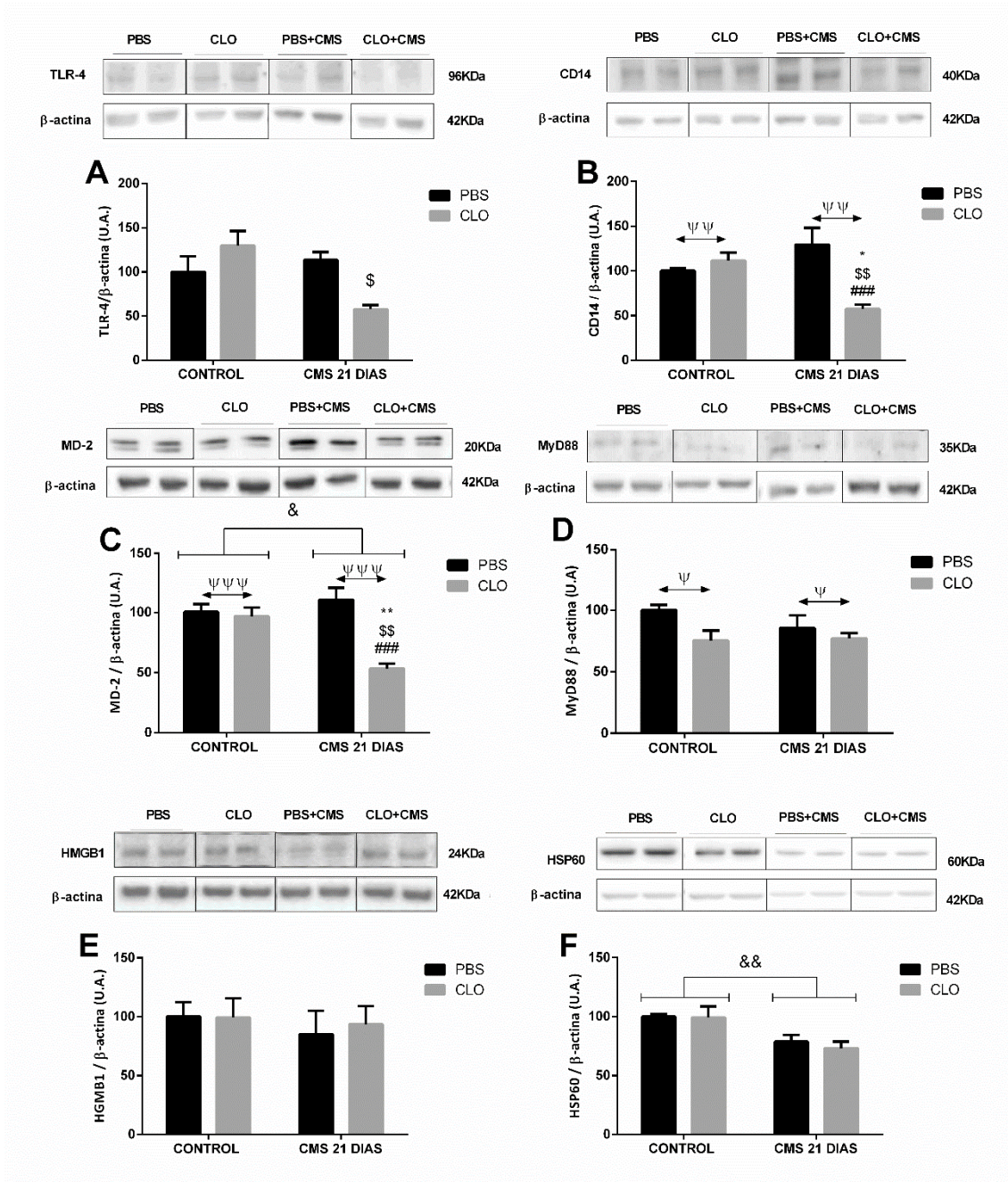
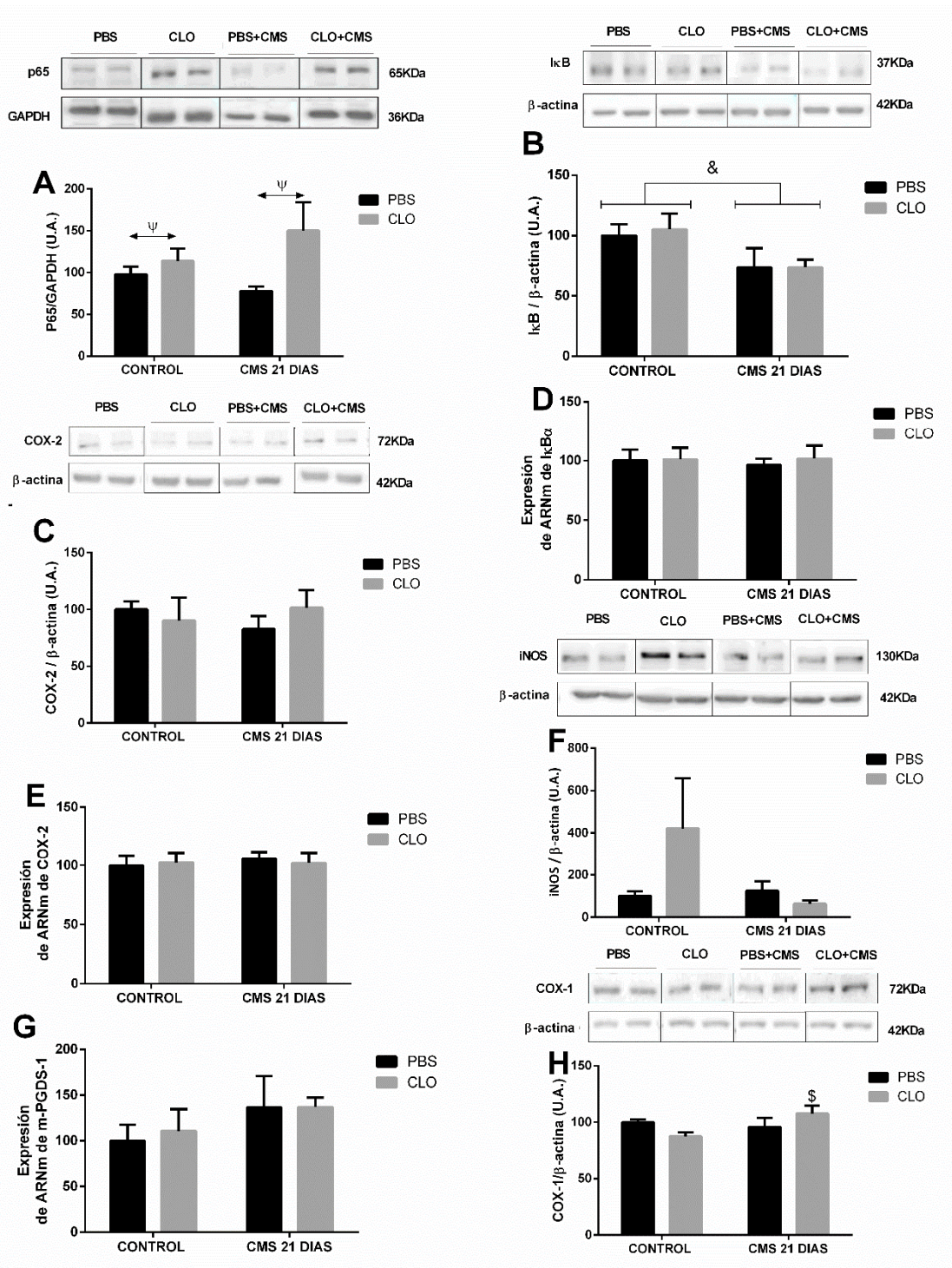


Fig.26- Niveles de expresión proteica de TLR-4 (A), CD14 (B), MD-2 (C), MyD88 (D), HMGB-1(E) y HSP60 (F) en la corteza frontal de ratas tratadas con la administración de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en condiciones de Control (CONTROL) y estrés agudo por inmovilización (CMS 21 DIAS). Los datos densitométricos de las respectivas bandas de interés están normalizados con respecto a la β-actina (banda inferior). Se recortaron las imágenes del Western Blot (líneas negras) para mejorar la claridad y la concisión de la presentación. Los datos representan la media muestral + EEM de 4-6 animales por grupo. & p < 0.05, && p < 0.01 efecto principal del estrés en el análisis ANOVA de dos vías entre grupos; Ψ p < 0.05, ΨΨΨ p < 0.001 efecto principal del tratamiento CLO en análisis ANOVA de dos vías entre grupos; En caso de interacción, post test de Tukey: * p < 0,05 Vs grupo PBS + CONTROL; ** p < 0,01 Vs grupo PBS + CONTROL; \$\$\$ p < 0.001 Vs grupo PBS + CMS 21 DIAS, \$ p < 0,05 Vs grupo CLO, \$\$ p < 0,01 Vs grupo CLO.

4.3.4 Efectos de la depleción de PVM en la vía de señalización del factor nuclear kappa b (NF- κ B) en condiciones de estrés crónico o CMS durante 21 días.

De igual manera que en el estrés agudo por inmovilización, evaluamos la existencia de alteraciones en la vía proinflamatoria dependiente de TLR-4/Myd88 también presentes a nivel de NF- κ B en el modelo de estrés crónico de 21 días. Por lo tanto, también se evaluó la expresión proteica de la subunidad p65 de NF- κ B, de su proteína inhibidora I κ B α (también su expresión génica) y los niveles de las enzimas proinflamatorias dependientes de NF- κ B, COX-2 e iNOS.

El ANOVA de dos vías mostró un efecto principal del tratamiento con CLO en los niveles de proteína de NF- κ B y un efecto del estrés en la expresión proteica de su proteína inhibidora I κ B α (Figuras 27A, B, y Tabla 2). Se ha observado una interacción de los factores (estrés y tratamiento con CLO) en la expresión proteica de COX-1, donde en el análisis complementario de comparaciones múltiples encontró un aumento en el grupo CLO+CMS 21 DIAS con respecto al grupo CLO (Fig. 27H y Tabla 2). No se han detectado cambios en los demás mediadores evaluados: COX-2 (Fig. 27C y E y Tabla 2), expresión génica de I κ B (Fig. 27D y Tabla 2), iNOS (Fig. 27F y Tabla 2), y mPGES-1 (Fig. 27G y Tabla 2). Tampoco se han observado diferencias entre los grupos, con respecto a los niveles de las prostaglandinas 15d-PGJ₂ (clásicamente anti-inflamatoria) (Fig. 27I y Tabla 2) y PGE₂ (proinflamatoria) en muestras de corteza frontal (Fig. 27J y Tabla 2).



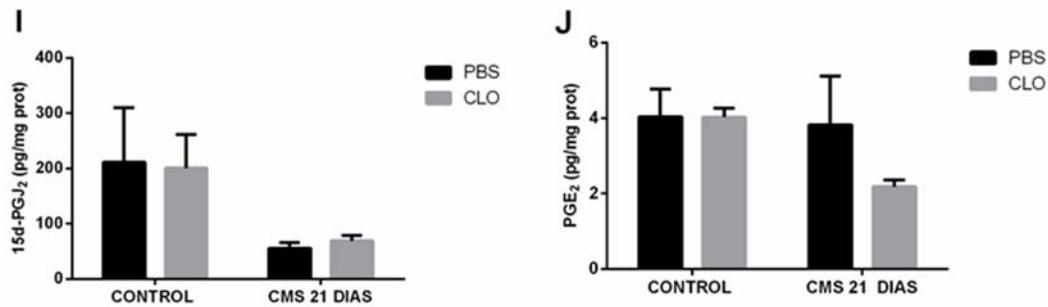


Fig.27- Expresión proteica de la subunidad p65 de NF- κ B en extractos nucleares (A), I κ B α en extractos citosólicos (B), COX-2 (C), iNOS (F) y COX-1 (H) en la corteza pre frontal de ratas tratadas con la administración de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en condiciones de CONTROL y estrés crónico (CMS 21 DIAS), Expresión de ARNm de I κ B α (D), COX-2 (E) y mPGES-1 (G) en la corteza frontal de ratas tratadas con la administración de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en CONTROL y condiciones de estrés agudo por inmovilización (CMS 21 DIAS). Análisis realizado a través de WB, los datos densitométricos de las respectivas bandas de interés están normalizados con respecto a la β -actina, excepto por la subunidad (A) de p65 de NF- κ B en la que se utilizó la proteína nuclear GAPDH (banda inferior). Niveles de 15d-PGJ₂ (I) y de PGE₂ (J) en corteza frontal en los diferentes grupos estudiado. Se recortaron las imágenes del Western Blot (líneas negras) para mejorar la claridad y la concisión de la presentación. Los datos representan la media muestral+ EEM de 4-6 animales por grupo. & p <0.05 efecto del estrés; Ψ p <0,05 efecto del tratamiento con CLO en el análisis ANOVA de dos vías entre los grupos. En caso de interacción, post test de Tukey: \$ p <0,05 Vs grupo CLO + CONTROL.

4.3.5 Efecto de la depleción de los PVM en los marcadores de estrés oxidativo/nitrosativo y en sus mecanismos antioxidantes reguladores en un modelo de 21 días de CMS.

Considerando los resultados previos del papel de los PVM en la regulación de los mecanismos antioxidantes endógenos en el modelo agudo por restricción de movimiento presentados anteriormente, decidimos explorar su papel en un modelo de estrés crónico de 21 días (CMS), en el que se ha descrito la implicación de mecanismo antioxidantes (Martín-Hernández *et al.*, 2016).

Se verificó los niveles del marcador de estrés oxidativo/nitrosativo, 4-hidroxinonenal (4-HNE) de la misma manera que en el modelo agudo. El ANOVA de dos vías encontró un efecto para el estrés disminuyendo su expresión proteica (Fig. 28A y Tabla 2). Posteriormente, se exploró la expresión proteica del factor nuclear tipo 2 (derivado de eritroide 2) (Nrf2) con un marcador potencial antioxidante y la expresión de ARNm de enzimas antioxidantes endógenas que

dependen de su activación. No se han observado efectos del estrés o el tratamiento con CLO para la expresión de la proteína Nrf2 (figura 14B y Tabla 2). Solo se detectó un efecto del estrés estimulatorio sobre la expresión de la enzima antioxidante GRS1 (Fig. 28C y Tabla 2). No hubo diferencias significativas en la expresión de ARNm de PARK7 (Fig. 28D), SOD-2 (Fig. 28D) ni de catalasa entre los grupos o sobre Keap-1, proteína inhibitoria de Nrf2 (datos no mostrados).

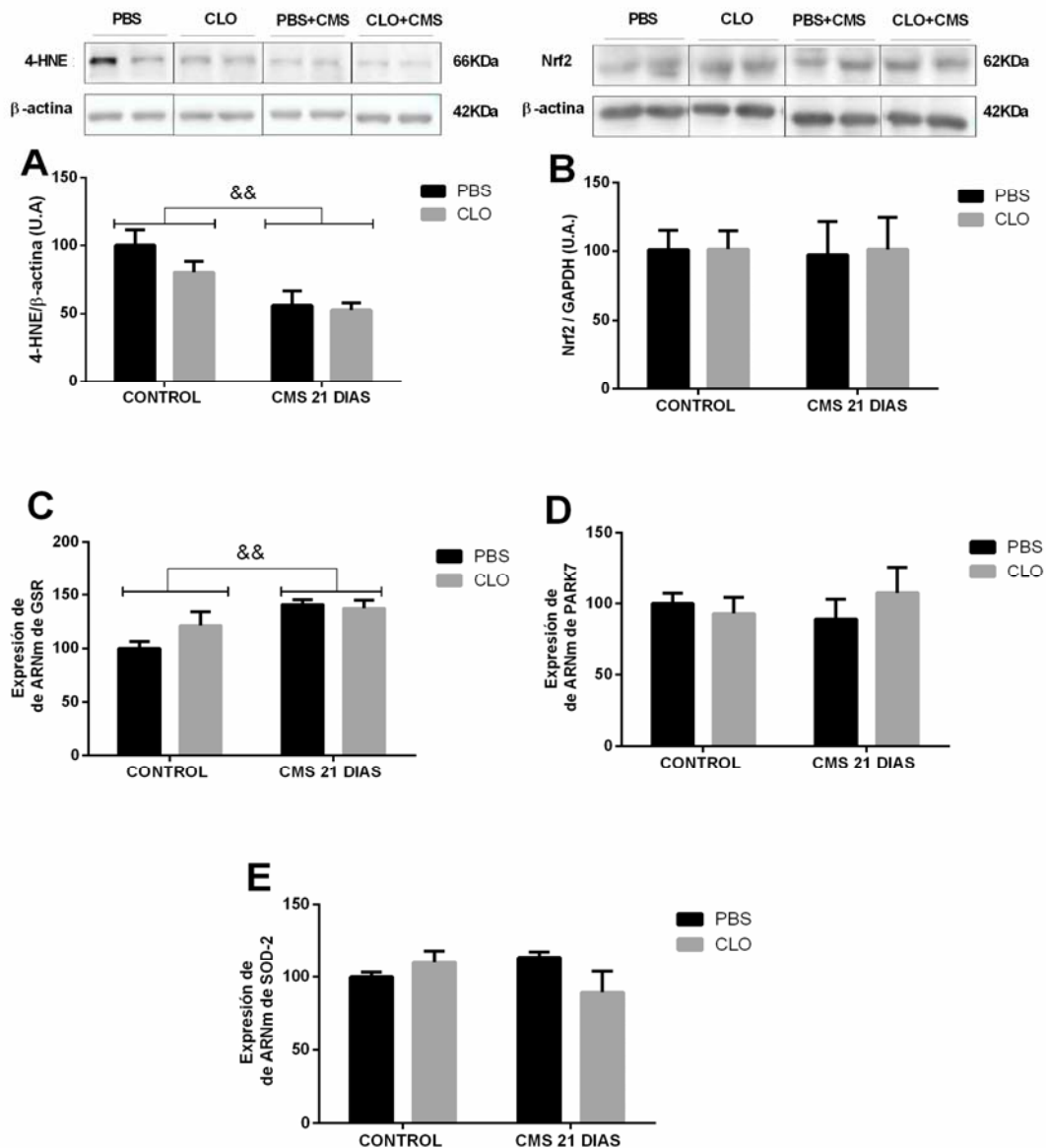


Fig.28.- Expresión proteica de 4-HNE (A) y Nrf2 en extractos nucleares (B) y expresión de ARNm de GRS1 (C), PARK7 (D) y SOD-2 (E) en la corteza frontal de ratas tratadas con la administración central de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en condiciones de CONTROL y estrés agudo de restricción (CMS 21 DIAS). En el análisis de transferencia western para la expresión de proteínas, los datos densitométricos de la banda 4-HNE se normalizan con respecto a la β -actina, y para la proteína nuclear Nrf-2 (A) se utilizó GAPDH (banda inferior). Se recortaron blots (líneas negras) para mejorar la claridad y la concisión de la presentación. Las barras representan la media + EEM. & p <0.05, && p <0.01 efecto principal del estrés en el análisis ANOVA de dos vías entre grupos.

CMS 21 DIAS						
Parametros	Estrés		Tratamiento CLO		Interacción	
Corticosterona	F(1, 23) = 50,39	P = 0,0001	F(1, 23) = 1,759	P = 0,1978	F(1, 23) = 1,836	P = 0,1885
ARNm IL-1 β	F(1, 21) = 10,17	P = 0,0044	F(1, 21) = 14,98	P = 0,0009	F(1, 21) = 5,465	P = 0,0294
ARNm IL-6	F(1, 21) = 5,475	P = 0,0292	F(1, 21) = 0,2105	P = 0,6511	F(1, 21) = 1,114	P = 0,3032
WB IL-1R	F(1, 22) = 3,199	P = 0,0875	F(1, 22) = 10,97	P = 0,0032	F(1, 22) = 4,376	P = 0,0482
WB IL-6R	F(1, 21) = 0,1065	P = 0,7474	F(1, 21) = 7,294	P = 0,0134	F(1, 21) = 3,243	P = 0,0861
WB TNFR2	F(1, 22) = 0,9840	P = 0,3320	F(1, 22) = 0,1198	P = 0,7325	F(1, 22) = 4,935	P = 0,0369
WB TLR-4	F(1, 22) = 3,194	P = 0,0877	F(1, 22) = 0,6163	P = 0,4408	F(1, 22) = 6,811	P = 0,0160
WB CD14	F(1, 22) = 1,762	P = 0,1979	F(1, 22) = 10,67	P = 0,0035	F(1, 22) = 20,26	P = 0,0002
WB MD-2	F(1, 22) = 4,780	P = 0,0397	F(1, 22) = 15,74	P = 0,0007	F(1, 22) = 12,12	P = 0,0021
WB MyD88	F(1, 22) = 0,8257	P = 0,3734	F(1, 22) = 5,464	P = 0,0289	F(1, 22) = 1,307	P = 0,2653
WB p65	F(1, 22) = 0,2281	P = 0,6377	F(1, 22) = 6,741	P = 0,0165	F(1, 22) = 2,723	P = 0,1131
WB I κ B α	F(1, 22) = 5,790	P = 0,0250	F(1, 22) = 0,04460	P = 0,8347	F(1, 22) = 0,04575	P = 0,8326
WB COX-1	F(1, 22) = 2,649	P = 0,1178	F(1, 22) = 0,002782	P = 0,9584	F(1, 22) = 6,088	P = 0,0219
15d-PGJ2	F(1, 13) = 4,683	P = 0,0497	F(1, 13) = 0,000383	P = 0,9847	F(1, 13) = 0,03276	P = 0,8592
WB 4-HNE	F(1, 21) = 12,56	P = 0,0019	F(1, 21) = 1,297	P = 0,2677	F(1, 21) = 0,6489	P = 0,4295
ARNm GSR-1	F(1, 21) = 8,317	P = 0,0089	F(1, 21) = 0,7998	P = 0,3813	F(1, 21) = 1,553	P = 0,2264
MCP-1 6H	F(1, 12) = 18,44	P = 0,0010	F(1, 12) = 0,1675	P = 0,6896	F(1, 12) = 1,118	P = 0,3112
MCP-1 CMS 21	F(1, 18) = 6,236	P = 0,0224	F(1, 18) = 4,561	P = 0,0467	F(1, 18) = 5,488	P = 0,0308

Tabla 2. Analices ANOVA de dos vías (valores F y dfs)

4.4 Estrés crónico “CMS” curso temporal: 7 y 14 días

Teniendo en cuenta los resultados tras el estrés crónico de 21 días, se optó por la realización de un curso temporal y obtención de muestras a los 7 y 14 días del inicio del estrés, con la intención de estudiar la evolución de los distintos mediadores a estudio implicados en la respuesta inmune inflamatoria, estrés oxidativo/nitrosativo y sus mecanismos antioxidantes reguladores en SNC.

4.4.1 “Chronic mild stress” (CMS) 7 días

4.4.1.1 Niveles de corticoesterona en plasma tras la exposicion a estrés crónico por 7 días

Se evaluaron los niveles de corticoesterona en plasma tras 7 días de estrés crónico. Se observó un efecto del estrés en los niveles plasmáticos de

corticosterona, así como un efecto del tratamiento con CLO, el ANOVA de dos vías detectó una interacción entre los factores (estrés y tratamiento CLO) (Fig. 29A y Tabla 3). El post test de Tukey permitió observar una diferencia significativa del grupo CLO+CMS 7 DIAS, con respecto a los grupos, PBS+CONTROL, CLO+CONTROL y PBS+CMS 7 DIAS.

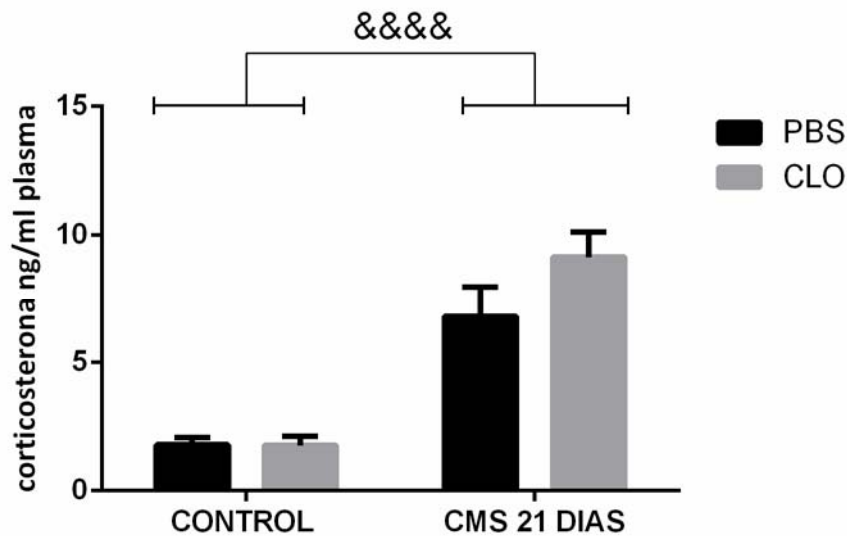


Fig.29.- Niveles de corticosterona plasmática, evaluados 7 días de estrés crónico de ratas tratadas con clodronato encapsulado en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en CONTROL y condiciones de estrés agudo por inmovilización (CMS 7 DIAS), Las barras representan la media muestral + EEM de 4-6 animales por grupo. && $p < 0.01$ efecto principal del estrés y $\Psi\Psi$ $p < 0.01$ efecto principal del tratamiento con CLO en el análisis ANOVA de dos vías entre grupos; En caso de interacción, post test de Tukey: *** $p < 0,0=1$ Vs grupo PBS + CONTROL; ### $p < 0,001$ Vs grupo PBS + CMS 7 DIAS, \$\$\$ $p <$ vs CLO+CONTROL.

4.4.1.2 Efectos de la depleción de PVM en la expresión de citocinas proinflamatorias y sus receptores en condiciones de estrés crónico de 7 días

Tras la regulación de las citocinas en los modelos estudiados hemos decidido verificar sus niveles a diferentes tiempos en un curso temporal empezando por 7 días de estrés crónico (1 ciclo). En los niveles de ARNm de IL-1 β , se observó una interacción entre factores (estrés x tratamiento con CLO, según el ANOVA de dos vías), el post test de comparaciones múltiples mostró que los grupos, CLO+CONTROL y PBS+CMS 7 DIAS presentaron niveles aumentados de manera significativa en comparación al grupo PBS+CONTROL (Fig. 30A y Tabla 3). Se ha detectado un efecto principal para el estrés de 7 días en los niveles de ARNm de IL-6 (Fig. 30B y Tabla 3). No se han observado diferencias significativas de los niveles ARNm de TNF α entre los grupos experimentales estudiados (Fig. 30C).

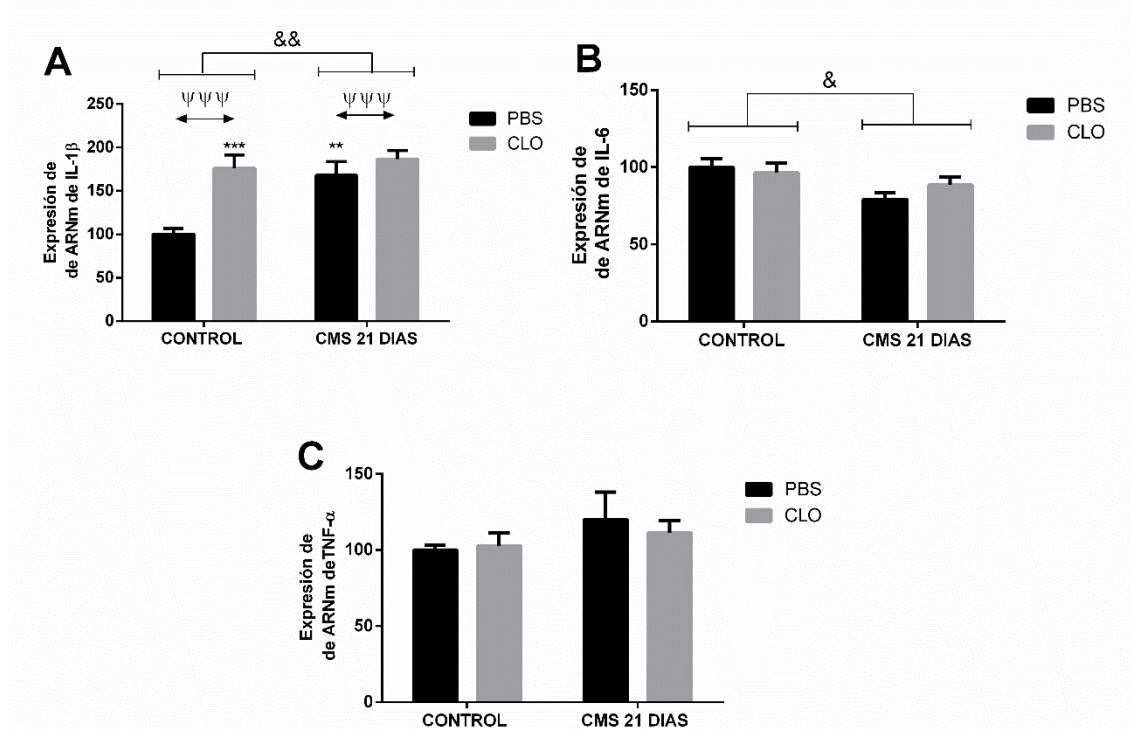


Fig.30.-Expresión génica de IL-1 β (A), IL-6 (B) y TNF α (C), en la corteza frontal de ratas tratadas con la administración central de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en condiciones de CONTROL y estrés crónico (CMS 7 DIAS). Las barras representan la media + EEM de 4-6 animales por grupo. &&& p <0.001 efecto principal del estrés en el análisis ANOVA de dos vías entre grupos; En caso de interacción, post test de Tukey: ** p <0,01 Vs grupo PBS + CONTROL; *** p <0,001 Vs grupo PBS + CONTROL.

Con respecto a los receptores de citocinas (IL-1R), se observó un efecto principal del tratamiento con CLO, disminuyendo sus niveles proteicos en los grupos tratados con CLO tanto en situaciones control como estrés (Fig. 31A y Tabla 3). En el caso del receptor TNFR2 se encontró un efecto principal del estrés y un efecto del tratamiento con CLO e interacción entre los factores (estrés x tratamiento con CLO) (Fig. 31D y Tabla 3). Los post-test complementarios de comparaciones múltiples mostraron una disminución en el grupo CLO+CMS 7 días con respecto, al grupo PBS+CONTROL. No se han observado diferencias de los niveles proteicos para el receptor de IL-6 (Fig.31B) o de TNFR1(Fig.31C)

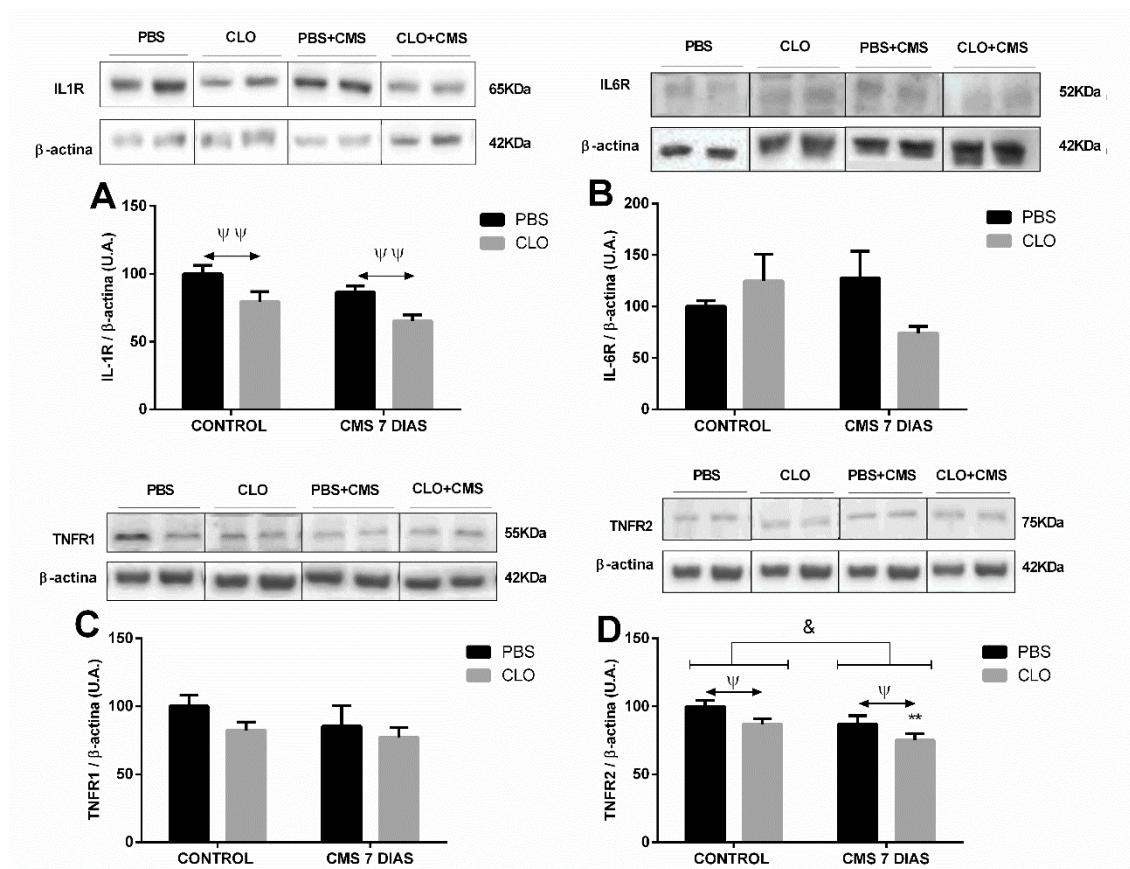


Fig.31- Niveles de expresión proteica de los receptores IL-1R(A), IL-6R(B), TNFR1 (C) y TNFR2 (D) en corteza frontal de ratas tratadas con la administración de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en condiciones de CONTROL y estrés crónico durante 7 días (CMS 7 DIAS), los datos densitométricos de las respectivas bandas de interés están normalizados con respecto a la β -actina (banda inferior). Se recortaron las imágenes del Western Blot (líneas negras) para mejorar la claridad y la concisión de la presentación. Los datos representan la media muestral + EEM. $\&$ $p < 0.05$, efecto del estrés en el análisis ANOVA de dos vías entre grupos; Ψ y $p < 0,05$ efecto principal del tratamiento CLO; En caso de interacción, post test de Tukey: $**$ $p < 0,01$ Vs grupo PBS + CONTROL.

