

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA



**Efecto del estrés en las etapas tempranas de la vida sobre la
proliferación celular en el hipocampo de ratas adultas.**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

P R E S E N T A

CARLOS ALFREDO GARCÍA CRUZ

DIRECTORA DE TESIS:

D.C. NAIMA LAJUD ÁVILA

Morelia, Mich. Mayo de 2021



El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Neurobiología del Desarrollo de la División, de Neurociencias del Centro de Investigación Biomédica de Michoacán del Instituto Mexicano del Seguro Social, en el marco del protocolo de investigación titulado: "Caracterización del efecto del enriquecimiento ambiental sobre la neurogénesis hipocampal y el desempeño cognoscitivo en un modelo combinado de lesión cerebral traumática y maltrato infantil en ratas" con número de registro ante el comité nacional de investigación en salud no: R-2016-785-054. El cual, contó con apoyo financiero completo del fondo sectorial de investigación en salud y seguridad social CONACyT/FOSISS No: FIS/IMSS/PROT/1769.

Índice

Agradecimientos.....	4
Introducción.....	7
Marco teórico.....	9
El concepto de estrés.....	9
El eje HPA y la respuesta al estrés	10
Neurogénesis adulta.....	15
Efecto del estrés sobre la neurogénesis adulta.....	19
Estrés en las etapas tempranas de la vida (ELS).....	20
Modelos de ELS: Separación maternal (MS)	21
Antecedentes	23
Justificación.....	24
Hipótesis	25
Objetivos	25
Material y métodos	26
Resultados	30
Discusión.....	33
Conclusión.....	35
Bibliografía	36

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud hacia mi asesora, la Dra. Naima Lajud Ávila por brindarme la oportunidad de realizar el presente estudio, guiarme durante cada paso de éste con apoyo y comprensión hasta su término.

Mi mayor agradecimiento hacia mis padres. A mi madre, fuente de vida e inspiración en esencia, quien depositó confianza y esperanza en mí y no dudó en apoyar mis decisiones. A mi padre, fuente de energía y fortaleza; reservado en su carácter, pero de una calidez enorme.

Gracias a mis sinodales por su amabilidad y obsequiarme de su tiempo para ser partícipes de este proyecto; y a los excelentes docentes que me encontré en el camino, cuya pesada, pero gratificante labor, rinde los mejores frutos.

A mis amigos y a todos aquellos dentro y fuera de nuestro de investigación que de alguna manera contribuyeron a que este estudio se llevara a cabo.

A la curiosidad, por ser un incansable motor en el ánimo del ser humano y detonante de nuevos caminos y descubrimientos.

A la música, refugio y compañero de travesía; aguas tonificantes y fuente de inspiración.

RESUMEN

Diversos estudios muestran una correlación significativa entre las personas que padecieron estrés en las etapas tempranas de la vida (ELS) con aquellas que tienen una susceptibilidad mayor a padecer trastornos neuropsicopatológicos durante la adultez. Sin embargo, aún es necesario esclarecer los mecanismos y las condiciones bajo las cuales el ELS puede afectar el desarrollo estructural y funcional del cerebro, y de qué manera estos efectos se ven prolongados durante la adultez y si existe la posibilidad de revertirlos. En este estudio empleamos el modelo de separación maternal (MS) para obtener información sobre los efectos del ELS en la neurogénesis adulta, específicamente sobre la etapa de proliferación celular y determinar si éstos afectan el desarrollo posnatal de la zona subgranular (SGZ) que conlleve a una modificación a largo plazo de la estructura y función del hipocampo. Nuestros resultados indican que la MS no tiene efecto sobre la proliferación celular en la SGZ y tampoco observamos efecto significativo de la MS sobre el volumen de la SGZ. Al evaluar el fenotipo de las células que se encontraban proliferando, observamos que la MS no afecta el número de células Ki67+ con fenotipo GFAP. Finalmente, encontramos que los progenitores neurales que se encuentran activos en el nicho neurogénico adulto pertenecen a una población diferente que aquellos que proliferan durante el periodo de exposición al estrés. No obstante, solo nos fue posible la identificación de una célula en la que co-localizaron los marcadores BrdU y Ki67. Concluimos señalando que nuestros resultados muestran valores disminuidos en el grupo sometido a MS aunque no son significativos. Por ello, consideramos que es necesario que futuras investigaciones evalúen la actividad del nicho neurogénico en puntos específicos del neonato y adulto, de manera que pueda identificarse si en algún momento estas disminuciones representan cambios significativos que conduzcan a una modificación a largo plazo de la estructura o funcionamiento del hipocampo.

Palabras clave: separación maternal, neurogénesis, ansiedad, neuropsicología, progenitor neural

ABSTRACT

Several studies show a significant correlation between individuals who experienced early life stress (ELS) and those who are more susceptible to neuropsychopathological disorders during adulthood. However, the mechanisms and conditions under which ELS may affect the structural and functional development of the brain, how these effects are prolonged into adulthood, and whether there is a possibility of reversing them remain to be clarified. In this study, we employed the maternal separation (MS) model to gain insight into the effects of ELS on adult neurogenesis, specifically on the cell proliferation stage, and to determine whether these affect postnatal development of the subgranular zone (SGZ) leading to long-term modification of hippocampal structure and function. Our results indicate that MS has no effect on cell proliferation in the SGZ and we observed no significant effect of MS on SGZ volume. When assessing the phenotype of proliferating cells, we observed that MS does not affect the number of Ki67+ cells with GFAP phenotype. Finally, we found that neural progenitors that are active in the adult neurogenic niche belong to a different population than those proliferating during the stress exposure period. However, we were only able to identify one cell in which BrdU and Ki67 markers co-localized. We conclude mentioning that our results show decreased values of the group subjected to MS although these are not significant. Therefore, we consider that further investigation should aim the activity of the neurogenic niche at specific points in the neonate and adult, so that it can be identified whether at some point these decreases represent significant changes leading to a long-term modification of the structure or function of the hippocampus.

INTRODUCCIÓN

En México, 39.2 millones de personas son menores de 15 años y en Michoacán representan al 29% de la población (INEGI 2017). Este sector es el más vulnerable a la violencia que se vive en el país, no sólo en el entorno público, sino también en el familiar. De acuerdo al Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF), 1 de cada 2 niños ha sufrido una agresión psicológica por algún miembro de su familia y 1 de cada 15 ha recibido una forma de castigo físico severo. Además, cerca de la mitad de la población vive en condiciones de pobreza, y de ellos, el 20% vive en pobreza extrema (UNICEF, 2017).

Las experiencias adversas pueden ocasionar estrés en las etapas tempranas de la vida (ELS por sus siglas en inglés) del individuo y activar la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales (HPA por sus siglas en inglés) (Plotsky & Meaney, 1993). Este eje participa en la respuesta al estrés a través de una reacción en cascada que concluye con la liberación de glucocorticoides (GC) en el torrente sanguíneo (Chrousos & Gold, 1992). A diferencia del estrés en el adulto, el ELS puede desregular el eje HPA a largo plazo de manera irreversible y ocasionar que responda al estrés de manera inadecuada (Krueger, 1983; Ladd et al., 2000; Parker et al., 2000). Esta sensibilización al estrés puede explicar la correlación significativa que indican diversos estudios sobre las personas que padecieron ELS con aquéllas que tienen una susceptibilidad mayor a padecer trastornos neuropsicopatológicos durante la adultez (p. ej. depresión y ansiedad) (Cohen et al., 2006; Edwards et al., 2003; Heim & Nemeroff, 2001; Huh et al., 2014; Sheline et al., 1996); así como un menor desempeño cognoscitivo (McEwen & Sapolsky, 1995; Pechtel & Pizzagalli, 2011).

El hipocampo es una región del cerebro importante en la regulación del eje HPA (Herman et al., 2005) y tiene un papel crucial en las asociaciones a corto y largo plazo (Spencer & Bland, 2019), en la navegación espacial (Van Strien et al., 2009), y en el aprendizaje dependiente de emociones como el miedo (Davis, 1992). Por otro lado, en el hipocampo se encuentra la zona subgranular (SGZ) del giro dentado (DG), uno de los dos nichos neurogénicos donde se lleva a cabo la neurogénesis en el adulto (Eriksson et al., 1998). La neurogénesis es un proceso en el que nuevas neuronas son generadas a partir de células madres neurales (Ming & Song, 2011). Las etapas de este proceso consisten en: proliferación, migración, sobrevivencia e integración (Alvarez-Buylla & Lim, 2004); y pueden resultar afectadas por diversos factores como el estrés (Lucassen et al., 2015).

La separación maternal (MS por sus siglas en inglés) es un modelo experimental que nos permite obtener información sobre los efectos del ELS en la neurogénesis adulta (Plotsky & Meaney, 1993). Estudios indican que existe una disminución en la sobrevivencia de las neuronas generadas durante el periodo de exposición al estrés, que hay un aumento transitorio en ratas juveniles y finalmente una disminución de la proliferación y sobrevivencia de las nuevas neuronas en la rata adulta joven que sigue siendo notable en ratas mayores a 10 meses (Hulshof et al., 2011; Lajud et al., 2012; Mirescu et al., 2004; Ruiz et al., 2018; Suri et al., 2013). Sin embargo, el efecto de la SM sobre la proliferación celular del hipocampo aún es controversial por lo que en este estudio consideramos importante evaluar los efectos sobre la etapa de proliferación celular para determinar si éstos afectan el desarrollo posnatal de la SGZ que conlleve a una modificación a largo plazo de la estructura y función del hipocampo.

MARCO TEÓRICO

El concepto de estrés

En la época antigua, los filósofos dieron origen a conceptos como armonía, isonomía y eucrasia mediante los cuales explicaban un equilibrio del cosmos, la vida o los humores descritos por Hipócrates. Sin embargo, es hasta el siglo XIX, cuando Claude Bernard va más allá en el campo de la biología al proponer su teoría del medio interno (*milieu intérieur*), en la cual señala que un equilibrio dinámico entre el organismo y el medio externo, es una condición necesaria para la vida del organismo (Bernard, 1865). Así, este medio interno puede compensar un cambio que suceda en el exterior. Walter Bradford Cannon, amplía este concepto durante sus investigaciones y utiliza el término homeostasis para referirse al conjunto de mecanismos mediante los cuales el organismo se organiza para responder a estos cambios del exterior y volver al estado de equilibrio constante (Cannon, 1932). Además, introduce el concepto de reacción de lucha o huida (*flight-or-fight reaction*), a través del cual explica cómo el organismo responde a una situación extrema de amenaza o presión optando por una de estas vías.

La palabra *estrés* tiene su origen etimológico en el latín, *stringere* y a su vez del griego antiguo, *strangalizein*, cuyo significado es *provocar tensión* (Nicolaidis et al., 2014). Hans Selye introduce esta palabra en el campo de la fisiología para referirse a la respuesta no específica de un cuerpo a cualquier demanda que se le haga (Selye, 1956). Definió el concepto de estresor como cualquier evento capaz de poner en peligro la homeostasis y explicó la respuesta al estrés mediante el siguiente ejemplo: el efecto que tiene la administración de insulina en el organismo es específico sobre el descenso de los niveles de glucosa en sangre, luego entonces no es un estresor; no obstante, puede convertirse en uno, si se sigue administrando de manera continua o si se aumentan las dosis, ya que el organismo responde aumentando la secreción de catecolaminas y corticoides, el cual es un efecto no específico (Szabo et al., 2012). Este efecto “no específico” es el que se observa en el organismo estresado, un estado en el que la homeostasis se ve potencial o seriamente amenazada (Godoy et al., 2018).

A estas aportaciones, se suma el concepto de alostasis introducido por Peter Sterling. Este concepto precisa el proceso de adaptación que asegura la homeostasis. Sterling explica que los parámetros fisiológicos conforman estados estacionarios que cambian de acuerdo a la información continua que el organismo recibe del exterior. Señala que un estado estacionario en cuestión, puede ser más conveniente durante el

día que durante la noche. Y es con este ejemplo que explica como el organismo puede variar los parámetros necesarios para adaptarse a la situación en que se encuentra (Sterling & Eyer, 1988). Bajo este orden de ideas, Bruce McEwen y Eliot Stellar, observaron que el estrés ejercido de manera continua o repetida puede alterar la alostasis y predisponer al individuo a una enfermedad. McEwen y Stellar se refirieron a este estado con el nombre de carga alostática. Esto es, el costo de adaptación que tiene una respuesta al estrés inadecuada o sobreestimulada en el organismo (McEwen, 2001; McEwen & Stellar, 1993).

