



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**EFFECTOS DE LA EPIGALOCATEQUINA-3-GALATO
SOBRE LAS ALTERACIONES NEURONALES INDUCIDAS
POR EL ESTRÉS EN EL DESARROLLO POSTNATAL
TEMPRANO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTAN

**FLORES BAZA IRENE JAZMIN
LÓPEZ RAMÍREZ ARELY MARIEL**

DIRECTOR DE TESIS:
DR. JULIO CÉSAR ROJAS CASTAÑEDA

ASESORA INTERNA:
DRA. PATRICIA ROSAS SAUCEDO

Ciudad de México 2019





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE.**

Comunico a usted que la alumna **LÓPEZ RAMÍREZ ARELY MARIEL**, con número de cuenta **309182104**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **26 de marzo de 2019** a las **09:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE** Dra. LETICIA MORALES LEDESMA
- VOCAL** Dr. JULIO CÉSAR ROJAS CASTAÑEDA*
- SECRETARIO** Dra. PATRICIA ROSAS SAUCEDO
- SUPLENTE** M. en C. CARLOS CAMILO SILVA MÉNDEZ
- SUPLENTE** Dra. ROSA LINARES CULEBRO

Moralet Ledesma Leticia
Julio Cesar Rojas
Patricia Rosas Saucedo
Carlos Camilo Silva Méndez
Rosa Linares Culebro

El título de la tesis que presenta es: **Efectos de la epigalocatequina-3-galato sobre alteraciones neuronales inducidas por el estrés en el desarrollo postnatal temprano.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad de México, a 14 de febrero de 2019

DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD
DIRECTOR
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA
DIRECCIÓN

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

José Luis Gómez Márquez
V.O. BO.
Dr. JOSÉ LUIS GÓMEZ MÁRQUEZ
JEFE DE CARRERA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que la alumna **FLORES BAZA IRENE JAZMÍN**, con número de cuenta **305296193**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **26 de marzo de 2019** a las **11:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE** Dra. LETICIA MORALES LEDESMA
- VOCAL** Dr. JULIO CÉSAR ROJAS CASTAÑEDA*
- SECRETARIO** Dra. PATRICIA ROSAS SAUCEDO
- SUPLENTE** M. en C. CARLOS CAMILO SILVA MÉNDEZ
- SUPLENTE** Dra. ROSA LINARES CULEBRO

El título de la tesis que presenta es: **Efectos de la epigalocatequina-3-galato sobre alteraciones neuronales inducidas por el estrés en el desarrollo postnatal temprano.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
 Ciudad de México, a 14 de febrero de 2019

DR. VICENTE JESUS HERNÁNDEZ ABAD
 DIRECTOR
 ZARAGOZA
 DIRECCIÓN

RECIBÍ
 OFICINA DE EXÁMENES
 PROFESIONALES Y DE GRADO

V.O. BO.
 Dr. JOSÉ LUIS GÓMEZ MÁRQUEZ
 JEFE DE CARRERA

El trabajo de investigación de esta tesis se desarrolló en el laboratorio de Biología de la Reproducción en el Instituto Nacional de Pediatría como parte de nuestros estudios de licenciatura en la carrera de Biología de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecimientos

Le agradecemos a la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la FES Zaragoza, por permitirnos concluir nuestros estudios de licenciatura.

Al Instituto Nacional de Pediatría, al laboratorio de Biología de la Reproducción por el apoyo para la realización del presente trabajo.

Al **Dr. Julio Rojas** por darnos la oportunidad de participar en este proyecto, por su paciencia, confianza y compartirnos sus conocimientos.

A los investigadores del INP

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor

Dra. Margarita Chávez Saldaña

Dr. Francisco Jiménez Trejo

Les agradecemos su apoyo, conocimientos brindados y enriquecer con sus comentarios y críticas constructivas para mejorar la tesis.

Al **Téc. Pedro Medina** por su apoyo en la elaboración y empleo de las técnicas usadas en este proyecto.

A nuestra asesora la **Dra. Paty Rosas** por su apoyo, enseñanzas, tiempo invertido, sus consejos.

A nuestro comité tutorial:

Dra. Patricia Rosas Saucedo

Dra. Leticia Morales Ledesma

Dra. Rosa Linares Culebro

Mtro. Carlos Camilo Silva Méndez

Por sus observaciones, tiempo dedicado para la revisión y enriquecimiento de este trabajo.

Irene y Arely

Dedicatorias

A nuestros amigos tortuguitos: **Ariel, Archuro, Carlitos, Javier y Yuri** por compartir tantos momentos inolvidables a lo largo de toda la carrea y esperando que nuestra amistad dure por muchos años más.

A **Dany, Faby, Fany, Luis, Silvia y Edgar** por hacer nuestra estancia en el laboratorio divertida, mantener una sana convivencia y también compartirnos de sus conocimientos.

Irene y Arely

Dedicatorias

A mis padres **Efigenia Basa** y **Lucas Flores** por su incondicional apoyo a pesar de todas las adversidades que se me presentaron a lo largo de este proceso. Agradezco su apoyo tanto emocional como económico y todas sus enseñanzas para hacerme crecer como persona y saber que no existen cosas imposibles simplemente llevan un poco más de tiempo y dedicación.

A mis hermanos **Julio** y **Toño**, por hacer mi vida más sencilla, ser unos buenos hermanos y compartir todos los valores y consejos que nuestros padres nos han compartido.

A **Christian** que ha estado a mi lado durante estos últimos años, por siempre alentarme a seguir adelante y motivarme para no darme por vencida en esto que es el principio de mi preparación como profesionalista, gracias infinitas.

A mis amiguillas **Jessica** y **Valeria** por ser como unas hermanas desde hace muchísimos años, gracias por ser mis consejeras de vida y compartir tantísimos momentos inolvidables desde nuestra inocente juventud :) .

A **Arely** mi amiga desde el principio de mi formación como bióloga, lo que nos llevó a la realización de esta tesis en conjunto. Gracias por enseñarme el sentido de la bondad, responsabilidad y paciencia.

Irene

Dedicatorias

A mis papás **Tomás López** y **Eulalia Ramírez** porque por ustedes todo fue posible y no habría llegado tan lejos. Siempre me han brindado su amor y su apoyo incondicional y no tengo palabras para agradecerles por todo lo que me han dado.

A mis hermanos **Efraín** e **Isaí**, que siempre están a mi lado brindándome su apoyo en todo momento, porque siempre han confiado en mí y también me han enseñado otra forma de ver el mundo.

A mi abuelita **Manuela** que es como mi otra mamá. Siempre me da consejos y me demuestra su gran cariño.

A mis tíos **Alejandra, Carlos, Inés, Jorge, Guadalupe** y **Ricardo** y a mis primos **Uri, Kevin** y **Kinich** que siempre creen en mí. A su manera me brindan su apoyo, me comparten experiencias de vida y siempre me ayudan a ser mejor. Se los agradezco mucho.

A mis amigos **Paulina, Itzel, Gaby, Lilia, Paubali, Alejandra** y **Juan** porque más que amigos son como mis hermanos y aunque no siempre nos podemos ver sé que están cuando más se necesita. Agradezco todos los momentos que hemos compartido.

A la **Mtra. Sandra Vazquez, Claudia Ramírez** por aparecer en mi vida y darme la oportunidad de aprender de ustedes y ayudarme a mejorar como persona.

A **Irene**, la persona que ha brindado su sincera amistad desde que empezamos este viaje por el mundo de la biología. Gracias por los momentos divertidos, las enseñanzas profesionales y de vida.

Arely

| Índice | Página |
|---|--------|
| Abreviaturas y siglas usadas | 1 |
| Resumen | 2 |
| 1. Introducción | 4 |
| 1.1. Estrés..... | 4 |
| 1.1.1 Tipos de estrés..... | 4 |
| 1.2. Depresión..... | 6 |
| 1.2.1. Clasificación de los trastornos depresivos según el Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM-V). | 8 |
| 1.3. Neurobiología del estrés y la depresión..... | 9 |
| 1.3.1 Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal..... | 9 |
| 1.3.2. Núcleo paraventricular | 10 |
| 1.3.3. Sistema límbico..... | 12 |
| 1.3.3.1. Corteza prefrontal..... | 12 |
| 1.3.3.2. Hipocampo | 15 |
| 1.4. Tratamientos y antecedentes | 17 |
| 1.4.1. Té verde | 18 |
| 2. Planteamiento del problema | 22 |
| 3. Hipótesis..... | 22 |
| 4. Objetivo general..... | 22 |
| 4.1. Objetivos particulares | 22 |
| 5. Materiales y métodos..... | 23 |
| 6. Resultados..... | 26 |
| 7. Discusión | 36 |
| 8. Conclusiones particulares..... | 39 |
| 9. Conclusión general | 39 |
| 10. Bibliografía..... | 40 |

Abreviaturas y siglas usadas

5-HT: Serotonina

ACTH: Hormona adrenocorticotrópica

AR: Receptor para andrógenos

BDNF: Factor Neurotrófico derivado del cerebro

CRH: Hormona liberadora de corticotropina

DA: Dopamina

DG: Giro dentado

DH: Hipocampo dorsal

DSM-V: Manual de diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales

EGCG: Epigallocatequina-3-galato

ER α : Receptor a estrógenos alfa

HHA: Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal

MeA: Amígdala media

mPFC: Corteza prefrontal media

mPOA: Área preóptica media

NE: Noradrenalina

OMS: Organización mundial de la salud

PFC: Corteza prefrontal

PFC-IL: Corteza prefrontal infralímbica

PFC-PL: Corteza prefrontal prelímbica

PVN: Núcleo paraventricular

SL: Sistema límbico

SM: Separación materna

VH: Hipocampo ventral

vSUB: Subiculum ventral

Resumen

El estrés durante el periodo de desarrollo temprano induce efectos adversos los cuales podrían llevar a desarrollar depresión a largo plazo. La depresión es la principal causa de discapacidad en el mundo. Algunas funciones cerebrales y endocrinas que se ven alteradas por la depresión son el incremento en la hormona liberadora de la corticotropina (CRH) y el receptor a estrógenos alfa ($ER\alpha$), así como una disminución en el receptor para andrógenos (AR) y en el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). El tratamiento farmacológico para la depresión puede resultar costoso y con efectos secundarios adversos, por lo que se requiere una búsqueda de compuestos de origen natural que puedan reducir estos efectos. La (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG) es un componente del té verde y su consumo se ha asociado con la capacidad de mitigar los síntomas de la depresión, debido al incremento del BDNF. Por lo que, el objetivo del presente estudio fue determinar si la administración de EGCG durante el estrés en el desarrollo postnatal temprano tiene un efecto neuroprotector sobre las neuronas en regiones cerebrales involucradas en el estrés y la depresión. Para ello, se desarrolló un modelo de estrés por separación materna (SM), la cual se realizó durante tres horas al día, a partir del día 4 al 14 después del parto, que se ha mostrado induce depresión a largo plazo. Se utilizaron 20 ratas macho de la cepa Wistar de 4 días de edad, distribuidas en 4 grupos: 1) Vehículo (Vh) (Sol. Salina); 2) EGCG (10 mg/kg); 3) SM (Estrés); 4) SM+EGCG. A los 14 días de edad se les practicó la eutanasia y los cerebros fueron procesados para determinar por inmunohistoquímica el número de células inmunoreactivas para el BDNF en la corteza prefrontal media (mPFC) e hipocampo y para el $ER\alpha$, el AR y la CRH en el núcleo paraventricular (PVN) y mediante ELISA se determinó la concentración de la CRH en suero. Los resultados obtenidos mostraron un incremento significativo en la concentración de corticosterona en suero en el grupo de SM+EGCG comparado con el Vh. También se observó un incremento en el número de células inmunoreactivas a la CRH en el PVN del grupo con SM, comparado con el grupo Vh, lo que confirma que el modelo de SM genera estrés.

Por otra parte, se observó una disminución significativa en el número de células inmunoreactivas al BDNF en la mPFC en el grupo de SM comparado con el grupo Vh. Sin embargo, no hay diferencia significativa entre el grupo de SM y SM+EGCG, lo que sugiere que la EGCG no tiene el efecto neuroprotector que se esperaba, ya que la SM sí está

afectando la mPFC, posiblemente debido a que se encuentra en su primera fase de maduración, por lo cual las células son más susceptibles a daños.

La administración de la EGCG en el desarrollo postnatal temprano, no disminuye las alteraciones relacionadas con el estrés, en ratas evaluadas a los 14 días de edad.

1. Introducción

1.1. Estrés

El estrés es comúnmente definido como un estado de amenaza, real o percibida, a la homeostasis. El mantenimiento de la homeostasis en la presencia de estímulos aversivos (estresores) requiere la activación de un rango complejo de respuestas que involucran a los sistemas endocrino, nervioso e inmune, colectivamente conocido como la respuesta al estrés. La activación de la respuesta al estrés inicia una serie de cambios conductuales y fisiológicos que mejoran la probabilidad de supervivencia de un individuo cuando se enfrentan a desafíos homeostáticos. Los efectos del comportamiento de la respuesta al estrés incluyen mayor conciencia, mejoría de la cognición, euforia y analgesia mejorada. Las adaptaciones fisiológicas incluyen el aumento del tono cardiovascular, la frecuencia respiratoria y el metabolismo intermedio, junto con la inhibición de las funciones vegetativas generales como la alimentación, la digestión, el crecimiento, la reproducción y la inmunidad (Mucio-Ramírez, 2007).

En un estudio de la Organización Mundial de la Salud llevado a cabo en 21 países, se reportó que más del 10% de los encuestados declaró que fueron testigos de actos de violencia, sufrieron violencia interpersonal, sufrieron accidentes, estuvieron expuestos a conflictos bélicos o sufrieron eventos traumáticos relacionados con seres queridos (OMS, 2013).

1.1.1 Tipos de estrés

Existen diferentes tipos de estrés: estrés agudo, estrés agudo episódico y estrés crónico. Cada uno cuenta con sus propias características, síntomas, duración y enfoques de tratamiento (APA, 2018).

Estrés agudo: es la forma de estrés más común. Surge de las exigencias y presiones del pasado reciente y de las exigencias y presiones anticipadas del futuro cercano. El estrés agudo en pequeñas dosis puede ser imperceptible, pero cuando es demasiado resulta agotador. Afortunadamente, la mayoría de las personas reconocen los síntomas de estrés agudo, por lo que la mayoría de las veces no llega a causar daños importantes a largo plazo (APA, 2018).

Estrés agudo episódico: lo padecen aquellas personas que tienen estrés agudo con frecuencia, estas personas suelen tener una vida muy desordenada que resulta en casos de estudios clínicos de caos y crisis. Es común que las personas con reacciones de estrés agudo episódico estén demasiado agitadas, tengan mal carácter, sean irritables, ansiosas y estén tensas. El trabajo se vuelve un lugar muy estresante para ellas (APA, 2018).