4.4.1.3 Efectos de la depleción de los PVM sobre la vía de señalización del receptor de inmunidad innata toll-like 4 (TLR-4) en condiciones de estrés crónico durante 7 días

En condiciones de estrés crónico durante 7 días se ha podido observar un efecto del tratamiento con CLO en los niveles proteicos del receptor CD14 (Fig. 32B y Tabla 3). En los niveles del co-receptor MD-2 un efecto principal del estrés fue observado, viéndose disminuida su expresión. En el caso de la proteína adaptadora MyD88, se ha podido observar un efecto del tratamiento con CLO así como un efecto del estrés disminuyendo su expresión (Fig. 32D y tabla 3). o se han observado diferencias significativas en la expresión del receptor TLR-4 (Fig. 32A), ni de los DAMPs HMGB-1 o HSP60 (Fig.32E y F).se han observado diferencias significativas en la expresión del receptor TLR-4 (Fig. 32A), ni de los DAMPs HMGB-1 o HSP60 (Fig.32E y F).

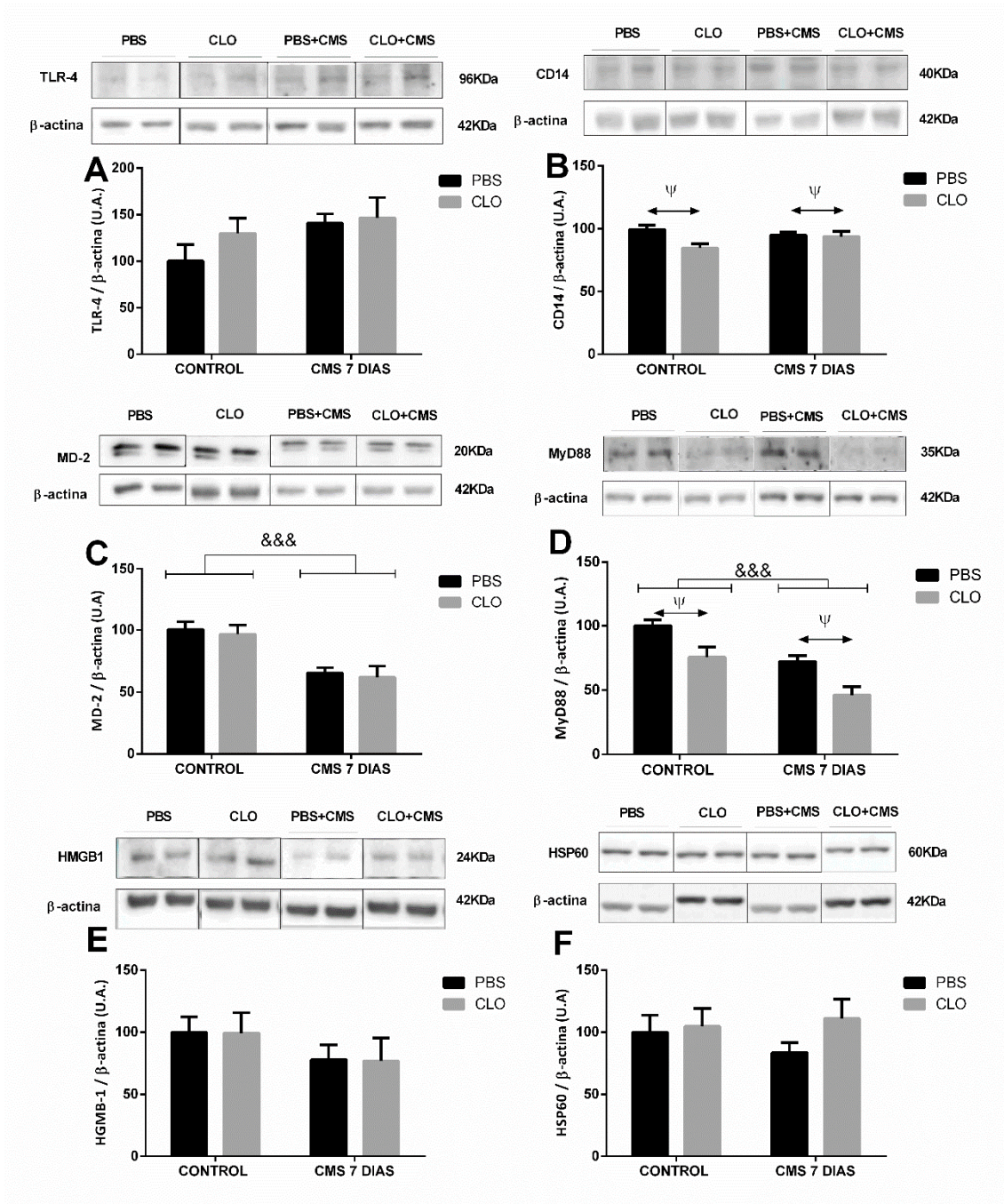
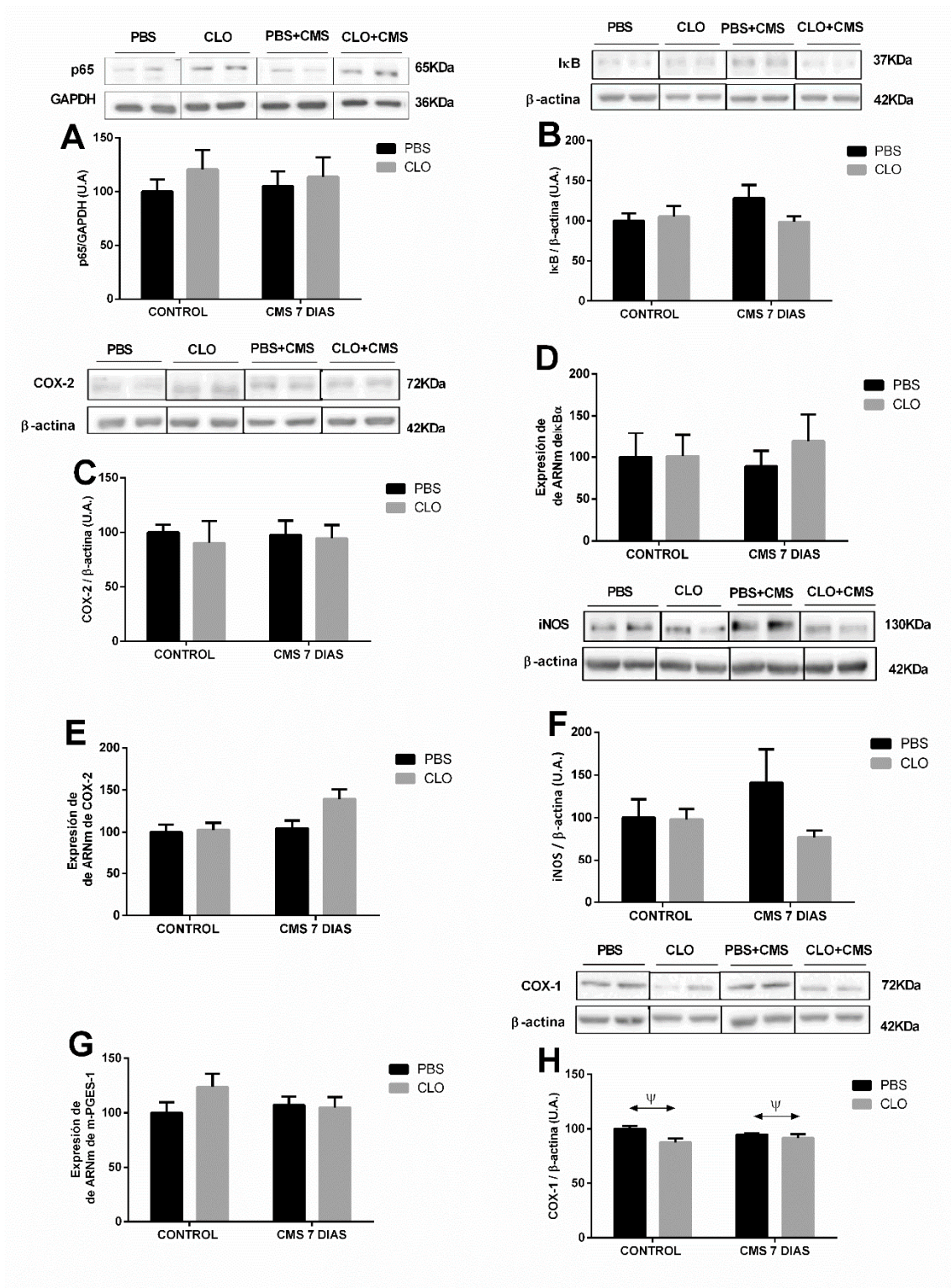


Fig.32- Niveles de expresión de TLR-4 (A), CD14 (B), MD2 (C), MyD88 (D), HMGB-1 (E) y HSP60 (F) en la corteza frontal de ratas tratadas con la administración de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en condiciones de Control (CONTROL) y estrés agudo por inmovilización (CMS 7 DIAS). Los datos densitométricos de las respectivas bandas de interés están normalizados con respecto a la β -actina (banda inferior). Se recortaron las imágenes del Western Blot (líneas negras) para mejorar la claridad y la concisión de la presentación. Los datos representan la media muestral + EEM. &&& $p < 0.001$ efecto principal del estrés en el análisis ANOVA de dos vías entre grupos y Ψ $p < 0.05$, efecto principal del tratamiento CLO.

4.4.1.4 Efectos de la depleción de PVM en la vía de señalización del factor nuclear kappa b (NF-κB) en condiciones de estrés crónico durante 7 días

En la vía de señalización del factor nuclear NF-κB no se han observado diferencias significativas en la expresión proteica o génica de los mediadores implicados esta vía de señalización entre los grupos estudiados: NF-κB (p65) (Fig. 33A), su proteína inhibidora IκB, (Fig. 33B, D), enzimas dependientes de NF-κB, COX-2 e iNOS (Fig. 33C, E, F), mPGES-1 (Fig.33G), así como las prostaglandinas 15d-PGJ₂ (clásicamente anti-inflamatoria) (Fig. 33I) o PGE₂ (pro-inflamatoria) en corteza (Fig. 33J). Solo se ha podido observar un efecto principal del tratamiento con CLO en la expresión de COX-1 (Fig. 33H y Tabla 3).



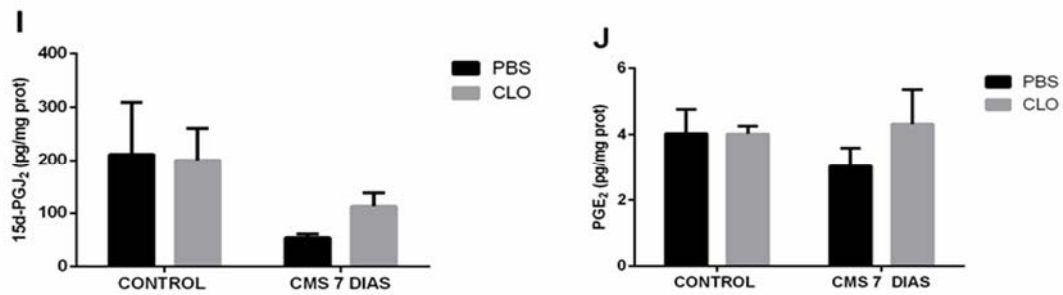


Fig. 33.- Expresión de la subunidad p65 de NF- κ B en extractos nucleares (A), I κ B α en extractos citosólicos (B), COX-2 (C), iNOS (F) y COX-1 (H) en la corteza pre frontal de ratas tratadas con la administración de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en condiciones de CONTROL y estrés crónico (CMS 7 DIAS), Expresión de ARNm de I κ B α (D), COX-2 (E) y mPGES-1 (G) en la corteza frontal de ratas tratadas con la administración de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en CONTROL y condiciones de estrés crónico (CMS 7 DIAS). Análisis realizado a través de WB, los datos densitométricos de las respectivas bandas de interés están normalizados con respecto a la β -actina, excepto por la subunidad (A) de p65 de NF- κ B en la que se utilizó la proteína nuclear GAPDH (banda inferior). Se recortaron las imágenes del Western Blot (líneas negras) para mejorar la claridad y la concisión de la presentación. Niveles de 15d-PGJ₂ (I) y de PGE₂ (J) en corteza frontal en los diferentes grupos estudiado. Los datos representan la media muestral+ EEM de 4-6 animales por grupo. Ψ p <0,05 efecto del tratamiento con CLO en el análisis ANOVA de dos vías entre los grupos

4.4.1.5 Efecto de la depleción de los PVM en los marcadores de estrés oxidativo/nitrosativo y en sus mecanismos antioxidantes reguladores en condiciones de estrés crónico durante 7 días

Con respecto a los marcadores de estrés oxidativo/nitrosativo y sus mecanismos de regulación, se ha podido observar un efecto principal del tratamiento con CLO en los niveles de 4-HNE, viéndose reducida su expresión (Fig. 34A y Tabla 3). Con respecto al factor de transcripción Nrf2 (Fig. 34B y Tabla 3), se encontró un efecto principal del estrés, donde sus niveles proteicos en núcleo se vieron aumentados tras el estrés de 7 días. No se han observado diferencias significativas en los mediadores antioxidantes relacionadas con el mecanismo de balance ante el estrés oxidativo/nitrosativo GRS (Fig. 34C), PARK7 (Fig. 34D), y SOD-2 (Fig. 34E).

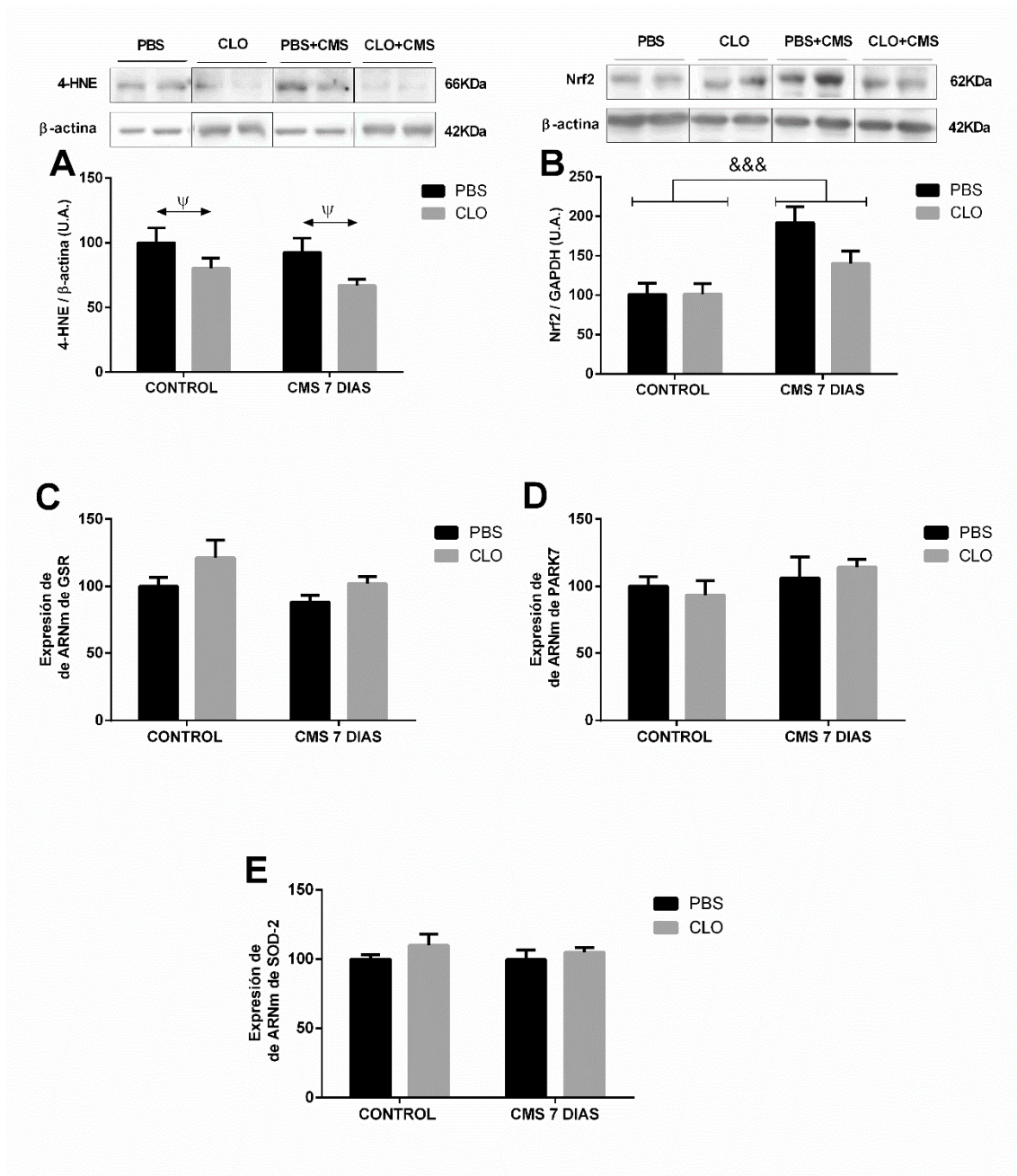


Fig. 34.- Expresión proteica de 4-HNE (A) y Nrf2 en extractos nucleares (B) y expresión de ARNm de GRS (C), PARK7 (D) y SOD-2 (E) en la corteza frontal de ratas tratadas con la administración central de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en condiciones de CONTROL y estrés agudo de restricción (CMS 7 DIAS). En el análisis de transferencia western para la expresión de proteínas, los datos densitométricos de la banda 4-HNE se normalizan con respecto a la β -actina, y para la proteína nuclear Nrf2 (A) se utilizó GAPDH (banda inferior). Se recortaron blots (líneas negras) para mejorar la claridad y la concisión de la presentación. Las barras representan la media + EEM. &&& $p < 0.001$ efecto principal del estrés y Ψ $p < 0,05$ efecto del tratamiento con CLO en el análisis ANOVA de dos vías entre grupos.

CMS 7 DIAS						
Parametros	Estrés		Tratamiento CLO		Interacción	
Corticosterona	F(1, 22) = 9,698	P = 0,0051	F(1, 22) = 10,43	P = 0,0039	F(1, 22) = 10,57	P = 0,0037
IL-1 β	F(1, 22) = 2,323	P = 0,1417	F(1, 22) = 3,787	P = 0,0645	F(1, 22) = 15,66	P = 0,0007
IL-6	F(1, 22) = 15,30	P = 0,0007	F(1, 22) = 1,737	P = 0,2011	F(1, 22) = 0,7566	P = 0,3938
WB IL-1R	F(1, 22) = 4,118	P = 0,0547	F(1, 22) = 9,357	P = 0,0058	F(1, 22) = 0,00156	P = 0,9688
WB IL-6R	F(1, 22) = 0,4225	P = 0,5224	F(1, 22) = 0,6628	P = 0,4243	F(1, 22) = 4,927	P = 0,0371
WB TNFR2	F(1, 23) = 6,626	P = 0,0170	F(1, 23) = 6,652	P = 0,0168	F(1, 23) = 0,01344	P = 0,9087
WB CD14	F(1, 23) = 0,3641	P = 0,5521	F(1, 23) = 4,900	P = 0,0371	F(1, 23) = 3,437	P = 0,0766
WB MD-2	F(1, 21) = 20,55	P = 0,0002	F(1, 21) = 0,2191	P = 0,6446	F(1, 21) = 0,00026	P = 0,9872
WB MyD88	F(1, 22) = 18,93	P = 0,0003	F(1, 22) = 14,68	P = 0,0009	F(1, 22) = 0,01079	P = 0,9182
WB p65	F(1, 21) = 8,611	P = 0,0079	F(1, 21) = 0,2091	P = 0,6522	F(1, 22) = 1,666	P = 0,2102
WB COX-1	F(1, 23) = 0,03764	P = 0,8479	F(1, 23) = 6,311	P = 0,0195	F(1, 23) = 2,161	P = 0,1551
WB 4-HNE	F(1, 20) = 1,026	P = 0,3232	F(1, 20) = 4,761	P = 0,0412	F(1, 20) = 0,07942	P = 0,7810
WB Nrf2	F(1, 22) = 16,51	P = 0,0005	F(1, 22) = 2,558	P = 0,1240	F(1, 22) = 2,674	P = 0,1162

Tabla 3. Análisis ANOVA de dos vías (valores F y dfs)

4.4.2 “Chonic mild stress” curso temporal 14 días

4.4.2.1 Niveles de corticosterona en plasma en condiciones de estrés crónico durante 14 días

Se evaluaron los niveles de corticosterona en plasma tras 14 días de estrés crónico leve. Se observó un efecto principal del estrés en los niveles de corticosterona, viéndose aumentados en ambos grupos estresados con respecto a sus grupos control (Fig. 35A y Tabla 4).

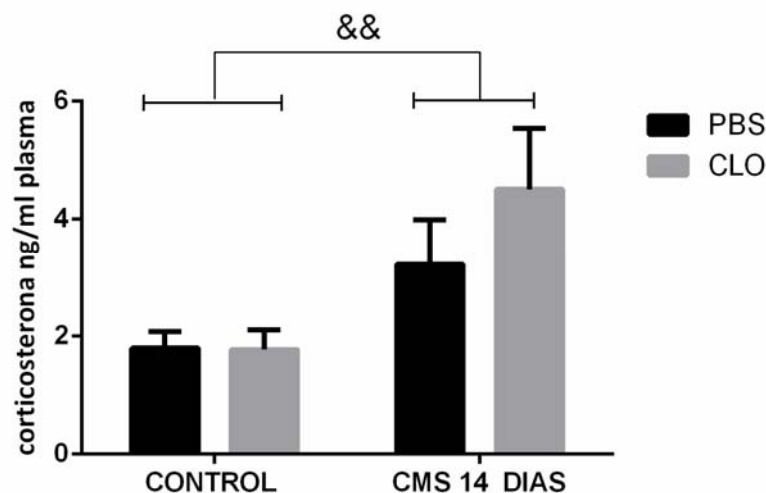


Fig.35.- Niveles de corticosterona plasmática, evaluados tras 14 días de estrés crónico de ratas tratadas con clodronato encapsulado en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en CONTROL y condiciones de estrés agudo por inmovilización (CMS 14 DIAS), Las barras representan la media muestral + EEM de 4-6 animales por grupo. && p <0.01 efecto principal del estrés en el análisis ANOVA de dos vías entre grupos.

4.4.2.2 Efectos de la depleción de PVM en la expresión de citocinas pro-inflamatoria y sus receptores en condiciones de estrés crónico de 14 días

Tras el estrés crónico de 14 días se ha evaluado los niveles de expresión génica o proteica de citocinas proinflamatorias y de sus receptores. En caso de IL-1 β , se han encontrado efectos principales del estrés y del tratamiento con CLO en su expresión génica. Se ha visto también un efecto principal del tratamiento con CLO elevando sus niveles de expresión génica (Fig. 36A y Tabla 4). No se ha visto efectos significativos con respecto a los niveles de expresión génica de las las citocinas IL-6 y TNF- α (Fig. 36B y C respectivamente Tabla 4).

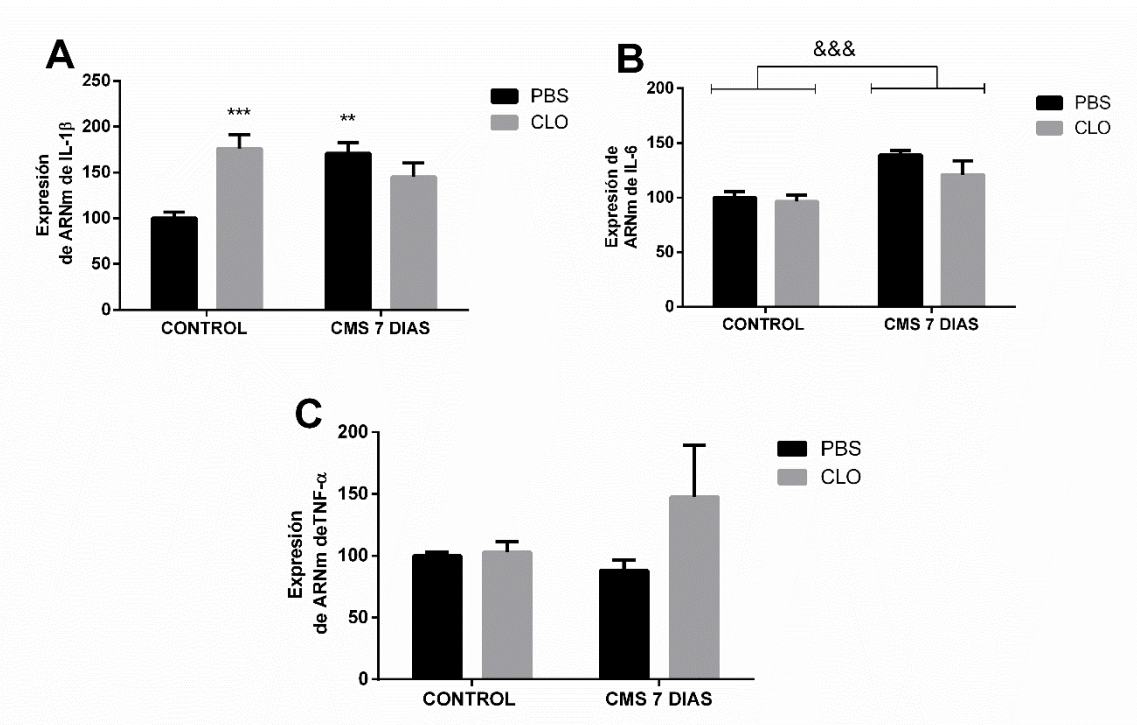


Fig. 36.- Expresión génica de IL-1 β (A), IL-6 (B) y TNF α (C), en la corteza frontal de ratas tratadas con la administración central de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en condiciones de CONTROL y estrés crónico (CMS 14 DIAS). Las barras representan la media + EEM de 4-6 animales por grupo. & p <0.05, efecto principal del estrés y efecto principal del tratamiento CLO $\Psi\Psi$ p <0.01, en el análisis ANOVA de dos vías entre grupos.

Con respecto a la expresión proteica los receptores de citocinas no se han observado efectos significativos para IL-1R, IL-6R, TNFR1 y TNFR2 (Fig. 37A, B, C y D).

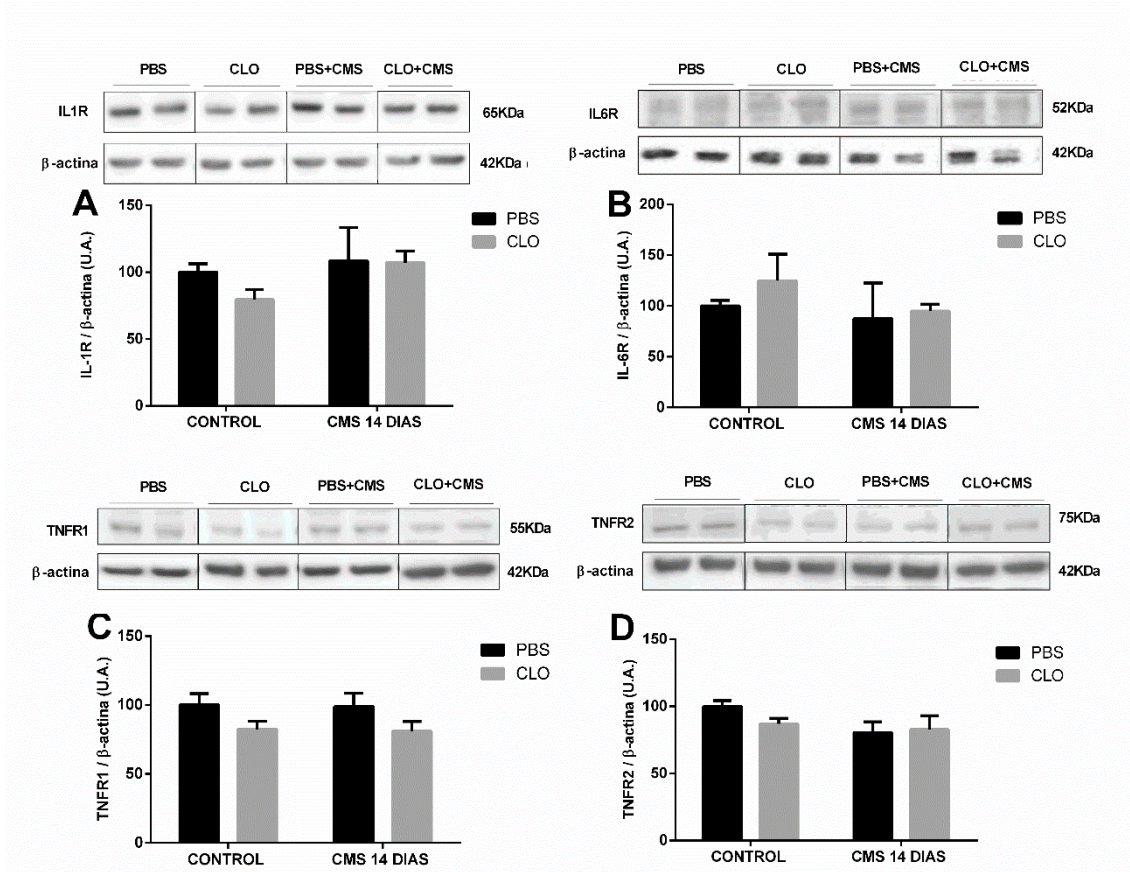


Fig.37- Niveles de expresión proteica de los receptores IL-1R(A), IL-6R(B), TNFR1 (C) y TNFR2 (D) en corteza frontal de ratas tratadas con la administración de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en condiciones de CONTROL y estrés crónico durante 14 días (CMS 14 DIAS), los datos densitométricos de las respectivas bandas de interés están normalizados con respecto a la β -actina (banda inferior). Se recortaron las imágenes del Western Blot (líneas negras) para mejorar la claridad y la concisión de la presentación. Los datos representan la media muestral.

4.4.2.3 Efectos de la depleción de los PVM sobre la vía de señalización del receptor de inmunidad innata toll-like 4 (TLR-4) en condiciones de estrés crónico durante 14 días

En la vía de señalización de los receptores de inmunidad innata se ha podido observar un efecto principal del estrés en la expresión proteica de MyD88 (Fig. 38D y tabla 4). No se han observado diferencias significativas en los demás

mediadores implicados en la vía de señalización relacionadas con la inmunidad innata: TLR-4, CD14, MD-2, HMGB-1, HSP60 (Fig. 38A, B, C, E, F respectivamente y Tabla 4).

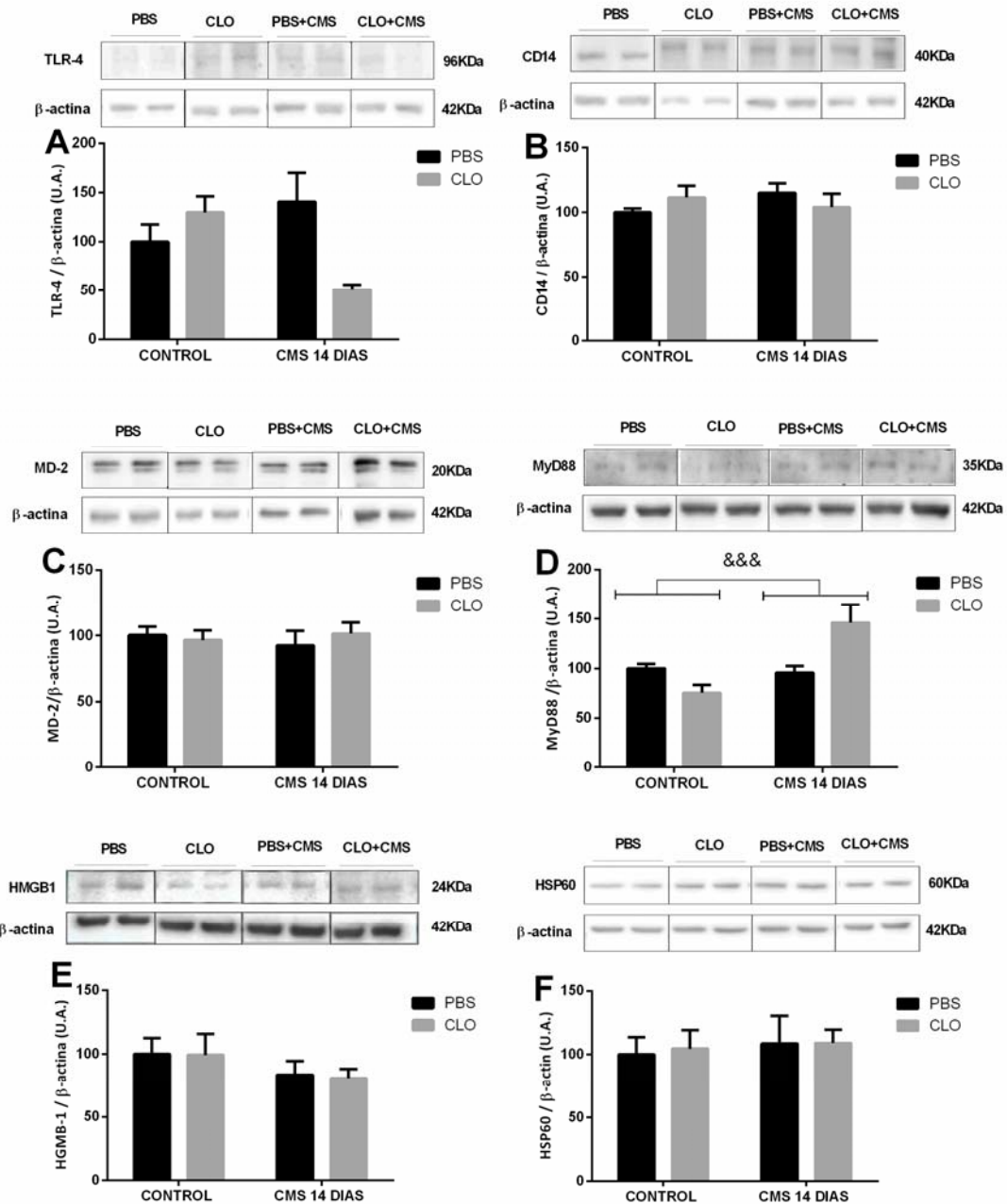
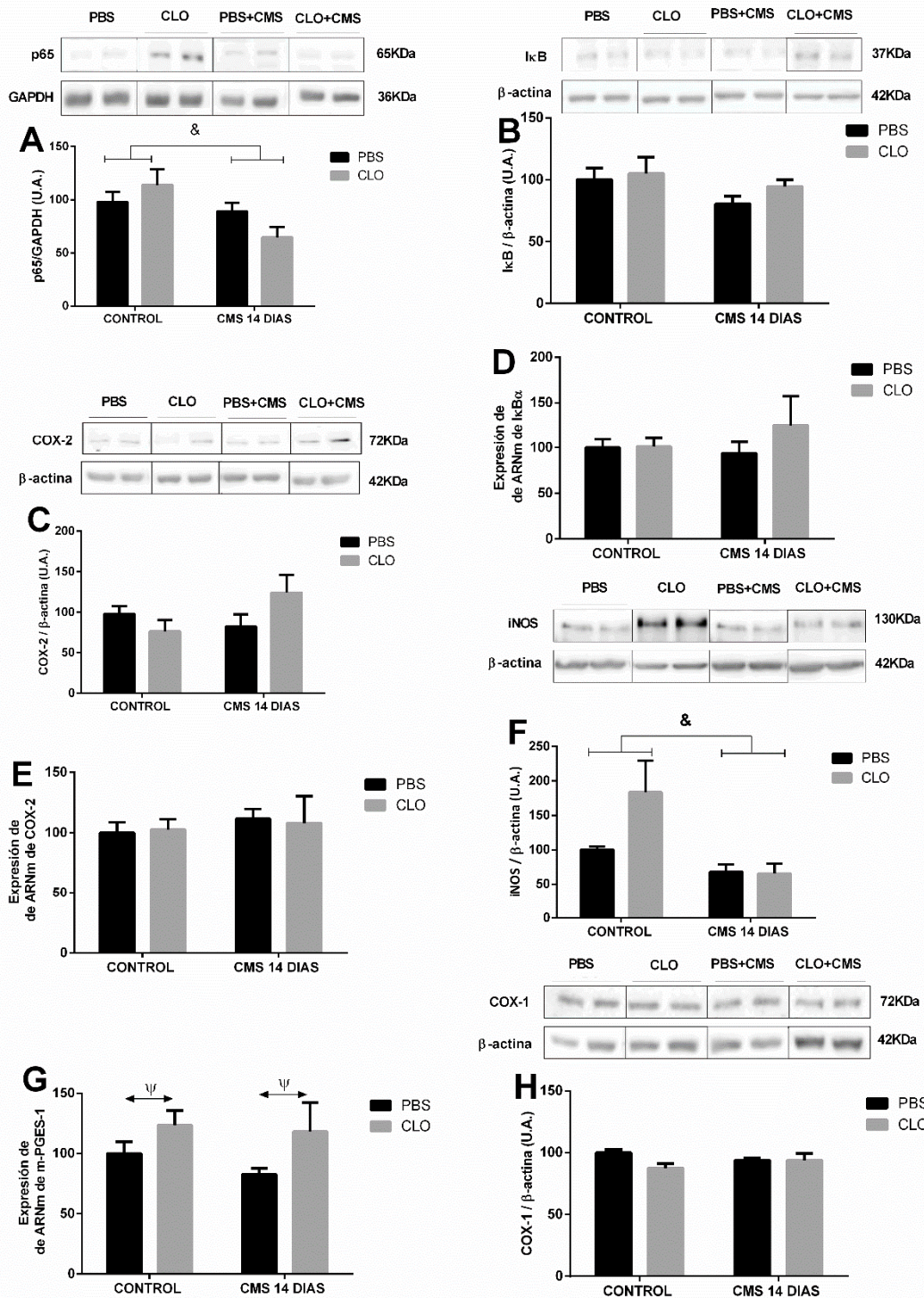


Fig. 38.-Niveles de expresión de TLR-4 (A), CD14 (B), MD-2 (C), MyD88 (D), HMGB-1 (E) y HSP60 (F) en la corteza frontal de ratas tratadas con la administración de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en condiciones de Control (CONTROL) y estrés agudo por inmovilización (CMS 14 DIAS). Los datos densitométricos de las respectivas bandas de interés están normalizados con respecto a la β -actina (banda inferior). Se recortaron las imágenes del Western Blot (líneas negras) para mejorar la claridad y la concisión de la presentación. Los datos representan la media muestral + EEM de 4-6 animales por grupo. &&& p < 0.001 efecto principal del estrés en el ANOVA de dos vías entre grupos.