A pesar de los efectos negativos del estrés, Selye llegó a la conclusión de que el estrés no debe ser considerado sólo como tal (distrés), sino que también puede ser benéfico (eustrés), ya que el individuo tiene la oportunidad de mejorar su adaptación al medio, y además, puede encontrar la experiencia como gratificante (p. ej. Una competencia deportiva) (Selye, 1974). Por tal motivo, es importante conocer los diferentes tipos de estresores. Estos pueden tener un origen: psicológico; como problemas familiares, económicos, falta de información, es decir, aquellos que muestran con incertidumbre el futuro; o fisiológicos, como deshidratación, hemorragia, inflamación sistémica, etc. Pueden considerarse ligeros, moderados o severos en función de la intensidad; agudos o crónicos dependiendo del número de eventos estresantes y tomando en cuenta su duración. Finalmente, es importante considerar que la magnitud y efectos de la respuesta al estrés no sólo dependen del estresor en sí, sino también de otros factores tales como la genética y la percepción del individuo (Lucassen et al., 2015).

El eje HPA y la respuesta al estrés

Selye creó un perfil que denominó Síndrome General de Estrés (Selye, 1936) el cual describe cómo el organismo se enfrenta al estrés. En la primera etapa, la exposición al estresor activa la respuesta al estrés. Esta respuesta (FIG. 1) se da a través de dos ejes principales, el sistema simpático-adreno-medular (SAM) y el eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal (HPA). El SAM brinda una respuesta parecida a un acto reflejo, lo que permite al organismo una rápida adaptación fisiológica para entrar en un estado de alerta o vigilia. La segunda etapa es de resistencia. En esta, el organismo se enfrenta al estresor y se adapta. Es aquí cuando se activa la respuesta

del eje HPA, dando inicio a una reacción en cascada que culminará con la liberación de GC en el torrente sanguíneo (Chrousos & Gold, 1992).

Activación de la respuesta al estrés



Figura 1. Esquema sobre la activación de respuesta al estrés (Modificado de Godoy, et al., 2018).

El eje HPA se conforma por el hipotálamo y la hipófisis ubicados en el cerebro; y las glándulas suprarrenales, localizadas en la parte superior de cada riñón (Ladd et al., 2000). Cuando el eje HPA se activa (FIG. 2), las neuronas ubicadas en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) comienzan a secretar factor liberador de corticotropina (CRF) y vasopresina (AVP). Enseguida, el CRF y la AVP se liberan en los

vasos del sistema portal hipofisial que conducen al lóbulo anterior de la pituitaria. Aquí, el CRF y la AVP estimulan la síntesis de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH). La ACTH se libera e ingresa al torrente sanguíneo, llega a las glándulas suprarrenales y estimula la secreción de GC (Smith & Vale, 2006).

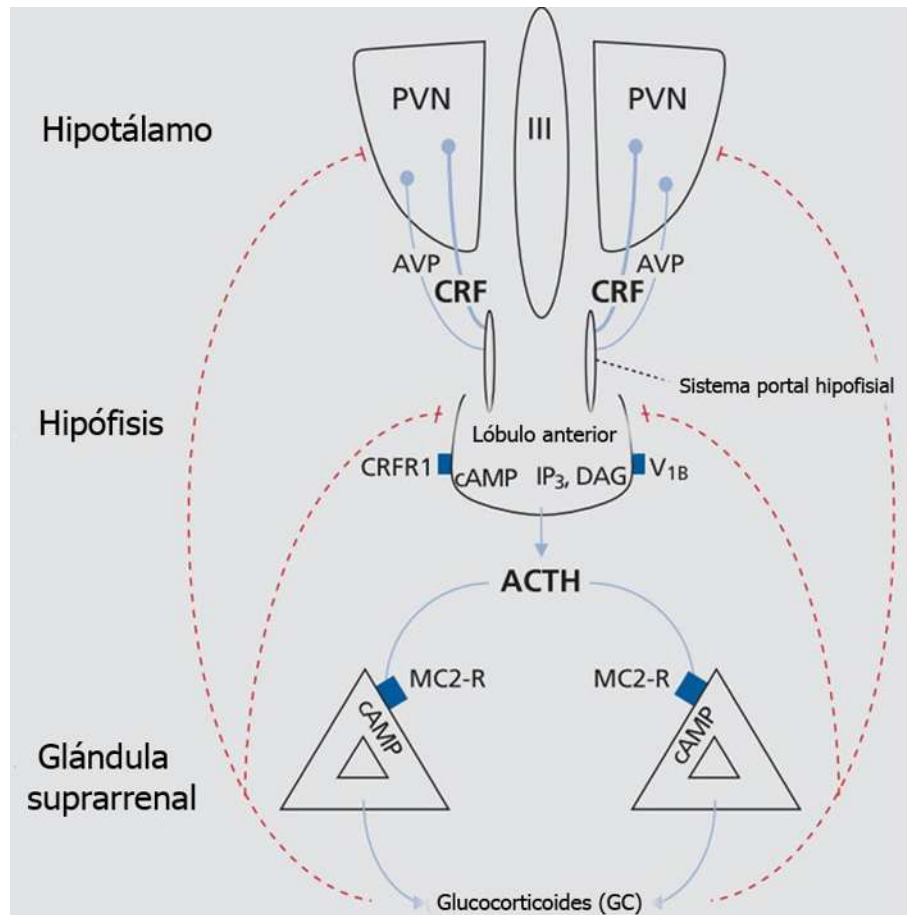


Figura 2. Representación esquemática de la reacción del eje HPA durante la respuesta al estrés (Modificada de Smith y Vale, 2006). Las líneas azules señalan el flujo de secreción de GC. Las células del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) secretan Factor liberador de corticotropina (CFR) se une al receptor CRF tipo 1 (CRFR1) en la hipófisis y activa una serie de eventos por la vía del Adenosin monofosfato cíclico (cAMP) donde participan también el Trifosfato de inositol (IP_3) y el Diacilglicerol (DAG), e induce la liberación de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) en la circulación sistémica. De manera sinérgica, la vasopresina (AVP) estimula la liberación de ACTH a través del receptor de vasopresina V_{1B} en presencia de CRF. La ACTH se une al receptor de melacortina tipo 2 (MC2-R) en la corteza suprarrenal, donde estimula la síntesis y liberación de GC a través de la vía del cAMP. Las líneas rojas indican la inhibición del eje HPA por retroalimentación negativa a través de receptores intracelulares en el cerebro y tejidos periféricos.

Los GC, cortisol en el humano y corticosterona en roedores, son hormonas esteroideas que traspasan la membrana celular fácilmente, tienen efectos importantes en el organismo y participan en la regulación del metabolismo principalmente a través del hígado, músculo y tejido adiposo; en el tono cardiovascular, en el sistema inmunológico, así como en otros procesos relacionados con el crecimiento, la reproducción y la conducta en humanos (Charmandari et al., 2005). Los niveles de GC en el organismo siguen un ciclo circadiano y su pico se encuentra durante la fase activa del ciclo diurno (Keller-Wood & Dallman, 1984), mientras que en ratas el pico se encuentra en la fase activa del ciclo nocturno (Sapolsky, 1992). La activación de la respuesta al estrés altera este ciclo ya que aumenta los niveles de GC. Este aumento permite que el organismo pueda lidiar con el estresor al proveerle la energía para tal fin. Una vez que el individuo ha logrado adaptarse al estresor, el periodo de estrés concluye y los niveles comienzan a disminuir hasta recuperar los niveles basales. Esta regulación se da a través de dos maneras principales: la primera es una respuesta inmediata de retroalimentación negativa y sucede mediante la unión de los GC con los receptores de glucocorticoides (GR) y los receptores de mineralocorticoides (MR), estos últimos con mayor afinidad (Herman et al., 2005). La segunda forma, es una respuesta lenta o retrasada, puede considerarse patológica y se activa cuando el tiempo de exposición a los GC es prolongado o crónico. En esta regulación, ocurre una disminución de ACTH al reducir la expresión de mRNA que codifica para proopiomelanocortina (POMC) el cual es la molécula precursora del ACTH (Keller-Wood & Dallman, 1984).

Los receptores GR y MR se encuentran ampliamente distribuidos en el cerebro. Dos de las regiones con mayor concentración de GR y MR son el PVN del hipotálamo y el hipocampo. Una alteración directa o indirecta en estas zonas puede modificar la respuesta al estrés. En el PVN esto puede ocurrir a través de la expresión de CRF cuando las neuronas del PVN resultan afectadas; o por vías catecolaminérgicas cuando se afectan algunas de las proyecciones aferentes de neuronas del tronco encefálico, de la estría terminal, de los núcleos hipotalámicos, o de las estructuras límbicas del cerebro anterior (Godoy et al., 2018; Smith & Vale, 2006).

El hipocampo es una región del cerebro que forma parte del sistema límbico. Está localizado en el lóbulo temporal y tiene forma de "C" o caballito de mar, forma de la cual toma su nombre. Se encuentra conformado anatómicamente por el DG, el complejo subicular o subiculum, y el cuerno de Amón (subdividido por su morfología e interconexiones desde CA1 hasta CA3). Está formado principalmente por neuronas

piramidales y granulares que se encuentran interconectadas en un circuito trisináptico (Spencer & Bland, 2019; Van Strien et al., 2009) (FIG. 3). Tiene un papel crucial en las asociaciones a corto y largo plazo, en la navegación espacial y en el aprendizaje dependiente de emociones como el miedo. Dado que el hipocampo posee una concentración alta de GR y MR, se considera un regulador importante del eje HPA que resulta altamente sensible a los niveles de GC y que repercute en la respuesta al estrés de manera bilateral. Por ejemplo, una estimulación hipocampal disminuye los niveles de GC (Herman et al., 2005; Rubin et al., 1966), mientras que las lesiones o daño sobre esta estructura, aumenta la producción de CRF y AVP y pueden prolongar la liberación de ACTH y GC (Herman et al., 1995, 2005).

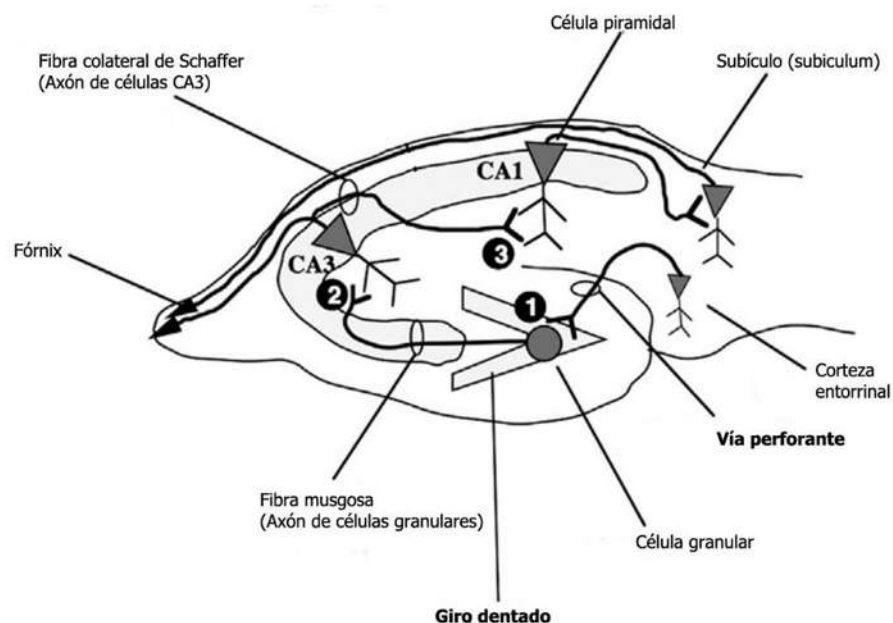


Figura 3. Hipocampo y representación del circuito trisináptico (Modificado de Spencer y Bland, 2019). La representación muestra células piramidales y de una célula granular participando en el circuito. Las tres sinapsis destacadas están numeradas en orden temporal en el que están involucradas por la actividad neural. En la primera sinapsis participan las neuronas piramidales localizadas en la corteza entorrinal que se proyectan a través de la vía perforante hacia el giro dentado. En la segunda sinapsis participan los axones de las células granulares localizados en la fibra musgosa, con las dendritas de las neuronas piramidales en CA3. Los axones de las neuronas en la fibra colateral de Schaffer forman sinapsis con las dendritas de las neuronas en CA1. La respuesta principal de este circuito y del hipocampo en general, proviene de las neuronas en CA1 al subículo adyacente y la corteza entorrinal así como a las estructuras subcorticales.

El organismo puede beneficiarse del estresor cuando se adapta a él, ya que mejora la oxigenación y el transporte de glucosa en el organismo. Además, facilita la formación de la memoria. No obstante, el organismo puede entrar en una fase de agotamiento cuando el estresor es crónico, es decir que va de horas a décadas, o bien, cuando no logra adaptarse. En esta fase se observan efectos negativos sobre la conducta y la memoria así como daños celulares como atrofia dendrítica, disminución del volumen hipocampal, entre otros (McEwen & Sapolsky, 1995).