Estrés crónico: se presenta de manera constante. Surge cuando una persona nunca ve una salida a una situación deprimente. Es el estrés una de las exigencias y presiones implacables durante períodos aparentemente interminables. Sin esperanzas, la persona abandona la búsqueda de soluciones (APA, 2018)

Algunos tipos de estrés crónico provienen de experiencias traumáticas de la niñez que se interiorizaron y se mantienen dolorosas y presentes constantemente. Algunas personas llegan a una crisis nerviosa final y puede llegar a ser fatal. Debido a que los recursos físicos y mentales se ven consumidos por el desgaste a largo plazo, los síntomas del estrés crónico son difíciles de tratar y pueden requerir tratamiento médico y de conducta, así como manejo del estrés (APA, 2018).

La respuesta al estrés agudo dura desde unos pocos minutos después del comienzo del estrés hasta unos pocos días. La activación de la respuesta aguda al estrés es iniciada por varios receptores que responden a los cambios en el ambiente. Las vías aferentes para el estrés transmiten esta información al sistema nervioso central, incluido el tálamo y el hipotálamo, donde se controlan los puntos de ajuste, y al córtex para la percepción. Estas áreas activan varias vías eferentes para generar una respuesta al estímulo ambiental. La respuesta aguda al estrés es impulsada por el sistema nervioso autónomo que promueve la liberación de catecolaminas y glucocorticoides, que alteran el metabolismo y activan los factores de transcripción involucrados en la respuesta aguda (Collier et al., 2017).

La respuesta crónica al estrés es impulsada por el sistema endocrino y se asocia con poblaciones de receptores alterados, la sensibilidad del tejido a señales homeostáticas y un nuevo estado fisiológico (Collier et al., 2017). Uno de los efectos más consistentes del estrés crónico es una reducción en la ramificación y la longitud de las dendritas apicales piramidales CA3, junto con una disminución en el número de contactos

sinápticos. Se ha informado una ramificación reducida similar para las neuronas principales en la corteza prefrontal (de Kloet et al., 2005).

El estrés durante el periodo de desarrollo temprano predispone a los individuos a desordenes psiquiátricos como la ansiedad y la depresión, lo cual activa una serie de sistemas neuronales y endocrinos como el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA). Existen estructuras anatómicas que median la respuesta tanto al estrés como a la depresión, que se encuentran en el sistema nervioso central, por ejemplo la amígdala media (MeA), la corteza prefrontal media (mPFC) y el hipocampo, así como en los tejidos periféricos como la corteza de la glándula adrenal (Mucio-Ramírez, 2007).

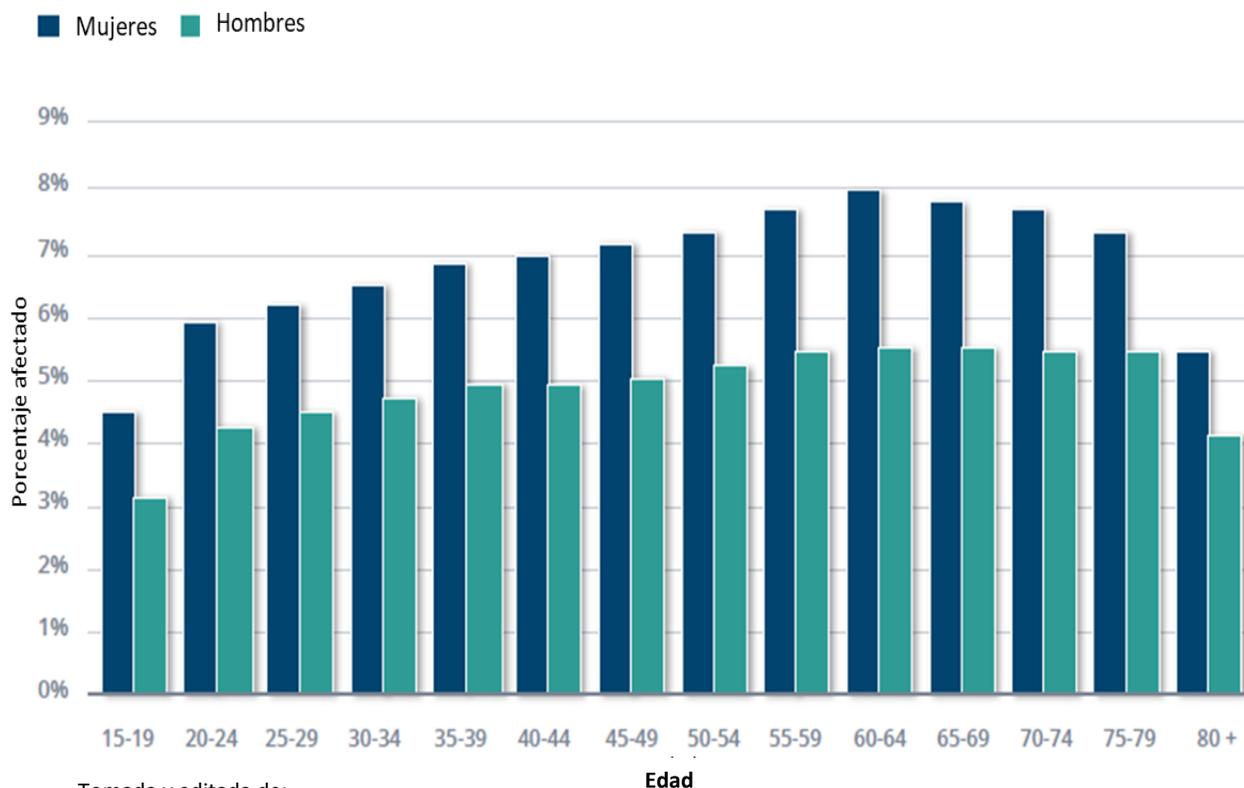
1.2. Depresión

La depresión es un trastorno mental frecuente que en el 2015 representaba la cuarta causa de discapacidad en cuanto a la pérdida de años de vida saludable y se estimaba que para el 2020 sería la segunda causa de discapacidad en el mundo. Sin embargo, para el 2017 se convirtió en la principal causa de discapacidad, afectando a más de 300 millones de personas, por lo cual representa un problema de salud pública (OMS, 2017a). La depresión produce mayor discapacidad que otras condiciones crónicas como la diabetes, los trastornos respiratorios, las enfermedades cardíacas o la artritis (Berenzon et al., 2012). Este trastorno mental se caracteriza por la presencia de 5 o más de los siguientes síntomas: tristeza, pérdida de interés o placer (anhedonia), sentimientos de culpa o falta de autoestima, trastornos del sueño o del apetito, sensación de cansancio y falta de concentración. La depresión puede llegar a hacerse crónica o recurrente y en su forma más grave puede conducir al suicidio. Las estadísticas a nivel mundial indican que cada año se suicidan cerca de 800 000 personas, siendo la segunda causa de muerte en las edades de 15 a 29 años (OMS, 2017b).

La depresión tiene una prevalencia a nivel mundial del 4.4% y es más común entre las mujeres (5.1%) que entre los hombre (3.6%). Entre los países con mayor depresión se encuentra Ucrania con una prevalencia del 6.3% de la población, seguido de Estados Unidos de América, Estonia y Australia con 5.9%, Brasil con 5.8% y México con un 4.2% (OMS, 2017a).

La prevalencia de la depresión varía por rango de edad, siendo el porcentaje más alto en la edad adulta (más del 7.5% en mujeres y más del 5.5% en hombres, entre 55-77 años). La depresión también está presente en niños y adolescentes de menos de 15 años, pero en un nivel más bajo que los grupos de edad adulta (OMS, 2017b) (Tabla 1). En niños de 6 a 12 años en Estados Unidos de América existe una prevalencia del 2%, mientras que en adolescentes de 13 a 18 años de edad es del 3% al 8% (Costello et al., 1996).

Tabla 1. Prevalencia global de desórdenes depresivos, por edad y sexo (%)



Tomada y editada de:
OMS, 2017.

Sin embargo, en México, la depresión es un importante caso de estudio ya que varios autores han reportado estadísticas muy diferidas del trastorno de la depresión. La Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica señaló que el 9.2% de la población sufrieron o sufrirán un trastorno afectivo en algún momento de su vida (Berenzon et al., 2012). Por otra parte, la Encuesta Nacional de Hogares en México realizada en 2015, estimó que de 95.1 millones de personas de más de 12 años, el 29.9% ha sentido depresión en algún momento (INEGI, 2015).

La depresión en México ocurre con mayor frecuencia entre las mujeres (10.4% de la población de mujeres) que entre los hombres (5.4% de la población de hombres) (Berenzon et al., 2012), mientras que la Encuesta Nacional de Hogares indica que el 34% de las mujeres y el 25.1% de los hombres manifestaron haber sentido depresión (INEGI, 2015).

En México se tienen muy pocos datos de depresión en niños, se ha reportado que el 16% de niños de 8 a 13 años de edad están en riesgo de desarrollar depresión (Gallegos et al., 2013). En adolescentes (12 a 17 años de edad) la depresión tiene una prevalencia de 7.6% en mujeres y 2.0% en hombres (Benjet et al., 2009).

1.2.1. Clasificación de los trastornos depresivos según el Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM-V).

Según el DSM-V (2013) los trastornos depresivos son una perturbación de las funciones psíquicas y del estado del ánimo, el trastorno de depresión mayor (incluye el episodio depresivo mayor), el trastorno depresivo mayor persistente (distimia), el trastorno disfórico premenstrual, el trastorno depresivo inducido por una sustancia/medicamento, el trastorno depresivo debido a otra afección médica, otro trastorno depresivo especificado y otro trastorno depresivo no especificado.

En la depresión están involucradas varias estructuras anatómicas y diversas vías nerviosas, lo que sugiere la participación de una cantidad considerable de factores. Se han identificado varias regiones cerebrales encargadas de regular las funciones de emotividad, recompensa y ejecución. Entre las regiones más estudiadas están la PFC, el hipocampo y la MeA (Sequeira y Fornaguera, 2009).

En pacientes con depresión, el eje HHA se hiperactiva, al igual que las neuronas que sintetizan la hormona liberadora de corticotropina (CRH) presentes en el núcleo paraventricular (PVN) (Sequeira y Fornaguera, 2009). También hay expresión del receptor a estrógenos alfa (ER α) y una disminución del receptor para andrógenos (AR) en el PVN (Wu et al., 2017).

1.3. Neurobiología del estrés y la depresión

1.3.1 Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal

Los principales efectores de la respuesta de estrés se localizan en el PVN del hipotálamo, la adenohipófisis y la corteza de la glándula adrenal. El conjunto de estas estructuras se conoce comúnmente como el eje HHA (Fig. 1).

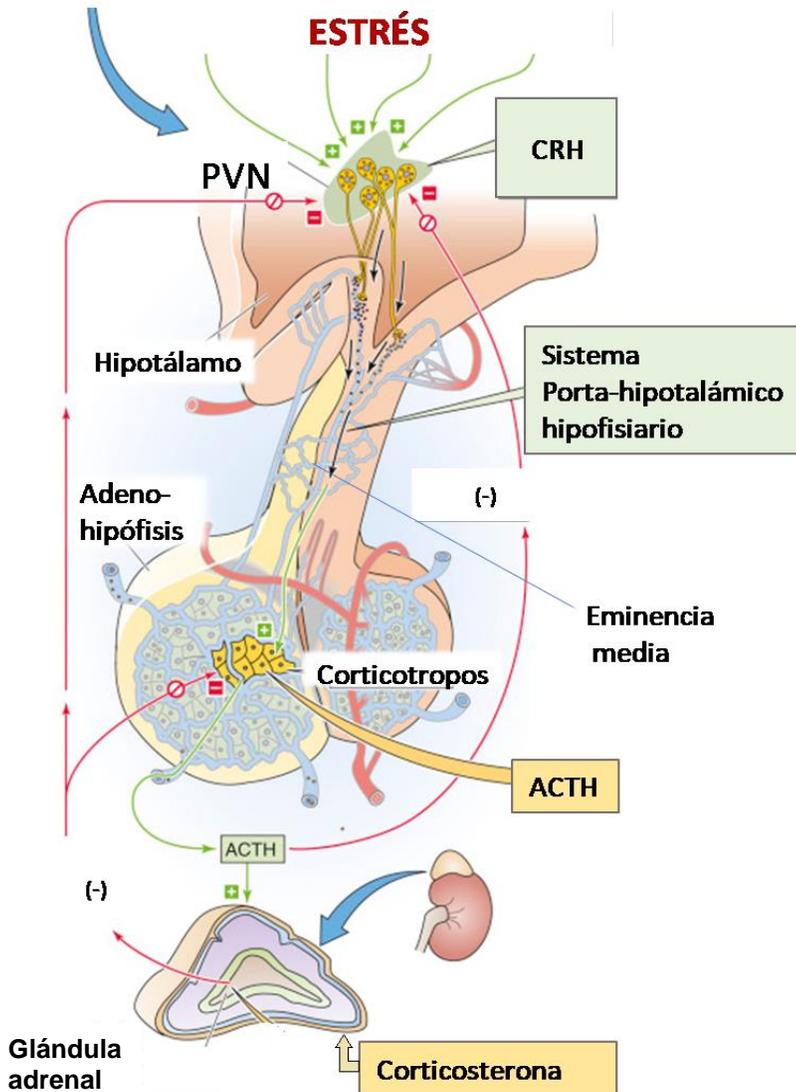


Figura 1. Eje Hipotálamo - Hipófisis-Adrenal (Tomada y editada de Barret, 2017).

Las neuronas del PVN (división medial parvocelular) mandan sus proyecciones a la porción externa de la eminencia media en donde se libera la CRH que es importante en la respuesta al estrés al regular al eje HHA. Las células blanco de la CRH son los corticotropos de la adenohipófisis que a la síntesis y liberación de la hormona adenocorticotropica (ACTH), la cual viaja a través del sistema circulatorio estimula y culmina con la liberación de glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en roedores) en la corteza adrenal. La inhibición por retroalimentación de los glucocorticoides contribuye decisivamente a regular la magnitud y la duración de su liberación.

Los glucocorticoides regulan la actividad del eje HHA, y también su propia síntesis por mecanismos de retroalimentación negativa, que son mediados por los receptores de glucocorticoides, los cuales son principalmente activados cuando la concentración de glucocorticoides es elevada (durante la respuesta al estrés). Los receptores a glucocorticoides son expresados en la porción parvocelular media del PVN y está colocalizado con los receptores de CRH, colocándolo en posición principal para controlar la salida de las mismas neuronas que activan el eje HHA (Herman y Tasker, 2016). Los glucocorticoides actúan a nivel de la glándula hipofisiaria inhibiendo la liberación de ACTH y a nivel del PVN donde inhiben la síntesis y liberación de CRH. Además, los glucocorticoides regulan indirectamente la actividad del eje HHA mediante la modulación de otras estructuras límbicas cerebrales, incluyendo el hipotálamo, la amígdala y la corteza prefrontal (PFC), que a su vez regulan la actividad del PVN (Spiga et al., 2014) (Fig.1).

1.3.2. Núcleo paraventricular

El PVN desempeña un papel en la integración de las actividades motoras neuroendocrinas, autónomas y somáticas para mantener la homeostasis en respuesta a los desafíos ambientales internos y externos (Biag et al., 2012). El PVN es una de las principales estructuras relacionadas con la activación del eje HHA en respuesta al estrés. Se localiza en el área hipotalámica dorsal y constituye aproximadamente el 1% del cerebro, que se encuentra abajo y anterior al tálamo (Fig.2) (Hendelman, 2006).

