



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE QUÍMICO  
FARMACOBIOLOGÍA**



## **TESIS**

**“EFECTOS DEL ESTRÉS SOBRE LAS CÉLULAS MICROGLIALES EN EL  
HIPOCAMPO DE RATAS HEMBRAS VÍRGENES Y LACTANTES”**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA:**

**MARCO ANTONIO FERREIRA VILLANEDA**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**D EN C. MARÍA DE LA LUZ TORNER AGUILAR**

**CO-DIRECTOR DE TESIS:**

**D EN C. LUIS MIGUEL SAAVEDRA PIMENTEL**

**Morelia, Michoacán, septiembre de 2022**

## ÍNDICE GENERAL.

<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>1</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>2</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>3</b>
<b>I.- RESUMEN.....</b>	<b>4</b>
<b>II.- ABSTRACT.....</b>	<b>5</b>
<b>III.- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>6</b>
<b>IV.- MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>7</b>
<b>1.- Cambios fisiológicos durante el embarazo y la lactancia.....</b>	<b>7</b>
1.1.- <i>Cambios en el cerebro femenino durante el embarazo y la lactancia.....</i>	<i>7</i>
1.2.- <i>Hormonas o neuropéptidos importantes para la conducta materna y la lactancia.....</i>	<i>10</i>
<b>2.- Respuesta al estrés en general.....</b>	<b>11</b>
2.1.- <i>Estructura y función del hipocampo.....</i>	<i>14</i>
2.2.- <i>Respuesta al estrés en la hembra durante el embarazo y la lactancia.....</i>	<i>15</i>
<b>3.- Estrés sufrido en la etapa prenatal.....</b>	<b>16</b>
<b>4.- Depresión posparto (PPD).....</b>	<b>17</b>
4.1.- <i>Modelos animales de la PPD.....</i>	<i>19</i>
4.2.- <i>Consecuencias de la PPD.....</i>	<i>19</i>
<b>5.- Sistema neuroinmune y su participación en respuesta al estrés.....</b>	<b>21</b>
5.1.- <i>Cambios morfológicos y funciones de la microglía.....</i>	<i>23</i>
5.2.- <i>Efectos del estrés sobre la microglía.....</i>	<i>24</i>
<b>V.- JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>26</b>
<b>VI.- HIPÓTESIS.....</b>	<b>26</b>
<b>VII.- OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>27</b>
1.- <b>Objetivos particulares.....</b>	<b>27</b>
<b>VIII.- MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
1.- <b>Animales.....</b>	<b>27</b>
2.- <b>Grupos experimentales.....</b>	<b>27</b>
3.- <b>Grupos control.....</b>	<b>27</b>
4.- <b>Estrés crónico.....</b>	<b>27</b>

<b>5.- Estrés prenatal.....</b>	<b>28</b>
<b>6.- Estrategia experimental.....</b>	<b>28</b>
<b>7.- Perfusión intracardiaca y eutanasia.....</b>	<b>28</b>
<b>8.- Procesamiento de los cerebros.....</b>	<b>28</b>
<b>9.- Inmunohistoquímica.....</b>	<b>29</b>
<b>10.- Análisis morfológico.....</b>	<b>29</b>
<b>11.- Estadística.....</b>	<b>29</b>
<b>IX.- RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
<b>X.- DISCUSIÓN.....</b>	<b>39</b>
<b>XI.- CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS.....</b>	<b>42</b>
<b>XII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>43</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.- Mecanismo de respuesta al estrés.....	12
Figura 2.- Corte horizontal del cerebro humano y estructura del hipocampo en distintas especies.....	14
Figura 3. Prevalencia mundial de los trastornos depresivos en porcentaje de la población, por edad y sexo.....	18
Figura 4.- Relación entre la PPD y el impacto negativo hacia su descendencia, así como las intervenciones que podrían corregir dicho impacto.....	20
Figura 5.- Origen de macrófagos y células de la microglía.....	22
Figura 6.- Transformaciones de la microglía tanto en términos de fenotipo como de moléculas secretoras con el avance de la edad.....	23
Figura 7. Número total de microglía/mm <sup>2</sup> en CA3 del hipocampo de ratas vírgenes.....	31
Figura 8. Porcentaje de microglía activada en CA3 del hipocampo de ratas vírgenes.....	31
Figura 9. Número total de microglía/mm <sup>2</sup> en CA3 del hipocampo de ratas lactantes.....	32
Figura 10. Porcentaje de microglía activada en CA3 del hipocampo de ratas lactantes.....	32
Figura 11. Comparación de la densidad de microglía total y porcentaje de microglía activada entre grupos de ratas vírgenes y lactantes en CA3.....	33
Figura 12. Fotomicrografías de microglía en la región de CA3 del hipocampo.....	34
Figura 13. Análisis de microglía en hilus del hipocampo de ratas vírgenes.....	35
Figura 14. Análisis de microglía en hilus del hipocampo de ratas lactantes.....	36
Figura 15. Comparación de la densidad de microglía total y porcentaje de microglía activada entre grupos de ratas vírgenes y lactantes en hilus.....	37
Figura 16. Fotomicrografías de microglía en la región de hilus del hipocampo.....	38

## ÍNDICE DE TABLAS.

<b>Tabla 1. Ejemplos de las diferentes formas de plasticidad neuronal asociadas al periodo periparto.....</b>	<b>8</b>
---	----------

## LISTA DE ABREVIATURAS.

<b>ACTH</b>	Hormona corticotropina
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>AVP</b>	Arginina vasopresina
<b>BNST</b>	Núcleo del lecho de la estría terminal
<b>CRH</b>	Hormona liberadora de corticotropina
<b>Eje HPA</b>	Eje Hipotalámico- Pituitario- Adrenal
<b>Eje SAM</b>	Eje Simpático-adrenomedular
<b>ER- alfa</b>	Receptor de estrógeno alfa
<b>HSD-11<math>\beta</math>2</b>	11 beta hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2
<b>ICD</b>	Diámetro capilar interno
<b>IGF- 1</b>	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
<b>IGF- 2</b>	Factor de crecimiento insulínico tipo 2
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-4</b>	Interleucina 4
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>MHCII</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad tipo 2
<b>mPFC</b>	Corteza prefrontal medial
<b>MPOA</b>	Área preóptica medial
<b>OB</b>	Bulbo olfatorio
<b>OXT</b>	Oxitocina
<b>OXT-R</b>	Receptor de oxitocina
<b>PIGF</b>	Factor de crecimiento placentario
<b>PPD</b>	Depresión posparto
<b>PRL</b>	Prolactina
<b>PVN</b>	Núcleo paraventricular
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SON</b>	Núcleo supraóptico
<b>SVZ</b>	Zona subventricular
<b>TDAH</b>	Trastorno por déficit de atención e hiperactividad
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular
<b>VMH</b>	Hipotálamo ventromedial

## I. RESUMEN.

**Introducción.** La depresión que sufre la madre después del nacimiento se conoce como depresión posparto, su prevalencia oscila entre el 10% y el 15%. Durante el embarazo, el estrés crónico puede conducir a estados depresivos, lo cual representa uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de trastornos afectivos posparto, incluida la generación siguiente. La microglía es un tipo celular que forma parte del sistema neuroinmune, pueden responder a diversos estímulos y activarse, entre ellos al estrés. **Objetivo.** Nuestro objetivo fue evaluar si el estrés crónico y el estrés prenatal aumentan la densidad celular y/o la activación de la microglía en el hipocampo durante la lactancia, en comparación a la nuliparidad. **Material y métodos.** Se utilizaron ratas hembras adultas de 5 meses de edad, se conformaron 2 grupos, vírgenes (V), lactantes (L) y cada grupo se subdividió en control (C), estrés crónico (EC) y estrés prenatal (EP). Los grupos de ratas hembras (excepto los controles) fueron sometidas a estrés por restricción, una hora diaria durante 10 días. Se analizó la población de microglía en la región CA3 e hilus del hipocampo. **Resultados.** En CA3 el estrés provocó una tendencia al aumento del número total de microglía en ratas lactantes. En ratas vírgenes ocasionó una tendencia al aumento del porcentaje de microglía activada. En la región del hilus se encontró una disminución del número total de microglía y un aumento del porcentaje de microglía activada por el estrés en ratas vírgenes. Finalmente, en ambas regiones del hipocampo, hubo un aumento del número total de microglía y una disminución del porcentaje de microglía activada a causa de la condición fisiológica, en ratas lactantes en comparación con las ratas vírgenes. **Conclusión.** Esto sugiere que, aunque la lactancia incrementa la población total de microglía, existe un efecto neuroprotector que evita su mayor activación.

**Palabras clave:** Estrés, depresión posparto, microglía, lactancia, hipocampo

## II. ABSTRACT.

**Introduction.** The depression suffered by the mother after birth is known as postpartum depression, prevalence ranges between 10% and 15%. During pregnancy, chronic stress can lead to depressive states, which represents one of the most important risk factors for the development of postpartum affective disorders, including the next generation. Microglial cells are part of the neuroimmune system, they can respond to various stimuli and become activated, including stress. **Objective.** Our aim is to evaluate if chronic stress and prenatal stress increase cell density and / or microglial activation in the hippocampus during lactation, compared to nulliparity. **Material and methods.** 5-month-old adult female rats were used, 2 groups were formed, virgins (V), infants (L) and each group was subdivided into control (C), chronic stress (EC) and prenatal stress (EP). Groups of female rats (except controls) were subjected to restriction stress for one hour daily for 10 days. The microglia population in the CA3 and hilus region of the hippocampus. **Results.** In CA3 stress caused a tendency to increase the total number of microglia in lactating rats. In virgin rats caused a tendency to increase the percentage of activated microglia. In the hilus region, a decrease in the total number of microglia and an increase in the percentage of stress-activated microglia were found in virgin rats, under physiological conditions. Finally, in both regions of the hippocampus, there was an increase in the total number of microglia and a decrease in the percentage of activated microglia, in lactating rats compared to virgin rats. **Conclusion.** This suggests that, although lactation increases the total population of microglia, there is a neuroprotective effect that prevents his further activation.

**Keywords:** Stress, postpartum depression, microglia, lactation, hippocampus

### III.INTRODUCCIÓN.

En respuesta al estrés, el cuerpo activa múltiples procesos coordinados y dinámicos para restaurar la homeostasis y preservar la vida. Estos procesos incluyen la activación de los ejes simpático-adrenomedular (SAM) e hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA). El eje HPA es el eje principal que regula la exposición al estrés, tiene como objetivo final, iniciar la síntesis y liberación de glucocorticoides. El eje HPA está sujeto a inhibición por retroalimentación por su producto principal, los glucocorticoides, y está mediada en parte por el hipocampo, el cual forma parte de la formación hipocampal. La formación hipocampal está constituida por el giro dentado, hipocampo, complejo subicular y corteza entorrinal. Es una estructura prominente en forma de C que sobresale en el piso del cuerno temporal del ventrículo lateral. El hipocampo se divide en CA1, CA2 y CA3.

Durante el embarazo y la lactancia, se producen numerosos cambios a nivel fisiológico, celular y molecular, que particularmente distinguen a una madre lactante de una nulípara, entre ellos, la respuesta del eje HPA ha mostrado estar severamente atenuada a una variedad de estresores en madres.

La depresión que ocurre después del nacimiento se conoce como depresión posparto (PPD). Las causas de este padecimiento son múltiples, incluyen interacciones epigenéticas, genéticas y de estrés / ambiente, incluso en el desarrollo temprano de la propia madre. La PPD es una enfermedad mental grave que también afecta al niño. Los hijos de madres que padecen PPD corren el riesgo de tener problemas emocionales, conductuales y psicológicos, así como retrasos en el desarrollo cognitivo y del lenguaje que son evidentes más allá de la infancia temprana. La mayoría de los modelos animales de PPD se han creado sobre la base de un embarazo inducido por hormonas con la abstinencia de hormonas ováricas, el estrés crónico durante el embarazo o la exposición a glucocorticoides durante el posparto. Acerca de las consecuencias del estrés prenatal, estas incluyen un mayor riesgo de problemas emocionales, conductuales y cognitivos. También está bien establecido que el estrés prenatal puede causar hipertensión inducida y resultados físicos alterados, se ha estudiado especialmente en relación con el crecimiento fetal y la vulnerabilidad posterior a enfermedades cardiovasculares.

La microglía pertenece al sistema nervioso central, es parte de una familia de células estrechamente relacionadas llamadas macrófagos residentes en tejidos. Morfológicamente, la microglía tiene tres etapas de transición principales que se pueden distinguir como: ameboide, ramificada o en reposo y reactiva o activada y estos estados realizan diversas funciones en el cerebro. En el cerebro en desarrollo y adulto, la microglía ameboide y la ramificada apoyan la supervivencia de neuronas sanas. En respuesta a diversos estímulos, la microglía se activa y alcanza cualquiera de las dos fases de activación, es decir, M1 (proinflamatoria) y M2 (antiinflamatoria) sobre la base de la gravedad y la generación de moléculas secretoras. La microglía puede responder al estrés y en consecuencia se altera el número total de células, su morfología y función.

## **IV. MARCO TEÓRICO.**

### **1.- Cambios fisiológicos durante el embarazo y la lactancia.**

Durante el embarazo y la lactancia, se producen numerosos cambios a nivel fisiológico, celular y molecular, que particularmente distinguen a una madre lactante de una hembra nulípara y que preparan a la mujer para los desafíos de la maternidad. Esos cambios dramáticos en la fisiología materna, plasticidad del cerebro materno, y el comportamiento materno no solo ayudan a asegurar la supervivencia de la descendencia, sino también a actuar en conjunto para la salud fisiológica y mental de la madre (Hillerer et al., 2014).

Para garantizar el correcto desarrollo y la supervivencia de la futura progenie, es necesario que se lleve a cabo un fenómeno llamado placentación, el cual es un proceso de dos etapas de vasculogénesis invasiva coordinada (formación de una red ramificada de vasos vellosidades coriónicas de origen fetal) y posterior angiogénesis (Cross et al., 1994). Después de la implantación, el citotrofoblasto secreta factores angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento placentario (PIGF). Dadas las necesidades mejoradas en el suministro de sangre materna durante el embarazo, el VEGF representa un factor particularmente crucial durante ese tiempo estimulando la vasculogénesis y la angiogénesis. Esta remodelación es fundamental para la adecuada perfusión de la unidad fetoplacentaria y consecuentemente el intercambio de nutrientes, oxígeno, y desechos entre la madre y el feto en desarrollo (Demir et al., 2007). Ciertas citocinas juegan un papel crucial para los eventos asociados con el embarazo. El embarazo es caracterizado por cambios fundamentales en los niveles de las citocinas maternas para permitir la supervivencia del feto, que puede verse como injerto semi alogénico. Así, el embarazo puede ser considerado como un estado de inflamación leve y controlada, sin embargo, asegurando el mantenimiento de un delicado equilibrio entre citocinas antiinflamatorias, entre ellas interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10), y proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF), interleucina 1 (IL-1) e interleucina 8 (IL-8) (Hillerer et al., 2014). Aparte de estos cambios que ocurren durante las primeras etapas del embarazo, existen numerosas adaptaciones a nivel del cerebro de la madre hacia el final del embarazo y en el período de lactancia (Hillerer et al., 2014).

#### *1.1.- Cambios en el cerebro femenino durante el embarazo y la lactancia.*

Durante el período periparto, el cerebro materno sufre múltiples cambios macroscópicos, microscópicos, celulares y moleculares. Algunas de estas regiones del cerebro son cruciales para el inicio, mantenimiento y regulación del comportamiento materno (Hillerer et al., 2014). Una parte de este circuito materno es el sistema motivacional maternal, formado por el área preóptica medial (MPOA) junto con el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST) como regiones centrales para inducir el inicio de la conducta materna mediante la activación hormonal, al suprimir las respuestas de miedo a los olores de las crías por un lado y activar el sistema motivacional no específico (es decir, el sistema de dopamina mesolímbico) por otro lado. (Hillerer et al., 2014).

Otras regiones importantes del cerebro que pueden asignarse al "circuito materno" incluyen las regiones hipotalámicas núcleo paraventricular (PVN) y el núcleo supraóptico (SON), que son fundamentales para la regulación de la ansiedad, el estrés y el mantenimiento de la conducta materna (Hillner et al., 2014). Las neuronas del hipotálamo se proyectan de manera central al hipocampo, que se interconecta con la corteza prefrontal medial (mPFC). La mPFC parece ser central para la percepción, la valoración y la regulación de estímulos y actos relevantes para el periodo periparto en concierto con el hipocampo (Hillner et al., 2014).

Uno de los cambios que ocurren tanto en humanos como en roedores durante el período de periparto es el tamaño del cerebro materno. En su estudio clínico, Oatridge y colaboradores (2002) reclutó un total de nueve madres sanas (control) y cinco mujeres preeclámpicas, demostrando que el tamaño del cerebro se redujo significativamente en ambos grupos mientras que el tamaño del ventrículo lateral se incrementó. Este efecto ha demostrado ser aún más pronunciado en madres que sufrieron preeclampsia durante el embarazo. Más detalladamente, reveló que el volumen del hipocampo es significativamente menor en lactantes en comparación con las hembras nulíparas (Oatridge et al., 2002). Desafortunadamente, la importancia fisiológica de los anteriores hallazgos mencionados en humanos y roedores no están bien entendidos en la actualidad y los mecanismos subyacentes todavía necesitan ser aclarados (Hillner et al., 2014).

Los cambios de volumen no solo se han informado en el hipocampo, sino también en otras regiones del cerebro con un papel significativo durante el período periparto (Hillner et al., 2014). La hipófisis se agranda durante el curso del embarazo, probablemente debido a la hiperplasia de las células lactotropas, y disminuye hasta ocho meses después del parto en humanos. También se han producido efectos similares observados en el MPOA y el SON de ratas gestantes / lactantes. Además, se han observado adaptaciones morfológicas en otra estructura hipotalámica, el PVN. Los cambios acontecidos en el cerebro femenino durante el periodo periparto son concentrados en la Tabla 1 (Hillner et al., 2014).