4.4.2.4 Efectos de la depleción de PVM en la vía de señalización del factor NF-KB en condiciones de CMS durante 14 días

En la vía señalización del factor nuclear NF- κ B, se ha podido observar un efecto principal del estrés disminuyendo los niveles proteicos en núcleo de la subunidad del NF- κ B, el p65 (Fig. 39A y Tabla 4). También se ha observado un efecto del estrés, viéndose disminuídos los niveles proteicos de la enzima inducible óxido nítrico sintasa (iNOS) (Fig. 39F y Tabla 4). Se ha observado un efecto del tratamiento con CLO, en la expresión génica de mPGES-1, la enzima responsable del último paso en la producción de la prostaglandina E₂ (Fig. 39G y Tabla 4). No se han observado diferencias significativas en la expresión de su proteína inhibitoria I κ B (Fig, 39B y D), COX-2 (Fig. 39C y E) y COX-1 (Fig. 39F). Así como no se observó diferencias significativas en la expresión de prostaglandinas 15d-PGJ₂ (clásicamente antiinflamatoria) o (Fig. 39I) PGE₂ (proinflamatoria) en muestras de corteza frontal (Fig. 39J).



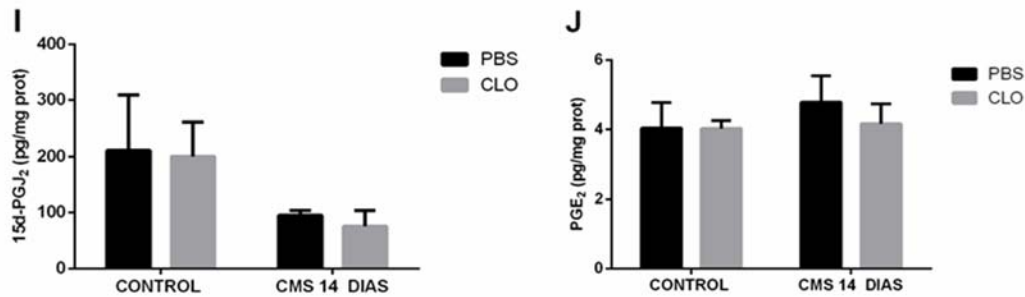


Fig. 39- Expresión proteica de la subunidad p65 de NF- κ B en extractos nucleares (A), I κ B α en extractos citosólicos (B), COX-2 (C), iNOS (F) y COX-1 (H) en la corteza pre frontal de ratas tratadas con la administración de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en condiciones de CONTROL y estrés crónico (CMS 14 DIAS), Expresión de ARNm de I κ B α (D), COX-2 (E) y mPGES-1 (G) en la corteza frontal de ratas tratadas con la administración de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en CONTROL y condiciones de estrés crónico (CMS 14 DIAS). Análisis realizado a través de WB, los datos densitométricos de las respectivas bandas de interés están normalizados con respecto a la β -actina, excepto por la subunidad (A) de p65 de NF- κ B en la que se utilizó la proteína nuclear GAPDH (banda inferior). Se recortaron las imágenes del Western Blot (líneas negras) para mejorar la claridad y la concisión de la presentación. Niveles de 15d-PGJ₂ (I) y de PGE₂ (J) en corteza frontal en los diferentes grupos estudiado. Los datos representan la media muestral+ EEM de 4-6 animales por grupo. & p< 0,05 efecto del estrés (CMS 14 DIAS) y Ψ p <0,05 efecto del tratamiento con CLO en el análisis ANOVA de dos vías entre los grupos.

4.4.2.5 Efecto de la depleción de los PVM en los marcadores de estrés oxidativo/nitrosativo y en sus mecanismos antioxidantes reguladores en condiciones de estrés crónico durante 14 días

No se han observado diferencias significativas en el índice de estrés oxidativo/nitrosativo 4-HNE (Fig. 40A), o en las enzimas antioxidantes GRS, SOD-2, y PARK7 (Fig. 40C, E, D). Sin embargo, se ha podido observar un efecto principal del estrés en los niveles proteicos en núcleo del factor de transcripción Nrf2 (Fig. 40B y tabla 4).

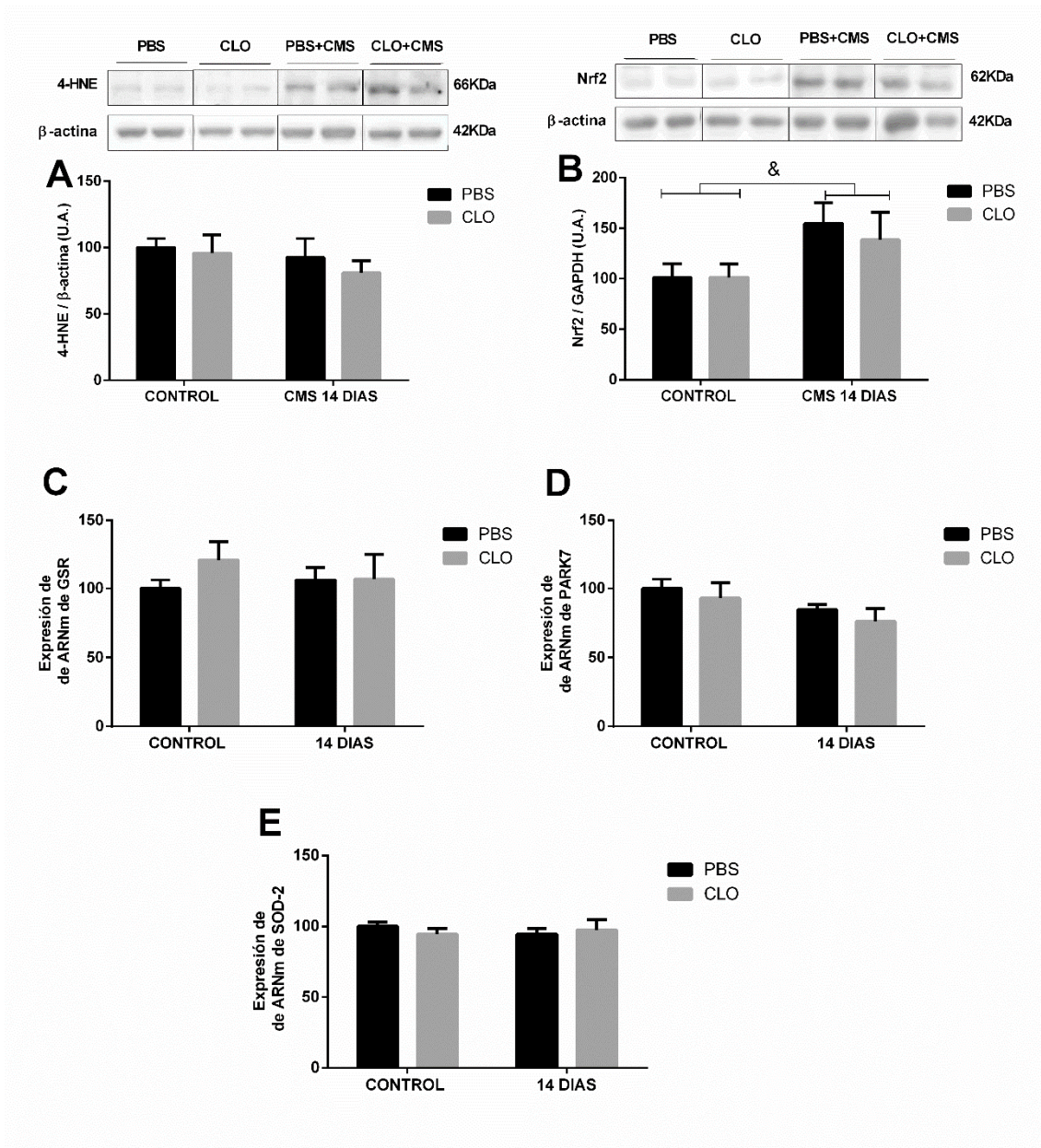


Fig. 40.-Expresión proteica de 4-HNE (A) y Nrf2 en extractos nucleares (B) y expresión de ARNm de GRS-1 (C), PARK7 (D) y SOD-2 (E) en la corteza frontal de ratas tratadas con la administración central de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en condiciones de CONTROL y estrés agudo de restricción (CMS 14 DIAS). En el análisis de transferencia western para la expresión de proteínas, los datos densitométricos de la banda 4-HNE se normalizan con respecto a la β -actina, y para la proteína nuclear Nrf2 (A) se utilizó GAPDH (banda inferior). Se recortaron blots (líneas negras) para mejorar la claridad y la concisión de la presentación. Las barras representan la media + SEM de 4-6 animales por grupo. & p < 0.05 efecto principal del en el análisis ANOVA de dos vías entre grupos.

CMS 14 DIAS						
Parametros	Estrés		Tratamiento CLO		Interacción	
Corticosterona	F(1, 21) = 9,161	P = 0,0064	F(1, 21) = 0,8257	P = 0,3738	F(1, 21) = 0,8939	P = 0,3552
mARN IL-1β	F(1, 21) = 6,829	P = 0,0162	F(1, 21) = 11,69	P = 0,0026	F(1, 21) = 1,772	P = 0,1974
WB TLR-4	F(1, 21) = 0,8466	P = 0,3680	F(1, 21) = 2,054	P = 0,1665	F(1, 21) = 8,241	P = 0,0091
WB MyD88	F(1, 20) = 15,41	P = 0,0008	F(1, 20) = 2,376	P = 0,1389	F(1, 20) = 19,86	P = 0,0002
WB p65	F(1, 21) = 5,679	P = 0,0267	F(1, 21) = 0,1217	P = 0,7307	F(1, 21) = 2,768	P = 0,1110
WB COX-2	F(1, 21) = 1,230	P = 0,2800	F(1, 21) = 0,4857	P = 0,4935	F(1, 21) = 4,798	P = 0,0399
mRNA mPGES-1	F(1, 21) = 0,7446	P = 0,3980	F(1, 21) = 5,094	P = 0,0348	F(1, 21) = 0,2041	P = 0,6560
WB Nrf2	F(1, 22) = 16,51	P = 0,0005	F(1, 22) = 2,558	P = 0,1240	F(1, 22) = 2,674	P = 0,1162

Tabla 4. Analices ANOVA de dos vías (valores F y dfs).

4.4.2.6 Niveles de quimioquinas en estrés agudo por inmovilización y estrés crónico

Se han evaluado también la expresión de otros mediadores implicados en la respuesta neuroinflamatoria, como es la quimioquina MCP-1/CCL2, un marcador temprano del tráfico de células inmune tanto en estrés agudo por inmovilización (ESTRÉS 6H) como en el estrés crónico durante 21 días (CMS 21 DIAS). El estudio de este tráfico es muy relevante ya que se ha relacionado con una amplificación de una respuesta inmune en SNC, directamente relacionado con alteraciones comportamentales en modelos de LPS y estrés (Weber *et al.*, 2017). El ANOVA de dos vías evidenció un efecto principal del estrés en el aumento de los niveles de expresión génica tras el estrés agudo por inmovilización (Fig. 41A y Tabla 2). En lo que se refiere al estrés crónico, se han observado efectos principales del estrés, del tratamiento con CLO e interacción entre los factores (tratamiento CLO x CMS 21 DÍAS) en los niveles de expresión génica de MCP-1 (Fig. 41B y Tabla 2) El post test de Tukey reveló diferencias significativas entre el grupo CLO+CMS 21 DIAS con respecto a los grupos CLO+CONTROL y PBS+ CMS 21 DIAS.

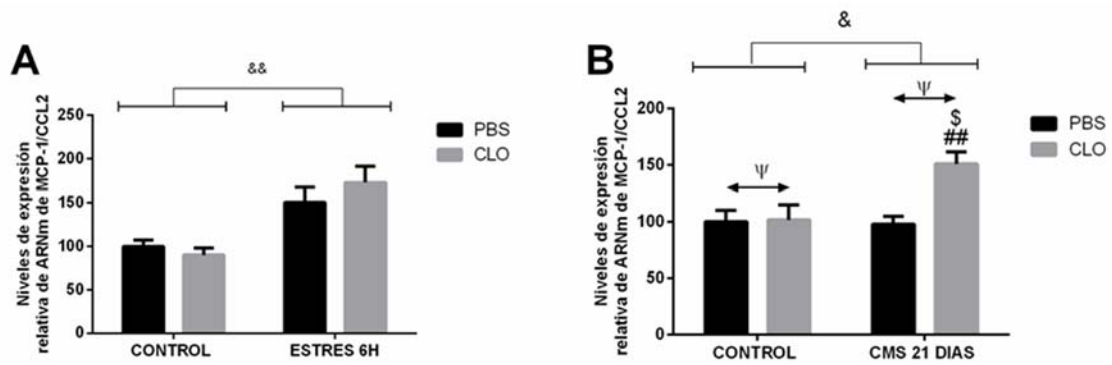


Fig.41.- Expresión génica de MCP-1 en estrés agudo por inmovilización (A), en estrés crónico durante 21 días (CMS 21 DIAS) (B) en corteza frontal de tejido cerebral de ratas tratados con la administración central de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en condiciones de CONTROL, estrés agudo (ESTRÉS 6H) y crónico (CMS 21 DIAS). Las barras representan la media + SEM de 3-6 animales por grupo. && $p < 0.01$ y & $p < 0.05$ un efecto principal del estrés, Ψ $p < 0.05$ efecto principal del tratamiento con CLO en el análisis ANOVA de dos vías entre grupos; En caso de interacción, post test de Tukey: \$ $p < 0.05$ Vs grupo CLO + CONTROL; ## $p < 0.05$ Vs grupo PBS + CMS 21 DIAS.

4.5 Papel de los PVM en el tráfico de células inmunes

Los últimos resultados recogidos en el apartado anterior, nos llevaron a plantear si el aumento observado de la MCP-1 nos podría indicar un efecto regulador de los PVM en el tráfico de células inmunes en modelos de neuroinflamación relacionados con el estrés. La estancia corta financiada por el MINECO permitió la posibilidad de contactar con un laboratorio experto en el tráfico de células inmunes, en Columbus, OHIO, USA. (Dr. Jonathan Godbout), pudiendo de esta manera verificar el papel de los PVM a través del aprendizaje de técnicas como la citometría de flujo.

4.5.1 Tráfico de células inmunes en un modelo agudo de administración de LPS y estrés social o “repeat social defeat”

LPS 24 HORAS

El primer experimento fue realizado en un modelo agudo de LPS (sacrificio y toma de muestras a las 24 horas de su administración intraperitoneal). En este

modelo no se observaron diferencias significativas con respecto al tráfico de células inmunes entre los distintos grupos a estudio con respecto a los niveles de granulocitos (Fig. 42A), monocitos (Fig. 42B) o células T (Fig. 42C), a través de citometría de flujo.

Fueron evaluados también los niveles de expresión génica de citocinas proinflamatorias relacionadas con el tráfico inmune como IL-1 β , IL-6 y TNF- α . No se observaron tampoco diferencias significativas, pero existe una tendencia al aumento en el grupo PBS+LPS 24 H con respecto al grupo PBS + CONTROL en los niveles de IL-1 β y (Fig. 42A) y TNF- α (Fig. 42B).

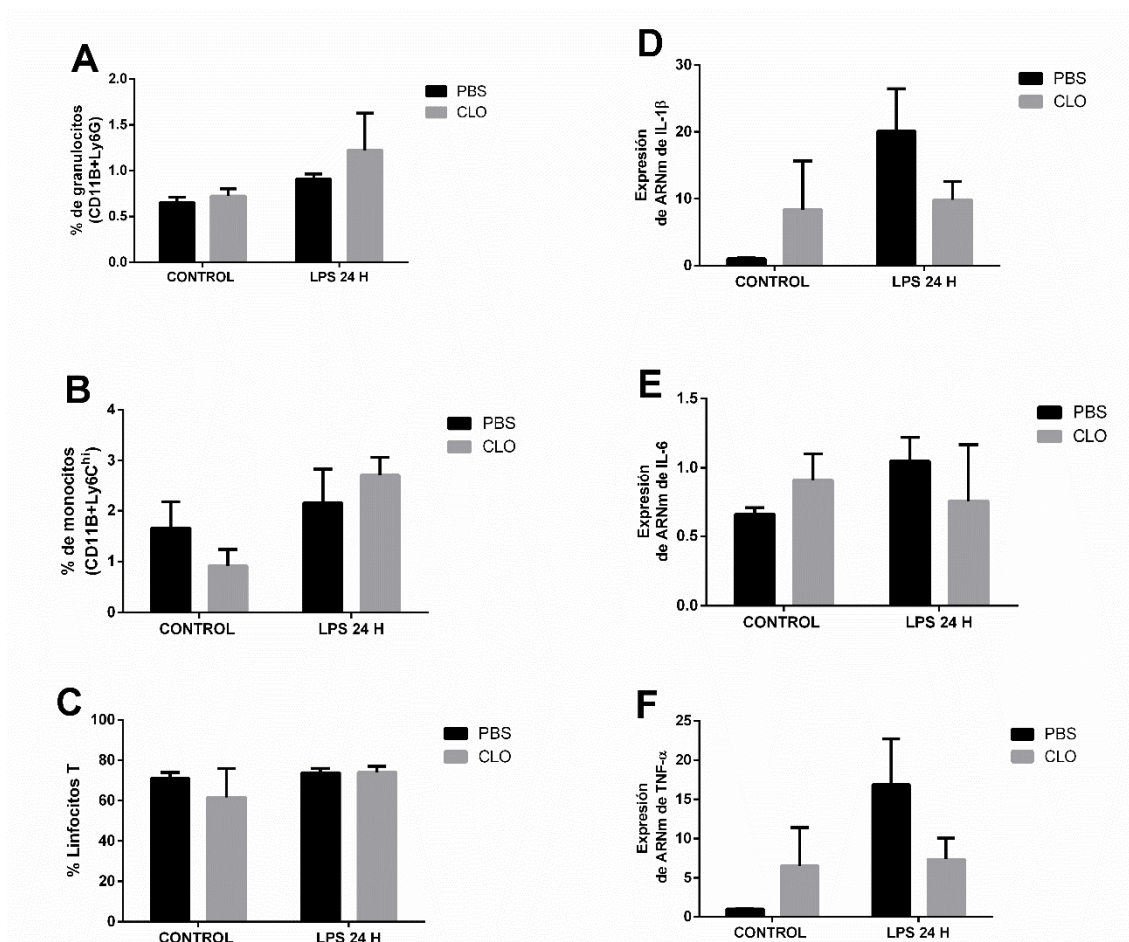


Fig.42.- Tráfico de células inmune: granulocitos (A), monocitos (B), células T (C) en tejido cerebral (B), a través de citometria de flujo. Niveles de expresión génica de citoquinas IL-1 β (D), IL-6(E) y TNF- α (C), en ratones tratados con la administración central de clodronato en liposomas (CLO) o su vehiculo (PBS) en condiciones de CONTROL y LPS (LPS 24 H). Las barras representan la media + SEM de 3-4 animales por grupo.

ESTRÉS SOCIAL “REPEAT SOCIAL DEFEAT” (RSD):

El siguiente experimento planteado fue la verificación del papel de los PVM en un modelo de estrés social o “Repeat social defeat” (RSD), un modelo optimizado en el centro receptor de la estancia predoctoral y en el que se había establecido previamente la relación entre el tráfico de células inmune y la ansiedad y comportamiento tipo depresivo (Weber *et al.*, 2017).

Con respecto al tráfico de células inmunes en el modelo de estrés social (RSD) se observó un efecto inhibitorio del tratamiento con clodronato (CLO) en el tráfico de granulocitos (Ly6G+) (Fig. 43A y Tabla 5). Se ha observado también un efecto positivo del estrés aumentando el número de monocitos con perfil proinflamatorio (Ly6C^{hi}) en cerebro (Fig. 43B y Tabla 5) y, en contraposición, un efecto del estrés disminuyendo los niveles de monocitos (Ly6C^{low}) (Fig. 43D y Tabla 5), células que han sido descritas por algunos autores con un perfil reparador o de “vigilancia” (Shi & Pamer, 2011). Por último, se observó que el tratamiento con CLO tenía un efecto principal, aumentando el número de linfocitos T en cerebro (Fig. 43C y Tabla 5), una regulación previamente descrita en otros modelos de patologías en el SNC (Faraco *et al.*, 2017).

Dada la relación directa en el tráfico de células inmune en SNC y la periferia, se ha evaluado la proporción de células inmunes en sangre. Se encontró un efecto del estrés (RSD) aumentando el número de granulocitos (Ly6G+) (Fig. 43E y Tabla 5) y de monocitos (Ly6C^{hi}) (Fig. 43F y Tabla 5) en sangre (Weber *et al.*, 2017). No se han observado efectos con respecto a los niveles de monocitos (Ly6C^{low}).

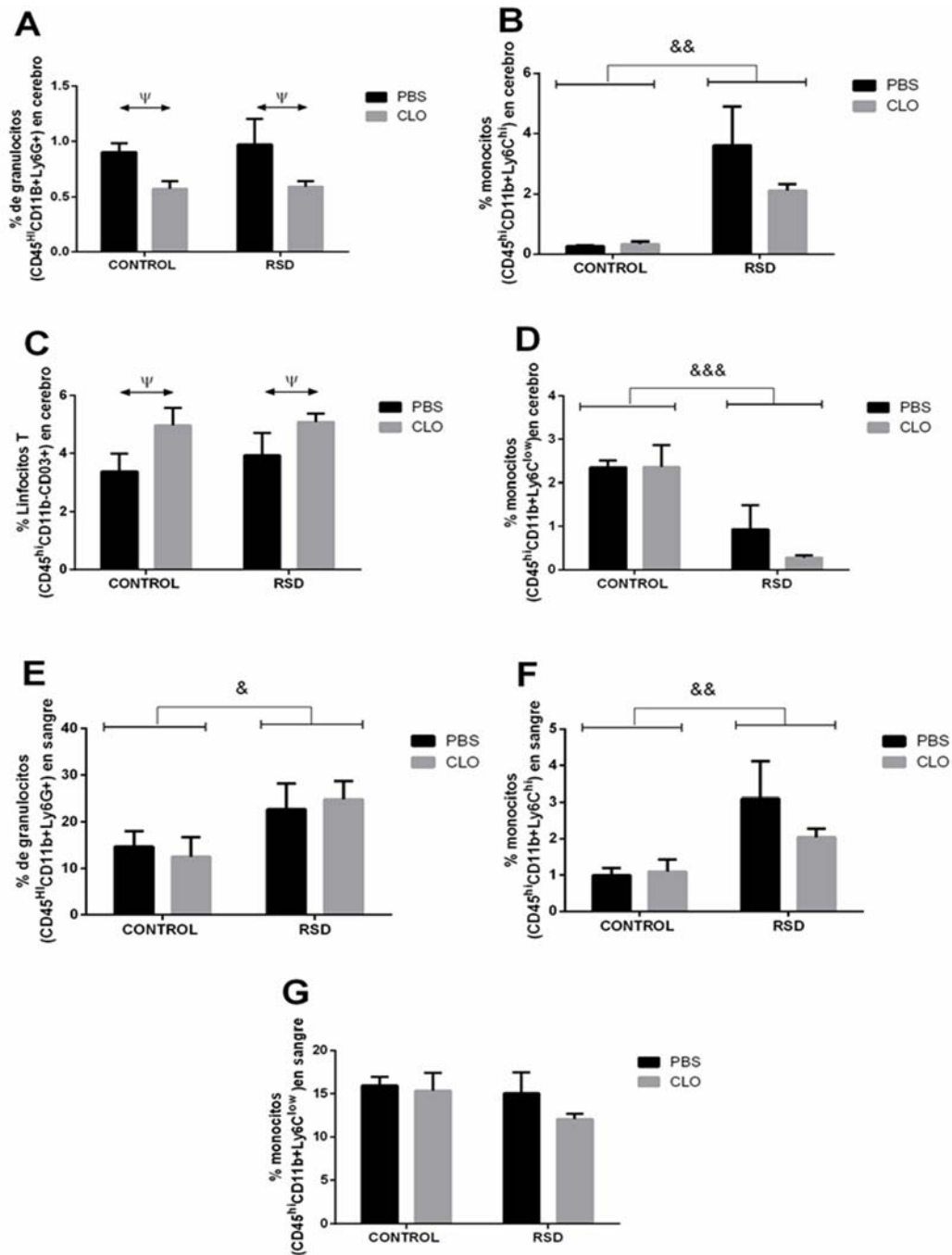


Fig. 43.- Tráfico de células inmune de origen mieloide en tejido cerebral: granulocitos (Ly6G⁺) (A), monocitos (Ly6C^{hi}) (B), linfocitos T (CD11b⁺/CD03⁺) (C), monocitos (Ly6C^{low}) (D). Tráfico de células inmune en sangre: granulocitos (Ly6G⁺) (E), monocitos (Ly6C^{hi}), monocitos (Ly6C^{low}), en ratones tratados con la administración central de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en condiciones de CONTROL y estrés (RSD). Las barras representan la media + EEM de 6 animales por grupo. && p < 0.01 efecto principal de RSD, & p < 0.05 efecto principal de RSD, Ψ p < 0.05 efecto principal del tratamiento CLO, en el análisis ANOVA de dos vías entre grupos.

RSD						
Parametros	Estrés		Tratamiento CLO		Interacción	
RSD Ly6G+	F (1, 16) = 0,1140	P = 0,7400	F (1, 16) = 7,381	P = 0,0152	F (1, 16) = 0,03393	P = 0,8562
RSD Ly6CHI	F (1, 16) = 15,21	P = 0,0013	F (1, 16) = 1,149	P = 0,2996	F (1, 16) = 1,418	P = 0,2511
RSD CD03+	F (1, 16) = 0,3171	P = 0,5812	F (1, 16) = 5,225	P = 0,0362	F (1, 16) = 0,1319	P = 0,7212
RSD Ly6C low	F (1, 16) = 20,60	P = 0,0003	F (1, 16) = 0,7114	P = 0,4114	F (1, 16) = 0,7202	P = 0,4086
RSD Ly6G+ sangre	F (1, 19) = 5,963	P = 0,0246	F (1, 19) = 4,993e-0	P = 0,9982	F (1, 19) = 0,2730	P = 0,6074
RSD Ly6Chi sangre	F (1, 19) = 9,351	P = 0,0065	F (1, 19) = 0,9125	P = 0,3515	F (1, 19) = 1,368	P = 0,2567

Tabla 5. Análisis ANOVA de dos vías (valores F y dfs).

4.5.1.1 Papel de los PVM en el tráfico de células inmunes en un modelo subcrónico de neuroinflamación inducido por LPS.

Teniendo en cuenta estudios previos en los que se ha podido observar un papel regulador para los PVM en el paso de mediadores y en algunos casos hasta de tipos celulares al SNC en diversos modelos animales de neuropatologías como la esclerosis múltiple y el Alzheimer (Faraco *et al.*, 2017), se decidió verificar su papel regulador en un modelo de neuroinflamación por LPS. Este modelo de neuroinflamación es muy conocido y estudiado por su relación con alteraciones comportamentales como la ansiedad y “*sickness behaviour*”. El modelo particular elegido para ello, fue un modelo administración de dosis progresivas de LPS durante 3 días, donde se pueden observar alteraciones comportamentales y se evita una posible tolerancia por la administración de LPS (Wickens *et al.*, 2017).

4.5.1.2 Activación inmune en un modelo subcrónico de LPS

Como marcador de activación inmune se pesaron los bazo de los animales sometidos a la administración subcrónica de LPS (Engler *et al.*, 2004). Se ha observado un efecto principal del estrés tras la administración subcrónica de LPS (Fig. 44A y Tabla 6).

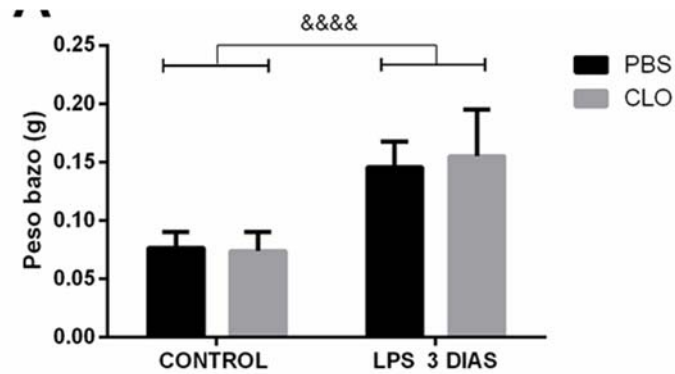


Fig. 44.-Peso de bazo tras la administración de LPS en ratones tratados con la administración central de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en condiciones de CONTROL y LPS (LPS 3 DIAS). Las barras representan la media + EEM. &&&& p < 0.0001 efecto principal de LPS en el análisis ANOVA de dos vías entre grupos.

4.5.1.3 Tráfico de células inmunes en un modelo subcrónico de LPS tras la depleción de los PVM.

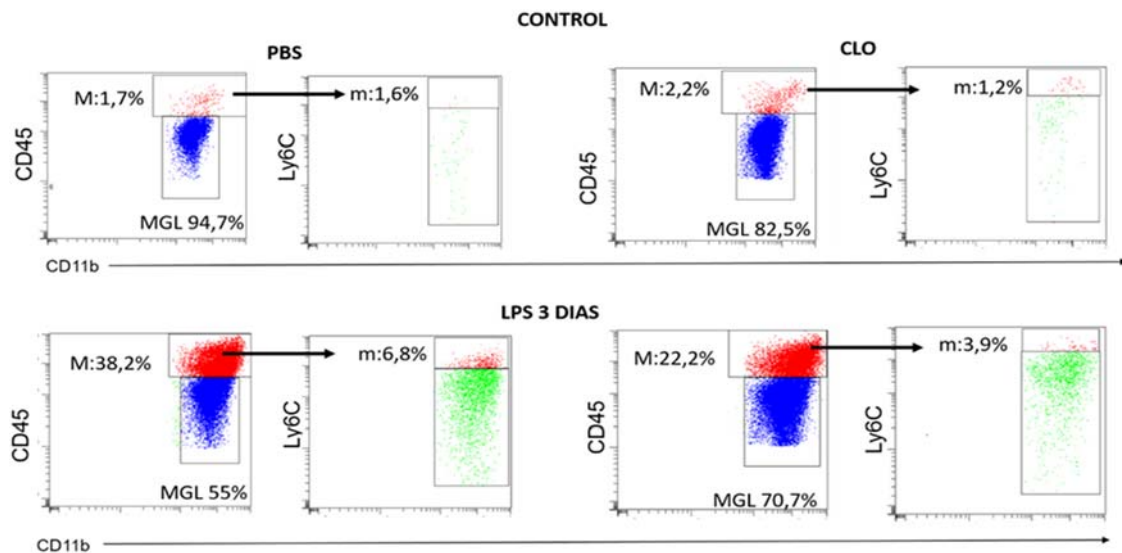
La función de los monocitos incluye mediar en la defensa de un organismo frente a un estímulo microbiano (Serbina *et al.*, 2008), y lo hacen infiltrándose en el sitio de daño o inflamación y diferenciándose. La capacidad de los monocitos para movilizarse y realizar el tráfico es un proceso crítico y aparentemente complejo, necesario para promover la defensa inmune. El aumento de células mieloides cerebrales ha sido previamente descrito tras una administración periférica de LPS y modelos de estrés (Wohleb *et al.*, 2012). Hemos decidido verificar el papel de los PVM en este evento, además de identificar el perfil inflamatorio (LyC6^{hi}) de los monocitos resultantes de este tráfico células en nuestro modelo.