Las neuronas en el PNV se forman en el día embrionario 13-15 (E13-15) pero se logran distinguir claramente hasta el día E16-E18 (Altman y Bayer, 1978). En la rata, las neuronas en el PVN se dividen en tres categorías principales: 1) las neuronas neuroendocrinas magnocelulares envían sus axones directamente al lóbulo posterior de la hipófisis (neurohipófisis) y secretan vasopresina u oxitocina en el sistema circulatorio; 2) Las neuronas neuroendocrinas parvocelulares sintetizan y secretan una variedad de hormonas liberadoras o inhibidoras. Por ejemplo, la CRH, la hormona liberadora de tirotrópina y la somatostatina, todas estas hormonas son liberadas en el sistema porta hipofisiario para el transporte al lóbulo anterior de la hipófisis (adenohipófisis) para regular la síntesis y la liberación de las hormonas (Biag et al., 2012).

La actividad del PVN es regulada por el sistema límbico (SL) por medio de señales excitatorias del área prelímbica de la mPFC (mPFC-PL) e inhibitorias del hipocampo a través del subiculum ventral (vSUB), que disminuye la activación del eje HHA (Herman y Tasker, 2016).

1.3.3. Sistema límbico

El término límbico es casi un sinónimo de cerebro emocional. El SL fue relacionado con un papel importante en la experiencia de la emoción a principios del año 1930. En 1937, James Papez describió el “sistema de emoción”, una vía principal del SL, conectando un grupo de estructuras que rodean el tronco cerebral (el giro cingulado, hipocampo, hipotálamo y el núcleo del tálamo anterior). Entendió este circuito como una vía funcional de comunicación entre las estructuras anteriores que permiten el control cortical de la emoción, así como en el almacenamiento de la memoria (Hendelman, 2006).

El SL controla en gran parte las respuestas de estrés que implica la participación de centros subcorticales como la amígdala e hipocampo y otros corticales como la mPFC (Sánchez-Navarro y Román, 2004), que en una primera instancia son inconscientes, pero que al ser procesadas por áreas corticales determinan en conjunto una valoración subjetiva consciente de la experiencia (Vales, 2012).

En este sistema el hipocampo, la PFC y la amígdala tienen una estimulación bastante limitada hacia el PVN, por lo cual la regulación del eje HHA por esas estructuras requiere de intermediarios sinápticos. Se han mostrado conexiones a un gran número de regiones subcorticales (hipocampo a través del vSUB), esas regiones límbicas trabajan en paralelo para influenciar la activación del eje HHA, y probablemente desempeñan funciones similares en las respuestas autonómicas al estrés (Herman, 2012).

1.3.3.1. Corteza prefrontal

La PFC se encuentra anterior al área premotora y al área primaria motora de la corteza frontal (Fig.3), un área está implicada en la planificación de acciones motrices complejas y la otra regula el movimiento consciente, respectivamente. La PFC tiene una función "heteromodal", integrando información sensorimotora compleja con motivación y afecto (Palazidou, 2012).

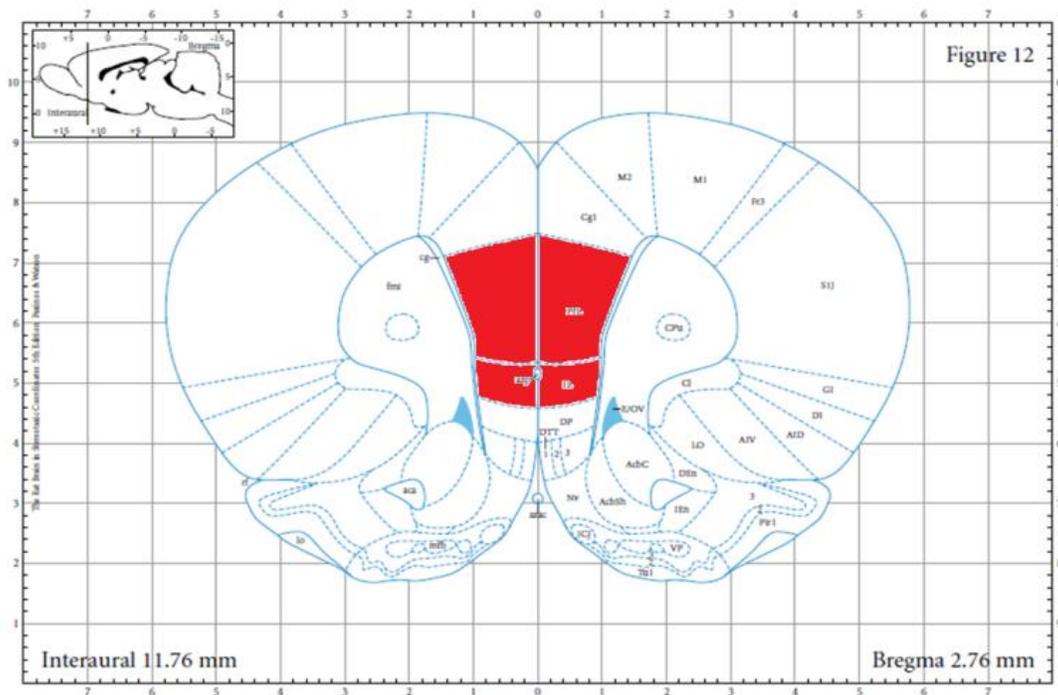


Figura 3. Diagrama del atlas estereotaxico de Paxinos y Watson (2004), donde se muestra en rojo la corteza prefrontal media (mPFC); figura 12, coordenadas Bregma 2.76 mm.

En humanos, la PFC se desarrolla durante los primeros años de vida hasta la adolescencia tardía, donde existe el punto más alto de impulsividad asociado a la regulación de los aspectos emocionales. Este es uno de los motivos por los cuales las experiencias infantiles moldean este sistema inhibitorio en formación, también explican las diferencias en cuanto a la regulación emocional de un niño con respecto a un adulto (Vales, 2012). En la rata, la PFC está en constante desarrollo hasta el día 90 después del parto. Eden y Uylings (1985) describen tres fases en el desarrollo de la PFC; la primer fase es del día 1 al 18 después del parto, la cual consiste principalmente en la diferenciación de neuronas y la formación de las capas corticales. La segunda fase va del día 18 al 30 después del parto y únicamente ocurren cambios en el volumen y la tercera fase se lleva a cabo del día 30 al 90 después del parto, en esta fase se presenta una extensión en las dendritas neuronales presentes y es aquí donde comienza la maduración funcional de la PFC en la rata.

La mPFC tiene un papel complejo en la regulación del estrés. Todas las divisiones de la PFC en roedores son ampliamente activadas por el estrés agudo. Sin embargo, las consecuencias fisiológicas de la activación del estrés pueden variar según la región. La división mPFC-PL es importante en la inhibición del estrés ya que diversos estudios han mostrado que daños en esta región prolongan la respuesta del eje HHA a estresores psicogénicos agudos (restricción), mientras la estimulación inhibe la respuesta al estrés. La mPFC parece ser un sitio para la retroalimentación de los glucocorticoides en respuesta a la activación del eje HHA, se ha observado que los implantes locales de glucocorticoides inhiben la respuesta anticipatoria al estrés. Por el contrario, las lesiones dirigidas a la parte infralimbica de la mPFC (mPFC-IL) tienen un efecto fisiológico diferente. Daños a la mPFC-IL disminuye la respuesta autonómica a estresores psicogénicos. Así, las regiones PL e IL de la mPFC parecen tener efectos opuestos en la respuesta al estrés (Herman, 2012).

Los efectos diferenciales de las regiones mPFC-PL y mPFC-IL en el sistema de estrés pueden reflejar su marcada divergencia. La mPFC-PL tiene aferencias de las vías relacionadas con la recompensa, incluyendo el núcleo accumbens, la amígdala basolateral y el núcleo del lecho de la estría terminal posterior, el cual está relacionado con la inhibición del eje HHA. En contraste, la PFC-IL tiene muchas interconexiones con regiones involucradas en la regulación autonómica de la amígdala, el núcleo del tracto solitario, el lecho de la estría terminal anteroventral y el hipotálamo dorsomedial. Por lo tanto, es probable que el efecto negativo de la activación de la PFC por el estrés es debido a una integración subcortical con estructuras como el vSUB para la salida de las señales de las regiones PL e IL (Herman, 2012; Herman y Tasker, 2016).

Se ha reportado, tanto en modelos animales (Castrén y Kojima, 2017) como en pacientes con depresión, (Karege et al., 2005) muerte neuronal en el hipocampo, disminución del número de células en la PFC (Duman et al., 2000) y una disminución en la concentración en suero del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Karege et al., 2005). Por otra parte, el tratamiento a largo plazo con antidepresivos induce un aumento en las concentraciones del ARNm del BDNF, en la PFC e hipocampo, incrementando la plasticidad sináptica y promoviendo la sobrevivencia neuronal (Nibuya et al., 1995). Además, se ha observado que la administración intracerebral del BDNF en un modelo de depresión en ratas tiene efectos conductuales antidepresivos (Siuciak et al., 1997).

El BDNF es una neurotrofina sintetizada como una proteína precursora (pro-BDNF) que es procesada proteolíticamente en una forma madura de BDNF (mBDNF) por proteasas intracelulares y/o extracelulares, principalmente por la proproteína convertasa PC7, y extracelularmente por metaloproteinasas y plasmina (Castrén y Kojima, 2017). El BDNF promueve la proliferación y diferenciación neuronal, tiene una función antiapoptótica, en la regulación de la morfología sináptica, en la transmisión de la información y plasticidad sináptica en el aprendizaje y la memoria, mejorando así los síntomas de la depresión (Cai et al., 2015; Wang et al., 2015). Por lo cual, se ha propuesto la teoría neurotrófica de la depresión, la cual argumenta que concentraciones bajas de factores neurotróficos como el BDNF incrementan la vulnerabilidad de las células nerviosas en estructuras límbicas como el hipocampo y la PFC al estrés (Ménard et al., 2016).

1.3.3.2. Hipocampo

El hipocampo forma parte del prosencéfalo, ubicado en el lóbulo medial temporal y desempeña un papel primordial en las funciones ejecutivas (procesos que asocian ideas, movimientos y acciones simples y los orientan a la solución de conductas complejas), por ejemplo, la transformación de la memoria a corto plazo en memoria a largo plazo (Fig.4) (Meisenzahl et al., 2010).

El hipocampo se divide en dos subregiones: hipocampo dorsal (DH) y el hipocampo ventral (VH), los cuales presentan distintas conexiones anatómicas, patrones de expresión génica y funcionalidad de comportamiento (conducta). Diversos estudios han propuesto que la actividad del DH está relacionada con la memoria y el aprendizaje, mientras que el VH podría relacionarse con la regulación de las respuestas neuroendocrinas y del comportamiento al estrés (Diniz et al., 2016).

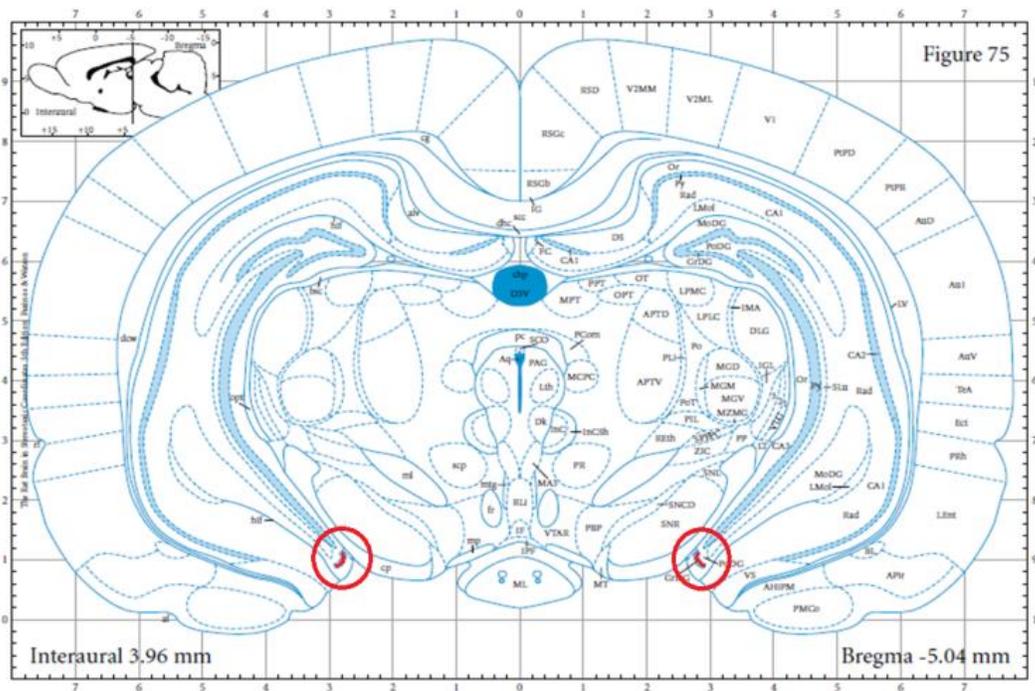


Figura 4. Diagrama del atlas estereotaxico de Paxinos y Watson (2004), donde se muestra en rojo el giro dentado del hipocampo ventral (VH); figura 75, coordenadas Bregma -5.04 mm.

El hipocampo es una de las principales zonas de producción de nuevas neuronas a partir de las células progenitoras neurales ubicadas en el giro dentado (DG) (Tannenholz et al., 2014). En la ratona el 4% de las células del DG se forma prenatalmente y el 13% se agrega durante la primera semana post natal, el 64% se forma entre el día 8 al 16 después del parto, mientras que el 19% se forma después del día 16 postnatal (Bayer y Altman, 1974). La producción de neuronas es regulada por los estados cognitivo y emocional del animal. Intervenciones tales como el aprendizaje, enriquecimiento ambiental, ejercicio y tratamientos antidepresivos incrementan la neurogénesis hipocampal adulta, mientras que intervenciones negativas como el aumento en la concentración de glucocorticoides, el aislamiento social y el estrés crónico, llevan a su disminución. Los efectos de comportamiento de algunos antidepresivos, son modulados por la estimulación de la neurogénesis en el hipocampo (Tannenholz et al., 2014):

En los pacientes con trastorno depresivo mayor, el incremento en la neurogénesis inducido por antidepresivos se localiza en el VH en roedores. Estudios en ratones muestran una proliferación celular y neurogénesis disminuida en el DG ventral, que se invierte por el tratamiento crónico de antidepresivos (Tannenholz et al., 2014).

La mayoría de los modelos de estrés disminuyen la neurogénesis del adulto y también disminuyen la expresión de BDNF. Sin embargo, el papel del BDNF en la regulación de la neurogénesis es compleja. La infusión de BDNF en los ventrículos laterales aumenta la neurogénesis en varias regiones cerebrales, pero no en el hipocampo, posiblemente debido a tasa de difusión al hipocampo (Ménard et al., 2016).

Un resumen de estudios realizado por Duman y Monteggia (2006) muestra que muchos tipos de estrés agudo (estrés único) y crónico (7 a 21 días) disminuyen la expresión de BDNF en el hipocampo.