**Tabla 1. Ejemplos de las diferentes formas de plasticidad neuronal asociadas al periodo periparto.** En la presente tabla se muestran alteraciones asociadas en las diferentes regiones del cerebro de mamíferos (Hillner et al., 2014).

Región del cerebro	Alteración	Tiempo de ocurrencia	Especies
Cerebro completo	↓Tamaño del cerebro	Embarazo/lactancia	Humano
	↓Peso del cerebro	Lactancia	Rata
Ventrículo lateral	↓Volumen	Embarazo/lactancia	Humano
	↑Tamaño	Embarazo	Humano

Glándula pituitaria	↓Tamaño	Lactancia	Humano, rata
Hipotálamo	↑Volumen	Lactancia	Rata
SON	↑Sinapsis axosomáticas y axodendríticas en neuronas oxitocina (OXT)	Lactancia	Rata
	↑Número de sinapsis compartidas en neuronas oxt	Lactancia	Rata
PVN	Entrada excitadora e inhibitoria alterada a las neuronas oxt	Lactancia	Rata
	↓Longitud dendrítica y ramificación de neuronas oxt	Lactancia	Rata
	Retracción glial de neuronas y dendritas oxt	Lactancia	Rata
	↑Diámetro capilar interno (ICD)	Lactancia	Rata
	↓Volumen	Lactancia	Rata
Hipocampo	↓Proliferación celular	Lactancia	Rata, oveja
	↓Supervivencia celular	Lactancia	Rata
	↓Longitud dendrítica y complejidad de las neuronas piramidales CA1 / CA3	Embarazo/lactancia	Rata
	↑Densidad de espinas en neuronas piramidales CA1	Embarazo/lactancia	Rata
	↑Proliferación celular SVZ	Embarazo	Ratón
Zona subventricular (SVZ)/bulbo olfatorio (OB)	↑Número de interneuronas OB	Lactancia	Ratón
	↓Proliferación celular SVZ	Embarazo/lactancia	Rata, oveja
	↑Densidad de presinapsis y estabilidad de la columna	Lactancia	Ratón
	↑Densidad dendrítica y densidad de la columna	Lactancia	Rata
mPFC	↑Densidad dendrítica y densidad de la columna	Lactancia	Rata

## *1.2.- Hormonas y neuropéptidos importantes para la conducta materna y la lactancia.*

Como la mayoría de las especies de mamíferos no son espontáneamente maternas, la elevada disponibilidad de neuropéptidos como OXT, prolactina (PRL), así como la arginina vasopresina (AVP) y sus respectivos receptores, es un requisito previo para el inicio y mantenimiento del complejo repertorio de conductas maternas (Hillner et al., 2014). Las alteraciones asociadas al parto en estos sistemas de neuropéptidos cerebrales no sólo son de vital importancia para la conducta materna, sino también actúan en concierto para disminuir la ansiedad durante la lactancia, según lo revelado por estudios con roedores (Hillner et al., 2014).

Durante el período parto el cerebro materno de los roedores, sufre cambios marcados en la expresión de receptores. Champagne y colaboradores (2003) revelaron que un aumento en la expresión del receptor de estrógeno alfa (ER- $\alpha$ ) en el área preóptica medial (MPOA) se correlacionó con un mayor nivel de acicalamiento en el grupo de acicalamiento/aseo alto (Champagne et al., 2003). Similar a ER, se han encontrado niveles de expresión del receptor de oxitocina (OXT-R) aumentados en varias regiones distintas del cerebro "materno" como el MPOA, hipotálamo ventromedial (VMH), BNST, tabique lateral, el núcleo central de la amígdala y PVN. Las alteraciones observadas en los patrones de distribución del OXT-R reflejan el papel crucial del sistema OXT para orquestar diferentes aspectos del comportamiento materno, incluido el cuidado (Hillner et al., 2014).

Una regulación positiva del ARN mensajero (ARNm) del receptor de prolactina ha demostrado que tiene importancia en la regulación del comportamiento materno, como el MPOA, BNST y VMH durante diferentes puntos de tiempo dentro del período parto (Mann y Bridges, 2002). Además, los estudios en ratas revelaron que las fluctuaciones asociadas al parto del receptor de vasopresina V1a en las regiones cerebrales del "circuito materno" son fundamentales para la expresión oportuna y afinada de la agresión materna. En consecuencia, se ha demostrado que el nivel de unión del receptor V1a en BNST, MPOA, tabique lateral y el núcleo central de la amígdala se correlaciona positivamente con el nivel de comportamiento agresivo durante el embarazo, el parto y la lactancia (Caughey et al., 2011).

La hormona liberadora de corticotropina (CRH) es un modulador primario del eje hipotalámico- pituitario- adrenal (HPA) a través de su acción sobre la liberación de la hormona corticotropina (ACTH) en la circulación, y también está involucrado en la gestación, parto, y atención materna (Nephew y Murgatroyd, 2013). El sistema de CRH, disminuye su actividad durante la lactancia. De hecho, el aumento de la disponibilidad de CRH da como resultado niveles más bajos de agresión materna en roedores. La AVP es otra neurohormona involucrada tanto en el estrés como en la conducta materna, y los niveles de ARNm de AVP en el hipotálamo aumentan 2-3 veces durante la última etapa del embarazo y la lactancia. La AVP central media tanto la atención materna y agresión en

roedores. Los estudios en roedores criados con comportamiento de alta ansiedad / comportamiento de baja ansiedad han postulado que la crianza materna está relacionada con ansiedad innata y la actividad de OXT y AVP, ya que los ratones con baja ansiedad muestran niveles más bajos de la atención materna en comparación con los ratones de alta ansiedad. La PRL es un mediador clave de la lactancia tanto en mamíferos y la atención materna, aunque se sabe menos sobre su papel en el comportamiento social no materno. También tiene acciones inhibitorias sobre la actividad del eje HPA después de la exposición al estrés que puede estar relacionado con su papel en el cuidado materno (Nephew y Murgatroyd, 2013).

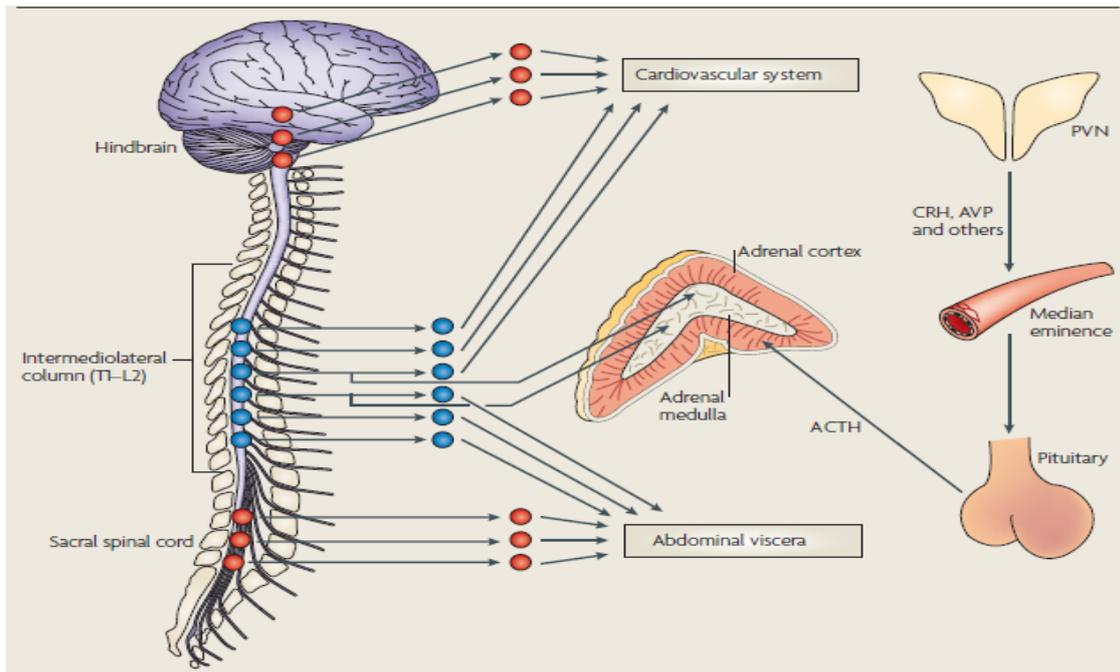
En el período posparto temprano, la noradrenalina, OXT, AVP y PRL promueven el aprendizaje olfativo en la madre y el cuidado materno. La OXT contribuye a la sincronía afectiva madre-hijo, promoviendo el apego de la madre y el recién nacido. Este adjunto es esencial para la regulación de las emociones, la reactividad al estrés, la adaptación metabólica y desarrollo social y cognitivo del bebé (Olza et al., 2014). También es apropiado mencionar que uno de los requisitos hormonales mejor comprendidos para la aparición de la conducta materna es el estradiol durante el embarazo, el estradiol prepara a la mujer para inicio inmediato de la conducta materna en el parto. Ningún estudio ha examinado si los andrógenos durante la segunda mitad del embarazo en ratas juegan algún papel en la aparición hormonal de comportamiento materno en el parto (Lonstein y Morrell, 2007).

Si bien la progesterona es fundamental para el mantenimiento del embarazo, su retirada al final del embarazo es necesaria para el inicio hormonal de la conducta materna. Un modelo muy fructífero para comprender la dependencia hormonal para el inicio natural de la conducta materna después del embarazo es el modelo de histerectomía-ovariectomía en el que se extirpan el útero (incluidos los fetos) y / o los ovarios (Lonstein y Morrell, 2007). Los experimentos han demostrado que la progesterona previene la manifestación inapropiada de la conducta materna durante el embarazo y que la abstinencia de progesterona antes del parto permite y facilita la aparición inmediata de la conducta materna. En ausencia de estradiol, ni la progesterona sola ni la abstinencia de progesterona estimulan la conducta materna (Lonstein y Morrell, 2007).

## **2.-Respuesta al estrés en general.**

“El estrés puede ser definido como una amenaza real o supuesta a la integridad fisiológica o psicológica de un individuo que resulta en una respuesta fisiológica y/o conductual” (McEwen, 2000).

En respuesta al estrés, el cuerpo activa múltiples procesos coordinados y dinámicos para restaurar la homeostasis, preservar la vida y, en última instancia, lograr el éxito evolutivo de la especie. La importancia de los sistemas endócrinos en esta regulación homeostática se conoce desde los primeros estudios de Hans Selye en la década de 1930, cuando se describió la activación de los ejes simpático-adrenomedular (SAM) e HPA en respuesta al estrés (Fig. 1) (Russell y Lightman, 2019).



**Figura 1. Mecanismo de respuesta al estrés.** Se muestran los principales componentes efectores ante un evento estresante (Ulrich-Lai y Herman, 2009). Los ejes SAM (lado izquierdo de la figura) e HPA (lado derecho de la figura) son los sistemas primarios para mantener o restablecer la homeostasis durante el estrés (Fig.1). La exposición a estrés activa las neuronas simpáticas preganglionares en la columna de células intermediolaterales de la médula espinal toracolumbar (mostrada en azul). Estas neuronas preganglionares se proyectan a los ganglios pre o paravertebrales para finalmente llegar a los órganos terminales y a las células cromafines de la médula suprarrenal. Esta activación simpática representa la clásica respuesta de "lucha o huida" que fue caracterizada por primera vez por Walter Cannon y sus colegas a principios del siglo XX; debido a la activación se aumentan los niveles circulantes de adrenalina (principalmente de la médula suprarrenal) y noradrenalina (principalmente de los nervios simpáticos), la frecuencia cardíaca, la fuerza de contracción, vasoconstricción periférica y movilización de energía. El tono parasimpático también se puede modular durante el estrés (mostrado en rojo), la activación de los núcleos preganglionares craneosacros activan los núcleos posganglionares ubicados en o cerca de los órganos terminales que inervan (Ulrich-Lai Y Herman, 2009).

Para el eje HPA, la exposición al estrés activa neuronas hipofisiotróficas en el PVN del hipotálamo que secreta hormonas liberadoras, como CRH y la AVP hacia la circulación. Estas hormonas liberadoras actúan sobre la hipófisis anterior para promover la secreción de ACTH, que a su vez actúa sobre la corteza suprarrenal interna para iniciar la síntesis y liberación de hormonas glucocorticoides (corticosterona en ratas y cortisol en humanos) (Ulrich-Lai Y Herman, 2009).

Los glucocorticoides poseen potentes funciones antiinflamatorias. Pueden inducir la apoptosis de linfocitos T, neutrófilos, basófilos y eosinófilos. También

regulan múltiples genes proinflamatorios que codifican citocinas, quimiocinas y enzimas inflamatorias. De igual manera tiene la capacidad de inhibir la presentación de antígenos, la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase II, los anticuerpos y favorecen las respuestas de los linfocitos T helper 1 frente a T helper 2. Otras funciones de los glucocorticoides es modular la emoción y la cognición, siendo ejemplos clave la capacidad de aprendizaje, el rendimiento, la percepción emocional y el estado de ánimo (Russell y Lightman, 2019).

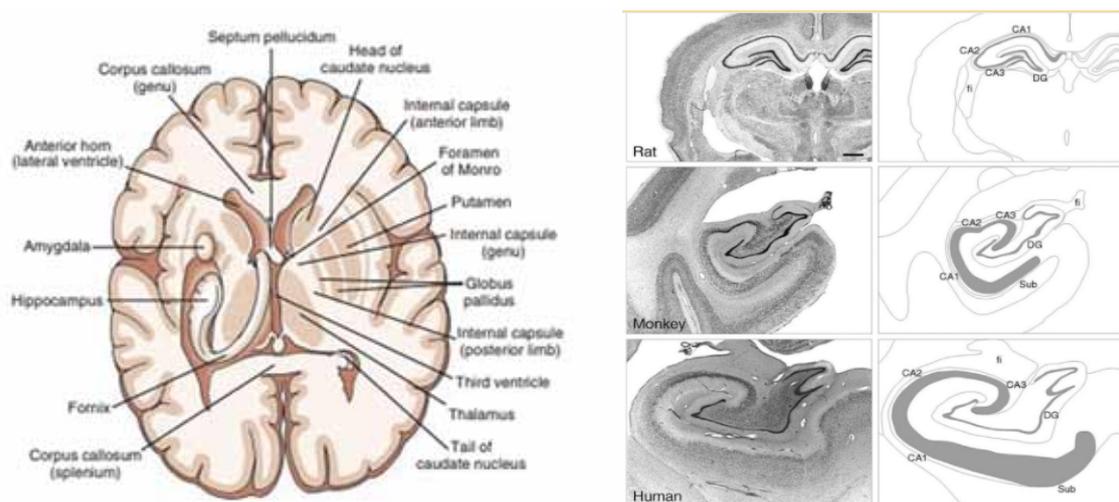
El rápido aumento de los niveles de cortisol que produce el estrés aumenta la disponibilidad de reservas de energía suplementarias a través de la inducción de la gluconeogénesis y la inhibición de la producción de insulina combinada con la vasoconstricción, que ayuda a la entrega de sangre a los músculos y al cerebro. El cortisol posee un efecto dual, tanto antiinflamatorio como proinflamatorio. Es importante mencionar que la exposición crónica al estrés y por ende la exposición prolongada al cortisol, se vuelve desadaptativa, lo que conduce a una amplia gama de resultados adversos o bien estados de enfermedad, que incluyen síndrome metabólico, obesidad, cáncer, trastornos de salud mental, enfermedades cardiovasculares y aumento o susceptibilidad a las infecciones (Russell y Lightman, 2019).

El eje HPA está sujeto a inhibición por retroalimentación por su producto principal, los glucocorticoides. Esta retroalimentación está mediada en parte por estructuras límbicas del prosencéfalo (como es el hipocampo). Tanto los receptores de glucocorticoides como los receptores de mineralocorticoides se expresan abundantemente en el hipocampo y probablemente se colocan en algunas neuronas. El hipocampo puede responder a las elevaciones de corticosterona/cortisol tanto basales como inducidas por el estrés, debido a que estos receptores poseen distintas afinidades por los glucocorticoides (Ulrich-Lai y Herman, 2009).

Los glucocorticoides tienen acciones tanto genómicas como no genómicas en todo el cuerpo. Las acciones genómicas se producen tras la unión a los receptores de glucocorticoides y, en algunos tejidos, a los receptores de mineralocorticoides. Los receptores de mineralocorticoides tienen una gran afinidad por los glucocorticoides endógenos y se une en gran medida incluso durante el punto más bajo de secreción de corticosteroides dado por el reloj circadiano. Los receptores de glucocorticoides tienen una afinidad más baja y se une ampliamente solo a niveles relativamente altos de corticosteroides, como los que ocurren durante las respuestas al estrés. El receptor de glucocorticoides que produce efectos genómicos parece ser el principal mediador de la inhibición "retardada" de las respuestas al estrés por glucocorticoides. Los efectos no genómicos dados por el receptor de mineralocorticoides, se producen a los pocos minutos de la liberación de glucocorticoides y explican la inhibición por retroalimentación negativa "rápida" del eje HPA, que se ejerce a los pocos minutos del aumento de los glucocorticoides circulantes (demasiado rápido para estar mediado por acciones genómicas en cualquier sentido tradicional) (Ulrich-Lai y Herman, 2009).