Cerebro:

Se ha observado un efecto principal del LPS y un efecto del tratamiento con CLO en el tráfico de células mieloides en tejido cerebral, detectado por el ANOVA de dos vías. También apareció una interacción entre los factores (tratamiento con CLO y LPS), y el post test detectó una diferencia significativa del grupo PBS+LPS 3 DIAS con respecto al grupo PBS+CONTROL. Se observó también una diferencia significativa del grupo CLO+LPS 3 DIAS con respecto al

grupo PBS+LPS 3 DIAS y de la misma manera con respecto al grupo CLO+CONTROL (Fig. 45A y Tabla 6).

Con respecto al tráfico de monocitos con perfil inflamatorio ($Ly6C^{hi}$) se ha observado un efecto principal del estrés en el aumento al tráfico relacionado con este tipo celular, y también un efecto principal del tratamiento con CLO y una interacción entre los factores (tratamiento con CLO x LPS). El post test de Tukey evidenció una diferencia significativa entre el grupo PBS+LPS 3 DIAS con respecto al grupo PBS+CONTROL, también se han podido detectar diferencias significativas entre el grupo CLO+LPS 3 DIAS con respecto a los grupos PBS+LPS 3 DIAS y CLO+CONTROL. No se observaron diferencias con respecto a linfocitos T (FIG. 45C).



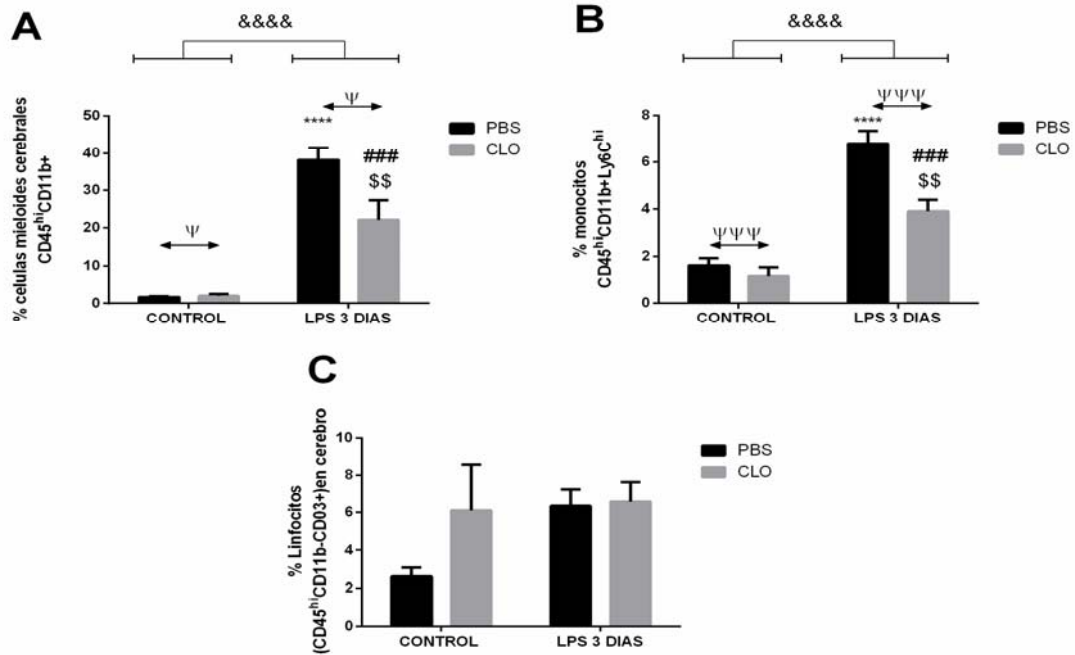


Fig.45- Tráfico de células inmune de origen mieloide (CD45^{hi}CD11b⁺) en tejido cerebral (A), región “M” en imagen de citometria de flujo. Tráfico celular de monocitos Ly6C^{hi} en tejido cerebral (B), región “m”, en imagen de citometria de flujo en tejido cerebral. Microglia región “MGL”, en imagen de citometria de flujo y Linfocitos T (C), de ratones tratados con la administración central de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en condiciones de CONTROL y LPS (LPS 3 DIAS). Las barras representan la media + EEM de 6-7 animales por grupo. &&&& p <0.0001 efecto principal de LPS, Ψ p<0.05 efecto principal del tratamiento CLO, ΨΨΨ p<0.001 efecto principal del tratamiento CLO en el análisis ANOVA de dos vías entre grupos; En caso de interacción, post test de Tukey: **** p <0,0001 Vs grupo PBS + CONTROL; \$\$\$ p <0,01 Vs grupo CLO + CONTROL, ### p < 0,001 Vs grupo PBS+LPS 3 DIAS.

Sangre:

Se ha analizado los niveles del tráfico de células inmune en el torrente sanguíneo ya que mantienen una relación directa con el aumento de células de origen mieloide (CD11b⁺) desde la médula ósea en modelos de estrés y de administración de LPS (Weber *et al.*, 2017). Se ha apreciado una tendencia al aumento en la presencia de células CD11b⁺ positivas en sangre, pero sin diferencias estadísticamente significativas (Fig. 46A). Se observó un efecto principal inhibitorio del LPS en la presencia de células CD11b⁺/SSC low/Ly6C^{hi} (monocitos circundantes) (Fig. 46B y Tabla 6). Por contrario, se ha observado también un efecto positivo de la administración de LPS en el número de granulocitos (Fig. 46C y Tabla 6).

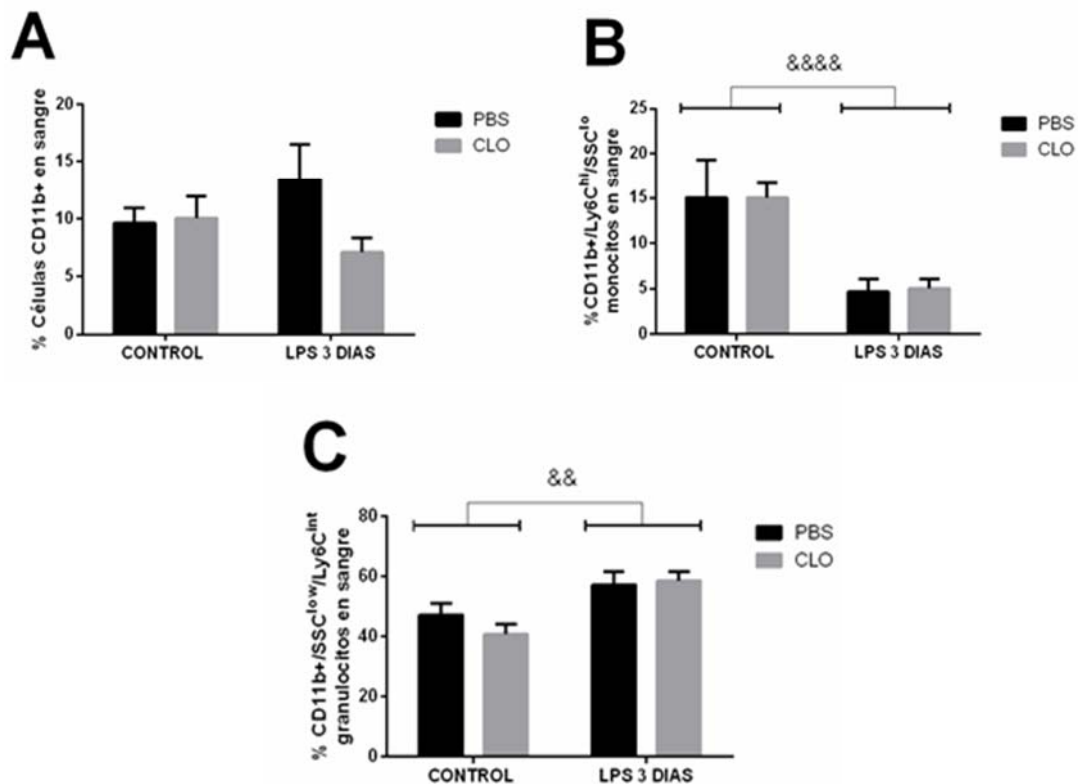
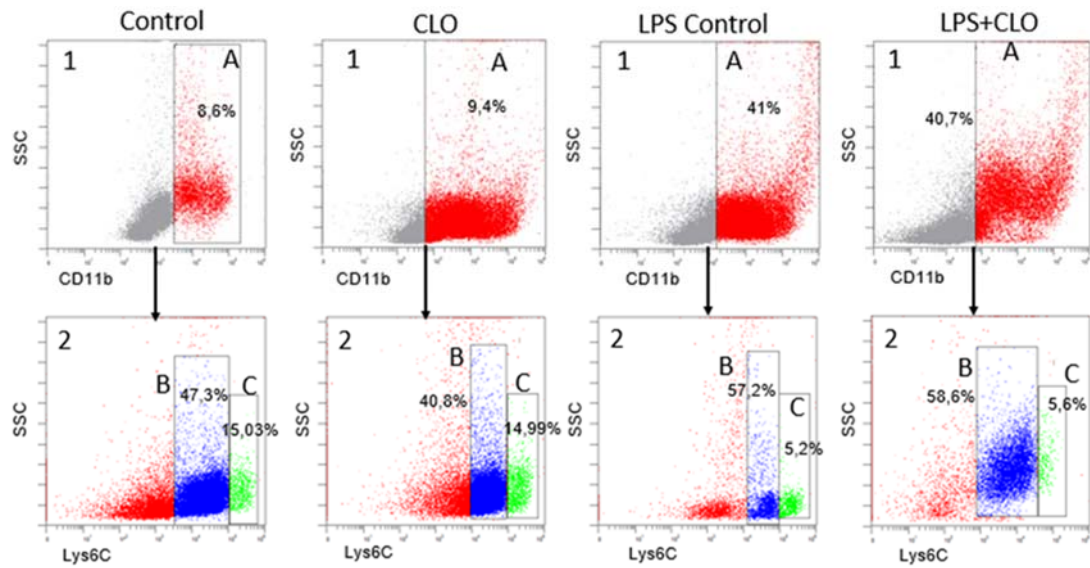


Fig. 46- Tráfico de células inmune de origen mieloide en sangre (A), región “A” en imagen de citometria de flujo. Tráfico celular de monocitos Ly6Chi en sangre (B), región “B”, en imagen de citometria de flujo en tejido cerebral, de ratones tratados con la administración central de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en condiciones de CONTROL y LPS (LPS 3 DIAS). Las barras representan la media + EEM de 6-7 animales por grupo. &&&& p <0.0001 efecto principal de LPS, && p <0.01 efecto principal de LPS, en el análisis ANOVA de dos vías entre grupos.

4.5.1.4 Efecto de la depleción de los pmv en la expresión de citocinas en un modelo de administración subcrónica de LPS

Como ha sido comentado anteriormente, la administración sistémica de LPS es responsable de activar y amplificar mecanismos de señalización proinflamatorios en el SNC, como la síntesis y liberación de citocinas (García-Bueno *et al.*, 2008a). Las citocinas además están implicadas en la regulación del tráfico de células inmunes en diferentes modelos de neuroinflamación (Weber *et al.*, 2017). Se evaluaron los niveles de expresión génica de IL-1 β , IL-6 y TNF α , en un corte coronal de tejido cerebral.

Se observó un efecto principal del LPS en los niveles de expresión génica de IL-1 β , así como una interacción entre los factores (tratamiento CLO y LPS). Los análisis post-test desvelaron diferencias significativas en el grupo PBS + LPS 3 DIAS con respecto al grupo CONTROL+PBS y una disminución en la expresión génica en el grupo CLO+LPS 3 DIAS, con respecto al grupo PBS+LPS 3 DIAS (Fig. 47 A y Tabla 6). No se ha observado cambios significativos en la expresión de IL-6 (Fig. 47B) o TNF- α (Fig. 47C).

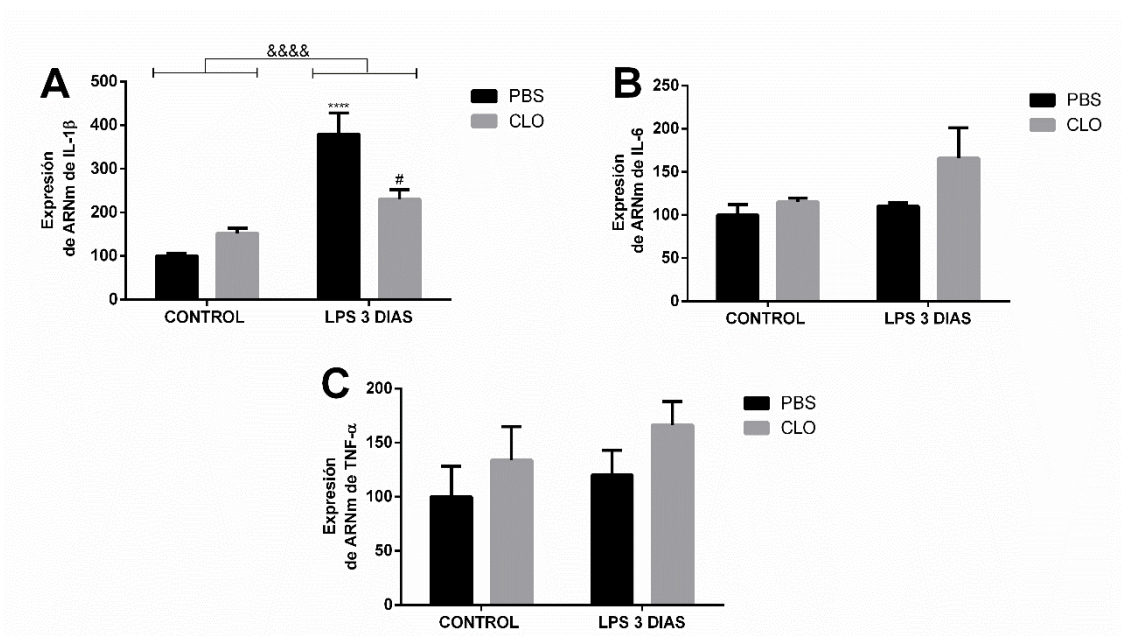


Fig.47.- Expresión génica de IL-1 β (A), IL-6 (B) y TNF α (C), en corte coronal de tejido cerebral de ratones tratados con la administración central de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en condiciones de CONTROL y LPS (LPS 3 DIAS). Las barras representan la media + EEM de 6-7 animales por grupo. &&&& p < 0.0001 efecto principal de LPS en el análisis ANOVA de dos vías entre grupos; En caso de interacción, post test de Tukey: **** p < 0,0001 Vs grupo PBS + CONTROL; # p < 0,5 Vs grupo PBS + LPS 3 DIAS

4.5.1.5 Efecto de la depleción de los PMV en la expresión de quimioquinas y sus receptores en un modelo de administración subcrónica de LPS.

Además de las citocinas, hay otros mediadores más particularmente implicados en el proceso, como por ejemplo las quimioquinas MCP-1/CCL2, y fractalquina /C3XCL1, que regulan el tráfico de células inmunes al sitio de daño como por ejemplo en el caso de los monocitos circundantes (Weber *et al.*, 2017). El ANOVA de dos vías reveló una interacción entre los dos factores (tratamiento CLO x LPS), donde el post test de Tukey reveló una diferencia significativa en los niveles de expresión génica de MCP-1 en el grupo CLO+CONTROL y CLO+LPS 3 DÍAS con respecto al grupo PBS+CONTROL (Fig. 48A y Tabla 6). También se observó un efecto principal del LPS en el aumento de la expresión génica en el receptor de MCP-1 (CCR2), y una interacción entre los factores (tratamiento CLO x LPS), revelando una diferencia significativa en el aumento de la expresión génica del grupo PBS+LPS 3 DIAS con respecto al grupo PBS+CONTROL, y una disminución en el grupo CLO+LPS 3 DIAS con respecto a CLO+CONTROL (Fig. 48B y Tabla 6).

Se han evaluado también los niveles de expresión génica de la fractalquina y de su receptor, que como ha sido comentado con anterioridad, está implicada en la regulación en el tráfico de células inmunes en SNC, además de ser un importante señalizador neuronal, que al ver reducidos sus niveles por un daño o por estímulos estresantes induce la expresión de mediadores inflamatorios como citocinas proinflamatorias a través de la microglia (Weber *et al.*, 2017). No se han observado diferencias significativas tras la administración del LPS o tratamiento con CLO en la expresión génica de la fractalquina (Fig. 48C). Sin embargo, el ANOVA de dos vías detectó un efecto del LPS viéndose aumentada la expresión génica del receptor de fractalquina (CX3CR1), y una interacción entre los factores (tratamiento con CLO x LPS). Los análisis post-test desvelaron diferencias significativas en el aumento su la expresión génica en el grupo PBS+LPS 3 DIAS con respecto a PBS+CONTROL, y una disminución en

la expresión génica en el grupo tratado con CLO (CLO+LPS 3 DIAS) con respecto al grupo PBS+LPS 3 DIAS (Fig. 48D y Tabla 6).

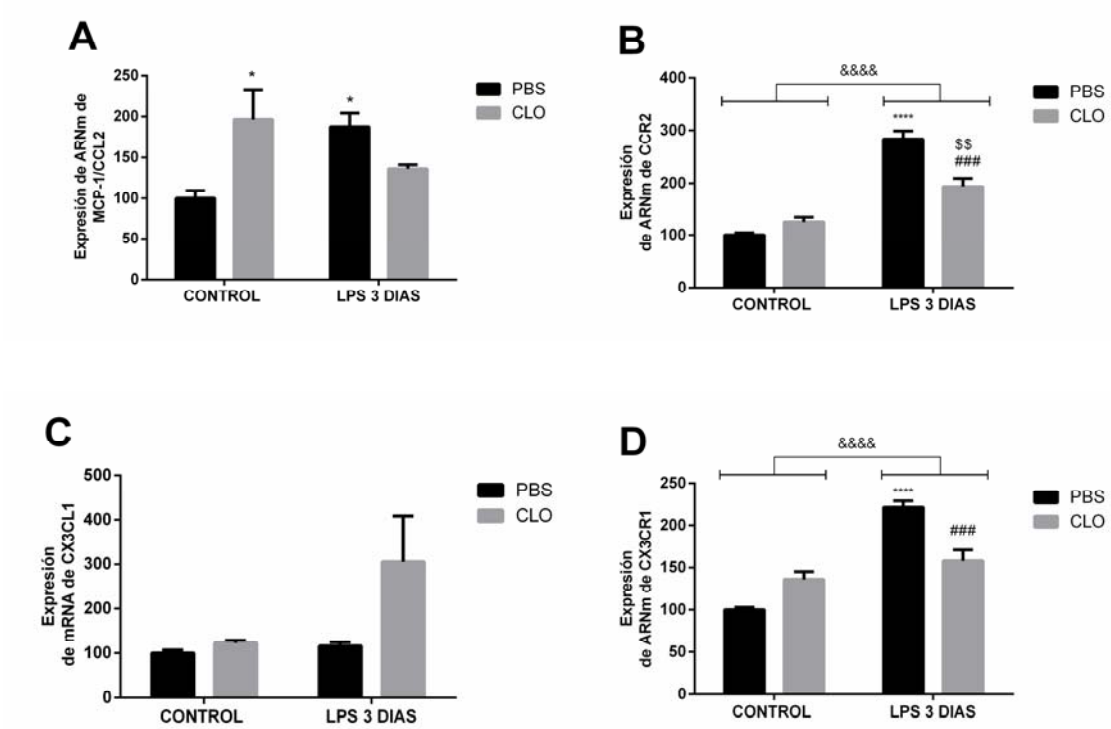


Fig.48.- Expresión génica de MCP-1 (A), CCR2 (B), CX3CL1(C) CX3CR3 (D) en corte coronal de tejido cerebral de ratones tratados con la administración central de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en condiciones de CONTROL y LPS (LPS 3 DIAS). Las barras representan la media + EEM de 6-7 animales por grupo. &&&& p <0.0001 efecto principal de LPS en el análisis ANOVA de dos vías entre grupos; En caso de interacción, post test de Tukey: **** p <0,0001 Vs grupo PBS + CONTROL; ## p <0,01 Vs grupo PBS + LPS 3 DIAS, ### p <0,001 Vs grupo PBS + LPS 3 DIAS, \$\$\$ p <0,01 Vs grupo CLO + CONTROL.

4.5.1.6 Efecto de la depleción de los PMV en la expresión de moléculas de adhesión y metaloproteinasas de matriz en un modelo de administración subcrónica de LPS.

A continuación, el siguiente paso relacionado con el tráfico de células inmune hacia el SNC se centra en las moléculas de adhesión (CAMs). En particular, la molécula de adhesión intercelular (ICAM) y la molécula de adhesión vascular (VCAM) detienen a los leucocitos en la superficie de la célula endotelial. Una vez que el leucocito se ha detenido en la superficie endotelial, puede

polarizarse y migrar a través de eventos regulados por las moléculas de adhesión VCAM/ICAM e integrinas para acceder al espacio perivascular (Greenwood *et al.*, 2011). Se encontró un efecto principal del LPS, reflejado en el aumento de los niveles de la expresión génica de ICAM (Fig. 49A y Tabla 6) tras el ANOVA de dos vías. Además, se observó un efecto principal del LPS en los niveles de VCAM y una interacción entre los factores (tratamiento con CLO y LPS), y el post test de Tukey reveló una diferencia significativa entre el grupo PBS+LPS 3 DIAS con respecto, al grupo PBS+CONTROL (Fig. 49B y Tabla 6).

Una vez que algunas células de origen mieloide (como macrófagos) entran en la vasculatura, el pie astrocítico comprende una barrera adicional que evita que los monocitos entren en el parénquima. Los macrófagos expresan enzimas metaloproteinasas de matriz (MMP) que degradan la barrera astrocítica, exacerbando la infiltración al parénquima cerebral (Bechmann *et al.*, 2007). En este estudio se ha podido observar un efecto principal del LPS en los niveles de expresión génica de MMP-9 tras el ANOVA de dos vías, además, se ha podido observar una interacción entre los factores (tratamiento con CLO y LPS). El post test de Tukey mostró una diferencia significativa de los grupos PBS+LPS 3 DIAS y CLO+LPS 3 DIAS con respecto al grupo CONTROL, y una diferencia significativa entre el grupo CLO+LPS 3 DIAS con respecto al grupo PBS+LPS 3 DIAS (Fig. 49C y Tabla 6).

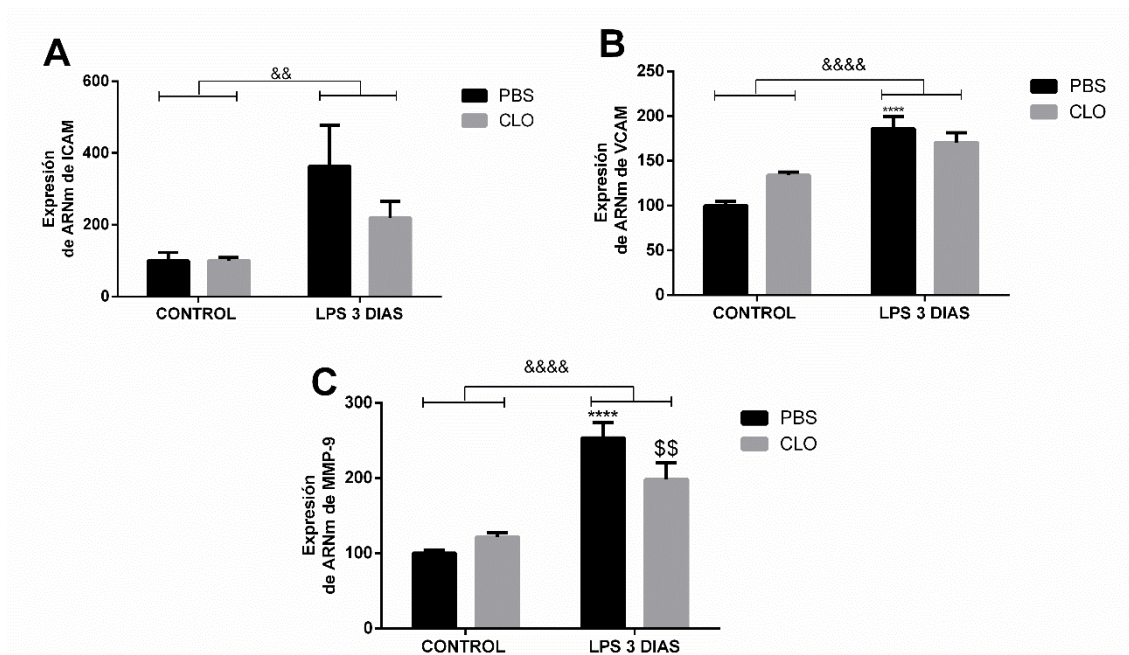


Fig.49.- Expresión génica de ICAM (A), VCAM (B), MMP-9 (C), en corte coronal de tejido cerebral de ratones tratados con la administración central de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en condiciones de CONTROL y LPS (LPS 3 DIAS). Las barras representan la media + EEM de 6-7 animales por grupo. && p <0.01 efecto principal de LPS y &&&& p <0.0001 efecto principal de LPS en el análisis ANOVA de dos vías entre grupos; En caso de interacción, post test de Tukey: **** p <0,0001 Vs grupo PBS + CONTROL; \$ p <0,05 Vs grupo CLO + CONTROL, ## p <0,01 Vs grupo PBS + LPS 3 DÍAS.

LPS 3 DIAS						
Parametros	Estrés		Tratamiento CLO		Interacción	
LPS 3 DIAS bazo	F (1, 21) = 63,09	P < 0,0001	F (1, 21) = 0,1269	P = 0,7252	F (1, 21) = 0,4124	P = 0,5277
LPS 3 DIAS CD11b+CD45HI	F (1, 20) = 58,44	P < 0,0001	F (1, 20) = 4,539	P = 0,0457	F (1, 20) = 4,822	P = 0,0401
LPS 3 DIAS Ly6Chi	F (1, 23) = 78,83	P < 0,0001	F (1, 23) = 14,21	P = 0,0010	F (1, 23) = 7,582	P = 0,0113
LPS 3 DIAS Ly6G+ sangre	F (1, 30) = 12,71	P = 0,0012	F (1, 30) = 0,4343	P = 0,5149	F (1, 30) = 1,064	P = 0,3106
LPS 3 DIAS Ly6Chi	F (1, 28) = 66,27	P < 0,0001	F (1, 28) = 0,01872	P = 0,8922	F (1, 28) = 0,02760	P = 0,8693
LPS 3 DIAS IL1β	F (1, 23) = 39,46	P < 0,0001	F (1, 23) = 2,874	P = 0,1035	F (1, 23) = 12,53	P = 0,0017
LPS 3 DIAS MCP-1	F (1, 23) = 0,4141	P = 0,5263	F (1, 23) = 1,122	P = 0,3005	F (1, 23) = 11,90	P = 0,0022
LPS 3 DIAS CCR2	F (1, 23) = 102,7	P < 0,0001	F (1, 23) = 6,616	P = 0,0170	F (1, 23) = 21,44	P = 0,0001
LPS 3 DIAS CX3CR1	F (1, 23) = 61,79	P < 0,0001	F (1, 23) = 2,211	P = 0,1507	F (1, 23) = 29,88	P < 0,0001
LPS 3 DIAS ICAM	F (1, 23) = 8,714	P = 0,0072	F (1, 23) = 1,235	P = 0,2780	F (1, 23) = 1,245	P = 0,2760
LPS 3 DIAS VCAM	F (1, 23) = 40,53	P < 0,0001	F (1, 23) = 0,8922	P = 0,3547	F (1, 23) = 6,611	P = 0,0171
LPS 3 DIAS MMP-9	F (1, 22) = 64,11	P < 0,0001	F (1, 22) = 3,795	P = 0,0643	F (1, 22) = 12,90	P = 0,0016

Tabla 6. ANOVA de dos vías (valores F y dfs)

4.5.1.7 Efecto de la depleción de los PVM en la ansiedad y “sickness behavior” en un modelo subcrónico de LPS.

La presencia de células mieloides circundantes en el SNC se ha relacionado directamente con la aparición de un comportamiento tipo depresivo o “sickness behaviour” y de ansiedad en diversos modelos de neuroinflamación relacionados con la exposición a estrés (Weber *et al.*, 2017). Además, hay estudios que señalan a los PVM como reguladores del paso de macromoléculas y células inmunes al parénquima cerebral en diferentes modelos de neuropatologías (Faraco *et al.*, 2017). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral con respecto a la regulación del paso de células inmunes al SNC decidimos verificar la posible relación de este evento con las alteraciones comportamentales. El “sickness behaviour” se ha evaluado a través del test de interacción social. Tras el ANOVA de dos vías, se ha observado un

efecto principal del estrés en los diferentes parámetros evaluados en la interacción social, como por ejemplo en número de contacto realizados por el individuo visitante (Fig. 50A), el tiempo de contacto (Fig. 50B) y la latencia de contacto (Fig. 50C).

También se realizó el test “open field” o campo abierto, utilizado para evaluar tanto locomoción como ansiedad. Se ha observado un efecto principal de la administración del LPS, en parámetros como, distancia recorrida (Fig. 50D y Tabla 7), tiempo gasto en el centro (Fig. 50E y Tabla 7), y tiempo gasto en las esquinas (Fig. 50F y Tabla 7).

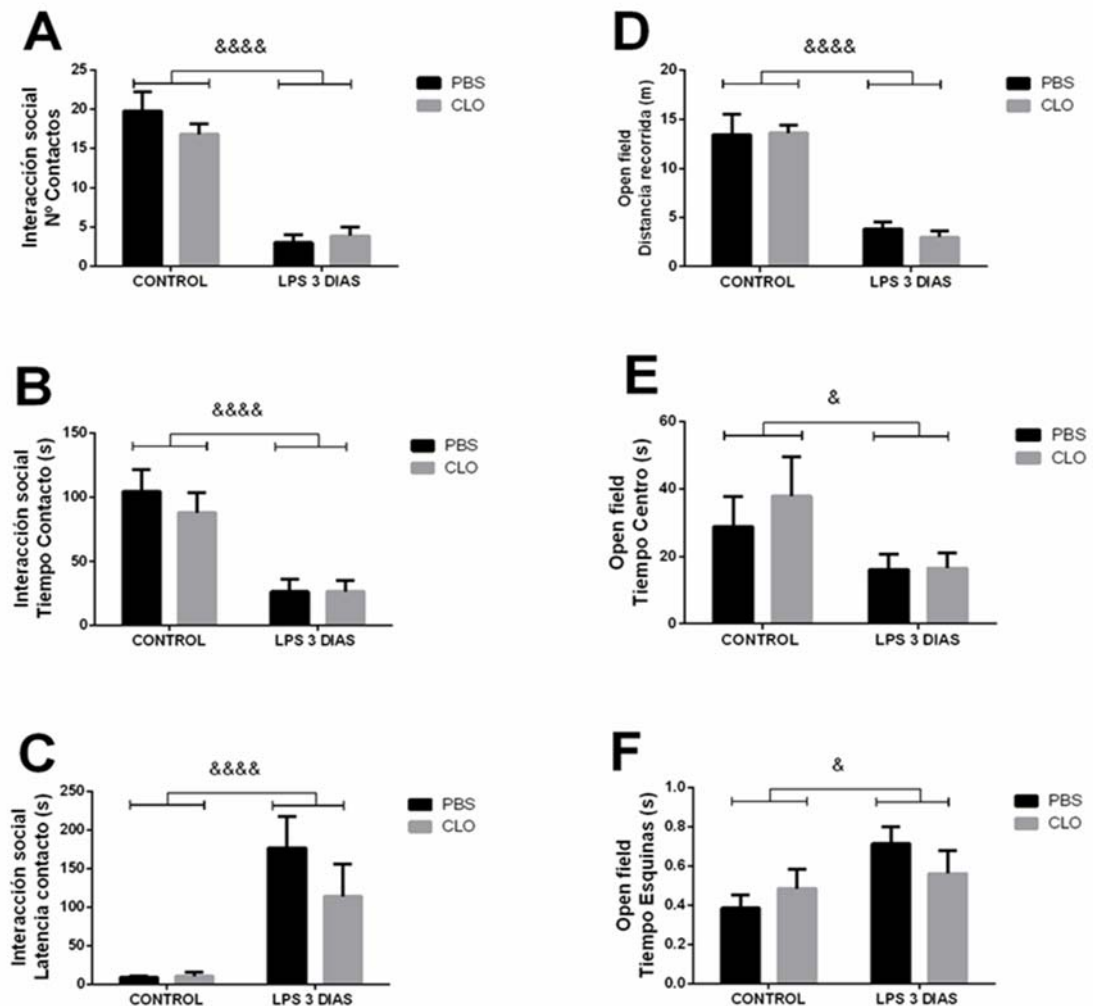


Fig. 50-Test de comportamiento realizado en ratones tratados con la administración central de clodronato en liposomas (CLO) o su vehículo (PBS) en condiciones de CONTROL y LPS (LPS 3 DIAS). Interacción social (Fig. A, B, C) Open field (Fig. D, E, F) Las barras representan la media + EEM de 6-7 animales por grupo. &&&& p <0.0001 efecto principal de LPS 3 DIAS, & p <0.05 efecto principal de LPS 3 DIAS, en el análisis ANOVA de dos vías entre grupos.

LPS 3 DIAS COMPORTAMIENTO						
Parametros	Estrés	Tratamiento CLO			Interacción	
IS N. CONTACTO	F(1, 30) = 89,16	P < 0,0001	F (1, 30) = 0,4405	P = 0,5119	F (1, 30) = 1,513	P = 0,2282
IS T. CONTACTO	F(1, 30) = 28,19	P < 0,0001	F (1, 30) = 0,3723	P = 0,5463	F (1, 30) = 0,3750	P = 0,5449
IS LATENCIA CONT.	F(1, 30) = 20,96	P < 0,0001	F (1, 30) = 1,068	P = 0,3097	F (1, 30) = 1,193	P = 0,2833
OP DISTANCIA REC.	F(1, 30) = 71,35	P < 0,0001	F (1, 30) = 0,06978	P = 0,7935	F (1, 30) = 0,1863	P = 0,6691
OP TIEMPO CENTRO	F(1, 30) = 4,345	P = 0,0457	F (1, 30) = 0,3301	P = 0,5699	F (1, 30) = 0,2651	P = 0,6104
OP TIEMPO ESQUINA	F(1, 29) = 4,497	P = 0,0426	F (1, 29) = 0,07984	P = 0,7795	F (1, 29) = 1,713	P = 0,2009

Tabla 7. Análisis ANOVA de dos vías (valores F y dfs)

4.6 Papel de los PVM en la activación de la vía antiinflamatoria L-PGDS/15d-PGJ₂ en un modelo agudo de neuroinflamación inducido por LPS.

