RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes

Universidad
Nacional
de Quilmes

Albite, Romina Débora

Alteraciones cerebrales y cognitivas en un modelo de estrés quirúrgico en ratas : expresión diferencial de genes y cambios cognitivos

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:
Albite, R. (2018). Alteraciones cerebrales y cognitivas en un modelo de estrés quirúrgico en ratas : expresión diferencial de genes y cambios cognitivos. (Tesis de doctorado). Bernal, Argentina : Universidad Nacional de Quilmes. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/864

Puede encontrar éste y otros documentos en: https://ridaa.unq.edu.ar

Universidad
Nacional
de Quilmes

Roque Sáenz Peña 352 // Bernal
Buenos Aires // Argentina
t.: (+41 11) 4365 7100
f.: (+54 11) 4365 7101
info@unq.edu.ar

Albite, Romina Débora, Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto,
Noviembre del 2015, 214 pp,
http://ridaa.unq.edu.ar,
Universidad Nacional de Quilmes, Secretaría de Posgrado,
Doctorado en Ciencia y Tecnología

Alteraciones cerebrales y cognitivas en un modelo de estrés quirúrgico en ratas: expresión diferencial de genes y cambios cognitivos

TESIS DOCTORAL

Romina Débora Albite

romina.albite@gmail.com

Resumen

Actualmente definimos estrés a cualquier condición que perturbe el equilibrio del organismo (homeostasis), sin embargo este término fue tomado inicialmente de la física por uno de los pioneros en la investigación en estrés, Hans Selye en los años 20. De aquellos primeros pasos llegamos a nuestros días con el reconocimiento de nuevas formas particulares de estrés. Una de ellas es el estrés producido durante los procedimientos quirúrgicos. En ellos se ha podido establecer que se desencadenan múltiples respuestas en los pacientes responsables de afectar procesos íntimamente relacionados con la memoria y el aprendizaje como son la activación del eje Hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) con el consiguiente aumento en los niveles de cortisol, modulador de mediadores inflamatorios como la IL1 e IL6 entre otros.

El cerebro humano cuenta con varias estructuras conocidas con un rol importante en el desarrollo de una respuesta al estrés, como lo son la corteza prefrontal, la amígdala y el hipocampo y el hipotálamo. Este último presenta una actividad directa en la inactivación del eje HPA y así en la regulación de la liberación de corticoesteroides.

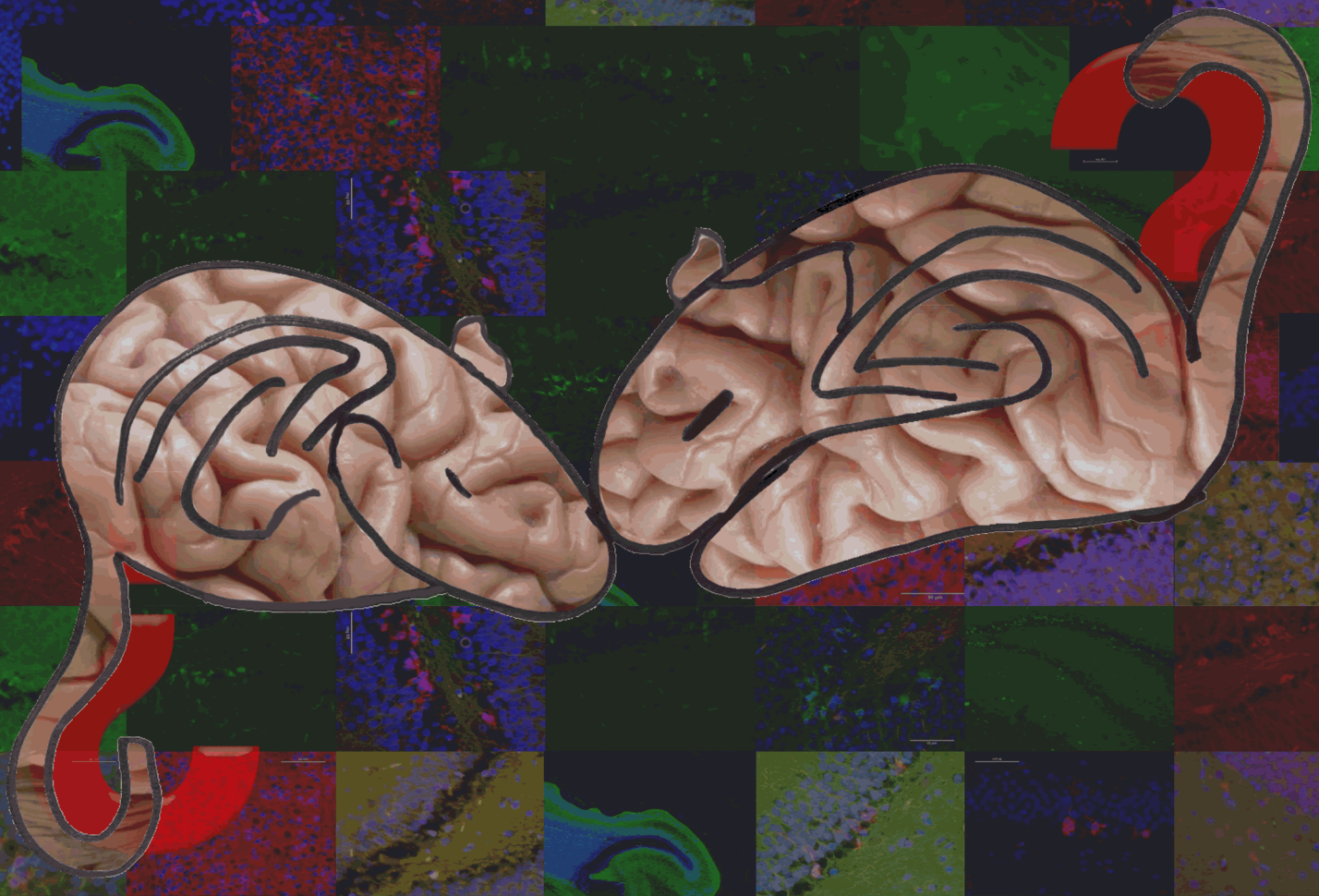
Los corticoides son de conocida acción moduladora de la respuesta inflamatoria e inmune y del estrés a través de sus receptores para mineralocorticoides y glucocorticoides; ejercen su acción de retroalimentación negativa a nivel hipofisario, se ajustan a sí mismos y actúan sobre el mismo hipotálamo para adecuar parámetros neuroendocrinos con los consecuentes cambios en volumen, neurogénesis y expresión en moléculas neurales.

Si bien es reconocido que procedimientos como el quirúrgico pueden traer aparejado cambios por el estrés, nuestro objetivo fue evaluar y comparar como influenciaba la severidad y complejidad de la intervención quirúrgica. Nuestro desarrollo se funda en que cada día, en consonancia con los avances médicos, el ser humano está más sometido a diferentes tipos de cirugías y al impacto que generan. Nuestro ánimo entonces fue tratar de comprender los mecanismos con el fin último de que se puedan generar estrategias o mecanismos para minimizar sus consecuencias. Lo hallado a lo largo de esta tesis fue que los fenómenos relacionados con el estrés podrían ocasionar alteraciones a nivel cognitivo cuyo correlato neuronal podría estar mediado por procesos inflamatorios cerebrales actuando sobre la neuroplasticidad mediada en parte por mecanismos neurogenéticos.

TESIS DOCTORAL

ALTERACIONES CEREBRALES Y COGNITIVAS EN UN MODELO DE ESTRÉS QUIRÚRGICO EN RATAS: EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES Y CAMBIOS COGNITIVOS.

Autor: Lic. Romina D. Albite
Director: Dr. Pablo F. Argibay
Co-Director: Dr. Mariano Gabri



Universidad Nacional de Quilmes

AÑO: 2015

Agradecimientos

- Al apoyo, la paciencia, el ánimo que dedicaron los doctores Pablo Argibay, Mariano Gabri y Diego Golombek, por estar presentes y colaborar desde sus puntos de vista al desarrollo y finalización de esta tesis.
- A mis amigos del ICBME que me acompañaron y apoyaron estos años en especial a Mónica Loresi, Maximiliano Dádamo, Santiago Hem, Alejandra Hidalgo, y a Gustavo Villoldo por escucharme, aconsejarme y guiarme; a Lucas Costa por su ayuda con la estadística; a Mariana Ríos y a Marcos Ojea Quintana por su colaboración con los test conductuales y sus valoradas opiniones, a Sabrina Bassi y a Carla Sesarini que se ocuparon de brindarme su tiempo para el entrenamiento en las técnicas moleculares, a Adriana Rinflerch y Valeria Burgos que me brindaron sus conocimiento con la parte de proteínas, a Graciela Dabrowski a Emiliana Herrero por su ayuda con el manejo y cuidado de los animales, a los médicos que hicieron las cirugías, a ellos y a cada uno de mis compañeros que colaboraron activamente en el desarrollo de esta tesis.
- A mis amigas de la vida, mis hermanas porque a pesar de todo siguen ahí firmes.
- A mi familia por estar ahí, en especial a vos mamá.
- A vos Diego, pieza esencial de mi vida, gracias por estar siempre, ser mi apoyo y mi compañero de vida.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

INDICE

Introducción 7

Estrés 8

Estrés quirúrgico 9

Estrés en el sistema inmune. Citoquinas 10

La interleuquina 1 (IL-1) 11

Interleuquina 6 (IL-6) 12

TNF α 13

Estrés en el sistema nervioso 14

Corticosteroides como mediadores del estrés 15

Neurogénesis 16

Zonas neurogénicas en el cerebro de la rata adulta 17

Zona subventricular de los ventrículos 17

Zona subgranular del giro dentado 17

Anatomía del hipocampo en la rata adulta 18

Anatomía del giro dentado en la rata adulta 19

Neurogénesis, estrés y expresión de factores. 20

Objetivos 23

Objetivo General: 24

Objetivos Particulares: 24

Materiales y Métodos 26

Subgrupo de Biología molecular 28

Subgrupo de evaluación cognitiva: 31

Subgrupo inmunohistoquímica....33
Controles experimentales....35
Resultados....36
Real time y Western Blot....37
Resultados Inmunohistoquímica:....57
Discusión....62
Resultados de PCR en tiempo real y Western Blot....63
Inmuniohistoquímica....67
Conclusión....68

Abreviaturas

HPA: Eje Hipotálamo Pituitario Adrenal

IL1: Interleuquina 1

IL6: Interleuquina 6

TNF α: Factor de Necrosis Tumoral

NK: Células Natural Killer

NF κβ: Familia de factores de trascripción

MR: Receptor de Minerocorticoide

GR: Receptor de Glucocorticoide

CRH: Hormona liberadora de Corticotrofina

ACTH: Corticotrofina

MR: Receptor Minerocorticoide

GR: Receptor Glucocorticoide

BrdU: Bromodeoxiuridina

PCNA: Antígeno Nuclear de Células en Proliferación

KI67: Factor de proliferación celular

ZSV: Zona subventricular

ZGS: Zona subgranular

GD: Giro Dentado

CA: Cuerno de Amón

BDNF: Factor Neurotrófico Derivado de cerebro

SHH: Sonic Hedhehog

Ptc: Receptor Patched

Smo; Receptor Smoothed

DCX: Doblecortina

SERT: Transportador de Serotonina

ANOVA: Análisis operativo de la varianza

ARN: Ácido Ribonucleico

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

PVDF: Fluoruro de polivinilideno

HRP: Peroxidasa del rábano (horseradish peroxidase)

DAB: Diaminobenzidina

EPI: Índice de preferencia exploratoria

ICBME: Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental

PBS: Tampón fosfato salino

Hoescht: Colorante fluorescente de ADN

CD34: Designación de un tipo de proteína Complejo de Diferenciación

GFAP: Proteína fibrilar acídica de la glia

MEDIA: Medida de tendencia central

DE: Desvío Estándar

EE: Error Estándar

N: Número

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Introducción

“Sin estrés estaríamos muertos” Hans Seyle

Estrés

El término **estrés** encuentra su origen en el año 1867 con Claude Bernard para designar que “cambios externos en el ambiente pueden perturbar el organismo y que una de las principales características de los seres vivos reside en poder mantener la estabilidad de su medio interno aun cuando se modifiquen las condiciones del medio externo” (Bernard et al 1859). Recién 1922 Cannon propone el término “homeostasia” para designar los procesos fisiológicos que mantienen constante el medio interno (Cannon et al 1930). Y en el año 1936 Hans Seyle introduce el concepto de estrés en la salud para designar la respuesta general del organismo a un peligro o demanda aumentada. (Seyle et al 1936).

En la actualidad el termino **estrés** queda definido como cualquier condición que perturba la homeostasis lo que ocasiona alteraciones en diversos sistemas fisiológicos, incluyendo el sistema inmune y las distintas fases de la respuesta inflamatoria (De Kloet *et al* 2005; Goshen *et al* 2009; Neveu *et al* 2000), como así también en ciertas funciones cerebrales y psicológicos. (Kim et al 2002).

Estrés quirúrgico

La cirugía es una forma de estrés que desencadena diversas respuestas fisiológicas; hormonales, metabólicas e inmunes que afectan la homeostasis (Valladares 2000; Nakamura 2003). Dentro de estas múltiples respuestas luego de la cirugía se ha observado que algunos pacientes presentan deficiencias cognitivas como pérdida de la memoria, cambios en la función intelectual y del comportamiento (Forget et al 2002, Salmon et al 1992, Rayevsky et al 1990).

Las heridas quirúrgicas desencadenan cambios endocrinos y metabólicos que activan el eje HPA (Lykkegaard 2005) activando el sistema inmunológico y la secreción de la hormona neuroendocrina cortisol luego de la cirugía (Di Padova et al 1991; Derenzo et al 2005; Gogenur et al 2007) produciendo una respuesta inflamatoria (Desborlough 2000) lo que demuestra que la magnitud de las heridas tienen una relación directa con la respuesta del organismo.

El estrés quirúrgico ocasionado por una cirugía menor tendría una respuesta del organismo menos exagerada que la ocasionada por una cirugía mayor, ya que el primero estimularía sólo algunos componentes del sistema inmune y por lo tanto volvería antes a valores basales al organismo; mientras que el segundo podría generar inmunosupresión (Romeo 2002; Hensler 1997), la cual es posible que comience durante la cirugía (Kawasaki 2007) y entonces el organismo tarde mucho mas tiempo en restaurar dichos valores (Ramírez 2003).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Estrés en el sistema inmune. Citoquinas

Las citoquinas actúan como mensajeros en la comunicación celular. Son proteínas de bajo peso molecular (15-25 KDa) secretadas transitoriamente por células del sistema inmune, células vasculares endoteliales, astrocitos y microglia del SNC e incluso por algunas neuronas (Felten *et al* 2000; Becher *et al* 1998) que tienen efectos paracrinos (actuando sobre una célula distinta a la secretora) y autocrinos (reconociendo un receptor en la membrana de la propia célula que la secreto).

Las citoquinas comparten propiedades comunes, tienen una vida media corta, muestran la capacidad de regular distintas funciones, tienen sinergia, antagonismo e inducción en cascada (Goldsby et al 2004). También pueden provocar aumentos en los niveles sanguíneos de glucocorticoides, al mismo tiempo que se incrementa el pico de la respuesta inmune de muchos antígenos.

Las citoquinas que desempeñan un rol relevante frente al estrés quirúrgico y que desarrollaremos a lo largo de este estudio son: IL1, IL6 y TNFα. (Angele et al 2005; Hildebrand et al 2005).

Se ha observado que IL-6 y TNFα aumentan en el suero de los pacientes luego de la intervención (Hoch *et al* 1993 ; Sakamoto *et al* 1994; Shapira-Litcher et al 2008) y que IL1 (Meduri *et al* 1995) contribuye a la respuesta que aparece tras el trauma quirúrgico, sugiriendo que los niveles de estas son correlacionables con la severidad y duración de la operación y que se podrían utilizar como predictor de las complicaciones postoperatorias (Buyukkocak 2005, Sato 2002; Ordemann et al 2001; Di Padova et al 1991; Ohzato et al 1992).

TNF α e IL1 son los iniciadores de la cascada inflamatoria (Kuo *et al* 2006) en la que participan numerosas citoquinas y que se relacionan con los efectos deletéreos de la respuesta inflamatoria sistémica. Mientras que IL6 en cambio se produce en respuesta a estas 2 citoquinas. Los niveles circulantes de IL6 parecen ser proporcionales a la extensión de la agresión quirúrgica (Choileain *et al* 2006)

La interleuquina 1 (IL-1)

IL1 (Dinarello 1991; Dinarello 1996) ocupa un lugar muy importante en la cascada de las citoquinas y por esto suele ser el blanco a bloquear por los fármacos.

La expresión de esta interleuquina en el cerebro en mínima, en general aumenta como producto de la activación de la microglia o porque el sistema inmune la recluta (Fogal *et al* 2008).

La actividad de esta interleuquina esta mediada por las isoformas **IL1 α** y **IL1 β**. Cada una de esta tiene diferentes mecanismos de acción y estados de bioactividad (cualquier respuesta o reacción del tejido vivo). Aunque solamente tienen 25 % de homología en su secuencia aminoacídica (Re *et al* 1994) comparten el mismo receptor y ejercen efectos biológicos similares.

IL1 α tiene bioactividad como precursor y IL1 β no es bioactiva; el mecanismo de acción de IL1 α es a través de la unión a membranas mientras que IL1 β queda retenida en el citosol después de sintetizarse y actúa desde ahí.

La principal función de esta citoquina es mediar la respuesta inflamatoria frente a infecciones y a otros estímulos inflamatorios. Actúa con TNF en la inmunidad innata (mecanismos de defensa mas elementales en vertebrados) y en la inflamación.

Los efectos biológicos de IL1, dependen de la cantidad de citoquina producida. A bajas concentraciones, IL1 media inflamación local (Luster 1998) y a altas concentraciones, IL1 entra en circulación y ejerce efectos endocrinos (Mantovani *et al* 1997).

Interleuquina 6 (IL-6)

IL6 (Gabay 2006) es una citoquina de bajo peso molecular (26 KDa) cuya principal función biológica es estimular la función inmunitaria. IL6 posee una función primordialmente pro inflamatoria ya que promueve la liberación de glucocorticoides (Ruzeck *et al* 1997).

IL6 es liberada por diversos tipos celulares; monocitos, fibroblastos y células endoteliales como respuesta a agresiones, a agentes infecciosos y a otras citoquinas. En el cerebro es expresada tanto por neuronas como por glia, pero en condiciones patológicas su expresión se incrementa dramáticamente (Loddick *et al* 1998).

Varios estudios demostraron que los niveles elevados de IL6 están asociados con estrés y depresión en humanos (Maes *et al* 1997; Maes *et al* 1998) y este ascenso es paralelo al incremento de la corticosterona (Zhou *et al* 1993). De esta manera estos resultados podrían sugerir que IL6, entre otras citoquinas proinflamatorias, juegan un rol en la activación del eje HPA en respuesta al estrés quirúrgico.

TNF α

TNF α es una citoquina pro inflamatoria de secreción que se produce en una gran variedad de células como macrófagos en respuesta al daño tisular (Bazzoni et al 1996; Choy et al 2001), en linfocitos, células NK, astrocitos y células de la microglia bajo estimulación con endotoxinas y en mediadores de la inflamación, como IL1, bajo estimulación con el propio TNF α (Camussi et al 1991). Existen dos tipo de receptores para TNF α, R1 y R2, esta citoquina estimula la fase aguda de la respuesta inflamatoria mediada por su receptor R2 con la capacidad adicional de inducir apoptosis de algunos tipos celulares (Wajant et al 2003) a través de la activación de NFκβ (grupo de factores de trascripción que están involucrados en la activación transcripcional de un gran numero de genes inflamatorios en respuesta a las citoquinas) por unión a su receptor R1.

TNF α es sintetizado como una proteína que se inserta en la membrana formando homotrímeros (3 subunidades de monómeros exactamente iguales). La enzima convertidora de TNF α, es una metaloproteasa que cliva la forma unida a membrana para dar lugar a la forma soluble. Tanto la forma trimérica unida a membrana como el trímero soluble son biológicamente activos.

TNF ejerce distintas funciones en diferentes órganos, entre ellas la activación de la producción de otros mediadores como las interleuquinas IL1 a IL6, es un agente antitumoral (Decker et al 1987; Feinman et al 1987), neovascularizante y estimulante de la resorción ósea.

Estrés en el sistema nervioso

El cerebro es a la vez efector y blanco de los fenómenos de estrés. Se ha asignado un rol preponderante en la respuesta al estrés a ciertas estructuras cerebrales (Figura 1): la corteza prefrontal y la amígdala (Wellman 2001; Vyas *et al* 2002; Radley *et al* 2004), el hipotálamo y el hipocampo (Conrad *et al* 1996; Mc Ewen 1999; Czéh *et al* 2001). Este último es una de las estructuras cerebrales más afectada por el estrés.

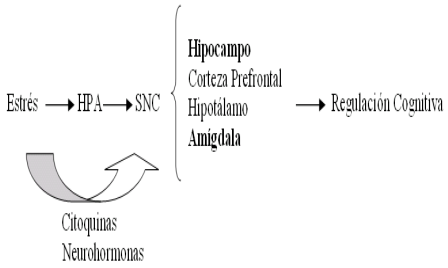


Figura 1: Potencial interacción entre el estrés y los cambios cognitivos.

Entre los cambios hipocampales debidos al estrés, se destacan las alteraciones en la plasticidad sináptica (Kim *et al* 1996; Maggio et al 2010; Foy 2011; Maggio *et al* 2013), la morfología dendrítica (Watanabe *et al* 1992; Mc Ewen 2000) y la neurogénesis (Gould et al 1999; Mirescu 2006; Zinder *et al* 2011), procesos que se encuentran íntimamente relacionados con la memoria y el aprendizaje. (Newcomer *et al* 1994, Escobar *et al* 2006, van Stegeren 2009; Spasojevic *et al* 2013; Fraga *et al* 2014; Gómes *et al* 2014).

El mecanismo biológico que se activa frente a una situación de estrés se inicia en la amígdala, la cual interviene en el procesamiento del miedo y la ansiedad. Esta estructura estimula la producción de CRH en el hipotálamo, hormona que activa en la hipófisis la síntesis de ACTH, que a su vez estimula a la corteza adrenal a secretar cortisol (humanos) y/o corticosterona (humanos, ratas y ratón) (Kasiwabara 2007, Jameson 1997, Dekeyser 2000). En el hipocampo, esta hormona afecta el nacimiento y la muerte de nuevas neuronas durante el desarrollo (Gould *et al* 1991), la morfología (Watanabe *et al* 1992) y la fisiología (Joels

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

et al 1994) de las neuronas. Probablemente como resultado de estos efectos el aprendizaje y la memoria (Sandi *et al* 1997) se verían afectados.