## 2.1.- Estructura y función del hipocampo.

Su análisis anatómico se remonta a Arantius (anatomista y cirujano italiano), quien describió por primera vez la aparición de la formación del hipocampo humano y le dio el nombre de hipocampo (derivado de la palabra griega para caballito de mar) Fig. 2a. Otros autores destacaron la semejanza del hipocampo con el cuerno de un carnero. El término "cornu ammonis" fue introducido por el neuroanatomista Rafael Lorente de Nó (1934). La Formación hipocampal se refiere al giro dentado, hipocampo, complejo subicular y corteza entorrinal (Schultz y Engelhardt, 2014). La formación hipocampal es una estructura prominente en forma de C que sobresale en el piso del cuerno temporal del ventrículo lateral. Se trata de una estructura marginal y de estructura de capas más sencilla de la misma sustancia gris cortical del lóbulo temporal. Por ello pertenece, por una parte al sistema límbico y por otra a la arquicorteza. El hipocampo se divide en CA1, CA2 y CA3 y se encuentra irrigado por la arteria cerebral posterior Fig. 2b (Singh y Dhikav, 2012). El giro dentado forma la parte más medial de la corteza cerebral, a nivel citoarquitectónico es una región cortical trilaminada. La tercera y más interna capa del giro dentado se denomina capa polimórfica o hilus y, a veces, se le denomina campo hipocampal CA4. Sin embargo, las células del hilus se proyectan sólo al giro dentado, por lo que se considera con mayor frecuencia como parte de esta zona (Schultz y Engelhardt, 2014).



a)

b)

**Figura 2. Corte horizontal del cerebro humano y estructura del hipocampo en distintas especies (Siegel y Sapru, 2015). (Andersen, et al., 2007).**

El hipocampo tiene conexiones de ida y vuelta desde varias partes del cerebro. Hay una variedad de fuentes que contribuyen con nervios aferentes. Una fuente importante de entradas incluye la corteza entorrinal. Muchas de estas entradas representan nervios olfativos, visuales y auditivos terciarios que llegan al

hipocampo después de hacer conexiones sinápticas dentro de la región entorrinal. Un segundo grupo de nervios surgen de la banda diagonal de Broca (del área septal) y finalmente nervios aferentes del hipocampo incluyen la corteza prefrontal, el giro cingulado anterior y la región premamilar. Las conexiones eferentes del hipocampo, surgen de células tanto en el hipocampo como en el complejo subicular. Los nervios que salen del hipocampo se denominan fórnix, los cuales inervan un número amplio de estructuras como el área septal, el núcleo talámico anterior, los cuerpos mamilares y las regiones adyacentes del hipotálamo medial, la corteza cingulada, varias partes de la corteza prefrontal, la amígdala y las regiones adyacentes del neocórtex temporal (Siegel y Sapru, 2015).

Actualmente se sabe que el hipocampo es vital para el aprendizaje, la memoria y la navegación espacial. También estudios experimentales en animales y los informes clínicos en humanos han indicado que el hipocampo juega un papel importante en el control de la agresión y la conducta de ira. Aunque el comportamiento emocional está regulado principalmente por la amígdala, el hipocampo y la amígdala tienen conexiones recíprocas, por lo que pueden influirse mutuamente. Finalmente dado que el hipocampo tiene proyecciones hacia el hipotálamo, puede regular las funciones endocrinas que se encuentran asociadas a esta región (Singh y Dhikav, 2012).

Diversos análisis han revelado que el estrés influye en gran medida sobre el hipocampo. Estructuralmente, los estudios en humanos y animales han demostrado que el estrés cambia la morfología neuronal, suprime la proliferación neuronal y reduce el volumen del hipocampo (Kim et al., 2015). Asimismo, las consecuencias del estrés no se restringen a un solo linaje celular, también se ha demostrado que las células microgliales se ven afectadas a nivel funcional, morfológico y de número, por distintos protocolos de estrés (Delpech et al., 2015).

## *2.2.- Respuesta al estrés en la hembra durante el embarazo y la lactancia.*

Es de importancia mencionar que en la lactancia se ha descrito una elevación crónica de corticosterona/cortisol plasmático en condiciones basales. A pesar de la elevada actividad basal del eje HPA, se ha demostrado en varias especies de mamíferos que la capacidad de respuesta del eje HPA, junto con la del sistema nervioso simpático, se atenúan severamente desde la mitad del embarazo hasta el final de la lactancia a una amplia variedad de factores estresantes psicológicos y fisiológicos. Por lo tanto, el comportamiento relacionado con la ansiedad y la capacidad de respuesta emocional a los estímulos estresantes se reduce con el resultado de un estado de calma general, pero también con el comportamiento materno mejorado y la agresión materna al proteger a la descendencia (Slattery y Neumann, 2008).

La CRH es el principal estimulador del eje HPA, la actividad reducida del sistema en el PVN puede contribuir a las respuestas atenuadas de la ACTH y corticosterona observada durante el embarazo y la lactancia. Además, se reduce la unión del receptor de CRH en la hipófisis lo que resulta en pérdida de la

sensibilidad de la hipófisis a CRH. La reducción asociada a la lactancia en la expresión de CRH también se ha descrito en el núcleo central de la amígdala, una región importante no solo para la regulación del eje HPA, sino también para la capacidad de expresar emociones (Slattery y Neumann, 2008).

También hay una pérdida de impulsos excitadores del eje HPA durante el embarazo, incluido un tono excitador noradrenérgico reducido dentro del PVN hipotalámico, que contribuye a su capacidad de respuesta atenuada durante la lactancia. Estas alteraciones podrían contribuir a la pérdida de la excitación noradrenérgica hipotalámica y al bajo nivel de expresión del gen CRH dentro del hipotálamo que se encuentra en condiciones de reposo. Otra entrada excitadora del eje HPA que se atenúa durante el embarazo es la de los opioides endógenos (Slattery y Neumann, 2008).

Se ha demostrado que la OXT cerebral endógena regula la actividad del eje HPA tanto en ratas hembras vírgenes como en machos. Por lo tanto, es probable que otros factores inhibidores adicionales, entre ellos los opioides endógenos y la PRL, actúen en conjunto con OXT para atenuar las respuestas hormonales del eje HPA en el período periparto. En apoyo a esto, la inactivación del receptor PRL en el cerebro, a través del uso de oligodesoxinucleótidos antisentido, resultó en una desinhibición significativa de la secreción de ACTH inducida por estrés en ratas lactantes, lo que demuestra que la PRL cerebral es un factor central que inhibe la respuesta del eje HPA en la lactancia (Slattery y Neumann, 2008).

### **3.- Estrés sufrido en la etapa prenatal.**

El cuidado físico de las mujeres embarazadas en el mundo ha mejorado enormemente durante los últimos 100 años; sin embargo, no ha sucedido lo mismo con su cuidado emocional. Este es posiblemente el aspecto más descuidado de la medicina obstétrica y es de suma importancia para el bienestar de la propia mujer embarazada y también para el de su futuro hijo (Glover, 2014).

Una evidencia considerable de muchos estudios muestra que, si la madre está deprimida, ansiosa o estresada durante el embarazo, es más probable que su hijo experimente una variedad de resultados adversos del desarrollo neurológico que los hijos de otras madres. Estos incluyen un mayor riesgo de problemas emocionales, conductuales y cognitivos. También está bien establecido que el estrés prenatal puede causar hipertensión inducida y resultados físicos alterados, como un mayor riesgo de asma para los hijos. Con los resultados físicos, el fenómeno de la programación fetal está bien establecido, se ha estudiado especialmente en relación con el crecimiento fetal y la vulnerabilidad posterior a enfermedades cardiovasculares y relacionadas. (Glover, 2014).

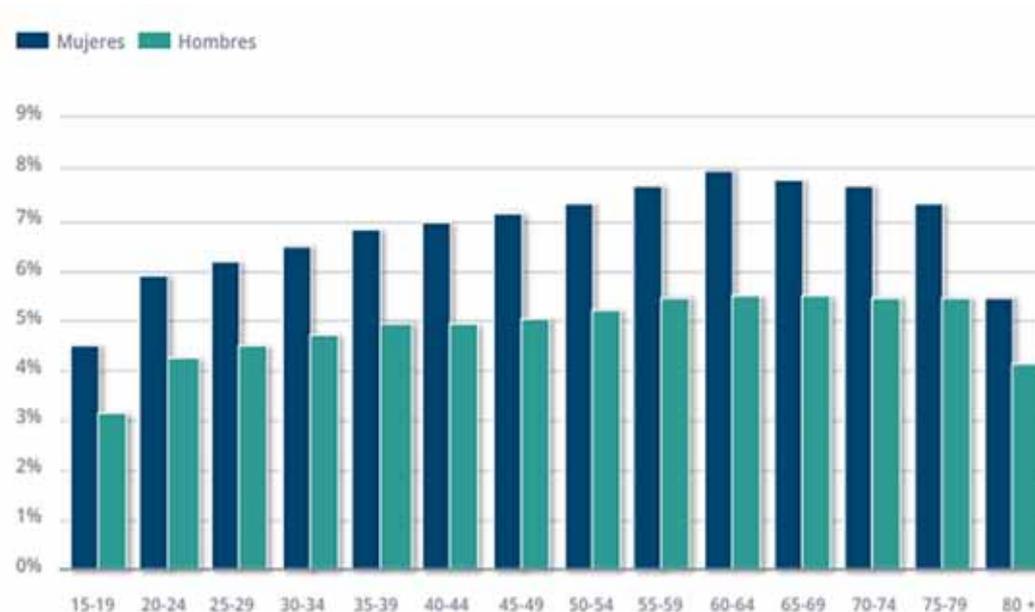
La exposición repetida al estrés de ratones hembra en las primeras etapas del embarazo (en los días 1 a 7) causa hiperfagia en la descendencia y un aumento en la expresión del factor de crecimiento insulínico tipo 2 (IGF-2) placentario, con efectos dependientes del sexo y del estrés sobre la expresión de 11 beta hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 2 (HSD-11 $\beta$ 2) en la placenta, revelando cómo la programación temprana podría causar cambios en el control metabólico,

la obesidad y otras funciones fisiológicas como la pubertad en la descendencia. Dado que el estrés también disminuye la secreción de prolactina y progesterona al principio del embarazo, el efecto de su regulación a la baja sobre la función placentaria y la programación embrionaria es potencialmente enorme (Douglas, 2011).

Algunos investigadores han analizado a los recién nacidos de madres que informan estrés durante el embarazo y han encontrado un peor desempeño en la Escala de Evaluación del Comportamiento Neonatal en relación con los recién nacidos de madres que no informan estrés durante el embarazo (Glover, 2014). Los estudios de bebés y niños pequeños han demostrado que tienen un temperamento más difícil, problemas para dormir y un rendimiento cognitivo más bajo y un mayor temor asociado con un mayor estrés materno durante el embarazo. Muchos grupos independientes han demostrado que el estrés prenatal aumenta el riesgo de problemas emocionales en los niños, especialmente la ansiedad y la depresión, y los síntomas del trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) y el trastorno de la conducta. Muchos estudios en humanos, como se mencionó anteriormente, han demostrado una asociación entre el estrés materno durante el embarazo y el riesgo de alteraciones en el resultado del niño. La evidencia de esto es sólida y se ha demostrado en muchos estudios prospectivos independientes de todo el mundo, lo que es más difícil de establecer es que la asociación es causal, ya que, si una madre está estresada durante el embarazo, es muy posible que esté estresada después del parto y esto podría afectar la crianza. Otros factores de confusión asociados incluyen el tabaquismo o el consumo de alcohol, que pueden afectar el comportamiento y el peso al nacer. También podría ocurrir continuidad genética. La madre puede tener ciertos genes que la hacen más propensa a sentirse ansiosa o deprimida y puede transmitir estos genes a su hijo, lo que a su vez lo hace más propenso a tener problemas emocionales o de comportamiento. Esto cobra particular importancia en el caso de la hija, quien puede desarrollar a su vez un estado de depresión posparto (Glover, 2014).

#### **4.- Depresión posparto (PPD).**

El trastorno depresivo mayor afecta al 12-20% de la población y según la Organización Mundial de la Salud, es la primera causa principal de discapacidad en el mundo. Las mujeres tienen el doble de probabilidades de desarrollar depresión, tienen síntomas más graves y presentan ansiedad comórbida en comparación con los hombres (Brummelte y Galea, 2016). Se estima que en el 2015, la proporción de la población mundial con depresión fue de 4,4%, siendo 322 millones el número total de personas que tienen depresión en el mundo. La depresión es más común en las mujeres (5,1%) que en los hombres (3,6%) y las tasas de prevalencia varían según la edad alcanzan su punto máximo en la edad más adulta (por encima de 7,5% en mujeres de edades comprendidas entre los 55 y 74 años, y por encima de 5,5% en hombres) (Fig. 3) (Organización panamericana de la salud, 2017).



**Figura 3. Prevalencia mundial de los trastornos depresivos en porcentaje de la población, por edad y sexo. Las mujeres se encuentran en un mayor porcentaje de sufrir trastornos depresivos, aumentando su incidencia con el paso de la edad (Organización panamericana de la salud, 2017).**

La depresión que acontece después del nacimiento se conoce como PPD, mientras que la depresión que ocurre durante el embarazo se conoce como depresión prenatal. La prevalencia de la depresión prenatal es acerca del 12%, con la prevalencia más alta en los dos últimos trimestres. La prevalencia de la depresión posparto oscila entre el 10% y el 15%, pero puede llegar hasta el 30% según los criterios utilizados para el diagnóstico. La susceptibilidad a la depresión, incluida la depresión posparto, es el resultado de interacciones epigenéticas, genéticas y de estrés / ambiente, incluso en el desarrollo temprano de la propia madre. La depresión prenatal es uno de los mayores factores de riesgo para desarrollar PPD (Brummelte y Galea, 2016).

La PPD es una enfermedad mental grave que no solo afecta a la madre, puede interferir con el desarrollo de la descendencia de una manera que incluye interacciones directas con los cuidadores. Las mujeres con PPD pueden tener características diferentes a las mujeres con depresión prenatal más posnatal, lo que argumenta a favor de distinguir entre estos dos períodos de depresión (Brummelte y Galea, 2016) También debe tenerse en cuenta que, si bien la depresión previa es el mayor factor de riesgo de PPD, aproximadamente el 40% de las mujeres tendrá su primer episodio de depresión durante el posparto, la mayor incidencia de nueva depresión posparto ocurre 2-3 meses después del parto. A pesar de que la PPD tiene muchas de las mismas características del trastorno depresivo mayor, se presenta durante un tiempo único fisiológicamente y las mujeres con PPD tienden a presentar una mayor ansiedad (Brummelte y Galea, 2016)

Durante el embarazo y el posparto, los niveles de hormonas esteroideas, peptídicas, así como los glucocorticoides fluctúan drásticamente, lo que podría

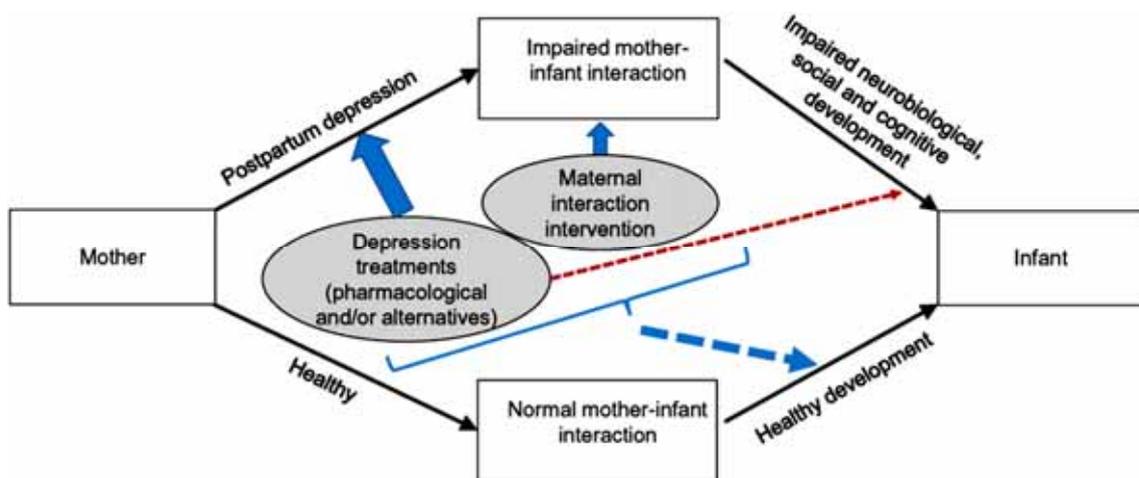
contribuir a la etiología de la PPD. Estos cambios en los niveles hormonales, como estradiol, corticosterona/cortisol, CRH y OXT, ocurren en roedores y humanos, aunque con diferentes perfiles y períodos gestacionales (Brummelte y Galea, 2016). El estrés y el eje HPA están relacionados con la etiología de la depresión, ya que los pacientes deprimidos (incluidos aquellos con PPD) muestran una función anormal del eje HPA, como hipersecreción de cortisol y secreción diurna anormal de cortisol. Como se señaló anteriormente, el embarazo y el puerperio se asocian con niveles elevados sostenidos de glucocorticoides tanto en humanos como en roedores, que es un perfil hormonal similar observado en pacientes deprimidas, lo que sugiere otro posible mecanismo para una mayor vulnerabilidad a la depresión durante el embarazo y el parto (Brummelte y Galea, 2016).

#### *4.1.- Modelos animales de la PPD.*

Casi todos los modelos animales de PPD se han creado sobre la base de un embarazo simulado por hormonas con la abstinencia de hormonas ováricas, el estrés crónico durante el embarazo o la exposición a glucocorticoides durante el posparto. Galea y sus colegas (2001) encontraron que la abstinencia de un embarazo simulado con hormonas inducía comportamientos depresivos, incluida una mayor inmovilidad en la prueba de nado forzado y anhedonia de sacarosa en ratas (Galea et al., 2001). Suda y colaboradores (2008) encontraron una mayor impotencia aprendida, un comportamiento similar a la ansiedad y un aumento de la agresión en ratas hembras después de un embarazo simulado con hormonas (Suda et al., 2008). Finalmente, Brummelte y Galea (2016) crearon un modelo de PPD mediante la administración de corticosterona posparto a las madres, encontrando que exhibieron un comportamiento depresivo (mayor inmovilidad y disminución de lucha en la prueba de natación forzada) en comparación con las ratas tratadas con aceite. Además, Las madres que recibieron corticosterona pasaron menos tiempo amamantando y más tiempo lejos del nido (Brummelte y Galea, 2016).