Neurogénesis adulta

La neurogénesis es un proceso a través del cual se generan neuronas nuevas a partir de células madres neurales (Ming & Song, 2011). Las etapas de este proceso consisten en: proliferación, migración, sobrevivencia e integración. Ocurre durante el desarrollo embrionario y continúa en el adulto en zonas específicas llamadas nichos neurogénicos (Eriksson et al., 1998). El hallazgo de la neurogénesis adulta en diferentes especies así como su integración al circuito nervioso, comenzaron a reportarse en la década de 1960, una vez que Altman y Das dieron a conocer su experimento en el cual encontraron células nuevas en el hipocampo de ratas a las cuales se les administró timidina- H^3 , un precursor del ADN empleado durante la división celular (Altman & Das, 1965). El escepticismo y la falta de herramientas adecuadas para la evaluación de este proceso retrasó el descubrimiento de neurogénesis adulta en el ser humano, la cual fue reportada finalmente por Eriksson y colaboradores en 1998 (Eriksson et al., 1998). A este estudio prosiguieron otros cuyos resultados generaron controversia sobre la verdadera existencia de neurogénesis adulta en el ser humano (Moreno-Jiménez et al., 2019; Sorrells et al., 2018; Tobin et al., 2019). Actualmente, el consenso científico considera que, en efecto, la neurogénesis adulta en el humano existe y que la variación de resultados se debe a problemas de metodología o técnica así como a la dificultad que representa la disponibilidad de muestras apropiadas para su evaluación (Ernst et al., 2014; Kempermann et al., 2018).

Se conocen dos nichos neurogénicos que permanecen activos a lo largo de toda la vida: la SGZ ubicada en el DG del hipocampo y la zona subventricular (SVZ) de las paredes del tercer ventrículo. Aquí encontramos a las células madres neurales. Estas son células multipotentes que tienen la capacidad de renovarse a sí mismas a través de la reproducción celular (Gonçalves et al., 2016). A su vez, éstas pueden dar origen a los

progenitores o precursores neurales (NPC), los cuales tienen una capacidad más limitada de autorrenovación y de diferenciación, pudiendo derivar en precursores gliales o neuronales (Seaberg & van der Kooy, 2003). Estas células tienen características de glía radial por lo que en ocasiones se refieren a ellas de esta manera.

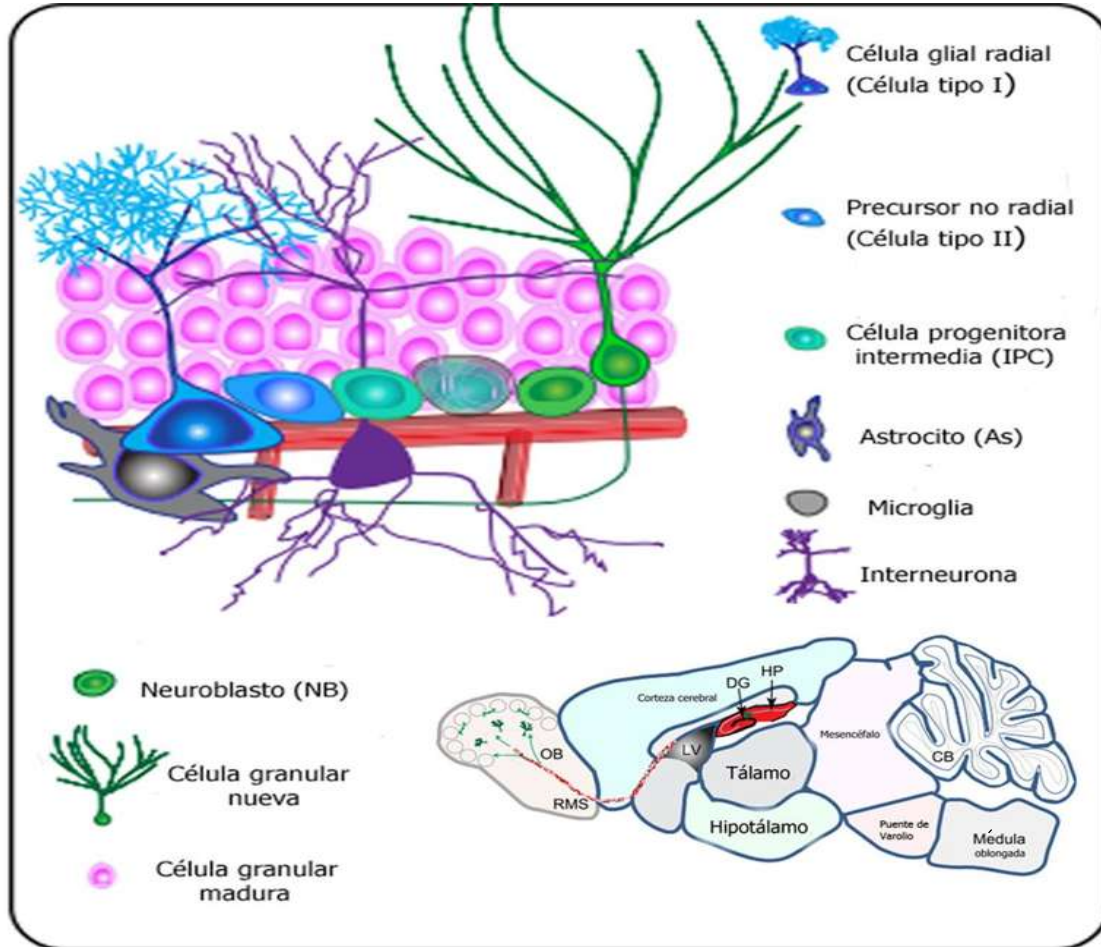


Figura 4. Esquematzación de neurogénesis adulta en SGZ y vista de un corte sagital de un roedor adulto remarcando los dos nichos neurogénicos (Modificada de Ming y Song, 2011).

El proceso de neurogénesis adulta es distinto en los nichos neurogénicos. Las neuronas nuevas en la SGZ realizan una migración corta. La línea roja señala la migración de las neuronas generadas en la SVZ hacia el bulbo olfatorio a través de la RMS. En el corte sagital se observan las regiones: CB: cerebelo, DG: giro dentado, HP: hipocampo, LV: ventrículo lateral, OB: bulbo olfatorio y RMS: vía rostral migratoria.

En la SGZ, las células de la glía radial dan lugar a precursores no radiales que derivan en progenitores intermediarios (Alvarez-Buylla et al., 2001). Estos pueden dar origen a oligodendrocitos, astrocitos, o bien, a células de transición que se diferencian hacia neuroblastos y finalmente a neuronas (FIG. 4) (Gage et al., 1998). Las neuronas

inmaduras realizan un proceso de migración corto, desplazándose hacia la capa granular (GCL) del DG, donde se diferencian en células granulares (Seri et al., 2004). En los días consecutivos, estas nuevas neuronas extienden sus dendritas a la capa molecular y proyectan sus axones a través del hilus hasta CA3 (FIG. 5) (Markakis & Gage, 1999; Zhao et al., 2006).

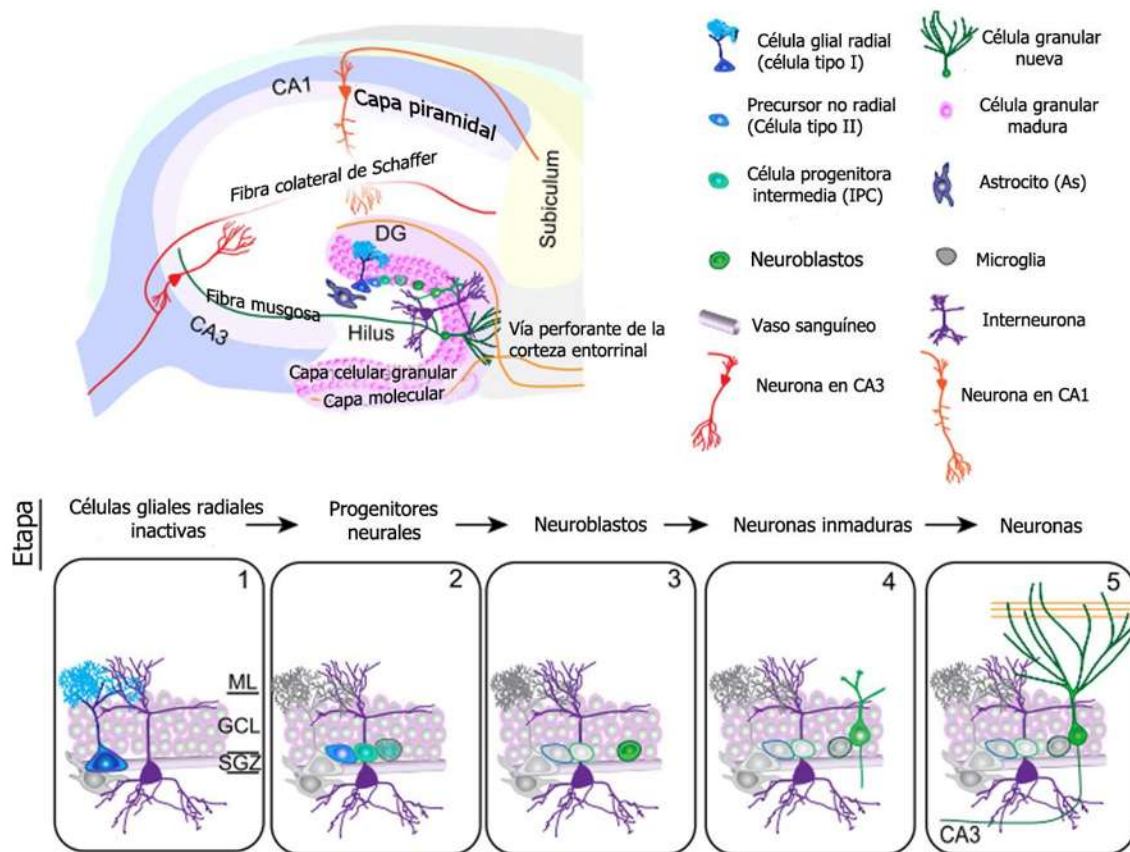


Figura 5. Etapas de la neurogénesis adulta en la SGZ (Modificado de Ming y Song, 2011).

El esquema superior muestra el nicho neurogénico en la SGZ y los diferentes tipos de células en la zona. El esquema inferior describe las distintas etapas de esta neurogénesis: 1) Activación de las células radiales en la SGZ; 2) Proliferación de los progenitores neurales; 3) Diferenciación de las células intermediarias hacia neuroblastos; 4) Migración de las neuronas inmaduras hacia la GCL; 5) Integración de las nuevas neuronas al circuito. ML: capa molecular.

La integración sináptica de las nuevas neuronas al circuito existente es un proceso que ocurre inicialmente por la activación tónica con el ácido γ -aminobutírico (GABA) circundante, continúa mediante la activación fásica con las dendritas de las

neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas, y finalmente, con los axones de salida de la fibra musgosa (Faulkner et al., 2008; Toni et al., 2007). Al inicio, las neuronas nuevas tienen una mayor excitabilidad y plasticidad sináptica, sin embargo, tras la fase de maduración, muestran propiedades electrofisiológicas normales respecto a las demás neuronas (Ge et al., 2008). Esta activación resulta lenta si se compara con la neurogénesis embrionaria, pero se puede conjeturar que la demora se debe al tiempo requerido para su correcta integración sináptica con el circuito existente ya que cuando el tiempo es menor puede haber lugar a conexiones aberrantes (Parent et al., 1997).

La regulación de la neurogénesis adulta es importante para evitar el daño a los circuitos sinápticos ya existentes. Existen varios mecanismos de regulación y los factores que los desencadenan pueden ser endógenos o exógenos. En el primer caso, tenemos la influencia de factores de crecimiento, neurotrofinas, citocinas, hormonas y neurotransmisores, así como el microambiente, es decir la población celular del nicho neurogénico: células endoteliales, astrocitos, microglía, etc. que pueden intervenir en los procesos de neurogénesis (Alvarez-Buylla & Lim, 2004). En cuanto a los factores exógenos se pueden considerar el ejercicio físico, la dieta, el enriquecimiento ambiental, el envejecimiento, las convulsiones, los golpes, la inflamación y el estrés (Hueston et al., 2017). Además, hay dos periodos críticos de sobrevivencia de la progenie neural, uno durante la formación de progenitores intermedios y neuroblastos, y el otro durante la integración de las neuronas inmaduras (Mouret et al., 2008; Platel et al., 2010)

Afortunadamente, el avance científico y tecnológico ha permitido que puedan obtenerse resultados más precisos que conduzcan cada vez a un mejor desarrollo experimental y a la resolución de las hipótesis planteadas. Por ejemplo, el 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU), un análogo de la timidina, se emplea como uno de los marcadores celulares más útiles, ya que se incorpora al material genético durante la síntesis de ADN (Fase S) de la división celular. De esta manera, es posible identificar a las células marcadas con esta sustancia a través de una inmunohistoquímica y así cuantificar la proliferación o sobrevivencia dependiendo del tiempo que transcurra entre la inyección y la evaluación. Otros marcadores importantes son: doblecortina (DCX), la cual es una proteína asociada a microtúbulos que se expresa de manera transitoria en neuronas inmaduras alrededor del día 4 al 14 tras su nacimiento (Van Bokhoven et al., 2011); NeuN, un marcador del núcleo de neuronas maduras; la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) que se expresa en astroglia, y en progenitores neurales en etapa de proliferación celular (Schoenfeld & Gould, 2012); y Ki-67, que se emplea como marcador

para el análisis cuantitativo de la proliferación celular en el hipocampo ya que se expresa durante todas las etapas del ciclo celular de células en división a excepción de G₀ (Sung et al., 2010).

