



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

TESIS

Estudio de los neuropéptidos hipotalámicos como puente
entre el estrés en la edad temprana y la adaptabilidad
conductual con un enfoque a la formación hipocampal en rata

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

Doctora en Ciencias Biomédicas

PRESENTA

M.C. MA. ANGÉLICA ROQUE GALICIA

Directora de tesis:

Dra. en C. LIMEI ZHANG JI

Facultad de Medicina

COMITÉ TUTOR

Dra. Luz Torner Aguilar

Centro de investigación biomédica de Michoacán

Dr. Jesús Hernández Falcón

Facultad de Medicina

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Neurociencias de Sistemas del departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UNAM, campus Ciudad Universitaria, bajo la tutoría de la **Dra. Limei Zhang** y el comité tutorial integrado por los Doctores **Luz Torner Aguilar** y **Jesús Hernández Falcón**. Durante la realización de los estudios de doctorado, se contó con el apoyo del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM, para la realización de una estancia de investigación en la Universidad de Pittsburgh, además contó con una beca de manutención del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) para la realización de los estudios de doctorado en Ciencias Biomédicas (CVU/becaria no. 509694/286252), CONACyT. Los donativos IN216918 y GI200121 del programa PAPIIT de la DGAPA UNAM y de CONACYT CB-238744 y CB-283279 aportaron recursos para el desarrollo de la presente tesis.

ÍNDICE

Resumen (en español)	5
Abstract (en inglés)	7
1. Introducción	9
1. Generalidades	10
1.1 Estrés, la respuesta al estrés y el eje HPA	11
1.1.1 La respuesta al estrés: el sistema nervioso autónomo y el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales	12
1.2 Neuropéptidos hipotalámicos relacionados con la respuesta al estrés	13
1.3 Modelos de estrés: Separación Maternal	16
1.4 El hipocampo, estrés y la vasopresina	19
1.5 La microglía y el estrés en el hipocampo	22
1.6 Plasticidad sináptica y la conducta	24
2. Planteamiento del problema	26
3 Hipótesis	27
4. Objetivos	28
5. Materiales y Métodos	29
5.1 Animales	30
5.2 Estrés temprano por separación maternal (MS)	30
5.3 Reacciones inmuno-histoquímicas para Iba-1, PSD95 y c-Fos	31
5.4 Tinción del Golgi	32
5.5 Evaluación del recuerdo del miedo	32
5.6 Prueba de localización de objetos (OLT)	33
5.7 Prueba de discriminación social	34
5.8 Colección de tejido y muestras de plasma de neonatos	34
5.9 Extracción de mRNA y reacción de RT-PCR	34
5.11 Análisis estadístico	35

6. Resultados	37
7. Discusión	55
8. Conclusión	63
9. Referencias	65
Lista de abreviaturas	80

Resumen

El estrés durante las etapas tempranas de la vida (*ELS*, por sus siglas en inglés: *early life stress*,) es un factor para el desarrollo de psicopatologías y alteraciones conductuales que pueden prevalecer hasta la edad adulta. El hipocampo es una estructura vulnerable a los efectos del estrés, principalmente durante los estadios posnatales tempranos. Es generalmente aceptado que el ELS modifica la conducta y la reactividad al estrés a largo plazo debido que causa una deficiencia en el circuito de retroalimentación negativa del eje HPA a nivel de hipocampo e hipotálamo. Sin embargo existen pocos estudios que describan los mecanismos mediante los cuales el ELS modifica el desarrollo de estas estructuras.

En la rata, la separación maternal diaria neonatal por 180 minutos por 15 días (MS180) es un modelo animal para estudiar los efectos del ELS en el desarrollo. En este trabajo analizamos los efectos de la MS180 sobre la expresión del neuropéptido arginina vasopresina (AVP) en el hipotálamo; de igual forma se comparó la densidad de las espinas dendríticas en el segmento inicial del axón (AISS, Axonal initial segment spines) en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo y la interacción con las células microgliales y la colocalización con PSD95. Adicionalmente, realizamos pruebas conductuales. En nuestros resultados observamos un aumento de la expresión de AVP en el hipotálamo al día posnatal 15 (PND15), mientras que en el hipocampo encontramos un aumento de las AISS en las células granulares del giro dentado. La MS180 aumentó la población de células microgliales y de igual manera se observa un aumento de puntos de la proteína de la densidad postsináptica 95 (PDS95), que colocalizan con las células microgliales. Analizamos la conducta tipo depresiva por nado forzado y observamos que los animales MS180 presentan un mayor tiempo en el parámetro flotación. Adicionalmente realizamos pruebas para evaluar la memoria en el hipocampo, como la prueba de localización de objetos, el reconocimiento social y el recuerdo del miedo. En los resultados observamos que los animales MS180 presentan problemas para reconocer las diferencias del objeto en un nuevo lugar, en la prueba de localización de objeto. Por otro lado, en la prueba de reconocimiento social ambos grupos tienen preferencia por la rata nueva. Al evaluar el recuerdo del miedo