#### *4.2.- Consecuencias de la PPD.*

Los hijos de madres que padecen PPD corren el riesgo de tener problemas emocionales, conductuales y psicológicos, así como retrasos en el desarrollo cognitivo y del lenguaje que son evidentes más allá de la infancia temprana (Fig. 4). Los niños de madres con PPD tienen más probabilidades de verse afectados y mostrar un comportamiento antisocial, hiperactividad y un rendimiento académico más pobre que las niñas de madres con PPD. El apego inseguro está relacionado con la insensibilidad materna, mientras que la paternidad hostil se asocia con problemas de externalización en los hijos; y finalmente, las dificultades para notar los signos de interés de los bebés y apoyar su compromiso con el entorno están asociadas con un desarrollo cognitivo deficiente (Brummelte y Galea, 2016).



**Figura 4. Relación entre la PPD y el impacto negativo hacia su descendencia, así como las intervenciones que podrían corregir dicho impacto. La descendencia de la madre depresiva puede desarrollar una interacción madre-hijo dañada, la cuál puede ser tratada para el correcto desarrollo del infante (Brummelte y Galea, 2016).**

En la PPD las interacciones madre-hijo se encuentran reducidas, Lovejoy y colaboradores (2000) encontraron que las madres deprimidas exhibían un comportamiento significativamente más negativo y desinteresado hacia sus hijos en distintas edades en comparación con las madres no deprimidas (Brummelte y Galea, 2016).

La literatura reciente sugiere que las madres deprimidas tienden a amamantar con menor frecuencia o por menos duración a sus hijos en comparación a las madres no deprimidas, a pesar de que sus bebés se benefician de la lactancia materna. Además, las madres que no inician o no mantienen la lactancia materna durante un tiempo adecuado tienen un mayor riesgo de PPD (Figueiredo et al., 2013). Citado anteriormente, la PPD puede estar involucrada en la causa del cese temprano del amamantamiento y que se ha observado que los síntomas depresivos preceden a su cese. Por ejemplo, un estudio reciente de detección de los niveles de depresión inmediatamente después del parto demostró que las madres con niveles más altos de síntomas depresivos tienen una mayor probabilidad de alimentar con biberón a sus bebés a los tres meses después del parto. Los resultados también mostraron que las probabilidades de alimentarse con biberón aumentaron con la gravedad de la depresión materna (Figueiredo et al., 2013).

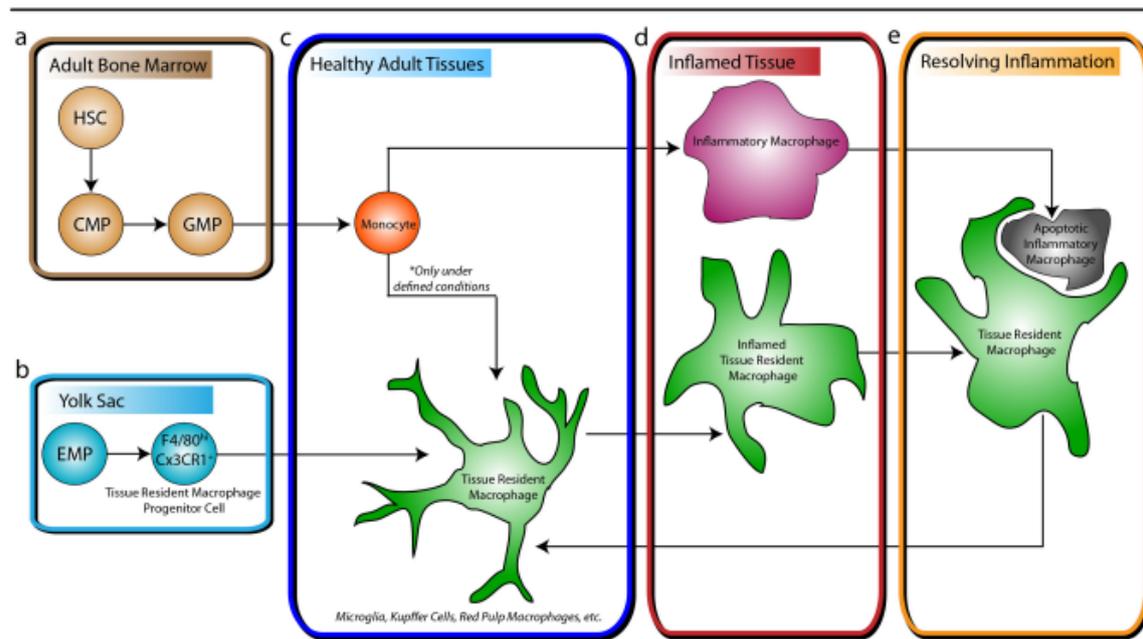
La investigación también se ha centrado en la asociación entre el amamantamiento materno, la depresión durante el embarazo y la PPD. Un estudio recientemente mostró que los niveles más altos de depresión y ansiedad durante el embarazo se asociaron con la interrupción de la lactancia, por su parte la interrupción de la lactancia predijo niveles más altos de ansiedad y depresión después del nacimiento. Otro estudio reciente sobre esta asociación concluyó que las puntuaciones más altas de depresión en el tercer trimestre del embarazo predijeron una duración más baja de la lactancia materna exclusiva, también se

encontró una disminución de los síntomas depresivos en mujeres que iniciaron o mantuvieron la lactancia materna exclusiva durante tres o más meses. Las hormonas lactogénicas, la oxitocina y la prolactina, están asociadas con efectos antidepressivos y ansiolíticos. El amamantamiento se ha asociado con respuestas atenuadas al estrés, especialmente la del cortisol, estos resultados sugieren que se atenúan las respuestas neuroendocrinas al estrés, factor que se ha relacionado con menos síntomas depresivos posparto. El amamantamiento también se asocia con mejores interacciones madre-bebé (Figueiredo al., 2013).

### **5.-Sistema neuroinmune y su participación en respuesta al estrés.**

El sistema neuroinmune está conformado principalmente por las células de la microglía. La microglía constituye el 15-20% de la población glial en el sistema nervioso central (SNC), es parte de una familia más grande de células estrechamente relacionadas llamadas macrófagos residentes en tejidos, surgen temprano en la embriogénesis a partir de macrófagos primitivos en el saco vitelino, antes del desarrollo del sistema hematopoyético derivado de la médula ósea (Fig. 5). Reconocidas por primera vez por Nissl en 1880, más tarde Pio-del Rio Hortega, un neuroanatomista español, describió la microglía como células ramificadas en reposo utilizando métodos de tinción de plata (Frank et al., 2019). Los macrófagos residentes en tejidos son un grupo de células versátil y diverso. La existencia de múltiples términos específicos de órganos acuñados por histopatólogos (como células de Kupffer en el hígado, macrófagos de zona marginal en el bazo, macrófagos alveolares en los pulmones, células multinucleadas denominadas osteoclastos en los huesos y microglía en el cerebro) enfatiza esta diversidad (Cronk y Kipnis, 2013).

En general hay dos clasificaciones de macrófagos: macrófagos inflamatorios y macrófagos residentes en tejidos (Fig. 5). Los inflamatorios se desencadenan en los monocitos circulantes y al final de la inflamación, por lo general no persisten en el tejido inflamado, sino que sufren apoptosis o emigran a los ganglios linfáticos que drenan. Por el contrario, los macrófagos residentes en tejidos, que ya están presentes al comienzo de la inflamación, responderán de manera similar a los macrófagos inflamatorios, pero permanecerán después de la conclusión de la inflamación, y son fundamentales para la reparación del tejido y el retorno a la función normal. Los macrófagos residentes en los tejidos secretan factores de crecimiento y continúan fagocitando los desechos y las células apoptóticas, lo que probablemente ayuda en la reparación y regeneración de los tejidos (Cronk y Kipnis, 2013).



**Figura 5. Origen de macrófagos y células de la microglía.** a) Las células madre hematopoyéticas adultas (HSC) dan lugar a progenitores mieloides comunes (CMP), que dan lugar a células progenitoras de granulocitos-monocitos (GMP). b) Al principio del desarrollo embrionario, los progenitores eritroides / mieloides (EMP) se diferencian en progenitores de macrófagos primitivos en el saco vitelino, que son F4 / 80<sup>hi</sup>CX3CR1<sup>+</sup>, y dan lugar a macrófagos residentes en los tejidos, incluida la microglía que reside en el SNC. c) En el tejido adulto, los monocitos se recambian constantemente del sistema hematopoyético. Por el contrario, los macrófagos residentes en tejidos en condiciones homeostáticas se renuevan en gran medida por sí solos d) Cuando un tejido se inflama, los monocitos entran y se diferencian en macrófagos inflamatorios. Los macrófagos residentes en tejidos también toman esta característica. e) Al final de la inflamación, la mayoría de los macrófagos inflamatorios sufren apoptosis y los macrófagos residentes en el tejido retoman su papel en el mantenimiento de la homeostasis del tejido, lo que incluye la eliminación de los desechos inflamatorios. (Cronk y Kipnis, 2013).

La microglía proporciona la primera línea de defensa contra cualquier enfermedad o agresión y muestra una enorme plasticidad estructural y funcional. La activación microglial no solo protege y repara el tejido dañado al eliminar la célula moribunda y ayuda al proceso de restauración, sino que también está implicada en la inducción de la neurodegeneración y es ahora bien reconocida como un contribuyente elemental en la patogénesis de diversas enfermedades y trastornos neurológicos (Frank et al., 2019).

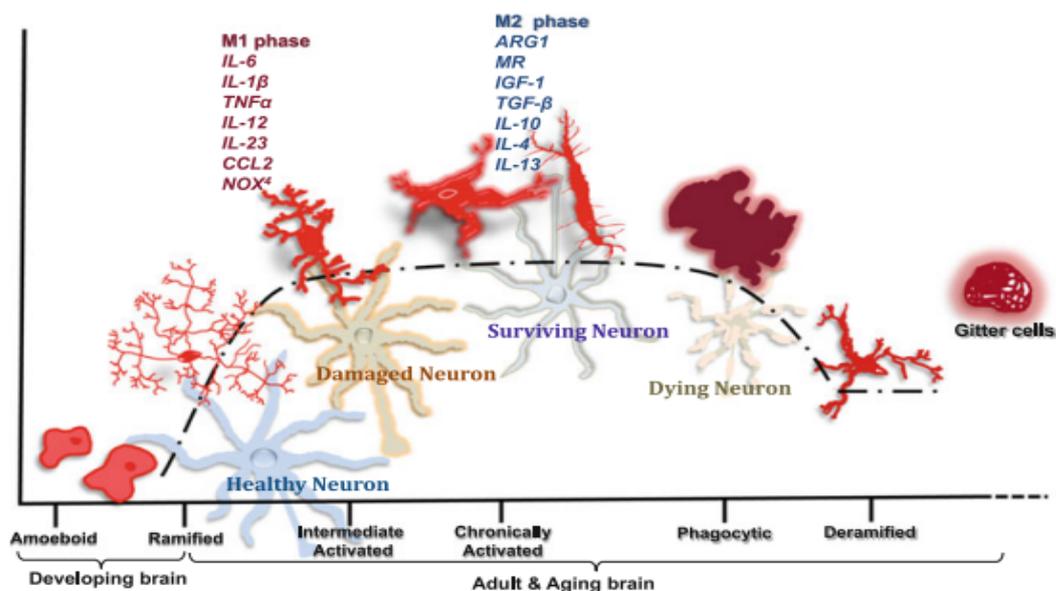
Durante muchos años, se pensaba que las microglías eran células estáticas en el cerebro hasta que ocurría una lesión o infección, momento en el que se activaban, inflamaban y desempeñaban su función de defensores inmunes del SNC. Desde entonces, las técnicas de imagen avanzadas han revelado que las

microglías están en constante movimiento, extendiendo y retrayendo sus procesos, presumiblemente muestreando su entorno en busca de estímulos sobresalientes. La microglía mantiene un patrón regular en el SNC, con células individuales que cubren un área relativamente no superpuesta y de tamaño constante dentro del tejido. Tras la agresión al parénquima cerebral, se ha observado que las microglías cercanas rompen su patrón regular y algunas migrarán rápidamente al área de la lesión (Cronk y Kipnis, 2013).

### 5.1.- Cambios morfológicos y funciones de la microglía.

Morfológicamente, la microglía tiene tres etapas de transición principales que se pueden distinguir como: ameboide, ramificada o en reposo y reactiva o activada y estos estados realizan diversas funciones en el cerebro (Fig. 6). La microglía ameboide es de forma redonda o irregular. Debido a su capacidad de fagocitar y para inducir la apoptosis en neuronas no deseadas en el cerebro en desarrollo, la microglía es un participante importante en el proceso de desarrollo del SNC (Frank et al., 2019).

La microglía de vigilancia ramificada o "en reposo" del SNC adulto consiste en un cuerpo de células pequeñas con procesos cortos, tenues, finos. Examina continuamente el SNC en busca de cualquier daño o insulto y son reguladores de la homeostasis. La Microglía después de cualquier estímulo desfavorable, se transforma en un estado reactivo o activado. Estas células tienen procesos gruesos y retraídos con un cuerpo celular grande e irregular. Dependiendo del estímulo y la progresión del estado de enfermedad, la activación microglial actúa de dos formas; ayudar en la restauración eficaz de las células cerebrales lesionadas o generar un entorno amenazante que resulte en un daño cerebral exagerado (Frank et al., 2019).



**Figura 6. Transformaciones de la microglía tanto en términos de fenotipo como de moléculas secretoras con el avance de la edad.** En el cerebro en desarrollo y adulto, la microglía ameboide y la ramificada apoyan la

supervivencia de neuronas sanas. La microglía se activa y alcanza cualquiera de las dos fases de activación, fase M1 y/o M2, en respuesta a estímulos agresivos. La fase M1 exagera el daño neuronal dirigido por la activación microglial mediante la liberación de una gran cantidad de moléculas proinflamatorias, mientras que la fase M2 atenúa la neuroinflamación al liberar factores de crecimiento y moléculas antiinflamatorias, que promueven el proceso de reparación de tejidos y la supervivencia de neuronas. En la progresión de la enfermedad y la muerte neuronal, la microglía se vuelve desramificada y fagocítica. Las células de Gitter son las microglías repletas de restos fagocíticos (Frank et al., 2019).

El SNC utiliza el sistema del complemento para lograr diversos objetivos. Se utiliza en la periferia para marcar y acelerar la eliminación de células apoptóticas y patógenos. En el SNC, la microglía fagocita las sinapsis neuronales que han sido etiquetadas con proteínas del complemento a través del receptor 3 del complemento unido a la membrana. Esta función parece ser crítica para la eliminación de sinapsis débiles o disfuncionales durante el neurodesarrollo posnatal (Cronk y Kipnis, 2013). Además, la microglía es importante para la neurogénesis. Se ha demostrado que puede influir en la diferenciación de los progenitores neurales a través de la inducción de la producción del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) y también son uno de los fagocitos responsables de eliminar los muchos progenitores que sufren apoptosis en la zona subgranular de la circunvolución dentada (Cronk y Kipnis, 2013). También se ha demostrado que el IGF-1 derivado de la microglía apoya la supervivencia de las neuronas corticales de la capa durante el desarrollo. A medida que el cerebro se desarrolla, la microglía es fundamental para inducir la apoptosis y eliminar las neuronas apoptóticas de Purkinje en el cerebelo, y también para regular el número de células precursoras neurales corticales. Por lo tanto, se sugiere que la microglía es importante para la homeostasis y el desarrollo posnatal adecuado del cerebro, y en su ausencia, el cerebro no se mantiene correctamente, experimentando eventualmente no solo patología funcional sino también física (Cronk y Kipnis, 2013).

### *5.2.- Efectos del estrés sobre la microglía.*

Wohleb y colaboradores (2011) llevaron a cabo un estudio en ratones macho utilizando un modelo de estrés por interrupción social 2h/día durante 6 días, en el cual observó que el estrés aumentó los marcadores inflamatorios (CD14, TLR4 y CD86) en la superficie de la microglía, aumentó la inmunorreactividad Iba-1 de la microglía en la amígdala medial, la corteza prefrontal y el hipocampo. Otro estudio por Wohleb y colaboradores (2012) en ratones macho, utilizando como modelo el estrés por derrota social (similar al modelo anterior mencionado) 2 h/día por 6 días, descubrió un aumento significativo del número de células Iba-1 (un marcador de microglía tanto en reposo como reactiva) en el hipocampo, la corteza prefrontal y la amígdala (Wohleb et al., 2012; Walker et al., 2013).

Un estudio realizado en ratones macho por Bian y colaboradores (2012), encontró resultados relevantes con un modelo de estrés crónico impredecible

diario durante 40 días. Los animales estresados tenían un número significativamente mayor de células positivas para Iba1 en el hipocampo (CA3) y las áreas prelímbicas (Bian et al., 2012). Milior y colaboradores (2016) encontraron que el estrés crónico impredecible en ratones macho (cada factor de estrés aplicado durante 24 h durante un período de 2 semanas) inducía una disminución en la ramificación de la microglia, pero el tamaño del cuerpo celular no se alteraba (Milior et al., 2016). Franklin y sus colegas (2018) demostraron que 4 semanas de estrés crónico impredecible en ratas macho, aumentaron el tamaño del soma de las células de la microglía, la longitud de las ramas, el número de ramas y el volumen de las ramas en el hipocampo dorsal, lo que sugiere que el estrés induce un fenotipo hiperramificado. En general, varios estudios que utilizaron una variedad de modelos de estrés crónico impredecible demostraron que la exposición al estrés aumentaba el número de células inmunopositivas para las proteínas Iba-1, complejo mayor de histocompatibilidad tipo 2 (MHCII) y CD11b asociadas a microglia / macrófagos en varias regiones cerebrales diferentes (Frank et al., 2019).