Los PVMs parecen presentar un papel antiinflamatorio en la regulación de respuestas de fase aguda dependientes de la síntesis a nivel vascular de la prostaglandina E₂ (síntesis de glucocorticoides o fiebre) frente a determinados estímulos inmunes como la administración aguda y sistémica de LPS (Serrats *et al.*, 2010).

En este estudio, se administró una dosis sub-séptica de LPS por vía sistémica en ratas. Este modelo es uno de los más utilizados para producir neuroinflamación, activación de la respuesta a estrés y para estudiar los posibles mecanismos moleculares y celulares implicados. Además, el LPS sistémico produce una serie de alteraciones comportamentales conocidas como “depressive-like behaviour” que le hace especialmente útil para el estudio de patologías como la depresión.

La vía del receptor nuclear PPAR γ , de su ligando endógeno 15d-Prostaglandina J₂ (15d-PGJ₂) y de su enzima de síntesis Prostaglandina D₂ sintasa lipocalina (L-PGDS) podría ser responsable del perfil antiinflamatorio descrito para los PVM. Estas moléculas se expresan en macrófagos y microglia del parénquima cerebral y su activación es neuroprotectora en diversos modelos experimentales de neuropatologías.

La vía multienzimática por la que es producida la PGE₂ es regulada negativamente por la producción de la prostaglandina antiinflamatoria 15d-PGJ₂, resultante de la acción catalítica de la enzima L-PGDS. Este efecto se da a través de la activación del factor de transcripción antiinflamatorio PPAR γ y ha sido descrito en distintos modelos de activación inmune/inflamación (Garcia-Bueno *et al.*, 2008a). Considerando esta regulación recíproca entre prostaglandinas y el papel antiinflamatorio de los PVMs tras la administración aguda y sistémica de LPS, decidimos verificar si la vía antiinflamatoria de la prostaglandina 15d-PGJ₂ podría estar expresada por los PVM, constituyendo un posible mecanismo regulador de la producción de PGE₂ a nivel vascular.

Primero se demostró que los mediadores implicados en la vía antiinflamatoria L-PGDS/15d-PGJ₂/PPAR γ se expresa en PVM por doble inmunofluorescencia.

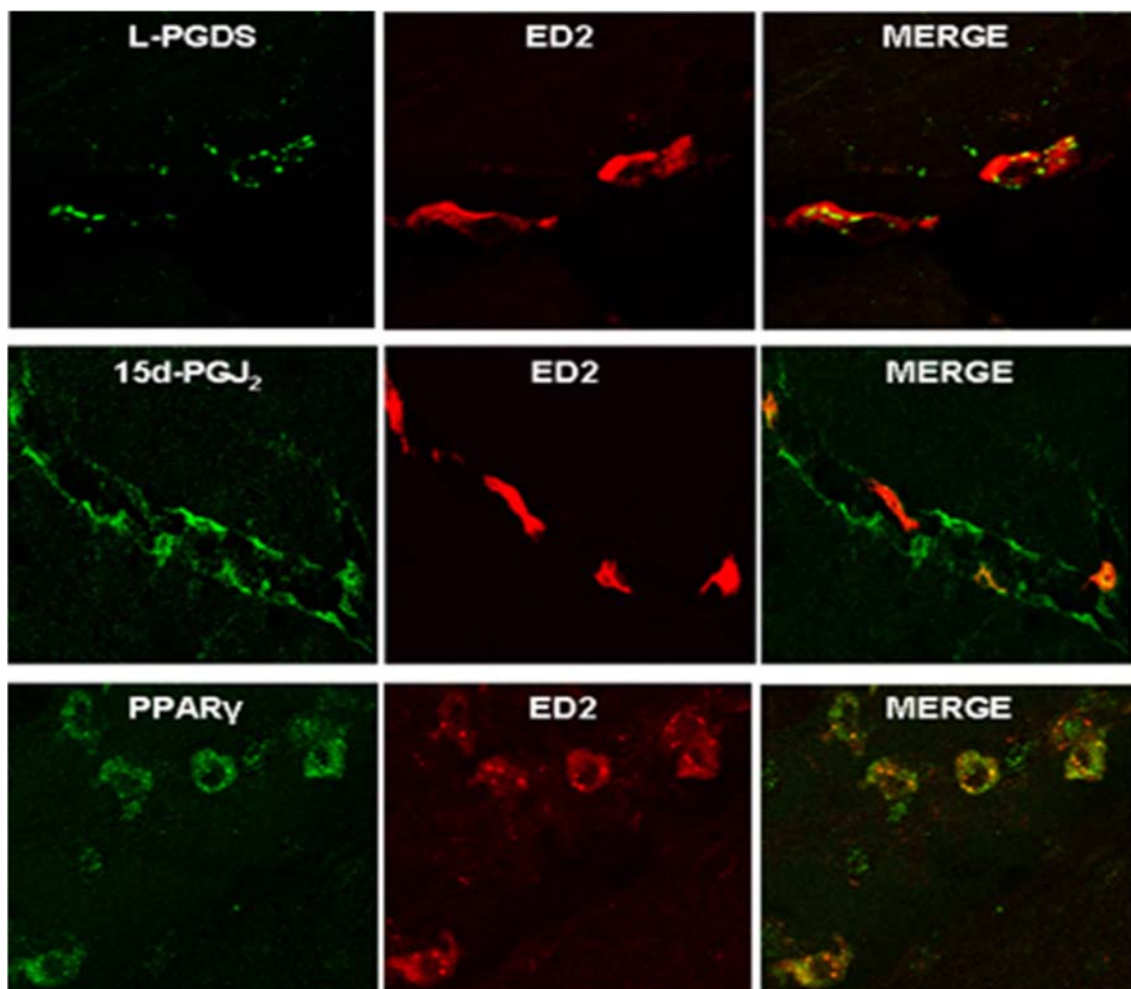


Fig.51-: Proteínas antiinflamatorias en verde L-PGDS, 15d-PGJ₂, PPAR γ y marcador de PVM CD163 en rojo, por inmunofluorescencia.

4.6.1 Niveles de prostaglandinas en la médula ventrolateral.

Posteriormente se realizaron cursos temporales tras la administración de LPS para comprobar alteraciones en los niveles de 15d-PGJ₂ y de la prostaglandina proinflamatoria PGE₂ en la médula ventrolateral (zona clave en la transducción de señales desde la periferia al SNC y en la activación del eje del HHA del estrés) de animales con PVMs intactos (Fig. 52A) o en animales en los que habían sido eliminados centralmente con clodronato encapsulado en liposomas (Fig. 52B). El ANOVA de una vía permitió observar tras la administración de LPS una bajada en los niveles de 15d-PGJ₂ a los 30 minutos, 1, 3, 5, 8, 12 y 24 horas de la administración de LPS con respecto al CONTROL (tiempo 0) (Fig. 52A). Por el contrario, los niveles de PGE₂ aumentaron a las 3, 5, 8 y 12 horas tras LPS (Fig. 52A) con respecto a su CONTROL (tiempo 0). Tras la depleción de los PVM (Fig. 52B) los niveles iniciales o basales de 15d-PGJ₂ fueron más bajos, y se mantienen así a los 30 minutos, 1, 3, 5, 8, 12 y 24 horas con respecto a su control (tiempo 0), Por el contrario, los niveles de PGE₂ presentaron un notable aumento a la 1, 3, 5 y 8 horas con respecto a su CONTROL (tiempo 0), coincidente con los bajos niveles de 15d-PGJ₂ (Fig. 52B).

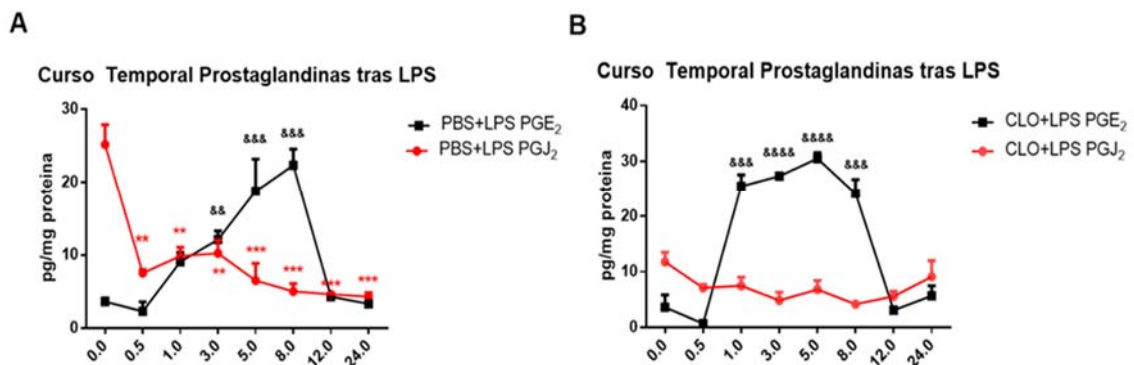


Fig. 52.-Niveles de prostaglandinas PGE₂ y15d-PGJ₂ en médula ventrolateral, en un curso temporal de 24 horas, en ratas tratadas con la administración central de clodronato en liposomas (CLO) (Fig. B) o su vehículo (PBS) (Fig. A) tras la administración de LPS. La curva representada representan la media + EEM. &&&& p <0.0001 vs CONTROL (tiempo0) PGE₂, &&& p <0.001 vs CONTROL (tiempo 0) PGE₂, && p <0.01 vs CONTROL (tiempo0) PGE₂, *** p <0.001 vs CONTROL (tiempo 0) 15d- PGJ₂, ** p <0.01 vs CONTROL (tiempo0) 15d-PGJ₂. ANOVA de una vía, post test de Tukey.

4.7 Efectos de la administración de oligonucleótidos modificado antisentido silenciador de ARNm (GapmeR) sobre genes antiinflamatorios

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los distintos modelos incluidos en esta Tesis Doctoral y en especial los descritos en este último bloque que sugieren un papel antiinflamatorio de los PVM en un modelo agudo de administración sistémica de LPS, nos planteamos la posibilidad de poner a punto una metodología para inhibir un gen de interés en los PVM, yendo un paso más allá de su depleción con clodronato encapsulando en liposomas, que es a día de hoy la única forma que nos permite conocer el papel de estas células en distintas condiciones fisiopatológicas.

Para ello, se administró por vía icv una solución de Oligonucleótido modificado antisentido silenciador de ARNm y ARNInc tipo GapmeR, que llevaba secuencias de inhibición del enzima sintasa responsable de la producción de la prostaglandina 15d-PGJ₂, la PGD₂ sintasa lipocalina (L-PGDS), permitiendo así su silenciamiento selectivo en los PVM. Las principales desventajas de las herramientas de inhibición génica comúnmente utilizadas son su baja afinidad hacia las moléculas de ARNm diana y sus efectos secundarios tóxicos. Algunos de estos problemas se han resuelto en nucleótidos de "segunda generación" con modificaciones de alquilo en la posición 2' de la ribosa. En los últimos años, se ha logrado un progreso valioso mediante el desarrollo de nuevos nucleótidos químicamente modificados con propiedades mejoradas tales como una mayor estabilidad del suero, una mayor afinidad y una baja toxicidad. Además una ventaja más de los GapmeR es su potencial inhibidor, que ocurre no solo en citoplasma sino también a nivel nuclear, lo que se traduce en una inhibición más estable y prolongada (Kurreck, 2003). Pocos son los estudios en SNC, así como en otros contextos, con la utilización de los GapmeR, pero los que existen han obtenido resultados muy prometedores en modelos de isquemia cerebral y de Alzheimer (Barrett *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017).

Por otro lado, la construcción del vehículo (liposoma), fue el punto crucial para la consecución del objetivo planteado. La presencia de la manosa en la vesícula idealizada y su funcionalización fue uno de los puntos de mayor relevancia en lo que se refiere al direccionamiento de la vesícula hacia los PVM (una colaboración realizada con el grupo Mecánica de Microsistemas Biológicos, Dres. Francisco Monroy y Lara Moleiro, del Departamento de Química física I, Universidad Complutense de Madrid). Además de la elección de los lípidos, que presentaban afinidad al inhibidor génico, y poca toxicidad, así hemos podido llegar a los resultados preliminares presentados en este apartado.

Estos estudios preliminares nos permitieron realizar una validación de la metodología. Los GapmeR fueron marcados con fluoresceína (emitiendo a 488nm), los PVM con CD206, en rojo (emitiendo a 555nm). En la figura abajo se puede apreciar la localización entre el PVM (rojo) y el GapmeR (verde), cual parece ubicarse tanto citoplasma como en núcleo, que puede ser apreciado a través de la tinción de DAPI (azul) en núcleo (Fig. 53) en corteza.

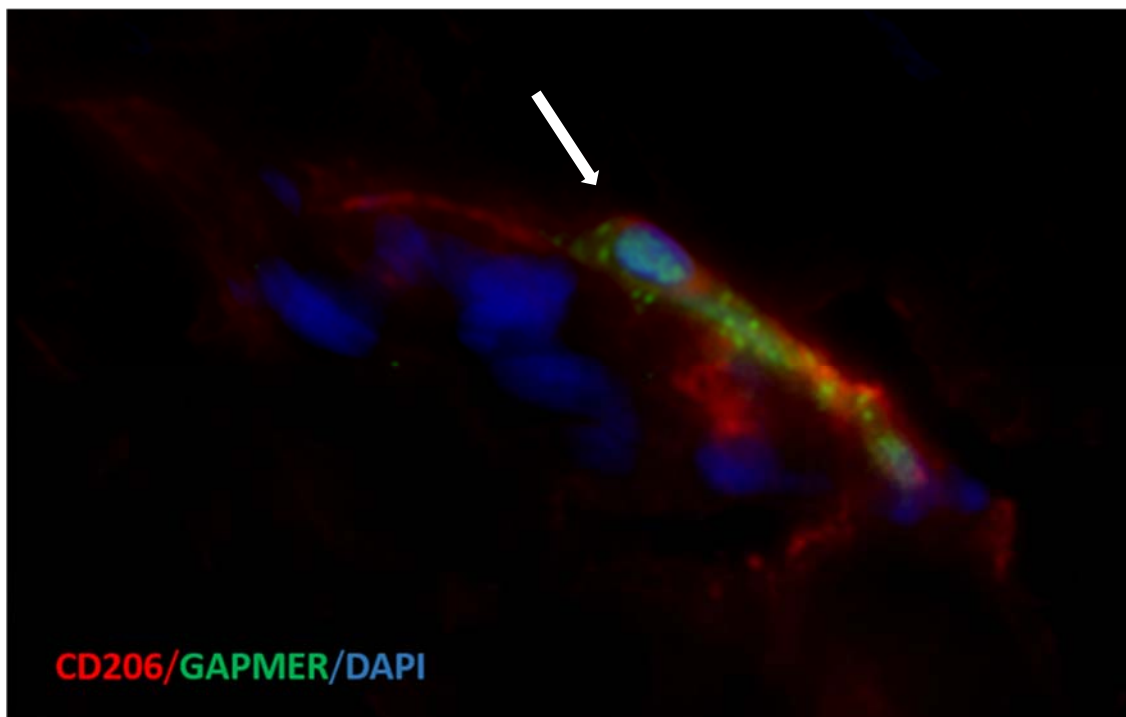


Fig.53.- Presencia de GapmeR en verde, co-localizando con PVM (CD206) en rojo, por inmunofluorescencia, tras la administración central de liposomas encapsulando GapmeR, en corteza frontal en rata.

En segundo lugar, quisimos validar si la administración de GapmeR había producido la inhibición del gen de interés (L-PGDS). Esta comprobación se realizó mediante la técnica de hibridación "in situ" (colaboración realizada con el grupo Neurofarmacología de Sistemas en el Instituto de investigaciones biomédicas de Barcelona (CSIC) (Dres. Francesc Artigas y Analía Botolozzi) en cortes de cerebro de distintas áreas cerebrales de animales CONTROL en los que se administró la emulsión de liposomas que encapsularon GapmeR o su vehículo (Figs. 54A-B). En los cortes de corteza frontal de rata control se ha podido observar el marcaje de la sonda de la secuencia de ARNm de L-PDGS en meninges y en la vasculatura del parénquima cerebral. Esta señal de la sonda de ARNm de la secuencia de L-PDGS marcada se ve reducida en los animales que recibieron la administración central de la emulsión de liposoma conteniendo GapmeR encapsulado (Figs.54B y C). Cabe destacar que el efecto es menos pronunciado a niveld de las meninges (Fig. 54C-D).

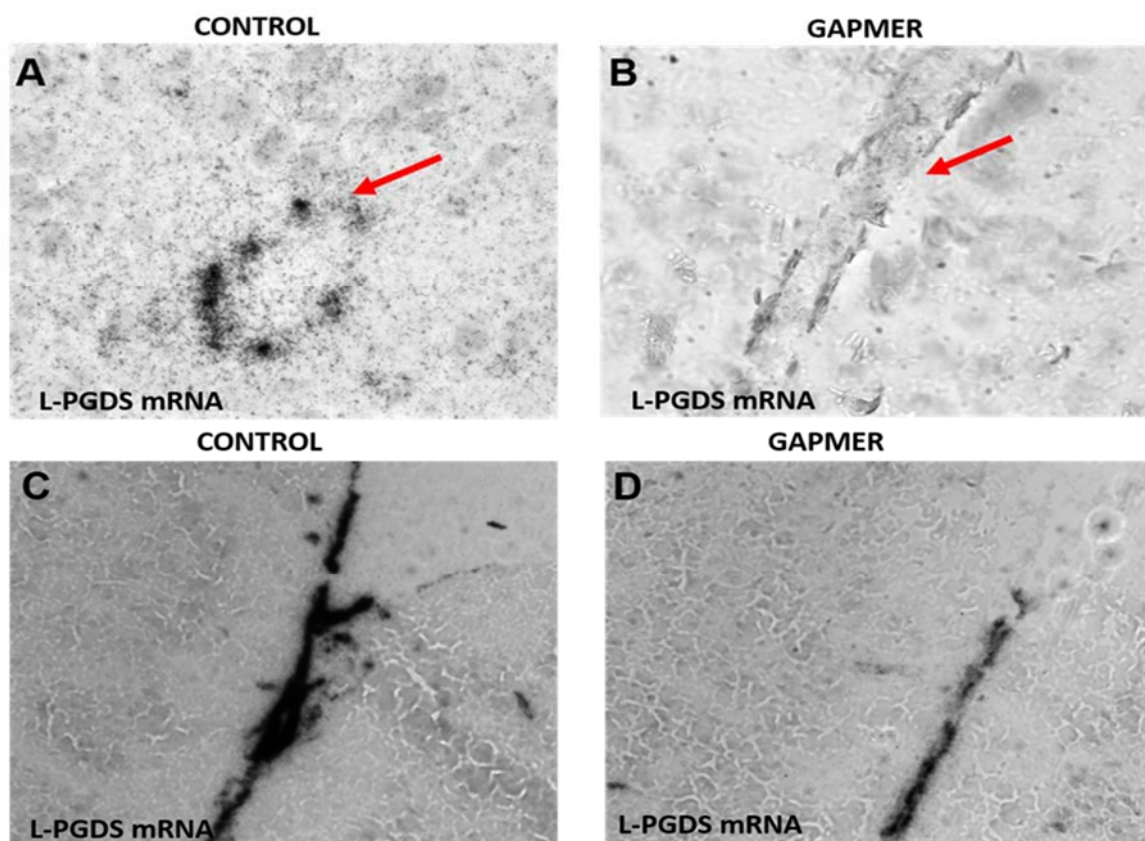


Fig. 54.-Hibridación "in situ" (ISH) en corteza frontal en ratones tratados con la administración central de Liposomas encapsulando PBS (A) (CONTROL) o (GAPMER) (B). Administración central de Liposomas encapsulando PBS (C) (CONTROL) o (GAPMER) (D) en meninges.

5 DISCUSIÓN

5.1 Discusión: papel de los PVM en un modelo de estrés agudo por inmovilización.

Nuestro primer estudio sugiere que los PVM pueden ser considerados como elementos reguladores relevantes de la respuesta inflamatoria y del estrés oxidativo / nitrosativo inducidos por el estrés agudo en la corteza frontal de ratas. Específicamente, la depleción selectiva de PVM está relacionada con: 1) descenso en los niveles de la citocina proinflamatoria TNF α y en la vía relacionada con la señalización aguda por citocinas JAK / STAT; 2) Aumento en la expresión de receptores de IL-1 β y 6 en condiciones de estrés; 3) descenso en la expresión de los elementos de la vía de señalización de TLR-4 (Myd88 especialmente); 4) disminución en la expresión de NF- κ B, I κ B α y COXs, y finalmente, 5) descenso en los niveles del marcador de estrés oxidativo 4-HNE paralelo a un aumento en la expresión de la vía antioxidante Nrf2 y de sus enzimas dependientes GRS-1 y PARK7 bajo condiciones de exposición a estrés.

Los resultados apoyan la existencia de una relación compleja entre los PVM y la señalización de citocinas proinflamatorias. En este sentido, un estudio reciente que examina el transcriptoma inflamatorio de células relacionadas con la vasculatura del cerebro anterior mediante la selección de células activadas por fluorescencia en ratones control e inmunocomprometidos señala que los PVM son la principal fuente de citocinas proinflamatorias en condiciones de control y tras la administración intraperitoneal de LPS (Vasilache *et al.*, 2015). En nuestras condiciones experimentales, los niveles de IL-1 β permanecieron inalterados después de 6 h de estrés. Sin embargo, en animales con ausencia de PVM, el TNF α apareció marcadamente reducido tanto en animales control como en animales sometidos a estrés sin PVM, siendo la expresión de IL-6 también menor, pero sin alcanzar significación estadística. Estos resultados sugieren un papel predominante para TNF- α en comparación con otras citocinas proinflamatorias en nuestras condiciones experimentales particulares de estrés de restricción aguda, como se ha demostrado previamente en este modelo (Madrigal *et al.*, 2002a).

También se ha podido observar un marcado aumento de IL-6R en animales CLO+ESTRÉS 6H, que podría considerarse una respuesta del endotelio a los niveles reducidos, aunque no significativos, de IL-6. Se necesitan más estudios inmunohistoquímicos o de “sorting” celular para dilucidar las fuentes de citocinas y las interacciones existentes entre distintos tipos celulares que expresan sus receptores en la exposición al estrés agudo por inmovilización.

Los resultados obtenidos en los elementos de la vía de señalización JAK / STAT dirigida a citocinas también podrían corroborar los resultados obtenidos. STAT3 y su inhibidor SOCS3 se expresan en PVM en gran medida (Vasilache *et al.*, 2015), y la activación específica de STAT3 se ha relacionado recientemente con la ruta de TNF α / IL-6 / IL-6R en un modelo *in vitro* de muerte celular microglial inducida por metanfetamina (Coelho-Santos *et al.*, 2012). De hecho, la vía de señalización JAK / STAT está emergiendo como regulador de la supervivencia neuronal y glial, la plasticidad sináptica y las vías de señalización intracelular afectadas en condiciones fisiológicas y patológicas del SNC relacionadas con el estrés, más típicamente estímulos agudos y puede considerarse un nuevo objetivo terapéutico atractivo a explorar (Nicolas *et al.*, 2013).

Con respecto a la vía de señalización de TLR-4, la disminución de la expresión de la proteína MyD88 en animales estresados sin PVM es especialmente notable. MyD88 se expresa en células endoteliales y en PVM, y está regulado al alza en respuesta a LPS en ambos tipos celulares (Vasilache *et al.*, 2015). Otros autores sugieren un papel esencial para el MyD88 endotelial (pero no en PVM) en la activación neuronal y la liberación de glucocorticoides tras la administración intraperitoneal de IL-1 β (Gosselin & Rivest, 2008). Se necesitan más estudios para evaluar si la depleción de los PVM es suficiente para explicar el bloqueo total de la expresión de MyD88 en las condiciones de estrés aquí mostradas o si hay otros tipos celulares que expresan MyD88, como la microglía o las neuronas implicadas. Además, la regulación a la baja HMGB1 aquí reportada también podría estar implicada, ya que la expresión de MyD88 está directamente regulada por HMGB-1 en las neuronas corticales primarias de ratón (Li *et al.*, 2013).

Nuestros resultados muestran una regulación a la baja de COXs y mPGES-1 (que no se corresponde con diferencias en los niveles totales de PGE₂) en animales estresados sin PVM, resultados que coinciden con un estudio previo que utiliza como modelo la exposición a 30 min de estrés por inmovilización (Serrats *et al.*, 2017). Nuestros resultados también permiten observar un aumento de la producción de 15d-PGJ₂ en los animales sin PVM, mecanismo de regulación antiinflamatorio ya descrito anteriormente en un modelo de estrés por inmovilización y que podría estar relacionado con los resultados observados en la inhibición de los niveles de citocinas, TLR-4, NF-κB y la potenciación de los sistemas antioxidantes (Garcia-Bueno *et al.*, 2005).

En lo que se refiere a las respuestas de fase aguda dependientes de la producción de PGE₂ a nivel vascular, vale la pena mencionar que la depleción de PVM produce resultados diferenciales en función del estímulo inmune aplicado: en el caso del LPS sistémico, la falta de PVM exacerba las respuestas de fase aguda como la síntesis de glucocorticoides o la fiebre, y por el contrario, después de un dosis intravenosa baja a moderada de IL-1B estas respuestas están bloqueadas (Serrats *et al.*, 2010). Esta última situación experimental parece ser más similar a la exposición al estrés agudo por inmovilización aquí utilizado. Las causas de estos aparentes papeles divergentes para PVM aún se desconocen, pero las diferencias entre LPS y estrés agudo por inmovilización en la regulación de TLR-4 y los receptores de citocinas en las células endoteliales que conforman la unidad neurovascular, así como en el grado y la eficiencia de la síntesis de las citocinas proinflamatorias deben ser exploradas (Roth, 2015).

Los PMV se han relacionado previamente con la regulación de las vías de estrés oxidativo/nitrosativo en diferentes condiciones experimentales. En particular, los PVM se han relacionado con la disfunción endotelial producida por un aumento del estrés oxidativo/nitrosativo vascular producido por la NADPH oxidasa que contiene NOX2 en un modelo de Alzheimer basado en la acumulación de péptidos Aβ (Park *et al.*, 2017), y en ratones hipertensos (Faraco *et al.*, 2017). Nuestros resultados también respaldan el papel de los PVM como inductores directos/indirectos de estrés oxidativo/nitrosativo (niveles aumentados del índice de peroxidación lipídica 4-HNE), no solo a nivel neurovascular sino en todo el parénquima cecerebral de la corteza frontal de las

ratas sometidas a la inmovilización aguda. Aquí, también mostramos una relación no descrita previamente entre los PVM y el sistema antioxidante endógeno dependiente de la activación de Nrf2. Estos resultados son notables teniendo en cuenta el papel neuroprotector emergente de la vía Nrf2 en las enfermedades neuropsiquiátricas/neurodegenerativas y relacionadas con el estrés (Johnson *et al.*, 2008; Roth, 2015; Martin-Hernandez *et al.*, 2016).

Los resultados observados para PARK7 probablemente estén relacionados con la regulación de Nrf2 encontrada en nuestras condiciones experimentales, ya que se ha propuesto a PARK7 como un activador de la ruta Nrf2 induciendo genes antioxidantes (Milani *et al.*, 2013). Las interacciones mecánicas son complejas, pero en particular, PARK7 estabiliza Nrf2 al interferir con su degradación y facilita la translocación nuclear de Nrf2 al evitar la unión con su proteína inhibidora Keap1 en ratones (Clements *et al.*, 2006a). Se ha podido observar también un efecto del estrés con respecto al aumento de los niveles de la prostaglandina 15d-PGJ₂, un importante mediador responsable por la activación de la respuesta antioxidante a través de Nrf2, coincidente con otros estudios en el SNC (Haskew-Layton *et al.*, 2013).

Con respecto a los niveles de corticosterona, cabe destacar que el grupo de animales estresados con PVM intactos presenta solo una tendencia al aumento con respecto al grupo control, tendencia que desaparece por completo en los animales sin PVM. Este efecto del estrés es menor del esperado en relación con estudios previos utilizando este protocolo de estrés agudo, (García-Bueno *et al.*, 2005) lo que podría estar relacionado con la técnica de icv sufrida una semana antes, lo que ha podido producir una desensibilización del eje del estrés frente al estímulo por inmovilización posterior. Nuestros resultados en los animales tratados con CLO coinciden con un estudio previo, en el que se puede observar como la exposición a estrés por inmovilización no produce un aumento de corticosterona en los animales sin PVM (Serrats *et al.*, 2017). Estudios futuros deben profundizar en el papel de los PVMs en la regulación del eje HHA del estrés en modelos de activación inmune de diferente duración y naturaleza, así como la cuantificación de otros parámetros a distintos tiempos, como los niveles plasmáticos de ACTH o los niveles de ARNm de CRF en el núcleo paraventricular del hipotálamo.

Por lo tanto, en lo que se refiere al modelo agudo por inmovilización, podríamos concluir que los PVM presentan un perfil proinflamatorio / oxidante en nuestras condiciones experimentales.

5.2 Discusión: papel de los PVM en un modelo de estrés crónico “CMS”.

Nuestro segundo bloque de experimentos tenía como objetivo extender el posible perfil traslacional de los resultados obtenidos en el modelo de estrés agudo por inmovilización, estudiando el papel de los PVM en un modelo ampliamente utilizado y validado de depresión en humanos como es la exposición crónica a estrés moderado o CMS (del inglés *Chronic Mild Stress*).

Para ello determinamos la expresión de los mediadores pro/antiinflamatorios y oxidantes previamente evaluados en un curso temporal, en el que se sacrificó a los animales a la 1^a, 2^a y 3^a semana de CMS.

Tras 21 días de estrés, el único resultado reseñable derivado de la depleción de PVM fue que la expresión de la mayoría de los marcadores analizados de la vía de TLR-4 mostraron una tendencia a la disminución. En el caso de los niveles de TLR-4, a los 7 y 14 días de exposición al CMS no se encontraron cambios significativos hasta los 21 días, que se observó una disminución en el grupo CLO+CMS 21 DIAS. Esta alteración puede sugerir que este receptor es regulado en gran parte por los PVM ante estímulos de estrés en condiciones crónicas. Una tendencia similar se ha podido ver en el receptor CD14 al receptor TLR-4, a diferencia que en el CMS de 7 días se observó una disminución de los niveles en el grupo CLO+CONTROL, a los 14 días no hubo cambios, mientras que a los 21 días del tratamiento se encontró una disminución en el grupo con CLO+ CMS 21 DIAS. La proteína MD-2, mostró efectos por parte de la exposición al CMS a los 7 días, observándose una disminución. Sin embargo, a los 14 días no se observaron diferencias entre tratamientos, mientras que en el grupo CMS 21 DIAS, similar a TLR-4 y CD14, tuvo una disminución en sus niveles. Los niveles de la proteína MyD88 resultaron más alterados que el resto de los marcadores analizados, observándose que tanto la exposición al estrés como el efecto de la depleción de PVM tiene efectos sobre esta proteína.

A los 7 días se observó una disminución de los niveles en los grupos de CLO+CONTROL y PBS+CMS 7 DIAS. Notablemente fue el único marcador en el que se observó un cambio en la exposición al CMS a los 14 días, aumentó sus niveles en el grupo CLO + CMS 21 DIAS, y en la etapa de los 21 días se observó la misma tendencia de disminución de MyD88 en el tratamiento de CLO control y CMS similar al resto de proteínas analizadas de la vía de TLR-4. El estudio de las proteínas HMGB-1 y HSP60 fue la manera de relacionar su papel como DAMPs en la activación de la vía de TLR-4. La proteína HMGB-1 no mostró cambios en ninguna de las etapas de exposición al CMS, mientras que HSP60 mostró una disminución por efecto en el grupo PBS+CMS 21 DIAS, sin diferencia tras la depleción de los PVM. En resumen, se puede decir que los PVM están implicados en la regulación de la vía de inmunidad innata TLR-4 y que su ausencia induce una baja de la respuesta inflamatoria a media que aumenta el tiempo de exposición al estrés.

En el caso de las citocinas, no se pudo corroborar los efectos observados a nivel agudo sobre TNF α tras la depleción de PVM y solo hubo cambios en los niveles proteicos de los receptores IL-1R (descenso) e IL-6R (aumento). Estos cambios podrían reflejar la complejidad en la señalización de citocinas proinflamatorias en modelos crónicos, así como posibles mecanismos de adaptación de otros tipos celulares frente a la depleción de PVM, pero no nos permiten extraer ninguna conclusión. Lo que parece claro es que en el caso de la expresión TNF α , la depleción de los PVM ni la exposición al CMS en el curso temporal ha permitido observar cambios, lo que sugiere que esta molécula no está regulada por PVM en el estrés crónico, lo contrario de lo que se sucede en la exposición a estrés agudo.

En cuanto al resto de mediadores inflamatorios y de estrés oxidativo, la depleción de PVM solo afectó tras 21 días de estrés a los niveles de la subunidad proinflamatoria p65 de NF-Kb, produciendo un aumento en sus niveles. Los niveles de su inhibidor I κ B se mantuvieron bajos. Sin embargo, este aumento no se vio correlacionado con un aumento de los mediadores proinflamatorios, estrés oxidativo y mecanismos antioxidantes de respuesta. Este *desacoplamiento* merece estudios futuros.

Por último, se evaluaron los niveles de corticosterona, y se observó un efecto muy distinto del producido por la depleción de PVM en el modelo agudo, observándose un aumento muy pronunciado tras la depleción de los PVM tras la exposición al CMS a los 7 días, y que se mantiene, aunque de manera menos acusada a los 14 y 21 días de estrés. Una vez más se observa cómo el tipo y la duración de estrés puede hacer que los PVM tengan efectos contrapuestos en la regulación de la respuesta inflamatoria, lo que hace difícil extraer conclusiones del modelo de estrés crónico utilizado. Es posible que las alteraciones a nivel vascular en el modelo de CMS sean menos acusadas o tengan menor importancia que en modelos agudos de LPS o estrés y todo ello explique la pérdida de efectos producidos por la depleción de PVM. Otra explicación podría ser la activación de vías homeostáticas por parte de otros tipos celulares relacionados con la respuesta inmune.

5.3 Discusión: papel de los PVM en el tráfico de células inmune y en el comportamiento

En este apartado de la presente Tesis Doctoral se pretendió verificar el papel de los PVM en la regulación del tráfico de células inmunes a través de citometría de flujo en los diferentes modelos propuestos.