en la prueba observamos, que los animales MS180 presentan un mayor puntaje cuando se exponen al sonido de un depredador (gato). Adicionalmente se analizó la expresión de c-Fos en los animales, después de ser expuestos al sonido, y observamos un aumento de la expresión de c-Fos en el hipocampo dorsal y ventral, en el grupo MS180. Estos datos en conjunto nos sugieren que el ELS modifica la expresión de AVP en el hipotálamo, la microglía hipocampal y la conducta; estos efectos pueden ser permanentes; sin embargo, es necesario seguir estudiando los mecanismos en los cuales el ELS dirige estos cambios.

Abstract

Stress during the early stages of life or early life stress (ELS) is a factor in the development of psychopathologies and behavioral disturbances that can persist into adulthood. The hippocampus is a structure vulnerable to the stress effects, mainly during the early postnatal stages. It is generally accepted that ELS modifies behavior and reactivity to long-term stress by causing a deficiency in the negative feedback loop on the HPA axis at the hippocampus and the hypothalamus levels. However, there are few studies that describe the mechanisms by which ELS modifies the development of these structures.

Neonatal daily maternal separation for 180 minutes for 15 days (MS180) in rats is an animal model to study the effects of ELS on brain development. In this work we analyze the effects of MS180 on the expression of the neuropeptide arginine vasopressin (AVP) in the hypothalamus. Likewise, the density of dendritic spines in the axon initial segment (AISS) in the subgranular zone of the dentate gyrus of the hippocampus and the interaction with microglial cells and co-localization with PSD95 were compared. Additionally, we performed behavioral tests. In our results, we observed an increase in AVP expression in the hypothalamus at PND15, while in the hippocampus we found an increase in AISS in the granular cells of the dentate gyrus in males and females. MS180 increased the population of microglial cells and the number of PSD95 points that co-localize with microglial cells. We analyzed the depressive type behavior by forced swimming and we observed that the MS180 animals are statistically different in the time of flotation. Additionally, we performed tests to evaluate the memory in the hippocampus, such as the object location test, social recognition, and the fear memory. We observed that the MS180 animals present problems to recognize the differences of the object in a new and familiar place. On the other hand, in the social recognition test, both groups had a preference for the new rat. When evaluating fear memory, we observed that the MS180 animals present a higher score when exposed to sound of predator (cat). Additionally, the expression of c-Fos was increased in the ventral and dorsal hippocampus of the

MS180 group exposed to sound. These data suggest that ELS modifies hypothalamic vasopressin expression, hippocampal microglia and behavior; these effects may be permanent. It is necessary to continue studying the mechanisms by which ELS directs these changes.

1. Introducción

1. Generalidades

El estrés durante las etapas tempranas de la vida ("ELS" por sus siglas en inglés of "early life stress"), se asocia con alteraciones en la conducta de ansiedad, la depresión, la memoria y el aprendizaje (Aisa y cols., 2007). La separación maternal (MS), es el modelo más usado para analizar los efectos del ELS en roedores (Plotsky y Meaney, 1993; Hofer, 1973). Los estudios previos reportaron que los eventos amenazantes durante el neurodesarrollo temprano se correlacionan con una hiper-reactividad al estrés (Heim y Nemeroff, 2001; McIlwrick y cols., 2016; Veenema y Neumann, 2009), lo que sugiere que ELS programa a los animales para que sean más sensibles a situaciones adversas en la vida adulta.

El hipocampo es una estructura plástica y vulnerable a los efectos del estrés, principalmente durante los estadios postnatales tempranos (McEwen y cols., 1992). Además, el hipocampo participa en el circuito de retroalimentación negativa del eje del estrés, el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales (HPA, por sus siglas en inglés), y en procesos de aprendizaje y memoria (Tsigos y Chrousos, 2002).