Respecto al estrés prenatal y la microglía, un estudio analizó la morfología microglial y su inmunorreactividad para Iba-1 en ratones machos durante la edad adulta. En condiciones basales, los animales con estrés prenatal mostraron un mayor porcentaje de microglía con morfología reactiva en CA1 en comparación con los machos no estresados. Se observó un número similar de células inmunorreactivas Iba-1 en la región CA1 en los dos grupos experimentales. Sin embargo, el estrés prenatal en condiciones basales aumentó la proporción de células inmunorreactivas Iba1 con somas más grandes y procesos retraídos y más gruesos, indicativos de una mayor activación microglial. El número de células microgliales activadas muestra una correlación directa con el deterioro de la neurogénesis. Por lo tanto, el mayor número de células inmunorreactivas a Iba1 en el grupo con estrés prenatal podría estar involucrado en la disminución de la neurogénesis (Diz-Chaves et al., 2013).

En otro estudio del mismo autor utilizando ratones hembra ovariectomizadas, encontró que el número de células inmunorreactivas a Iba1 en el hilus del giro dentado fue significativamente mayor en animales con estrés prenatal que en animales sin estrés. En ratones no estresados, la morfología predominante de las células inmunorreactivas a Iba1 fue la de un cuerpo de células pequeñas con tres a cinco procesos celulares. El estrés prenatal provocó una disminución en el número de células inmunorreactivas para Iba1 y la morfología predominante fue de las células inmunorreactivas a Iba1 con numerosos procesos celulares (58%). Se desconoce la importancia de estos cambios morfológicos en la microglía, pero pueden reflejar una transición de la microglía en reposo hacia un fenotipo activado. Además, en los animales con estrés prenatal hubo una mayor proporción de células inmunorreactivas a Iba1 con grandes somas y procesos retraídos y más gruesos; morfología característica de la microglía activada. (Diz-Chaves et al., 2012).

Otro estudio realizado en ratas machos y hembras adultas utilizando el modelo de separación maternal arrojó los siguientes datos; en la zona del hilus del giro dentado de machos se observa una disminución de la densidad microglial, y tanto en machos como en hembras en las regiones de CA3 y del giro dentado, se observa un mayor porcentaje de microglía activada (Saavedra et al., 2021).

Las investigaciones disponibles sobre los efectos del estrés en la microglía están centradas principalmente en roedores macho, muy pocos son los estudios que toman como referencia las hembras en modelos de estrés, y más aún, son casi nulos los estudios que utilizan precisamente ratas hembra para el análisis.

## **V. JUSTIFICACIÓN.**

La prevalencia de la PPD se encuentra entre el 10% y el 15%, aunque en general se cree que no se informa de manera considerable. Una historia previa de PPD es el principal factor predictivo de aparición posterior. Otros factores de riesgo incluyen síntomas depresivos prenatales, neuroticismo prenatal, menor apoyo social, menor nivel socioeconómico, complicaciones obstétricas, incluida la preeclampsia (Anderson y Maes, 2013). Las devastadoras consecuencias de la PPD no solo afectan directamente a la madre, también incluyen a su descendencia. (Navarre et al., 2010).

El estrés psicosocial repetido / crónico durante el embarazo representa uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de trastornos del estado de ánimo posparto y numerosos estudios han investigado el efecto de la exposición al estrés en la madre y en su descendencia (Perani y Slattery, 2014).

Los hijos de madres que sufrieron estrés, ansiedad o depresión durante el embarazo muestran una variedad de resultados adversos sobre el desarrollo cognitivo, conductual, emocional y se relacionan con la prematuridad y el bajo peso al nacer. Además, está bien establecido que el estrés prenatal puede aumentar la vulnerabilidad posterior a enfermedades cardiovasculares y relacionadas (Glover, 2014).

El estrés representa un factor con efectos neuroinflamatorios y el periodo de parto es considerado un evento altamente estresor con el cual vienen aunados cambios fisiológicos, conductuales a lo largo del embarazo y a su posterior finalización, por lo que resulta interesante analizar los efectos que produce el cambio de la nuliparidad a la lactancia, y el efecto del estrés bajo estas condiciones. El estudio de la microglía total y en reposo en este modelo, representa un marcador de neuroinflamación.

## **VI. HIPÓTESIS**

Incrementaría en mayor medida la activación de la microglía como consecuencia de los diversos tipos de estrés sufridos por ratas lactantes, aunado el periodo de parto, el cual es considerado un evento estresor.

## **VII. OBJETIVO GENERAL.**

Analizar los efectos del estrés sufrido en distintas etapas de la vida sobre el sistema neuroinmune, examinando la activación y densidad celular de la microglía en el hipocampo de ratas hembras lactantes en comparación a ratas hembras nulíparas.

### **1.- Objetivos particulares.**

1. Evaluar la densidad celular de la microglía en las regiones del hilus y CA3 del hipocampo en ratas vírgenes con o sin estresores.
2. Evaluar el porcentaje de activación de la microglía en las regiones del hilus y CA3 del hipocampo en ratas vírgenes con o sin estresores.
3. Evaluar la densidad celular de la microglía en las regiones del hilus y CA3 del hipocampo en ratas lactantes con o sin estresores.
4. Evaluar el porcentaje de activación de la microglía en las regiones del hilus y CA3 del hipocampo en ratas lactantes con o sin estresores.

## **VIII.- MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **1.-Animales.**

Para los experimentos se utilizaron ratas hembras adultas de 5 meses de edad de la cepa Sprague Dawley, provistas de agua y alimento ad libitum, mantenidas a una temperatura de 22-26 °C, humedad 50-60% y bajo ciclo de luz- oscuridad (12:12).

### **2.- Grupos experimentales.**

Trabajamos con cerebros provenientes de 6 grupos divididos en base a su condición fisiológica (vírgenes, lactantes) y si fueron sometidos a estrés o no (estrés prenatal, estrés crónico, control).

- 1.- Grupo control lactante (n =6)
- 2.- Grupo control virgen (n = 5)
- 3.- Grupo estrés crónico lactante (n = 6)
- 4.- Grupo estrés crónico virgen (n = 3)
- 5.- Grupo estrés prenatal lactante (n = 6)
- 6.- Grupo estrés prenatal virgen (n = 3)

### **3.- Grupos control.**

Se utilizaron grupos de ratas vírgenes y ratas lactantes las cuales nunca fueron sometidas a procedimientos de estrés, y fueron en cada caso consideradas grupos control de acuerdo a su estado fisiológico.

### **4.- Estrés crónico.**

Este modelo se basa en la inmovilización de los roedores en una botella de plástico; el procedimiento se realiza una hora al día durante 10 días y también

se les coloca una lámpara de luz blanca a espaldas de los roedores. Un grupo de ratas hembras vírgenes fueron expuestas a este modelo de estrés crónico (V-EC) y se sacrificaron 5 Días posteriores a la terminación del estrés. Otros grupos de ratas hembras fueron expuestas a este estresor durante su embarazo, específicamente del día 11 al 20 de gestación. El grupo de ratas lactantes con estrés crónico (L-EC) se sacrificaron 5 días posteriores al parto.

### **5.- Estrés prenatal.**

Se realiza mismo protocolo que el estrés crónico y la diferencia radica en que los roedores tomados para este modelo ahora son las hijas de las ratas hembras que fueron sometidas al estrés mientras estaban embarazadas. Esta generación F1 se deja crecer hasta su etapa adulta y se dividen en dos grupos: hembras vírgenes con estrés prenatal (V-EP), las cuales se sacrifican sin exponer a ningún estresor a los 5 meses de edad, y grupo de ratas lactantes con estrés prenatal. Estas últimas se aparean para lograr el embarazo, se permite que den a luz y se sacrifican al día 5 posparto.

### **6.- Estrategia experimental.**

Los grupos controles de hembras lactantes y vírgenes no fueron manipulados. El resto de grupos (estrés crónico, estrés prenatal) fueron sometidos a estrés por inmovilización, una hora diaria durante 10 días, siendo sacrificados los grupos 5 días posteriores al estresor en caso de las ratas vírgenes EC, ó 5 días después del parto en el caso de las lactantes EC. Posteriormente se extrajeron los cerebros y se procesaron. Respecto a los grupos estrés prenatal lactante y virgen se utilizaron las hijas de las ratas que fueron expuestas al estrés antes mencionado, por lo que su sacrificio se realizó hasta alcanzar la edad adulta y de igual manera se extrajo el cerebro y se procesó.

### **7.- Perfusión intracardiaca y eutanasia.**

El sacrificio se realizó con una dosis letal de pentobarbital sódico (0.18 g/kg de peso corporal), acto seguido se perfundieron por vía intracardiaca con solución salina al 0.9 % y paraformaldehído (PFA) al 4% en solución de buffer de fosfatos 0.1 M (PB), en este punto los cerebros fueron extraídos y fijados con PFA durante 24 horas. Posteriormente se introdujeron en una solución de sacarosa al 20 % por 24 horas, y finalmente a otra misma solución, pero ahora al 30 % hasta el día de su procesamiento.

### **8.- Procesamiento de los cerebros.**

Los cerebros fueron introducidos durante 5 minutos en una solución de 2-metilbutano a -40 °C, posteriormente fueron llevados a un crióstato (Triangle biomedical sciences, TBS) a -22 °C. Se procesaron para obtener cortes coronales seriados de 40 µm de grosor, con una distancia de 240 µm cada uno. Los cortes para cada cerebro fueron colocados en 12 tubos eppendorf con solución crioprotectora, siendo equivalentes los tubos 1 y 7, 2 y 8, 3 y 9; así sucesivamente para evitar la saturación de cortes por cada tubo.

## **9.- Inmunohistoquímica.**

Para los cortes se realizó una inmunotinción con anticuerpos primarios específicos (proveedor Wako) contra el marcador molecular Iba1, que nos permite identificar la microglía. El protocolo se divide en día 1 y 2; en el primer día se lavan los cortes con PB 0.1 M, para posteriormente incubar en una solución metanol (90%)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10%) para iniciar el bloqueo de la endoperoxidasas, el cual finaliza con otra incubación en una solución PBT (90%) /H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10%) por 25 minutos. Se realizan lavados con PB 0.1 M y se procede a incubar en solución de bloqueo (PBT/ suero 5 %) durante 30 minutos, una vez realizado se incuba a 4 °C por 72 hrs. en una dilución de anticuerpo primario (1:30,000) en solución de bloqueo.

El segundo día se realizan lavados con PB 0.1 M y se incuba con una dilución de anticuerpo secundario biotinilado (1:750) en solución de bloqueo por 2 hrs, dirigido contra la especie del primer anticuerpo utilizado. Subsiguiente se lleva a cabo una fase de amplificación con el complejo Avidina-Biotina, al cual va aunado una enzima peroxidasa, dando como resultado un aumento de la intensidad de la reacción enzimática colorimétrica. Para lo mencionado se utiliza el agente revelador Diaminobencidina (DAB), se procede nuevamente a una serie de lavados con PB 0.1 M y para finalizar se montan los cortes en portaobjetos gelatinizados y se cubren con Cytoseal.

## **10.- Análisis morfológico.**

Para el estudio de la microglía se examinaron las células inmunoteñidas en la región del hilus del giro dentado y CA3 desde la porción dorsal (-2.80mm hasta -4.16mm) de Bregma, para cada región se analizó 1 campo por corte de ambos hemisferios, con un total de 4 cortes por rata. Se realizaron microfotografías de los cortes con un microscopio de campo claro acoplado a una cámara de video digital (AxioCam MRC Carl Zeiss). A través del programa analizador de imágenes Axiovisión Rel 4.0 (Carl Zeiss) se evaluó el área ( $\mu\text{m}^2$ ) de cada campo examinado. Tomando como marco de referencia del área un valor de 15,000  $\mu\text{m}^2$  y solo se contaron las células dentro de la misma. Se cuantificó la microglía total en el giro dentado y CA3 del hipocampo de acuerdo a la descripción de Dizchaves y cols. (2012), tanto la microglía en reposo (soma pequeño y prolongaciones largas y delgadas) y activada (soma de gran tamaño, ameboide y con prolongaciones cortas y gruesas). Posteriormente se realizó el registro en células totales por  $\text{mm}^2$ .

## **11.- Estadística.**

Se analizaron los resultados con el programa prisma 6.0, a través del método estadístico análisis de varianza (ANOVA) de una y de dos vías, siendo un valor estadísticamente significativo de  $p \leq 0.05$ . Se utilizó la prueba de tukey como prueba post-hoc. Además, se utilizó la prueba t-Student para comparación entre dos grupos.

## IX. RESULTADOS

Se llevó a cabo el análisis histológico evaluando el número total de microglía y el porcentaje de microglías que presentan activación, en las regiones de CA3 e hilus del hipocampo.

Realizamos un análisis de varianza de una vía (factor estrés) y observamos que en la región de CA3 de ratas vírgenes, el estrés no produjo cambios significativos (ANOVA  $p=0.47$ ) en el número total de microglía (Fig. 7), pero si provocó una tendencia (ANOVA  $p=0.06$ ) a ser significativa al aumento del porcentaje de microglía activada, en comparación con su control VIR-CONT (Fig. 8a). Se realizó un análisis estadístico separado entre los grupos VIR-CONT y VIR-EP, observando un aumento (Prueba t-Student  $p<0.05$ ) del porcentaje de microglía activada por el estrés prenatal (Fig. 8b).

Se observó una tendencia a ser significativa (ANOVA  $p=0.08$ ) al aumento del número total de microglía por el estrés en ratas lactantes, en comparación con el grupo LAC-CONT (Fig. 9a). Para observar la contribución de cada grupo estresado a dicha tendencia, se realizó un análisis estadístico separado entre los grupos LAC-CONT y LAC-EC, mostrándose que el estrés crónico aumentó significativamente el número total de microglía (Fig. 9b) (Prueba t-Student  $p<0.05$ ).

Por otra parte, el estrés en ratas lactantes no produjo cambios significativos (ANOVA  $P=0.14$ ) en el porcentaje de microglía activada (Fig. 10a). Sin embargo, realizando la comparación solo entre los grupos de estresores, se observó un aumento del porcentaje (Prueba t-Student  $P<0.05$ ) por el estrés prenatal, en comparación con el grupo LAC-EC (Fig. 10b).

El ANOVA de dos vías arrojó que el factor fisiológico sí interviene, ya que en los grupos de lactantes encontramos un aumento significativo ( $F_{(1,29)} = 60.3$ ,  $p<0.001$ ) del número total de microglía, en comparación con grupos de vírgenes (Fig. 11a). A su vez, al comparar mediante el ANOVA de dos vías el porcentaje de microglía activada entre vírgenes y lactantes observamos una contribución significativa del estado fisiológico (Fig. 11c) ( $F_{(1,23)} = 19.1$ ,  $p<0.001$ ), de la condición de estrés ( $F_{(2,23)} = 4.56$ ,  $p<0.05$ ) así como su interacción ( $F_{(2,23)} = 3.82$ ,  $p<0.05$ ) para reducir el porcentaje de microglía activada en grupos de lactantes. Finalmente, se anexan fotomicrografías de los grupos utilizados de ratas lactantes y vírgenes, tanto controles, estrés crónico y estrés prenatal, solamente de la región de CA3 (Fig. 12)

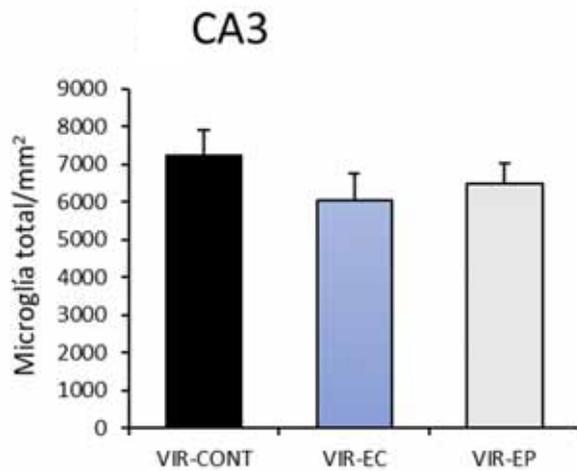


Figura 7. Número total de microglía/mm<sup>2</sup> en CA3 del hipocampo de ratas vírgenes. Se muestran los grupos de vírgenes, tanto control como los dos grupos sometidos a estrés.  $P = 0.47$ , vírgenes estrés crónico (VIR-EC), vírgenes estrés prenatal (VIR-EP) vs vírgenes control (VIR-CONT).

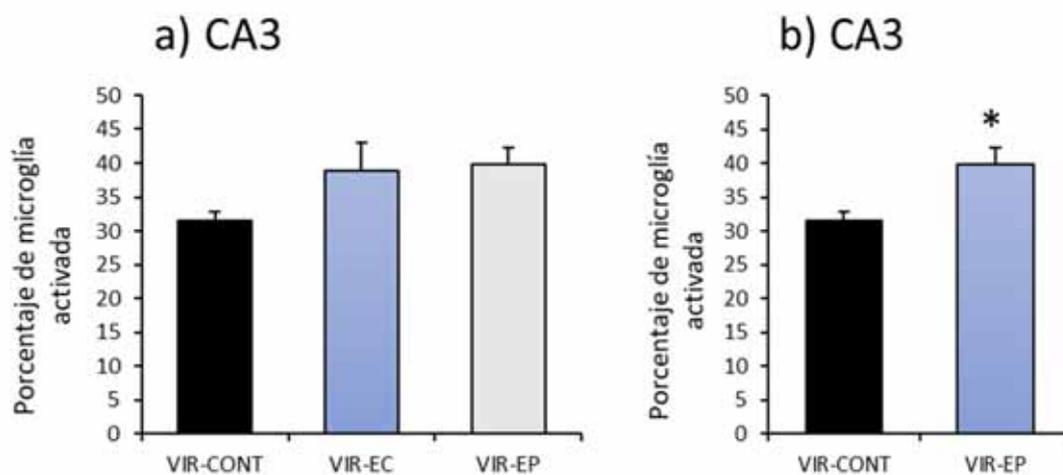


Figura 8. Porcentaje de microglía activada en CA3 del hipocampo de ratas vírgenes. a) Se muestran los grupos de vírgenes, tanto control como los dos grupos sometidos a estrés.  $P=0.06$ , vírgenes control (VIR-CONT) vs vírgenes estrés crónico (VIR-EC), vírgenes estrés prenatal (VIR-EP). b) Se muestran los grupos de vírgenes control y estrés prenatal.  $P \leq 0.05^*$  VIR- CONT vs VIR-EP.