Corticosteroides como mediadores del estrés

Una de las principales funciones de los corticoides es modular la respuesta inmune e inflamatoria y los mecanismos de adaptación al estrés. Operan a través de sus receptores, MR de alta afinidad y el GR, de baja afinidad, los cuales son co-expresados abundantemente en neuronas del sistema límbico, particularmente en el hipocampo. (Sistema límbico es un sistema formado por varias estructuras cerebrales; hipocampo, hipotálamo, hipófisis; que gestionan respuestas fisiológicas ante estímulos emocionales) (De Kloet et al 2003 y 2005) Los niveles de glucocorticoides ejercen un *feedback* negativo (inhibitorio) (Kim et al 1998) a nivel de la hipófisis y el hipocampo con el fin de regularizar los parámetros neuroendocrinos (Akil et al 1995; Delbende et al 1992; Swaab et al 2005 Weidenfeld et al 1898; Miller et al 1999; Keller-Wood et al 1984; Jacobson et al 1991).

Frente a una situación de estrés, la amígdala participa en la activación del eje HPA (Charney et al 1998), mientras que finalizado el evento estresor, el hipocampo es el encargado de la inactivación del eje.

En situaciones de estrés se produce una hiperactividad del eje, liberándose a circulación sanguínea más CRF y ACTH, dando lugar a mayor concentración de corticoides (Mairesse *et al* 2007). En estas condiciones el *feedback* negativo resulta ineficiente y se produce una activación continua del eje (Weinstock 1997)

Existe una importante relación entre los niveles alto de corticoides y enfermedades con atrofia del hipocampo (Landfield *et al* 1978; Sapolsky *et al* 1986; Mc Ewen 1999b; Miller *et al* 2005), lo que conlleva a una mayor muerte neuronal y a una disminución de la neurogenesis.

Neurogénesis

Como neurogénesis adulta se conoce al proceso de formación de nuevas neuronas en el cerebro adulto, que comprende desde las señales que inducen la división de la célula precursora hasta su diferenciación y su establecimiento definitivo como una nueva neurona funcional. La neurogénesis entonces comprende varios procesos: proliferación, migración, diferenciación, maduración y supervivencia celular.

El sistema nervioso tiene un poder de generación limitado. El dogma clásico determinaba que la neurogénesis solo ocurría en las etapas más tempranas del desarrollo embrionario y que la población neuronal adulta no podía ser reemplazada (Ramón y Cajal *et al* 1914). La heterogeneidad celular y la complejidad del sistema nervioso parecían explicar la ausencia del recambio neuronal en el cerebro adulto.

En 1960, el uso de la timidina tritiada y las técnicas autorradiograficas permitieron la detección de células en fase de síntesis de ADN en tejido nervioso de animales adultos. Los primeros trabajos de Altman indicaron la existencia de neurogenesis en el bulbo olfatorio y formación del hipocampo (Altman 1962; Altman 1963). Estas afirmaciones fueron corroboradas por Kaplan que combinaba las técnicas autorradiograficas con la microscopia electrónica (Kaplan *et al* 1977; Kaplan *et al* 1985)

Pasaron algo más de 20 años para que el grupo de Nottebohm impulsara el conocimiento de la neurogénesis con los estudios en canarios (Goldman *et al* 1983; Paton *et al* 1984). Ya en la década del 90, se empezó a derrumbar el dogma clásico y se empezó a aceptar la existencia de la neurogénesis en el cerebro adulto (Cameron *et al* 1993; Kuhn *et al* 1996).

Para estos descubrimientos fue clave la incorporación de la BrdU, molécula que se incorpora al ADN de células en proliferación. Más recientemente se han empezado a utilizar anticuerpos que detectan por inmunohistoquímica antígenos de proliferación celular (PCNA, Ki 67).

Zonas neurogénicas en el cerebro de la rata adulta

La presencia de células madre en el cerebro se ha descrito en varias zonas como el estriado, neocorteza y cuerpo calloso (Palmer *et al* 1995). En el cerebro adulto la presencia de células madre de origen neuronal se divide en 2 zonas: la zona ZSV de los ventrículos y a la zona ZSG del giro dentado del hipocampo.

Zona subventricular de los ventrículos

Las células generadas en esta zona migran al bulbo olfatorio para luego ir a la capa granular y periglomerular para diferenciarse a neuronas GABAérgigas granulares y periglomerulares (Winner *et al* 2002).

En la ZSV también se originan células gliales que se destinan a diferentes regiones cerebrales.

Zona subgranular del giro dentado

En esta zona se generan neuroblastos que migran hasta integrarse a la capa granular del giro dentado donde extienden procesos y se diferencian a neuronas granulares (Christie *et al* 2006). En esta región a diferencia de la ZSV se produce escasa glia (Cameron *et al* 1993).

Giro dentado

El GD esta formado por el Cuerno de Amón o hipocampo propiamente dicho y el subículo. Estas estructuras presentan una única capa de somas neuronales densamente empaquetados entre dos capas de células dispersas (Ramón y Cajal, 1911). La corteza entorrinal adyacente recibe aferencias de las cortezas asociativas y es la fuente de la mayoría de las aferencias que recibe el hipocampo. La formación de esta estructura presenta una gran plasticidad estructural y funcional y está implicada en muchos procesos neurales, en particular el aprendizaje y la memoria.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Anatomía del hipocampo en la rata adulta

La capa principal del hipocampo es la capa de células piramidales. Esta capa agrupa los somas de las neuronas piramidales excitatorias y se subdivide en 4 regiones: CA3 y CA1 son las más importantes, CA2 es más pequeña y se sitúa entre ellas y CA4 está incluida en el hilio del GD. Estas regiones presentan diferencias en el tamaño celular y el patrón de conectividad. Las neuronas de CA1 tienen somas más pequeños y están más empaquetadas. En CA1 y CA2, las neuronas piramidales carecen de las espinas dendríticas típicas de CA3 y de sus aferencias musgosas.

Los otros estratos son el lacunosum-moleculare (continuación de la capa molecular de la corteza entorrinal), el radiatum (que aloja las dendritas apicales de las neuronas piramidales), el lucidum (sólo presente en CA3), el oriens (que contiene los axones de las neuronas piramidales) y el álveo, en el que se reúnen los axones de las neuronas piramidales hacia la fimbria.

Las dendritas apicales de las neuronas piramidales de CA3 reciben las fibras musgosas y sus axones proyectan por un lado al álveo y por otro a las dendritas apicales de CA1 mediante las colaterales de Schaffer. Los axones de CA1 también se bifurcan y proyectan al álveo (hacia el hipotálamo) y al subículo. Las neuronas del subículo proyectan la información de vuelta a la corteza entorrinal, pero a neuronas de distintas capas de las que partió la vía perforante.

En la capa piramidal y en el stratum oriens se encuentran la mayoría de las células en cesto y candelabro. Estas células son interneuronas inhibitorias GABAérgicas que están implicadas en la modulación de la actividad eferente en las neuronas piramidales.

Las capas de células no piramidales del hipocampo contienen un número pequeño de neuronas. Estas neuronas tienen somas con diferentes morfologías y presentan distintos patrones de arborización dendrítica y axonal (Ramón y Cajal, 1905).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Anatomía del giro dentado en la rata adulta

La capa celular principal del GD es la capa de células granulares. Estas se disponen en una lámina intermedia cuyas dendritas apicales se orientan hacia la capa superficial (molecular) y sus axones hacia la capa más profunda (polimórfica o hilio). En la capa de células granulares se pueden distinguir una hoja dorsal o suprapiramidal y una ventral o infrapiramidal, con respecto a la situación de las neuronas piramidales (Figura 2).

Las células granulares reciben aferencias de la corteza entorrinal que alcanzan las dendritas apicales en la capa molecular. Los axones de las células granulares abandonan el GD a través del hilio y de CA4 y se extienden hasta CA3 atravesando el estrato lúcido. Son axones altamente ramificados y se denominan fibras musgosas. Las fibras musgosas forman sinapsis complejas con las espinas especiales, largas y muy ramificadas de las células piramidales de CA3.

En el borde interno de la capa granular también se localizan células en cesto. Estas células presentan un axón muy ramificado y confinado a la capa granular y son capaces de inhibir simultáneamente un elevado número de células granulares. En la capa molecular y en el hilio también se encuentran varios subtipos de interneuronas GABAérgicas.

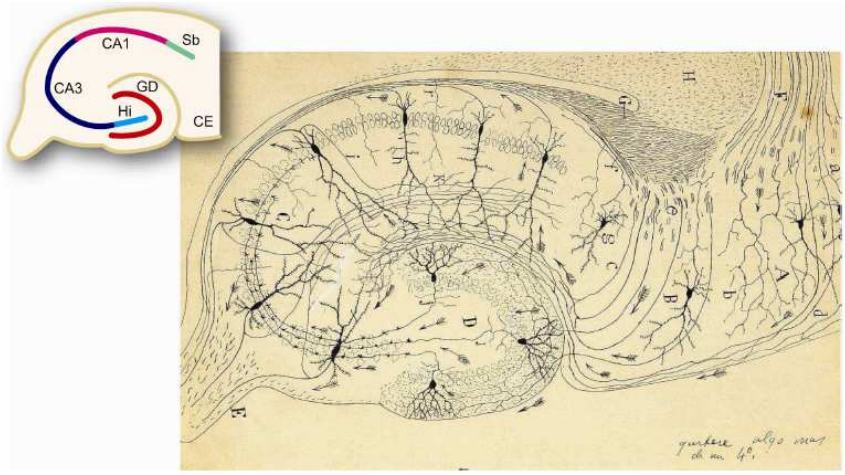


Fig 2: El hipocampo y sus regiones: En pequeño, esquema de las regiones: CE, Corteza Entorrinal; GD, Giro Dentado; H, Hilio; CA1-CA3, Regiones del Hipocampo; Sb, Subículo. En grande, dibujo esquemático del hipocampo y sus principales proyecciones (Ramón y Cajal 1911). Las flechas indican la dirección de las conexiones.

Neurogénesis, estrés y expresión de factores.

El estrés suprime la neurogénesis adulta e interfiere tanto en los estadios de renovación como en la supervivencia y proliferación neuronal (Czeh et al 2001, Mirescu et al 2006, Oomen et al 2007, Wong et al 2004, Fink 2010). Además reduce la expresión de factores de crecimiento y neurotróficos que influyen en la neurogénesis.

Entre los factores mas afectados se encuentra **BDNF** que actúa promoviendo la generación de nuevas neuronas (Mattson et al 2004), y también protege a las existentes y promueve la plasticidad sináptica. (Modie 2003, Tolwani et al 2002). Disminuye cuando disminuye la neurogénesis (Lucassen et al), ya que la activación de los receptores de MR y GR por la presencia de corticosterona reprimen la actividad transcripcional del promotor de BDNF (Schaaf et al 1999). La regulación de la expresión de BDNF en el hipocampo esta mediado el receptor MR (Chao *et al* 1998) mientras que en el giro dentado la expresión esta mediada por el receptor GR (Chao et al 1998) en cooperación con MR.

Los factores de transcripción de MR y GR, podrían ejercer efectos directamente en la región promotora de BDNF. La transrepresión que ocurre vía interacción MR y/o GR es a través otros factores de transcripción como AP1 (Jonat *et al* 1990) y CREB (Imai *et al* 1993).

Existe también afectación de ciertas proteínas presentes en el hipocampo, involucradas en la neurogénesis como **Noggin** (Hogan 1996, Melher *et al* 1997) y **SHH** (Agathocleous *et al* 2007, Bhardwaj *et al* 2001, Cai *et al* 2008, Kondo *et al* 2005, Palma *et al* 2004, Zhou *et al* 2006). **Noggin** actúa promoviendo la generación de nuevas neuronas y **SHH** está relacionada con la etapa de proliferación celular. La vía de señalización de esta ultima ocurre a través de sus receptores **Ptc** (Stone *et al* 1996) y **Smo** (van den Heuvel *et al* 1996). Las células que responden a SHH regulan positivamente la expresión de las proteínas **Gli** (factor de transcripción). Son tres las proteínas Gli que participan en la mediación de la señal SHH. Estas actúan de manera combinada: **Gli1** y Gli2 tienen efecto activante mientras que Gli3 antagoniza la función de SHH-Gli1, aunque existe evidencia de que Gli 2 y Gli 3 podrían actuar de la manera inversa (Ruiz i Altaba 1999, Lee *et al* 1997, Hynes *et al* 1997, Ruiz i Altaba 2007, Mo *et al* 1997, Aza-Blanc *et al* 2000, Litingtung *et al* 2000). También se ve afectada la expresión de varias proteínas entre ellas **Beta III**

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Tubulina, de aparición temprana en la diferenciación neuronal (Memberg *et al* 1995, Menezes *et al* 1994).Una reducción en los niveles de Beta III representaría un deterioro en la plasticidad del hipocampo debido a alteraciones en el citoesqueleto de las células neurales (Rubio *et al* 2007); **S100b**, proteína de unión a calcio, involucrada en la respuesta adaptativa al estrés (Margis *et al* 2004) aumentando la proliferación y supervivencia de los progenitores celulares después de un daño lo que se correlaciona con un incremento en la neurogénesis (Kleindienst *et al* 2005); **DCX**, representa un marcador de inmadurez neuronal que juega un rol relevante en la plasticidad del cerebro adulto y atenúa el aprendizaje espacial y la función de memoria (Kutsuna *et al* 2011); **Notch** es un componente clave evolucionalmente conservado que participa en la neurogénesis temprana (Chambers *et al* 2001)y en los mecanismos de señalización, el cual contribuye en los procesos relacionados a la plasticidad neuronal. Alteraciones en la señalización de Notch conllevan a déficits de memoria y aprendizaje espacial como la actividad exploratoria (Costa *et al* 2003). Por último e implicado en procesos de estrés **SERT**, proteína de membrana encargada de introducir dentro de la célula al neurotransmisor Serotonina y que en consecuencia reduce la disponibilidad de esta monoamina en el medio extracelular. Su función principal en el sistema nervioso central es en la regulación de la vía de señalización serotoninérgica, recaptando moléculas de serotonina desde la brecha sináptica hacia la terminal presináptica para su reutilización. Se ha descrito que la reducción del transportador de serotonina incrementa el estado de ansiedad y depresión (Olivier et al 2008; Owens et al 1994).

De lo aquí descripto surge entonces que los fenómenos relacionados con el estrés ocasionarían a nivel cognitivo diversas alteraciones cuyo correlato neuronal podría estar mediado por procesos inflamatorios cerebrales actuando sobre la neuroplasticidad mediada en parte por mecanismos neurogenéticos.

En base a lo mencionado, proponemos como hipótesis de trabajo que el estrés generado por la intervención quirúrgica podría causar cambios en la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-1α, IL-1β, TNF-α) como así también de los receptores GR y MR en el hipocampo afectando de esta forma la expresión de moléculas involucradas en el proceso de neurogénesis (BDNF, Noggin, SHH, BMP, Ptc, Smo, Gli 1, Beta III, S100b, Notch, DCX, SERT),

generando déficit cognitivos en el animal que dependerían de la severidad de la intervención.

Objetivos

Objetivo General:

Evaluar la respuesta neuroendocrina de los animales de estudio a los diferentes grados de estrés quirúrgico y su comportamiento frente a la influencia de la cirugía.

Objetivos Particulares:

Objetivo 1: Evaluar la expresión de genes de citoquinas pro inflamatorias IL-6, IL-1α, IL-1β, TNF-α, y los receptores de glucocorticoides MR y GR en hipocampo y corteza cerebral de los animales de este estudio.

La expresión de genes es una variable continua de potencial distribución normal. En cada grupo se efectuará una evaluación estadística descriptiva con medidas centrales (media y mediana), y de dispersión (error estándar, desvió estándar, coeficiente de variación). La inferencia estadística de diferencias entre los grupos se efectuará con un análisis operativo de la varianza (ANOVA), entre los grupos. Por otra parte se efectuarán comparaciones entre el grupo experimental de cirugía de injuria elevada contra cada uno de los otros grupos. Esto se efectuará tentativamente a través de una prueba de "t" para datos no apareados. El tamaño muestral estimado inicialmente para una diferencia en las medias de 20% en la expresión del gen y 15% en los desvíos estándares, es de 12 animales en cada grupo (Alpha: 0,05; grupos de tratamiento: 4; diferencias mínimas detectables entre las medias: 0,2; desvíos estándares: 0,15; poder: 0,8). [Primer of Biostatistics: Sixth Edition Stanton Glantz McGraw-Hill Medical]

***Objetivo 2*:** Evaluar la expresión de genes pro-neurogénicos (BDNF, Noggin, SHH, sus receptores Ptc y Smo y el factor de transcripción Gli 1, S-100β, Beta III, NOTCH, DCX y SERT) en el hipocampo.

La metodología estadística es igual a la descripta para el objetivo 1.

Objetivo 3: Evaluar la correlación entre la expresión de los genes anteriormente mencionados.

Se efectuará estudios de correlación entre los diferentes genes pro-inflamatorios y pro-neurogénicos. Dado lo pequeño del tamaño muestral no

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

están previstos estudios de correlación múltiple y sí se harán correlaciones individuales.

Objetivo 4: Evaluar a través de pruebas cognitivas estandarizadas, la influencia de la cirugía.

Las pruebas cognitivas se evalúan a través de variables continuas. En cada grupo se efectuará una evaluación estadística descriptiva con medidas centrales (media, mediana, modo), y de dispersión (error estándar, desvío estándar, coeficiente de variación, rango). La inferencia estadística de diferencias entre los grupos se efectuará con un análisis operativo de la varianza (ANOVA), entre los grupos. De acuerdo a los valores hallados, podrán usarse otras pruebas no paramétricas según corresponda. Por otra parte se efectuarán comparaciones entre el grupo experimental de cirugía de injuria elevada contra cada uno de los otros grupos. Esto se efectuará tentativamente a través de una prueba de ANOVA. El tamaño muestral estimado inicialmente para una diferencia en las medias de 20% en la expresión del gen y 15% en los desvíos estándares, es de 12 animales en cada grupo (Alpha: 0,05; grupos de tratamiento: 4; diferencias mínimas detectables entre las medias: 0,2; desvíos estándares: 0,15; poder: 0,8). [Primer of Biostatistics: Sixth Edition Stanton Glantz McGraw-Hill Medical]

Objetivo 5: Evaluar la potencial correlación entre las variables moleculares y las cognitivas.

Se efectuará estudios de correlación entre los diferentes genes pro-inflamatorios y pro-neurogénicos y las variables cognitivas. Dado lo pequeño del tamaño muestral no están previstos estudios de correlación múltiple y sí se harán correlaciones individuales

Materiales y Métodos

Animales: Se utilizaron ratas jóvenes adultas machos (edad +/- 3 meses; n: 136) obtenidas del bioterio del instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental del Hospital Italiano de Buenos Aires (Argentina). Los animales fueron hospedados en grupo hasta la cirugía y luego de la misma de manera individual. Los animales se encontraban con parámetros normales de temperatura y humedad con un ciclo 12 h día / 12h noche, con libre acceso a comida y agua. Todos los experimentos realizados con los animales están de acuerdo con Guide *for the care and use of laboratory animals* que fue aprobada en Washington DC en 1996.

***Procedimiento experimental*:**

Se utilizaron cuatro grupos experimentales:

1. Grupo control: animales apareados en sexo y edad con los de los otros grupos (n inicial = 12). Estadía en cajas habituales de cría, sin anestesia, sin cirugía y sin estrés preoperatorio. Tiempo T0 correspondiente al inicio de extracción de la caja en los otros grupos. Tiempo Tf correspondiente al sacrificio. Tiempos intermedios equivalentes.
2. Grupo de anestesia: animales apareados en sexo y edad con los de los otros grupos (n inicial = 12). Inducción anestésica con sevofluorano al inhalado bajo campana. Una vez sedados se les administró una solución compuesta por Ketamina (50mg/Kg.), Xilacina (20mg/Kg.) y solución fisiológica por vía intraperitoneal. La dosis administrada fue de 2 ml cuya duración es de 30 minutos. Tiempo de anestesia equivalente al de la cirugía de injuria elevada. Refuerzo cada 30 min de 0.5 ml.
3. Grupo quirúrgico con cirugía de bajo impacto
4. Grupo quirúrgico con cirugía de alto impacto.

Cirugías:

Se realizaron cuatro tipos de intervención quirúrgica en ratas wistar jóvenes-adultas:

- Cirugía abdominal de bajo impacto (laparotomía mediana de 2-3 cm) que consistió en la manipulación de las vísceras intraperitoneales por un lapso de 4 minutos.
- Cirugía abdominal de alto impacto 1 (hepatectomía) donde se realizó una resección hepática involucrando el lóbulo lateral izquierdo,

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

prosiguiendo a realizar el cierre con sutura irreabsorbible (prolene 4.0)

- Cirugía abdominal de alto impacto 2 (gastrotomía) donde se realizó una incisión sobre cara anterior del estomago, prosiguiendo a realizar el cierre primario con sutura irreabsorbible (prolene 6.0) o reabsorbibles lento (PDS 6.0).

Tras constatar ausencia de sangrado se procedió al cierre de la pared abdominal y de la piel usando hilos multifilamento irreabsorbibles (Tricon). Una vez finalizado el procedimiento el animal pasó a una jaula bajo lámpara de calor recibiendo 1 única dosis de antibiótico en forma profiláctica (Penicilina) y analgésicos (Tramadol) (Es importante destacar que el efecto del Tramadol se mantiene aproximadamente por 12 hs, por lo que las pruebas cognitivas posteriores no se verían influenciadas por dicha droga)

En ambos casos a las ratas se les realizó una inducción anestésica con sevofluorano inhalado bajo campana. Una vez sedados se les administró una solución compuesta por Ketamina (50mg/Kg.), Xilacina (20mg/Kg.) y solución fisiológica por vía intraperitoneal. La dosis administrada será de 2 ml cuya duración es de 30 minutos. Durante el procedimiento se aseguró la adecuada anestesia del animal mediante el movimiento de vibrizas.

Exclusión: Se excluyeron y reemplazaron, todos aquellos animales cuya intervención haya sido mayor de 10 minutos, hayan sufrido accidentes intraoperatorios (Ej. Lesión de víscera sólida o hueca, sangrado intraoperatorio entre otros) o de la técnica anestésica (Ej. Hipotermia o hipoxia).

Subgrupo de Biología molecular

Después de 24 horas las ratas fueron sacrificadas por decapitación previa anestesia con Sevoflurano. Se extrajo el cerebro y se separaron los hipocampos, el cerebelo y la corteza colocándolos inmediatamente en nitrógeno líquido. Las muestras fueron almacenadas a -70ºC hasta su procesamiento.

- Para la extracción de ARN: método de Trizol®, modificado parcialmente en nuestro laboratorio.

Se estudió la expresión diferencial de genes mediante la técnica de Real Time PCR con Syber Green® relacionados con:

- El sistema inmune inflamatorio (citoquinas: IL-6, IL-1α, IL-1β, TNF-α,
- Los receptores de cortiscosterona. GR y MR
- La neurogénesis (BDNF, Beta III, Noggin, S100b, SHH, Smo, Ptc, Gli 1).