En algunos trabajos se ha propuesto que los cambios sobre la conducta tipo ansiedad y depresiva en animales con ELS se deben a una deficiencia del circuito de retroalimentación negativa del eje HPA, a nivel de hipocampo e hipotálamo (Shin y cols., 2016; Swaab y cols., 2005). Nuestro grupo de trabajo reportó la proyección de inervaciones vasopresinérgicas desde el hipotálamo hacia el hipocampo, mismas que son susceptibles a los efectos del estrés; también que la MS aumenta la expresión de arginina vasopresina (AVP) en el hipotálamo (Hernández y cols., 2012; Zhang y cols., 2012; Zhang y Hernández, 2013).

Los estudios de Meaney y colaboradores (1996) propusieron a los glucocorticoides (GC) como los principales mediadores de los efectos a largo plazo causados por el ELS (Meaney y cols., 1996). Sin embargo, resultados más recientes reportaron que la exposición al ELS no aumenta las concentraciones basales de los GC durante la etapa neonatal (Lajud y cols., 2012). Posteriormente, Liao y

colaboradores (2014), observaron que el tratamiento con el antagonista del receptor a GC, RU486, tampoco previene los efectos del ELS sobre el desarrollo cerebral. Estas observaciones sugieren la existencia de otros factores, que podrían dirigir los efectos del ELS sobre el sistema nervioso central (SNC) y el comportamiento en la adultez.

1.1.1. Estrés, la respuesta al estrés y el eje HPA

La palabra estrés se utiliza para describir las experiencias que nos representa un reto, ya sea emocional y/o fisiológico (McEwen, 2007, 2017). Walter Cannon y Hans Selye fueron los primeros en describir al estrés y la respuesta al estrés, en la década de los 30's del siglo pasado. Cannon utilizó el concepto de “enfrentamiento o huida” para referirse a la respuesta conductual de los organismos ante una amenaza (Goldstein y Kopin, 2007). Mientras que el término estrés fue propuesto por Hans Selye, quien observó el efecto del estrés crónico sobre la fisiología de los organismos; sus estudios lo llevaron a definirlo como “una respuesta inespecífica del organismo ante un estresor continuo que conduce a un estado patológico, que incluso puede concluir con la muerte del individuo” (Deussing y Chen, 2018; Squire, 2003). El término estrés es muy complejo, ya que involucra cambios emocionales y fisiológicos del organismo, en este trabajo se utilizó la definición de Tsigos y Chrousos (2002), que definen al estrés como una respuesta del organismo ante un estímulo que amenace su homeostasis, y esta respuesta puede ser de tipo conductual y fisiológico.

Por otro lado, al hablar de estrés, se menciona el término alostasis, el cual es el proceso que en forma activa mantiene la homeostasis. La alostasis puede entenderse como una respuesta anticipada para afrontar el estrés de una determinada situación (interna o externa). Sin embargo, cuando este proceso de alostasis es prolongado o no adecuado, conduce a que el proceso de adaptación sea ineficiente, lo que es referido como carga alostática (Davies, 2016; Goldstein y Kopin, 2007; McEwen, 2002). Esta respuesta des-regulada produce un desgaste o

agotamiento en el individuo por una hiper-activación de los sistemas de alostasis y como consecuencia a largo plazo causa fallas en el organismo (McEwen, 2002).

1.1.2. La respuesta al estrés: el sistema nervioso autónomo y el eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales

La respuesta al estrés recluta al sistema nervioso autónomo (SNA) para dar una respuesta rápida y al eje hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales (HPA) para una respuesta lenta. El SNA inerva los órganos del musculo liso en varias glándulas, el corazón y el sistema vascular; estas proyecciones forman plexos en los órganos como los pulmones, el tracto gastrointestinal, el sistema genitourinario y los vasos sanguíneos. De esta manera, el SNA puede controlar la respiración, la digestión, la respuesta inmune y reproductiva y mantener la homeostasis del organismo. Además de lo antes mencionado, el SNA en situaciones de estrés puede movilizar fuentes de energía para favorecer la respuesta rápida de “enfrentamiento o huida” (McEwen, 2007).

La respuesta lenta al estrés esta mediada por el eje HPA; este se activa cuando los organismos detectan una amenaza física o psicológica (Goncharova, 2013). Los estímulos sensoriales se integran en el hipotálamo y esto conduce a la liberación de una cascada de hormonas (Lupien y cols., 2005). La hormona liberadora de corticotropina (CRH) y el neuropéptido arginina vasopresina (AVP) se secretan por el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), ambas llegan a la glándula hipófisis donde estimulan la secreción de la hormona adenocorticotrópica (ACTH). La ACTH se vierte a la circulación para llegar a las glándulas suprarrenales donde induce la secreción de los glucocorticoides. Los principales glucocorticoides (GC) efectores son la corticosterona en roedores y el cortisol en humanos. Durante la activación de la respuesta al estrés los GC promueven la movilización de fuentes de energía, inducen la lipólisis y proteólisis, y participan en la modulación de la conducta (Herman y cols., 2016). Durante el desarrollo los GC son requeridos para la maduración de los tejidos periféricos y la diferenciación celular en el sistema nervioso central (Galeeva y cols., 2010).