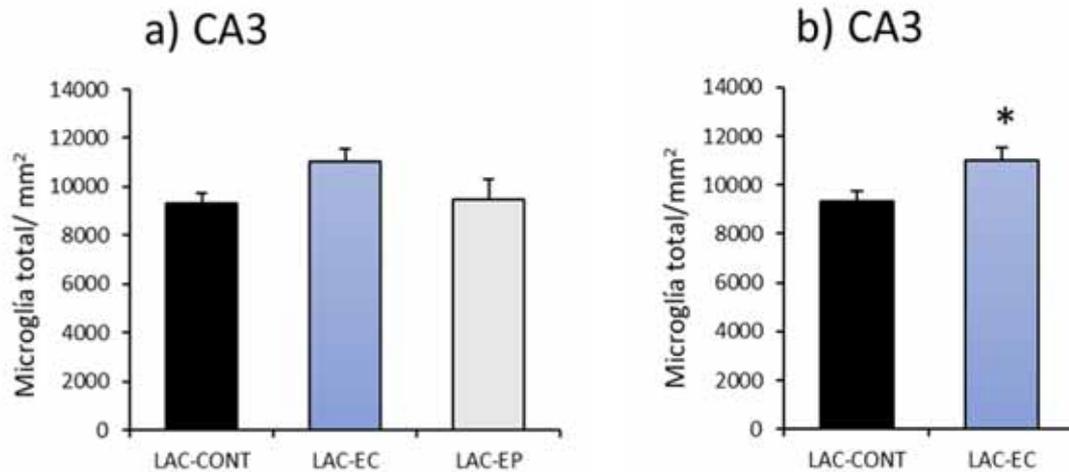


Figura 9. Número total de microglía/mm<sup>2</sup> en CA3 del hipocampo de ratas lactantes. a) Se muestran los grupos de lactantes, tanto control como los dos grupos sometidos a estrés. P=0.08, lactantes control (LAC-CONT) vs lactantes estrés crónico (LAC-EC), lactantes estrés prenatal (LAC-EP). b) Se muestran los grupos lactantes control versus estrés crónico. P < 0.05\* LAC-CONT vs LAC-EC.

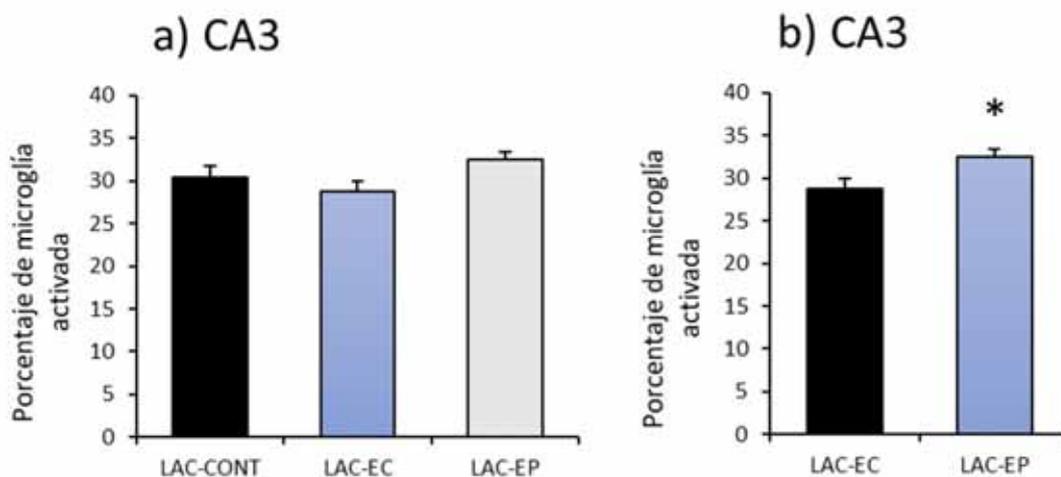


Figura 10. Porcentaje de microglía activada en CA3 del hipocampo de ratas lactantes. a) Se muestran los grupos de lactantes, tanto si fueron o no sometidos a estrés. P= 0.14, lactantes control (LAC-CONT) vs lactantes estrés crónico (LAC-EC), lactantes estrés prenatal (LAC-EP). b) Se muestran los grupos de lactantes estrés crónico versus estrés prenatal. P < 0.05\* LAC-EC vs LAC-EP.

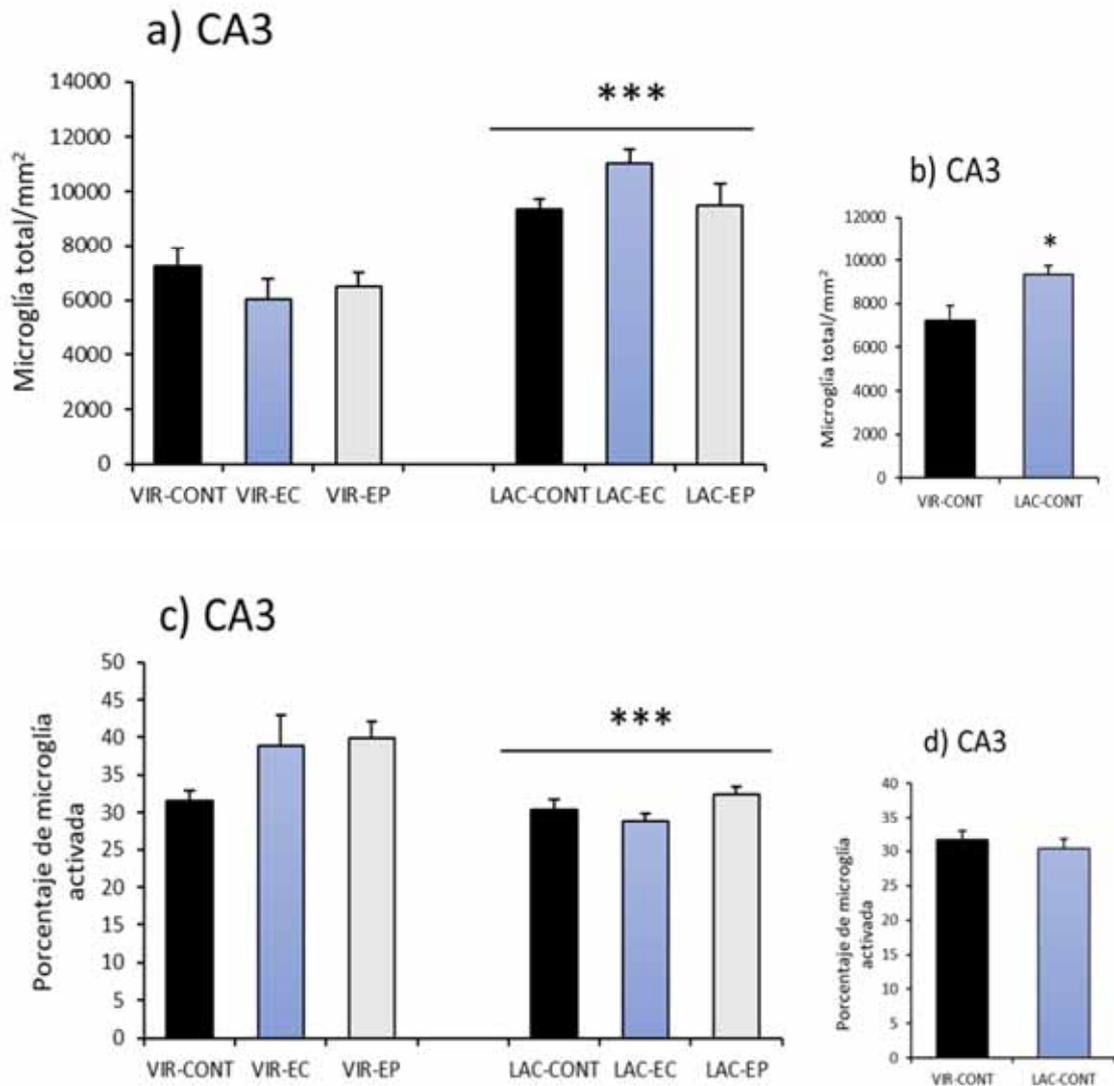


Figura 11. Comparación de la densidad de microglía total y porcentaje de microglía activada entre grupos de ratas vírgenes control (VIR-CONT), vírgenes estrés crónico (VIR-EC), vírgenes estrés prenatal (VIR-EP), ratas lactantes control (LAC-CONT), lactantes estrés crónico (LAC-EC) y lactantes estrés prenatal (LAC-EP) en CA3. a) Número total de microglía/mm<sup>2</sup> en CA3 del hipocampo. Se muestran los grupos de vírgenes y lactantes, tanto si sufrieron estrés como si fueron controles. Al comparar grupos lactantes vs grupos vírgenes  $P < 0.001^{***}$ . b) Se muestran los grupos controles de ratas vírgenes y lactantes.  $P < 0.05^*$  VIR-CONT VS LAC-CONT. c) Porcentaje de microglía activada en CA3 del hipocampo. Se muestran los grupos de vírgenes y lactantes, tanto si sufrieron estrés como si fueron controles. Al comparar grupos lactantes vs grupos vírgenes  $P < 0.001^{***}$ . d) Se muestran los grupos controles de ratas vírgenes y lactantes.

CA3

Hembras vírgenes

Hembras lactantes

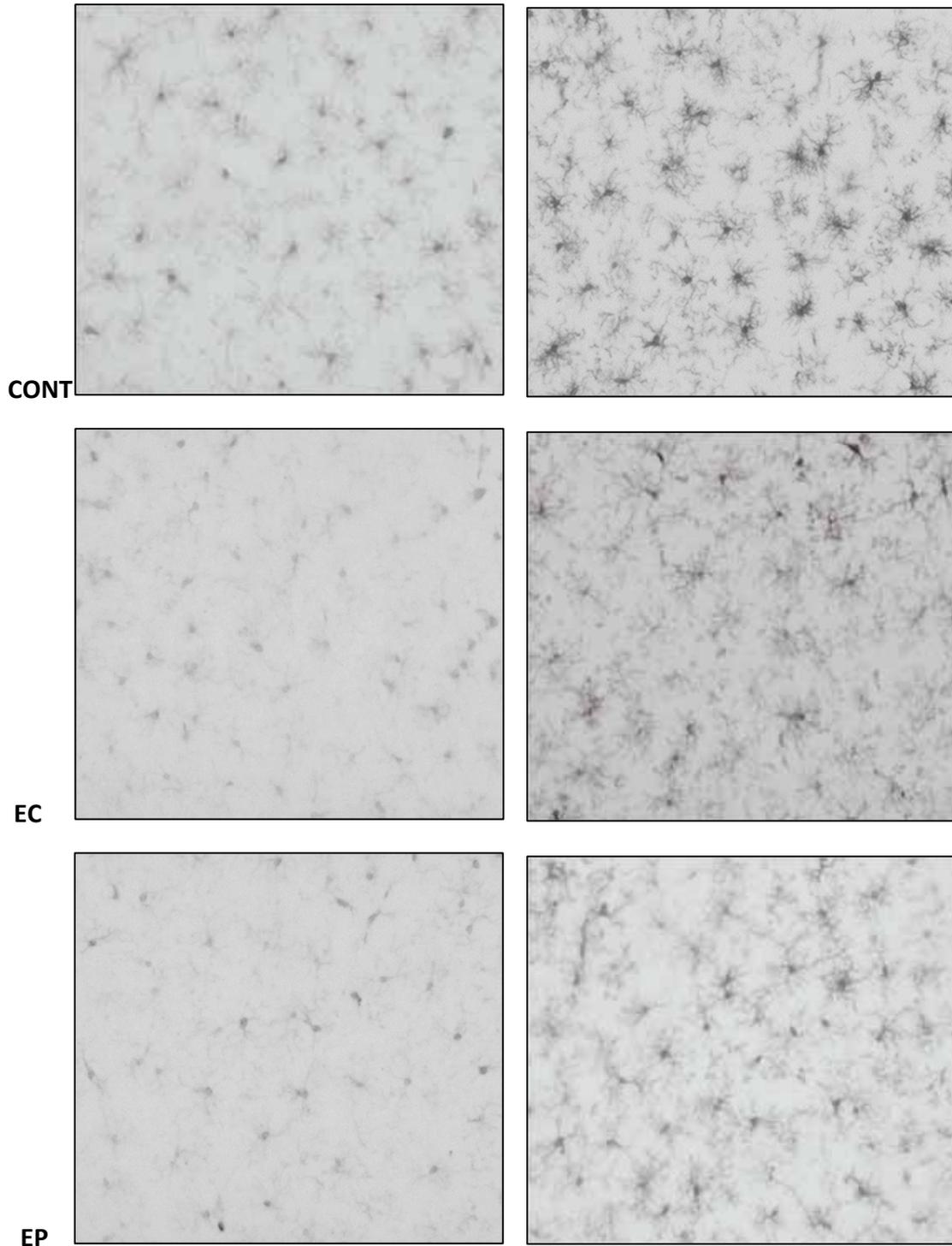


Figura 12. Fotomicrografías de microglía en la región de CA3 del hipocampo. Se muestran los grupos de hembras vírgenes y hembras lactantes controles (CONT), sometidos a estrés crónico (EC) y estrés prenatal (EP).

En la región del hilus de ratas vírgenes, el estrés provocó una disminución significativa (ANOVA  $p < 0.01$ ) del número total de microglía (Fig. 13a), además de un aumento significativo (ANOVA  $p < 0.05$ ) del porcentaje de microglía activada (Fig. 13b) en los grupos de ratas con estrés crónico o estrés prenatal, en comparación con su grupo control.

Por otra parte, el estrés en ratas lactantes no produjo cambios significativos en el número total de microglía /  $\text{mm}^2$  (Fig. 14a) (ANOVA  $p = 0.11$ ), pero si se encontró en ratas lactantes cambios (ANOVA  $p < 0.05$ ) en el porcentaje de microglía activada (Fig. 14b). El análisis post hoc mostró un aumento del porcentaje de microglía activada entre el grupo de estrés prenatal, en comparación con el grupo de estrés crónico. Realizando una prueba estadística separada entre LAC- CONT y LAC- EC, se encontró una disminución (Prueba t-Student  $p < 0.05$ ) del porcentaje de microglía activada por el estrés crónico (Fig. 14c)

Al comparar grupos de ratas vírgenes y lactantes mediante el ANOVA de dos vías, encontramos que el número total de microglía aumentó significativamente en grupos de lactantes (Fig. 15a) en comparación con grupos de vírgenes estresadas (Factor Estado fisiológico  $F(1,23) = 11.8$ ,  $p < 0.01$ ; Factor Estrés  $F(2,23) = 12.4$ ,  $p < 0.001$ ; interacción  $F(2,23) = 7.28$ ,  $p < 0.01$ ).

La comparación entre los grupos de vírgenes y lactantes mostró una disminución significativa del porcentaje de microglía activada (Fig. 15c) (Factor Estado fisiológico  $F(1,23) = 13.7$ ,  $p < 0.01$ ; Factor Estrés  $F(2,23) = 4.05$ ,  $p < 0.05$ ; interacción  $F(2,23) = 5.70$ ,  $p < 0.01$ ), en los grupos de lactantes comparados con los grupos de vírgenes. Por último, se anexan fotomicrografías de los grupos utilizados de ratas lactantes y vírgenes, tanto controles, estrés crónico y estrés prenatal, solamente de la región del hilus (Fig. 16).

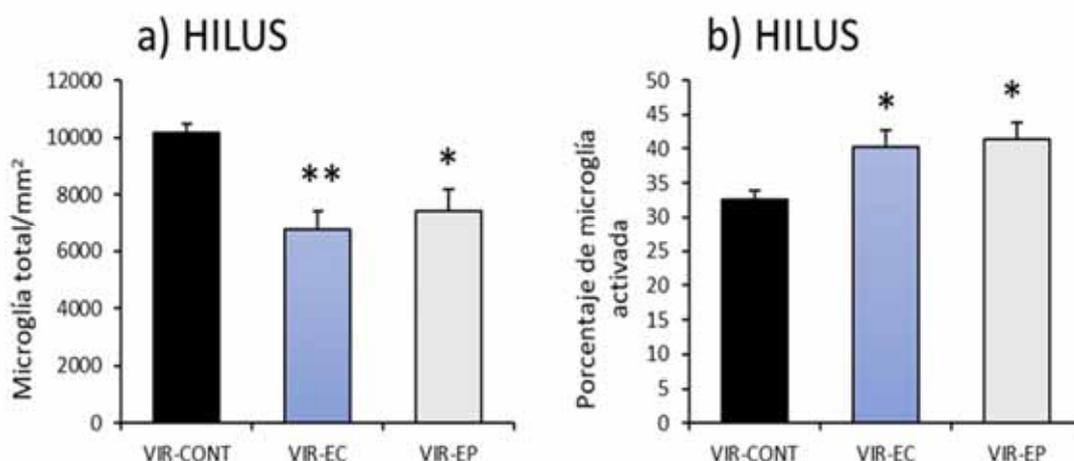


Figura 13. Análisis de microglía en hilus del hipocampo de ratas vírgenes. a) Se muestra el número total de microglía/ $\text{mm}^2$  en los grupos de ratas vírgenes, tanto si fueron o no sometidos a estrés.  $P < 0.05^*$  vírgenes estrés prenatal (VIR-EP),  $< 0.01^{**}$  vírgenes estrés crónico (VIR-EC) vs vírgenes control (VIR-CONT). b)

Porcentaje de microglía activada en hilus del hipocampo. Se muestran los mismos grupos de vírgenes.  $P < 0.05^*$  VIR-CONT vs VIR-EC, VIR-EP.