Efectos del estrés sobre la neurogénesis adulta

El estrés puede alterar diferentes etapas de la neurogénesis (Lucassen et al., 2015). Los primeros estudios en mamíferos demostraron que el estrés agudo ocasiona una disminución de las células que proliferan en el giro dentado del hipocampo (E. Gould et al., 1998; E. Gould et al., 1997), mientras que aquéllos que emplearon estresores crónicos en roedores reportaron no sólo una disminución de la proliferación, sino también de la diferenciación celular y de la sobrevivencia (Czeh et al., 2001; Van Bokhoven et al., 2011; Yap et al., 2006). No obstante, también se han reportado efectos positivos. Estresores relacionados con el aprendizaje dependiente de hipocampo y el enriquecimiento ambiental favorecen la proliferación celular y la sobrevivencia de las nuevas neuronas (Elizabeth Gould et al., 1999; Leuner et al., 2004; Veena et al., 2009).

Uno de los mecanismos sugeridos para explicar los efectos del estrés sobre la neurogénesis se basa en la elevación de los niveles de GC durante la activación de la respuesta al estrés y el tiempo que requiere el organismo para volver a los niveles basales (Sapolsky et al., 1986). En principio, la neurotoxicidad de los GC fue demostrada en el hipocampo por Mühlen y Ockenfels (Mühlen K aus der & Ockenfels, 1969). Posteriormente, Sapolsky conjeturó que los niveles de GC ejercen un papel importante en la pérdida neuronal del hipocampo mediante una limitación o carencia de sustratos energéticos disponibles así como la exposición de estas neuronas vulnerables a metabolitos tóxicos (Sapolsky, 1985; Sapolsky et al., 1986). Bajo esta hipótesis, Gould y colaboradores realizaron estudios donde los individuos fueron sometidos a un control de GC mediante la extirpación de las glándulas suprarrenales y dosificando los GC de manera exógena para mantener el ciclo circadiano. Los resultados mostraron un aumento de la proliferación y la sobrevivencia de células progenitoras, mientras que, efectos opuestos se encontraron en grupos a los cuales se les administraron dosis de GC en concentraciones altas o que fueron sometidos a estresores crónicos. (Elizabeth Gould et al., 1991, 1992; Tanapat et al., 2001)

Más tarde, se descubrió que la neurogénesis misma puede participar en la regulación de la respuesta al estrés. En estudios con estrés moderado crónico

observaron que la neurogénesis adulta contribuye a la resistencia y adaptación del organismo al estresor (Lehmann et al., 2013; Surget et al., 2011). Schloesser, Manji, y Martinowich llevaron a cabo un estudio en ratones con neurogénesis suprimida y encontraron que los niveles de GC fueron significativamente mayores con respecto al grupo control. Tras encontrar que este efecto no está mediado por la expresión de receptores a GC, sugirieron un posible mecanismo a través de la alteración de las propiedades electrofisiológicas en el circuito trisináptico, específicamente CA1 (Schloesser et al., 2009).

Estrés en las etapas tempranas de la vida (ELS)

El ELS es ocasionado por experiencias adversas en la infancia (ACE) como: una mala relación con la madre, maltrato infantil, pobreza extrema, pérdida de un ser querido, aislamiento social, etc. (Parker et al., 2000). El ELS puede desregular la actividad del eje HPA en el adulto de manera irreversible e inadecuada (Charmandari et al., 2005; Krueger, 1983). Esta desregulación puede derivar de una programación al ambiente la cual ocurre como parte del proceso de adaptación del individuo; comienza antes del nacimiento y continúa durante el periodo posnatal hasta el periodo de adolescencia temprana (Barker, 1990, 1995).

Existe un periodo hiporresponsivo del eje HPA (SHRP) que protege de los estresores a ciertas estructuras cerebrales que continúan en desarrollo aún después del nacimiento. En ratas, este periodo abarca aproximadamente los días postnatales 4 a 14 (Schapiro et al., 1962) y en humanos, hasta cerca de los 5 años (Gunnar & Donzella, 2002). No obstante, un estresor fuerte puede ser capaz de interrumpir esta protección, activando la respuesta al estrés, ocasionando la liberación y aumento de los GC que, a su vez, pueden repercutir sobre estas estructuras en desarrollo. Sapolsky sugirió que este mecanismo podría subyacer la recalibración del umbral de respuesta al estrés observada en los individuos adultos que sufrieron una exposición al ELS (Sapolsky, 1994).

La sensibilización de la respuesta al estrés cobra importancia para intentar explicar la correlación significativa que indican diversos estudios sobre las personas que padecieron ELS con aquellas que tienen una susceptibilidad mayor a padecer trastornos neuropsicopatológicos durante la adultez (p. ej. depresión y ansiedad); así como un menor desempeño cognoscitivo (Cohen et al., 2006; Edwards et al., 2003; Heim &

Nemeroff, 2001; Huh et al., 2014). Heim y colaboradores, realizaron un estudio en el que evaluaron la respuesta al estrés psicosocial de grupos de personas con antecedentes de ACE y ahora están diagnosticadas con depresión. Los resultados los compararon con un grupo con antecedentes de ACE pero no diagnosticados con depresión, y encontraron que los individuos con antecedentes de ACE y diagnosticados con depresión en la adultez tuvieron una mayor reactividad del eje HPA frente al estresor (Heim et al., 2008).

Modelos animales de ELS: Separación maternal (MS)

Para estudiar los efectos del ELS y esclarecer los mecanismos bajo los cuales se programa el eje HPA en el adulto, se acude a modelos animales, ya que en humanos es complicado controlar todas las variables. La selección del estresor, duración y edad a la que se aplica, depende de la pregunta de investigación y tomando en cuenta la comparación interespecie. Por ejemplo, se considera que el neurodesarrollo en ratas del día postnatal (PND) 1 al 10, equivale aproximadamente, al primer trimestre de vida postnatal en humanos (Clancy et al., 2007).

La MS es el modelo más utilizado en primates y roedores. Consiste en separar a las crías de la madre todos los días durante un tiempo determinado. Este es un estresor fuerte en roedores debido a que la relación entre madre e hijo es fundamental (Bowlby, 1977). Como consecuencia, los animales sometidos a MS presentan una desregularización del eje HPA caracterizada por un aumento en los niveles de CRF, ACTH y GC. Además, muestran un aumento en la conducta tipo depresiva y las respuestas relacionadas al miedo en pruebas de campo abierto y ambiente novedoso (Ladd et al., 2000; Lajud & Torner, 2015).

Los estudios pioneros de Plotsky y Meaney emplearon la MS, separando a las crías de por 180 min durante dos semanas. Asimismo, modificaron el modelo con el objetivo de deslindar el efecto de la manipulación de las ratas con el de la MS *per se*. Para esto, sometieron a otro grupo de crías a la MS pero redujeron el tiempo de separación a 15 min (MS15 o AFR) (Plotsky & Meaney, 1993). Posteriormente, Mirescu y colaboradores, utilizaron este modelo para determinar los efectos a largo plazo sobre la neurogénesis adulta y encontraron que la MS ocasiona una disminución en la proliferación y sobrevivencia de las neuronas nuevas (Mirescu et al., 2004).

Otros efectos de la MS reportados en la literatura son: la disminución de la densidad y longitud de las espinas dendríticas en áreas como el hipocampo y la corteza prefrontal (Bock et al., 2005; Monroy et al., 2010); alteración del metabolismo, con un perfil que muestra un aumento en los niveles de glucosa en ayunas, de la resistencia a la insulina y de dislipidemia (Ruiz et al., 2018; Vargas et al., 2016); aumento de la temperatura corporal (Melo et al., 2018); así como alteración de la microbiota intestinal y una mayor vulnerabilidad a padecer colitis (Jašarević & Bale, 2019; Milde et al., 2004).

ANTECEDENTES

Distintos equipos han aportado información sobre los efectos de la MS sobre la neurogénesis. Una de estas aportaciones es la de Mirescu y colaboradores, quienes encontraron una disminución de la proliferación y sobrevivencia de las nuevas neuronas en la rata adulta joven (2 meses) (Mirescu et al., 2004). Por otro lado, Hulshof y colaboradores, evaluaron ratas en edad similar y reportaron una disminución de la proliferación en el hipocampo ventral, pero no encontraron cambios en la sobrevivencia (Hulshof et al., 2011). Resultados previos de nuestro grupo de investigación mostraron que existe una disminución en la sobrevivencia de las neuronas generadas durante el periodo de exposición al estrés (Lajud et al., 2012). Posteriormente, Suri y colaboradores, reportaron que en ratas juveniles (PND 21) hay un aumento transitorio de la neurogénesis el cual desaparece en adultos jóvenes. Adicionalmente, observaron una disminución en la neurogénesis en ratas viejas (15 meses) (Suri et al., 2013). Recientemente, nuestro grupo encontró una disminución de sobrevivencia en el hipocampo dorsal de adultos jóvenes (4 meses), y una disminución significativa en ambas zonas, dorsal y ventral, en ratas adultas maduras (10 meses) (Ruiz et al., 2018).

Los estudios anteriores nos brindan información respecto a la sobrevivencia de las nuevas neuronas. Sin embargo, no nos proporcionan información para determinar la causa de la disminución observada. De acuerdo a los resultados preliminares de nuestro equipo (Lajud et al., 2012; Ruiz et al., 2018), que indican que un menor número de células se incorporan al DG y si tenemos en cuenta que la regulación endógena de la neurogénesis depende, entre otros factores, de las condiciones del mismo nicho neurogénico, consideramos que es importante determinar si ésta disminución en la neurogénesis ocasionada por la MS, está acompañada por alteraciones en dicha zona. Hasta ahora, los datos que se tienen al respecto pertenecen a otro tipo de estresores, y en ocasiones, resultan controversiales (Schoenfeld & Gould, 2012). Por todo lo anterior, en el presente trabajo decidimos evaluar las alteraciones en el nicho neurogénico de la capa subgranular en ratas adultas sometidas a MS, y de esta manera contribuir a esclarecer los efectos del estrés en las etapas tempranas de la vida sobre la neurogénesis.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente, se requiere esclarecer los mecanismos y las condiciones bajo las cuales el estrés causado por las ACE durante las primeras etapas de la vida, pueden afectar el desarrollo estructural y funcional del cerebro, y de qué manera estos efectos se ven prolongados durante la adultez y si existe la posibilidad de revertirlos. Debido a que no se pueden controlar las variables en humanos, se requiere acudir a modelos animales donde sea posible evaluar condiciones similares. El modelo de MS nos permite estudiar estos efectos y nos proporciona información importante para comprenderlos.

Dado que no hay un consenso sobre los efectos del ELS en la neurogénesis adulta, y que no se han estudiado los efectos de la MS sobre la proliferación de los precursores neurales y su posterior integración al circuito hipocampal adulto, nos hemos planteado la pregunta de investigación:

¿El estrés en las primeras etapas de la vida, causa una alteración en el desarrollo del nicho neurogénico de la zona subgranular que conlleva a una modificación a largo plazo de la estructura y función del hipocampo?

HIPÓTESIS

El estrés en las etapas tempranas de la vida, causa alteraciones en la actividad del nicho neurogénico de la capa subgranular del hipocampo en la edad adulta.

OBJETIVOS

Objetivo general.

Evaluar el efecto de la separación maternal sobre la actividad del nicho neurogénico de la capa subgranular del hipocampo en animales adultos.

Objetivos específicos.

1. Evaluar el efecto de la SM sobre la proliferación celular en el adulto.
2. Determinar el fenotipo celular de las células que se encuentran proliferando en la capa granular del giro dentado.
3. Determinar si las células que proliferan en el nicho neurogénico adulto pertenecen a la misma población de células que se encontraba proliferando durante el periodo de exposición al estrés.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron hembras embarazadas de la cepa Sprague-Dawley sincronizadas al día 14 del ciclo estral (E14) (Bioterio del Instituto De Neurobiología, UNAM) que se dejaron habitar una semana en nuestras instalaciones. Los animales se alojaron en cajas con agua y comida *ad libitum* en una habitación con temperatura controlada, bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (el ciclo de luz comenzó a las 07:00 h). La limpieza de las cajas se realizó tres veces por semana.