Los principales centros de salida de información del hipocampo en la parte ventral son el CA1 y vSUB (Tannenholz et al., 2014). El vSUB envía proyecciones excitatorias a numerosas regiones subcorticales incluyendo la BNST posterior, la región peri-PVN (incluyendo la zona sub paraventricular, mPOA y región ventrolateral del núcleo hipotalámico dorsomedial) los cuales envían proyecciones GABAérgicas al PVN que inhiben al eje HHA (Herman, 2012).

En pacientes con depresión se ha observado una disminución en el volumen de la PFC y el hipocampo, así como la reducción de la neurogénesis provocada por el estrés en roedores (Cástren y Rantamäki, 2010).

1.4. Tratamientos y antecedentes

Aunque hay diversos tratamientos para la depresión, más de la mitad de los afectados en todo el mundo (más del 90% en algunos países) no son tratados (OMS, 2017b). Los profesionales pueden ofrecer tratamientos psicológicos, como la activación conductual, la terapia cognitiva conductual y la psicoterapia interpersonal, o medicamentos antidepresivos como los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina [(5-HT) fluoxetina, citalopram, escitalopram]] y los antidepresivos tricíclicos (amitriptilina, imipramina, clomipramina) o una combinación de ambos (OMS, 2009). Los psiquiatras deben tener presentes los posibles efectos adversos de los antidepresivos, las posibilidades de llevar a cabo uno u otro tipo de tratamiento (por disponibilidad de conocimientos técnicos o de la complejidad del procedimiento) y las preferencias individuales (OMS, 2017a).

En la actualidad, el entendimiento de la depresión se basa en la deficiencia de monoaminas [5HT, noradrenalina (NE) y dopamina (DA)] (Cai et al., 2015). Los antidepresivos bloquean la recaptura de las monoaminas al inhibir sus transportadores, de esta forma incrementan la concentración de éstas en la hendidura sináptica. Además, se ha reportado que diferentes clases de antidepresivos incrementan significativamente la expresión del BDNF en el hipocampo y en la PFC (Duman y Monteggia, 2006).

En México, menos del 20% de las personas que presentan un trastorno afectivo buscan algún tipo de ayuda, y se estima que quienes lo hacen tardan hasta 14 años en llegar a un tratamiento especializado. En este sentido, México es una de las naciones que muestra mayor retraso en la búsqueda de atención. Aunado a lo anterior, cuando los pacientes acceden a los servicios de salud, solo el 50% de ellos reciben algún tipo de tratamiento mínimo adecuado, es decir, de por lo menos cuatro sesiones de psicoterapia y, en el caso de prescripción de psicotrópicos, al menos dos visitas con el médico o psiquiatra y tratamiento con los fármacos por algún periodo (Berenzon et al., 2012). Los tratamientos actuales son medicamentos sintéticos que pueden producir efectos secundarios no deseados [neurológicos, cardiovasculares, sexuales, etc. (Arranz y Doménech, 2011)] por lo que el uso de agentes de fuentes naturales para su tratamiento como los polifenoles del té verde (*Camellia sinensis*) es una alternativa.

1.4.1. Té verde

El té es una bebida muy popular y es la más consumida después del agua, aproximadamente un 76-78% del té que se consume en el mundo es negro, un 22% es té verde y menos de un 2% es té oolong (Valenzuela, 2004).

El té verde se obtiene de la planta *Camellia sinensis* (familia Theaceae) que es un arbusto o árbol perenne de 1-12 m. Tiene una raíz principal, hojas verdes de elíptica a oblonga de 4 a 15 cm de longitud y flores axilares (6-8 pétalos), solitarias o hasta 3 en un racimo de 2.5-3.5 cm de diámetro de color blanco amarillento. La planta de té verde se corta para fines de cultivo a máximo dos metros de altura (Fig. 5) (Palacio et al., 2013; Keller et al., 2011).



Figura 5. *Camellia Sinensis*

Cuando las hojas son obtenidas en este momento y no se realizan procesos de oxidación y fermentación se logra extraer té verde. Si se exponen por largo tiempo al sol y al aire después de haber sido maceradas, se obtiene té negro, debido a la oxidación que se genera por la exposición al ambiente. Por el contrario, si se aplica una oxidación más corta que la del té negro, se puede extraer el té Oolong (Palacio et al., 2013).

El té verde está constituido por polifenoles también conocidos como catequinas (Tabla 2), los cuales representan el 30% del peso seco de las hojas y son importantes ya que contribuyen a sus efectos benéficos. Los polifenoles del té verde incluyen principalmente la epigallocatequina-3-galato (EGCG), epigallocatequina (EGC), epicatequina-3-galato (ECG), y la epicatequina (EC) (Zhu et al., 2012). La EGCG es el componente activo más abundante y representa del 30-50% del total de las catequinas (Zhao et al., 2017).

Tabla 2. Componentes del té verde. Tomada y editada de Gramza-Michalowska et al., 2016

| Contenido de catequinas en hojas de té verde | |
|---|---|
| Componente | Contenido (mg/1g de hojas secas) |
| | Té verde |
| EC | 2.77 ± 0.03 |
| GC | 1.23 ± 0.05 |
| C | 0.01 ± 0.002 |
| EGC | 9.68 ± 0.4 |
| ECG | 4.22 ± 0.12 |
| EGCG | 21.88 ± 0.51 |
| Catequinas totales | 40.86 ± 0.33 |

Los valores son las medias de tres determinaciones ± error estándar. catequina (C); epicatequina (EC); galocatequina (GC); epicatequina galato (ECG); epigallocatequina (EGC); y epigallocatequina-3-galato (EGCG).

El té verde es conocido por sus beneficios a la salud, incluyendo propiedades antimutagénicas, antioxidantes, prevención para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y del sistema nervioso, cáncer, aceleración del metabolismo, fuerte actividad bactericida (Gramza-Michalowska et al., 2016), antiestresante y también se han propuesto efectos neuroprotectores (Zhu et al., 2012).

Se ha observado que los polifenoles del té verde, particularmente la EGCG, muestra efectos neuroprotectores/neurorestaurativos en contra de diversas lesiones cerebrales, incluyendo algunas enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y el Alzheimer (Weinreb et al, 2004), lesiones cerebrales por isquemia reperusión y daños neuronales inducidos por agentes tóxicos [6-hidroxidopamina, beta amiloide y especies reactivas de oxígeno (Levites et al., 2002, 2003; Mandel et al., 2004)].

En la administración oral, los polifenoles del té verde pueden pasar a través de la barrera hematoencefalica para ejercer efectos neuroprotectores (Zhao et al., 2017). La EGCG protege a las neuronas a través de muchos mecanismos, que incluyen la eliminación de radicales libres, la quelación de metales de transición y la modulación de los genes de supervivencia/muerte celular y las vías de transducción celular (Mandel et al., 2006; Weinreb et al., 2009). La EGCG tiene una vida media aproximada de 3 h (Mereles y Hunstein, 2011).

Estudios realizados por Zhu y colaboradores (2012) observaron los efectos de la administración oral del té verde en ratones sanos (con peso entre 18-22g). Administraron 5, 10 o 20 mg/kg de peso corporal de polifenoles del té verde por 7 días y evaluaron la prueba de nado forzado, prueba de suspensión de cola y actividad locomotora en campo abierto, como indicadores de la depresión, también midieron concentraciones en suero de corticosterona y ACTH. Observaron una disminución significativa en la inmovilidad en la prueba de nado forzado y en la prueba de suspensión de cola, y no observaron alteraciones en la actividad locomotora en el campo abierto. Los polifenoles del té verde también redujeron las concentraciones séricas de corticosterona y ACTH en ratones expuestos a la prueba de nado forzado. Por lo tanto este estudio demostró que los polifenoles del té verde ejercen efectos similares a los antidepresivos en modelos de conducta de depresión en el ratón, y el mecanismo puede implicar la inhibición del eje HHA.

Dwivedi y colaboradores (2003) analizaron la expresión del ARNm del BDNF y su receptor TrkB en la PFC e hipocampo en personas que se suicidaron, y observaron que su expresión disminuyó de manera significativa en comparación con sujetos control. Estas reducciones se asociaron con disminuciones significativas en las concentraciones de proteína de BDNF y dada su importancia en las funciones fisiológicas como la supervivencia celular y la plasticidad sináptica, sugieren que estas moléculas pueden

desempeñar un papel importante en los aspectos fisiopatológicos del comportamiento suicida que en la gran mayoría de los casos está relacionado a conductas depresivas.

Tian y colaboradores (2013) reportaron en ratas hembras adultas (250-300 g), el efecto neuroprotector de la EGCG sobre una lesión en la médula espinal, para la cual se realizó una laminectomía en la 10^a vértebra torácica y se les dejó caer 10 g de peso desde una altura de 4 cm. Se les administraron 10 o 20 mg/kg de EGCG después de la lesión en la médula espinal y cuatro semanas después de la lesión analizaron por inmunohistoquímica el BDNF en la médula. Observaron un incremento en la expresión del BDNF y del factor neurotrófico derivado de células gliales, demostrando que el tratamiento con EGCG reduce significativamente la pérdida de mielina, mejora la expresión de los factores neurotróficos BDNF y el factor neurotrófico derivado de células gliales, protege contra la apoptosis celular y en última instancia, mejora la función locomotora.

Lee y colaboradores (2018) reportaron en ratas macho (200-220 g), el efecto neuroprotector de la EGCG sobre las alteraciones por un único evento de estrés prolongado, el cual consistió en controlar a las ratas por 120 min y posteriormente las sometieron a una prueba de nado forzado por 20 min. Al día 1 después del estrés prolongado administraron 5, 10 o 25 mg/kg de peso corporal de EGCG durante 14 días. 15 días después del estrés prolongado se les realizó la prueba de reconocimiento de objeto y la de campo abierto y a los 16 días se colocaron en el laberinto acuático de Morris. Se sacrificaron a los 21 días después del estrés prolongado y observaron que las ratas tratadas con EGCG disminuyeron las alteraciones en el aprendizaje, memoria y previene la disminución del BDNF.

2. Planteamiento del problema

El estrés es el principal factor que desencadena la depresión, la cual se ha convertido en la primera causa de discapacidad en el mundo. Sin embargo, no se le da la importancia debida, ya que menos del 20% de las personas con depresión buscan ayuda y solo la mitad recibe un tratamiento adecuado. Los medicamentos farmacológicos pueden producir efectos no deseados, por lo que el uso de agentes naturales, como el té verde, se han utilizado como una alternativa para el tratamiento de la depresión.

El té verde es la bebida más consumida por su gran cantidad de efectos benéficos. Existen diversos estudios sobre el efecto de sus componentes, principalmente de la EGCG. Sin embargo la mayoría de los estudios sobre los efectos del estrés en edades tempranas se han evaluado en la edad adulta, por lo cual se decidió analizar si estas alteraciones se pueden prevenir por el tratamiento con EGCG desde la edad temprana.

3. Hipótesis

El BDNF es un factor de protección neuronal que disminuye ante estímulos estresantes y resulta en alteraciones neuronales. La administración de EGCG induce un aumento del BDNF, entonces en un modelo de estrés, inducido por SM durante el desarrollo postnatal temprano en ratas, la administración de EGCG inducirá un incremento del BDNF y por lo tanto disminuirá las alteraciones en regiones cerebrales relacionadas con el estrés.

4. Objetivo general

Evaluar los efectos de la administración de EGCG sobre alteraciones en regiones cerebrales relacionadas con el estrés, en un modelo de estrés por SM del día 4 al 14 después del parto.

4.1. Objetivos particulares

Analizar, en la rata macho de 14 días de edad, el efecto de la administración de la EGCG sobre:

- a) La concentración de corticosterona en suero.
- b) El número de células inmunoreactivas al BDNF en la mPFC e hipocampo ventral.
- c) El número de células inmunoreactivas a la CRH, al ER α y al AR en el PVN.

5. Materiales y métodos

Población. Se utilizaron 12 ratas hembra primíparas de (250-275 g) y cuatro machos (300-350 g) de la cepa Wistar, que fueron adquiridos de la compañía Envigo, ciudad de México, México. El manejo y cuidado de los animales se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Diario Oficial 22 de agosto de 2001 y el reglamento interno del Instituto Nacional de Pediatría.

Obtención de animales. Las ratas se colocaron a aparear en un sistema poligámico de tres hembras por cada macho, durante una semana. Una semana antes de la fecha de parto programada, las madres gestantes se alojaron de manera individual. Todos los animales tuvieron libre acceso al agua y alimento (LabDiet 5000[®]; PMI Nutrition International, Inc., Brentwood, MO, USA) y se mantuvieron bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 h (luces encendidas a las 10:00 y apagadas a las 22:00), temperatura de 21 °C ± 1 °C y humedad relativa de 52 ± 10%.

El día del nacimiento fue asignado como el día cero. Se colocaron en un contenedor y se asignaron de una manera aleatoria a las madres. El objetivo de este procedimiento es incrementar la homogeneidad de la población. El tamaño de la camada se ajustó a 8 crías, tratando de mantener el mayor número de machos posible pero siempre con al menos una cría hembra, para asegurar una nutrición adecuada hasta el destete (día 21 después del parto). Únicamente fueron empleadas las crías macho en el presente protocolo a las hembras de todos los grupos se les practicó la eutanasia al destete mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (Pisabental, Atitalaquia, Hidalgo, México) vía intraperitoneal.

Grupos experimentales. A los 4 días de edad, las madres y sus camadas fueron separadas en forma aleatoria en 4 grupos (3 camadas por grupo): 1) Vehículo (Vh): Se inyectó solución salina vía subcutánea (3 ml/kg); 2) EGCG (10 mg/kg); 3) Separación materna (SM); 4) SM+EGCG. La administración de EGCG fue realizada 30 minutos antes de separar a las crías de la madre.

Preparación de la EGCG. Se administró en una concentración de 10 mg/kg. Para esto se diluyó 1.5 mg de EGCG (Cayman Chemical, Michigan, EUA) en 10 ml de solución salina, de la cual se inyectó un volumen de 3 ml/kg.

Procedimiento de separación materna. Cada una de las camadas fue removida del nido y se colocó en una caja de plástico con viruta limpia. Las crías fueron aisladas en un contenedor manteniéndolas a 32°C con un cojín eléctrico (Boufleur et. al., 2013). La SM se realizó tres horas al día (con un inicio y término entre las 8:00 y las 12:00 h), al término de éste periodo las crías fueron retornadas a su caja original, en donde se encontraba su madre. Este procedimiento fue realizado desde el día 4 al 14 después del parto. Este periodo fue elegido a causa de que las crías de ratas presentan una respuesta adrenocortical reducida al estrés conocida como periodo de baja respuesta al estrés. Se cree que esta respuesta neuroendocrina interrumpida (ausencia de liberación de ACTH y corticosterona) se origina por un incremento en el receptor a glucocorticoides, una condición mediada por la retroalimentación negativa a nivel del cerebro (hipocampo, hipotálamo e hipófisis). Esto asegura una baja estable en la concentración de corticoides que parece ser óptimo para el desarrollo neuronal. La SM periódica (180 minutos) es un potente estresor que activa la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal aún durante el periodo de baja respuesta al estrés (Lajud et al., 2012).