Las secuencias de los primers se detallan a continuación:

Gen	**Primer forward**	**Primer Reverse**
IL6	**TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC**	**TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCCS**
IL1α	**AAGACAAGCCTGTGTTGCTGAG**	**TCCCAGAAGAAAATGAGGTCGGTC**
IL1β	**CACCTCTCAAGCAGAGCACAG**	**GGGTTCCATGGTGAAGTCAA**
TNFα	**AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTC**	**TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC**
IL6R	**TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC**	**TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC**
IL1R	**GTTTTTGGAACACCCTTCAGCC**	**ACGAAGCAGATGAACGGATAGC**
TNFR	**GAGTGAGACGCATTTCCAGT**	**CACGGTGTTCTGTTTCTCCT**
GR	**CACCCATGATCCTGTCAGTG**	**AAAGCCTCCCTCTGCTAACC**
MR	**TAAGTTTCCCCACGTGGTTC**	**ATCCACGTCTCATGGCTTTC**
BDNF	**GGACATATCCATGACCAGAAA**	**GCAACAAACCACAACATTATC**
Beta III	**GCCATTCAGAGTAAGAACAG**	**GGATGTCACACACCGCTA**
Noggin	**TGTAAATATAGAGAACAAATG**	**ACGGGATATTATAAAGAATA**
S100 b	**GAGTCACTGAGGGACGAAAT**	**AACGGAGGTGCTATTGGTAG**
SHH	**AAGGTGAGGAAGTCGCTGTA**	**AAGGTGAGGAAGTCGCTGTA**
Smo	**TTCGTGCTCATCACCTTCA**	**TGGCTTGGCATAGCACATA**
Ptc	**TGGTTGTGGGTCTCCTCAT**	**ACTCGTCCACCAACTTCCA**
Gli1	**GACCTGCAAACCGTAATCC**	**ATGGTGCCAATGGAGAGAT**
Actina β	**TCTGTGTGGATTGGTGGCTCTA**	**CTGCTTGCTGATCCACATCTG**

- Para la extracción de proteínas: método de Ripa

Se estudió la expresión de proteínas mediante la técnica de Western Blot relacionadas con:

- El sistema inmune inflamatorio (citoquinas: IL-6 , TNF α)
- Los receptores de corticosterona GR y MR
- La neurogénesis (BDNF, Beta III).

Las muestras de hipocampo que estaban congeladas a -70ºC fueron procesadas de manera individual. Se las homogeneizo en buffer de lisis (RIPA) con inhibidor de proteasas para que luego de incubarlas a 4ºC y centrifugarlas recuperar el sobrenadante que es donde se encontraban las proteínas totales.

El extracto de proteínas obtenido se lo cuantifico usando la técnica colorimétrica con reactivo Bradford (protein assay; Bio-Rad).

Las muestras fueron resuspendidas en buffer Laemmeli y sembradas (50 mg por calle) en geles de poliacrilamida y separadas por SDS-PAGE.

Las proteínas fueron separadas en corrida electroforética y transferidas a membranas de nitrocelulosa y/o PVDF dependiendo del tipo de proteína.

TNFα, GR, MR, BDNF y Beta III fueron detectadas en membrana de nitrocelulosa, mientras que IL6 en PVDF, con sus respectivos anticuerpos primarios (Santa Cruz Biotechnology) y los secundarios correspondientes conjugados con HRP (DAKO) Las bandas en todos los casos fueron detectados con el DAB kit (DAKO) y evaluadas usando ImageJ (programa gratuito y de uso libre)

Subgrupo de evaluación cognitiva:

Pruebas conductuales

1. Capacidad de aprendizaje y memoria: prueba de "reconocimiento de Objeto novedoso".
2. Ansiedad: prueba de "laberinto elevado en cruz" o plus maze.

Se realizó el test de reconocimiento de objeto novedoso a la mañana previa a la cirugía y 7 días después de la cirugía para evaluar si existe un deterioro cognitivo del animal luego del procedimiento. Fue necesaria la realización de una habituación al espacio abierto, al menos una semana antes de tomar el test.

La realización del test laberinto elevado en cruz se realizó 7 días después de la cirugía.

Reconocimiento de objeto novedoso

Protocolo

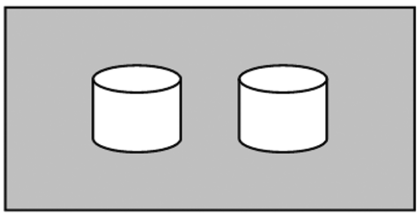
Se basa en la tendencia de la rata a dedicar más tiempo a la exploración de un objeto nuevo respecto a uno conocido. Se divide en dos fases: Presentación y Testeo

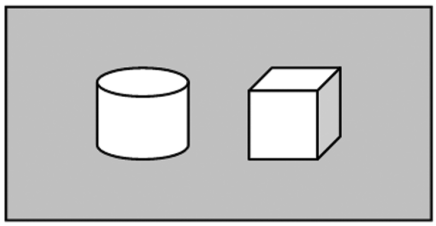
1ª fase: Presentación

- 2 objetos iguales en un recinto de acrílico o plástico con base lisa.
- Llevar al animal dentro del recinto y dejarlo que explore por 5 min.
- Retirar al animal y ubicarlo en una jaula aislada durante 5 minutos.
- Limpiar el recinto cuidadosamente con agua y detergente, secar. Hacer lo mismo con los objetos.

2ª fase: Testeo

- Ubicar en el recinto una copia del objeto de presentación y un objeto novedoso.
- Volver a poner a la rata dentro del recinto. Dejarla explorando durante 3 minutos.
- Registrar con cámara digital los dos eventos para determinar tiempos de exploración de los objetos.





- Durante la fase de presentación, en un espacio abierto se presentan dos objetos idénticos.
- En la fase de testeo se reemplaza uno de los objetos por otro novedoso.

Índice de preferencia exploratoria (EPI)

EPI mide la preferencia de exploración de los animales como la diferencia entre el tiempo que pasa el animal explorando el objeto nuevo (nov) y el familiar (fam). Calculado como una proporción del total del tiempo que paso explorando ambos objetos.

$$EPI: \frac{t\ nov - t\ fam}{t\ nov + t\ fam}$$

Índice : Tiene valore entre -1 a 1

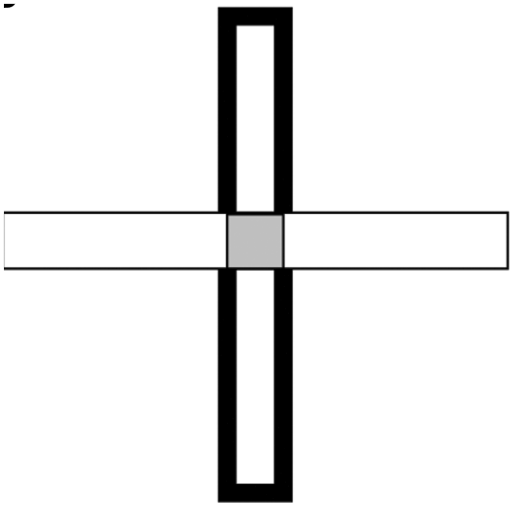
Valores x>0 representan preferencia exploración objeto nuevo

Laberinto elevado en cruz.

Protocolo

Este test se basa en las tendencias opuestas de la rata a explorar espacios desconocidos y a buscar refugio en lugares cerrados y oscuros.

- Ubicar a la rata en el centro de la cruz. Registrar con cámara digital durante 5 minutos.
- Medir los tiempos de permanencia en brazos abiertos, en brazos cerrados y en el centro.
- Calcular los porcentajes de permanencia en cada área.



Subgrupo inmunohistoquímica

Estudio de proliferación neuronal

Se analizó la expresión de DCX en el giro dentado de los animales de los diferentes grupos. Para evitar sesgos, cada sección de tejido se cuantificó sin conocer el grupo experimental al que pertenecía.

Para cada uno de los casos se utilizaron protocolos locales de probada eficiencia en la Unidad de histología del ICBME.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Después de 24 horas las ratas se sacrificaron por decapitación previa anestesia con Sevoflurano. Se extrajo el cerebro y se procedió a la fijación inmediatamente en paraformaldehido 4% a 4ºC por 24hs .Luego se continuó con el protocolo para su inclusión en parafina deshidratando los cerebros en una sucesión creciente de alcoholes (70-90-100) y posterior aclaramiento con dos cambios de xilol. Se los incluyó parafina y se realizaron cortes de 5 micras de espesor.

A los cortes obtenidos se los desparafinó y se los lavó con tampón fosfato salino (PBS) a pH 7,2, luego se realizó recuperación antigénica por calor en buffer citrato pH 6 en horno a microondas. Con posterioridad se delimitaron los cortes con lápiz hidrófugo, y se realizó la inhibición de sitios inespecíficos por 5 minutos con Power Block® (Biogenex). Transcurrido ese tiempo se incubó con anticuerpo primario DCX 1/50 (Santa Cruz Biotechnology) toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. Al día siguiente se realizaron sucesivos lavados con PBS a pH 7.2 y se agregó el anticuerpo secundario biotinilado específico (Vector Labs) que se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se lavaron con PBS a pH 7.2 y pH 8.2. y se incubó con Estreptavidina Texas red® , en PBS a pH 8.2 por 60minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego de realizar sucesivos lavados con PBS pH 8.2 se realizó contra coloración nuclear con Hoescht (Sigma Aldrich). Finalmente se montaron los cortes y se estudiaron bajo el microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E400.

Como controles de tejido positivos se utilizaron cortes de cerebro embrionario y negativos de parénquima hepático; como controles de anticuerpo primario (isotipo) se utilizó CD34 (Santa Cruz biotechnology), como control de la neurogenesis GFAP (Biogenex) y como control del anticuerpo secundario se sustituyó el mismo por PBS.

Se contaron las células positivas en 10 secciones de la zona subgranular del giro dentado en ambos hemisferios cerebrales de cada animal en cada grupo. Los recuentos se realizaron directamente bajo microscopio de epifluorescencia con objetivo de 40x.

Controles experimentales

Protocolo de Incremento de la neurogenesis (*Couillard-Despres et al 2005; Ehninger et al 2003; Engesser- Cesar et al 2007; Naylor et al 2005*)

Se utilizaron Ratas Wistar (n: 4) macho de 3 meses de edad (300 gr.), las cuales fueron divididas en 2 grupos: control y entrenamiento. El grupo control fue alojado en jaulas en condiciones estándar. El grupo de entrenamiento fue alojado en jaulas (36cm x 42 cm x 20 cm) con libre acceso a una rueda de entrenamiento (36 cm diámetro). Las revoluciones de la rueda se registraron automáticamente con un software de computadora .Todos los animales se colocaron en sus respectivos alojamientos 12 h antes del comienzo del experimento. La duración total del experimento es de 14 días. Este tiempo corresponde a altos niveles de expresión de DCX en las nuevas células generadas. Transcurrido ese tiempo se procedió a realizar el test conductual RON y luego se procedió a procesar los cerebros de los animales (ver sección subgrupo evaluación inmuniohistoquímica) y se realizo el conteo de DCX positivas en el giro dentado

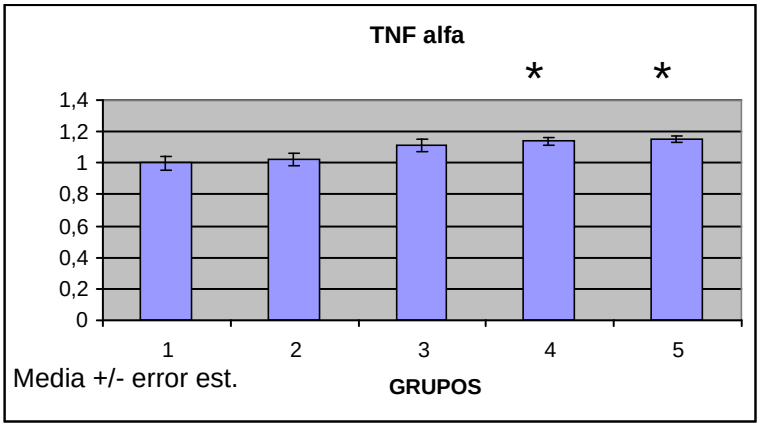
Protocolo de Inhibición de la neurogenesis (*Mizumatsu et al 2003; Tada et al 2000; Santarelli et al 2003; Saxe et al 2007; Sun et al 2013*)

Para inhibir la neurogénesis de los cerebros de las ratas a estudiar se utilizó la exposición a bajas dosis de rayos x de la región del hipocampo utilizando esterotaxia para localizar la zona. Se utilizaron 2 ratas, cada rata se irradió individualmente en un campo con una placa protectora de plomo, la cual bloqueó la exposición del cuerpo y las demás regiones del cerebro. Se utilizó 1 dosis única de 15 gray. La radiación reduce drásticamente la proliferación celular en la SGZ. Se dejó recuperar los animales 2 meses antes de las pruebas de comportamiento para evitar los efectos inflamatorios de la irradiación. Transcurrido ese tiempo se procedió a realizar el test conductual RON y luego se procedió a procesar los cerebros de los animales (ver sección subgrupo evaluación inmuniohistoquímica) y se realizo el conteo de DCX positivas en el giro dentado.

Resultados

Real time y Western Blot

Se midió el estrés, midiendo la expresión tanto de mRNA en hipocampo, corteza y cerebelo como de la proteína en hipocampo, de las siguientes citoquinas pro inflamatorias TNF alfa, IL6 y de los receptores de corticosteroides MR y GR

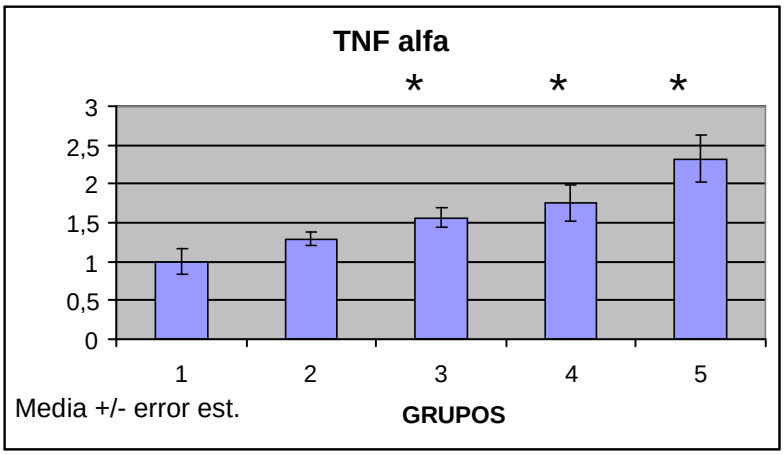


Referencias:
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

Ref.
Valores normalizados a 1
En todas las comparaciones se toma al grupo control (1) como referencia.

p<0.05 *; p< 0.01**; p<0.001***

Fig.2: Expresión aumentada del mRNA TNF α en hipocampo.



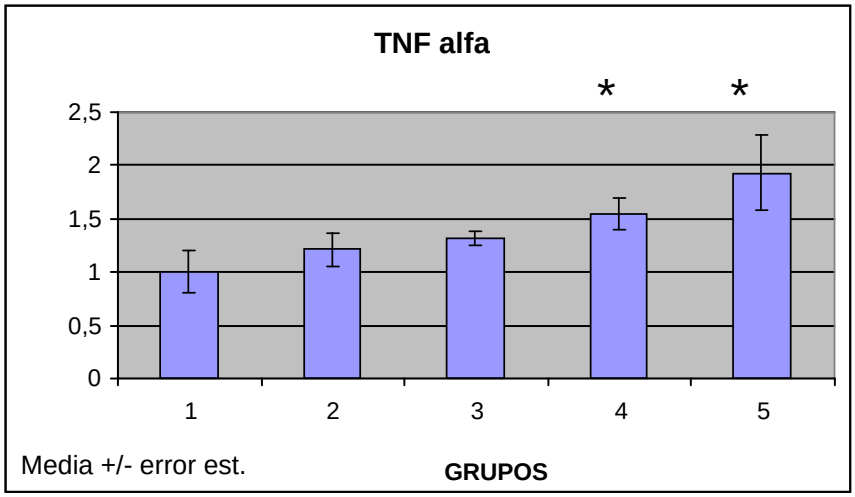
Referencias:
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

Ref.
Valores normalizados a 1
En todas las comparaciones se toma al grupo control (1) como referencia.

p<0.05 *; p< 0.01**; p<0.001***

Fig. 3: Expresión aumentada del mRNA TNF α en corteza

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes



Referencias:
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

Ref.
Valores normalizados a 1
En todas las comparaciones se toma al grupo control (1) como referencia.

$p<0.05$ *; $p< 0.01$**; $p<0.001$***

Fig. 4: Expresión aumentada de mRNA TNF α en cerebelo

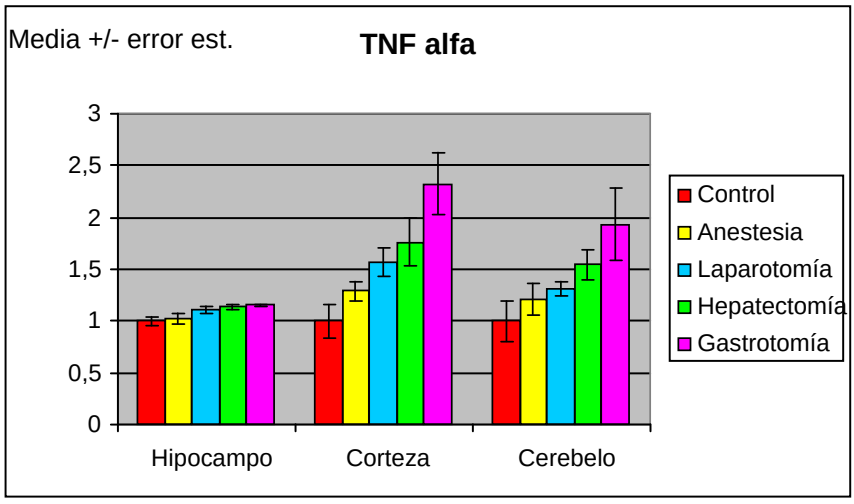
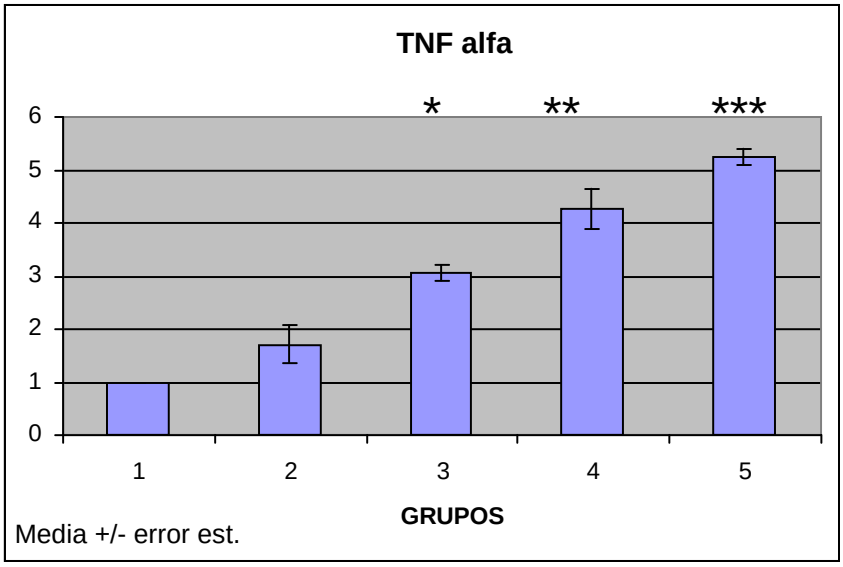


Fig. 5: Expresión del mRNA de IL6 agrupada por estructuras cerebrales

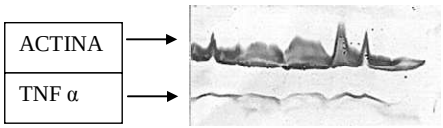


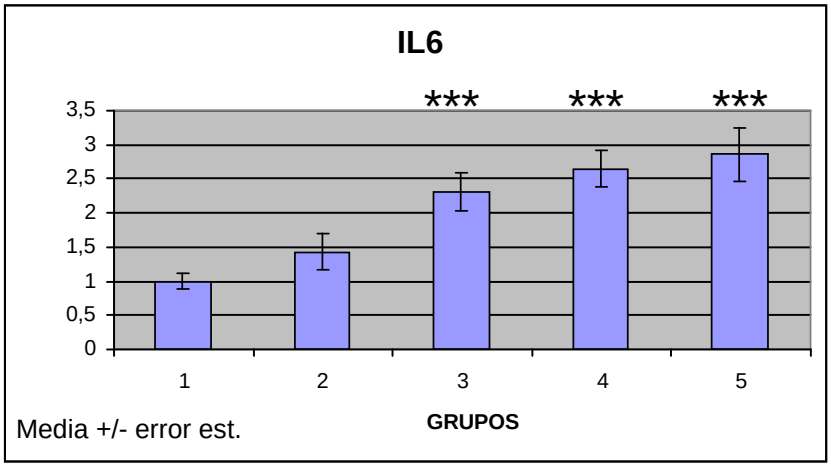
Referencias:
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

Western blot de TNF α

p<0.05 *; p< 0.01**; p<0.001***

Fig. 6: Expresión de la proteína de TNF α en hipocampo





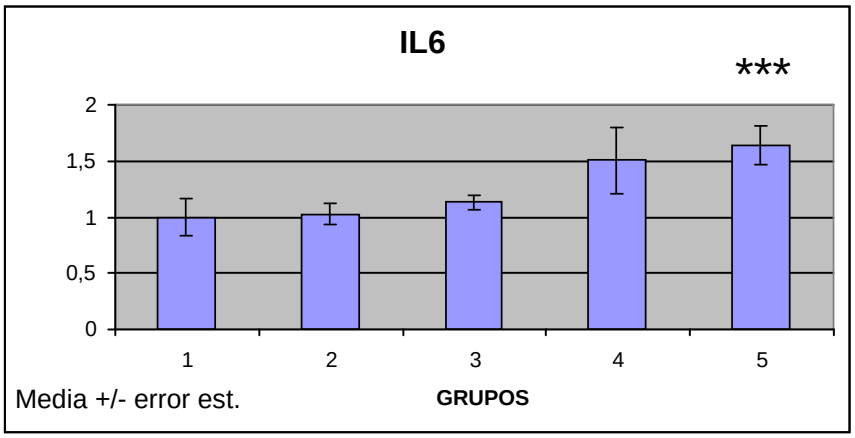
Referencias:
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

Ref.
Valores normalizados a 1
En todas las comparaciones se toma al grupo control (1) como referencia.

p<0.05 *; p< 0.01**; p<0.001***

Fig. 7: Expresión aumentada del mRNA IL6 en hipocampo

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

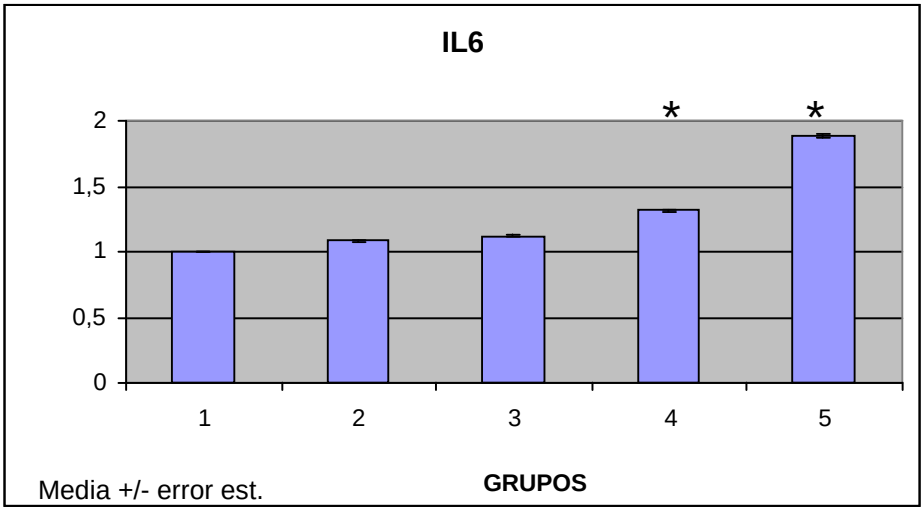


Referencias:
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

Ref.
Valores normalizados a 1
En todas las comparaciones se toma al grupo control (1) como referencia.