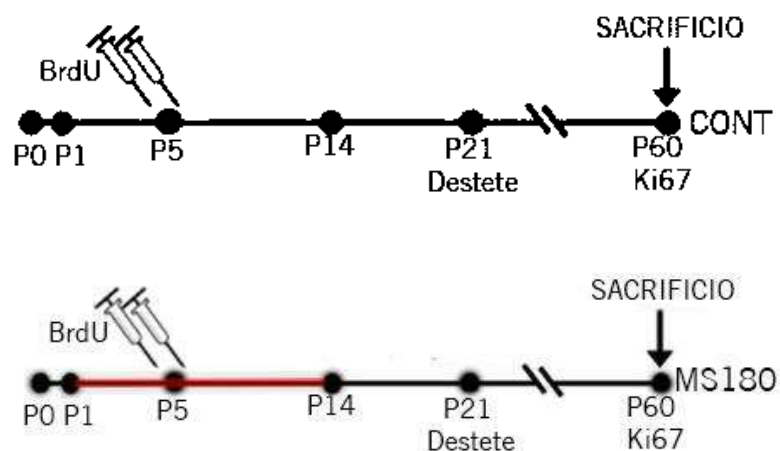


Figura 6. Línea de tiempo experimental para grupo control y grupo MS180

P= día postnatal (PND). Las líneas negras representan la duración del experimento. La línea roja en el grupo MS180 indica el periodo de MS. En el PND 5 se administró BrdU en ambos grupos. La evaluación con Ki67 se realizó en tejido obtenido al PND 60.

El día del nacimiento se designó como PND 0. En el PND 1, se mezclaron todas las camadas y las crías se distribuyeron aleatoriamente, ajustando a ocho crías por madre. La mitad de las camadas se designó como control y solo fueron perturbadas para limpieza de la caja. La otra mitad fue sometida a la MS durante 14 días (FIG. 6). Para determinar si las células que proliferan en el nicho neurogénico adulto pertenecen a la misma población de células que se encontraba proliferando durante el periodo de exposición al estrés, se procedió a inyectar a las ratas dos veces con BrdU (50 mg/Kg, Sigma-Aldrich), a las 09:00 h del PND 5 y 12 h después. Al PND 21, las ratas fueron destetadas y se mantuvieron en condiciones estándar de bioterio hasta la edad adulta. Al PND 60, las ratas se sacrificaron para evaluar la actividad del nicho neurogénico en

el DG mediante inmunohistoquímica. Sólo se evaluaron las ratas machos para evitar efectos dependientes del sexo.

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a la norma mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). El protocolo fue aprobado por el comité local de investigación y ética en investigación en salud del Instituto Mexicano del Seguro Social, con clave de registro R-2013-1602-17.

1.1 Separación maternal

Se retiraron las crías manteniendo a la madre a un lado con un cartón. Éstas se colocaron en una caja de plexiglás cubierta con aserrín limpio. Las crías se llevaron a un cuarto distinto al de la colonia y las cajas se colocaron sobre una almohadilla térmica ajustada en un rango de 30-33°C. Transcurridos 180 min, las crías se devolvieron con su madre. Este proceso se repitió durante 14 días y la manipulación se mantuvo al mínimo para evitar efectos no deseados.

1.2 Procesamiento de muestras

Al PND 60, las ratas se sacrificaron administrando pentobarbital sódico. Se perfundió con 100 ml de solución salina (NaCl) al 0.9%, seguida de 200 ml de paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos (PB) 0.1 M. Los cerebros se extrajeron y mantuvieron en una solución fijadora con el mismo fijador. Posteriormente, se pasaron a una solución con sacarosa al 30% en PB y se congelaron en metilbutano. Los cortes sagitales del hipocampo (40 µm de grosor) se obtuvieron mediante un criostato. Estos se recolectaron en tubos de manera sistemática y se congelaron para su conservación.

1.3 Inmunohistoquímica para Ki67

Para la detección de las células que expresan Ki67 se seleccionaron series de uno de cada 6 cortes (240 µm de separación) de forma sistemática aleatoria. Se bloquearon las peroxidases con H₂O₂ al 10% en PB más Tritón X-100 al 3% durante 15 min. Se incubó en metanol por 30 min y después se agregó la solución con el anticuerpo primario anti-Ki67 (1:800, proveedor: Abcam). Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario (1:750, origen: conejo, proveedor: Vector). Finalmente, se

transfirió el tejido a una solución AB (Vector) y se visualizó la tinción con el kit de níquel/diaminobenzidina (DAB) y se realizó una contra-tinción con hematoxilina-eosina (Vector).

1.4 Inmunohistoquímica para BrdU

Los cortes recibieron una serie de pretratamientos con una solución de formamida al 50% en buffer de citratos a 74°C y HCl 1N a 37°C. Se restauró pH con buffer de boratos (pH 8.4). La primera incubación se realizó con el coctel del anticuerpo primario con anti-BrdU (1:500, origen: ratón, proveedor: Roche Applied Sciences) y anti-Ki67 (1:300, origen: conejo, proveedor: Abcam). Los cortes fueron visualizados con una mezcla de anticuerpos secundarios, anti-ratón (origen: cabra) acoplado a ALEXA488 (1:100) y anti-conejo acoplado a CY5 (1:200).

1.5 Inmunohistoquímica para Ki67-GFAP

El procedimiento de la tinción fue similar al descrito anteriormente. Después de realizar la tinción de Ki67 con Níquel-DAB, se agotó la reacción y se enjuagó el tejido para incubar con anti-GFAP (1:3000, origen: conejo, proveedor: Abcam) y al día siguiente con anti-conejo (1:750, origen: caballo, proveedor: Vector). Finalmente, se reveló con DAB sin níquel (Vector) por 5 min y se montó siguiendo el procedimiento descrito.

1.6 Conteo semi estereológico

Se evaluaron las series de cortes cerebrales obtenidas (separadas 240 µm de cada una). Se llevó a cabo el conteo de células marcadas con Ki67 a lo largo de la SGZ del DG del hipocampo, a una magnificación de 200x y 400x en un microscopio Karl Zeiss. El conteo se realizó por un investigador ciego a las condiciones experimentales. El número total de células se estimó realizando la sumatoria de todos los cortes, multiplicada por 6.

La medición del área del hipocampo se realizó de manera digital empleando un programa de análisis de imagen (Axiovision 4.6, Karl Zeiss), siguiendo el patrón de la capa granular y subgranular del DG marcada por la tinción. La medición del volumen se

calculó de acuerdo al Principio de Cavalieri, en el cual el volumen es igual a la suma de las áreas de cada corte (40 μm).

1.7 Análisis estadístico

Se hizo un recuento de los conteos celulares obtenidos de cada sexta sección y el número de células marcadas en cada individuo se expresó como la sumatoria de los promedios de cada sección. Los resultados finales se presentaron como la media de cada grupo $\pm$ el error estándar de la media. El volumen se presentó de la misma manera y se realizaron pruebas de T de Student para evaluar si hubo cambios significativos en el número de células marcadas o en el volumen del hipocampo, así como en la densidad de las mismas. La significancia estadística se ajustó a $p < 0.05$.

RESULTADOS

1.1 La MS no tiene efecto sobre la proliferación celular en la SGZ.

Al PND 60, encontramos que no hay diferencias significativas en el número de células Ki67⁺ ($p > 0.05$) ni en la densidad de células ($p > 0.05$) que estaban proliferando en el DG (FIG. 7A y C). Tampoco observamos efecto significativo de la MS sobre el volumen de la SGZ ($p > 0.05$, FIG. 7D).

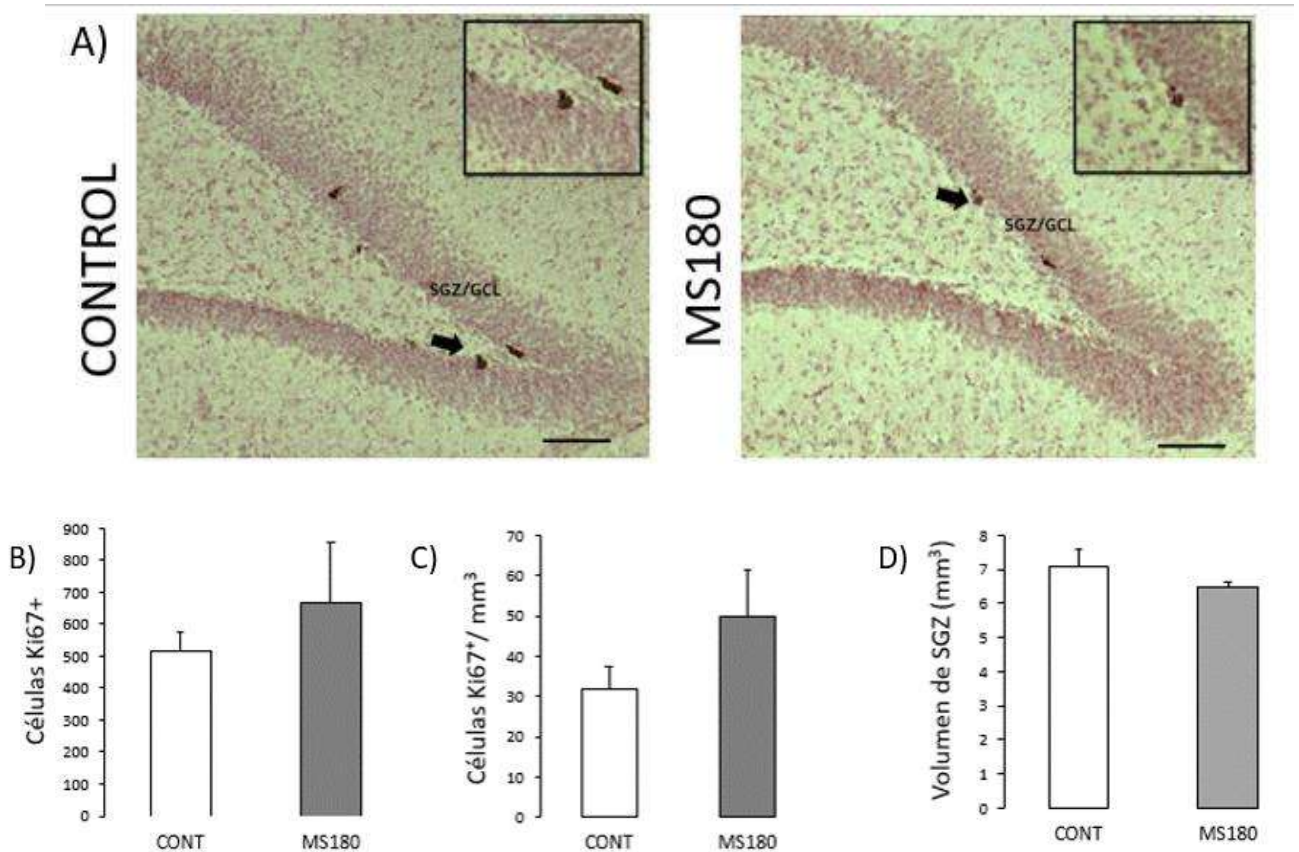


Figura 7. La separación maternal no afecta la tasa de proliferación del nicho neurogénico adulto. A) Imágenes representativas de la inmunotinción para Ki67 con una contratinción con hematoxilina-eosina al PND 60. En el inserto se muestra una mayor amplificación de las células señaladas con la flecha. B) Estimación estereológica del número de células Ki67⁺. C) Estimación de densidad de células Ki67⁺ por mm³. D) Estimación del volumen de la capa subgranular y granular (SGZ/GCL) del giro dentado del hipocampo. (Promedio $\pm$ error estándar; $n = 9$. Escala 100 μ m)

1.2 La MS no afecta el número de células Ki67⁺ con fenotipo GFAP.

Para conocer el fenotipo de las células que se encontraban proliferando, se empleó una doble inmunotinción contra Ki67 y GFAP (Fig. 8A). Los resultados indican que $22.5\% \pm 2.8$ del total de células que se encontraban proliferando en el grupo control, muestran un fenotipo GFAP⁺; mientras que en el grupo MS el porcentaje es de $15.3\% \pm 4.4$. Aunque existe una reducción del porcentaje, esta no es significativa ($p > 0.05$, Fig. 8B; 8C).