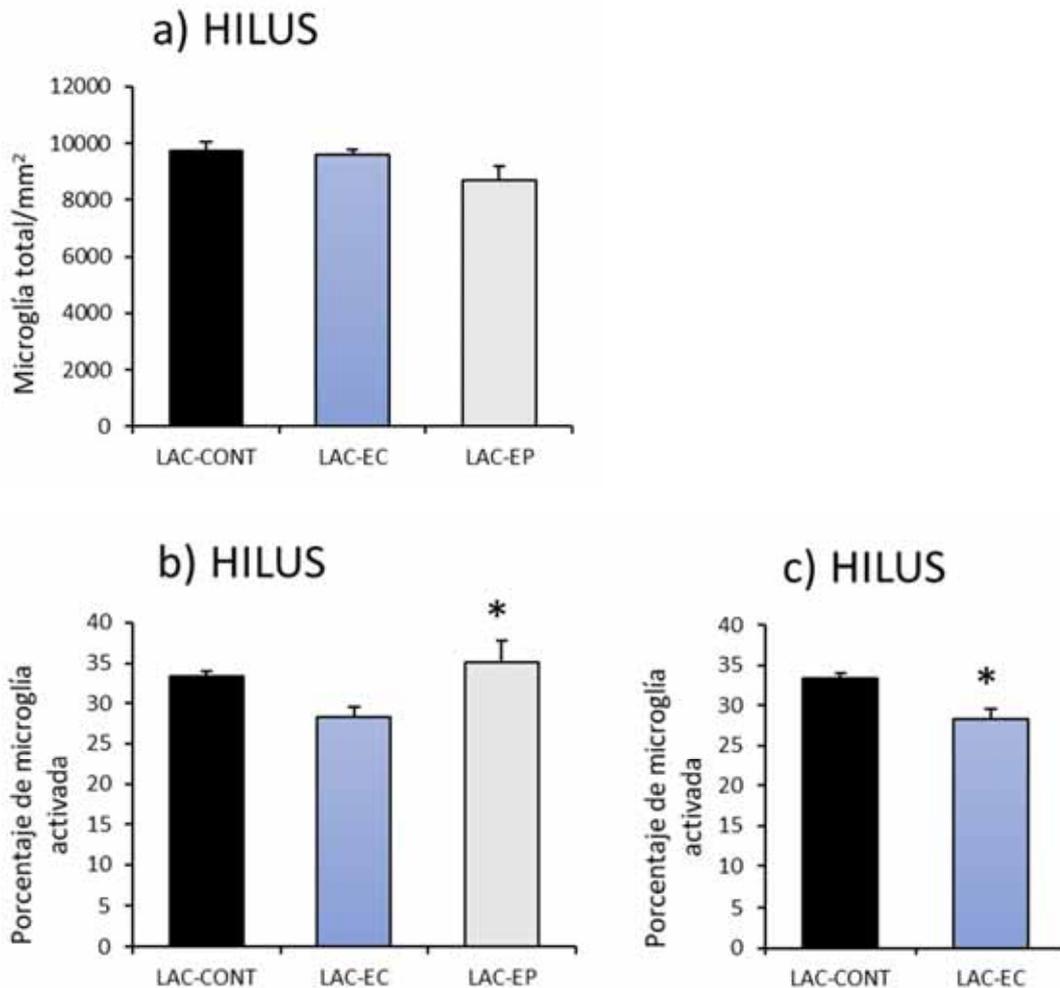


Figura 14. Análisis de microglía en hilus del hipocampo de ratas lactantes. a) Número total de microglía/mm<sup>2</sup> en hilus del hipocampo. Se muestran los grupos de lactantes control y los grupos sometidos a estrés crónico y estrés prenatal.  $P = 0.11$ , lactantes control (LAC-CONT) vs lactantes estrés crónico (LAC-EC), lactantes estrés prenatal (LAC-EP). b) Porcentaje de microglía activada en hilus del hipocampo. Se muestran los grupos de lactantes control y los grupos sometidos a estrés crónico y estrés prenatal.  $P < 0.05^*$  LAC-EC vs LAC-EP. c) Porcentaje de microglía activada en hilus del hipocampo. Se muestran los grupos lactante control y estrés crónico.  $P < 0.01^{**}$  LAC-CONT vs LAC-EC.

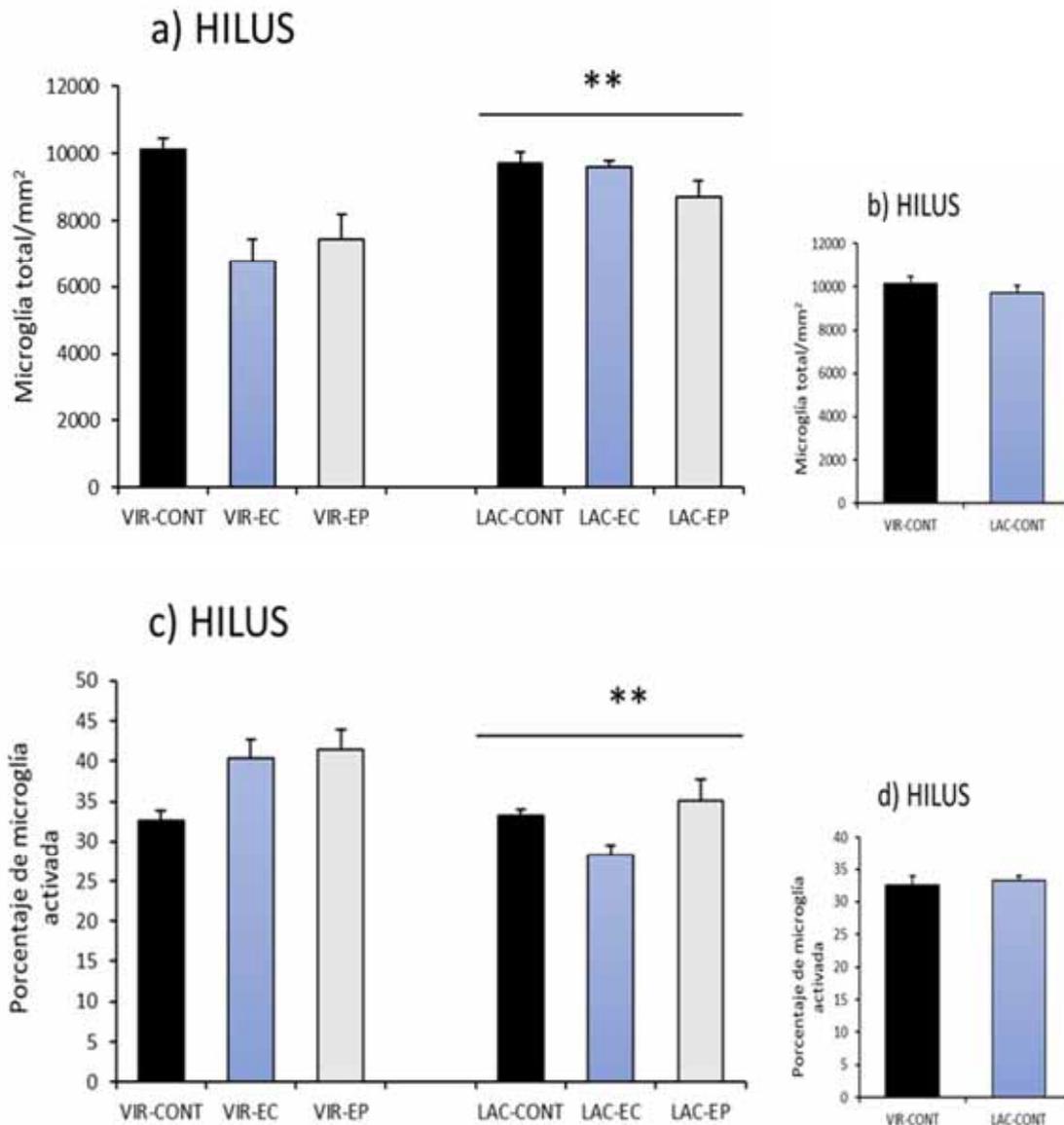


Figura 15. Comparación de la densidad de microglía total y porcentaje de microglía activada entre grupos de ratas vírgenes control (VIR-CONT), vírgenes estrés crónico (VIR-EC), vírgenes estrés prenatal (VIR-EP), ratas lactantes control (LAC-CONT), lactantes estrés crónico (LAC-EC) y lactantes estrés prenatal (LAC-EP) en hilus. a) Número total de microglía/mm<sup>2</sup> en hilus del hipocampo. Se muestran los grupos de vírgenes y lactantes, tanto si sufrieron estrés como si fueron controles. Al comparar grupos vírgenes vs grupos lactantes  $P < 0.01^{**}$ . b) Se muestran los grupos controles de ratas vírgenes y lactantes. c) Porcentaje de microglía activada en hilus del hipocampo. Se muestran los grupos de vírgenes y lactantes, tanto si sufrieron estrés como si fueron controles. Al comparar grupos vírgenes vs grupos lactantes  $P < 0.01^{**}$ . d) Se muestran los grupos controles de ratas vírgenes y lactantes.

## HILUS

Hembras vírgenes

Hembras lactantes

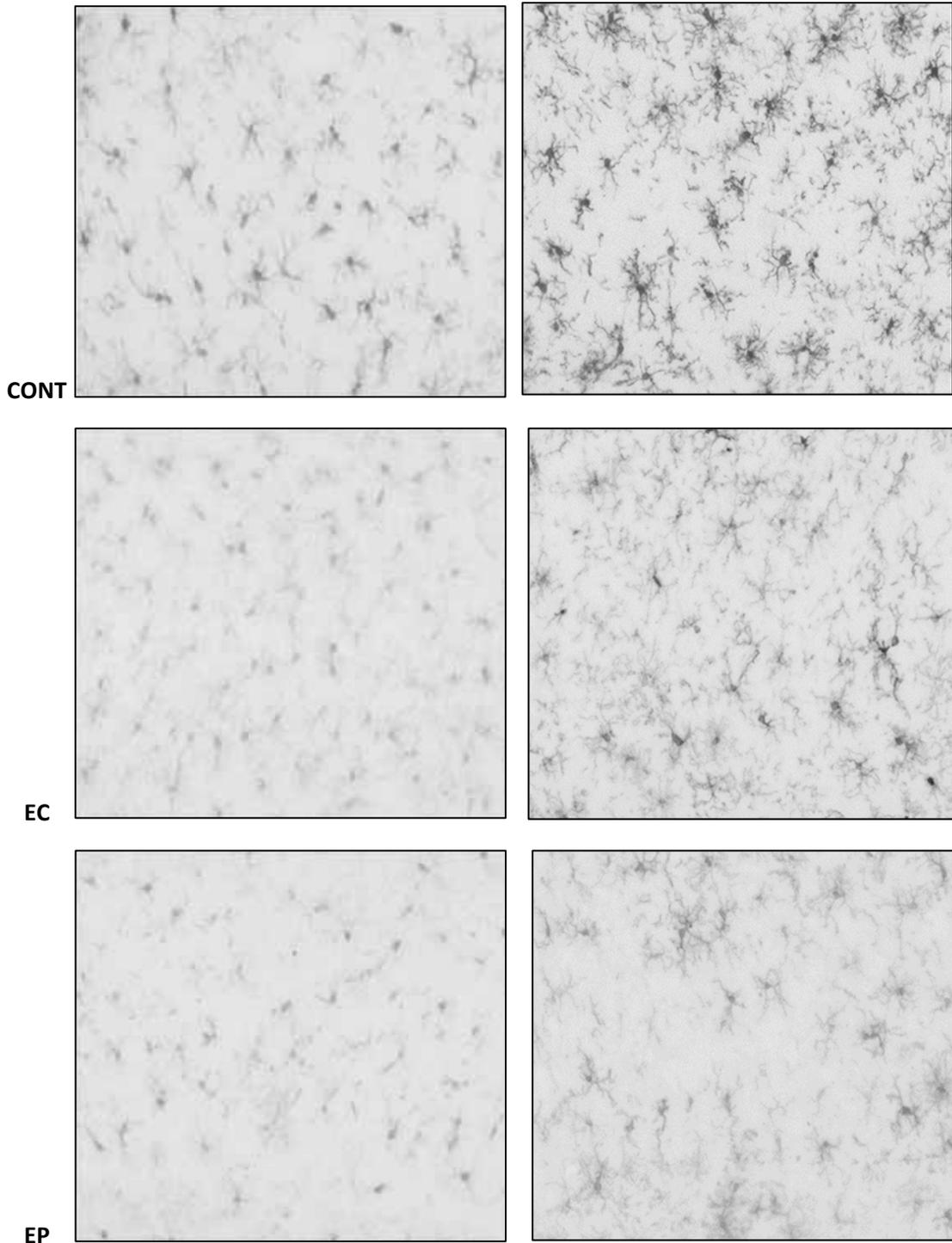


Figura 16. Fotomicrografías de microglía en la región de hilus del hipocampo. Se muestran los grupos de hembras vírgenes y hembras lactantes controles (CONT), sometidos a estrés crónico (EC) y estrés prenatal (EP).

## X. DISCUSIÓN

La finalidad de este estudio fue evaluar los efectos del estrés en distintas etapas de la vida de la hembra, analizando el número total de la microglía y el porcentaje de su activación en la lactancia y la nuliparidad, en las regiones de CA3 e hilus del hipocampo, ambas estructuras sensibles al estrés y que han sido examinadas en múltiples ocasiones. Los resultados indican que el estrés en ratas vírgenes provoca un aumento en el porcentaje de microglía activada. Adicionalmente, tanto en la región de CA3 e hilus se observa que los grupos de ratas lactantes comparados con los grupos de vírgenes reportan mayor número de microglía total, pero curiosamente no se observa un mayor porcentaje de microglía activada. Esto sugiere que, a pesar de que el periodo de lactancia ejerce efectos aumentando el número de microglía, se atenúa la neuroinflamación que se encuentra relacionada.

En la presente investigación encontramos que en la región de CA3 de ratas hembra vírgenes el estrés prenatal ejerció un aumento en el porcentaje de microglía activada, sin reportar cambios en el número total de microglía. Al parecer no existen estudios que evalúen específicamente la región de CA3 bajo un modelo de estrés prenatal, aunque un estudio que evaluó la región total del hipocampo (Ślusarczyk et al., 2015) en ratas macho con un modelo de estrés prenatal, reportó en contraste un aumento de los niveles de proteína Iba1 en el hipocampo y en concordancia hubo más células con morfología activada. Sin embargo, este estudio no cuenta con una región específica y la cuantificación de microglía fue a través de la técnica analítica Western Blot, en cambio nuestra evaluación fue a través de conteos manuales y expresados por área en mm<sup>2</sup>. Otro estudio (Diz Chaves et al., 2013) estuvo en concordancia con nuestros resultados a pesar de analizar una región hipocampal distinta, pero con cierta semejanza. En este se reportó que el estrés prenatal en la región de CA1 de ratones macho no provocó cambios en el número de células inmunorreactivas a Iba-1, pero si una mayor proporción de células activadas, pese a que también se debe tener presente la diferencia de sexo y cepa de modelo biológico utilizado.

Se ha reportado que el estrés crónico por inmovilización en ratas macho induce un número significativamente mayor de células positivas para Iba1 en CA3 y también una mayor densidad de material inmunorreactivo positivo. Además, el tamaño celular promedio estimado fue significativamente menor en los animales estresados y este tamaño celular reducido es de hecho consistente con las alteraciones morfológicas que se observan típicamente en la microglía reactiva (Tynan et al., 2010). Nuestros resultados no indican cambios en la microglía producidos por el estrés crónico en ratas hembra vírgenes. La disparidad de resultados se debe en gran medida a que Tynan et al. utilizaron ratas macho, por lo que la diferencia de sexo difiere en los cambios producidos por distintos protocolos de estrés. Además, el número total de la microglía evaluado mediante la densidad óptica fue obtenido utilizando operaciones de umbralización en las que solo se incluyeron para el análisis los píxeles dentro de un rango dado de intensidad de color y tamaño, pudiendo sobreestimarse el número y la densidad de la microglía por el hecho de obtener una tinción con mayor intensidad, que no

refleja directamente un cambio. Como consideración final, la ausencia de cambios en nuestro estudio también podría atribuirse a que se utilizó un tamaño de n muy pequeño para este grupo, por lo tanto, el valor de la desviación estándar/error fue elevado, cabe aclarar que los resultados gráficamente son similares a los reportados en el hilus en este mismo estudio.

Un estudio previo al nuestro realizado en la región de CA3 (Posillico y Schwarz. 2016) demostró que el estrés crónico sufrido durante la gestación de ratas lactantes no provoca cambios en el número total de la microglía. En contraste, nuestros resultados indican que el estrés crónico aumenta significativamente el número total de microglía sin afectar el porcentaje de su activación en ratas lactantes, sin embargo, utilizamos un estresor distinto (estrés por inmovilización) y por un lapso de tiempo mayor, el cual quizá fue lo suficientemente robusto para provocar cambios en el sistema neuroinmune, incluyendo que nuestros análisis fueron realizados por conteo manual de las células microgliales y a los 5 meses de edad. Ningún estudio ha reportado los efectos del estrés prenatal en CA3 de hembras lactantes adultas, nuestros hallazgos indican que no existe ningún cambio de la microglía bajo esta condición, posiblemente los efectos del estrés fueron atenuados debido a los cambios fisiológicos que ocurren durante el embarazo, como es la respuesta atenuada al estrés y la participación de ciertas hormonas con efectos neuroprotectores, que evitan los cambios de número total y morfología activada en la microglía.