A los 14 días de edad, una hora después del término de la SM (Veenema y Neumann, 2009), cinco ratas de cada grupo fueron seleccionadas de manera aleatoria y bajo anestesia profunda se le realizó punción cardiaca. La sangre extraída se centrifugó a 2500 rpm por 11 minutos para obtener el suero y analizar la cantidad de corticosterona por medio de un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Enzo, Corticosterone ELISA kit, Farmingdale, NY).

Posteriormente para el lavado vascular, el animal fue perfundido vía intracardiaca con solución salina fisiológica (NaCl 0.9%), seguida por paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos salino (PBS; 0.1 M, pH 7.4) para la fijación *in situ*. Inmediatamente fue disecado el cerebro y postfijado por 18 h con el mismo tipo de fijador. Este procedimiento fue realizado alternando un animal de cada grupo, entre las 13:00 y las 14:00 h. A continuación los cerebros fueron lavados con PBS 0.1M (3 X 1 h) y crioprottegidos en soluciones graduales de sacarosa al 15 y 30% (hasta que el órgano descendió al fondo del contenedor). Se obtuvieron secciones coronales de 40 µm de grosor con un criostato (CM1850; Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemania) del PVN (Bregma: -1.80), hipocampo ventral (Bregma: -5.04) y de la región media de la PFC (Bregma: 2.76), que fueron empleadas para las técnicas de inmunohistoquímica. Para identificar de

manera correcta las secciones de tejido con las áreas cerebrales deseadas, éstas fueron identificadas con el atlas estereotáxico de la rata (Paxinos y Watson, 2004).

Se emplearon dos secciones de tejido de cada región, para cada anticuerpo y por cada animal para la técnica inmunohistoquímica en cortes histológicos en libre flotación. Las secciones del PVN fueron incubadas con anticuerpo primario contra el AR y el ER α (policlonales contra conejo, Santa Cruz Biotechnology, 1:50), y contra CRH (policlonal contra cabra, Santa Cruz Biotechnology, 1:50). Las secciones de mPFC e hipocampo fueron incubadas con anticuerpo policlonal de conejo contra el BDNF (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, EUA; 1:50). Posteriormente se incubaron con anticuerpo secundario biotinilado contra conejo (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, EUA; 1:200) y cabra (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, EUA; 1:200) respectivamente y finalmente revelados con diaminobencidina (Biocare Medical, California, EUA).

Las células inmunoreactivas para cada uno de los receptores fueron contadas manualmente por una sola persona. Los resultados fueron analizados con el programa estadístico GraphPad Prism (versión 6.01, San Diego, California) y se expresaron como la mediana \pm el rango intercuartil del número de células inmunoreactivas para CRH, AR, ER α , BDNF y la concentración de corticosterona. Fueron comparados por medio de la prueba de Kruskal Wallis, seguido de la prueba de Dunn, con una $p < 0.05$ considerada como significativa.

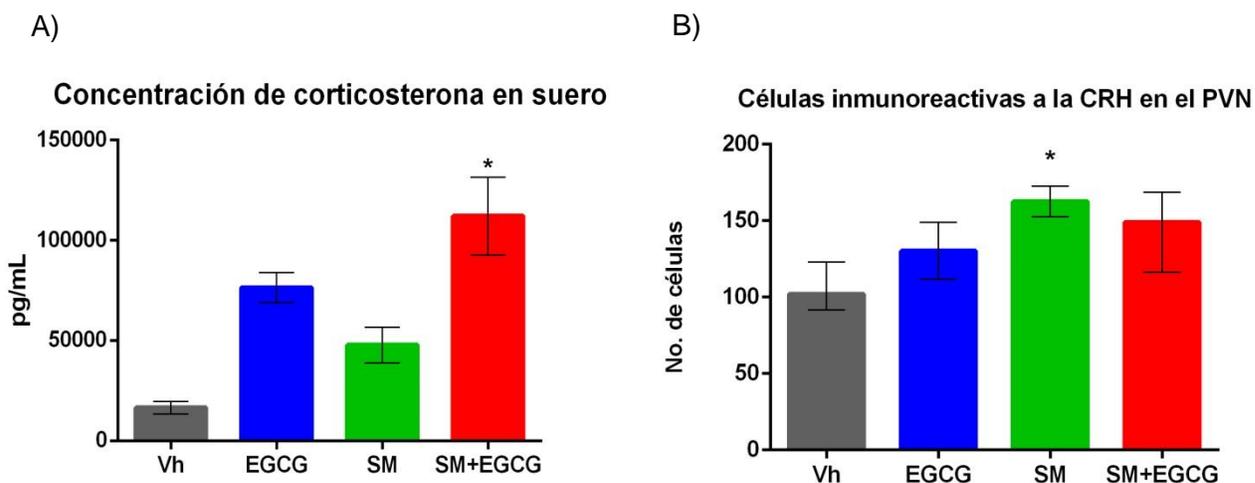
6. Resultados

Corticosterona en suero

El grupo de SM+EGCG presentó un incremento significativo en comparación con el Vh, considerando una $p < 0.05$ (gráfica 1A).

Número de células inmunoreactivas a la CRH en el PVN

El número de células inmunoreactivas a la CRH en el PVN presentó un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en el grupo de SM con respecto al grupo Vh (gráfica 1B).



Gráfica 1. Efecto de la administración de epigallocatequina-3-galato (EGCG) en el estrés temprano, inducido por SM sobre A) la concentración de corticosterona en suero y B) El número de células inmunoreactivas a la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en el núcleo paraventricular (PVN) hipotalámico en $40\ 000\ \mu\text{m}^2$. Los datos son expresados como la mediana \pm el rango intercuartil de 5 animales por grupo. Diferencia estadística significativa, * $p < 0.05$ vs el grupo Vh. Vh: Vehículo, EGCG: epigallocatequina-3-galato, SM: separación materna.

Células inmunoreactivas a la CRH en el PVN

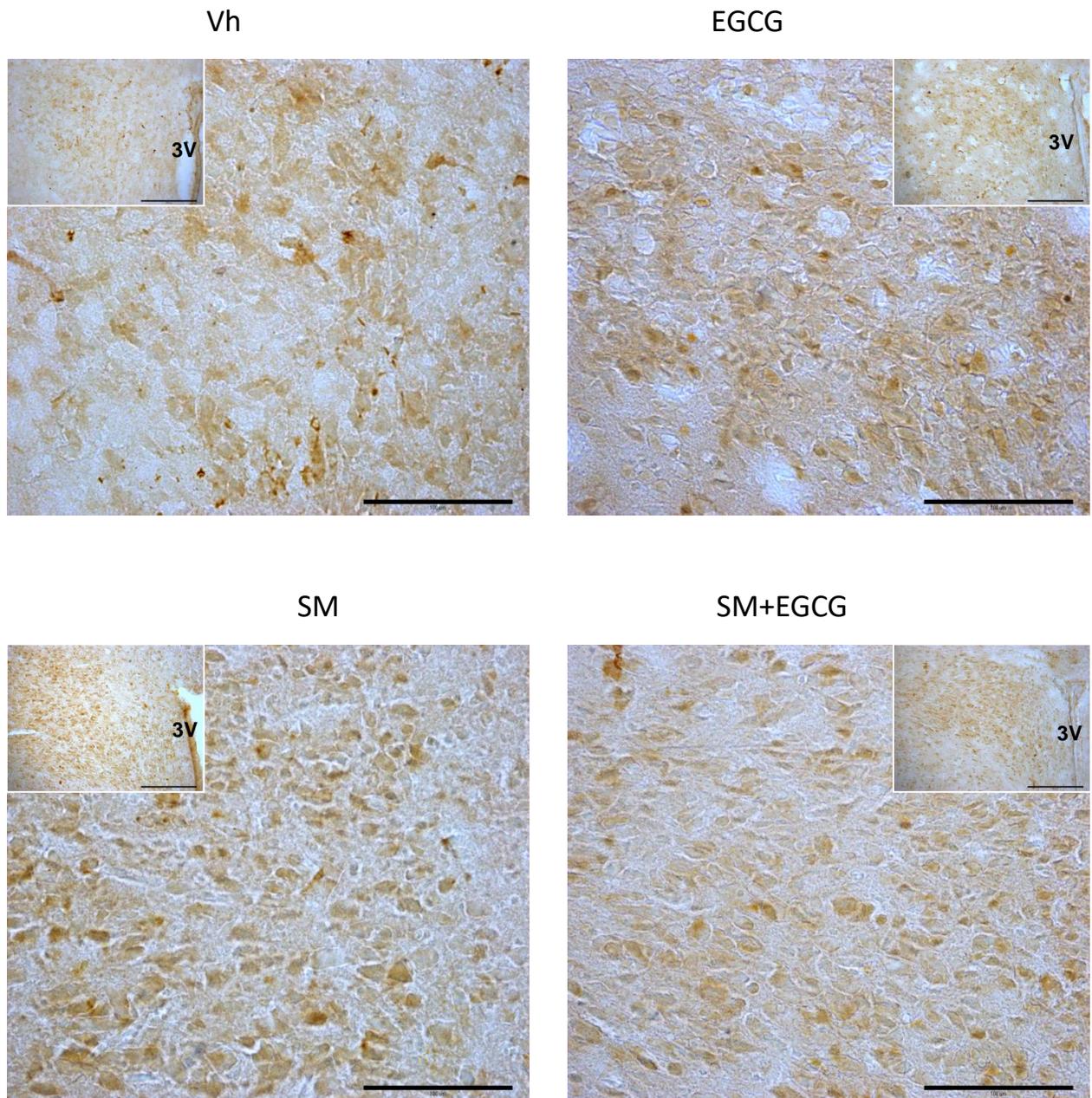
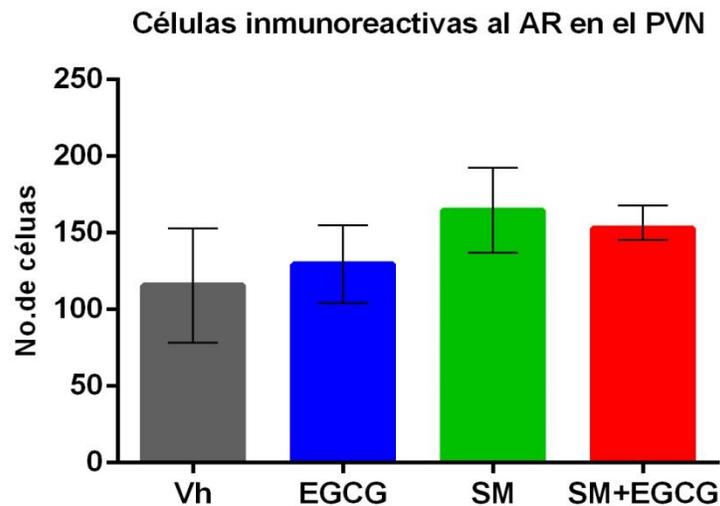


Figura 6. Imágenes de células inmunoreactivas a la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en secciones coronales de 40 μm de grosor del núcleo paraventricular (PVN) hipotalámico. Barras de calibración: 100 μm (400x), inserto: 200 μm (200x). Vh: Vehículo, EGCG: epigallocatequina-3-galato, SM: separación materna, 3V: tercer ventrículo.

Número de células inmunoreactivas al AR en el PVN

El número de células inmunoreactivas al AR no presentó diferencia estadística significativa entre los grupos. La distribución celular fue similar en los diferentes grupos, obteniendo una $p > 0.05$ (gráfica 2).



Gráfica 2. Efecto de la administración de epigalocatequina-3-galato (EGCG) en el estrés temprano, inducido por la SM sobre el número de células inmunoreactivas al receptor de andrógenos (AR) en el núcleo paraventricular (PVN) hipotalámico en $40\,000\ \mu\text{m}^2$. Los resultados son expresados como la mediana \pm el rango intercuartil de 5 animales por grupo. Vh: Vehículo, EGCG: epigalocatequina-3-galato, SM: separación materna.

Células inmunoreactivas al AR en el PVN

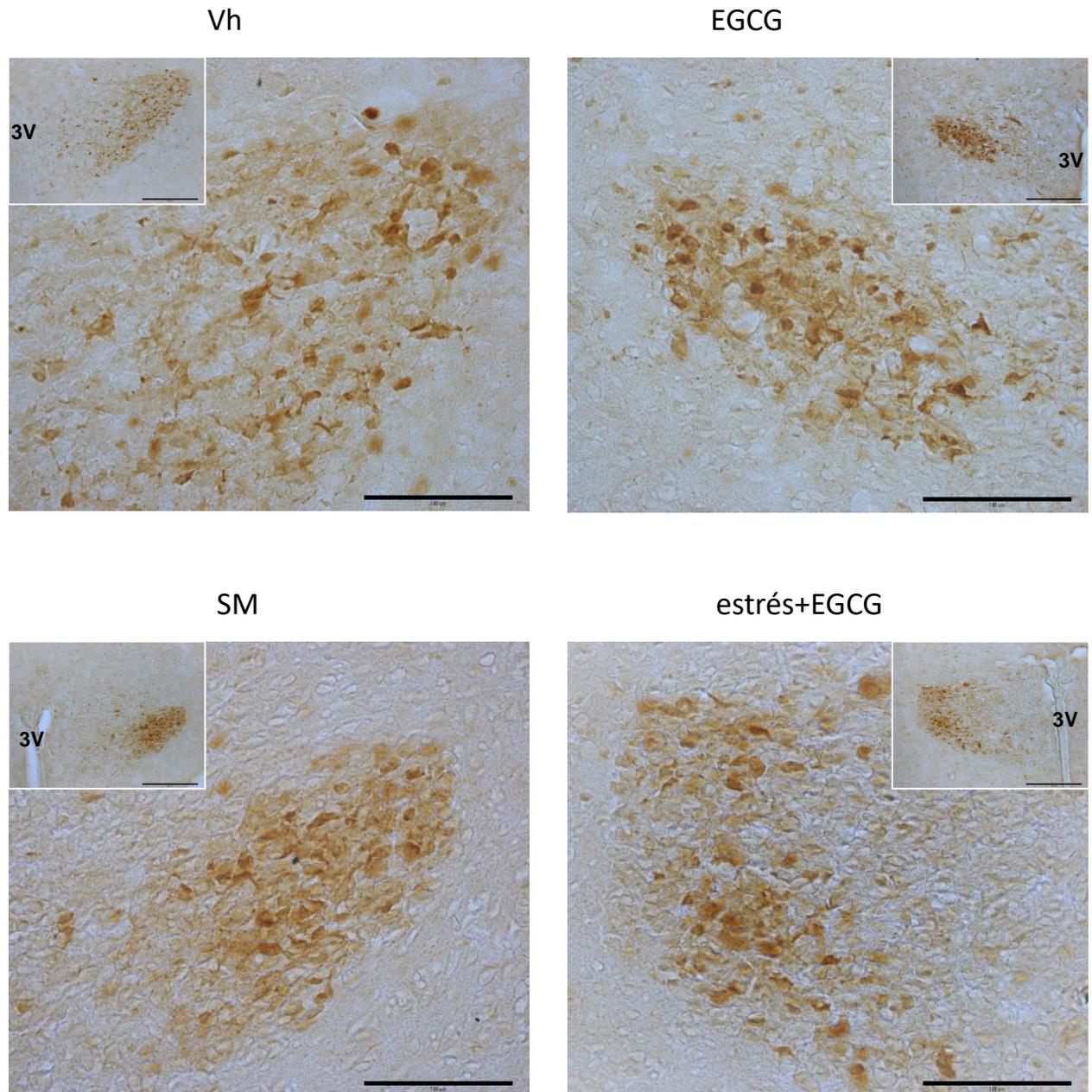
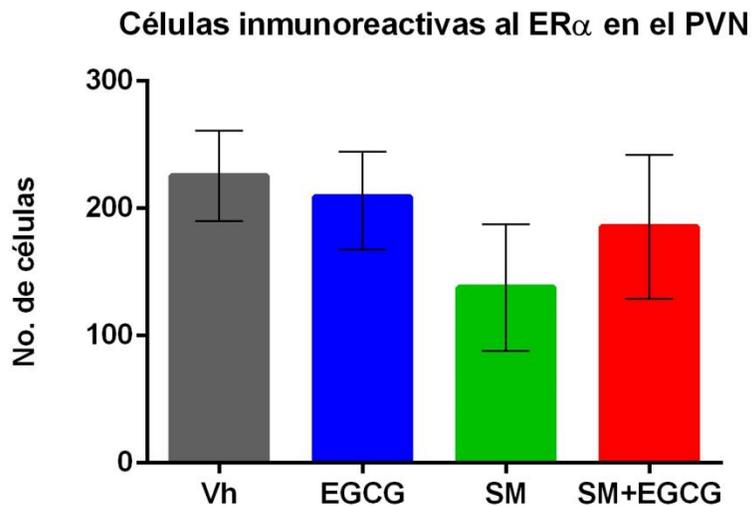


Figura 7. Imágenes de células inmunoreactivas al receptor a andrógenos en secciones coronales de 40µm de grosor del núcleo paraventricular (PVN) hipotalámico. Barras de calibración: 100 µm (400x), inserto: 200 µm (200x). Vh: Vehículo, EGCG: epigallocatequina-3-galato, SM: separación materna, 3V: tercer ventrículo.