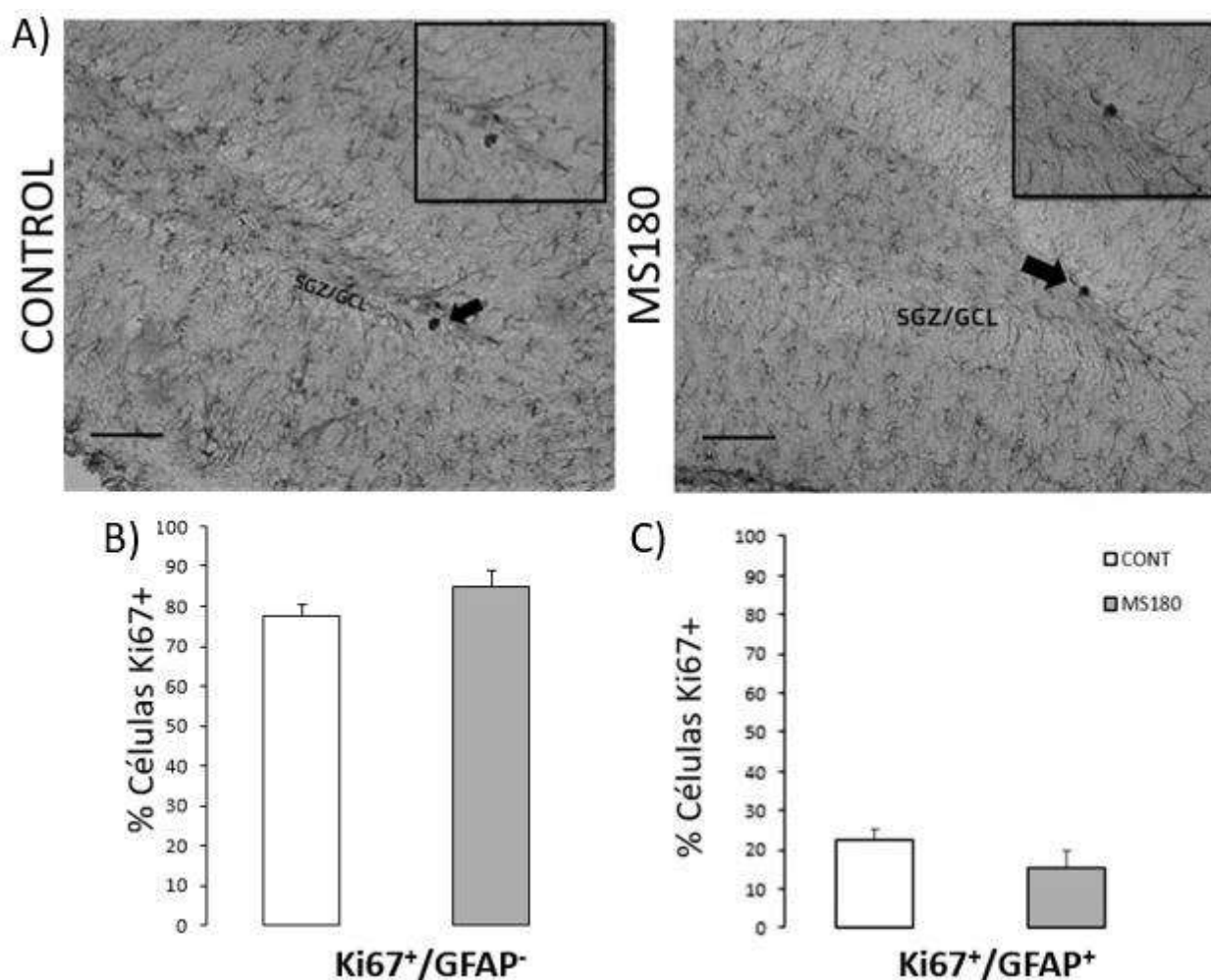


Figura 8. La MS disminuye el número de progenitores neurales GFAP⁺ que proliferan en el adulto. A) Imágenes representativas de la inmunotinción contra Ki67 (negro) y GFAP (rojo). En el inserto se muestra una mayor ampliación de las células señaladas con la flecha. B) Porcentaje de células Ki67⁺ que no muestran una co-tinción con GFAP (GFAP⁻). B) Porcentaje células Ki67⁺

muestran una co-tinción con GFAP (GFAP+) (Promedio $\pm$ error estándar; $n=9$. $*p<0.05$, Escala 100 μm).

1.3 Los progenitores neurales que se encuentran activos en el nicho neurogénico adulto pertenecen a una población diferente que aquellos que proliferan durante el periodo de exposición al estrés.

Con intención de conocer si las células que se encontraban proliferando al PND 60 pertenecían a la misma población de NPC que se encontraban proliferando al PND5, se realizó una inmunotinción doble para BrdU y Ki67. Sin embargo, solo nos fue posible detectar una célula que mostró co-localización para BrdU Y Ki67 en cada grupo (Fig. 9).

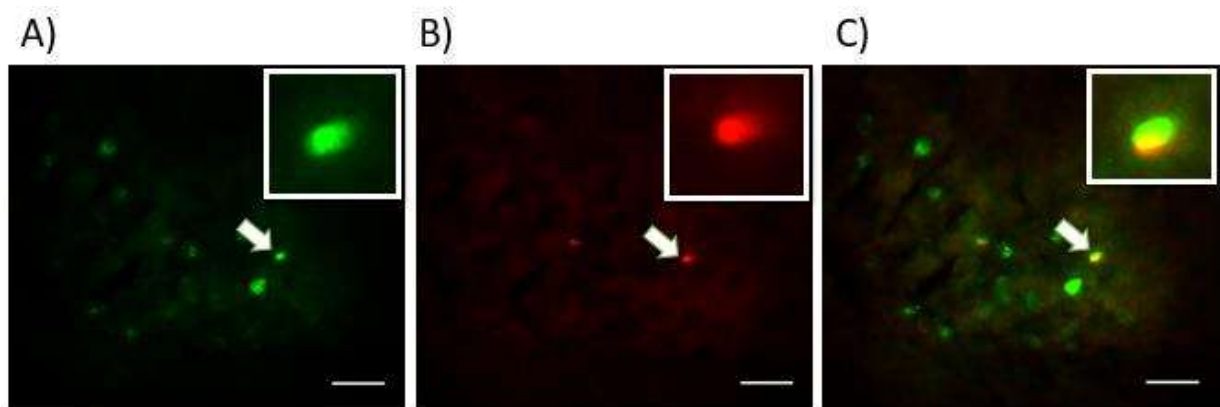


Figura 9. Las células que proliferan en la CSG del adulto pertenecen a una población diferente que las que proliferan en el neonato. Imágenes de una inmunotinción fluorescente contra A) Ki67 (verde) y B) BrdU (rojo). C) Reconstrucción digital de la fusión (merge) de ambos canales. En el inserto se muestra una mayor amplificación de la célula señalada con la flecha No se observó co-localización de estos marcadores en el resto de los campos analizados (escala 200 μm).

DISCUSIÓN

En el presente estudio evaluamos los efectos de la separación maternal en la actividad del nicho neurogénico de la capa subgranular del hipocampo en animales adultos sobre la proliferación celular en la SGZ/GCL. Para esto, estimamos la proliferación celular con el marcador Ki67 y por otro lado, se midió el volumen del hipocampo. Estimamos también, el porcentaje de células progenitoras que se encontraban proliferando al momento del sacrificio empleando los marcadores Ki67 y GFAP. En esos tres parámetros no encontramos diferencias significativas. Finalmente, evaluamos por primera vez el origen ontogenético de las células que se encuentran proliferando en el nicho neurogénico del adulto con los marcadores Ki67 y BrdU y observamos que estas pertenecen a una población distinta a las que se encuentran proliferando durante la etapa postnatal.

De acuerdo a nuestros resultados, la MS no afecta la proliferación celular del nicho neurogénico en animales de 60 días de edad. Esto concuerda con resultados previos obtenidos por Suri y colaboradores (Suri et al., 2013) quienes evaluaron la proliferación con BrdU en la SGZ/GCL en ratas de la misma cepa (Sprague-Dawley) y edad y no encontraron diferencias entre los grupos. Sin embargo, resultan controversiales con los reportados inicialmente por Mirescu y colaboradores (Mirescu et al., 2004), quienes reportaron una disminución de las células marcadas con BrdU en el grupo MS en ratas de la misma cepa y edad. La variabilidad de estos resultados con los nuestros puede explicarse con base en la metodología usada. Por ejemplo, el marcador que emplean es distinto, asignan 2 crías más por camada en comparación con nuestro equipo que asigna 8 crías, el destete fue un día más tarde (PND 22) y las camadas fueron separadas en grupos de dos o tres ratas hasta el PND 45. Diversos autores han reportado que este tipo de variaciones en la metodología pueden explicar las diferencias de los resultados obtenidos. (Korosi et al., 2012; Murthy & Gould, 2018; Schoenfeld & Gould, 2013).

Conocer el efecto de la MS sobre el volumen del hipocampo es importante ya que varios autores han reportado una disminución de éste en adultos mayores deprimidos. Esta disminución ha sido relacionada con un déficit en la memoria declarativa (Bremner et al., 2000; Sheline et al., 1996). Recientemente, Hayek y colaboradores, demostraron que la reducción de microestructuras de materia blanca del fórnix y del volumen del DG del hipocampo pueden causar esta disminución cognitiva (Hayek et al., 2020). En el presente estudio no encontramos diferencias en el volumen

hipocampal, lo cual concuerda con nuestros artículos previos (Lajud et al., 2012; Ruiz et al., 2018). Sin embargo, otros autores refieren otros datos (Czéh et al., 2001; Orelan et al., 2010). En primer lugar, es posible que, entre especies, los resultados puedan diferir debido a variaciones en los mecanismos celulares implicados en este efecto (Jun et al., 2012). En segundo lugar, la edad evaluada es crucial para poder comparar pues, si bien encontramos que el volumen está disminuido en las primeras semanas después de la MS (Czéh et al., 2001; Orelan et al., 2010), en ratas adultas esta diferencia ya no es detectable (Huot et al., 2002).

Al emplear en conjunto los marcadores GFAP y Ki67 nos permiten identificar células progenitoras en etapa de proliferación en el nicho neurogénico (Ki67⁺/GFAP⁺), que siendo GFAP⁺ en cualquier otra región del cerebro se consideraría como astroglia. Nuestros datos sobre el porcentaje de células que presentaron un fenotipo GFAP⁺ en el nicho neurogénico, indican que este no se encuentra disminuido en el grupo MS.

Para conocer si las células que se encontraban proliferando al PND 60 pertenecían a la misma población celular que proliferaba en el neonato, realizamos un marcaje con BrdU al PND 5 y evaluamos la existencia de células BrdU⁺/Ki67⁺ dos meses después de la inyección. Nuestros resultados mostraron sólo una célula en cada grupo. De esta manera, encontramos que sí hay proporción muy pequeña de la población que pertenece a la población celular que proliferaba en el neonato. Sin embargo, es importante considerar la limitación del estudio, ya que la falta de células que co-localicen puede deberse a la dilución del marcaje de las células BrdU⁺ consecuente a la replicación de las células hijas (Ganusov & De Boer, 2013). La falta de coincidencia entre marcadores puede explicarse, de manera alternativa, a través de las diferencias entre los nichos neurogénicos en el neonato y en el adulto. Li y colaboradores, demostraron que las NPC en el adulto se originan de forma prenatal en el hipocampo ventral (Li et al., 2013). Además, el estudio de las mutaciones en los marcadores ciclina D2 (CCND2) y el receptor nuclear huérfano TLX mostraron un daño severo en el nicho neurogénico adulto pero poco o ningún efecto en el desarrollo postnatal del DG del neonato (Ansorg et al., 2012; Shi et al., 2004). En suma, nuestros resultados pueden ser entendidos bajo estos términos. No obstante, para poder determinar con mayor certeza se requieren estudios consecuentes que profundicen en la evaluación de la actividad de los nichos neurogénicos del neonato y del adulto.

CONCLUSIÓN

En el presente estudio encontramos que los efectos del estrés en las etapas tempranas de la vida sobre la proliferación celular en el hipocampo no son significativos a pesar de encontrarse una disminución en los parámetros medidos. Por ello, creemos que es necesario evaluar la actividad del nicho neurogénico en puntos específicos del neonato y adulto, de manera que pueda identificarse si en algún momento estas disminuciones representan cambios significativos que conduzcan a una modificación a largo plazo de la estructura o funcionamiento del hipocampo.