p<0.05 *; p< 0.01**; p<0.001***

Fig. 8: Expresión aumentada del mRNA IL6 en corteza



Referencias:
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

Ref.
Valores normalizados a 1
En todas las comparaciones se toma al grupo control (1) como referencia.

p<0.05 *; p< 0.01**; p<0.001***

Fig. 9: Expresión aumentada del mRNA IL6 en cerebelo

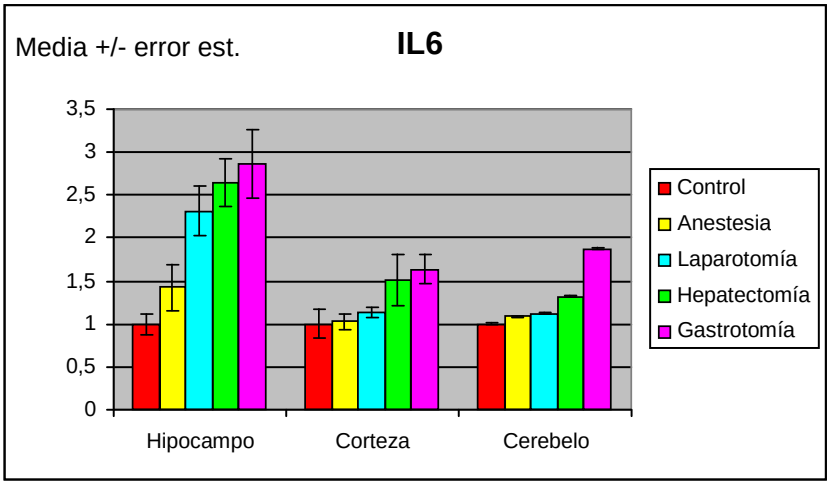
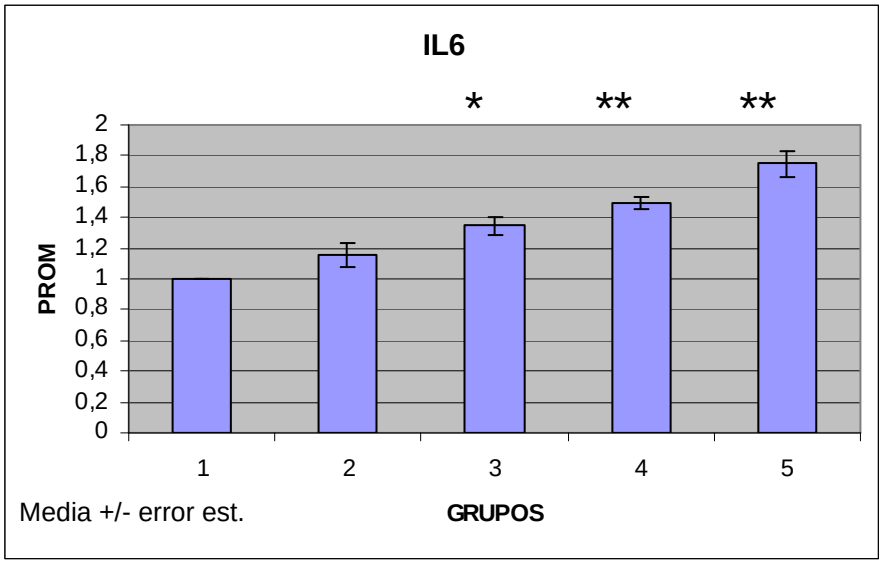


Fig. 10: Expresión del mRNA IL6 agrupada por estructuras cerebrales



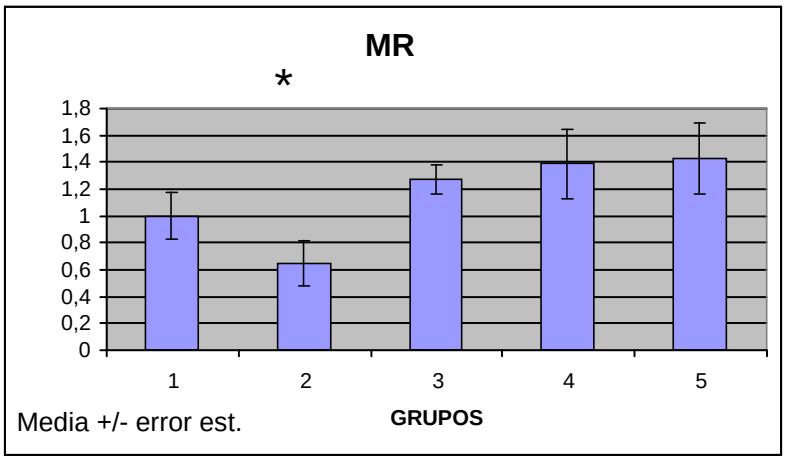
Referencias:
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

p<0.05 *; p< 0.01**; p<0.001***

Fig.11: Expresión aumentada de la proteína de IL6 en hipocampo

Western blot de IL6

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

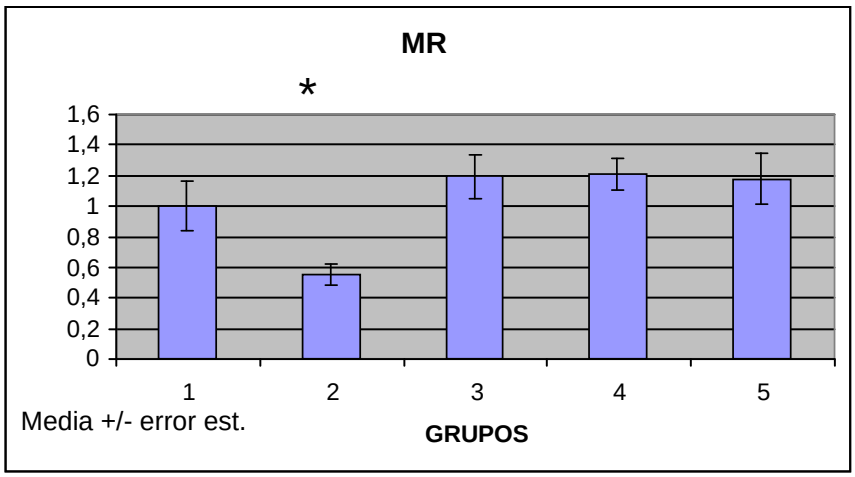


Referencias:
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

Ref.
Valores normalizados a 1
En todas las comparaciones se toma al grupo control (1) como referencia.

p<0.05 *; p< 0.01**; p<0.001***

Fig. 12: Expresión del mRNA de MR en hipocampo

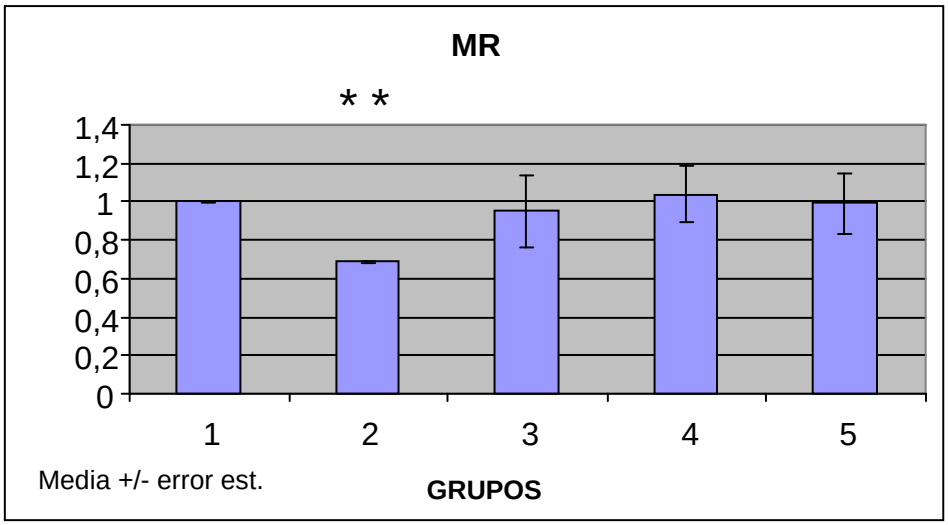


Referencias:
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

Ref.
Valores normalizados a 1
En todas las comparaciones se toma al grupo control (1) como referencia.

p<0.05 *; p< 0.01**; p<0.001***

Fig. 13: Expresión del mRNA de MR en corteza



Referencias:
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

Ref.
Valores normalizados a 1
En todas las comparaciones se toma al grupo control (1) como referencia.

$p<0.05$ *; $p< 0.01$**; $p<0.001$***

Fig. 14: Expresión del mRNA de MR en cerebelo

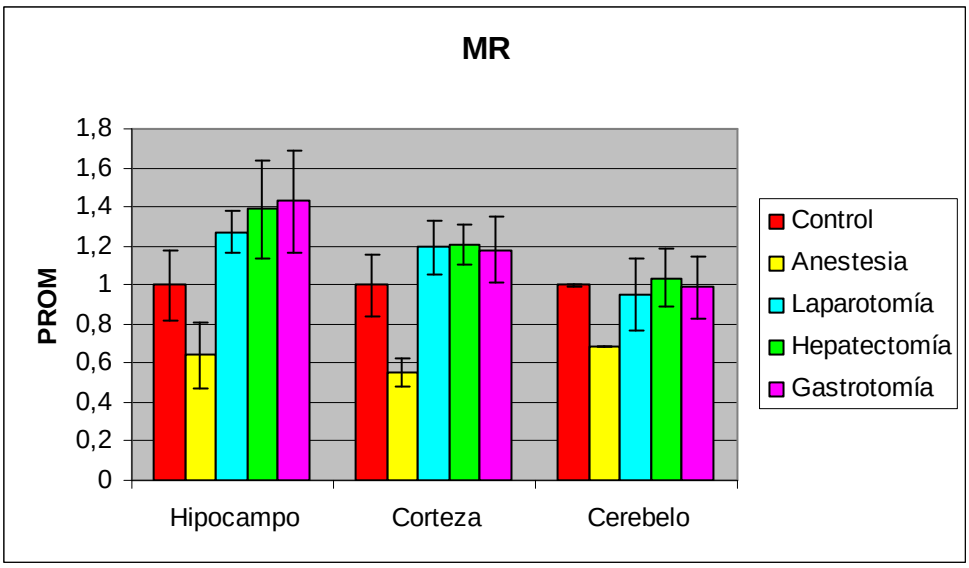
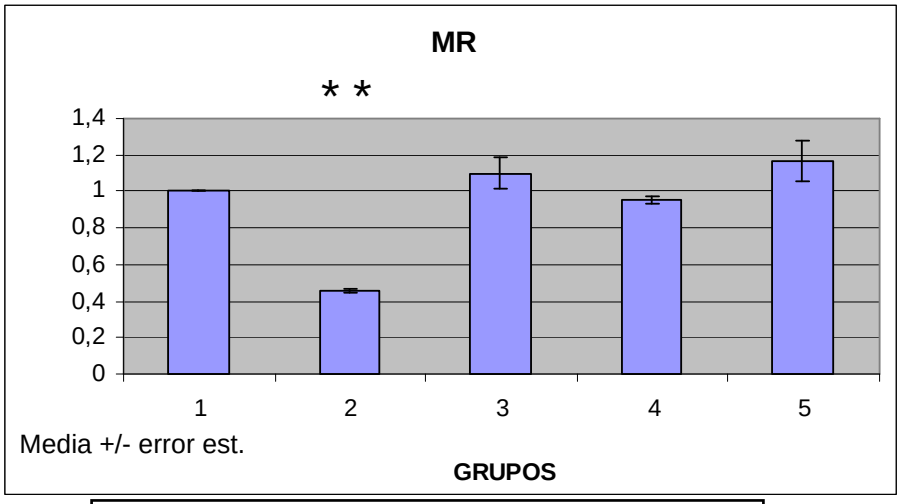


Fig. 15: Expresión del mRNA de MR agrupado por estructuras cerebrales

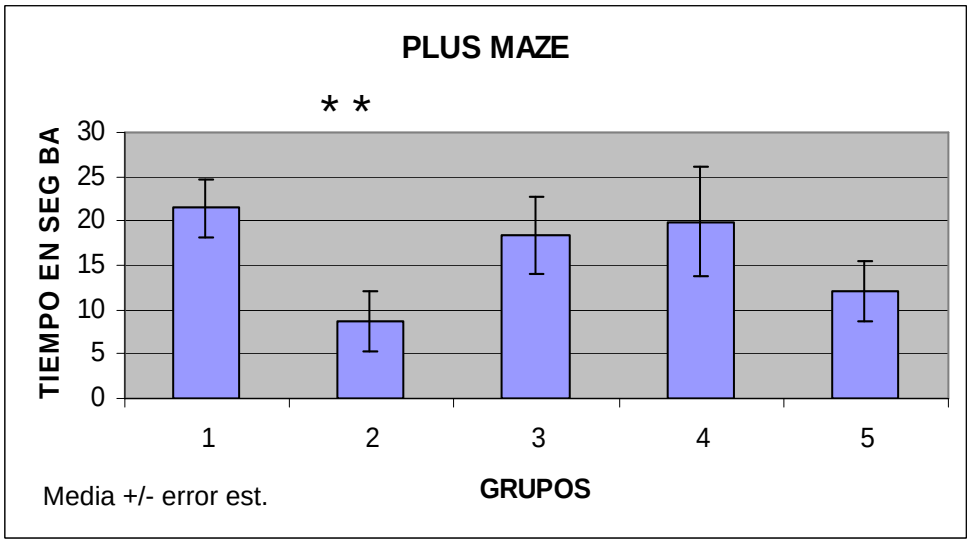


Referencias:
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

p<0.05 *; p< 0.01**; p<0.001***

Western blot de MR

Fig. 16: Expresión de la proteína de MR en hipocampo

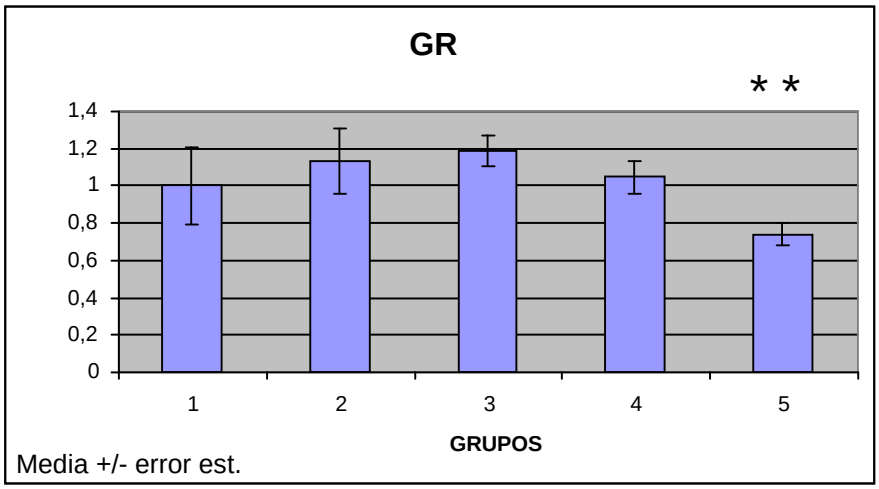


Referencias:
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

p<0.05 *; p< 0.01**; p<0.001***

Fig. 17: Test Plus Maze que mide estadios tipo ansiedad

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

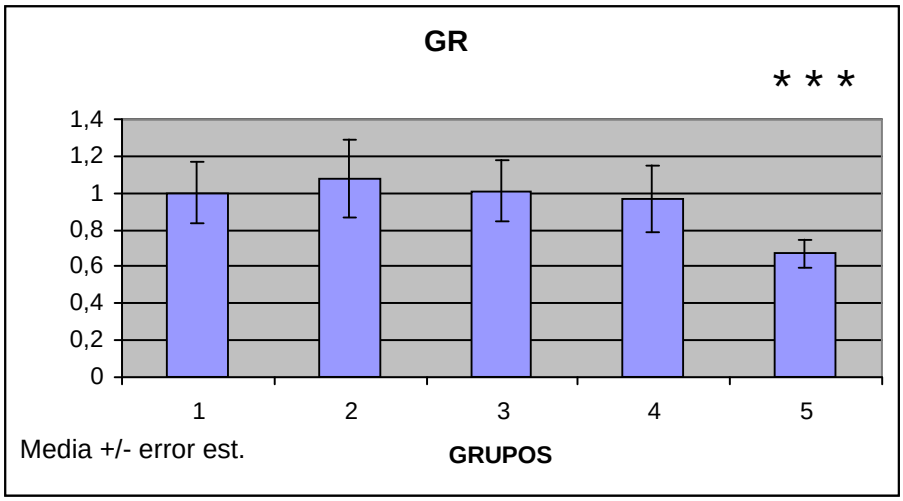


Referencias:
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

Ref.
Valores normalizados a 1
En todas las comparaciones se toma al grupo control (1) como referencia.

Fig. 18: Expresión disminuida del mRNA de GR en hipocampo

p<0.05 *; p< 0.01**; p<0.001***

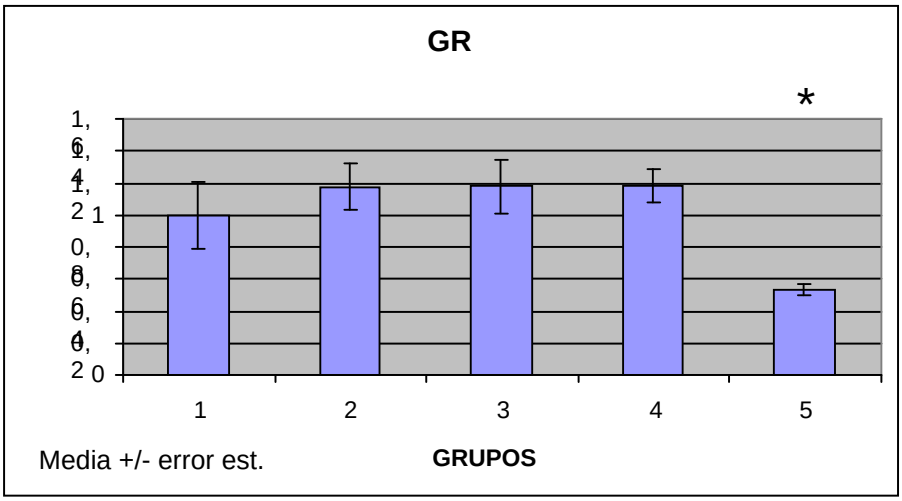


Referencias:
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

Ref.
Valores normalizados a 1
En todas las comparaciones se toma al grupo control (1) como referencia.

Fig. 19: Expresión disminuida del mRNA de GR en corteza

p<0.05 *; p< 0.01**; p<0.001***



Referencias:
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

Ref.
Valores normalizados a 1
En todas las comparaciones se toma al grupo control (1) como referencia.

p<0.05 *; p< 0.01**; p<0.001***

Fig. 20: Expresión disminuida del mRNA de GR en cerebelo

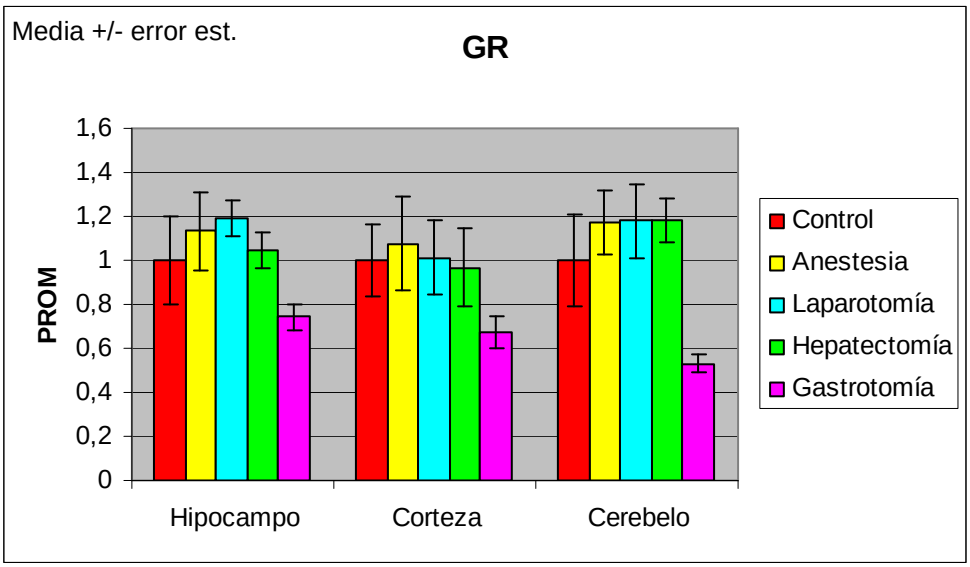


Fig. 21: Expresión del mRNA de GR agrupado por estructuras cerebrales

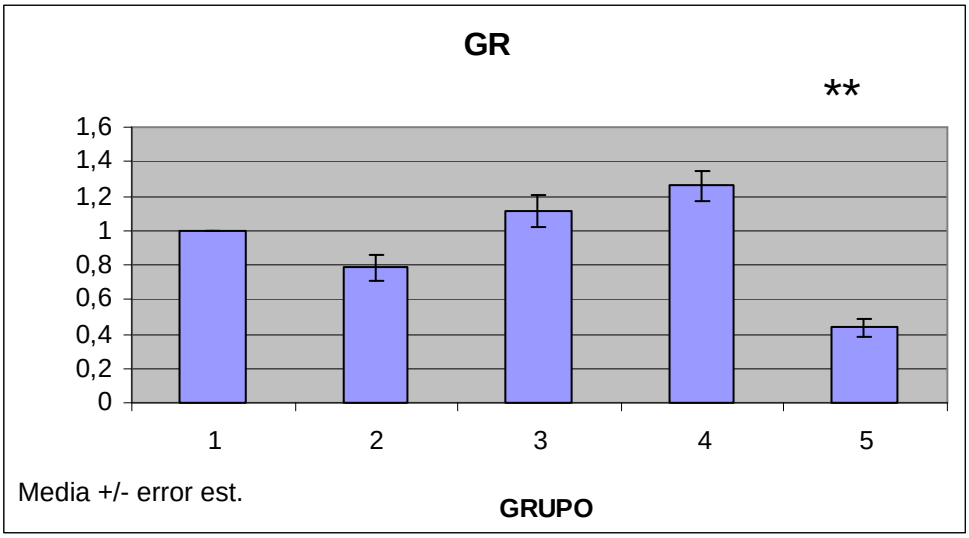


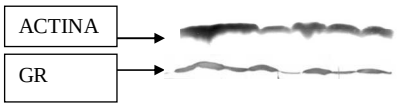
Fig. 22: Expresión disminuida de la proteína GR en hipocampo

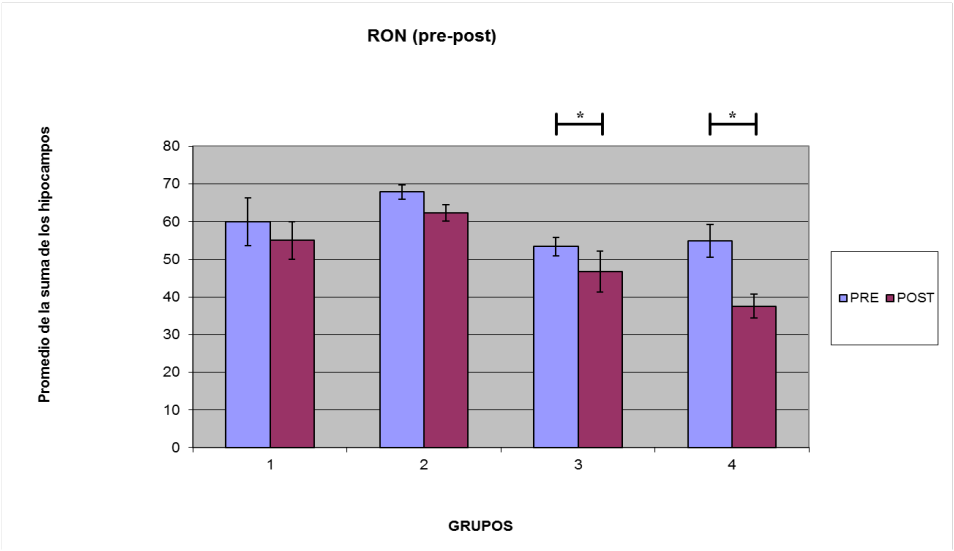
Referencias:
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

Ref.
Valores normalizados a 1
En todas las comparaciones se toma al grupo control (1) como referencia.