Número de células inmunoreactivas al ER α en el PVN

El número de células inmunoreactivas al ER α no mostró diferencia significativa entre los grupos, obteniendo una $p > 0.05$ (gráfica 3).



Gráfica 3. Efecto de la administración de epigallocatequina-3-galato (EGCG) en el estrés temprano, inducido por SM sobre el número de células en $40\,000\ \mu\text{m}^2$ de secciones de tejido inmunoreactivo al receptor de estrógenos alfa (ER α) en el núcleo paraventricular (PVN) hipotalámico. Los resultados son expresados como la mediana \pm el rango intercuartil de 5 animales por grupo. Vh: Vehículo, EGCG: epigallocatequina-3-galato, SM: separación materna.

Células inmunoreactivas al ER α en el PVN

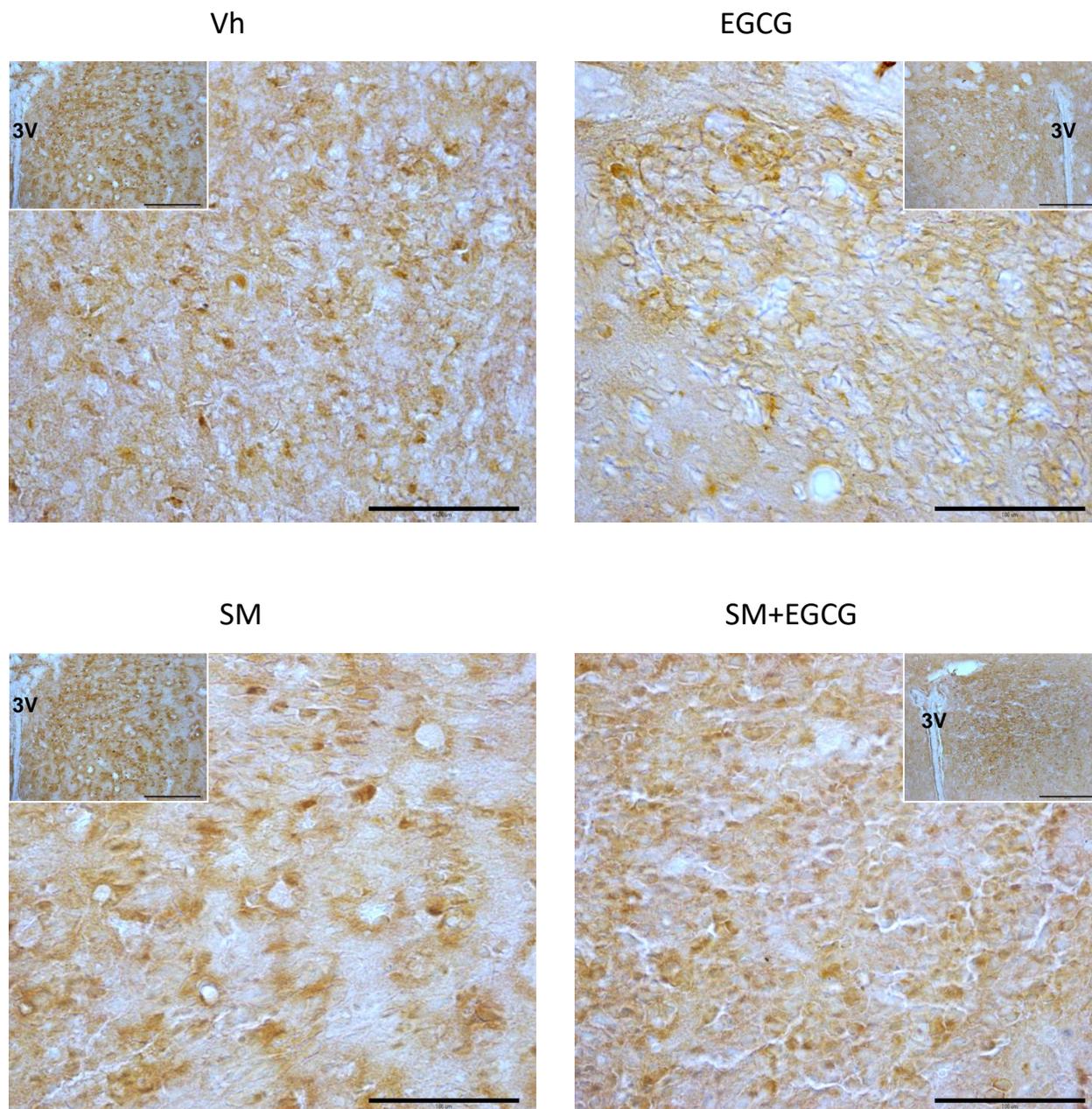
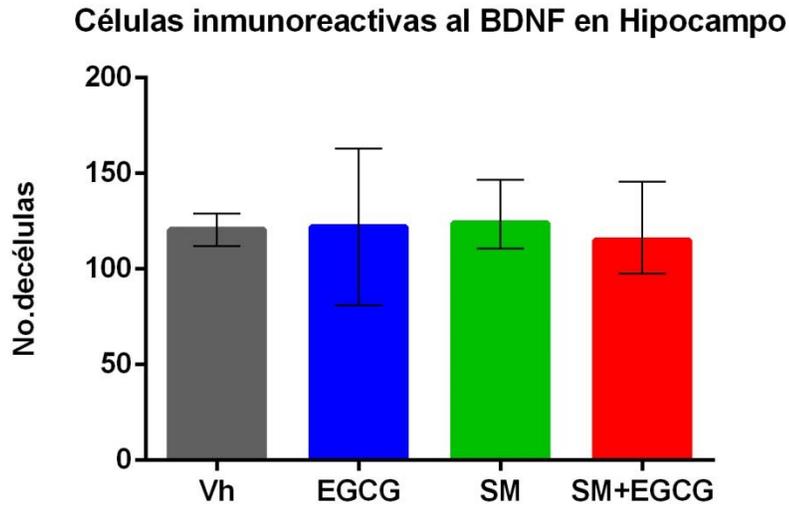


Figura 8. Imágenes de células inmunoreactivas al receptor a estrógenos alfa (ER α) en secciones coronales de 40 μ m de grosor del núcleo paraventricular (PVN) hipotalámico (400x). Barras de calibración: 100 μ m, inserto: 200 μ m (200x). Vh: Vehículo, EGCG: epigallocatequina-3-galato, SM: separación materna, 3V: tercer ventrículo.

Número de células inmunoreactivas al BDNF en Hipocampo

En la gráfica 4 se muestra el número de células inmunoreactivas al BDNF, en la cual no se observó diferencia estadística significativa entre los grupos, obteniendo una $p > 0.05$.



Gráfica 4. Efecto de la administración de epigallocatequina-3-galato (EGCG) en el estrés temprano, inducido por SM sobre el número de células inmunoreactivas al factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en $40\,000\ \mu\text{m}^2$ en el hipocampo ventral. Los resultados son expresados como la mediana \pm el rango intercuartil de 5 animales por grupo. Vh: Vehículo, EGCG: epigallocatequina-3-galato, SM: separación materna.

Células inmunoreactivas al BDNF en Hipocampo

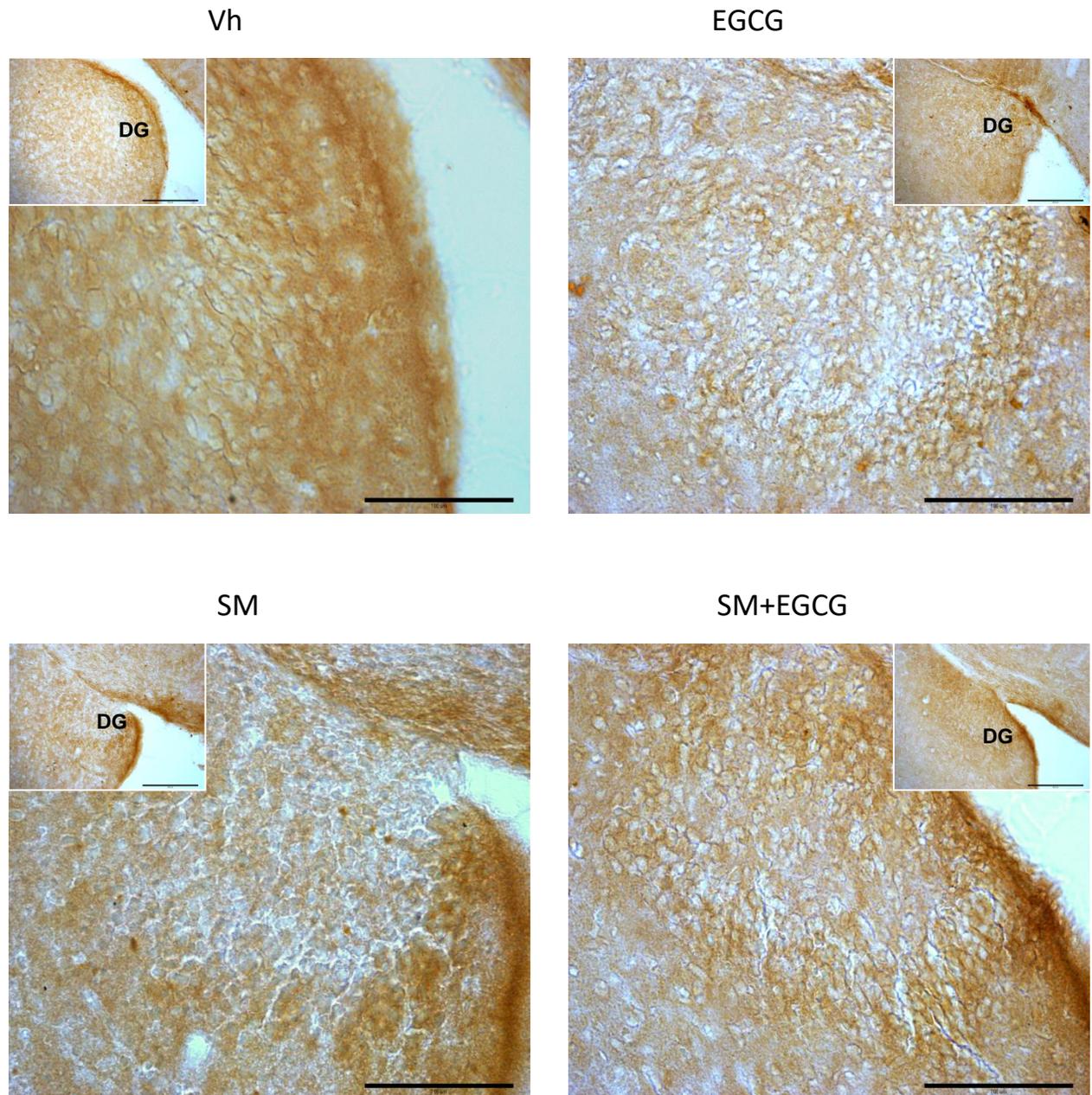
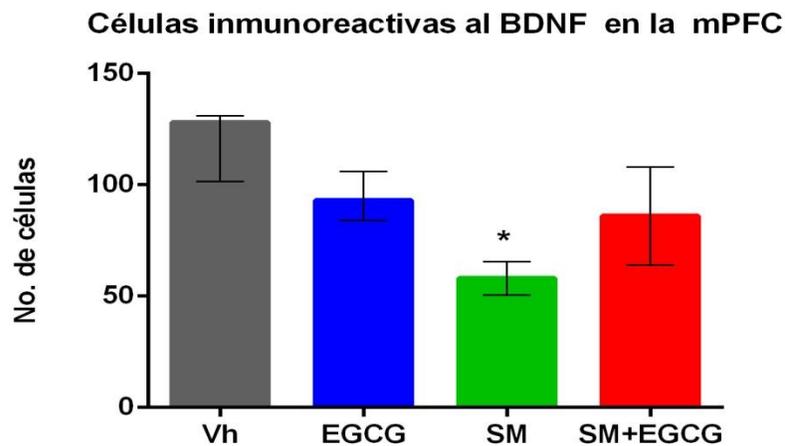


Figura 9. Imágenes de células inmunoreactivas al factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en secciones coronales de 40 μm de grosor del hipocampo ventral. Barras de calibración: 100 μm (400x), inserto: 200 μm (200x). Vh: Vehículo, EGCG: epigallocatequina-3-galato, SM: separación materna, DG: giro dentado.

Número de células inmunoreactivas al BDNF en la mPFC

El número de células inmunoreactivas al BDNF en la mPFC del grupo con SM fue significativamente menor respecto al grupo Vh y al EGCG, considerando una $p < 0.05$ (gráfica 5).



Gráfica 5. Efecto de la administración de epigallocatequina-3-galato (EGCG) en el estrés temprano, inducido por la SM sobre el número de células en $40\ 000\ \mu\text{m}^2$ de secciones de tejido inmunoreactivo al factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en la corteza prefrontal media (mPFC). Los resultados son expresados como la mediana \pm el rango intercuartil de 5 animales por grupo. Diferencia estadística significativa, * $p < 0.05$ vs Vh. Vh: Vehículo, EGCG: epigallocatequina-3-galato, SM: separación materna.