BIBLIOGRAFÍA

- Altman, J., & Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of comparative neurology*, 124(3), 319–335. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5861717>
- Alvarez-Buylla, A., García-Verdugo, J. M., & Tramontin, A. D. (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(4), 287–293. <https://doi.org/10.1038/35067582>
- Alvarez-Buylla, A., & Lim, D. A. (2004). Minireview For the Long Run: Maintaining Germinal Niches in the Adult Brain astrocytes are neurogenic stem cells challenges traditional views concerning brain development as well as stem cell identity. *Studies in adult birds and developing. Neuron*, 41, 683–686. <https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0896-6273%2804%2900111-4>
- Ansorg, A., Witte, O. W., & Urbach, A. (2012). Age-dependent kinetics of dentate gyrus neurogenesis in the absence of cyclin D2. *BMC Neuroscience*, 13(1), 46. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-13-46>
- Barker, D. J. P. (1990). The fetal and infant origins of adult disease The womb may be more important than the home. *Bmj*, 301(156), 1111.
- Barker, D. J. P. (1995). Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ*, 311(6998), 171–174. <https://doi.org/10.1136/bmj.311.6998.171>
- Bernard, C. (1865). *An Introduction to the Study of Experimental Medicine*. Macmillan & Co., Ltd.
- Bock, J., Gruss, M., Becker, S., & Braun, K. (2005). Experience-induced Changes of Dendritic Spine Densities in the Prefrontal and Sensory Cortex: Correlation with Developmental Time Windows. *Cerebral Cortex*, 15(6), 802–808. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhh181>
- Bowlby, J. (1977). The making and breaking of affectional bonds. I. Aetiology and psychopathology in the light of attachment theory. An expanded version of the Fiftieth Maudsley Lecture, delivered before the Royal College of Psychiatrists, 19 November 1976. *British Journal of Psychiatry*, 130(3), 201–210. <https://doi.org/10.1192/bjp.130.3.201>
- Bremner, J. D., Narayan, M., Anderson, E. R., Staib, L. H., Miller, H. L., & Charney, D. S. (2000). Hippocampal volume reduction in major depression. *American Journal of Psychiatry*, 157(1), 115–117. <https://doi.org/10.1176/ajp.157.1.115>
- Cannon, W. B. (1932). *The Wisdom of the Body*. W. W. Norton & Company.
- Charmandari, E., Tsigos, C., & Chrousos, G. (2005). ENDOCRINOLOGY OF THE STRESS RESPONSE. *Annual Review of Physiology*, 67(1), 259–284. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.040403.120816>
- Chrousos, G. P., & Gold, P. W. (1992). The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 267(9), 1244–1252. <https://doi.org/10.1001/jama.267.9.1244>
- Clancy, B., Finlay, B. L., Darlington, R. B., & Anand, K. J. S. (2007). Extrapolating brain

- development from experimental species to humans. *NeuroToxicology*, 28(5 SPEC. ISS.), 931–937. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2007.01.014>
- Cohen, R. A., Hitsman, B. L., Paul, R. H., McCaffery, J., Stroud, L., Sweet, L., Gunstad, J., Niaura, R., MacFarlane, A., Bryant, R. A., & Gordon, E. (2006). Early Life Stress and Adult Emotional Experience: An International Perspective. *The International Journal of Psychiatry in Medicine*, 36(1), 35–52. <https://doi.org/10.2190/5R62-9PQY-0NEL-TLPA>
- Czéh, B., Michaelis, T., Watanabe, T., Frahm, J., de Biurrun, G., van Kampen, M., Bartolomucci, A., & Fuchs, E. (2001). Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(22), 12796–12801. <https://doi.org/10.1073/pnas.211427898>
- Davis, M. (1992). The Role of the Amygdala in Fear and Anxiety. *Annual Review of Neuroscience*, 15(1), 353–375. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.15.030192.002033>
- Edwards, V. J., Holden, G. W., Felitti, V. J., & Anda, R. F. (2003). Relationship Between Multiple Forms of Childhood Maltreatment and Adult Mental Health in Community Respondents: Results From the Adverse Childhood Experiences Study. *American Journal of Psychiatry*, 160(8), 1453–1460. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.160.8.1453>
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.-M., Nordborg, C., Peterson, D. A., & Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine*, 4(11), 1313–1317. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/3305>
- Ernst, A., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Druid, H., & Frisén, J. (2014). Neurogenesis in the Striatum of the Adult Human Brain. *Cell*, 156(5), 1072–1083. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.044>
- Faulkner, R. L., Jang, M. H., Liu, X. B., Duan, X., Sailor, K. A., Ju, Y. K., Ge, S., Jones, E. G., Ming, G. L., Song, H., & Cheng, H. J. (2008). Development of hippocampal mossy fiber synaptic outputs by new neurons in the adult brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(47), 18643–18643. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809330105>
- Gage, F. H., Kempermann, G., Palmer, T. D., Peterson, D. A., & Ray, J. (1998). Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. *Journal of Neurobiology*, 36(2), 249–266. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4695\(199808\)36:2<249::AID-NEU11>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4695(199808)36:2<249::AID-NEU11>3.0.CO;2-9)
- Ganusov, V. V., & De Boer, R. J. (2013). A mechanistic model for bromodeoxyuridine dilution naturally explains labelling data of self-renewing T cell populations. *Journal of The Royal Society Interface*, 10(78), 20120617. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0617>
- Ge, S., Sailor, K. A., Ming, G. L., & Song, H. (2008). Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus. *Journal of Physiology*, 586(16), 3759–3765. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.155655>
- Godoy, L. D., Rossignoli, M. T., Delfino-Pereira, P., Garcia-Cairasco, N., & de Lima Umeoka, E. H. (2018). A Comprehensive Overview on Stress Neurobiology: Basic Concepts and Clinical Implications. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12(July), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00127>
- Gonçalves, J. T., Schafer, S. T., & Gage, F. H. (2016). Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell*, 167(4), 897–914.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.021>

- Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B. S., Flugge, G., & Fuchs, E. (1998). Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(6), 3168–3171. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3168>
- Gould, E., McEwen, B. S., Tanapat, P., Galea, L. A., & Fuchs, E. (1997). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(7), 2492–2498. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9065509>
- Gould, Elizabeth, Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., & Shors, T. J. (1999). Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nature Neuroscience*, 2(3), 260–265. <https://doi.org/10.1038/6365>
- Gould, Elizabeth, Woolley, C. S., Cameron, H. A., Daniels, D. C., & McEwen, B. S. (1991). Adrenal steroids regulate postnatal development of the rat dentate gyrus: II. Effects of glucocorticoids and mineralocorticoids on cell birth. *Journal of Comparative Neurology*, 313(3), 486–493. <https://doi.org/10.1002/cne.903130309>
- Gould, Elizabeth, Woolley, C. S., Cameron, H. A., Daniels, D. C., & McEwen, B. S. (1992). Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *Journal of Neuroscience*, 12(9), 3642–3650.
- Gunnar, M. R., & Donzella, B. (2002). Social regulation of the cortisol levels in early human development. *Psychoneuroendocrinology*, 27(1–2), 199–220. [https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(01\)00045-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(01)00045-2)
- Hayek, D., Thams, F., Flöel, A., & Antonenko, D. (2020). Dentate Gyrus Volume Mediates the Effect of Fornix Microstructure on Memory Formation in Older Adults. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12(March), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00079>
- Heim, C., & Nemeroff, C. B. (2001). The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: Preclinical and clinical studies. *Biological Psychiatry*, 49(12), 1023–1039. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(01\)01157-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(01)01157-X)
- Heim, C., Newport, D. J., Mletzko, T., Miller, A. H., & Nemeroff, C. B. (2008). The link between childhood trauma and depression: Insights from HPA axis studies in humans. *Psychoneuroendocrinology*, 33(6), 693–710. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.03.008>
- Herman, J. P., Cullinan, W. E., Morano, M. I., Akil, H., & Watson, S. J. (1995). Contribution of the Ventral Subiculum to Inhibitory Regulation of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis. *Journal of Neuroendocrinology*, 7(6), 475–482. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.1995.tb00784.x>
- Herman, J. P., Ostrander, M. M., Mueller, N. K., & Figueiredo, H. (2005). Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary- adrenocortical axis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 29(8), 1201–1213. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2005.08.006>
- Hueston, C. M., Cryan, J. F., & Nolan, Y. M. (2017). Stress and adolescent hippocampal neurogenesis: diet and exercise as cognitive modulators. *Translational Psychiatry*, 7(4), e1081–e1081. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.48>

- Huh, H. J., Kim, S.-Y., Yu, J. J., & Chae, J.-H. (2014). Childhood trauma and adult interpersonal relationship problems in patients with depression and anxiety disorders. *Annals of General Psychiatry*, 13(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s12991-014-0026-y>
- Hulshof, H. J., Novati, A., Sgoifo, A., Luiten, P. G. M., Den Boer, J. A., & Meerlo, P. (2011). Maternal separation decreases adult hippocampal cell proliferation and impairs cognitive performance but has little effect on stress sensitivity and anxiety in adult Wistar rats. *Behavioural Brain Research*, 216(2), 552–560. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.08.038>
- Huot, R. L., Plotsky, P. M., Lenox, R. H., & McNamara, R. K. (2002). Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Research*, 950(1–2), 52–63. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)02985-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)02985-2)
- INEGI. (2017). *Anuario Estadístico y Geográfico de Michoacán de Ocampo 2017*. <https://doi.org/10.7283/T5MW2F2D>
- Jašarević, E., & Bale, T. L. (2019). Prenatal and postnatal contributions of the maternal microbiome on offspring programming. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 55(April), 100797. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2019.100797>
- Jun, H., Mohammed Qasim Hussaini, S., Rigby, M. J., & Jang, M.-H. (2012). Functional Role of Adult Hippocampal Neurogenesis as a Therapeutic Strategy for Mental Disorders. *Neural Plasticity*, 2012, 1–20. <https://doi.org/10.1155/2012/854285>
- Keller-Wood, M. E., & Dallman, M. F. (1984). Corticosteroid Inhibition of ACTH Secretion. *Endocrine Reviews*, 5(1), 1–24. <https://doi.org/10.1210/edrv-5-1-1>
- Kempermann, G., Gage, F. H., Aigner, L., Song, H., Curtis, M. A., Thuret, S., Kuhn, H. G., Jessberger, S., Frankland, P. W., Cameron, H. A., Gould, E., Hen, R., Abrous, D. N., Toni, N., Schinder, A. F., Zhao, X., Lucassen, P. J., & Frisén, J. (2018). Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions. *Cell Stem Cell*, 23(1), 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.04.004>
- Korosi, A., Naninck, E. F. G., Oomen, C. A., Schouten, M., Krugers, H., Fitzsimons, C., & Lucassen, P. J. (2012). Early-life stress mediated modulation of adult neurogenesis and behavior. *Behavioural Brain Research*, 227(2), 400–409. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.07.037>
- Krueger, D. W. (1983). Childhood Parent Loss: Developmental Impact and Adult Psychopathology. *American Journal of Psychotherapy*, 37(4), 582–592. <https://doi.org/10.1176/appi.psychotherapy.1983.37.4.582>
- Ladd, C. O., Huot, R. L., Thiruvikraman, K. V., Nemeroff, C. B., Meaney, M. J., & Plotsky, P. M. (2000). Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. En *The Biological Basis for Mind Body Interactions* (Vol. 122, pp. 81–103). [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)62132-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)62132-9)
- Lajud, N., Roque, A., Cajero, M., Gutiérrez-Ospina, G., & Torner, L. (2012). Periodic maternal separation decreases hippocampal neurogenesis without affecting basal corticosterone during the stress hyporesponsive period, but alters HPA axis and coping behavior in adulthood. *Psychoneuroendocrinology*, 37(3), 410–420. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.07.011>
- Lajud, N., & Torner, L. (2015). Early life stress and hippocampal neurogenesis in the

- neonate: sexual dimorphism, long term consequences and possible mediators. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 8(February), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00003>
- Lehmann, M. L., Brachman, R. A., Martinowich, K., Schloesser, R. J., & Herkenham, M. (2013). Glucocorticoids Orchestrate Divergent Effects on Mood through Adult Neurogenesis. *Journal of Neuroscience*, 33(7), 2961–2972. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3878-12.2013>
- Leuner, B., Mendolia-Loffredo, S., Kozorovitskiy, Y., Samburg, D., Gould, E., & Shors, T. J. (2004). Learning Enhances the Survival of New Neurons beyond the Time when the Hippocampus Is Required for Memory. *Journal of Neuroscience*, 24(34), 7477–7481. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0204-04.2004>
- Li, G., Fang, L., Fernández, G., & Pleasure, S. J. (2013). The Ventral Hippocampus Is the Embryonic Origin for Adult Neural Stem Cells in the Dentate Gyrus. *Neuron*, 78(4), 658–672. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.03.019>
- Lucassen, P. J., Oomen, C. A., Naninck, E. F. G., Fitzsimons, C. P., Dam, A.-M. van, Boldizsár, C., & Korosi, A. (2015). Regulation of Adult Neurogenesis and Plasticity by (Early) Stress, Glucocorticoids, and Inflammation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press Regulation*, 7(9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021303>
- Markakis, E. A., & Gage, F. H. (1999). Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *The Journal of Comparative Neurology*, 406(4), 449–460. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19990419\)406:4<449::AID-CNE3>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19990419)406:4<449::AID-CNE3>3.0.CO;2-I)
- McEwen, B. S. (2001). Plasticity of the hippocampus: adaptation to chronic stress and allostatic load. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 933, 265–277. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12000027>
- McEwen, B. S., & Sapolsky, R. M. (1995). Stress and cognitive function. *Current Opinion in Neurobiology*, 5(2), 205–216. [https://doi.org/10.1016/0959-4388\(95\)80028-X](https://doi.org/10.1016/0959-4388(95)80028-X)
- McEwen, B. S., & Stellar, E. (1993). Stress and the Individual. *Archives of Internal Medicine*, 153(18), 2093. <https://doi.org/10.1001/archinte.1993.00410180039004>
- Melo, C., Vizin, R. C. L., Silva, N. U., Ishikawa, D. T., Echeverry, M. B., Carrettiero, D. C., & Almeida, M. C. (2018). Early maternal separation promotes alterations in the thermoregulatory profile of adult Wistar rats. *Journal of Thermal Biology*, 78(July), 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.09.013>
- Milde, A. M., Enger, Ø., & Murison, R. (2004). The effects of postnatal maternal separation on stress responsivity and experimentally induced colitis in adult rats. *Physiology and Behavior*, 81(1), 71–84. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.01.002>
- Ming, G. li, & Song, H. (2011). Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron*, 70(4), 687–702. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.001>
- Mirescu, C., Peters, J. D., & Gould, E. (2004). Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nature Neuroscience*, 7(8), 841–846. <https://doi.org/10.1038/nn1290>