En el primer experimento realizado, en el centro receptor de la OSU (Ohio State University) utilizando un modelo de LPS de 24h, no se pudo observar diferencias significativas, posiblemente por tratarse de un estudio piloto con un número de animales reducido. No obstante, se pudieron observar tendencias muy interesantes para el desarrollo de los futuros experimentos, como el aumento de granulocitos y monocitos (Ly6C^{hi}) y de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α , sugiriéndose una posible regulación de los PVM en este proceso.

Ya en el segundo experimento realizado, en un modelo de estrés social o RSD, fue posible observar datos más consistentes con respecto al papel de los PVM en el tráfico de células inmunes. Se observó un efecto del tratamiento con CLO en el tráfico de granulocitos (Ly6G⁺, posiblemente neutrófilos), que coincide

con datos de un reciente estudio realizados en un modelo de daño isquémico tras la depleción de los PVM (Pedragosa *et al.*, 2018). Se pudo observar también un aumento en el porcentaje de monocitos (Ly6C^{hi}) con un perfil clásicamente proinflamatorio, previamente descrito en muchos estudios realizados por el centro en el que se desarrolló la estancia predoctoral, tanto en modelos de estrés como en modelos de administración periférica de LPS (Weber *et al.*, 2017). Aunque no se haya observado una diferencia significativa en el tráfico de estos monocitos (Ly6C^{hi}) tras la administración de CLO, se ha observado una tendencia a la baja. Con respecto a los linfocitos T, los resultados sugieren un efecto de la depleción de los PVM, que se traduce en el aumento de linfocitos T, coincidiendo con datos publicados en un modelo de esclerosis múltiple (Faraco *et al.*, 2017). Aunque no fuera uno de los objetivos principales de este estudio, también hemos evaluado los niveles de los monocitos Ly6C^{low}, un perfil de monocitos descrito por algunos autores como centinelas del sistema inmune o reparador, y se pudo constatar que en el grupo control su número permanece más elevado que en el grupo de animales sometidos a estrés, coincidiendo con previos estudios de estrés y también LPS (Weber *et al.*, 2017).

Tanto en el estudio realizado en estrés social (RDS) como en el modelo subcrónico de LPS 3 DIAS, se ha podido observar un efecto del modelo en el tráfico de células inmune en periferia, tanto en sangre como en lo que se refiere al aumento del peso del bazo, uno de los principales indicadores de una activación inmune en relación al tráfico de células, ya que es el órgano responsable del acúmulo de leucocitos (granulocitos y monocitos) (Avitsur *et al.*, 2002). Estas células tienen un fenotipo único ya que no solo son insensibles a GC cuando se trata de modelo de estrés social, sino que también poseen un fenotipo activado, es decir, tienen niveles elevados de receptores Toll-like (TLR), moléculas de adhesión y receptores coestimuladores en su superficie (Reader *et al.*, 2015). Cuando se estimulan, estas células producen altos niveles de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, promoviendo así un entorno nocivo en la periferia. En cualquier caso, no se ha podido observar un efecto del tratamiento CLO, lo que podría sugerir que el papel regulador de los PVM no se extiende a la periferia. Esta respuesta en bazo, ha sido atribuida a otros factores como por ejemplo alteraciones endocrinas, como se ha descrito en algunos modelos de

estrés en un efecto dependiente de la acción de las catecolaminas. Los factores estresantes breves o agudos activan la señalización simpática que aumenta la noradrenalina (NA) para movilizar leucocitos "alojados" en la circulación de reservorios que incluyen bazo, BM y ganglios linfáticos (Dhabhar *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta que los PVM han sido descritos como reguladores del eje HHA (Serrats *et al.*, 2010) (Serrats *et al.*, 2017), sería interesante explorar la regulación catecolaminérgica sobre estas células. Así como un estudio, buscando explorar las células con perfiles más especializados, en bazo, médula y ganglios linfáticos.

Tras la administración de LPS, se ha podido observar un aumento en los niveles de mediadores implicados en una respuesta inflamatoria en el SNC como por ejemplo citocinas, especialmente IL-1 β , una respuesta ampliamente descrita en modelos de administración de LPS o estrés (Weber *et al.*, 2017) y una disminución de la expresión génica de estas citocinas resultante de la depleción de los PVM, sugiriendo que uno de los mecanismos de la respuesta inmune regulada por los PVM puede ser dependiente de esta citocina en el modelo de LPS, pero no tanto en modelos de estrés por inmovilización, en los que es el TNF α el que parece estar más implicado.

El eje quimiotáctico CCL2-CCR2 está implicado en la mediación de la infiltración de leucocitos en el SNC bajo una variedad de afecciones que incluyen encefalitis por VIH (Eugenin *et al.*, 2006), isquemia (Dimitrijevic *et al.*, 2006), enfermedad priónica (Gomez-Nicola *et al.*, 2014) y estrés (Wohleb *et al.*, 2013). En nuestro estudio la disminución de los receptores de MCP-1 (CCR2), en ausencia de los PVM, coinciden consistentemente con la inhibición en el tráfico de las células mieloides cerebrales, lo que puede indicar que la MCP-1, uno de los mediadores responsables directos por el tráfico de células inmune en cerebro, pueden estar siendo regulado por los PVM.

Aunque la microglia exprese CX3CR1 en el SNC este receptor también es expresado por células en circulación como monocitos, células dendríticas (DC) y células T y células "natural killer" en circulación y por la microglia en el SNC (Harrison *et al.*, 1998). Los resultados obtenidos coinciden con los datos del tráfico de células mieloides una vez que estas expresan este receptor, lo que

podría explicar su aumento tras la administración de LPS y disminución en consecuencia del tratamiento con CLO. Algunos estudios en modelos de estrés sugieren una relación entre la actividad neuronal y la activación microglial. Esta interpretación está respaldada por el hecho de que la activación neuronal precede temporalmente a la activación microglial y a la producción de citocinas (Wohleb *et al.*, 2011; Wohleb *et al.*, 2013). Es posible que estos dos eventos actúen de forma independiente, lo que podría explicar la ausencia de diferencias en la expresión génica de la fractalquina tras la administración de LPS durante 3 días. Son necesarios estudios más detallados para caracterizar la señalización a través de este receptor y las células involucradas en ella.

En modelos de neuroinflamación se ha podido observar el aumento de la expresión de moléculas de adhesión como ICAM / VCAM en células endoteliales de la BHE. Tanto ICAM como VCAM se correlacionaron con el tráfico periférico de monocitos (Sawicki *et al.*, 2015), coincidiendo con los resultados observados en nuestro estudio. Aunque no se ha podido apreciar un efecto de la depleción de los PVM, sugiriendo que al menos en nuestro modelo el efecto de PVM en el tráfico celular no está muy relacionado con estas moléculas, al menos en el momento del sacrificio.

Ciertas condiciones patológicas en el SNC con un componente inflamatorio resultan en el aumento de la expresión de enzimas de degradación como las metaloproteinasas de matriz (MMP), MMP-9 en particular (Weber *et al.*, 2017). Teniendo en cuenta que los macrófagos la expresan y rompen la barrera astrocítica que exacerba la infiltración de la vasculatura en el parénquima (Bechmann *et al.*, 2007), decidimos verificar sus niveles en nuestro modelo y hemos podido observar que hay un aumento en la expresión de la MMP9 por la administración de LPS como en otras condiciones patológicas como isquemia, trastornos neurodegenerativos como esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, Parkinson, que resulta en un aumento resultante del tráfico de células inmune en estas patologías (Weber *et al.*, 2017). Además de manera notable se ha podido observar una disminución en su expresión génica tras la depleción de los PVM, lo que evidencia una regulación local de estas células en la expresión de la MMP-9. Mientras se redactaba esta Tesis Doctoral, se ha publicado un interesante estudio que relaciona a los PVM con una disfunción de la BHE

dependiente de los efectos del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Pedragosa *et al.*, 2018), Curiosamente, los PVM están involucrados en el mantenimiento de la función de barrera vascular en la periferia en condiciones fisiológicas (Gupta *et al.*, 2016; He *et al.*, 2016). Por lo que merece la pena explorar sus efectos a nivel del mantenimiento de la BHE y en particular, un posible mecanismo dependiente de VEG en el SNC.

En lo que se refiere al tráfico de células inmunes en el modelo de LPS 3 DIAS, estudiado a través de citometría de flujo en una metodología puesta a punto en el laboratorio donde se desarrolló esta Tesis Doctoral, se ha podido observar que tras la administración de LPS produce un aumento en el tráfico de las células mieloides cerebrales totales (CD45^{hi}cd11b+), coincidiendo con la literatura previa relacionada, siendo un evento ampliamente descrito en modelos periféricos tanto de LPS como modelos de estrés (Weber *et al.*, 2017). Se ha podido observar que tras la administración de LPS, la aparición de una subpoblación de células mieloides cerebrales (CD45^{hi}CD11b+) que se sitúa entre la microglia y la población de CD45^{hi}CD11b+, y aparentemente representando un porcentaje total aumentado. Este escenario coincide con estudios en modelos de isquemia cerebral (Pedragosa *et al.*, 2018), en donde se han identificado mayoritariamente como granulocitos. La presencia de esta subpoblación no es algo muy habitual en modelos de LPS. Además, los experimentos piloto realizados en nuestro laboratorio, en fase de optimización de la citometría de flujo, siempre han sido realizados bajo la administración de LPS en una concentración de 0,83mg/kg durante los tres días, en los que no se apreciaba la presencia de dicha subpoblación (datos no mostrados). Esto nos permite discutir la posibilidad de que la administración de LPS 3 DIAS en dosis progresivas (0.208/0.415/0.83 mg/kg), actúe activando una respuesta inmune y previniendo la tolerancia al LPS, no solo en mediadores bioquímicos o en aspectos comportamentales descritos previamente (Wickens *et al.*, 2017), pero también en el tráfico de células inmunes, una vez que todos estos eventos están estrechamente relacionados (Weber *et al.*, 2017). Un estudio comparativo entre ambas dosis permitiría elucidar el efecto de la tolerancia de LPS, en lo que se refiere al tráfico de células inmunes y demás parámetros implicados, como consecuencia de una respuesta inmune inducida por LPS.

Además del aumento en el porcentaje de células mieloides cerebrales (CD45^{hi}CD11b⁺) en consecuencia de la activación de una respuesta inmune, se ha podido observar un efecto del tratamiento con CLO, ya que este aumento se previene en ausencia de los PVM. Un efecto muy similar se encontró en el tráfico de monocitos (Ly6C^{hi}) con un fenotipo proinflamatorio, que de igual manera se ha visto reducido tras la administración del CLO. Otra evidencia que enfatiza el aumento del tráfico de células inmunes en el SNC se refiere a una alteración en la relación microglia/células mieloides. Si en una situación basal (CONTROL) esta relación es de 1 célula mieloides cerebral por cada 4 células de microglia, esta relación se ve regulada en los grupos que reciben la administración de LPS, lo que explica la variación a la baja observada en el porcentaje de microglia. Cabe reseñar que no se observa variación con respecto a la población de microglia total, un dato constatado también por nuestros datos de inmunofluorescencia. Estos resultados sugieren un papel regulador en el tráfico de células mieloides totales, así como monocitos (Ly6C^{hi}).

En lo que se refiere a los linfocitos T se ha podido observar en el modelo de estrés social (RSD) un efecto de la depleción de los PVM, regulando el tráfico de estas células en SNC, en el grupo CLO con respecto al grupo PBS. Datos que coinciden con estudios en un modelo de esclerosis múltiple (Polfliet *et al.*, 2001). Se ha podido observar también el mismo efecto en el grupo PBS+ RSD con respecto al grupo CLO+ RSD, aunque notablemente no se haya apreciado un efecto del estrés social (RSD), con respecto al porcentaje de linfocitos. Algunos autores atribuyen la ausencia de efectos en el número de linfocitos en algunos modelos de neuroinflamación a una alteración en la hematopoyesis, direccionando la respuesta inmune a la producción de células mieloides (fundamentalmente priorizando una respuesta inmune innata) (Engler *et al.*, 2004) (McKim *et al.*, 2016). Estos resultados, podrían atribuir a los PVM un papel regulador en el tráfico de linfocitos T en una situación fisiológica y no excluyen que los PVM, puedan regular el tráfico de linfocitos en distintos modelos de neuroinflamación. Un estudio en modelo crónico podría elucidar el papel de los PVM sobre el tráfico celular de los linfocitos de forma más traslacional. La baja diferencia en el tráfico de linfocitos T entre los grupos en el experimento subcrónico de administración de LPS 3 DIAS puede deberse a la perfusión con

PBS realizadas en los animales para realizar este experimento, eliminando los linfocitos T circulantes en la vasculatura cerebral.

Los experimentos comportamentales realizados en el modelo de administración subcrónica de LPS 3 DIAS han producido efectos muy pronunciados. Se ha podido comprobar que los animales que recibieron la administración de LPS 3 DIAS, respondieron con un déficit en la interacción social, traducándose en “sickness behaviour”, lo que concuerda con muchos otros estudios relacionados con la administración de LPS y modelos de estrés (Wohleb *et al.*, 2012). Sin embargo, no se ha podido observar un efecto de la depleción de los PVM, aunque uno de los parámetros evaluados: la latencia al primer contacto entre los animales, ha presentado una tendencia a verse disminuida en los animales sin PVM.

El “open field” ha sido ampliamente descrito como un test validado para la evaluación de la ansiedad (Carola *et al.*, 2002; Seibenhener & Wooten, 2015). Muchos son los estudios donde se ha podido observar el efecto de la administración de LPS, hasta 72 horas después de su administración, en lo que se refiere a la ansiedad (Wohleb *et al.*, 2012; Wickens *et al.*, 2017), coincidiendo con nuestro estudio. No se ha observado un efecto de la depleción de los PVM.

Ambos test realizados no presentaron suficiente sensibilidad para evaluar el efecto de la depleción de los PVM, probablemente como consecuencia de un efecto muy marcado del modelo de 3 días de LPS en las variables estudiadas, que enmascara el efecto de la depleción de PVM. Son necesarios más estudios en este sentido, como por ejemplo la realización del test de comportamiento tras la administración de cada dosis de LPS, lo que nos permitiría realizar un seguimiento temporal de las alteraciones comportamentales, con o sin la presencia de PVM.

La administración de LPS 3 DIAS, así como estrés social provoca un cambio evidente, en el perfil inflamatorio de las células mieloides y su distribución, además de afectar a muchos mediadores responsables por una respuesta inmune en neuroinflamación y al tráfico de células inmunes. Se ha podido observar que en algunos parámetros bioquímicos los PVM, regulan directamente este efecto, así como en el tráfico de algunos fenotipos de células mieloides o

linfoides, más estudios son necesarios, para evaluar el mecanismo dependiente de los PVM, el efecto a nivel de comportamiento, así como su potencial traslacionalidad en un modelo crónico de activación a inmune por exposición a distintos tipos de estrés.

5.4 Discusión: papel regulador de los PVM en la síntesis de prostaglandinas e inhibición génica selectiva en los PVM.

Como describen estudios previos, se ha podido atribuir un papel regulador de los PVM en la producción de la prostaglandina PGE₂ vascular tras la administración a distintos estímulos inmunes, montando una serie de respuestas de fase aguda (Serrats *et al.*, 2010; Serrats *et al.*, 2017). La síntesis de PGE₂ está regulada por la prostaglandina 15d-PGJ₂, con potencial antiinflamatorio a través del receptor PPAR γ , como ha sido demostrado en modelos de enfermedades neuropsiquiátricas, (García-Bueno *et al.*, 2010). Debido a esta relación, hemos decidido verificar si la relación entre estas prostaglandinas de distinto perfil puede estar regulada por los PVM. Primero demostramos que la vía antiinflamatoria L-PGDS/15d-PGJ₂/PPAR γ está expresada en PVM. Posteriormente, realizamos un curso temporal en la expresión de ambas tras la administración de LPS y se pudo apreciar una disminución pronunciada de la 15d-PGJ₂, a diferentes tiempos, hasta un máximo de 24 horas con respecto a su control (tiempo 0) que coincide con un aumento de la síntesis de PGE₂ con pico tras 3 horas de la administración de LPS. Por otro lado, al deplecionar los PVM, la síntesis de la 15d-PGJ₂, los niveles a tiempo 0 son muy reducidos, y esto coincide con el aumento de la PGE₂ a niveles más altos que en los animales con PVM. Estos resultados podrían sugerir el potencial de la 15d-PGJ₂ expresada en PVM como reguladora de la producción de PGE₂ a nivel vascular y por lo tanto en la activación de las respuestas de fase aguda dependientes, como la activación del eje HHA del estrés o la fiebre que merece ser explorado en el futuro.

En esta línea, y considerando los resultados de estos experimentos decidimos trabajar en la validación de una herramienta que nos pudiera

proporcionar un estudio más específico de este mecanismo anterior y de manera exclusivamente dirigida a los PVM.

Una colaboración realizada con el grupo “Biofísica para la Biotecnología y la Biomedicina” (Dres. Francisco Monroy y Lara Moleiro), en la Facultad de C.C. Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, nos permitió la construcción de un liposoma que pudiera encapsular un silenciador génico a un tiempo más prolongado conocido como GapmeR[®].

Los experimentos preliminares realizados nos han permitido poner a punto y constatar la incorporación de una molécula con perfil silenciador génico hacia el gen de interés que codifica para la L-PGDS, enzima responsable por la síntesis de la prostaglandina 15d-PGJ₂, en una emulsión de liposomas vectorizados frente a PVM. Esta metodología fue validada a través de la técnica de hibridación “*in situ*”, al observarse la inhibición del gen de interés a nivel vascular. Cabe indicar que esta metodología podría ser aplicada a diferentes modelos de enfermedades relacionadas al SNC, en las que los PVM puedan tener algún papel fisiopatológico. Es necesario comprobar en nuestras condiciones experimentales el resultado de la inhibición de esta enzima, comprobando el perfil inflamatorio resultante y sus efectos sobre la neuroinflamación, tráfico de células inmunes y comportamiento característicos de los modelos agudos utilizados en esta Tesis Doctoral, como la administración sistémica de LPS y extender los resultados a modelos más traslacionales de patologías psiquiátricas relacionandas con la exposición a estrés, como el CMS o la activación inmune materna.

5.5 Discusión global. Limitaciones del estudio. Ideas de futuro.

Los distintos estudios relacionados con el papel de los PVM presentados en esta Tesis Doctoral sugieren que su papel regulador es dependiente de la naturaleza y tiempo de exposición a los estímulos aplicados. Esta diversidad en el papel de los PVM se podido observar en muchos otros tipos de modelos, incluyendo modelos de infección vírica o bacteriana (Faraco *et al.*, 2017).

Se ha podido ver cómo estas células pueden presentar un perfil proinflamatorio/oxidante, en un modelo agudo por restricción de movimiento, sin embargo, este mecanismo no parece tan claro en el modelo de estrés crónico. Una posible explicación a las diferencias observadas podría ser que en condiciones de estrés agudo la citocina TNF- α podría tener un papel predominante en comparación a las demás, como ya se observó previamente para este modelo en el laboratorio donde se desarrolla esta Tesis Doctoral (Madrigal *et al.*, 2002b). Sin embargo, en modelo crónico el TNF α no parece tener un papel tan notable en la respuesta inmune y lo mismo ocurre en el modelo subcrónico de LPS, en el que la IL-1 β y no TNF- α , parece tener un papel más predominante.

TNFR1 no mostró cambios por efectos de la depleción de PVM ni del CMS, sin embargo, TNFR2 tuvo una tendencia a disminuir sus niveles ante la depleción de PVM y a la exposición del CMS a los 7 días, distinto de lo observado a los 14 y 21 días donde no se observaron cambios significativos. Este evento, igual que IL1R, coincide con los resultados obtenidos de la expresión de TNF α , donde no se observaron alteraciones en los niveles. Se podría resumir que, principalmente, la IL-1, de igual manera que su receptor juegan un papel importante en la respuesta inmune mediada por citocinas proinflamatorias en el estrés crónico.

La mayoría de los marcadores analizados de la vía de TLR-4 mostraron una tendencia a la disminución de niveles de síntesis proteica a los 21 días, En el caso de los niveles de TLR-4, en las etapas de 7 y 14 días de exposición al CMS no se encontraron cambios significativos hasta los 21 días de tratamiento, momento en el que se observó una disminución de los niveles en el grupo tratado CLO+CMS. Esta alteración demuestra que este receptor es regulado en gran parte por los PVM ante estímulos de estrés en condiciones crónicas, incluso la posibilidad de un efecto de tolerancia con respecto a esta vía de señalización, más estudios serían necesarios para elucidar este efecto que ha sido observado en estudios que abordan cambios comportamentales (Wickens *et al.*, 2017).

Con respecto al tráfico de células inmunes, hemos podido observar que los PVM parecen tener una participación fundamental, tanto en estrés social, como

en un modelo de administración subcrónica de LPS, sobre todo en lo que se refiere al tráfico de monocitos (Ly6Chi) con un perfil inflamatorio por excelencia, que se ha visto implicado en cambios comportamentales como los que caracterizan al “sickness behaviour” en modelos de estrés o LPS. También se ha podido observar un papel con respecto al tráfico de linfocitos T, y la síntesis de MMP-9, que representa uno de los posibles mecanismos responsables de los efectos observados en el tráfico de las células inmunes. Más estudios son necesarios para investigar si hay alteraciones comportamentales estrechamente relacionadas con el tráfico de las células inmunes, y en concreto con el tráfico de linfocitos, como por ejemplo en un modelo con una respuesta inflamatoria más sutil que el propuesto en este estudio.

Cabe puntuar que se ha encontrado un número mayor de PVM en las muestras cerebrales postmortem de pacientes deprimidos que se suicidaron (Schnieder *et al.*, 2014; Torres-Platas *et al.*, 2014), y las cepas de ratones con ansiedad alta (ratones 129S2 / Sv) también presentaron un mayor número de PVM activadas (MHCII+) en condiciones de control y LPS (Li *et al.*, 2014). PVM se han implicado recientemente en la regulación de procesos relacionados con la fisiopatología de la depresión, como la neurogénesis adulta del hipocampo, la depresión conductual durante la enfermedad y los déficits cognitivos relacionados con la depresión (Konsman *et al.*, 2008; Griffin *et al.*, 2013; de Miranda *et al.*, 2017), por lo que merece la pena estudios complementarios que permitan dilucidar de la implicación de los PVM desde un punto de vista comportamental.

Una posible explicación para la pluralidad de los efectos ocasionados por estas células podría estar relacionada con los cambios ocasionados en el ambiente tras la depleción, y al intento del sistema en restablecer la homeostasis, lo que implicaría montar una respuesta inmune equivalente a partir de otros tipos celulares implicados. Estas hipótesis deberán ser comprobadas mediante la realización de un experimento tipo “Cellular Sorting”, que podría demostrar el papel de los diferentes fenotipos celulares en la respuesta inmune en los diferentes modelos a estudio con y sin PVM.

Estos estudios podrían combinarse con la metodología desarrollada en esta Tesis Doctoral basada en la administración central de liposomas encapsulando un inhibidor génico específico tipo GapmeR[®] sobre un gen de interés, proporcionando resultados mecanísticos más específicos relacionados con los PVM.

En la discusión de la presente Tesis Doctoral deben considerarse algunas limitaciones: 1) Los liposomas que contienen CLO pueden deplecionar indistintamente los macrófagos PVM y meníngeos. Ambos son residentes del parénquima cerebral pero su localización es distinta. Los meníngeos son células mieloides situadas en las meninges subdurales y poseen múltiples funciones, y aunque parecen tener el mismo fenotipo y origen que los PVM al actuar como centinelas para infecciones y daño tisular (Herz *et al.*, 2017) no se puede descartar que tengan funciones diferenciales. Por lo tanto, es probable que se activen en respuesta a la exposición al estrés, pero se necesitan estudios más detallados para distinguir entre los roles de ambos tipos celulares; 2) aunque ni nosotros ni otros autores hemos detectado por técnicas de inmunohistoquímica alteraciones mayores en la cantidad de células microgliales que expresan iba1 después de la administración de CLO (Polfliet *et al.*, 2001; Faraco *et al.*, 2017), no podemos afirmar inequívocamente que la metodología liposómica no altera las funciones de microglia y la reactividad, como se informó en el cerebro de rata neonatal (Fernandez-Lopez *et al.*, 2016; Nelson & Lenz, 2017). Queda por dilucidar en futuros estudios si estas discrepancias están relacionadas con diferentes enfoques metodológicos (es decir, el diámetro de las vesículas de la emulsión liposómica), o con una capacidad fagocítica basal diferencial de la microglía entre el tejido cerebral in vivo neonatal y adulto; 3) se necesitan estudios más detallados de inmunohistoquímica, citometría de flujo y clasificación celular para caracterizar con precisión los tipos celulares que conforman la unidad neurovascular y que se ven afectados de manera directa / indirecta por la depleción selectiva de los PVM. Estos estudios ayudarán a evaluar las interacciones celulares que regulan la estructura y la función de la BHE en condiciones de estrés; y 4) la depleción selectiva de macrófagos no es un proceso irreversible, de hecho existe una tasa de reposición constante de los mismos que podría verse afectada por la exposición a estrés y otros estímulos

inmunes, con lo que en nuestro modelo de CMS podría estar teniendo lugar la reposición de la población de PVM en cerebro con un perfil inflamatorio diferente o incluso de otros tipos celulares inmunes. Este hecho podría estar relacionado con la variabilidad de los resultados observados en nuestro curso temporal de CMS que nos impide sacar claras conclusiones de este apartado.

6 CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS

6.1 Conclusiones

1. En un un modelo de estrés agudo por inmovilización en rata, los PVM:
 - regulan la síntesis de TNF- α en corteza frontal
 - presentan un papel regulador en la vía de señalización de JAK/STAT
 - presentan un papel regulador en la vía proinflamatoria TLR-4/NF- κ B/COX
 - están implicados en el estrés oxidativo y sus mecanismos antioxidantes de control dependientes del factor nuclear Nrf2

2. En un modelo de neuroinflamación inducido por estrés crónico moderado tras 21 días de exposición, los PVM presentan un papel regulador en la vía de señalización proinflamatoria del TLR-4.

3. En un modelo de administración repetida de LPS, los PVM:
 - podrían estar implicados en el tráfico de células inmunes al SNC. También en un modelo de estrés social.
 - regulan la síntesis de IL-1 β en corteza frontal.
 - están implicados en la síntesis de mediadores implicados en el tráfico de células inmunes, como: quimiocinas y sus receptores, moléculas de adhesión y metaloproteasas de matriz

4. La manipulación genética de los PVM con oligonucleótidos silenciadores de ARNm específicos encapsulados en liposomas podría representar una interesante herramienta para el estudio del papel de los PVM en distintas condiciones fisiopatológicas.

6.2 Conclusions

1. In an acute model of restraint stress in rats, PVMs:

- regulate the synthesis of TNF- α in frontal cortex
- showed a regulatory role in the signaling pathway of JAK / STAT
- showed a regulatory role in the pro-inflammatory pathway TLR-4 / NF- κ B / COX
- and are involved in oxidative stress and its antioxidant mechanisms of control dependent on the nuclear factor Nrf2

2. In a chronic mild stress-induced neuroinflammation model after 21 days of exposure, PVMs present a regulatory role in the proinflammatory signaling pathway of TLR-4.

3. In a repeated administration LPS model, PVMs:

- could be involved in the traffic of immune cells to the CNS. Also in a social stress model.
- regulate the synthesis of IL-1 β in frontal cortex.
- are involved in the synthesis of mediators involved in the trafficking of immune cells, such as: chemokines and their receptors, adhesion molecules and matrix metalloproteases

4. The genetic manipulation of PVMs with oligonucleotides silencing specific mRNAs encapsulated in liposomes could represent an interesting tool for the study of the role of PVM in different physiopathological conditions.

7 BIBLIOGRAFÍA

Abercrombie, E.D. & Jacobs, B.L. (1987) Single-unit response of noradrenergic neurons in the locus coeruleus of freely moving cats. II. Adaptation to chronically presented stressful stimuli. *J Neurosci*, **7**, 2844-2848.

Abraham, I., Veenema, A.H., Nyakas, C., Harkany, T., Bohus, B.G. & Luiten, P.G. (1997) Effect of corticosterone and adrenalectomy on NMDA-induced cholinergic cell death in rat magnocellular nucleus basalis. *J Neuroendocrinol*, **9**, 713-720.

Aggleton, J.P., Kentridge, R.W. & Sembi, S. (1992) Lesions of the fornix but not the amygdala impair the acquisition of concurrent discriminations by rats. *Behav Brain Res*, **48**, 103-112.

Aid, S. & Bosetti, F. (2011) Targeting cyclooxygenases-1 and -2 in neuroinflammation: Therapeutic implications. *Biochimie*, **93**, 46-51.

Allan, S.M. & Rothwell, N.J. (2003) Inflammation in central nervous system injury. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **358**, 1669-1677.

Ataka, K., Asakawa, A., Nagaishi, K., Kaimoto, K., Sawada, A., Hayakawa, Y., Tatezawa, R., Inui, A. & Fujimiya, M. (2013) Bone marrow-derived microglia infiltrate into the paraventricular nucleus of chronic psychological stress-loaded mice. *PLoS One*, **8**, e81744.

Audoy-Remus, J., Richard, J.F., Soulet, D., Zhou, H., Kuberski, P. & Vallières, L. (2008) Rod-Shaped monocytes patrol the brain vasculature and give rise to perivascular macrophages under the influence of proinflammatory cytokines and angiopoietin-2. *J Neurosci*, **28**, 10187-10199.

Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G. & Geissmann, F. (2007) Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*, **317**, 666-670.

Avitsur, R., Stark, J.L., Dhabhar, F.S., Padgett, D.A. & Sheridan, J.F. (2002) Social disruption-induced glucocorticoid resistance: kinetics and site specificity. *Journal of neuroimmunology*, **124**, 54-61.

Avitsur, R., Stark, J.L. & Sheridan, J.F. (2001) Social stress induces glucocorticoid resistance in subordinate animals. *Horm Behav*, **39**, 247-257.

Axelrod, J. & Reisine, T.D. (1984) Stress hormones: their interaction and regulation. *Science*, **224**, 452-459.

Barrett, G.L., Naim, T., Trieu, J. & Huang, M. (2016) In vivo knockdown of basal forebrain p75 neurotrophin receptor stimulates choline acetyltransferase activity in the mature hippocampus. *J Neurosci Res*, **94**, 389-400.

Bazzoni, F. & Beutler, B. (1996) The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med*, **334**, 1717-1725.

Bebo, B.F., Jr. & Linthicum, D.S. (1995) Expression of mRNA for 55-kDa and 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptors in mouse cerebrovascular endothelium: effects of interleukin-1 beta, interferon-gamma and TNF-alpha on cultured cells. *Journal of neuroimmunology*, **62**, 161-167.

Bechmann, I., Galea, I. & Perry, V.H. (2007) What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol*, **28**, 5-11.

Bechmann, I., Kwidzinski, E., Kovac, A.D., Simburger, E., Horvath, T., Gimsa, U., Dirnagl, U., Priller, J. & Nitsch, R. (2001) Turnover of rat brain perivascular cells. *Exp Neurol*, **168**, 242-249.

Bernardo, A., Ajmone-Cat, M.A., Levi, G. & Minghetti, L. (2003) 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 regulates the functional state and the survival of microglial cells through multiple molecular mechanisms. *J Neurochem*, **87**, 742-751.

Beumer, W., Gibney, S.M., Drexhage, R.C., Pont-Lezica, L., Doorduyn, J., Klein, H.C., Steiner, J., Connor, T.J., Harkin, A., Versnel, M.A. & Drexhage, H.A. (2012) The immune theory of psychiatric diseases: a key role for activated microglia and circulating monocytes. *J Leukoc Biol*, **92**, 959-975.

Beutler, B. & Rietschel, E.T. (2003) Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol*, **3**, 169-176.

Bhargava, A., Meijer, O.C., Dallman, M.F. & Pearce, D. (2000) Plasma membrane calcium pump isoform 1 gene expression is repressed by corticosterone and stress in rat hippocampus. *J Neurosci*, **20**, 3129-3138.

Bierhaus, A., Wolf, J., Andrassy, M., Rohleder, N., Humpert, P.M., Petrov, D., Ferstl, R., von Eynatten, M., Wendt, T., Rudofsky, G., Joswig, M., Morcos, M., Schwaninger, M., McEwen, B., Kirschbaum, C. & Nawroth, P.P. (2003) A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 1920-1925.

Bishai, I. & Coceani, F. (1992) Eicosanoid formation in the rat cerebral cortex. Contribution of neurons and glia. *Molecular and chemical neuropathology*, **17**, 219-238.

Black, P.H. & Garbutt, L.D. (2002) Stress, inflammation and cardiovascular disease. *J Psychosom Res*, **52**, 1-23.

Block, M.L. & Hong, J.S. (2007) Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity. *Biochem Soc Trans*, **35**, 1127-1132.

Bobinska, K., Galecka, E., Szemraj, J., Galecki, P. & Talarowska, M. (2017) Is there a link between TNF gene expression and cognitive deficits in depression? *Acta biochimica Polonica*, **64**, 65-73.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.

Bremner, J.D. (1999) Alterations in brain structure and function associated with post-traumatic stress disorder. *Seminars in clinical neuropsychiatry*, **4**, 249-255.

Brevet, M., Kojima, H., Asakawa, A., Atsuchi, K., Ushikai, M., Ataka, K., Inui, A., Kimura, H., Sevestre, H. & Fujimiya, M. (2010) Chronic foot-shock stress potentiates the influx of bone marrow-derived microglia into hippocampus. *J Neurosci Res*, **88**, 1890-1897.

Brown, S.W., Meyers, R.T., Brennan, K.M., Rumble, J.M., Narasimhachari, N., Perozzi, E.F., Ryan, J.J., Stewart, J.K. & Fischer-Stenger, K. (2003) Catecholamines in a macrophage cell line. *Journal of neuroimmunology*, **135**, 47-55.

Burt, D.B., Zembar, M.J. & Niederehe, G. (1995) Depression and memory impairment: a meta-analysis of the association, its pattern, and specificity. *Psychological bulletin*, **117**, 285-305.

Busbridge, N.J. & Grossman, A.B. (1991) Stress and the single cytokine: interleukin modulation of the pituitary-adrenal axis. *Mol Cell Endocrinol*, **82**, C209-214.

Butterweck, V., Prinz, S. & Schwaninger, M. (2003) The role of interleukin-6 in stress-induced hyperthermia and emotional behaviour in mice. *Behav Brain Res*, **144**, 49-56.