Células inmunoreactivas al BDNF en la mPFC

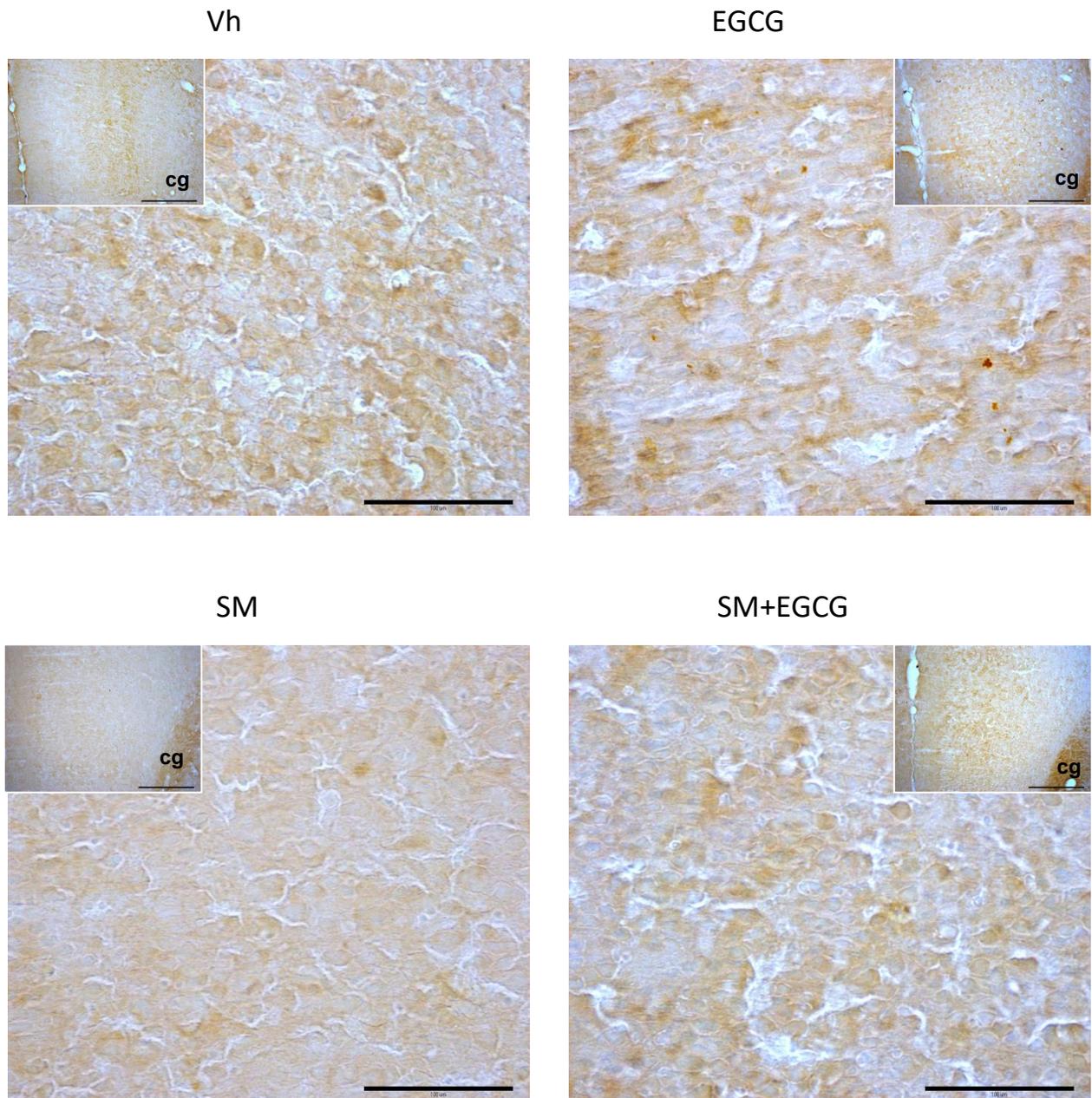


Figura 10. Imágenes de células inmunoreactivas al factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en secciones coronales de 40 µm de grosor de la corteza prefrontal media (mPFC) (400x). Barras de calibración: 100 µm, inserto: 200 µm (100x). Vh: Vehículo, EGCG: epigallocatequina-3-galato, SM: separación materna, cg: cíngulo.

7. Discusión

Diversos estudios han mostrado que eventos estresantes en la vida temprana incrementan el riesgo de desarrollar enfermedades neuropsiquiátricas a largo plazo como la depresión y la ansiedad.

Durante el neurodesarrollo, es importante la interacción madre-cría ya que es una fuente importante de estimulación sensitiva, motora y afectiva para la cría, la cual está relacionada con la maduración de los circuitos neuronales. Por lo que, la SM es un estresor que altera la ontogenia cerebral (Dueñas et al., 2017).

En nuestro estudio no se observó un incremento en la concentración de corticosterona en suero en el grupo con SM comparado con el Vh, este resultado fue contrario a lo esperado. Veenema y Neumann (2009), quienes realizaron SM del día 1 al 14 después del parto, observaron un incremento en la concentración de corticosterona al igual que lo observaron Marais y colaboradores (2008). Estas diferencias podrían deberse a que nuestro estudio se evaluó a los 14 días de edad, resultado de un probable enmascaramiento por los cambios hormonales, como sucede en algunas hormonas. Por ejemplo, existe una disminución de hormonas, como la CRH, vasopresina y somatostatina del último día de gestación al día 1 de nacimiento, a partir del cual hay un incremento gradual en la concentración de estas hormonas hasta el día 15 (Emanuel et al., 1989).

Observamos que la combinación de la SM con la EGCG indujo un incremento en la concentración de corticosterona comparado con el grupo Vh, esto es contrario a lo esperado, pero podría estar relacionado a que en las ratas de 14 días de edad la EGCG les ayudó a mantenerse en un estado de alerta, que incluye la liberación de adrenalina de la médula adrenal, y esta hormona causa un estado de excitación o de alerta en el organismo, permitiéndole responder a desafíos posteriores (Joseph-Bravo y de Gortari, 2007). Este estado de alerta parece estar presente únicamente a los 14 días de edad, ya que se ha observado que en ratas adultas la EGCG ayuda a disminuir la concentración de corticosterona. Chen y colaboradores (2010) observaron una disminución de corticosterona en ratas adultas estresadas por restricción de movimiento, y administradas vía intragástrica con polifenoles del té verde o con EGCG, en comparación con el grupo de estrés. Adachi y colaboradores (2006) realizaron un estudio con polluelos, los cuales fueron sometidos a estrés por separación social y posteriormente inyectados con EGCG y también observaron una disminución en la concentración de corticosterona en suero, este

grupo de investigadores concluye que la EGCG podría tener un efecto sobre el eje HHA, atenuando la liberación de corticosterona. La diferencia de estos autores con nuestro estudio puede ser la edad en la que fueron evaluadas las ratas, debido a los cambios hormonales que presentan.

También los resultados del presente estudio mostraron un incremento significativo en el número de células inmunoreactivas a la CRH en el PVN. Bao y colaboradores (2005) observaron un incremento del número de células inmunoreactivas a la CRH en el PVN en humanos con estrés. Esto nos indica que el modelo de SM sí generó estrés.

Con base en lo anterior podemos decir que el efecto de la administración de EGCG no se refleja a nivel hipotalámico, ya que no se observaron diferencias en el número de células inmunoreactivas a la CRH. La EGCG provoca un incremento de corticosterona en suero, lo que indica que el efecto podría ser a nivel hipofisario o adrenal.

En el PVN se expresan los AR y ER α , los cuales han sido relacionados con el estrés. Los andrógenos contribuyen a los trastornos del estado del ánimo. La baja concentración de testosterona es un indicador de depresión y ansiedad (He, 2014).

Los andrógenos y estrógenos desempeñan un papel importante en la conducta relacionada con la ansiedad y la depresión al actuar a través de sus receptores en diversas áreas cerebrales que responden al estrés. Se ha reportado en el ratón que la exposición prenatal a etanol produce una conducta de ansiedad sin cambios en el número de AR en el PVN en el sujeto adulto (He, 2014) mientras que el estrés prenatal produce un decremento del número de células inmunoreactivas al AR en el mPOA y la MeA (He et al., 2015).

Se sabe que los estrógenos son reguladores del estado del ánimo en humanos y animales y se ha demostrado que la activación del ER puede influir en las respuestas del eje HHA al estrés y el efecto potenciador de este eje se debe al ER α . Estudios sugieren que este receptor podría alterar el sistema de retroalimentación negativa mediado por glucocorticoides para modular la actividad del eje HHA (Weiser y Handa, 2009).

Se ha reportado en ratones que el estrés prenatal induce conducta de ansiedad en el sujeto adulto, con un incremento en el número de células inmunoreactivas al ER α (He et al., 2015). En nuestro estudio no encontramos diferencias significativas en el número de células inmunoreactivas al AR y al ER α en el PVN, lo que sugiere que nuestros animales no presentaban ansiedad.

El BDNF es miembro de la familia de las neurotrofinas el cual ejerce una amplia gama de funciones, como mantenimiento de la supervivencia neuronal, estructura, crecimiento y diferenciación y promoción de la plasticidad sináptica para el aprendizaje y la memoria. El BDNF ha sido implicado en mecanismos relacionados con desordenes psiquiátricos. Existen diversos estudios del efecto de la SM sobre BDNF, sin embargo, son inconsistentes. Por ejemplo, se ha observado que la SM del día 2 al 14 después del parto por 180 minutos al día aumenta la concentración de BDNF en hipocampo de ratas adultas expuestas a un evento estresante posterior (Greisen et al., 2005; Faure et al., 2007), también se ha encontrado que en la SM del día 2 al 6 después del parto por 5 horas al día disminuye la concentración del BDNF en la PFC, hipocampo y estriado en el ratón adulto (Ognibene et al., 2008) o en un protocolo de SM del día 1 al 10 después del parto por 180 min en la fase de luz no se observó ningún cambio en la concentración de BDNF en la mPFC e Hipocampo en ratas adultas (Réus et al., 2011). Estas diferencias en la concentración del BDNF pueden deberse a los distintos procedimientos experimentales llevados a cabo por cada uno de esos estudios (Wang et al., 2015).

Nuestros resultados para el número de células inmunoreactivas al BDNF en Hipocampo no mostraron diferencia significativa en las ratas de 14 días de edad, esto podría deberse a que la mayoría de las neuronas aparece después del nacimiento, el hipocampo no es funcional sino hasta las 2-3 semanas de vida (Edgin y Nadel, 2017), por lo cual en el día 14 de edad no se lograron ver alteraciones por el estrés ni por la administración de la EGCG. Este resultado coincide con Ohta y colaboradores (2017), quienes tampoco observaron alteraciones en la concentración del BDNF el día 14 después del parto en ratas con SM por 3 horas dos veces al día, sin embargo, en los 7 y 10 días después del parto sí observaron una disminución de este factor en las ratas estresadas comparadas con el grupo control, pero en el día 21 observaron un incremento en el grupo de SM, comparado con el control. Este grupo de investigadores justifica este aumento como una respuesta compensatoria del animal ante el estímulo estresante.

El BDNF también está presente en la PFC y se sabe que esta área del cerebro controla varios aspectos de la regulación cognitivo-emocional-conductual (Chang et al., 2018).

Para el número de células inmunoreactivas al BDNF en la mPFC únicamente se observó una disminución significativa en el grupo de SM comparado con el grupo Vh, lo cual indica que efectivamente el estrés provoca un daño en las neuronas que sintetizan BDNF en la mPFC. Esto puede ser debido a que la PFC se encuentra en constante maduración desde los primeros días postnatales hasta la edad adulta (Eden y Uylings, 1985). El procedimiento de SM en nuestro modelo experimental se llevó a cabo durante la primera fase de maduración de la PFC que va del día 1 al 18 después del parto, en la cual predomina la diferenciación neuronal (Eden y Uylings, 1985), por lo que se encuentra en mayor susceptibilidad al estrés.

Para poder esclarecer nuestros resultados sería importante tomar en cuenta a los animales que pudieron desarrollar resiliencia al estrés, por lo que sería necesario incrementar el número de animales para tratar de eliminar la variación que generan estos sujetos experimentales.

8. Conclusiones particulares

- La administración de la EGCG incrementa la concentración de corticosterona en animales sometidos a estrés.
- La administración de la EGCG en el desarrollo postnatal temprano no alteró el número de células inmunoreactivas a la CRH, al AR ni al ER α en el PVN. De la misma manera ocurre para el BDNF en el hipocampo ventral y mPFC.

9. Conclusión general

La administración de la EGCG en el desarrollo postnatal temprano, no disminuye las alteraciones relacionadas con el estrés, en ratas evaluadas a los 14 días de edad.

10. Bibliografía

- Adachi, N., Tomonaga, S., Tachibana, T., Denbow, D.M. & Furuse, M. (2006) (-)-Epigallocatechin gallate attenuates acute stress responses through GABAergic system in the brain. *European Journal of Pharmacology*, 531, 171-175.
- Altman, J. & Bayer, S. A. (1978). Development of the diencephalon in the rat. 11. Correlation of the embryonic development of the hypothalamus with the time of origin of its neurons. *The journal of comparative neurology*, 182 (5), 973-993.
- APA. (2018). <http://www.apa.org/centrodeapoyo/tipos.aspx>
- Arranz, E. F. & Doménech, B. J. (2011). Antidepresivos. Zarranz, J. J. (ed). Neurofarmacología Contemporánea. (1ª edición) Foletra S.A. Barcelona, España, pp. 219-246.
- Barrett, E. J. (2017). The Adrenal Gland. Boron, W. F. & Boulpaep, E. L. (ed). Medical physiology. (3ª edición) Elsevier. Philadelphia, PA, pp 1018-1034.
- Bao, A. M., Hestiantoro, A., Van Someren, E. J., Swaab, D. F. & Zhou, J. N. (2005). Colocalization of corticotropin-releasing hormone and oestrogen receptor- α in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in mood disorders. *Brain: a journal of neurology*, 128, 1301-1313.
- Bayer, S. A. & Altman, J. (1974). Hippocampal Development in the Rat: Cytogenesis and Morphogenesis Examined with Autoradiography and Low-level X-irradiation. *The journal of comparative neurology*. 158 (1), 55-79.
- Benjet, C., Borges, G., Medina-Mora, M., Méndez, E., Fleiz, C., Rojas, E. & Cruz, C. (2009). Diferencias de sexo en la prevalencia y severidad de trastornos psiquiátricos en adolescentes en la Ciudad de México. *Salud mental*, 31, 155-163.
- Berenzon, S., Lara, M., Robles, R., & Medina-Mora, M. (2012). Depresión: estado del conocimiento y la necesidad de políticas públicas y planes de acción en México. *Salud pública de México*, (55), 74-80.
- Biag, J., Huang, Y., Gou, L., Hintiryan, H., Askarinam, A., Hahn, J. D., Toga, A. W. & Dong, H. W. (2012). Cyto-and Chemoarchitecture of the hypothalamic paraventricular nucleus in the

C57BL/6J male mouse: a study of immunostaining and multiple fluorescent tract tracing. *Journal of Comparative Neurology*, 520 (1), 6-33.