$p<0.05$ *; $p< 0.01$**; $p<0.001$***

Western blot de GR

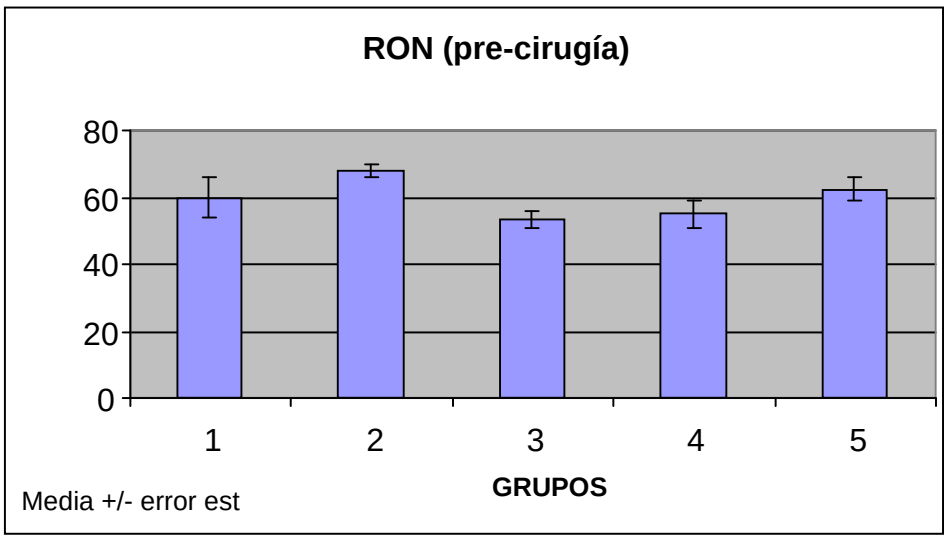




Referencias:
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

p<0.05 *
p< 0.01**
p<0.001***

Fig. 23: Test RON mide memoria a corto plazo

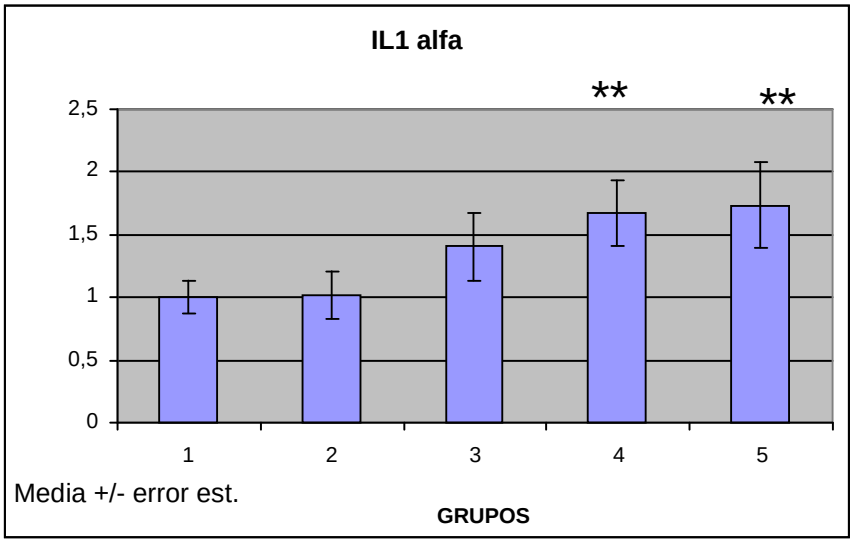


Referencias
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

p<0.05 *; p< 0.01**; p<0.001***

Fig. 24: Partimos de animales (pre cirugía) en las mismas condiciones

También se midió la expresión del mensajero de otras citoquinas pro inflamatorias en el hipocampo: IL1 α Y β y su receptor.

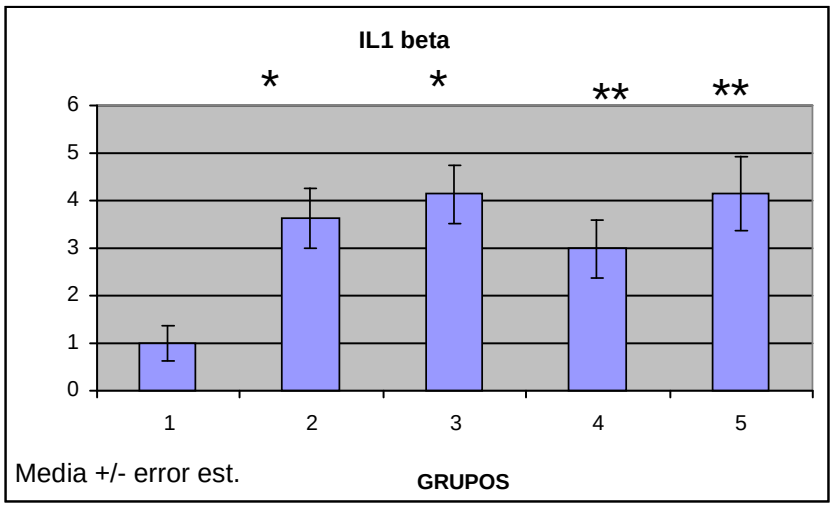


Referencias:
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

Ref.
Valores normalizados a 1
En todas las comparaciones se toma al grupo control (1) como referencia.

p<0.05 *; p< 0.01**; p<0.001***

Fig. 25: Expresión del mRNA IL1alfa medido en hipocampo

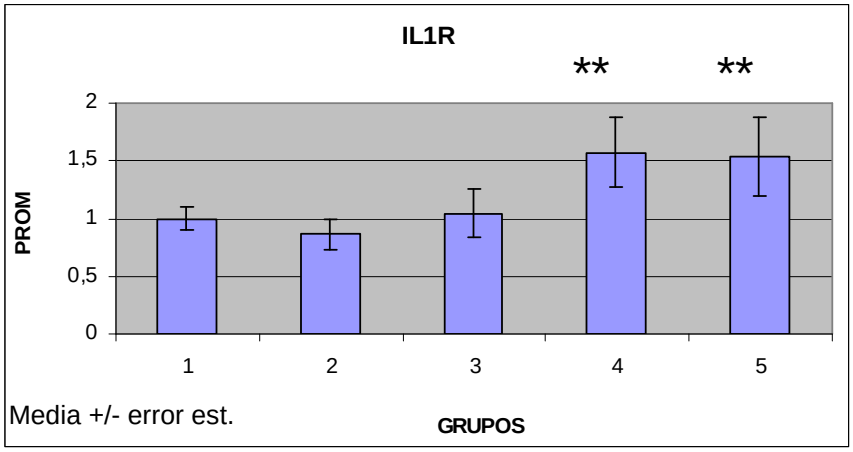


Referencias:
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

Ref.
Valores normalizados a 1
En todas las comparaciones se toma al grupo control (1) como referencia.

p<0.05 *; p< 0.01**; p<0.001***

Fig. 26: Expresión aumentada del mRNA IL1 β en hipocampo

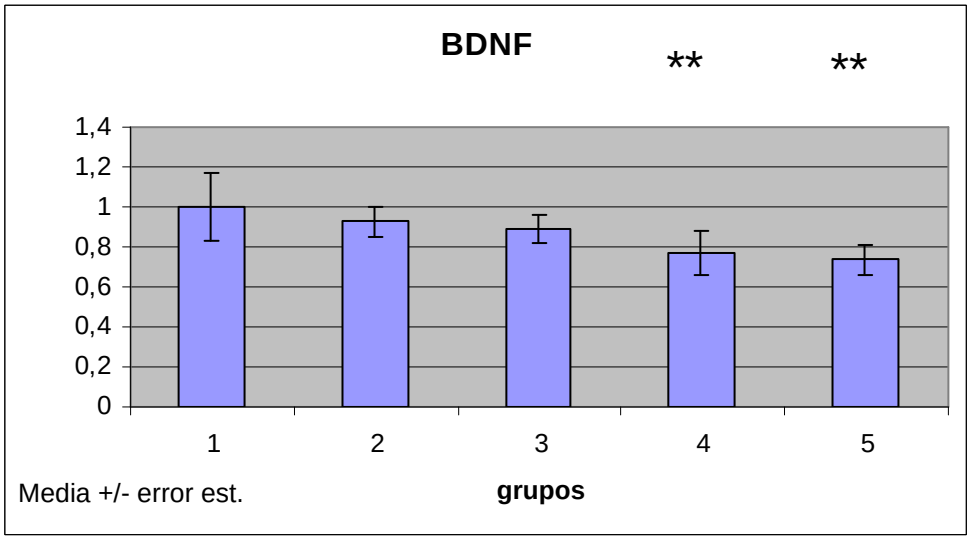


Referencias:
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

Ref.
Valores normalizados a 1
En todas las comparaciones se toma al grupo control (1) como referencia.

p<0.05 *; p< 0.01**; p<0.001***

Fig. 27: Expresión aumentada del mRNA IL1R en hipocampo

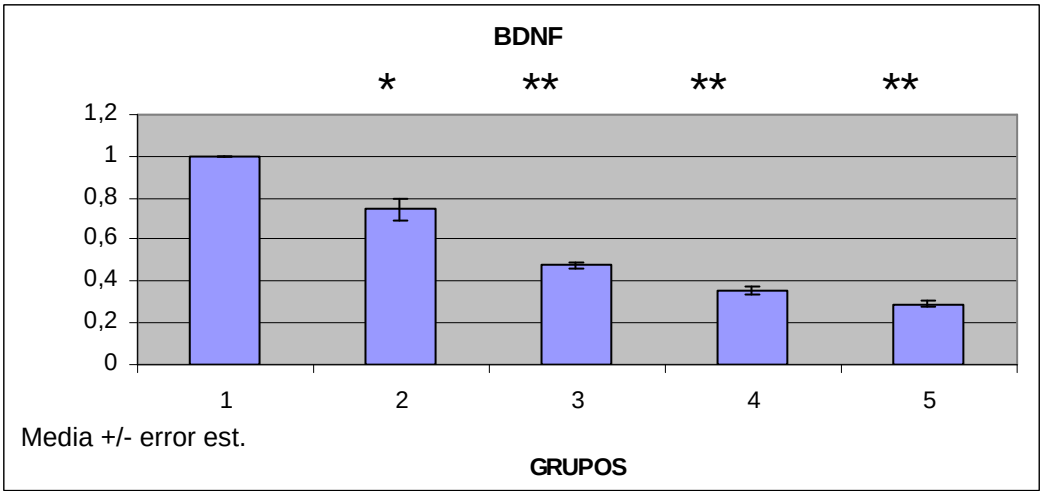


Referencias:
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

Ref.
Valores normalizados a 1
En todas las comparaciones se toma al grupo control (1) como referencia.

p<0.05 *; p< 0.01**; p<0.001***

Fig. 28: Expresión disminuida del mRNA de BDNF en hipocampo



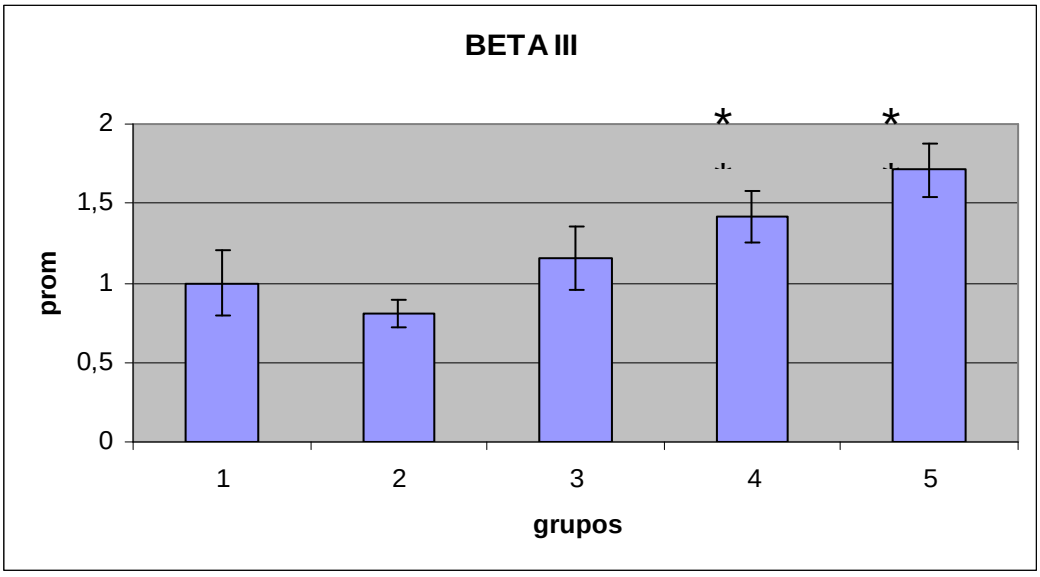
Referencias:
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

Ref.
Valores normalizados a 1
En todas las comparaciones se toma al grupo control (1) como referencia.

p<0.05 *; p< 0.01**; p<0.001***

Fig. 29: Expresión disminuida de la proteína de BDNF en hipocampo

Western blot de BDNF

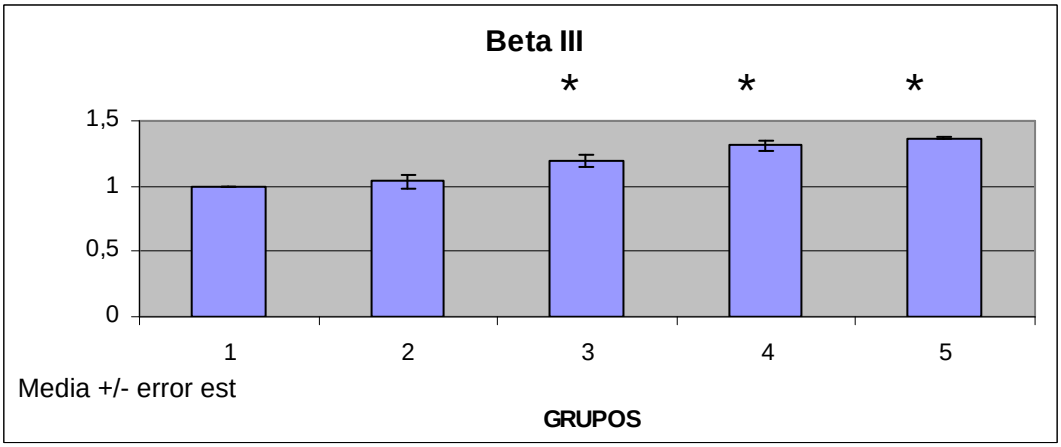


Referencias:
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

Ref.
Valores normalizados a 1
En todas las comparaciones se toma al grupo control (1) como referencia.

p<0.05 *; p< 0.01**; p<0.001***

Fig. 30: Expresión aumentada del mRNA de Beta III en hipocampo



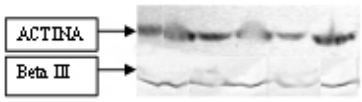
Referencias:
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

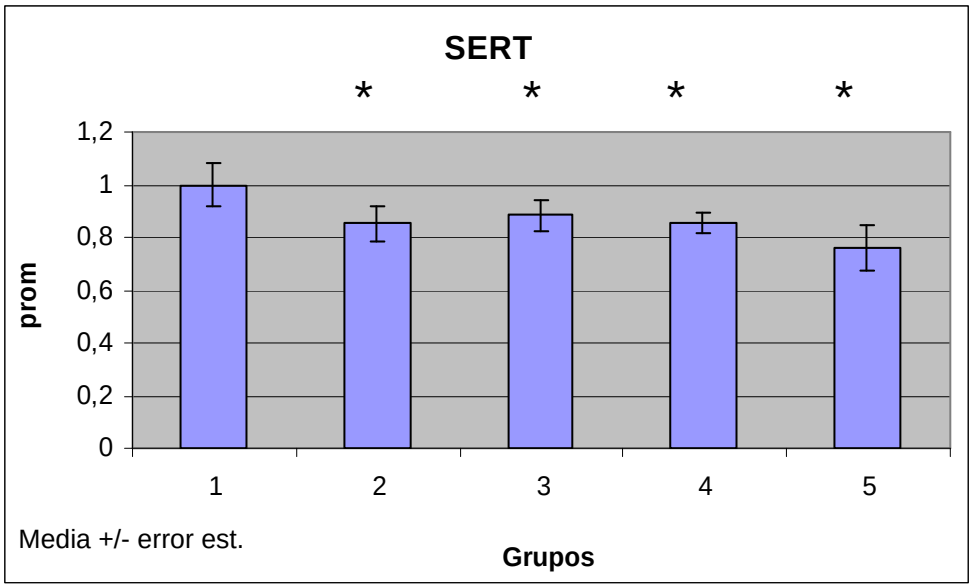
Ref.
Valores normalizados a 1
En todas las comparaciones se toma al grupo control (1) como referencia.

p<0.05 *; p< 0.01**; p<0.001***

Fig. 31: Expresión disminuida de la proteína de BDNF en hipocampo

Western blot de Beta III





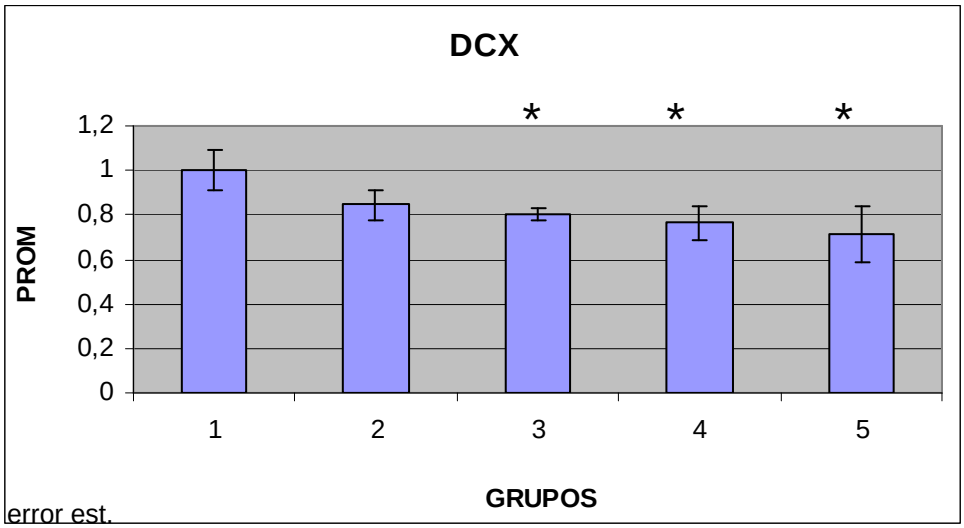
Referencias
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

Ref.
Valores normalizados a 1
En todas las comparaciones se toma al grupo control (1) como referencia.

p<0.05 *; p< 0.01**; p<0.001***

Fig. 32: Expresión del mRNA de SERT medida en hipocampo

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes



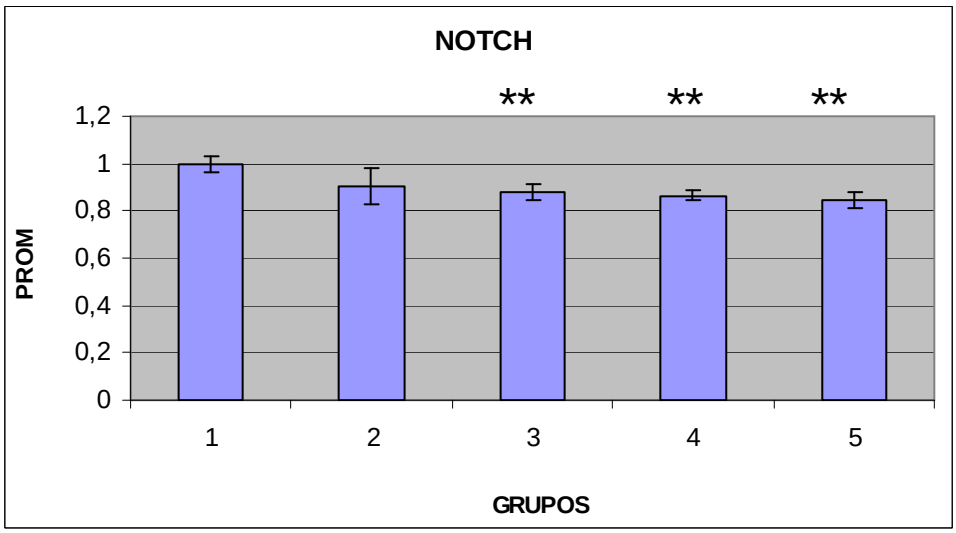
Referencias
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

Ref.
Valores normalizados a 1
En todas las comparaciones se toma al grupo control (1) como referencia.

p<0.05 *; p< 0.01**; p<0.001***

Media +/- error est.