C., F.J., Jukka, M., Michael, B.G., G., R.R.G. & J., R.M. (1997) Clodronate and Liposome-Encapsulated Clodronate Are Metabolized to a Toxic ATP Analog, Adenosine 5'-(β,γ -Dichloromethylene) Triphosphate, by Mammalian Cells In Vitro. *Journal of Bone and Mineral Research*, **12**, 1358-1367.

Cai, H.Q., Catts, V.S., Webster, M.J., Galletly, C., Liu, D., O'Donnell, M., Weickert, T.W. & Weickert, C.S. (2018) Increased macrophages and changed brain endothelial cell gene expression in the frontal cortex of people with schizophrenia displaying inflammation. *Mol Psychiatry*.

Cannon, W.B. (1929a) ORGANIZATION FOR PHYSIOLOGICAL HOMEOSTASIS. *Physiological Reviews*, **9**, 399-431.

Cannon, W.B. (1929b) Pharmacological Injections and Physiological Inferences. *Science*, **70**, 500-501.

Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T. & Goeddel, D.V. (1996) TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature*, **383**, 443-446.

Capone, C., Faraco, G., Park, L., Cao, X., Davisson, R.L. & Iadecola, C. (2011) The cerebrovascular dysfunction induced by slow pressor doses of angiotensin II precedes the development of hypertension. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, **300**, H397-407.

Carola, V., D'Olimpio, F., Brunamonti, E., Mangia, F. & Renzi, P. (2002) Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav Brain Res*, **134**, 49-57.

Cawley, N.X., Li, Z. & Loh, Y.P. (2016) 60 YEARS OF POMC: Biosynthesis, trafficking, and secretion of pro-opiomelanocortin-derived peptides. *J Mol Endocrinol*, **56**, T77-97.

Chai, Z., Gatti, S., Toniatti, C., Poli, V. & Bartfai, T. (1996) Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 beta: a study on IL-6-deficient mice. *J Exp Med*, **183**, 311-316.

Charney, D.S., Deutch, A.Y., Krystal, J.H., Southwick, S.M. & Davis, M. (1993) Psychobiologic mechanisms of posttraumatic stress disorder. *Arch Gen Psychiatry*, **50**, 295-305.

Christiansen, S., Bouzinova, E.V., Palme, R. & Wiborg, O. (2012) Circadian activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis is differentially affected in the rat chronic mild stress model of depression. *Stress*, **15**, 647-657.

Christoffel, D.J., Golden, S.A. & Russo, S.J. (2011) Structural and synaptic plasticity in stress-related disorders. *Reviews in the neurosciences*, **22**, 535-549.

Clements, C.M., McNally, R.S., Conti, B.J., Mak, T.W. & Ting, J.P. (2006a) DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 15091-15096.

Clements, C.M., McNally, R.S., Conti, B.J., Mak, T.W. & Ting, J.P.Y. (2006b) DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 15091-15096.

Coelho-Santos, V., Goncalves, J., Fontes-Ribeiro, C. & Silva, A.P. (2012) Prevention of methamphetamine-induced microglial cell death by TNF-alpha and IL-6 through activation of the JAK-STAT pathway. *J Neuroinflammation*, **9**, 103.

Cole, M.A., Kim, P.J., Kalman, B.A. & Spencer, R.L. (2000) Dexamethasone suppression of corticosteroid secretion: evaluation of the site of action by receptor measures and functional studies. *Psychoneuroendocrinology*, **25**, 151-167.

Corona, A.W., Huang, Y., O'Connor, J.C., Dantzer, R., Kelley, K.W., Popovich, P.G. & Godbout, J.P. (2010) Fractalkine receptor (CX3CR1) deficiency sensitizes mice to the behavioral changes induced by lipopolysaccharide. *J Neuroinflammation*, **7**, 93.

Coutinho, A.E. & Chapman, K.E. (2011) The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Mol Cell Endocrinol*, **335**, 2-13.

D'Aquila, P.S., Brain, P. & Willner, P. (1994) Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. *Physiol Behav*, **56**, 861-867.

D'Mello, C., Le, T. & Swain, M.G. (2009) Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factor signaling during peripheral organ inflammation. *Journal of Neuroscience*, **29**, 2089-2102.

da Silva Correia, J., Soldau, K., Christen, U., Tobias, P.S. & Ulevitch, R.J. (2001) Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem*, **276**, 21129-21135.

Dantzer, R., Bluthé, R.M., Gheusi, G., Cremona, S., Laye, S., Parnet, P. & Kelley, K.W. (1998) Molecular basis of sickness behavior. *Ann N Y Acad Sci*, **856**, 132-138.

Dantzer, R. & Kelley, K.W. (2007) Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. *Brain Behav Immun*, **21**, 153-160.

Dantzer, R., O'Connor, J.C., Freund, G.G., Johnson, R.W. & Kelley, K.W. (2008) From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature reviews. Neuroscience*, **9**, 46-56.

De Bosscher, K., Vanden Berghe, W. & Haegeman, G. (2000) Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors. *Journal of neuroimmunology*, **109**, 16-22.

De Bosscher, K., Vanden Berghe, W. & Haegeman, G. (2003) The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev*, **24**, 488-522.

De Cristobal, J., Moro, M.A., Davalos, A., Castillo, J., Leza, J.C., Camarero, J., Colado, M.I., Lorenzo, P. & Lizasoain, I. (2001) Neuroprotective effect of aspirin by inhibition of glutamate release after permanent focal cerebral ischaemia in rats. *J Neurochem*, **79**, 456-459.

- de Kloet, E.R. (2000) Stress in the brain. *Eur J Pharmacol*, **405**, 187-198.
- de Kloet, E.R., Joels, M. & Holsboer, F. (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature reviews. Neuroscience*, **6**, 463-475.
- de Miranda, A.S., Zhang, C.J., Katsumoto, A. & Teixeira, A.L. (2017) Hippocampal adult neurogenesis: Does the immune system matter? *J Neurol Sci*, **372**, 482-495.
- De Strooper, B. & Karran, E. (2016) The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell*, **164**, 603-615.
- DellaGioia, N. & Hannestad, J. (2010) A critical review of human endotoxin administration as an experimental paradigm of depression. *Neurosci Biobehav Rev*, **34**, 130-143.
- Dhabhar, F.S., Malarkey, W.B., Neri, E. & McEwen, B.S. (2012) Stress-induced redistribution of immune cells--from barracks to boulevards to battlefields: a tale of three hormones--Curt Richter Award winner. *Psychoneuroendocrinology*, **37**, 1345-1368.
- Dhir, A., Padi, S.S., Naidu, P.S. & Kulkarni, S.K. (2006) Protective effect of naproxen (non-selective COX-inhibitor) or rofecoxib (selective COX-2 inhibitor) on immobilization stress-induced behavioral and biochemical alterations in mice. *Eur J Pharmacol*, **535**, 192-198.
- Dimitrijevic, O.B., Stamatovic, S.M., Keep, R.F. & Andjelkovic, A.V. (2006) Effects of the chemokine CCL2 on blood-brain barrier permeability during ischemia-reperfusion injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, **26**, 797-810.
- Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Cole, R.N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M. & Talalay, P. (2002) Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 11908-11913.
- Dowlati, Y., Herrmann, N., Swardfager, W., Liu, H., Sham, L., Reim, E.K. & Lanctot, K.L. (2010) A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry*, **67**, 446-457.

Droge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, **82**, 47-95.

Duman, R.S. (2009) Neuronal damage and protection in the pathophysiology and treatment of psychiatric illness: stress and depression. *Dialogues in clinical neuroscience*, **11**, 239-255.

Duman, R.S. & Aghajanian, G.K. (2012) Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets. *Science*, **338**, 68-72.

Dunn, A.J. & Berridge, C.W. (1990) Is corticotropin-releasing factor a mediator of stress responses? *Ann N Y Acad Sci*, **579**, 183-191.

Dunn, A.J., Wang, J. & Ando, T. (1999) Effects of cytokines on cerebral neurotransmission. Comparison with the effects of stress. *Adv Exp Med Biol*, **461**, 117-127.

Dutta, P., Courties, G., Wei, Y., Leuschner, F., Gorbатов, R., *et al.* (2012) Myocardial infarction accelerates atherosclerosis. *Nature*, **487**, 325-329.

Egan, R.W., Paxton, J. & Kuehl, F.A., Jr. (1976) Mechanism for irreversible self-deactivation of prostaglandin synthetase. *J Biol Chem*, **251**, 7329-7335.

Elmquist, J.K., Breder, C.D., Sherin, J.E., Scammell, T.E., Hickey, W.F., Dewitt, D. & Saper, C.B. (1997) Intravenous lipopolysaccharide induces cyclooxygenase 2-like immunoreactivity in rat brain perivascular microglia and meningeal macrophages. *J Comp Neurol*, **381**, 119-129.

Engelhardt, B., Vajkoczy, P. & Weller, R.O. (2017) The movers and shapers in immune privilege of the CNS. *Nat Immunol*, **18**, 123-131.

Engler, H., Bailey, M.T., Engler, A. & Sheridan, J.F. (2004) Effects of repeated social stress on leukocyte distribution in bone marrow, peripheral blood and spleen. *Journal of neuroimmunology*, **148**, 106-115.

Eren, I., Naziroglu, M. & Demirdas, A. (2007) Protective effects of lamotrigine, aripiprazole and escitalopram on depression-induced oxidative stress in rat brain. *Neurochem Res*, **32**, 1188-1195.

Ericsson, A., Liu, C., Hart, R.P. & Sawchenko, P.E. (1995) Type 1 interleukin-1 receptor in the rat brain: distribution, regulation, and relationship to sites of IL-1-induced cellular activation. *J Comp Neurol*, **361**, 681-698.

Erridge, C., Pridmore, A., Eley, A., Stewart, J. & Poxton, I.R. (2004) Lipopolysaccharides of *Bacteroides fragilis*, *Chlamydia trachomatis* and *Pseudomonas aeruginosa* signal via toll-like receptor 2. *J Med Microbiol*, **53**, 735-740.

Erta, M., Quintana, A. & Hidalgo, J. (2012) Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int J Biol Sci*, **8**, 1254-1266.

Eugenin, E.A., Osiecki, K., Lopez, L., Goldstein, H., Calderon, T.M. & Berman, J.W. (2006) CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 mediates enhanced transmigration of human immunodeficiency virus (HIV)-infected leukocytes across the blood-brain barrier: a potential mechanism of HIV-CNS invasion and NeuroAIDS. *J Neurosci*, **26**, 1098-1106.

Fabrick, B.O., Van Haastert, E.S., Galea, I., Polfliet, M.M., Dopp, E.D., Van Den Heuvel, M.M., Van Den Berg, T.K., De Groot, C.J., Van Der Valk, P. & Dijkstra, C.D. (2005) CD163-positive perivascular macrophages in the human CNS express molecules for antigen recognition and presentation. *Glia*, **51**, 297-305.

Faraco, G. & Iadecola, C. (2013) Hypertension: a harbinger of stroke and dementia. *Hypertension*, **62**, 810-817.

Faraco, G., Park, L., Anrather, J. & Iadecola, C. (2017) Brain perivascular macrophages: characterization and functional roles in health and disease. *J Mol Med (Berl)*, **95**, 1143-1152.

Faraco, G., Sugiyama, Y., Lane, D., Garcia-Bonilla, L., Chang, H., Santisteban, M.M., Racchumi, G., Murphy, M., Van Rooijen, N., Anrather, J. & Iadecola, C. (2016) Perivascular macrophages mediate the neurovascular and cognitive dysfunction associated with hypertension. *J Clin Invest*, **126**, 4674-4689.

Farooq, R.K., Isingrini, E., Tanti, A., Le Guisquet, A.M., Arlicot, N., Minier, F., Leman, S., Chalon, S., Belzung, C. & Camus, V. (2012) Is unpredictable chronic mild stress (UCMS) a reliable model to study depression-induced neuroinflammation? *Behav Brain Res*, **231**, 130-137.

Feinstein, D.L. (2003) Therapeutic potential of peroxisome proliferator-activated receptor agonists for neurological disease. *Diabetes Technol Ther*, **5**, 67-73.

Felten, D.L., Felten, S.Y., Carlson, S.L., Olschowka, J.A. & Livnat, S. (1985) Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. *J Immunol*, **135**, 755s-765s.

Fernandez-Lopez, D., Faustino, J., Klibanov, A.L., Derugin, N., Blanchard, E., Simon, F., Leib, S.L. & Vexler, Z.S. (2016) Microglial Cells Prevent Hemorrhage in Neonatal Focal Arterial Stroke. *J Neurosci*, **36**, 2881-2893.

Filipowicz, A.R., McGary, C.M., Holder, G.E., Lindgren, A.A., Johnson, E.M., Sugimoto, C., Kuroda, M.J. & Kim, W.K. (2016) Proliferation of Perivascular Macrophages Contributes to the Development of Encephalitic Lesions in HIV-Infected Humans and in SIV-Infected Macaques. *Sci Rep*, **6**, 32900.

Foley, D.L., Neale, M.C., Gardner, C.O., Pickles, A., Prescott, C.A. & Kendler, K.S. (2003) Major depression and associated impairment: same or different genetic and environmental risk factors? *Am J Psychiatry*, **160**, 2128-2133.

Forman, B.M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R.P., Spiegelman, B.M. & Evans, R.M. (1995) 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell*, **83**, 803-812.

Fujihara, M., Muroi, M., Tanamoto, K., Suzuki, T., Azuma, H. & Ikeda, H. (2003) Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol Ther*, **100**, 171-194.

Furay, A.R., Bruestle, A.E. & Herman, J.P. (2008) The role of the forebrain glucocorticoid receptor in acute and chronic stress. *Endocrinology*, **149**, 5482-5490.

Galea, I., Palin, K., Newman, T.A., Van Rooijen, N., Perry, V.H. & Boche, D. (2005) Mannose receptor expression specifically reveals perivascular macrophages in normal, injured, and diseased mouse brain. *Glia*, **49**, 375-384.

Garate, I., Garcia-Bueno, B., Madrigal, J.L., Bravo, L., Berrocoso, E., Caso, J.R., Mico, J.A. & Leza, J.C. (2011) Origin and consequences of brain Toll-like receptor 4 pathway stimulation in an experimental model of depression. *J Neuroinflammation*, **8**, 151.

Garate, I., Garcia-Bueno, B., Madrigal, J.L., Caso, J.R., Alou, L., Gomez-Lus, M.L., Mico, J.A. & Leza, J.C. (2013) Stress-induced neuroinflammation: role of the Toll-like receptor-4 pathway. *Biol Psychiatry*, **73**, 32-43.

Garcia-Bueno, B., Caso, J.R. & Leza, J.C. (2008a) Stress as a neuroinflammatory condition in brain: damaging and protective mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev*, **32**, 1136-1151.

Garcia-Bueno, B., Madrigal, J.L., Lizasoain, I., Moro, M.A., Lorenzo, P. & Leza, J.C. (2005) The anti-inflammatory prostaglandin 15d-PGJ2 decreases oxidative/nitrosative mediators in brain after acute stress in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, **180**, 513-522.

Garcia-Bueno, B., Madrigal, J.L., Perez-Nievas, B.G. & Leza, J.C. (2008b) Stress mediators regulate brain prostaglandin synthesis and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation after stress in rats. *Endocrinology*, **149**, 1969-1978.

Garcia-Bueno, B., Perez-Nievas, B.G. & Leza, J.C. (2010) Is there a role for the nuclear receptor PPARgamma in neuropsychiatric diseases? *Int J Neuropsychopharmacol*, **13**, 1411-1429.

García Bueno, B., Caso, J.R., Madrigal, J.L.M. & Leza, J.C. (2016) Innate immune receptor Toll-like receptor 4 signalling in neuropsychiatric diseases. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, **64**, 134-147.

Garvey, W.T., Huecksteadt, T.P., Lima, F.B. & Birnbaum, M.J. (1989) Expression of a glucose transporter gene cloned from brain in cellular models of insulin resistance: dexamethasone decreases transporter mRNA in primary cultured adipocytes. *Mol Endocrinol*, **3**, 1132-1141.

Gilman, S.E., Trinh, N.H., Smoller, J.W., Fava, M., Murphy, J.M. & Breslau, J. (2013) Psychosocial stressors and the prognosis of major depression: a test of Axis IV. *Psychol Med*, **43**, 303-316.

Goldman-Rakic, P.S. (1987) Motor control function of the prefrontal cortex. *Ciba Found Symp*, **132**, 187-200.

Goldmann, T., Wieghofer, P., Jordao, M.J., Prutek, F., Hagemeyer, N., Frenzel, K., Amann, L., Staszewski, O., Kierdorf, K., Krueger, M., Locatelli, G., Hochgerner, H., Zeiser, R., Epelman, S., Geissmann, F., Priller, J., Rossi, F.M.,

Bechmann, I., Kerschensteiner, M., Linnarsson, S., Jung, S. & Prinz, M. (2016) Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. *Nat Immunol*, **17**, 797-805.

Gomez-Nicola, D., Schettters, S.T. & Perry, V.H. (2014) Differential role of CCR2 in the dynamics of microglia and perivascular macrophages during prion disease. *Glia*, **62**, 1041-1052.

Gorka, Z., Moryl, E. & Papp, M. (1996) Effect of chronic mild stress on circadian rhythms in the locomotor activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, **54**, 229-234.

Gosselin, D. & Rivest, S. (2008) MyD88 signaling in brain endothelial cells is essential for the neuronal activity and glucocorticoid release during systemic inflammation. *Mol Psychiatry*, **13**, 480-497.

Graeber, M.B., Streit, W.J. & Kreutzberg, G.W. (1989) Identity of ED2-positive perivascular cells in rat brain. *J Neurosci Res*, **22**, 103-106.

Grahn, R.E., Watkins, L.R. & Maier, S.F. (2000) Impaired escape performance and enhanced conditioned fear in rats following exposure to an uncontrollable stressor are mediated by glutamate and nitric oxide in the dorsal raphe nucleus. *Behav Brain Res*, **112**, 33-41.

Graybeal, C., Kiselycznyk, C. & Holmes, A. (2012) Stress-induced deficits in cognition and emotionality: a role of glutamate. *Current topics in behavioral neurosciences*, **12**, 189-207.

Greenwood, J., Heasman, S.J., Alvarez, J.I., Prat, A., Lyck, R. & Engelhardt, B. (2011) Review: leucocyte-endothelial cell crosstalk at the blood-brain barrier: a prerequisite for successful immune cell entry to the brain. *Neuropathology and applied neurobiology*, **37**, 24-39.

Griffin, E.W., Skelly, D.T., Murray, C.L. & Cunningham, C. (2013) Cyclooxygenase-1-dependent prostaglandins mediate susceptibility to systemic inflammation-induced acute cognitive dysfunction. *J Neurosci*, **33**, 15248-15258.

Grippe, A.J., Francis, J., Beltz, T.G., Felder, R.B. & Johnson, A.K. (2005) Neuroendocrine and cytokine profile of chronic mild stress-induced anhedonia. *Physiol Behav*, **84**, 697-706.

Grisanti, L.A., Evanson, J., Marchus, E., Jorissen, H., Woster, A.P., DeKrey, W., Sauter, E.R., Combs, C.K. & Porter, J.E. (2010) Pro-inflammatory responses in human monocytes are beta1-adrenergic receptor subtype dependent. *Mol Immunol*, **47**, 1244-1254.

Grisanti, L.A., Woster, A.P., Dahlman, J., Sauter, E.R., Combs, C.K. & Porter, J.E. (2011) alpha1-adrenergic receptors positively regulate Toll-like receptor cytokine production from human monocytes and macrophages. *J Pharmacol Exp Ther*, **338**, 648-657.

Groeneweg, F.L., Karst, H., de Kloet, E.R. & Joels, M. (2011) Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response. *J Endocrinol*, **209**, 153-167.

Gupta, P., Lai, S.M., Sheng, J., Tetlak, P., Balachander, A., Claser, C., Renia, L., Karjalainen, K. & Ruedl, C. (2016) Tissue-Resident CD169(+) Macrophages Form a Crucial Front Line against Plasmodium Infection. *Cell Rep*, **16**, 1749-1761.

Gyoneva, S. & Traynelis, S.F. (2013) Norepinephrine modulates the motility of resting and activated microglia via different adrenergic receptors. *J Biol Chem*, **288**, 15291-15302.

Halliwell, B. (2006) Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends in biochemical sciences*, **31**, 509-515.

Hamner, M.B. & Gold, P.B. (1998) Plasma dopamine beta-hydroxylase activity in psychotic and non-psychotic post-traumatic stress disorder. *Psychiatry Res*, **77**, 175-181.

Hanke, M.L., Powell, N.D., Stiner, L.M., Bailey, M.T. & Sheridan, J.F. (2012) Beta adrenergic blockade decreases the immunomodulatory effects of social disruption stress. *Brain Behav Immun*, **26**, 1150-1159.

Harrison, J.K., Jiang, Y., Chen, S., Xia, Y., Maciejewski, D., McNamara, R.K., Streit, W.J., Salafranca, M.N., Adhikari, S., Thompson, D.A., Botti, P., Bacon, K.B. & Feng, L. (1998) Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 10896-10901.

Hasegawa-Ishii, S., Shimada, A., Inaba, M., Li, M., Shi, M., Kawamura, N., Takei, S., Chiba, Y., Hosokawa, M. & Ikehara, S. (2013) Selective localization of bone marrow-derived ramified cells in the brain adjacent to the attachments of choroid plexus. *Brain, Behavior, and Immunity*, **29**, 82-97.

Haskew-Layton, R.E., Payappilly, J.B., Xu, H., Bennett, S.A. & Ratan, R.R. (2013) 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2) protects neurons from oxidative death via an Nrf2 astrocyte-specific mechanism independent of PPARgamma. *J Neurochem*, **124**, 536-547.

Hawkes, C.A. & McLaurin, J. (2009) Selective targeting of perivascular macrophages for clearance of beta-amyloid in cerebral amyloid angiopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 1261-1266.

He, H., Mack, J.J., Guc, E., Warren, C.M., Squadrito, M.L., Kilarski, W.W., Baer, C., Freshman, R.D., McDonald, A.I., Ziyad, S., Swartz, M.A., De Palma, M. & Iruela-Arispe, M.L. (2016) Perivascular Macrophages Limit Permeability. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **36**, 2203-2212.

Heidt, T., Sager, H.B., Courties, G., Dutta, P., Iwamoto, Y., Zaltsman, A., von Zur Muhlen, C., Bode, C., Fricchione, G.L., Denninger, J., Lin, C.P., Vinegoni, C., Libby, P., Swirski, F.K., Weissleder, R. & Nahrendorf, M. (2014) Chronic variable stress activates hematopoietic stem cells. *Nat Med*, **20**, 754-758.

Hench, P.S., Kendall, E.C., Slocumb, C.H. & Polley, H.F. (1950) Effects of cortisone acetate and pituitary ACTH on rheumatoid arthritis, rheumatic fever and certain other conditions. *Archives of internal medicine (Chicago, Ill. : 1908)*, **85**, 545-666.

Herz, J., Filiano, A.J., Smith, A., Yogev, N. & Kipnis, J. (2017) Myeloid Cells in the Central Nervous System. *Immunity*, **46**, 943-956.

Hickey, W.F. & Kimura, H. (1988) Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science*, **239**, 290-292.

Hill, M.N., McLaughlin, R.J., Pan, B., Fitzgerald, M.L., Roberts, C.J., Lee, T.T., Karatsoreos, I.N., Mackie, K., Viau, V., Pickel, V.M., McEwen, B.S., Liu, Q.S., Gorzalka, B.B. & Hillard, C.J. (2011) Recruitment of prefrontal cortical endocannabinoid signaling by glucocorticoids contributes to termination of the stress response. *J Neurosci*, **31**, 10506-10515.

Hodes, G.E., Kana, V., Menard, C., Merad, M. & Russo, S.J. (2015) Neuroimmune mechanisms of depression. *Nat Neurosci*, **18**, 1386-1393.

Hoffman, S.W., Rzigalinski, B.A., Willoughby, K.A. & Ellis, E.F. (2000) Astrocytes generate isoprostanes in response to trauma or oxygen radicals. *J Neurotrauma*, **17**, 415-420.

Hofmann, N., Lachnit, N., Streppel, M., Witter, B., Neiss, W.F., Guntinas-Lichius, O. & Angelov, D.N. (2002) Increased expression of ICAM-1, VCAM-1, MCP-1, and MIP-1 alpha by spinal perivascular macrophages during experimental allergic encephalomyelitis in rats. *BMC immunology*, **3**, 11.

Holder, G.E., McGary, C.M., Johnson, E.M., Zheng, R., John, V.T., Sugimoto, C., Kuroda, M.J. & Kim, W.K. (2014) Expression of the mannose receptor CD206 in HIV and SIV encephalitis: a phenotypic switch of brain perivascular macrophages with virus infection. *J Neuroimmune Pharmacol*, **9**, 716-726.

Holfelder, K., Schittenhelm, J., Trautmann, K., Haybaeck, J., Meyermann, R. & Beschoner, R. (2011) De novo expression of the hemoglobin scavenger receptor CD163 by activated microglia is not associated with hemorrhages in human brain lesions. *Histology and histopathology*, **26**, 1007-1017.

Horner, H.C., Munck, A. & Lienhard, G.E. (1987) Dexamethasone causes translocation of glucose transporters from the plasma membrane to an intracellular site in human fibroblasts. *J Biol Chem*, **262**, 17696-17702.

Howren, M.B., Lamkin, D.M. & Suls, J. (2009) Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. *Psychosom Med*, **71**, 171-186.

Huang, H.W., Tang, J.L., Han, X.H., Peng, Y.P. & Qiu, Y.H. (2013) Lymphocyte-derived catecholamines induce a shift of Th1/Th2 balance toward Th2 polarization. *Neuroimmunomodulation*, **20**, 1-8.

Hunzeker, J., Padgett, D.A., Sheridan, P.A., Dhabhar, F.S. & Sheridan, J.F. (2004) Modulation of natural killer cell activity by restraint stress during an influenza A/PR8 infection in mice. *Brain Behav Immun*, **18**, 526-535.

Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M. & Nabeshima, Y. (1997) An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying

enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun*, **236**, 313-322.

Iyer, A.M., Brooke, S.M. & Sapolsky, R.M. (1998) Glucocorticoids interact with gp120 in causing neurotoxicity in striatal cultures. *Brain Res*, **808**, 305-309.

J., R.M., J., W.D., G., R.R.G., Xiaohui, J., Xiaojuan, X., Michael, B.G., V., B.A. & H., E.F. (1994) Inhibitory effects of bisphosphonates on growth of amoebae of the cellular slime mold dictyostelium discoideum. *Journal of Bone and Mineral Research*, **9**, 1029-1039.

Jabaudon, D., Scanziani, M., Gahwiler, B.H. & Gerber, U. (2000) Acute decrease in net glutamate uptake during energy deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5610-5615.

Jankord, R. & Herman, J.P. (2008) Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. *Ann N Y Acad Sci*, **1148**, 64-73.

Jin, J., Wang, X., Wang, Q., Guo, X., Cao, J., Zhang, X., Zhu, T., Zhang, D., Wang, W., Wang, J., Shen, B., Gao, X., Shi, Y. & Zhang, J. (2013) Chronic psychological stress induces the accumulation of myeloid-derived suppressor cells in mice. *PLoS One*, **8**, e74497.

Johnson, J.A., Johnson, D.A., Kraft, A.D., Calkins, M.J., Jakel, R.J., Vargas, M.R. & Chen, P.C. (2008) The Nrf2-ARE pathway: an indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci*, **1147**, 61-69.

Johnson, J.D., Campisi, J., Sharkey, C.M., Kennedy, S.L., Nickerson, M., Greenwood, B.N. & Fleshner, M. (2005) Catecholamines mediate stress-induced increases in peripheral and central inflammatory cytokines. *Neuroscience*, **135**, 1295-1307.

Josefsson, E., Bergquist, J., Ekman, R. & Tarkowski, A. (1996) Catecholamines are synthesized by mouse lymphocytes and regulate function of these cells by induction of apoptosis. *Immunology*, **88**, 140-146.

Joseph, M.H. & Kennett, G.A. (1983) Stress-induced release of 5-HT in the hippocampus and its dependence on increased tryptophan availability: an in vivo electrochemical study. *Brain Res*, **270**, 251-257.

Jou, I., Lee, J.H., Park, S.Y., Yoon, H.J., Joe, E.H. & Park, E.J. (2006) Gangliosides trigger inflammatory responses via TLR4 in brain glia. *Am J Pathol*, **168**, 1619-1630.

Kaspar, J.W. & Jaiswal, A.K. (2010) An autoregulatory loop between Nrf2 and Cul3-Rbx1 controls their cellular abundance. *J Biol Chem*, **285**, 21349-21358.

Katsuura, G., Gottschall, P.E., Dahl, R.R. & Arimura, A. (1988) Adrenocorticotropin release induced by intracerebroventricular injection of recombinant human interleukin-1 in rats: possible involvement of prostaglandin. *Endocrinology*, **122**, 1773-1779.

Kendler, K.S., Karkowski, L.M. & Prescott, C.A. (1999) Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *Am J Psychiatry*, **156**, 837-841.

Kessler, R.C. (1997) The effects of stressful life events on depression. *Annual review of psychology*, **48**, 191-214.

Kessler, R.C. (2003) Epidemiology of women and depression. *Journal of affective disorders*, **74**, 5-13.

Kessler, R.C., Chiu, W.T., Demler, O., Merikangas, K.R. & Walters, E.E. (2005) Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*, **62**, 617-627.

Kida, S., Steart, P.V., Zhang, E.T. & Weller, R.O. (1993) Perivascular cells act as scavengers in the cerebral perivascular spaces and remain distinct from pericytes, microglia and macrophages. *Acta neuropathologica*, **85**, 646-652.

Kigerl, K.A., Lai, W., Rivest, S., Hart, R.P., Satoskar, A.R. & Popovich, P.G. (2007) Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 regulate inflammation, gliosis, and myelin sparing after spinal cord injury. *J Neurochem*, **102**, 37-50.

Kim, M., Carman, C.V. & Springer, T.A. (2003) Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science*, **301**, 1720-1725.

Kim, W.K., Alvarez, X., Fisher, J., Bronfin, B., Westmoreland, S., McLaurin, J. & Williams, K. (2006) CD163 identifies perivascular macrophages in normal and

viral encephalitic brains and potential precursors to perivascular macrophages in blood. *Am J Pathol*, **168**, 822-834.

Kim, Y.K. & Maes, M. (2003) The role of the cytokine network in psychological stress. *Acta Neuropsychiatr*, **15**, 148-155.

Kitayama, I., Yaga, T., Kayahara, T., Nakano, K., Murase, S., Otani, M. & Nomura, J. (1997) Long-term stress degenerates, but imipramine regenerates, noradrenergic axons in the rat cerebral cortex. *Biol Psychiatry*, **42**, 687-696.

Konsman, J.P., Drukarch, B. & Van Dam, A.M. (2007) (Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology. *Clin Sci (Lond)*, **112**, 1-25.

Konsman, J.P., Veeneman, J., Combe, C., Poole, S., Luheshi, G.N. & Dantzer, R. (2008) Central nervous action of interleukin-1 mediates activation of limbic structures and behavioural depression in response to peripheral administration of bacterial lipopolysaccharide. *Eur J Neurosci*, **28**, 2499-2510.

Kosten, T.A., Galloway, M.P., Duman, R.S., Russell, D.S. & D'Sa, C. (2008) Repeated unpredictable stress and antidepressants differentially regulate expression of the bcl-2 family of apoptotic genes in rat cortical, hippocampal, and limbic brain structures. *Neuropsychopharmacology*, **33**, 1545-1558.

Krishnan, V. & Nestler, E.J. (2008) The molecular neurobiology of depression. *Nature*, **455**, 894-902.

Kronfol, Z. & Remick, D.G. (2000) Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. *Am J Psychiatry*, **157**, 683-694.

Kurreck, J. (2003) Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem*, **270**, 1628-1644.

Lacroix, S., Feinstein, D. & Rivest, S. (1998) The bacterial endotoxin lipopolysaccharide has the ability to target the brain in upregulating its membrane CD14 receptor within specific cellular populations. *Brain Pathol*, **8**, 625-640.

Laflamme, N. & Rivest, S. (2001) Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *FASEB J*, **15**, 155-163.

Lawrence, M.S. & Sapolsky, R.M. (1994) Glucocorticoids accelerate ATP loss following metabolic insults in cultured hippocampal neurons. *Brain Res*, **646**, 303-306.

Lee, A.L., Ogle, W.O. & Sapolsky, R.M. (2002) Stress and depression: possible links to neuron death in the hippocampus. *Bipolar Disord*, **4**, 117-128.

Lehenkari, P.P., Kellinsalmi, M., Näpänkangas, J.P., Ylitalo, K.V., Mönkkönen, J., Rogers, M.J., Azhayev, A., Väänänen, H.K. & Hassinen, I.E. (2002) Further Insight into Mechanism of Action of Clodronate: Inhibition of Mitochondrial ADP/ATP Translocase by a Nonhydrolyzable, Adenine-Containing Metabolite. *Molecular Pharmacology*, **61**, 1255-1262.

Lehnardt, S., Massillon, L., Follett, P., Jensen, F.E., Ratan, R., Rosenberg, P.A., Volpe, J.J. & Vartanian, T. (2003) Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 8514-8519.

Levonen, A.L., Landar, A., Ramachandran, A., Ceaser, E.K., Dickinson, D.A., Zanoni, G., Morrow, J.D. & Darley-Usmar, V.M. (2004) Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem J*, **378**, 373-382.

Leza, J.C., Salas, E., Sawicki, G., Russell, J.C. & Radomski, M.W. (1998) The effects of stress on homeostasis in JCR-LA-cp rats: the role of nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther*, **286**, 1397-1403.

Li, W., Ling, H.P., You, W.C., Ji, X.J., Tang, Y., Zhao, J.B., Su, X.F. & Hang, C.H. (2013) Recombinant high-mobility group box 1 protein (HMGB-1) promotes myeloid differentiation primary response protein 88 (Myd88) upregulation in mouse primary cortical neurons. *Neurol Sci*, **34**, 847-853.

Li, Z., Ma, L., Kuleskaya, N., Voikar, V. & Tian, L. (2014) Microglia are polarized to M1 type in high-anxiety inbred mice in response to lipopolysaccharide challenge. *Brain Behav Immun*, **38**, 237-248.

Lightman, S.L. & Young, W.S., 3rd (1988) Corticotrophin-releasing factor, vasopressin and pro-opiomelanocortin mRNA responses to stress and opiates in the rat. *J Physiol*, **403**, 511-523.

Linehan, S.A., Martinez-Pomares, L., Stahl, P.D. & Gordon, S. (1999) Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: In situ expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells. *J Exp Med*, **189**, 1961-1972.