Bouffleur, N., Antoniazzi, C. T., Pase, C. S., Benvegno, D. M., Dias, V. T., Segat, H. T., Roversi, K., Nora, M. D., Koakoskia, G., Rosa, J. G., Barcellos, L. J. & Burger, M. E. (2013). Neonatal handling prevents anxiety-like symptoms in rats exposed to chronic mild stress: behavioral and oxidative parameters. *Stress*, 16 (3), 321-30.

Cai, S., Huang, S., & Hao, W. (2015). New hypothesis and treatment targets of depression: an integrated view of key findings. *Neuroscience bulletin*, 31 (1), 61-74.

Castrén, E. & Kojima, M. (2017). Brain-derived neurotrophic factor in mood disorders and antidepressant treatments. *Neurobiology of disease*, 97, 119-126.

Castrén, E. & Rantamäki, T. (2010). Role of brain derived neurotrophic factor in the aetiology of depression. *CNS Drugs*, 24 (1), 1-7.

Chang, W. H., Lee, I. H., Chi, M. H., Lin, S. H., Chen, K. C., Chen, P. S., Chiu, N. T., Yao, W. J. & Yang, Y. K. (2018). Prefrontal cortex modulates the correlations between brain derived neurotrophic factor level, serotonin, and the autonomic nervous system. *Scientific reports*. 8 (2558).

Chen, W.Q., Zhao, X.L., Wang, D.L., Lee, S.T., Hou, Y., Hong, Y., & Cheng, Y.Y. (2010). Effects of epigallocatechin-3-gallate on behavioral impairments induced by psychological stress in rats. *Experimental Biology and Medicine*, 235, 577-583.

Collier, R. J., Renquist, B. J. & Xiao, Y. (2017). A 100-year review: stress physiology including heat stress. *Journal of Dairy Science*, 100, 10367-10380.

Costello, E., Angold, A., Burns, B., Stangl, D., Tweed, D., Erkanli, A. & Worthman, C. (1996). The great smoky mountains study of youth: goals, design, methods, and the prevalence of DSM-III disorders. *Archives of general psychiatry*, 53 (12), 1129-1136.

de Kloet, E. R., Joëls, M. & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 6 (6), 463-75.

- Diniz, C. A., Casarotto, P. C. & Joca, S. R. (2016). NMDA-NO signaling in the dorsal and ventral hippocampus time-dependently modulates the behavioral responses to forced swimming stress. *Behavioural Brain Research*, 307, 126-136.
- DSM-V. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual* (Fifth Edition ed.). Washington, DC: American Psychiatric Association.
- Dueñas, Z., Caicedo-Mera, J.C. & Torner, L. (2017) Global effects of early life stress on neurons and glial cells. *Current Pharmaceutical Design*.23, 1-8.
- Duman, C., & Monteggia, L. (2006). A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biological Psychiatry*, 59 (12), 1116-1127.
- Duman, R. S., Malberg, J., Nakagawa, S. & D'Sa, C. (2000). Neuronal plasticity and survival in mood disorders. *Biological Psychiatry*, 49 (8), 732-739.
- Dwivedi, Y., Rizavi, H. S., Conley, R. R., Roberts, R. C., Tamminga, C. A. & Pandey, G. N. (2003). Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. *Archives of general psychiatry*, 60, 804-815.
- Eden, C. G. & Uylings, H. B. (1985). Cytoarchitectonic development of the prefrontal cortex in the rat. *The journal of comparative neurology*, 241, 253-267.
- Edgin, J. O. & Nadel, L. (2017). Hippocampus and development. *Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology*, 89-96.
- Emanuel, R. L., Thull, D. L., Girard, D. M. & Majzoub, J. A. (1989). Developmental Expression of corticotropin releasing hormone messenger RNA and peptide in rat hypothalamus. *Peptides*, 10 (6), 1165-1169
- Faure, J., Uys, J. D., Marais, L., Stein, D. J. & Daniels, W. M. (2007). Early maternal separation alters the response to traumatization: resulting in increased levels of hippocampal neurotrophic factors. *Metabolic Brain Disease*, 22, 183–195.
- Ferguson, A. V., Latchford, K. J. & Samson, W. K. (2008). The paraventricular nucleus of the hypothalamus a potential target for integrative treatment of autonomic dysfunction. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 12 (6), 717-727.

- Gallegos, J., Linan-Thompson, S., Stark, K. & Ruvalcaba, N. (2013). Preventing childhood anxiety and depression: testing the effectiveness of a school-based program in Mexico. *Psicología educativa, 19*, 37-44.
- Gramza-Michalowska, A., Kobus-Cisowska, J., Kmiecik, D., Korczak, J., Helak, B., Dziedzic, K. & Górecka, D. (2016). Antioxidative potential, nutritional value and sensory profiles of confectionery fortified with green and yellow tea leaves (*Camellia sinensis*). *Food Chemistry, (211)*, 448-454.
- Greisen, M.H., Altar, C.A., Bolwig, T.G., Whitehead, R., & Wörtwein, G. (2005). Increased adult hippocampal brain-derived neurotrophic factor and normal levels of neurogenesis in maternal separation rats. *Journal of Neuroscience Research, 79*, 772–778.
- He, F. (2014). The relationship of prenatal ethanol exposure and anxiety-related behaviors and central androgen receptor and vasopressin expression in adult male mandarin voles. *Neuroscience, 266*, 224-234.
- He, G. Q., Fang, G., Wang, B., Jun, G. X. & Lin, G. C. (2015). Perinatal stress effects on later anxiety and hormone secretion in male mandarin voles. *Behavioral Neuroscience, 129* (6), 789-800.
- Hendelman, W. J. (2006). *The Atlas of Functional Neuroanatomy*, 2ª edición CRC Press.
- Herman, J. & Tasker, J. (2016). Paraventricular hypothalamic mechanisms of chronic stress adaptation. *Frontiers in Endocrinology, 7* (137), 1-10.
- Herman, J. P. (2012). Neural pathways of stress integration: relevance to alcohol abuse. *Alcohol Research, 34* (4), 441-447.
- INEGI. (2015). http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/boletines/2016/especiales/especiales/2016_06_05.pdf
- Joseph-Bravo, P. & De Gortari, P. (2007). El estrés y sus efectos en el metabolismo y el aprendizaje. *Biotecnología, 14*, 65–76.

- Karege, F., Bondolfi, G., Gervasoni, N., Schwald, M., Aubry, J. M. & Bertschy, G. (2005). Low Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. *Biological Psychiatry*, 57 (9), 1068-1072.
- Keller, H. A., Delucchi, G. & Romero, H. F. (2011). *Camelliasinensis* (Theaceae) en la Argentina: Naturalización y Usos Locales. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 46 (1-2), 145-150.
- Lajud, N., Roque, A., Cajero, M., Gutierrez-Ospina, G. & Torner, L. (2012). Periodic maternal separation decreases hippocampal neurogenesis without affecting basal corticosterone during the stress hyporesponsive period, but alters HPA axis and coping behavior in adulthood. *Psychoneuroendocrinology*, 37, 410-420.
- Lee, B., Shim, I., Lee, H. & Hahm D. H. (2018). Effects of epigallocatechin gallate on behavioral and cognitive impairments, hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction, and alternations in hippocampal BDNF expression under single prolonged stress. *Journal of medicinal food*, 21 (10), 979-989.
- Levites, Y., Amit, T., Mandel, S. & Youdim, M. B. H. (2003). Neuroprotection and neurorescue against amyloid beta toxicity and PKC dependent release of non-amyloidogenic soluble precursor protein by green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate. *FASEB Journal*, 17 (18), 952–954.
- Levites, Y., Amit, T., Youdim, M. B. H. & Mandel, S. (2002). Involvement of protein kinase C activation and cell survival/cell cycle genes in green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate neuroprotective action. *The Journal of biological chemistry*, 277 (34), 30574–30580.
- Mandel, S., Amit, T., Reznichenko, L., Weinreb, O. & Youdim, M. B. (2006). Green tea catechins as brain-permeable, natural iron chelators-antioxidants for the treatment of neurodegenerative disorders. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50 (2), 229–234.
- Mandel, S., Weinreb, O., Amit, T. & Youdim, M. B. H. (2004). Cell signaling pathways in the neuroprotective actions of the green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate: implications for neurodegenerative diseases. *Journal of Neurochemistry*, 88 (6), 1555–1569.

- Marais, L., van Rensburg, S., van Zyl, J. M., Stein, D. J. & Daniels, W. M. (2008). Maternal separation of rat pups increases the risk of developing depressive-like behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus. *Neuroscience research*.61, 106-112.
- Meisenzahl, E. M., Seifert, D., Bottlender, R., Teipel, S., Zetzsche, T., Jäger, M., Koutsouleris, N., Schmitt, G., Scheuerecker, J., Burgermeister, B., Hampel, H., Rupprecht, T., Born, C., Reiser, M., Möller, H. J. & Frodl, T. (2010). Differences in hippocampal volume between major depression and schizophrenia: a comparative neuroimaging study. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 260 (2), 127-137.
- Ménard, C., Hoods, G., & Russo, S. (2016). Pathogenesis of depression: insights from human and rodent studies. *Neuroscience*, 321, 138-162.
- Mereles, D. & Hunstein, W. (2011). Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for Clinical Trials: More Pitfalls than Promises?. *International Journal of Molecular Sciences*, 12 (9), 5592-5603.
- Mucio-Ramírez, J. (2007). La neuroquímica del estrés y el papel de los péptidos opioides. *Revista de educación bioquímica*, 26 (4), 121-128.
- Nibuya, M., Morinobu, S. & Duman, R. S. (1995). Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *Journal of neuroscience*, 15, 7539-7547.
- Ognibene, E., Adriani, W., Caprioli, A., Ghirardi, O., Ali, S. F., Aloe, L. & Laviola, G. (2008). The effect of early maternal separation on brain derived neurotrophic factor and monoamine levels in adult heterozygous reeler mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 32, 1269–1276.
- Ohta, K. I., Suzuki, S., Warita, K., Kaji, T., Kusaka, T. & Miki, T. (2017). Prolonged maternal separation attenuates BDNF-ERK signaling correlated with spine formation in the hippocampus during early brain development. *Journal of Neurochemistry*, 141 (2), 179-194.
- Okere, C. O. & Waterhouse, B. D. (2003). Inter- and intra-nuclear differences in galanin expression between the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei in colchicine-untreated rats. *Brain research*, 972 (1-2), 222-228.

- OMS. (2009). http://www.who.int/mental_health/management/psychotropic_book_spanish.pdf
- OMS. (2013). http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2013/trauma_mental_health_20130806/es/
- OMS. (2017a). Depression and Other Common Mental Disorders. Global Health Estimates. Ginebra
- OMS. (2017b). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/es/>.
- Palacio, S. E., Ribero, V. M. & Restrepo, G. J. (2013). Toxicidad hepática por té verde (*Camellia sinensis*): Revisión de tema. *Asociaciones colombianas de gastroenterología, Endoscopia digestiva, Coloproctología y Hepatología*, 28 (1), 46-52.
- Palazidou, E. (2012). The neurobiology of depression. *British Medical Bulletin*, 101, 127-145.
- Paxinos, G. & Watson, C. (2004). The rat brain in stereotaxic coordinates (5th ed). *Elsevier Academic*, Amsterdam; London.
- Réus, G. Z., Stringari, R. B., Ribeiro, K. F., Cipriano, A. L., Panizzutti, B. S., Stertz, L., Lersch, C., Kapczinski, F. & Quevedo, J. (2011). Maternal deprivation induces depressive-like behavior and alters neurotrophin levels in the rat brain. *Neurochemical Research*. 36, 460–466.
- Sánchez-Navarro, J. & Román, F. (2004). Amígdala, corteza prefrontal y especialización hemisférica en la experiencia y expresión emocional. *Anales de psicología*, 20 (2), 223-240.
- Sequeira, C. A. & Fornaguera, T. J. (2009). Neurobiología de la depresión. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 10 (6), 462-478.
- Siuciak, J. A., Lewis, D. R., Wiegand, S. J. & Lindsay, R. M. (1997). Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Pharmacology biochemistry and behavior*, 56, 131-137.
- Spiga, F., Walker, J. J., Terry, J. R. & Lightman, S. (2014). HPA Axis-Rhythms. *Comprehensive Physiology*, 4, 1273-1298.

- Tannenholz, L., Jimenez, J. C. & Kheirbek, M. A. (2014). Local and regional heterogeneity underlying hippocampal modulation of cognition and mood. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 8, 1-7.
- Tian, W., Han, X. G., Liu, Y. J., Tang, G. Q., Liu, B., Wang, Y. Q., Xiao, B. & Xu, Y. F. (2013). Intrathecal epigallocatechin gallate treatment improves functional recovery after spinal cord injury by upregulating the expression of BDNF and GDNF. *Neurochemical Research*, 38 (4), 772-779.
- Valenzuela, A. (2004). El consumo de té y la salud: características y propiedades benéficas de esta bebida milenaria. *Revista Chilena de Nutrición*, 31 (2), 72-87.
- Vales, L. (2012). Sistema límbico. Leira, P. M. (ed). Manual de bases biológicas del comportamiento humano. CSE Universidad de la República, pp. 137-143.
- Veenema, A. H. & Neumann, I. D. (2009). Maternal separation enhances offensive play-fighting, basal corticosterone and hypothalamic vasopressin mRNA expression in juvenile male rats. *Psychoneuroendocrinology*, 34 (3), 463-7.
- Wang, Q., Shao, F. & Wang, W. (2015). Maternal separation produces alterations of forebrain brain-derived neurotrophic factor expression in differently aged rats. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 8 (49), 1-8.
- Walker, J. J., Terry, J. R. & Lightman, S. L. (2010). Origin of ultradian pulsatility in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277, 1627-1633.
- Weinreb, O., Amit, T., Mandel, S. & Youdim, M. B. (2009). Neuroprotective molecular mechanisms of (-)-epigallocatechin-3-gallate: a reflective outcome of its antioxidant, iron chelating and neurotogenic properties. *Genes & Nutrition*, 4 (4), 283–296.
- Weinreb, O., Mandel, S., Amit, T. & Youdin, M. (2004). Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15, 506-516.

- Weiser, M. J. & Handa, R. J. (2009). Estrogen impairs glucocorticoid dependent negative feedback on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis via estrogen receptor alpha within the hypothalamus. *Neuroscience*, 159 (2), 883-895.
- Wu, J-L., He, Y., Hrubý, R., Balesar, R., Qi, Y-J., Guo, L., Ren, Z., Zhu, Q-B., Huang, M-L., Swaab, D. & Bao, A-M. (2017). Aromatase changes in depression: A postmortem and animal experimental study. *Psychoneuroendocrinology*, 77, 56-62.
- Zhao, X., Liu, F., Jin, H., Li, R., Wang, Y., Zhang, W., Wang, H. & Chen, W. (2017). Involvement of PKC α and ERK1/2 signaling pathways in EGCG's protection against stress-induced neural injuries in Wistar rats. *Neuroscience*, 346, 226-237.
- Zhu, W., Shi, H., Wei, Y., Wang, S., Sun, C., Ding, Z. & Lu, L. (2012). Green tea polyphenols produce antidepressant-like effects in adult mice. *Pharmacological Research*, 65 (1), 74-80.