Fig. 33: Expresión del mRNA de DCX en hipocampo



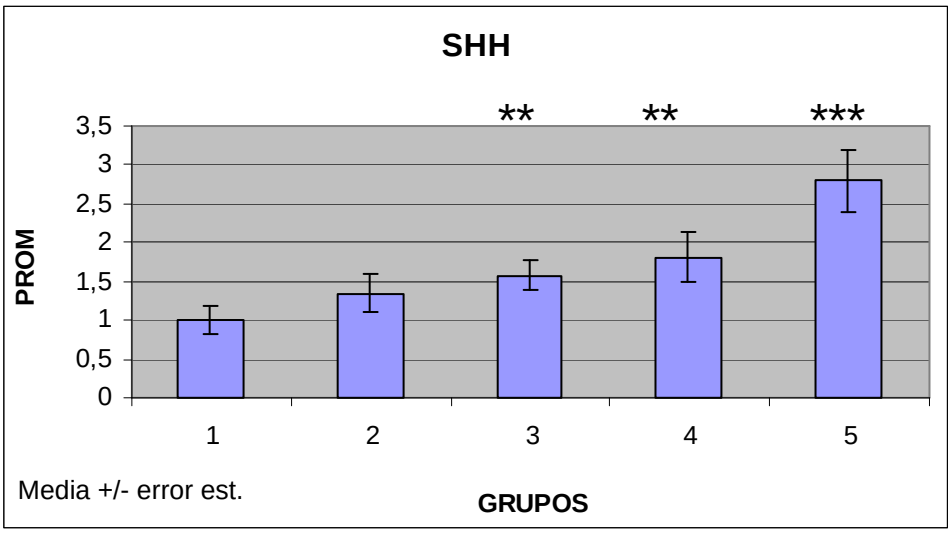
Referencias
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

Ref.
Valores normalizados a 1
En todas las comparaciones se toma al grupo control (1) como referencia.

p<0.05 *; p< 0.01**; p<0.001***

Fig. 34: Expresión del mRNA de NOTCH en hipocampo

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

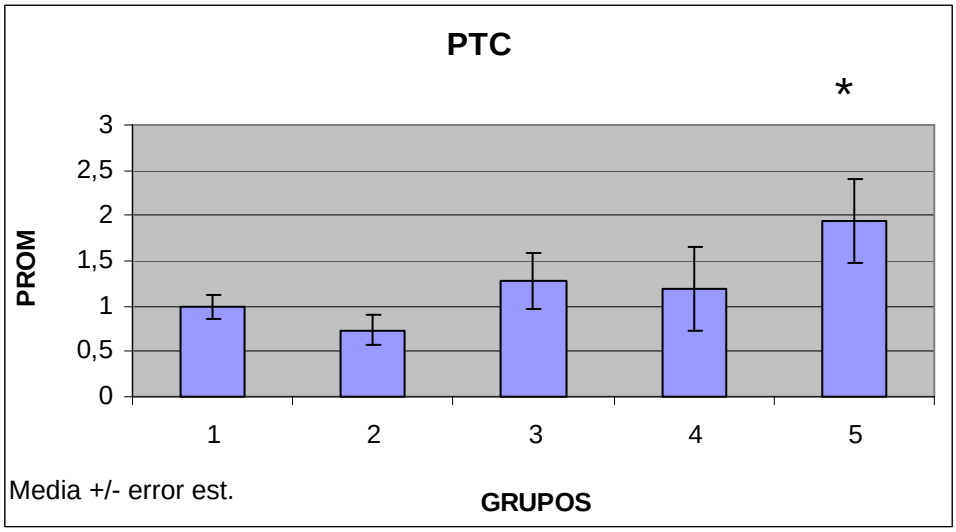


Referencias
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

Ref.
Valores normalizados a 1
En todas las comparaciones se toma al grupo control (1) como referencia.

Fig. 35: Expresión del mRNA de SHH en hipocampo

p<0.05 *; p< 0.01**; p<0.001***

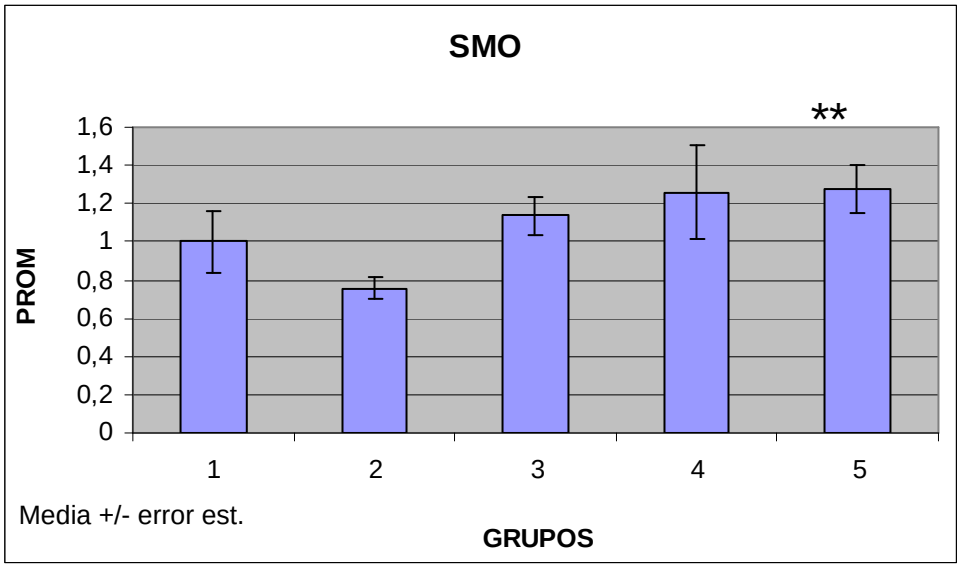


Referencias
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

Ref.
Valores normalizados a 1
En todas las comparaciones se toma al grupo control (1) como referencia.

Fig. 36: Expresión del mRNA de PTC en hipocampo

p<0.05 *; p< 0.01**; p<0.001***

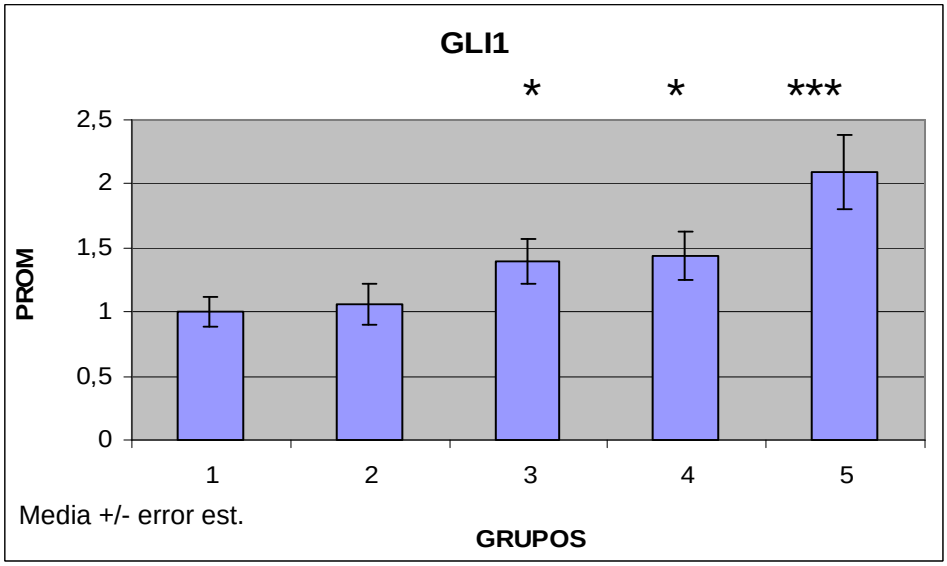


Referencias
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

Ref.
Valores normalizados a 1
En todas las comparaciones se toma al grupo control (1) como referencia.

p<0.05 *; p< 0.01**; p<0.001***

Fig. 37: Expresión del mRNA de SMO en hipocampo

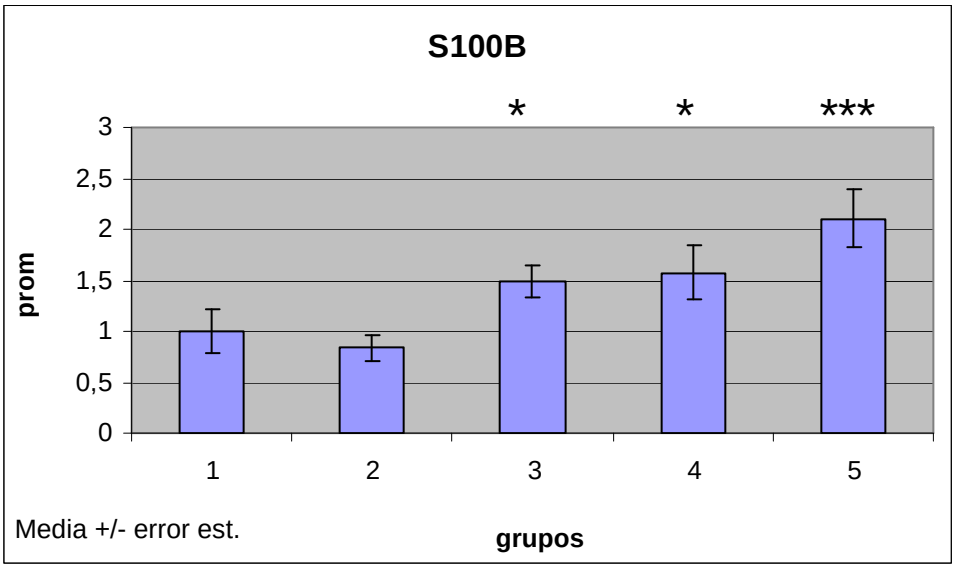


Referencias
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

Ref.
Valores normalizados a 1
En todas las comparaciones se toma al grupo control (1) como referencia.

p<0.05 *; p< 0.01**; p<0.001***

Fig. 38: Expresión del mRNA de GLI1 en hipocampo

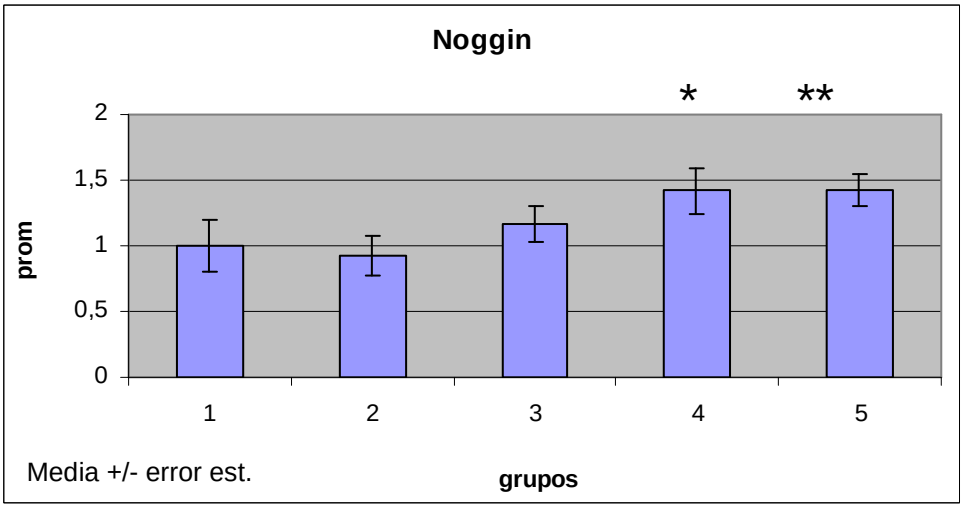


Referencias
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

Ref.
Valores normalizados a 1
En todas las comparaciones se toma al grupo control (1) como referencia.

p<0.05 *; p< 0.01**; p<0.001***

Fig. 39: Expresión del mRNA de S100β en hipocampo



Referencias
1. Control
2. Anestesia
3. Laparotomía
4. Hepatectomía
5. Gastrotomía

Ref.
Valores normalizados a 1
En todas las comparaciones se toma al grupo control (1) como referencia.

p<0.05 *; p< 0.01**; p<0.001***

Fig. 40: Expresión del mRNA de Noggin en hipocampo

Resultados Conducta:

CLASIFICACION	N° RATA	previo test			post test		
		testeo			testeo		
		Objeto Viejo	Objeto Nuevo	EPI	Objeto Viejo	Objeto Nuevo	EPI
Neurogénesis POSITIVO	1	ar 19,65	ab 14,12	-0,16	ab 4,46	ar 28,72	0,73
CONTROL	2	ar 4,13	ab 13,95	0,54	ab 6,08	ar 21,52	0,56
Neurogénesis NEGATIVO	1	ar 11,12	ab 20,92	0,3	ab 21,43	ar 2,09	-0,82
CONTROL	2	ar 19,61	ab 67,67	0,55	ab 2,25	ar 24,4	0,83

Fig. 41: Comparación de Resultados de Protocolo de conducta Neurogenesis positiva y negativa. Ref: ar, arriba; ab, abajo; EPI, índice de preferencia exploratoria

Resultados Inmunohistoquímica:

control Neuro positivo	control	anestesia	laparotomía	hepatectomía	gastrotomía	control Neuro negativo	
115	56	69	39	22	29	7	
109	69	46	37	35	31	1	
84	67	30	29	30	27	4	
88	80	77	37	34	33	0	
73	69	63	37	27	27	4	
85	70	51	37	37	33	1	
109	60	59	40	37	17	2	
86	75	56	36	34	35	4	
75	64	69	36	40	21	0	
77	54	56	43	38	36	0	
90,1	66,4	57,6	37,1	33,4	28,9	2,3	MEDIA
15,3148439	8,12677331	13,3849003	3,57304725	5,54176065	6,11827863	2,35937845	DE
4,8464696	2,57176371	4,23572794	1,13071116	1,75372172	1,93616412	0,74663875	EE
10	10	10	10	10	10	10	N

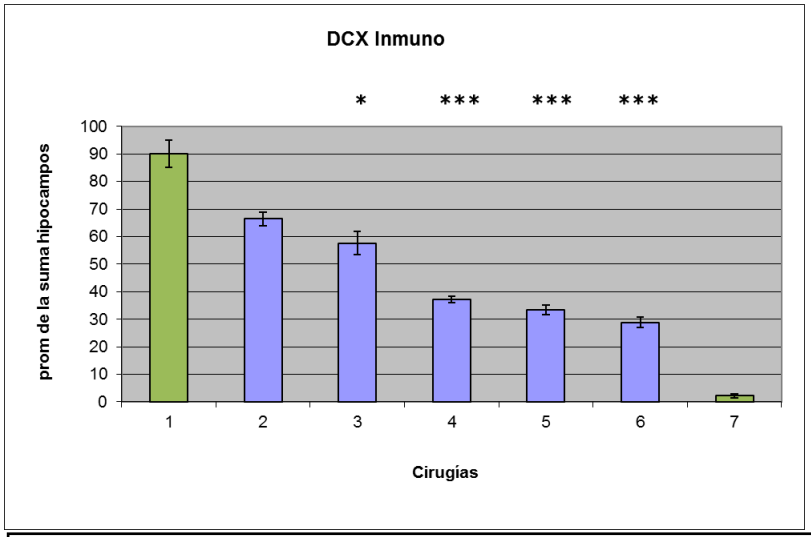


Fig. 42: Expresión de la proteína DCX en giro dentado del hipocampo a través de inmuniohistoquímica

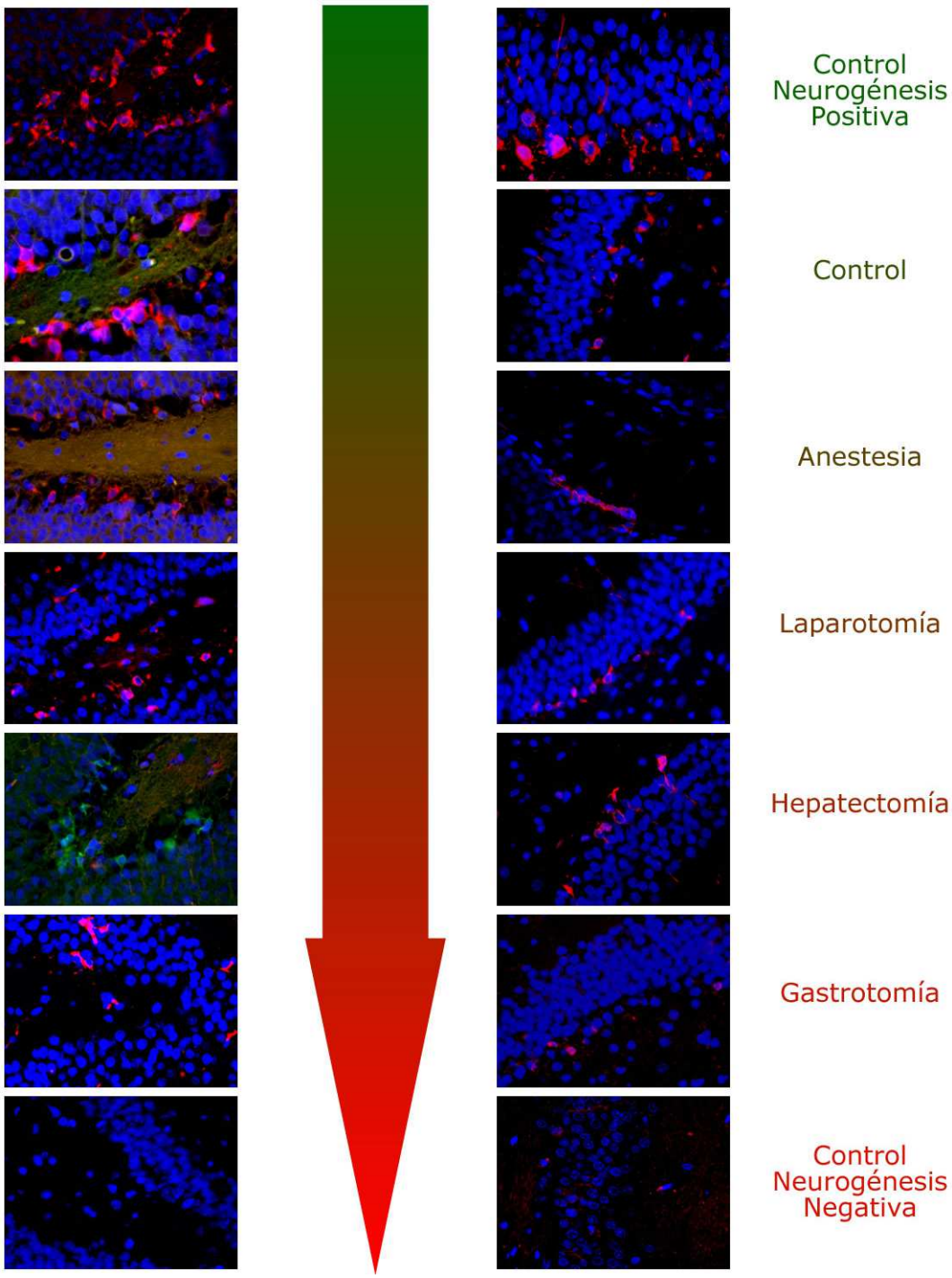


Fig.43: El esquema evidencia como decrece la neurogénesis en relación a la severidad de la intervención quirúrgica realizada. Las microfotografías corresponden a dos áreas del hipocampo donde se observan grupos de neuronas inmunoreactivas para el anticuerpo anti-Doblecortina –DCX- (rojo), contra coloración con Hoescht.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Controles:

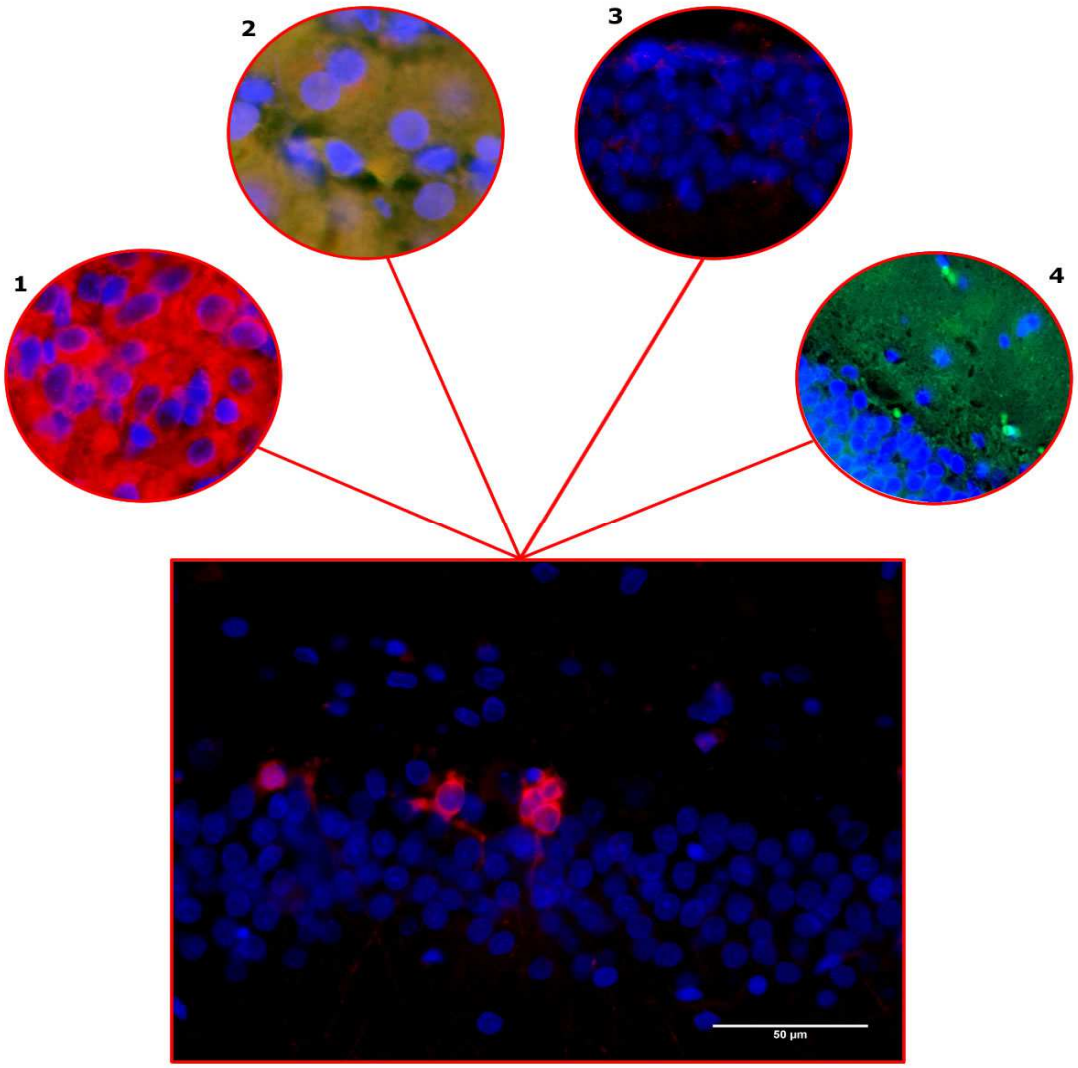


Fig.44: Microfotografía que muestra células inmunoreactivas para el anticuerpo anti-DCX en rojo (neurogenesis) en giro dentado de Hipocampo, contracoloración nuclear con Hoescht (azul). 1. Control positivo, cerebro neonato. 2. Control negativo, parénquima hepático.3. Control isotipo CD34, cerebro neonato. 4. Control anticuerpo secundario, PBS.