Lipton, S.A. (1999) Neuronal protection and destruction by NO. *Cell Death Differ*, **6**, 943-951.

Liu, G.H., Qu, J. & Shen, X. (2008) NF-kappaB/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK. *Biochim Biophys Acta*, **1783**, 713-727.

Lopez, J.F., Vazquez, D.M., Chalmers, D.T. & Watson, S.J. (1997) Regulation of 5-HT receptors and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Implications for the neurobiology of suicide. *Ann N Y Acad Sci*, **836**, 106-134.

Lowy, M.T., Wittenberg, L. & Novotney, S. (1994) Adrenalectomy attenuates kainic acid-induced spectrin proteolysis and heat shock protein 70 induction in hippocampus and cortex. *J Neurochem*, **63**, 886-894.

Lucas, S.M., Rothwell, N.J. & Gibson, R.M. (2006) The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol*, **147 Suppl 1**, S232-240.

Lucca, G., Comim, C.M., Valvassori, S.S., Reus, G.Z., Vuolo, F., Petronilho, F., Dal-Pizzol, F., Gavioli, E.C. & Quevedo, J. (2009) Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. *Neurochem Int*, **54**, 358-362.

Lupien, S.J., King, S., Meaney, M.J. & McEwen, B.S. (2000) Child's stress hormone levels correlate with mother's socioeconomic status and depressive state. *Biol Psychiatry*, **48**, 976-980.

Ma, Q. (2013) Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **53**, 401-426.

Madrigal, J.L., Caso, J.R., de Cristobal, J., Cardenas, A., Leza, J.C., Lizasoain, I., Lorenzo, P. & Moro, M.A. (2003a) Effect of subacute and chronic immobilisation stress on the outcome of permanent focal cerebral ischaemia in rats. *Brain Res*, **979**, 137-145.

Madrigal, J.L., Garcia-Bueno, B., Hinojosa, A.E., Polak, P., Feinstein, D.L. & Leza, J.C. (2010) Regulation of MCP-1 production in brain by stress and noradrenaline-modulating drugs. *J Neurochem*, **113**, 543-551.

Madrigal, J.L., Hurtado, O., Moro, M.A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Castrillo, A., Bosca, L. & Leza, J.C. (2002a) The increase in TNF-alpha levels is implicated in NF-kappaB activation and inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after immobilization stress. *Neuropsychopharmacology*, **26**, 155-163.

Madrigal, J.L., Moro, M.A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Castrillo, A., Bosca, L. & Leza, J.C. (2001a) Inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after acute restraint stress is regulated by nuclear factor kappaB-mediated mechanisms. *J Neurochem*, **76**, 532-538.

Madrigal, J.L., Moro, M.A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Fernandez, A.P., Rodrigo, J., Bosca, L. & Leza, J.C. (2003b) Induction of cyclooxygenase-2 accounts for restraint stress-induced oxidative status in rat brain. *Neuropsychopharmacology*, **28**, 1579-1588.

Madrigal, J.L., Moro, M.A., Lizasoain, I., Lorenzo, P. & Leza, J.C. (2002b) Stress-induced increase in extracellular sucrose space in rats is mediated by nitric oxide. *Brain Res*, **938**, 87-91.

Madrigal, J.L., Olivenza, R., Moro, M.A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Rodrigo, J. & Leza, J.C. (2001b) Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. *Neuropsychopharmacology*, **24**, 420-429.

Maes, M. (1995) Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **19**, 11-38.

Maes, M., Yirmiya, R., Noraberg, J., Brene, S., Hibbeln, J., Perini, G., Kubera, M., Bob, P., Lerer, B. & Maj, M. (2009) The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. *Metabolic brain disease*, **24**, 27-53.

Maier, S.F. & Watkins, L.R. (1998) Cytokines for psychologists: implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood, and cognition. *Psychol Rev*, **105**, 83-107.

Martin-Hernandez, D., Bris, A.G., MacDowell, K.S., Garcia-Bueno, B., Madrigal, J.L., Leza, J.C. & Caso, J.R. (2016) Modulation of the antioxidant nuclear factor (erythroid 2-derived)-like 2 pathway by antidepressants in rats. *Neuropharmacology*, **103**, 79-91.

Martín-Hernández, D., Caso, J.R., Bris, Á.G., Maus, S.R., Madrigal, J.L.M., García-Bueno, B., MacDowell, K.S., Alou, L., Gómez-Lus, M.L. & Leza, J.C. (2016) Bacterial translocation affects intracellular neuroinflammatory pathways in a depression-like model in rats. *Neuropharmacology*, **103**, 122-133.

Mato, M., Ookawara, S., Sano, M. & Fukuda, S. (1982) Uptake of fat by fluorescent granular perithelial cells in cerebral cortex after administration of fat rich chow. *Experientia*, **38**, 1496-1498.

McEwen, B.S. (1998) Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci*, **840**, 33-44.

McEwen, B.S. (2004) Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders. *Ann N Y Acad Sci*, **1032**, 1-7.

McEwen, B.S., de Leon, M.J., Lupien, S.J. & Meaney, M.J. (1999) Corticosteroids, the Aging Brain and Cognition. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, **10**, 92-96.

McEwen, B.S. & Magarinos, A.M. (2001) Stress and hippocampal plasticity: implications for the pathophysiology of affective disorders. *Human psychopharmacology*, **16**, S7-s19.

McEwen, B.S. & Sapolsky, R.M. (1995) Stress and cognitive function. *Curr Opin Neurobiol*, **5**, 205-216.

McEwen, B.S. & Stellar, E. (1993) Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch Intern Med*, **153**, 2093-2101.

McKim, D.B., Patterson, J.M., Wohleb, E.S., Jarrett, B.L., Reader, B.F., Godbout, J.P. & Sheridan, J.F. (2016) Sympathetic Release of Splenic Monocytes Promotes Recurring Anxiety Following Repeated Social Defeat. *Biol Psychiatry*, **79**, 803-813.

McKim, D.B., Weber, M.D., Niraula, A., Sawicki, C.M., Liu, X., Jarrett, B.L., Ramirez-Chan, K., Wang, Y., Roeth, R.M., Socaldito, A.D., Sobol, C.G., Quan, N., Sheridan, J.F. & Godbout, J.P. (2017) Microglial recruitment of IL-1beta-producing monocytes to brain endothelium causes stress-induced anxiety. *Mol Psychiatry*.

Milani, P., Ambrosi, G., Gammoh, O., Blandini, F. & Cereda, C. (2013) SOD1 and DJ-1 converge at Nrf2 pathway: a clue for antioxidant therapeutic potential in neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev*, **2013**, 836760.

Miller, A.H., Maletic, V. & Raison, C.L. (2009) Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry*, **65**, 732-741.

Miller, A.H. & Raison, C.L. (2016) The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nat Rev Immunol*, **16**, 22-34.

Minami, M., Kuraishi, Y., Yamaguchi, T., Nakai, S., Hirai, Y. & Satoh, M. (1991) Immobilization stress induces interleukin-1 beta mRNA in the rat hypothalamus. *Neurosci Lett*, **123**, 254-256.

Mitchell, P.B., Parker, G.B., Gladstone, G.L., Wilhelm, K. & Austin, M.P. (2003) Severity of stressful life events in first and subsequent episodes of depression: the relevance of depressive subtype. *Journal of affective disorders*, **73**, 245-252.

Moghaddam, B. (1993) Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *J Neurochem*, **60**, 1650-1657.

Moghaddam, B., Bolinao, M.L., Stein-Behrens, B. & Sapolsky, R. (1994) Glucocorticoids mediate the stress-induced extracellular accumulation of glutamate. *Brain Res*, **655**, 251-254.

Mollen, K.P., Anand, R.J., Tsung, A., Prince, J.M., Levy, R.M. & Billiar, T.R. (2006) Emerging paradigm: toll-like receptor 4-sentinel for the detection of tissue damage. *Shock*, **26**, 430-437.

Moreau, J.L., Scherschlicht, R., Jenck, F. & Martin, J.R. (1995) Chronic mild stress-induced anhedonia model of depression; sleep abnormalities and curative effects of electroshock treatment. *Behav Pharmacol*, **6**, 682-687.

Mouri, T., Itoi, K., Takahashi, K., Suda, T., Murakami, O., Yoshinaga, K., Andoh, N., Ohtani, H., Masuda, T. & Sasano, N. (1993) Colocalization of corticotropin-releasing factor and vasopressin in the paraventricular nucleus of the human hypothalamus. *Neuroendocrinology*, **57**, 34-39.

Murray, C.J. & Atkinson, C. & Bhalla, K. & Birbeck, G. & Burstein, R. & Chou, D. & Dellavalle, R. & Danaei, G. & Ezzati, *et al* (2013) The state of US health, 1990-2010: burden of diseases, injuries, and risk factors. *Jama*, **310**, 591-608.

Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., Kitamura, T., Kosugi, A., Kimoto, M. & Miyake, K. (2002) Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol*, **3**, 667-672.

Nagyoszi, P., Wilhelm, I., Farkas, A.E., Fazakas, C., Dung, N.T., Hasko, J. & Krizbai, I.A. (2010) Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells. *Neurochem Int*, **57**, 556-564.

Nair, S., Doh, S.T., Chan, J.Y., Kong, A.N. & Cai, L. (2008) Regulatory potential for concerted modulation of Nrf2- and Nfkb1-mediated gene expression in inflammation and carcinogenesis. *Br J Cancer*, **99**, 2070-2082.

Nance, D.M. & Sanders, V.M. (2007) Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). *Brain Behav Immun*, **21**, 736-745.

Nathan, C. & Xie, Q.W. (1994) Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*, **78**, 915-918.

Nelson, L.H. & Lenz, K.M. (2017) Microglia depletion in early life programs persistent changes in social, mood-related, and locomotor behavior in male and female rats. *Behav Brain Res*, **316**, 279-293.

Nguyen, K.T., Deak, T., Owens, S.M., Kohno, T., Fleshner, M., Watkins, L.R. & Maier, S.F. (1998) Exposure to acute stress induces brain interleukin-1beta protein in the rat. *J Neurosci*, **18**, 2239-2246.

Nguyen, T., Nioi, P. & Pickett, C.B. (2009) The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem*, **284**, 13291-13295.

Nicolas, C.S., Amici, M., Bortolotto, Z.A., Doherty, A., Csaba, Z., Fafouri, A., Dournaud, P., Gressens, P., Collingridge, G.L. & Peineau, S. (2013) The role of JAK-STAT signaling within the CNS. *JAKSTAT*, **2**, e22925.

Nie, S.N., Sun, H.C., Wu, X.H. & Qian, X.M. (2004) Cyclooxygenase 2, pS2, inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor alpha in gastric adaptation to stress. *World J Gastroenterol*, **10**, 3537-3541.

Niraula, A., Wang, Y., Godbout, J.P. & Sheridan, J.F. (2018) Corticosterone Production during Repeated Social Defeat Causes Monocyte Mobilization from the Bone Marrow, Glucocorticoid Resistance, and Neurovascular Adhesion Molecule Expression. *J Neurosci*, **38**, 2328-2340.

Nishi, T., Shimizu, N., Hiramoto, M., Sato, I., Yamaguchi, Y., Hasegawa, M., Aizawa, S., Tanaka, H., Kataoka, K., Watanabe, H. & Handa, H. (2002) Spatial redox regulation of a critical cysteine residue of NF-kappa B in vivo. *J Biol Chem*, **277**, 44548-44556.

Nowlin, B.T., Burdo, T.H., Midkiff, C.C., Salemi, M., Alvarez, X. & Williams, K.C. (2015) SIV encephalitis lesions are composed of CD163(+) macrophages present in the central nervous system during early SIV infection and SIV-positive macrophages recruited terminally with AIDS. *Am J Pathol*, **185**, 1649-1665.

Ohto, U., Fukase, K., Miyake, K. & Satow, Y. (2007) Crystal structures of human MD-2 and its complex with antiendotoxic lipid IVa. *Science*, **316**, 1632-1634.

Ohto, U., Yamakawa, N., Akashi-Takamura, S., Miyake, K. & Shimizu, T. (2012) Structural analyses of human Toll-like receptor 4 polymorphisms D299G and T399I. *J Biol Chem*, **287**, 40611-40617.

Olivenza, R., Moro, M.A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Fernandez, A.P., Rodrigo, J., Bosca, L. & Leza, J.C. (2000) Chronic stress induces the expression of inducible nitric oxide synthase in rat brain cortex. *J Neurochem*, **74**, 785-791.

Pacher, P., Beckman, J.S. & Liaudet, L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*, **87**, 315-424.

Padro, C.J. & Sanders, V.M. (2014) Neuroendocrine regulation of inflammation. *Semin Immunol*, **26**, 357-368.

Park, L., Uekawa, K., Garcia-Bonilla, L., Koizumi, K., Murphy, M., Pistik, R., Younkin, L., Younkin, S., Zhou, P., Carlson, G., Anrather, J. & Iadecola, C. (2017) Brain Perivascular Macrophages Initiate the Neurovascular Dysfunction of Alzheimer Abeta Peptides. *Circ Res*, **121**, 258-269.

Pavlidis, C., Ogawa, S., Kimura, A. & McEwen, B.S. (1996) Role of adrenal steroid mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in long-term potentiation in the CA1 field of hippocampal slices. *Brain Res*, **738**, 229-235.

Pedragosa, J., Salas-Perdomo, A., Gallizioli, M., Cugota, R., Miro-Mur, F., Brioso, F., Justicia, C., Perez-Asensio, F., Marquez-Kisinousky, L., Urra, X., Gieryng, A., Kaminska, B., Chamorro, A. & Planas, A.M. (2018) CNS-border associated macrophages respond to acute ischemic stroke attracting granulocytes and promoting vascular leakage. *Acta Neuropathol Commun*, **6**, 76.

Petty, F., McChesney, C. & Kramer, G. (1985) Intracortical glutamate injection produces helpless-like behavior in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, **22**, 531-533.

Piccinini, A.M. & Midwood, K.S. (2010) DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm*, **2010**.

Pires, P.W., Girgla, S.S., McClain, J.L., Kaminski, N.E., van Rooijen, N. & Dorrance, A.M. (2013) Improvement in middle cerebral artery structure and endothelial function in stroke-prone spontaneously hypertensive rats after macrophage depletion. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, **20**, 650-661.

Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S. & Seger, R. (2011) The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta*, **1813**, 1619-1633.

Polfliet, M.M., Zwijnenburg, P.J., van Furth, A.M., van der Poll, T., Dopp, E.A., Renardel de Lavalette, C., van Kesteren-Hendrikx, E.M., van Rooijen, N., Dijkstra, C.D. & van den Berg, T.K. (2001) Meningeal and perivascular macrophages of the central nervous system play a protective role during bacterial meningitis. *J Immunol*, **167**, 4644-4650.

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. & Beutler, B. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, **282**, 2085-2088.

Ponferrada, A., Caso, J.R., Alou, L., Colon, A., Sevillano, D., Moro, M.A., Lizasoain, I., Menchen, P., Gomez-Lus, M.L., Lorenzo, P., Cos, E., Leza, J.C. & Menchen, L. (2007) The role of PPARgamma on restoration of colonic homeostasis after experimental stress-induced inflammation and dysfunction. *Gastroenterology*, **132**, 1791-1803.

Popa, C., Abdollahi-Roodsaz, S., Joosten, L.A., Takahashi, N., Sprong, T., Matera, G., Liberto, M.C., Foca, A., van Deuren, M., Kullberg, B.J., van den Berg, W.B., van der Meer, J.W. & Netea, M.G. (2007) Bartonella quintana lipopolysaccharide is a natural antagonist of Toll-like receptor 4. *Infect Immun*, **75**, 4831-4837.

Prinz, M., Erny, D. & Hagemeyer, N. (2017) Ontogeny and homeostasis of CNS myeloid cells. *Nat Immunol*, **18**, 385-392.

Qin, L., Wu, X., Block, M.L., Liu, Y., Breese, G.R., Hong, J.S., Knapp, D.J. & Crews, F.T. (2007) Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*, **55**, 453-462.

Qiu, Y.H., Peng, Y.P., Jiang, J.M. & Wang, J.J. (2004) Expression of tyrosine hydroxylase in lymphocytes and effect of endogenous catecholamines on lymphocyte function. *Neuroimmunomodulation*, **11**, 75-83.

Quan, N., Avitsur, R., Stark, J.L., He, L., Lai, W., Dhabhar, F. & Sheridan, J.F. (2003) Molecular mechanisms of glucocorticoid resistance in splenocytes of socially stressed male mice. *Journal of neuroimmunology*, **137**, 51-58.

Quan, N. & Banks, W.A. (2007) Brain-immune communication pathways. *Brain Behav Immun*, **21**, 727-735.

Rachal Pugh, C., Fleshner, M., Watkins, L.R., Maier, S.F. & Rudy, J.W. (2001) The immune system and memory consolidation: a role for the cytokine IL-1beta. *Neurosci Biobehav Rev*, **25**, 29-41.

Radley, J.J., Arias, C.M. & Sawchenko, P.E. (2006) Regional differentiation of the medial prefrontal cortex in regulating adaptive responses to acute emotional stress. *J Neurosci*, **26**, 12967-12976.

Radley, J.J. & Sawchenko, P.E. (2011) A common substrate for prefrontal and hippocampal inhibition of the neuroendocrine stress response. *J Neurosci*, **31**, 9683-9695.

Raison, C.L., Capuron, L. & Miller, A.H. (2006) Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol*, **27**, 24-31.

Raison, C.L. & Miller, A.H. (2003) When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *Am J Psychiatry*, **160**, 1554-1565.

Ransohoff, R.M., Kivisakk, P. & Kidd, G. (2003) Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol*, **3**, 569-581.

Reader, B.F., Jarrett, B.L., McKim, D.B., Wohleb, E.S., Godbout, J.P. & Sheridan, J.F. (2015) Peripheral and central effects of repeated social defeat stress: monocyte trafficking, microglial activation, and anxiety. *Neuroscience*, **289**, 429-442.

Rhen, T. & Cidlowski, J.A. (2005) Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med*, **353**, 1711-1723.

Ricote, M., Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J. & Glass, C.K. (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*, **391**, 79-82.

Rivest, S., Lacroix, S., Vallieres, L., Nadeau, S., Zhang, J. & Laflamme, N. (2000) How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc Soc Exp Biol Med*, **223**, 22-38.

Rock, J.P., Oldfield, E.H., Schulte, H.M., Gold, P.W., Kornblith, P.L., Loriaux, L. & Chrousos, G.P. (1984) Corticotropin releasing factor administered into the ventricular CSF stimulates the pituitary-adrenal axis. *Brain Res*, **323**, 365-368.

Rogers, M.J., Russell, R.G.G., Blackburn, G.M., Williamson, M.P. & Watts, D.J. (1992) Metabolism of halogenated bisphosphonates by the cellular slime mould *dictyostelium discoideum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **189**, 414-423.

Rose, S., Misharin, A. & Perlman, H. (2012) A novel Ly6C/Ly6G-based strategy to analyze the mouse splenic myeloid compartment. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, **81**, 343-350.

Rossi, D.J., Oshima, T. & Attwell, D. (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature*, **403**, 316-321.

Roth, J. (2015) Who is the gatekeeper to let inflammation enter the brain? A concerted action of endothelial and perivascular cells. *Brain Behav Immun*, **48**, 29-30.

Rothwell, N.J. & Luheshi, G.N. (2000) Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci*, **23**, 618-625.

Russell, G.M., Henley, D.E., Leendertz, J., Douthwaite, J.A., Wood, S.A., Stevens, A., Woltersdorf, W.W., Peeters, B.W., Ruigt, G.S., White, A., Veldhuis, J.D. & Lightman, S.L. (2010) Rapid glucocorticoid receptor-mediated inhibition of hypothalamic-pituitary-adrenal ultradian activity in healthy males. *J Neurosci*, **30**, 6106-6115.

Russo, S.J. & Nestler, E.J. (2013) The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature reviews. Neuroscience*, **14**, 609-625.

Saijo, K. & Glass, C.K. (2011) Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol*, **11**, 775-787.

Salim, S. (2017) Oxidative Stress and the Central Nervous System. *J Pharmacol Exp Ther*, **360**, 201-205.

Samak, G., Suzuki, T., Bhargava, A. & Rao, R.K. (2010) c-Jun NH2-terminal kinase-2 mediates osmotic stress-induced tight junction disruption in the intestinal epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **299**, G572-584.

Sanacora, G., Treccani, G. & Popoli, M. (2012) Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. *Neuropharmacology*, **62**, 63-77.

Sapolsky, R.M. (1996) Why stress is bad for your brain. *Science*, **273**, 749-750.

Sapolsky, R.M. (2015) Stress and the brain: individual variability and the inverted-U. *Nat Neurosci*, **18**, 1344-1346.

Sapolsky, R.M., Krey, L.C. & McEwen, B.S. (1984) Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 6174-6177.

Sattler, R. & Tymianski, M. (2000) Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med (Berl)*, **78**, 3-13.

Sawada, A., Niiyama, Y., Ataka, K., Nagaishi, K., Yamakage, M. & Fujimiya, M. (2014) Suppression of bone marrow-derived microglia in the amygdala improves anxiety-like behavior induced by chronic partial sciatic nerve ligation in mice. *Pain*, **155**, 1762-1772.

Sawicki, C.M., McKim, D.B., Wohleb, E.S., Jarrett, B.L., Reader, B.F., Norden, D.M., Godbout, J.P. & Sheridan, J.F. (2015) Social defeat promotes a reactive endothelium in a brain region-dependent manner with increased expression of key adhesion molecules, selectins and chemokines associated with the recruitment of myeloid cells to the brain. *Neuroscience*, **302**, 151-164.

Schiltz, J.C. & Sawchenko, P.E. (2002) Distinct brain vascular cell types manifest inducible cyclooxygenase expression as a function of the strength and nature of immune insults. *J Neurosci*, **22**, 5606-5618.

Schmidt, H.D., Shelton, R.C. & Duman, R.S. (2011) Functional biomarkers of depression: diagnosis, treatment, and pathophysiology. *Neuropsychopharmacology*, **36**, 2375-2394.

Schnieder, T.P., Trencsevska, I., Rosoklija, G., Stankov, A., Mann, J.J., Smiley, J. & Dwork, A.J. (2014) Microglia of prefrontal white matter in suicide. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, **73**, 880-890.

Seckl, J.R., Dickson, K.L. & Fink, G. (1990) Central 5,7-dihydroxytryptamine lesions decrease hippocampal glucocorticoid and mineralocorticoid receptor messenger ribonucleic Acid expression. *J Neuroendocrinol*, **2**, 911-916.

Seibenhener, M.L. & Wooten, M.C. (2015) Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp*, e52434.

Seifert, H.A., Hall, A.A., Chapman, C.B., Collier, L.A., Willing, A.E. & Pennypacker, K.R. (2012) A transient decrease in spleen size following stroke corresponds to splenocyte release into systemic circulation. *J Neuroimmune Pharmacol*, **7**, 1017-1024.

Selye, H. (1976) Further thoughts on "stress without distress". *Med Times*, **104**, 124-144.

Selye, H. (1998) A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, **10**, 230-231.

Seong, S.Y. & Matzinger, P. (2004) Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol*, **4**, 469-478.

Serbina, N.V., Jia, T., Hohl, T.M. & Pamer, E.G. (2008) Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. *Annual Review of Immunology*, **26**, 421-452.

Serrats, J., Grigoleit, J.S., Alvarez-Salas, E. & Sawchenko, P.E. (2017) Pro-inflammatory immune-to-brain signaling is involved in neuroendocrine responses to acute emotional stress. *Brain Behav Immun*, **62**, 53-63.

Serrats, J., Schiltz, J.C., Garcia-Bueno, B., van Rooijen, N., Reyes, T.M. & Sawchenko, P.E. (2010) Dual roles for perivascular macrophages in immune-to-brain signaling. *Neuron*, **65**, 94-106.

Shi, C. & Pamer, E.G. (2011) Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*, **11**, 762-774.

Shie, F.S., Nivison, M., Hsu, P.C. & Montine, T.J. (2009) Modulation of microglial innate immunity in Alzheimer's disease by activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Curr Med Chem*, **16**, 643-651.

Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K. & Kimoto, M. (1999) MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med*, **189**, 1777-1782.

Shirey, K.A., Lai, W., Scott, A.J., Lipsky, M., Mistry, P., Pletneva, L.M., Karp, C.L., McAlees, J., Gioannini, T.L., Weiss, J., Chen, W.H., Ernst, R.K., Rossignol, D.P., Gusovsky, F., Blanco, J.C. & Vogel, S.N. (2013) The TLR4 antagonist Eritoran protects mice from lethal influenza infection. *Nature*, **497**, 498-502.

Sodhi, R.K., Singh, N. & Jaggi, A.S. (2011) Neuroprotective mechanisms of peroxisome proliferator-activated receptor agonists in Alzheimer's disease. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **384**, 115-124.

Sorrells, S.F., Caso, J.R., Munhoz, C.D. & Sapolsky, R.M. (2009) The stressed CNS: when glucocorticoids aggravate inflammation. *Neuron*, **64**, 33-39.

Sorrells, S.F. & Sapolsky, R.M. (2007) An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain Behav Immun*, **21**, 259-272.

Spengler, R.N., Chensue, S.W., Giacherio, D.A., Blenk, N. & Kunkel, S.L. (1994) Endogenous norepinephrine regulates tumor necrosis factor-alpha production from macrophages in vitro. *J Immunol*, **152**, 3024-3031.

Stanojevic, S., Dimitrijevic, M., Kustrimovic, N., Mitic, K., Vujic, V. & Leposavic, G. (2013) Adrenal hormone deprivation affects macrophage catecholamine metabolism and beta2-adrenoceptor density, but not propranolol stimulation of tumour necrosis factor-alpha production. *Exp Physiol*, **98**, 665-678.

Steel, C.D., Kim, W.K., Sanford, L.D., Wellman, L.L., Burnett, S., Van Rooijen, N. & Ciavarra, R.P. (2010) Distinct macrophage subpopulations regulate viral encephalitis but not viral clearance in the CNS. *Journal of neuroimmunology*, **226**, 81-92.

Sullivan, P.F., Neale, M.C. & Kendler, K.S. (2000) Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *Am J Psychiatry*, **157**, 1552-1562.

Szabo, C. (2003) Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol Lett*, **140-141**, 105-112.

Takadera, T., Yumoto, H., Tozuka, Y. & Ohyashiki, T. (2002) Prostaglandin E(2) induces caspase-dependent apoptosis in rat cortical cells. *Neurosci Lett*, **317**, 61-64.

Takaki, A., Huang, Q.H., Somogyvari-Vigh, A. & Arimura, A. (1994) Immobilization stress may increase plasma interleukin-6 via central and peripheral catecholamines. *Neuroimmunomodulation*, **1**, 335-342.

Takeda, K., Kaisho, T. & Akira, S. (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*, **21**, 335-376.

Takeuchi, O. & Akira, S. (2001) Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int Immunopharmacol*, **1**, 625-635.

Tang, S.C., Lathia, J.D., Selvaraj, P.K., Jo, D.G., Mughal, M.R., Cheng, A., Siler, D.A., Markesbery, W.R., Arumugam, T.V. & Mattson, M.P. (2008) Toll-like receptor-4 mediates neuronal apoptosis induced by amyloid beta-peptide and the membrane lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Exp Neurol*, **213**, 114-121.

Tanigawa, S., Fujii, M. & Hou, D.X. (2007) Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin. *Free Radic Biol Med*, **42**, 1690-1703.

Tobias, P.S., Soldau, K., Gegner, J.A., Mintz, D. & Ulevitch, R.J. (1995) Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. *J Biol Chem*, **270**, 10482-10488.

Tombaugh, G.C. & Sapolsky, R.M. (1992) Corticosterone accelerates hypoxia- and cyanide-induced ATP loss in cultured hippocampal astrocytes. *Brain Res*, **588**, 154-158.

Torres-Platas, S.G., Cruceanu, C., Chen, G.G., Turecki, G. & Mechawar, N. (2014) Evidence for increased microglial priming and macrophage recruitment in the dorsal anterior cingulate white matter of depressed suicides. *Brain Behav Immun*, **42**, 50-59.

Triantafilou, M., Brandenburg, K., Kusumoto, S., Fukase, K., Mackie, A., Seydel, U. & Triantafilou, K. (2004) Combinational clustering of receptors following stimulation by bacterial products determines lipopolysaccharide responses. *Biochem J*, **381**, 527-536.

Triantafilou, M., Miyake, K., Golenbock, D.T. & Triantafilou, K. (2002) Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J Cell Sci*, **115**, 2603-2611.

Tseng, R.J., Padgett, D.A., Dhabhar, F.S., Engler, H. & Sheridan, J.F. (2005) Stress-induced modulation of NK activity during influenza viral infection: role of glucocorticoids and opioids. *Brain Behav Immun*, **19**, 153-164.

Turnbull, A.V. & Rivier, C.L. (1999) Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev*, **79**, 1-71.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M. & Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **39**, 44-84.

Vallieres, L. & Rivest, S. (1999) Interleukin-6 is a needed proinflammatory cytokine in the prolonged neural activity and transcriptional activation of corticotropin-releasing factor during endotoxemia. *Endocrinology*, **140**, 3890-3903.

Van Rooijen, N. & Sanders, A. (1994) Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods*, **174**, 83-93.

Vasilache, A.M., Qian, H. & Blomqvist, A. (2015) Immune challenge by intraperitoneal administration of lipopolysaccharide directs gene expression in distinct blood-brain barrier cells toward enhanced prostaglandin E(2) signaling. *Brain Behav Immun*, **48**, 31-41.

Wang, C.X. & Shuaib, A. (2002) Involvement of inflammatory cytokines in central nervous system injury. *Prog Neurobiol*, **67**, 161-172.

Weber, M.D., Godbout, J.P. & Sheridan, J.F. (2017) Repeated Social Defeat, Neuroinflammation, and Behavior: Monocytes Carry the Signal. *Neuropsychopharmacology*, **42**, 46-61.

Wickens, R.A., Ver Donck, L., MacKenzie, A.B. & Bailey, S.J. (2017) Repeated daily administration of increasing doses of lipopolysaccharide provides a model of sustained inflammation-induced depressive-like behaviour in mice that is independent of the NLRP3 inflammasome. *Behav Brain Res*.

Williams, K., Alvarez, X. & Lackner, A.A. (2001a) Central nervous system perivascular cells are immunoregulatory cells that connect the CNS with the peripheral immune system. *Glia*, **36**, 156-164.

Williams, K.C., Corey, S., Westmoreland, S.V., Pauley, D., Knight, H., deBakker, C., Alvarez, X. & Lackner, A.A. (2001b) Perivascular macrophages are the primary cell type productively infected by simian immunodeficiency virus in the brains of macaques: implications for the neuropathogenesis of AIDS. *J Exp Med*, **193**, 905-915.

Williams, K.C. & Hickey, W.F. (2002) Central nervous system damage, monocytes and macrophages, and neurological disorders in AIDS. *Annu Rev Neurosci*, **25**, 537-562.

Willner, P. (1997) Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)*, **134**, 319-329.

Wilson, M.A. (2011) The Role of Cysteine Oxidation in DJ-1 Function and Dysfunction. *Antioxid Redox Signal*, **15**, 111-122.

Winklewski, P.J., Radkowski, M., Wszedybyl-Winklewska, M. & Demkow, U. (2017) Stress Response, Brain Noradrenergic System and Cognition. *Adv Exp Med Biol*, **980**, 67-74.

Wohleb, E.S., Fenn, A.M., Pacenti, A.M., Powell, N.D., Sheridan, J.F. & Godbout, J.P. (2012) Peripheral innate immune challenge exaggerated microglia activation, increased the number of inflammatory CNS macrophages, and prolonged social withdrawal in socially defeated mice. *Psychoneuroendocrinology*, **37**, 1491-1505.

Wohleb, E.S., Hanke, M.L., Corona, A.W., Powell, N.D., Stiner, L.M., Bailey, M.T., Nelson, R.J., Godbout, J.P. & Sheridan, J.F. (2011) beta-Adrenergic receptor antagonism prevents anxiety-like behavior and microglial reactivity induced by repeated social defeat. *J Neurosci*, **31**, 6277-6288.

Wohleb, E.S., McKim, D.B., Shea, D.T., Powell, N.D., Tarr, A.J., Sheridan, J.F. & Godbout, J.P. (2014a) Re-establishment of anxiety in stress-sensitized mice is caused by monocyte trafficking from the spleen to the brain. *Biol Psychiatry*, **75**, 970-981.

Wohleb, E.S., McKim, D.B., Sheridan, J.F. & Godbout, J.P. (2014b) Monocyte trafficking to the brain with stress and inflammation: a novel axis of immune-to-brain communication that influences mood and behavior. *Frontiers in neuroscience*, **8**, 447.

Wohleb, E.S., Powell, N.D., Godbout, J.P. & Sheridan, J.F. (2013) Stress-induced recruitment of bone marrow-derived monocytes to the brain promotes anxiety-like behavior. *J Neurosci*, **33**, 13820-13833. Yamagata, K., Andreasson, K.I., Kaufmann, W.E., Barnes, C.A. & Worley, P.F. (1993) Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron*, **11**, 371-386.

Zhang, J.C., Wu, J., Fujita, Y., Yao, W., Ren, Q., Yang, C., Li, S.X., Shirayama, Y. & Hashimoto, K. (2014) Antidepressant effects of TrkB ligands on depression-like behavior and dendritic changes in mice after inflammation. *Int J Neuropsychopharmacol*, **18**.

Zhang, X., Tang, X., Liu, K., Hamblin, M.H. & Yin, K.J. (2017) Long Noncoding RNA Malat1 Regulates Cerebrovascular Pathologies in Ischemic Stroke. *J Neurosci*, **37**, 1797-1806.

Zhang, Z., Zhang, Z.Y., Schittenhelm, J., Wu, Y., Meyermann, R. & Schluesener, H.J. (2011) Parenchymal accumulation of CD163+ macrophages/microglia in multiple sclerosis brains. *Journal of neuroimmunology*, **237**, 73-79.

Zhang, Z., Zhang, Z.Y., Wu, Y. & Schluesener, H.J. (2012) Lesional accumulation of CD163+ macrophages/microglia in rat traumatic brain injury. *Brain Res*, **1461**, 102-110.

Zhou, H., Andonegui, G., Wong, C.H. & Kubes, P. (2009) Role of endothelial TLR4 for neutrophil recruitment into central nervous system microvessels in systemic inflammation. *J Immunol*, **183**, 5244-5250.

Zink, M., Vollmayr, B., Gebicke-Haerter, P.J. & Henn, F.A. (2010) Reduced expression of glutamate transporters vGluT1, EAAT2 and EAAT4 in learned helpless rats, an animal model of depression. *Neuropharmacology*, **58**, 465-473.