- Monroy, E., Hernández-Torres, E., & Flores, G. (2010). Maternal separation disrupts dendritic morphology of neurons in prefrontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens in male rat offspring. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 40(2), 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2010.05.005>
- Moreno-Jiménez, E. P., Flor-García, M., Terreros-Roncal, J., Rábano, A., Cafini, F., Pallas-Bazarra, N., Ávila, J., & Llorens-Martín, M. (2019). Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 25(4), 554–560. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0375-9>
- Mouret, A., Gheusi, G., Gabellec, M. M., De Chaumont, F., Olivo-Marin, J. C., & Lledo, P. M. (2008). Learning and survival of newly generated neurons: When time matters. *Journal of Neuroscience*, 28(45), 11511–11516. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2954-08.2008>
- Mühlen K aus der, & Ockenfels, H. (1969). [Morphological alterations in the diencephalon and telencephalon following disturbances to the feedback mechanism adenohypophysis-adrenal cortex. 3. Studies on the guinea pig after administration of cortisone and hydrocortisone]. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria: 1948)*, 93(1), 126–141. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5784535>
- Murthy, S., & Gould, E. (2018). Early Life Stress in Rodents: Animal Models of Illness or Resilience? *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12(July), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00157>
- Nicolaides, N. C., Kyratzi, E., Lamprokostopoulou, A., Chrousos, G. P., & Charmandari, E. (2014). Stress, the stress system and the role of glucocorticoids. *NeuroImmunoModulation*, 22, 6–19. <https://doi.org/10.1159/000362736>
- Oreland, S., Nylander, I., & Pickering, C. (2010). Prolonged maternal separation decreases granule cell number in the dentate gyrus of 3-week-old male rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 28(2), 139–144. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2009.12.005>
- Parent, J. M., Yu, T. W., Leibowitz, R. T., Geschwind, D. H., Sloviter, R. S., & Lowenstein, D. H. (1997). Dentate Granule Cell Neurogenesis Is Increased by Seizures and Contributes to Aberrant Network Reorganization in the Adult Rat Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 17(10), 3727–3738. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-10-03727.1997>
- Parker, G., Gladstone, G., Mitchell, P., Wilhelm, K., & Roy, K. (2000). Do early adverse experiences establish a cognitive vulnerability to depression on exposure to mirroring life events in adulthood? *Journal of Affective Disorders*, 57(1–3), 209–215. [https://doi.org/10.1016/S0165-0327\(99\)00091-9](https://doi.org/10.1016/S0165-0327(99)00091-9)
- Pechtel, P., & Pizzagalli, D. A. (2011). Effects of early life stress on cognitive and affective function: an integrated review of human literature. *Psychopharmacology*, 214(1), 55–70. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-2009-2>
- Platel, J. C., Dave, K. A., Gordon, V., Lacar, B., Rubio, M. E., & Bordey, A. (2010). NMDA Receptors Activated by Subventricular Zone Astrocytic Glutamate Are Critical for Neuroblast Survival Prior to Entering a Synaptic Network. *Neuron*, 65(6), 859–872.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.03.009>

- Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (1993). Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Molecular Brain Research*, 18(3), 195–200. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(93\)90189-V](https://doi.org/10.1016/0169-328X(93)90189-V)
- Rubin, R. T., Mandell, A. J., & Crandall, P. H. (1966). Corticosteroid responses to limbic stimulation in man: Localization of stimulus sites. *Science*, 153(3737), 767–768. <https://doi.org/10.1126/science.153.3737.767>
- Ruiz, R., Roque, A., Pineda, E., Licona-Limón, P., José Valdéz-Alarcón, J., & Lajud, N. (2018). Early life stress accelerates age-induced effects on neurogenesis, depression, and metabolic risk. *Psychoneuroendocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.07.012>
- Sapolsky, R. M. (1985). Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: Temporal aspects of neuronal vulnerability. *Brain Research*, 359(1–2), 300–305. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)91440-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)91440-4)
- Sapolsky, R. M. (1992). Do glucocorticoid concentrations rise with age in the rat? *Neurobiology of Aging*, 13(1), 171–174. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(92\)90025-S](https://doi.org/10.1016/0197-4580(92)90025-S)
- Sapolsky, R. M. (1994). The physiological relevance of glucocorticoid endangerment of the hippocampus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 746(1), 294–304; discussion 304–7. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb39247.x>
- Sapolsky, R. M., Krey, L. C., & McEwen, B. S. (1986). The Neuroendocrinology of Stress and Aging: The Glucocorticoid Cascade Hypothesis*. *Endocrine Reviews*, 7(3), 284–301. <https://doi.org/10.1210/edrv-7-3-284>
- Schapiro, S., Geller, E., & Eiduson, S. (1962). Neonatal Adrenal Cortical Response to Stress and Vasopressin. *Experimental Biology and Medicine*, 109(4), 937–941. <https://doi.org/10.3181/00379727-109-27384>
- Schloesser, R. J., Manji, H. K., & Martinowich, K. (2009). Suppression of adult neurogenesis leads to an increased hypothalamo-pituitary-adrenal axis response. *NeuroReport*, 20(6), 553–557. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e3283293e59>
- Schoenfeld, T. J., & Gould, E. (2012). Stress, stress hormones, and adult neurogenesis. *Experimental Neurology*, 233(1), 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.01.008>
- Schoenfeld, T. J., & Gould, E. (2013). Differential Effects of Stress and Glucocorticoids on Adult Neurogenesis. En *Current topics in behavioral neurosciences* (Vol. 15, Número November 2011, pp. 189–210). <https://doi.org/10.1007/7854>
- Seaberg, R. M., & van der Kooy, D. (2003). Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends in Neurosciences*, 26(3), 125–131. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00031-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00031-6)
- Selye, H. (1936). A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature*, 138(3479), 32–32. <https://doi.org/10.1038/138032a0>
- Selye, H. (1956). *The Stress of Life*. McGraw-Hill Book Company.

- Selye, H. (1974). *Stress without distress* (Third). J. B. Lippincott & Co.
- Seri, B., García-Verdugo, J. M., Collado-Morente, L., McEwen, B. S., & Alvarez-Buylla, A. (2004). Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *Journal of Comparative Neurology*, 478(4), 359–378. <https://doi.org/10.1002/cne.20288>
- Sheline, Y. I., Wang, P. W., Gado, M. H., Csernansky, J. G., & Vannier, M. W. (1996). Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(9), 3908–3913. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.9.3908>
- Shi, Y., Chichung Lie, D., Taupin, P., Nakashima, K., Ray, J., Yu, R. T., Gage, F. H., & Evans, R. M. (2004). Expression and function of orphan nuclear receptor TLX in adult neural stem cells. *Nature*, 427(6969), 78–83. <https://doi.org/10.1038/nature02211>
- Smith, S. M., & Vale, W. W. (2006). The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 8(4), 383–395. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.222>
- Sorrells, S. F., Paredes, M. F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K. W., James, D., Mayer, S., Chang, J., Auguste, K. I., Chang, E. F., Gutierrez, A. J., Kriegstein, A. R., Mathern, G. W., Oldham, M. C., Huang, E. J., Garcia-Verdugo, J. M., Yang, Z., & Alvarez-Buylla, A. (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature*, 555(7696), 377–381. <https://doi.org/10.1038/nature25975>
- Spencer, R. L., & Bland, S. T. (2019). Hippocampus and Hippocampal Neurons. En *Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology* (pp. 57–68). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813146-6.00005-9>
- Sterling, P., & Eyer, J. (1988). Allostasis: A new paradigm to explain arousal pathology. En S. Fisher & J. Reason (Eds.), *Handbook of life stress, cognition and health* (pp. 639–646). John Wiley and Sons. <http://retina.anatomy.upenn.edu/pdfiles/5446.pdf>
- Sung, Y. H., Shin, M. S., Cho, S., Baik, H. H., Jin, B. K., Chang, H. K., Lee, E. K., & Kim, C. J. (2010). Depression-like state in maternal rats induced by repeated separation of pups is accompanied by a decrease of cell proliferation and an increase of apoptosis in the hippocampus. *Neuroscience Letters*, 470(1), 86–90. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.12.063>
- Surget, A., Tanti, A., Leonardo, E. D., Laugeray, A., Rainer, Q., Touma, C., Palme, R., Griebel, G., Ibarguen-Vargas, Y., Hen, R., & Belzung, C. (2011). Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. *Molecular Psychiatry*, 16(12), 1177–1188. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.48>
- Suri, D., Veenit, V., Sarkar, A., Thiagarajan, D., Kumar, A., Nestler, E. J., Galande, S., & Vaidya, V. A. (2013). Early stress evokes age-dependent biphasic changes in hippocampal neurogenesis, Bdnf expression, and cognition. *Biological Psychiatry*, 73(7), 658–666. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.10.023>
- Szabo, S., Tache, Y., & Somogyi, A. (2012). The legacy of Hans Selye and the origins of stress research: A retrospective 75 years after his landmark brief “letter” to the Editor#of Nature. *Stress*, 15(5), 472–478. <https://doi.org/10.3109/10253890.2012.710919>

- Tanapat, P., Hastings, N. B., Rydel, T. A., Galea, L. A. M., & Gould, E. (2001). Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. *Journal of Comparative Neurology*, 437(4), 496–504. <https://doi.org/10.1002/cne.1297>
- Tobin, M. K., Musaraca, K., Disouky, A., Shetti, A., Bheri, A., Honer, W. G., Kim, N., Dawe, R. J., Bennett, D. A., Arfanakis, K., & Lazarov, O. (2019). Human Hippocampal Neurogenesis Persists in Aged Adults and Alzheimer's Disease Patients. *Cell Stem Cell*, 24(6), 974-982.e3. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.05.003>
- Toni, N., Teng, E. M., Bushong, E. A., Aimone, J. B., Zhao, C., Consiglio, A., van Praag, H., Martone, M. E., Ellisman, M. H., & Gage, F. H. (2007). Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nature Neuroscience*, 10(6), 727–734. <https://doi.org/10.1038/nn1908>
- UNICEF. (2017). *Informe Anual. Situación de la infancia en México 2017*. <http://www.unicef.org.mx/Informe2017/Informe-Anual-2017.pdf>
- Van Bokhoven, P., Oomen, C. A., Hoogendijk, W. J. G., Smit, A. B., Lucassen, P. J., & Spijker, S. (2011). Reduction in hippocampal neurogenesis after social defeat is long-lasting and responsive to late antidepressant treatment. *European Journal of Neuroscience*, 33(10), 1833–1840. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07668.x>
- Van Strien, N. M., Cappaert, N. L. M., & Witter, M. P. (2009). The anatomy of memory: An interactive overview of the parahippocampal- hippocampal network. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(4), 272–282. <https://doi.org/10.1038/nrn2614>
- Vargas, J., Junco, M., Gomez, C., & Lajud, N. (2016). Early Life Stress Increases Metabolic Risk, HPA Axis Reactivity, and Depressive-Like Behavior When Combined with Postweaning Social Isolation in Rats. *PLOS ONE*, 11(9), e0162665. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162665>
- Veena, J., Srikumar, B. N., Mahati, K., Bhagya, V., Raju, T. R., & Shankaranarayana Rao, B. S. (2009). Enriched environment restores hippocampal cell proliferation and ameliorates cognitive deficits in chronically stressed rats. *Journal of Neuroscience Research*, 87(4), 831–843. <https://doi.org/10.1002/jnr.21907>
- Yap, J. J., Takase, L. F., Kochman, L. J., Fornal, C. A., Miczek, K. A., & Jacobs, B. L. (2006). Repeated brief social defeat episodes in mice: Effects on cell proliferation in the dentate gyrus. *Behavioural Brain Research*, 172(2), 344–350. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.05.027>
- Zhao, C., Teng, E. M., Summers, R. G., Ming, G. L., & Gage, F. H. (2006). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 26(1), 3–11. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3648-05.2006>