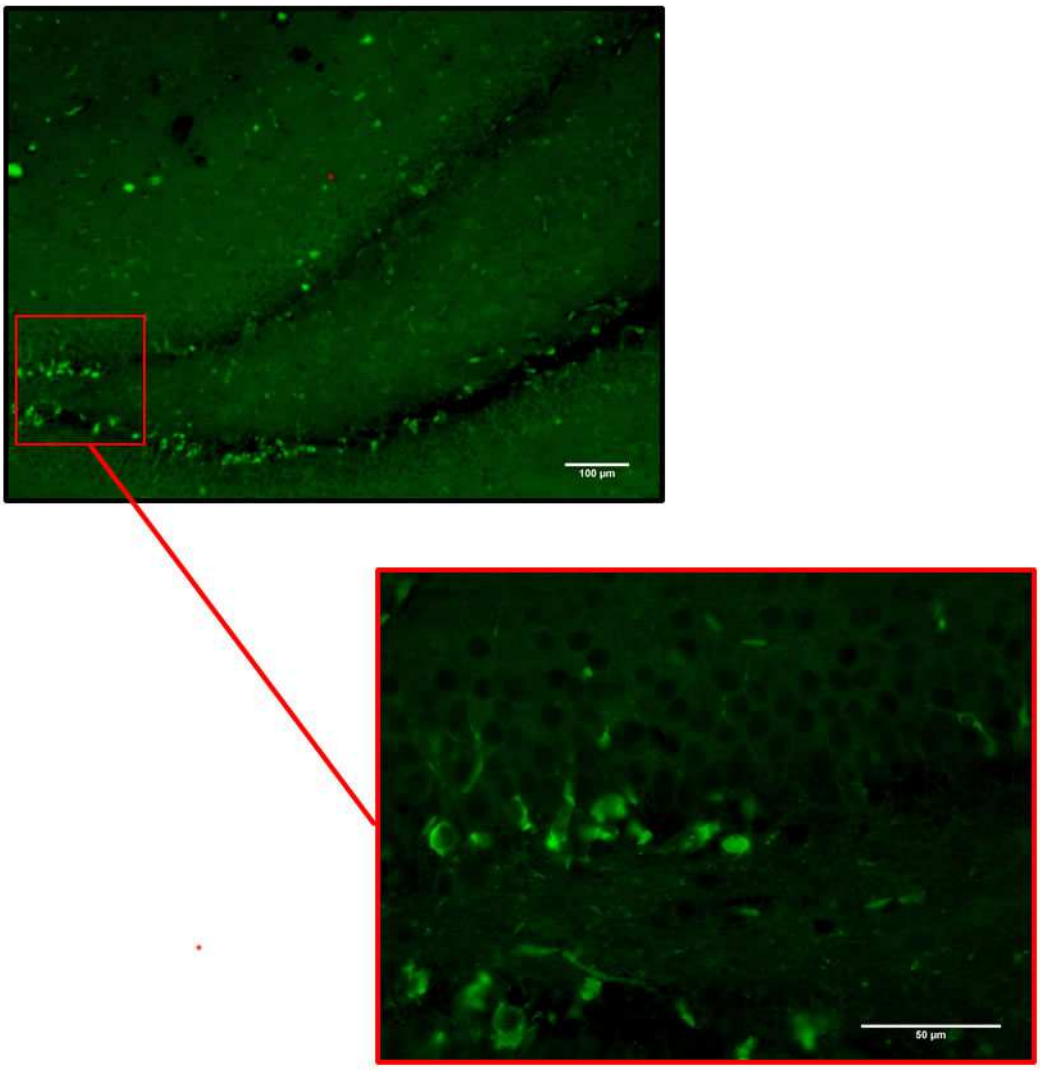


Fig.45: Microfotografía donde se observa células positivas a DCX en el GD de los animales a dos aumentos diferentes

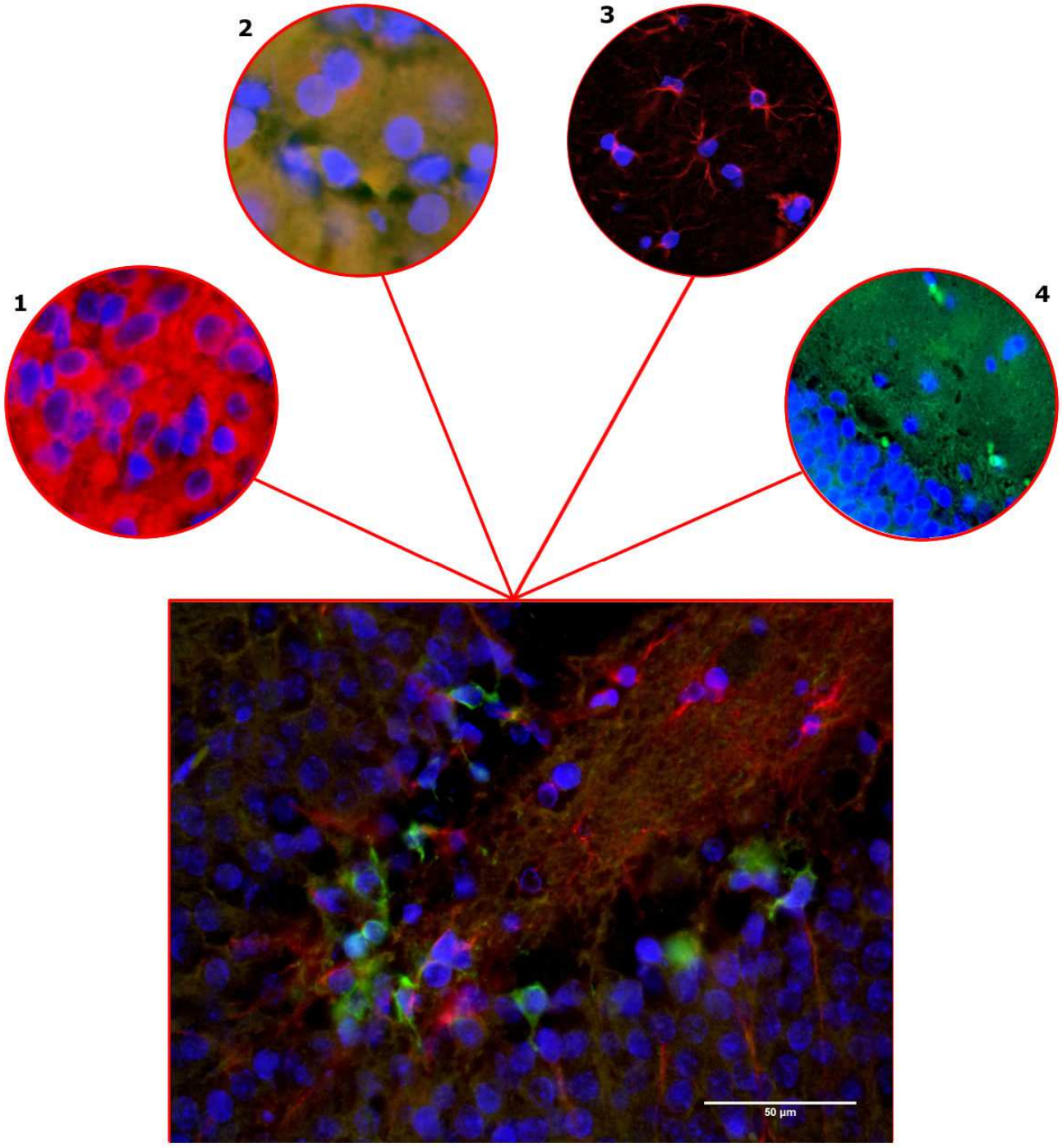


Fig.46: Microfotografía que muestra células inmunoreactivas para el anticuerpo anti-DCX en rojo (neurogenesis) y células inmunomarcadas en verde con anticuerpo anti- GFAP (astrocitos) en giro dentado de Hipocampo, contracoloración nuclear con Hoescht (azul). 1. Control positivo, cerebro neonato. 2. Control negativo, parénquima hepático.3. Control GFAP cerebro neonato. 4. Control anticuerpo secundario, PBS

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Discusión

Independientemente de los resultados técnicos de una operación quirúrgica, uno de los factores a tener en cuenta es el grado de respuesta de injuria que la misma puede producir. En este sentido, la cirugía ha sido considerada un factor importante de estrés con capacidad de generar reacciones inflamatorias e inmunosupresoras. Diversas son las cirugías en la cuales se ha comprobado un grado importante de injuria cerebral y/o cognitiva; sobre todo en las cirugías cardiacas y en adultos de mayor edad (Pruteanu L 2014; Kudoh et al 1999) Resulta, entonces, interesante desarrollar un modelo experimental en el cual evaluar el grado de impacto cerebral a la vez que cognitivo en cirugías en las cuales por la edad del paciente o tipo de procedimiento, esta injuria podría pasar desapercibida y generar daño a largo plazo.

A lo largo de esta tesis se comparo la respuesta de un animal frente a una cirugía mayor, una cirugía menor y frente a la técnica anestésica y fármacos anestésicos.

Los procedimientos quirúrgicos, tanto por la agresión tisular que se produce como por la técnica anestésica, evocan una respuesta que es proporcional a la intensidad del trauma quirúrgico. Esto fue medido por técnicas directas moleculares, como expresión de mensajeros y de proteínas, e indirectas conductuales, midiendo ansiedad y deterioro cognitivo.

Resultados de PCR en tiempo real y Western Blot

Las citoquinas proinflamatorias TNF α e IL6, son biomarcadores claves para cuantificar la respuesta inflamatoria. En nuestros resultados, tanto los ARNm de estas citoquinas evaluados en hipocampo, corteza y cerebelo (Fig.5, Fig. 10), así como sus proteínas (Fig.6 y Fig.11) evaluadas en hipocampo tenían un incremento significativo y proporcional a la severidad de la intervención quirúrgica. Lo mismo que ocurrió con los mRNA de IL 1, tipo α y β y su receptor que también aumentaron su expresión (Fig 25., Fig 26., Fig 27) en el hipocampo a medida que aumentaba el estrés quirúrgico. Existen resultados previos (Menger *et al* 2004, Desborough 2000) que muestran que la cirugía incrementa los niveles de IL6, de IL1 y de TNF α (Sasaki *et al* 2007) que, a su vez producirían (actuando en al hipotálamo) la liberación de CRH y de ACTH, ocasionando un aumento de corticosterona (Brotman *et al* 2007).

En relación a los corticoides, luego de la anestesia en nuestro modelo, se produce una disminución en la expresión del receptor MR, tanto del ARNm (Fig.15) como de su proteína (Fig.16) en el hipocampo.

Sorprendentemente, desde el punto de vista conductual, es en la prueba conductual del laberinto elevado (*Plus maze*) donde el animal que presenta mayor ansiedad es aquel al que sólo se lo anestesió (Fig.17). Esto podía ocurrir debido que la anestesia *per se* es ansiogénica lo que genera una respuesta moderada de la expresión de corticosterona, lo que genera que el receptor MR que es muy afín por esta hormona, se invagine provocando la disminución en la expresión de tanto de su mensajero como de la proteína. Suponemos que la posterior cirugía tiene algún factor modulador que atenúa esta respuesta, y estamos investigando el tema.

A la inversa que lo enunciado anteriormente el receptor GR, tanto su ARNm (Fig.21) como su proteína (Fig.22) en el hipocampo, tienden a disminuir luego de una cirugía mayor no así luego de la anestesia. El estrés generado por la cirugía mayor eleva las concentraciones de corticosterona y provoca que el receptor GR, que aunque es menos afín por esta hormona, se vuelva afín y se invagine generando la disminución en la expresión de GR.

Uno de los "blancos" del estrés en sus diferentes formas, en el hipocampo es la afectación de la generación de nuevas neuronas (Conrad *et al* 1996; Mc Ewen 1999; Czéh *et al* 2001, Mirescu et al 2006, Oomen et al 2007, Wong et al 2004). Nos ha parecido estudiar esto, ya que se ha relacionado la alteración en la neurogenesis con la presencia de estados depresivos; siendo que por otra parte estos estados son descriptos en el postoperatorio (Cassano et al 2010, Skolasky et al 2012, Ravven et al 2013). En relación a la neurogénesis, nuestros resultados indican que el estrés quirúrgico afecta la neurogénesis, evaluada esta a nivel celular, molecular, e indirectamente a través de las pruebas conductuales.

Los animales tienen una tendencia exploratoria natural hacia los objetos novedosos (Fig.24) Lo que ocurre en el grupo de cirugía mayor es que el animal pasa menos tiempo en el objeto nuevo desconocido para él en comparación con el objeto viejo (Fig.23) con el que el animal ya había sido familiarizado, evaluado a través del test RON (Test de reconocimiento de objeto novedoso que evalúa si la memoria a corto plazo se ve afectada). Esto ocurre debido a que el estrés quirúrgico ocasionado por la cirugía afecta la expresión de genes

y proteínas involucrados en la neurogénesis, por lo que el animal deja de reconocer al objeto nuevo como tal y explora el objeto viejo ,aunque ya conocido para él ,pero que no recuerda por haberse afectado la memoria de corto plazo. En relación al trofismo neuronal, disminuye en el grupo de cirugía mayor la expresión del mensajero de BDNF (Fig.28) como de su proteína (Fig.29), marcador clave en la neurogenesis, mientras que hay un aumento en el mensajero de Beta III (marcador de nuevas neuronas inmaduras), (Fig.30) como así también de su proteína (Fig. 31), el cual contrarresta la bajada en la expresión del anterior, ambos medidos en el hipocampo de los animales del grupo cirugía mayor. Al verse afectada la neurogenesis del animal debido al alto estrés quirúrgico que lo afecta, BDNF disminuye ya que la activación de los receptores de MR y GR por la presencia de corticosterona reprime la actividad trasncripcional del promotor de BDNF mientras que Beta III presente en el citoesqueleto de las células neurales aumenta su expresión quizás para re-emsamblar la red de microtubulos de las neuronas y recuperar la pérdida (; Bianchi et al 2003; Bianchi *et al* 2005; Yang *et al* 2009; Parker *et al* 2014;). Otros mensajeros que evaluamos en el hipocampo de los animales de esta tesis y que están involucrados en el proceso de neurogenesis son: el transportador de Serotonina (SERT) el cual disminuye su expresión (Fig. 32) a medida que aumenta la complejidad de la cirugía por el aumento de los glucocorticoides. Estos activan una vía cuyo producto es neurotóxico lo que provoca una reducción de la expresión de BDNF (Deltheil *et al* 2008) generando un estado de ansiedad en los animales. Doblecortina, marcador neuronal inmaduro por excelencia clave en la plasticidad del cerebro, disminuye (Fig. 33) su expresión a medida que aumenta el estrés quirúrgico, ya que la neurogenesis se ve afectada por la severidad de la intervención quirúrgica medida indirectamente por test conductuales y expresión de genes; Lo mismo ocurre con Notch, proteína conservada y muy importante de la plasticidad del cerebro que tiende a disminuir (Fig.34) a medida que aumenta la severidad de la cirugía lo que se refleja también en los test conductuales donde la memoria de corto plazo se ve afectada por el aumento del estrés quirúrgico (test RON) . SHH, protagonista de la vía de proliferación celular tiende a aumentar (Fig.35) a medida que aumenta el estrés quirúrgico al igual que sus receptores Ptc (Fig.36) y Smo (Fig.37) y el factor de transcripción más importante de la vía Gli1 (Fig.38)(factor

activante), suponemos que para contrarrestar los efectos del elevado estrés ocasionado por el aumento de la severidad de la intervención quirúrgica; S100β, que está involucrado en la respuesta adaptativa al estrés, al y Noggin, que está involucrado en la neurogenesis se elevan (Fig.39) (Fig.40) a valores significativos con el aumento de la severidad de la intervención quirúrgica) a medida que aumenta el estrés quirúrgico. Esto ocurre balancear la pérdida de otras proteínas y lograr el equilibrio del sistema.

Hemos podido constatar que el estrés generado por la intervención quirúrgica causa cambios en la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-1, TNF-α) como así también de GR y MR en el hipocampo que afectan la expresión de moléculas involucradas en el proceso de neurogénesis (BDNF, Noggin, SHH, BMP, Ptc, Smo, Gli, Beta III, S100b, Notch, DCX, SERT), generando déficit cognitivos en el animal que dependen de la severidad de la intervención. A mayor trauma quirúrgico, mayor estrés y mayor deterioro cognitivo y conductual de los animales.

Expresión	Estrés moderado	Estrés elevado
Aumentan	IL6 mRNA proteína TNF α mRNA proteína IL1 α- IL β mRNA	
Aumenta Disminuye	MR mRNA proteína	GR mRNA proteína
Aumentan	BNDF mRNA proteína SERT mRNA DCX mRNA Notch mRNA	
Disminuyen	Beta III mRNA proteína SHH, Ptc – Smo, Gli1 mRNA S100β mRNA Noggin	

Tabla resumen de expresión de genes y/o proteínas

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

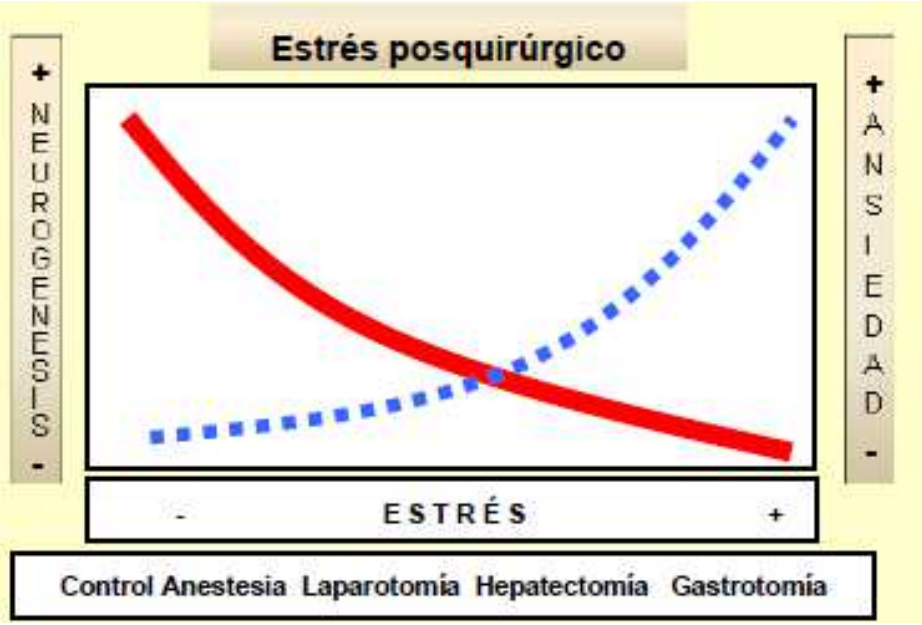
Inmuniohistoquímica

Se cuantifico DCX, marcador de neuronas inmaduras, e indirectamente de neurogenesis en el giro dentado de los animales de los diferentes grupos y se obtuvieron resultados acordes a los anteriormente obtenidos en PCR en tiempo real y Western Blot. A medida que aumenta el estrés quirúrgico producto de aumentar la complejidad de la cirugía la expresión de DCX disminuye (Fig.42), o sea la neurogenesis propiamente dicha disminuyó. Como control del anticuerpo DCX, hicimos inmuniohistoquímica en el giro dentado de DCX y de GFAP con contracoloración nuclear con Hoescht (Fig.46). Lo que vimos fue que todas las células que marcaban DCX no marcaban GFAP, es decir que no había comarcacion del anticuerpo.

Como controles positivos y negativos para comparar el grado de neurogenesis se utilizaron dos grupos. El control positivo de neurogenesis (exposición diaria a la rueda de entrenamiento (Couillard-Despress *et al* 2005; Ehninger *et al* 2003; Engesser-Cesar *et al* 2007; Naylor *et al* 2005) dio valores mas elevados (Fig. 41) que los obtenidos en el grupo sin intervención ($p<0.004$ ANOVA). Por otro lado, el grupo de control negativo (irradiación focalizada sobre el hipocampo (Mizumatsu *et al* 2003; Tada *et al* 2000; Santarelli *et al* 2003; Saxe *et al* 2007; Sun *et al* 2013) dio valores por debajo de la cirugía mayor ($p<0.0001$ ANOVA) y el grupo sin intervención ($p<0.0001$ ANOVA) (Fig.41).

Conclusión

Los procedimientos quirúrgicos, tanto por la agresión tisular que se produce como por la técnica anestésica, evocan una respuesta neuroendocrina que es proporcional a la intensidad del trauma quirúrgico y que conlleva a efectos negativos sobre la conducta de los animales.



El estrés quirúrgico afecta tanto el sistema endocrino neural como inmune generando cambios en la expresión de genes asociados que podrían ser los responsables del déficit cognitivo observado en los animales de este estudio

La respuesta al estrés quirúrgico produce una serie de estímulos que determinan una reacción del organismo en el proceso de restaurar la homeostasis. Entre los estímulos que podemos encontrar están las alteraciones que activan el SNC y con el, al eje HPA, los cuales a su vez ejercen influencia sobre el sistema inmune y por ultimo sobre la conducta de los animales (aprendizaje, memoria y ansiedad).

El perfil de las concentraciones elevadas de los corticosteroides (MR y GR) circulantes en respuesta al estrés quirúrgico tiene efectos nocivos para el organismo de los animales. Debido a que existen receptores para estos en múltiples órganos del cuerpo, por lo que un aumento y/o disminución afecta directamente a la homeostasis de la rata ya que el desequilibrio de un sistema conlleva al desequilibrio de otro y así sucesivamente con los sistemas

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

involucrados en la respuesta al estrés (sistema nervioso, sistema endocrino, sistema inmune)

En este trabajo hemos encontrado un importante número de genes cuyos niveles de expresión de mRNA disminuyen en el hipocampo de las ratas sometidas al estrés agudo quirúrgico, mientras que otros genes aumentan para compensar esta disminución y llegar así al equilibrio.

Las proteínas codificadas por los genes regulados de manera diferencial en el hipocampo de animales estresados identificados en este trabajo se comportaron de igual manera que sus mRNA disminuyendo y/o aumentando su expresión según correspondía.

La disminución del marcador DCX en el hipocampo de los animales es un indicador del daño ocasionado por el estrés quirúrgico. DCX disminuye a medida que aumenta el estrés generado por la cirugía, o sea la neurogenesis disminuye significativamente en respuesta al trauma por los efectos negativos que tiene el estrés sobre el sistema.

La respuesta conductual de los animales es reflejo de los procesos que en ellos ocurren. El aumento de la ansiedad y la disminución de la memoria a corto plazo son las variables afectadas en respuesta a la injuria quirúrgica.

La aplicabilidad de este trabajo radica en que no se han elucidado hasta el momento los mecanismos cerebrales que pudieran resultar de los diversos grados de estrés quirúrgico en situaciones que modelan la cirugía clínica por lo que el trabajo realizado en esta tesis aporta luz sobre este tema y permite comprender los complejos mecanismos de respuesta y adaptación del cerebro a la injuria quirúrgica, y como esta desata una serie de cascadas que determina el éxito o fracaso de una cirugía.

Es necesario de todos modos considerar investigaciones posteriores para profundizar en el entendimiento de los mecanismos de acción del estrés quirúrgico y así establecer la aplicabilidad clínica del presente estudio.