En la región del hilus, nuestros resultados en ratas vírgenes demuestran que el estrés crónico aumenta el porcentaje de microglía activada, pero contrariamente observamos una disminución en el número total de microglía. Pese a que existen pocos estudios que evalúen el hipocampo y principalmente la región del hilus, investigaciones en ratones macho han encontrado que el estrés crónico por derrota social repetida en la región total del hipocampo, aumenta el número total de microglía y al parecer también se observa una morfología hipertrófica con procesos más cortos y más gruesos (Wohleb et al., 2011, 2012). Ambos resultados concuerdan en que existe un aumento de microglía con morfología característica de activación, pese a la diferencia de sexo y a que nuestra investigación no estudió todo el conjunto del hipocampo, pudiendo existir diferencias entre regiones. Agregando que Wohleb et al. cuantificaron los cambios morfológicos y de número microglial a través de un análisis de imagen digital (DIA) y mediante escaneo densitométrico, lo cual podría explicar la imparidad del resultado en el número total de microglía.

El estrés prenatal en el hilus de ratones hembras indujo un aumento del número total de células microgliales inmunorreactivas para Iba1 y aumentó la proporción de células microgliales con somas grandes y procesos celulares retraídos (Diz chaves et al., 2012). En contraste, nuestros resultados apuntan a que el estrés prenatal produce una disminución de células microgliales, esta diferencia probablemente se deba a que nuestras hembras fueron ratas y no se realizó el proceso de ovariectomización, por lo que las hormonas ováricas pudieron jugar un papel importante. Además, nuestras hembras no fueron inyectadas con solución salina.

A diferencia de CA3, nuestros resultados en la región del hilus de ratas lactantes muestran que tanto el estrés crónico y el estrés prenatal no inducen cambios en el número total de microglía, sin embargo, el estrés crónico si produjo una disminución significativa en el porcentaje de activación. Investigaciones previas (Posillico y Schwarz. 2016.) reportaron que el estrés crónico provocaba una densidad más alta de microglía en comparación con las hembras no estresadas, sin medir directamente la proporción de microglía activada. Las diferencias entre resultados pueden estar influenciadas principalmente por la medición de la microglía, como se discutió anteriormente la densitometría de la tinción de Iba1 puede estar sobrevalorando el número de microglía, una tinción intensa no refleja un aumento directo en la población. Acerca del estrés prenatal, no hay estudios que evalúen los efectos de la respuesta neuroinmune durante este periodo, nuestros resultados indican a la par con CA3 que la lactancia parece ejercer un efecto de atenuación de la respuesta neuroinmune, aun cuando se sufre estrés en alguna etapa de la vida.

Adicionalmente, nuestros resultados apuntan que el paso de la nuliparidad hacia la lactancia sugiere un aumento de la microglía total, aunque la proporción de microglía activada no se modifica sobre la región de CA3. En cambio, en la región del hilus no parece ejercer cambios en la microglía. Diversos estudios han analizado los cambios neuroinmunes que produce esta transición, una investigación en la región de CA3 muestra en disparidad que la lactancia no ejerce ningún cambio en el número de microglía y en la región del giro dentado las hembras posparto tenían una menor densidad de microglía, aunque no se llevó a cabo el análisis morfológico en ambas áreas (Posillico y Schwarz. 2016.). Como se discutió anteriormente, las diferencias entre estos resultados seguramente se deben a la técnica basada en densitometría que Posillico y Schwarz utilizaron para evaluar los cambios en el número de microglía presente. Otro estudio realizado en la región del giro dentado reportó la ausencia de cambios en la densidad celular entre ratas nulíparas y lactantes, pero si observaron un aumento significativo en el porcentaje de células robustas (pocos procesos celulares y más cortos) en ratas al día posparto 8 (Eid et al., 2019). Los análisis microgliales de los resultados anteriores se realizaron utilizando el software NIS Elements Basic Research (Nikon), usando la función de medición, el tamaño del soma, además de la longitud y el número del proceso celular, en cambio nuestros análisis fueron llevados a cabo por un observador con experiencia en identificación morfológica microglial, esta diferencia en la técnica de análisis puede explicar las diferencias con nuestra investigación sobre la morfología de la microglía. Este tipo de análisis fue validado en nuestro laboratorio mediante la determinación del tamaño del soma (Saavedra y cols., 2021).

Por último, un análisis en el hipocampo dorsal indica una reducción en la densidad de microglía en el día posparto 1 y 8, asimismo, las hembras en el día posparto 8 tenían un número significativamente menor de microglía, no obstante, no se reportaron cambios en la proporción de microglía con morfología activada (Haim et al., 2016). Es importante señalar que en dicho estudio se promediaron los valores de las subregiones CA1, CA3 y el giro dentado para obtener el valor

del hipocampo dorsal y, de hecho, las inconsistencias respecto a nuestros resultados pueden explicarse debido a las diferencias en las densidades microgliales dentro de las distintas regiones del hipocampo.

Es de suma importancia comentar que la mayoría de tejidos utilizados para este experimento eran de aproximadamente dos años de antigüedad, por lo que se tuvo cierto grado de dificultad para realizar el ensayo inmunohistoquímico, debido a la degradación paulatina que sufrió el marcador molecular Iba-1 con el paso del tiempo. Por lo tanto, ciertos tejidos tuvieron que ser desechados y esto explica porque ciertos grupos de experimentación fueron tan pequeños. En conjunto, los resultados obtenidos deben ser completados y validados con nuevos tejidos.

Finalmente, para futuras investigaciones sería interesante el estudio de la microglía bajo el mismo contexto de estrés y estado fisiológico, ampliado a distintas áreas del cerebro, como es la región de la corteza prefrontal y el hipotálamo, ambas forman parte del circuito materno y son de relevancia para el mantenimiento e inicio de la conducta tipo materna. Además, se podrían incluir el estudio de conductas tipo depresivas, como es la prueba de nado forzado y la prueba de preferencia de sacarosa, añadiendo la cuantificación de interleucinas de tipo proinflamatorio (IL-1  $\beta$ , TNF-  $\alpha$  e IL-6) y antiinflamatorio (IL-4 e IL-6).

## **XI. CONCLUSIÓN**

A pesar del aumento significativo del número total de microglía que produce el paso de la nuliparidad a la lactancia en las hembras, no se observa un aumento del porcentaje de microglía activada el cual es responsable de neuroinflamación, por lo que parece ser que la lactancia ejerce un efecto neuroprotector, el cual ha sido reportado con anterioridad en modelos de excitotoxicidad (Vanoye, A. et al., 2008) (Cabrera, B. et al., 2009). Recordemos que una mayor activación en el número de microglía se correlaciona directamente con el deterioro de la neurogénesis. Parte de estos hallazgos pueden estar mediados por la respuesta atenuada del eje HPA y también por las hormonas prolactina y oxitocina, las cuales han reportado efectos neuroprotectores en ciertos modelos de estrés.

## XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Anderson, G. y Maes, M. (2013). Postpartum depression: psychoneuroimmunological underpinnings and treatment. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 9, 277–287. <https://doi.org/10.2147/NDT.S25320>
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T. y O’keefe, J. (2007). *The Hippocampus Book*. Oxford University Press, First Edition. Pág. 40.
- Bian, Y., Pan, Z., Hou, Z., Huang, C., Li, W. y Zhao, B. (2012). Learning, memory, and glial cell changes following recovery from chronic unpredictable stress. *Brain Research Bulletin* 88(5), 471-476.
- Brummelte, S. y Galea, L. (2016). Postpartum depression: Etiology, treatment and consequences for maternal care. *Hormones and Behavior* 77, 153-166. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.08.008>
- Cabrera, V., Cantú, D., Ramos, E., Vanoye, A., Cerbón, M. y Morales, T. (2009). Lactation is a natural model of hippocampus neuroprotection against excitotoxicity 461(2), 136-139. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.06.017>
- Caughey, S., Klampfl, S., Bishop, V., Pfoertsch J., Neumann, I., Bosch, O. y Meddle, S. (2011). Changes in the intensity of maternal aggression and central oxytocin and vasopressin V1a receptors across the peripartum period in the rat. *Journal of Neuroendocrinology* 23(11), 1113–1124.
- Champagne, F., Weaver, E., Diorio, J., Sharma, S. y Meaney, M. (2003). Natural variations in maternal care are associated with estrogen receptor alpha expression and estrogen sensitivity in the medial preoptic area. *Endocrinology* 144 (11), 4720- 4724.
- Cross, J., Werb, Z. y Fisher, S. (1994). Implantation and the Placenta: Key Pieces of the Development Puzzle. *Science* 266(5190), 1508-1518.
- Cronk, J. y Kipnis, J. (2013). Microglia – the brain’s busy bees. *F1000Prime Rep.* 5:53. <https://doi.org/10.12703/P5-53>
- Delpech, J., Madore, C., Nadjar, A., Jofree, C., Wohleb, E. y Layé, S. (2015). Microglia in neuronal plasticity: Influence of stress. *Neuropharmacology* 96A, 19-28. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.12.034>
- Demir, R., Seval, y. Huppertz, B. (2007). Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. *Acta Histochemica* 109(4), 257–265.
- Diz-Chaves, Y., Astiz, M., Bellini, M. y García, L. (2013). Prenatal stress increases the expression of proinflammatory cytokines and exacerbates the inflammatory response to LPS in the hippocampal formation of adult male mice. *Brain, Behavior, and Immunity* 28, 196-206. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.11.013>
- Diz-Chaves, Y., Pernía, O. y Carrero, P. et al. (2012). Prenatal stress causes alterations in the morphology of microglia and the inflammatory response of the hippocampus of adult female mice. *Journal of Neuroinflammation* 9, 71. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-71>

- Douglas, A. (2011). Mother-offspring dialogue in early pregnancy: Impact of adverse environment on pregnancy maintenance and neurobiology. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 35, 1167–1177. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbbp.2010.07.024>
- Eid, R., Chaiton, J., Lieblich, S., Bodnar, T., Weinberg, J. y Galea, L. (2019). Early and late effects of maternal experience on hippocampal neurogenesis, microglia, and the circulating cytokine milieu. *Neurobiology of Aging* 78, 1-7.
- Figueiredo, B., Dias, C., Brandao, S., Canário, C. y Costa, R. (2013). Breastfeeding and postpartum depression: state of the art review. *Jornal de Pediatria* 89, 4, 332-338. <https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2012.12.002>
- Frank, M., Fonken, L., Watkins, L. y Maier, S. (2019). Microglia: Neuroimmune-sensors of stress. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 94, 176-185. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2019.01.001>
- Galea, L., Wide, J. y Barr, A. (2001). Estradiol alleviates depressive-like symptoms in a novel animal model of post-partum depression. *Behavioural Brain Research* 122, 1-9.
- Glover, V. (2014). Maternal depression, anxiety and stress during pregnancy and child outcome; what needs to be done. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 28, 25-35. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2013.08.017>
- Haim, A., Julian, D., Albin, C., Brothers, H., Lenz, K. y Leuner B. (2016). A survey of neuroimmune changes in pregnant and postpartum female rats. *Brain, Behavior, Immunity* 59, 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2019.01.021>
- Hillerer, K., Rudolf, V., Fischer, T., y Aigner, L. (2014). The Maternal Brain: An Organ with Peripartal Plasticity. *Neural plasticity*, 2014, 2-8. <https://doi.org/10.1155/2014/574159>
- Kim, E., Pellman, B. y Kim J. (2015). Stress effects on the hippocampus: a critical review. *Learning and memory* 22, 411-416. doi: 10.1101/lm.037291.114
- Lonstein, J. y Morrell, J. (2007). Neuroendocrinology and Neurochemistry of Maternal Motivation and Behavior. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, 195-245. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-30405-2\\_5](https://doi.org/10.1007/978-0-387-30405-2_5)
- Mann, P. y Bridges, R. (2002). Prolactin receptor gene expression in the forebrain of pregnant and lactating rats. *Molecular Brain Research* 105 (1-2), 136–145.
- McEwen, B. (2000). The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Research*, (886,1-2), 172-189. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02950-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02950-4)
- Millior, G., Lecours, C., Samson, L., Bisht, K., Poggini, S., Pagani, F., Deflorio, C., Lauro, C., Alboni, S., Limatola, C., Branchi, I., Tremblay, M. y Maggi, L. (2016). Fractalkine receptor deficiency impairs microglial and neuronal responsiveness to chronic stress. *Brain, Behavior and Immunity* 55, 114-125. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.07.024>

- Navarre, B., Laggart, J. y Craft, R. (2010). Anhedonia in postpartum rats. *Physiology & Behavior* 99(1):59-66. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.10.011>
- Nephew, B. y Murgatroyd, C. (2013). The Role of Maternal Care in Shaping CNS Function. *National institutes of health*, 47 (6), 2-3. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2013.10.013>
- Oatridge, A., Holdcroft, A., Saeed, N., Hajnal, J., Puri, B., Fusi, L. y Bydder, G. (2002). Change in Brain Size during and after Pregnancy: Study in Healthy Women and Women with Preeclampsia. *American Journal of neuroradiology* 23(1), 19-26.
- Olza, F., Marín, M., Gil, A., García, L. y Arevalo, M. (2014). Neuroendocrinology of childbirth and mother–child attachment: The basis of an etiopathogenic model of perinatal neurobiological disorders. *Frontiers in neuroendocrinology*, 35 (4), 460. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.03.007>
- Organización panamericana de la salud. (2017). Depresión y otros trastornos mentales comunes. Estimaciones sanitarias mundiales. extraído el 25 de noviembre de 2021 de <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/34006/PAHONMH17005->
- Patro, A., Nagayach, A., Sinha, S. y Patro N. (2016). General Physiology and Pathophysiology of Microglia During Neuroinflammation. *Inflammation: The Common Link in Brain Pathologies*, 17–42. DOI: 10.1007/978-981-10-1711-7\_2
- Perani, C. y Slattery, D. (2014). Using Animal Models to study Postpartum Psychiatric Disorders. *British Journal of Pharmacology* 171(20), 4539-4555. <https://doi.org/10.1111/bph.12640>
- Posillico. K. y Schwarz J. (2016). An investigation into the effects of antenatal stressors on the postpartum neuroimmune profile and depressive-like behaviors. *Behavioural Brain Research* 298, 218-228. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.11.011>
- Russell, G. y Lightman, S. (2019). The human stress response. *Nature Reviews Endocrinology* 15, 525–534. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0228-0>
- Saavedra, L., Hernández, M., Madrigal, S., Ochoa, A. y Torner, L. (2021). Long-term activation of hippocampal glial cells and altered emotional behavior in male and female adult rats after different neonatal stressors. *Psychoneuroendocrinology* 126. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2021.105164>
- Schultz, C. y Engelhardt, M. (2014). Anatomy of the Hippocampal Formation. *Frontiers of Neurology and Neuroscience* 34, 6-17. <https://doi.org/10.1159/000360925>
- Siegel, A. y Sapru, H. (2015). *Essential Neuroscience*. Lippincott Williams & Wilkins, Third Edition. Pág. 199, 446-447.
- Singh, K. y Dhikav V. (2012). Hippocampus in health and disease: An overview. *Annals of Indian Academy of Neurology* 15 (4), 239-246. doi: 10.4103/0972-2327.104323

- Slattery, D. y Neumann, I. (2008). No stress please! Mechanisms of stress hyporesponsiveness of the maternal brain. *The Journal of Physiology* 586.2, 377-385. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.145896>
- Ślusarczyk, J., Trojan, E., Glombik, K., budziszewska, B., Kubera, M., Lason, W., Popiolek, K., Mika, J., Wedzony, K. y Basta, A. (2015). Prenatal stress is a vulnerability factor for altered morphology and biological activity of microglia cells. *Frontiers in cellular neuroscience* 9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00082>
- Suda, S., Nishida, E., Newton, S. y Duman, R. (2008). A Postpartum Model in Rat: Behavioral and Gene Expression Changes Induced by Ovarian Steroid Deprivation. *Biological Psychiatry* 64(4), 311-319. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.03.029>
- Tynan, R., Naicker, S., Hinwood, M., Nalivaiko, E., Buller, K., Pow, D., Day, T. y Walker, F. (2010). Chronic stress alters the density and morphology of microglia in a subset of stress-responsive brain regions. *Brain, Behavior, and Immunity* 24, 1058- 1068. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.02.001>
- Ulrich-Lai, Y. y Herman, J. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews Neuroscience* 10, 397–409. <https://doi.org/10.1038/nrn2647>
- Vanoye, A., Morales, T., Ramos, E., Mendoza, A. y Cerbón M. (2008). Neuroprotective effects of lactation against kainic acid treatment in the dorsal hippocampus of the rat. *Hormones and behavior* 53(1), 112-123. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.09.004>
- Walker, F., Nilsson, M. y Jones, K. (2013). Acute and Chronic Stress-Induced Disturbances of Microglial Plasticity, Phenotype and Function. *Current Drug Targets*, 14, 1262-1276. DOI: 10.2174/13894501113149990208
- Wohleb, E., Fenn, A., Pacentá, A., Powell, N., Sheridan, J. y Godbout, J. (2012). Peripheral innate immune challenge exaggerated microglia activation, increased the number of inflammatory CNS macrophages, and prolonged social withdrawal in socially defeated mice. *Psychoneuroendocrinology* 37(9), 1491- 1505. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.02.003>
- Wohleb, E., Hanke, M., Corona, A., Powell, N., Stiner, T., Bailey, M., Nelson, R., Godbout, J. y Sheridan J. (2011).  $\beta$ -Adrenergic Receptor Antagonism Prevents Anxiety-Like Behavior and Microglial Reactivity Induced by Repeated Social Defeat. *The journal of neuroscience* 31(17), 6277- 6288. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0450-11.2011>