Referencias:

- Agathocleous M, Locker M, Harris WA, et al. A general role of hedgehog in the regulation of proliferation. Cell Cycle. 2007;6(2):156-9.
- Akil H, Morano I. Stress: the fourth generation of progress. En: Bloom FE, Kupfer D, eds. Psychopharmacology. New York: Raven Press; 1995. p. 773-85.
- Altman J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? Science. 1962; 135(3509):1127-8.
- Altman J. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. Anat Rec. 1963; 145:573-91.
- Angele MK, Chaudry IH. Surgical trauma and immunosuppression: pathophysiology and potential immunomodulatory approaches. Langenbecks Arch Surg. 2005; 390(4):333-41.
- Aza-Blanc P, Lin HY, Ruiz i Altaba A, et al. Expression of the vertebrate Gli proteins in Drosophila reveal a distribution of activator and repressor activities. Development. 2000; 127(19):4293-301.
- Bernard C. Leçons sur les propriétés physiologiques et les altérations pathologiques des liquides de l'organisme. Paris: J.B. Baillière; 1989. 2 vol.
- Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, et al. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. Nat Immunol. 2001;2(2):172-80.
- Bianchi M, Heidbreder C, Crespi F. Cytoskeletal changes in the hippocampus following restraint stress: role of serotonin and microtubules. Synapse. 2003; 49(3):188-94.
- Bianchi M, Hagan JJ, Heidbreder CA. Neuronal plasticity, stress and depression: involvement of the cytoskeletal microtubular system? Curr Drug Targets CNS Neurol Disord. 2005; 4(5):597-611.
- Brotman DJ, Golden SH, Wittstein IS. The cardiovascular toll of stress. Lancet. 2007; 370(9592):1089-100. Errata en: Lancet. 2007; 370(9602):1828.

- Buyukkocak U, Caglayan O, Daphan C, et al. Similar effects of general and spinal anaesthesia on perioperative stress response in patients undergoing haemorrhoidectomy. Mediators Inflamm. 2006; 2006(1):97257.
- Cai C, Thorne J, Grabel L. Hedgehog serves as a mitogen and survival factor during embryonic stem cell neurogenesis. Stem Cells. 2008; 26(5):1097-108.
- Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, et al. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. Neuroscience. 1993; 56(2):337-44.
- Cannon, W. Bodily changes in pain, hunger, fear and rage. Am J Psychiatry*. 1930;* 86(4):770-1.
- Cassano P, Argibay P. Depresión y neuroplasticidad. Interacción de los sistemas nervioso, endocrino e inmune. Medicina (B Aires). 2010; 70(2):185-93.
- Christie BR, Cameron HA. Neurogenesis in the adult hippocampus. Hippocampus. 2006; 16(3):199-207.
- Choileain NN, Redmond HP. Cell response to surgery. Arch Surg. 2006; 141(11):1132-40.
- Conrad CD, Galea LA, Kuroda Y, et al. Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine pretreatment. Behav Neurosci. 1996; 110(6):1321-34.
- Chao HM, Sakai RR, Ma LY, et al. Adrenal steroid regulation of neurotrophic factor expression in the rat hippocampus. Endocrinology. 1998; 139(7):3112-8.
- Chambers CB, Peng Y, Nguyen H, et al. Spatiotemporal selectivity of response to Notch1 signals in mammalian forebrain precursors. Development. 2001; 128(5):689-702.
- Charney D, Grillon C, Bremmer D. The neurobiological basis of anxiety and fear: circuits, mechanisms and neurochemical interactions (Part 1). *Neuroscientist*. 1998; 4(1):35-44.
- Costa RM, Honjo T, Silva AJ. Learning and memory deficits in Notch mutant mice. Curr Biol. 2003; 13(15):1348-54.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

- Czéh B, Michaelis T, Watanabe T, et al. Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98(22):12796-801.
- De Kloet ER. Hormones, brain and stress. Endocr Regul. 2003; 37(2):51-68.
- De Kloet ER, Joëls M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. Nat Rev Neurosci. 2005;6(6):463-75.
- Delbende C, Delarue C, Lefebvre H, et al. Glucocorticoids, transmitters and stress. Br J Psychiatry Suppl. 1992 ;(15):24-35.
- Deltheil T, Guiard BP, Guilloux JP, et al. Consequences of changes in BDNF levels on serotonin neurotransmission, 5-HT transporter expression and function: studies in adult mice hippocampus. Pharmacol Biochem Behav. 2008; 90(2):174-83.
- DeKeyser FG, Leker RR, Weidenfeld J. Activation of the adrenocortical axis by surgical stress: involvement of central norepinephrine and interleukin-1. Neuroimmunomodulation. 2000; 7(4):182-8.
- Derenzo J, Macknight B, DiVittore NA, et al. Postoperative elevated cortisol excretion is not associated with suppression of 6-sulfatoxymelatonin excretion. Acta Anaesthesiol Scand. 2005;49(1):52-7.
- Desborough JP. The stress response to trauma and surgery. Br J Anaesth. 2000; 85(1):109-17.
- Di Padova F, Pozzi C, Tondre MJ, et al. Selective and early increase of IL-1 inhibitors, IL-6 and cortisol after elective surgery. Clin Exp Immunol. 1991; 85(1):137-42.
- Escobar Izquierdo A, Gómez González B. Estrés y memoria. Rev Mex Neurosci. 2006; 7(1):8-14.
- Fink G, ed. Stress science: neuroendocrinology. Maryland, MD: Academic Press/Elsevier; 2009. p. 829.
- Fogal B, Hewett SJ. Interleukin-1beta: a bridge between inflammation and excitotoxicity? J Neurochem. 2008; 106(1):1-23.

- Forget H, Lacroix A, Cohen H. Persistent cognitive impairment following surgical treatment of Cushing's syndrome. Psychoneuroendocrinology. 2002; 27(3):367-83.
- Foy MR. Ovarian hormones, aging and stress on hippocampal synaptic plasticity. Neurobiol Learn Mem. 2011; 95(2):134-44.
- Fraga MC, de Moura EG, da Silva Lima N, et al. Anxiety-like, novelty-seeking and memory/learning behavioral traits in male Wistar rats submitted to early weaning. Physiol Behav. 2014; 124:100-6.
- Gögenur I, Middleton B, Kristiansen VB, et al. Disturbances in melatonin and core body temperature circadian rhythms after minimal invasive surgery. Acta Anaesthesiol Scand. 2007; 51(8):1099-106.
- Goldman SA, Nottebohm F. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. Proc Natl Acad Sci USA. 1983; 80(8):2390-4.
- Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. Cytokines. Immunology. 4th ed. New York: WH Freeman; 1999. p. 301-27.
- Gómez JL, Luine VN. Female rats exposed to stress and alcohol show impaired memory and increased depressive-like behaviors. Physiol Behav. 2014; 123:47-54.
- Goshen I, Yirmiya R. Interleukin-1 (IL-1): a central regulator of stress responses. Front Neuroendocrinol. 2009; 30(1):30-45.
- Gould E, Woolley CS, Cameron HA, et al. Adrenal steroids regulate postnatal development of the rat dentate gyrus: II. Effects of glucocorticoids and mineralocorticoids on cell birth. J Comp Neurol. 1991; 313(3):486-93.
- Gould E, Tanapat P. Stress and hippocampal neurogenesis. Biol Psychiatry. 1999; 46(11):1472-9.
- Hildebrandt U, Kessler K, Plusczyk T, et al. Comparison of surgical stress between laparoscopic and open colonic resections. Surg Endosc. 2003; 17(2):242-6.
- Hoch RC, Rodríguez R, Manning T, et al. Effects of accidental trauma on cytokine and endotoxin production. Crit Care Med. 1993;21(6):839-45

- Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. Genes Dev. 1996; 10(13):1580-94.
- Hynes M, Stone DM, Dowd M, et al. Control of cell pattern in the neural tube by the zinc finger transcription factor and oncogene Gli-1. Neuron. 1997; 19(1):15-26.
- Imai E, Miner JN, Mitchell JA, et al. Glucocorticoid receptor-cAMP response element-binding protein interaction and the response of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene to glucocorticoids. J Biol Chem. 1993; 268(8):5353-6.
- Jacobson L, Sapolsky R. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. Endocr Rev. 1991; 12(2):118-34.
- Jiménez Rubio G, Bellón Velasco A, Ortíz López L, et al. El neurocitoesqueleto: un nuevo blanco terapéutico para el tratamiento de la depresión. Salud Mental. 2007; 30(2):1-10.
- Joëls M, de Kloet ER. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. Prog Neurobiol. 1994; 43(1):1-36.
- Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, et al. Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. Cell. 1990; 62(6):1189-204.
- Kaplan MS. Formation and turnover of neurons in young and senescent animals: an electronmicroscopic and morphometric analysis. Ann N Y Acad Sci. 1985; 457:173-92.
- Kaplan MS, Hinds JW. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. Science. 1977; 197(4308):1092-4.
- Kasiwabara M, Miyashita MN, Nomura T, et al. Surgical trauma-induced adrenal insufficiency is associated with postoperative inflammatory responses. J Nippon Med Sch. 2007; 74(4):247-83.
- Keller-Wood ME, Dallman MF. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. Endocr Rev. 1984; 5(1):1-24.

- Kim JJ, Foy MR, Thompson RF. Behavioral stress modifies hippocampal plasticity through N-methyl-D-aspartate receptor activation. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93(10):4750-3.
- Kim JJ, Diamond DM. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. Nat Rev Neurosci. 2002; 3(6):453-62.
- Kim JJ, Yoon KS. Stress: metaplastic effects in the hippocampus. Trends Neurosci. 1998; 21(12):505-9.
- Kleindienst A, McGinn MJ, Harvey HB, et al. Enhanced hippocampal neurogenesis by intraventricular S100B infusion is associated with improved cognitive recovery after traumatic brain injury. J Neurotrauma. 2005; 22(6):645-55.
- Kondo T, Johnson SA, Yoder MC, et al. Sonic hedgehog and retinoic acid synergistically promote sensory fate specification from bone marrow-derived pluripotent stem cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2005; 102(13):4789-94.
- Kudoh A, Ishihara H, Matsuki A. Response to surgical stress in elderly patients and Alzheimer's disease. Can J Anaesth. 1999;46(3):247-52.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. J Neurosci. 1996; 16(6):2027-33.
- Kuo CP, Jao SW, Chen KM, et al. Comparison of the effects of thoracic epidural analgesia and i.v. infusion with lidocaine on cytokine response, postoperative pain and bowel function in patients undergoing colonic surgery. Br J Anaesth. 2006; 97(5):640-6.
- Kutsuna N, Suma T, Takada Y, et al. Decrease in doublecortin expression without neuronal cell death in rat retrosplenial cortex after stress exposure. Neuroreport. 2012; 23(4):211-5.
- Landfield PW, Waymire JC, Lynch G. Hippocampal aging and adrenocorticoids: quantitative correlations. Science. 1978;202(4372):1098-102.
- Lee J, Platt KA, Censullo P, et al. Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. Development. 1997; 124(13):2537-52.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

- Litingtung Y, Chiang C. Specification of ventral neuron types is mediated by an antagonistic interaction between Shh and Gli3. Nat Neurosci. 2000;3(10):979-85.
- Loddick SA, Turnbull AV, Rothwell NJ. Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. J Cereb Blood Flow Metab. 1998; 18(2):176-9.
- Lucassen PJ, Meerlo P, Naylor AS, et al. Regulation of adult neurogenesis by stress, sleep disruption, exercise and inflammation: Implications for depression and antidepressant action. Eur Neuropsychopharmacol. 2010; 20(1):1-17.
- Luster MI. Inflammation, tumor necrosis factor, and toxicology. Environ Health Perspect. 1998;106(9):A418-9.
- Lykkegaard K, Lauritzen B, Tessem L, et al. Local anaesthetics attenuates spinal nociception and HPA-axis activation during experimental laparotomy in pigs. Res Vet Sci. 2005; 79(3):245-51.
- Maggio N, Segal M. Corticosteroid regulation of synaptic plasticity in the hippocampus. ScientificWorldJournal. 2010;10:462-9.
- Maggio N, Shavit-Stein E, Dori A, et al. Prolonged systemic inflammation persistently modifies synaptic plasticity in the hippocampus: modulation by the stress hormones. Front Mol Neurosci. 2013 Dec 4;6:46.
- Mairesse J, Lesage J, Breton C, et al. Maternal stress alters endocrine function of the feto-placental unit in rats. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2007;292(6):E1526-33.
- Mantovani G, Maccio A, Pisano M, et al. Tumor-associated lympho-monocytes from neoplastic effusions are immunologically defective in comparison with patient autologous PBMCs but are capable of releasing high amounts of various cytokines. Int J Cancer. 1997; 71(5):724-31.
- Margis R, Zanatto VC, Tramontina F, et al. Changes in S100B cerebrospinal fluid levels of rats subjected to predator stress. Brain Res. 2004; 1028(2):213-8.
- Mattson MP, Duan W, Wan R, et al. Prophylactic activation of neuroprotective stress response pathways by dietary and behavioral manipulations. NeuroRx. 2004; 1(1):111-6.

- McEwen BS. Effects of adverse experiences for brain structure and function. Biol Psychiatry. 2000; 48(8):721-31.
- McEwen BS. Stress and hippocampal plasticity. Annu Rev Neurosci. 1999; 22:105-22.
- McEwen BS. Stress and the aging hippocampus. Front Neuroendocrinol. 1999; 20(1):49-70.
- Meduri GU, Headley S, Kohler G, et al. Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time. Chest. 1995; 107(4):1062-73.
- Mehler MF, Mabie PC, Zhang D, et al. Bone morphogenetic proteins in the nervous system. Trends Neurosci. 1997; 20(7):309-17.
- Memberg SP, Hall AK. Dividing neuron precursors express neuron-specific tubulin. J Neurobiol. 1995; 27(1):26-43.
- Menezes JR, Luskin MB. Expression of neuron-specific tubulin defines a novel population in the proliferative layers of the developing telencephalon. J Neurosci. 1994; 14(9):5399-416.
- Menger MD, Vollmar B. Surgical trauma: hyperinflammation versus immunosuppression? Langenbecks Arch Surg. 2004; 389(6):475-84.
- Miller AH, Pariante CM, Pearce BD. Effects of cytokines on glucocorticoid receptor expression and function. Glucocorticoid resistance and relevance to depression. Adv Exp Med Biol. 1999; 461:107-16.
- Miller DB, O'Callaghan JP. Aging, stress and the hippocampus. Ageing Res Rev. 2005; 4(2):123-40.
- Mirescu C, Gould E. Stress and adult neurogenesis. Hippocampus. 2006;16(3):233-8.
- Mo R, Freer AM, Zinyk DL, et al. Specific and redundant functions of Gli2 and Gli3 zinc finger genes in skeletal patterning and development. Development. 1997; 124(1):113-23.
- Molloy RG, Mannick JA, Rodrick ML. Cytokines, sepsis and immunomodulation. Br J Surg. 1993; 80(3):289-97.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

- Neveu PJ, Liège S. Mechanisms of behavioral and neuroendocrine effects of interleukin-1 in mice. Ann N Y Acad Sci. 2000; 917:175-85.
- Newcomer JW, Craft S, Hershey T, et al. Glucocorticoid-induced impairment in declarative memory performance in adult humans. J Neurosci. 1994;14(4):2047-53.
- Oregon Health & Science University. Good chemical, neurons in brain elevated among exercise addicts [Internet]. [Consulta: 20/02/2015]. ScienceDaily. 2003; September 29. Disponible en: http://www.sciencedaily.com/releases/2003/09/030929053719.htm

- Ohzato H, Yoshizaki K, Nishimoto N, et al. Interleukin-6 as a new indicator of inflammatory status: detection of serum levels of interleukin-6 and C-reactive protein after surgery. Surgery. 1992;111(2):201-9.
- Olivier JD, Van Der Hart MG, Van Swelm RP, et al. A study in male and female 5-HT transporter knockout rats: an animal model for anxiety and depression disorders. Neuroscience. 2008; 152(3):573-84.
- Oomen CA, Mayer JL, de Kloet ER, et al. Brief treatment with the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone normalizes the reduction in neurogenesis after chronic stress. Eur J Neurosci. 2007;26(12):3395-401.
- Ordemann J, Jacobi CA, Schwenk W, et al. Cellular and humoral inflammatory response after laparoscopic and conventional colorectal resections. Surg Endosc. 2001; 15(6):600-8.
- Owens MJ, Nemeroff CB. Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter. Clin Chem. 1994;40(2):288-95.
- Palma V, Ruiz i Altaba A. Hedgehog-GLI signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. Development. 2004; 131(2):337-45.
- Palmer TD, Ray J, Gage FH. FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. Mol Cell Neurosci. 1995; 6(5):474-86.

- Parker AL, Kavallaris M, McCarroll JA. Microtubules and their role in cellular stress in cancer. Front Oncol. 2014;4:153.
- Paton JA, Nottebohm FN. Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. Science. 1984; 225(4666):1046-8.
- Pruteanu LM. Predictors of postsurgical stress among cardiac patients. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi. 2014; 118(2):508-13.
- Radley JJ, Sisti HM, Hao J, et al. Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. Neuroscience. 2004; 125(1):1-6.
- Ramón y Cajal S. Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso. Madrid: Hijos de Nicolás Moya; 1914.
- Ramón y Cajal S. Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. Paris ; 1911.
- Ramón y Cajal S. Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados. Estudios sobre el plan estructural y composición histológica de los centros nerviosos, adicionados de consideraciones fisiológicas fundadas en los nuevos descubrimientos. Madrid: Imprenta y Librería de Nicolás Moya. 1899-1905. 2 tomos en 3 volúmenes (1905).
- Ravven S, Bader C, Azar A, et al. Depressive symptoms after CABG surgery: a meta-analysis. Harv Rev Psychiatry. 2013; 21(2):59-69.
- Rayevsky KS, Bondarenko NA, Kudrin VS, et al. Cognitive deficiency induced by the acute stress in rats: a possible role of brain catecholaminergic systems. Ann Ist Super Sanita. 1990; 26(1):25-9.
- Re F, Muzio M, De Rossi M, et al. The type II "receptor" as a decoy target for interleukin 1 in polymorphonuclear leukocytes: characterization of induction by dexamethasone and ligand binding properties of the released decoy receptor. J Exp Med. 1994; 179(2):739-43.
- Ruiz i Altaba A. Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. Development. 1999; 126(14):3205-16.
- Ruiz i Altaba A, Mas C, Stecca B. The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. Trends Cell Biol. 2007;17(9):438-47.

- Ruzek MC, Miller AH, Opal SM, Pearce BD, Biron CA. Characterization of early cytokine responses and an interleukin (IL)-6-dependent pathway of endogenous glucocorticoid induction during murine cytomegalovirus infection. J Exp Med. 1997; 185(7):1185-92.
- Sakamoto K, Arakawa H, Mita S, et al. Elevation of circulating interleukin 6 after surgery: factors influencing the serum level. Cytokine. 1994;6(2):181-6.
- Salmon P. Psychological factors in surgical stress: Implications for management. Clin Psychol. 1992; 12(7):681-704.
- Sandi C, Loscertales M, Guaza C. Experience-dependent facilitating effect of corticosterone on spatial memory formation in the water maze. Eur J Neurosci. 1997;9(4):637-42.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. Endocr Rev. 1986;7(3):284-301.
- Sasaki N, Kikuchi S, Konno S, et al. Anti-TNF-alpha antibody reduces pain-behavioral changes induced by epidural application of nucleus pulposus in a rat model depending on the timing of administration. Spine (Phila Pa 1976). 2007; 32(4):413-6.
- Sato N, Koeda K, Ikeda K, et al. Randomized study of the benefits of preoperative corticosteroid administration on the postoperative morbidity and cytokine response in patients undergoing surgery for esophageal cancer. Ann Surg. 2002; 236(2):184-90.
- Scaccianoce S, Del Bianco P, Pannitteri G, et al. Relationship between stress and circulating levels of S100B protein. Brain Res. 2004;1004(1-2):208-11.
- Schaaf MJ, De Kloet ER, Vreugdenhil E. Corticosterone effects on BDNF expression in the hippocampus. Implications for memory formation. Stress. 2000; 3(3):201-8.
- Shapira-Lichter I, Beilin B, Ofek K, et al. Cytokines and cholinergic signals co-modulate surgical stress-induced changes in mood and memory. Brain Behav Immun. 2008; 22(3):388-98.

- Skolasky RL, Riley LH 3rd, Maggard AM, et al. The relationship between pain and depressive symptoms after lumbar spine surgery. Pain. 2012; 153(10):2092-6.
- Snyder JS, Soumier A, Brewer M, et al. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. Nature. 2011; 476(7361):458-61.
- Spasojevic N, Jovanovic P, Dronjak S. Molecular basis of chronic stress-induced hippocampal lateral asymmetry in rats and impact on learning and memory. Acta Physiol Hung. 2013; 100(4):388-94.
- Stone DM, Hynes M, Armanini M, et al. The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. Nature. 1996;384(6605):129-34.
- Swaab DF, Bao AM, Lucassen PJ. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. Ageing Res Rev. 2005;4(2):141-94.
- Tolwani RJ, Buckmaster PS, Varma S, et al. BDNF overexpression increases dendrite complexity in hippocampal dentate gyrus. Neuroscience. 2002; 114(3):795-805.
- Valladares Mendías JC, Alaminos Mingorance M, Castejón Casado J, et al. Estrés quirúrgico y activación hipófiso-suprarrenal en edad pediátrica. Cir Pediatr. 2000; 13(4):145-9.
- van den Heuvel M, Ingham PW. Smoothened encodes a receptor-like serpentine protein required for hedgehog signalling. Nature. 1996; 382(6591):547-51.
- Van Stegeren AH. Imaging stress effects on memory: a review of neuroimaging studies. Can J Psychiatry. 2009; 54(1):16-27.
- Venero C, Tilling T, Hermans-Borgmeyer I, et al. Chronic stress induces opposite changes in the mRNA expression of the cell adhesion molecules NCAM and L1. Neuroscience. 2002; 115(4):1211-9.
- Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS, et al. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. J Neurosci. 2002;22(15):6810-8.

- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. Cell Death Differ. 2003; 10(1):45-65.
- Watanabe Y, Gould E, McEwen BS. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. Brain Res. 1992; 588(2):341-5.
- Weidenfeld J, Abramsky O, Ovadia H. Evidence for the involvement of the central adrenergic system in interleukin 1-induced adrenocortical response. Neuropharmacology. 1998; 28(12):1411-44.
- Weinstock M. Does prenatal stress impair coping and regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis? Neurosci Biobehav Rev. 1997; 21(1):1-10.
- Wellman CL. Dendritic reorganization in pyramidal neurons in medial prefrontal cortex after chronic corticosterone administration. J Neurobiol. 2001;49(3):245-53.
- Winner B, Cooper-Kuhn CM, Aigner R, et al. Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. Eur J Neurosci. 2002; 16(9):1681-9.
- Wong EY, Herbert J. The corticoid environment: a determining factor for neural progenitors' survival in the adult hippocampus. Eur J Neurosci. 2004; 20(10):2491-8.
- Yang C, Wang G, Wang H, et al. Cytoskeletal alterations in rat hippocampus following chronic unpredictable mild stress and re-exposure to acute and chronic unpredictable mild stress. Behav Brain Res. 2009; 205(2):518-24.
- Zhou JX, Jia LW, Liu WM, et al. Role of sonic hedgehog in maintaining a pool of proliferating stem cells in the human fetal epidermis. Hum Reprod. 2006; 21(7):1698-704.