Los GC interaccionan con dos tipos de receptores en el SNC, tipo 1 o mineralocorticoide (MR) y tipo 2 o glucocorticoide (GCR). En condiciones fisiológicas cuando las concentraciones de GC son bajas los MR se encuentran ocupados, ya que tienen una mayor afinidad (De Kloet, 2000). Los GCR solo se activan cuando las concentraciones de GC aumentan, como en los estados de estrés crónico. Los GCR se encuentran distribuidos en todo el SNC, principalmente en la hipófisis, el hipotálamo, la corteza prefrontal y el hipocampo. En estas estructuras participan como mediadores del asa de retroalimentación negativa del eje HPA que permite inhibir la respuesta al estrés y restaurar la homeostasis. En conjunto todos estos cambios biológicos preparan al organismo para tener un desempeño óptimo bajo condiciones adversas, pero están destinados a ser transitorios (McEwen, 2002).

1.2. Neuropeptidos hipotalámicos relacionados con la respuesta al estrés

El estrés induce la activación del eje HPA, por lo cual requiere del reclutamiento de varias estructuras y la participación de los mensajeros químicos. Estos mensajeros, son los neuropeptidos CRH y AVP, principalmente; se originan en el hipotálamo y se vierten hacia el sistema portal hipofisiario para inducir la síntesis y liberación de la proopiomelanocortina (POMC), esta a su vez, es procesada para originar la ACTH (hormona adenocorticotrópica) y las beta endorfinas. Posteriormente, la ACTH es liberada al torrente sanguíneo, hasta llegar a las glándulas adrenales y estimular la síntesis y liberación de los GC (Inda y cols., 2017; Tsigos y Chrousos, 2002).

La CRH es una molécula peptídica involucrada en la respuesta al estrés y responsable de inducir la síntesis y secreción de ACTH en la glándula hipófisis. La CRH está formada por 41 aminoácidos y deriva de un precursor de 196 aminoácidos, fue aislada y caracterizada por Wylie Vale en 1981 (Laryea y cols., 2012). Este péptido se sintetiza en las células parvocelulares en el PVN del hipotálamo. 5% de las neuronas tipo CRH co-expresan AVP en el hipotálamo (Deussing y Chen, 2018; Perkeybile y Bales, 2015). La CRH se almacena en las terminales de los axones de la zona externa en la eminencia media (Korosi y Baram,

2008). La liberación de neuropéptidos como la CRH depende de un factor sensible N-etilmaleimida que se une a un complejo, lo cual permite la fusión del granulo de secreción con la membrana en el sitio de liberación (Deussing y Chen, 2018). Como se ha mencionado antes, la CRH puede ser liberada en condiciones de estrés; sin embargo, también puede ser estimulada durante el ciclo circadiano (Coleman y Canal, 2017). Las neuronas CRH pueden inducir la secreción circadiana de ACTH y los GC (de Kloet y cols., 1998; Deussing y Chen, 2018); los efectos de la CRH son mediados a través de sus receptores: CRHR1 y CRHR2 (Alcántara-Alonso y cols., 2017; Hügin-Flores y cols., 2003; Zheng y cols., 2016). Estos receptores se encuentran distribuidos en distintas áreas cerebrales. La expresión de CRH ha sido descrita en áreas extra-hipotalámicas tales como el núcleo central de la amígdala, la sustancia negra, el bulbo olfatorio, la corteza cerebral, el cerebelo y el hipocampo (Authement y cols., 2018; Laryea y cols., 2012; Korosi y Baram, 2008). Los efectos de la CRH son diversos, y se han relacionado con conductas de tipo depresiva, ansiedad, termorregulación y con hábitos alimenticios (Alcántara-Alonso y cols., 2017; Zhen y cols., 2016).

Por otro lado está el neuropéptido AVP; éste está constituido por 9 aminoácidos, se produce principalmente en el núcleo paraventricular (PVN) y el núcleo supra óptico (Buijs y cols., 1980; Reppucci y cols., 2018; Rundle y Funder, 1988) del hipotálamo. La AVP fue aislada y descrita por Vincent du Vigneaud en 1953 quien ganó el premio nobel por sus contribuciones a la medicina, neurocirugía y endocrinología (Ottenhausen y cols., 2016). La AVP se sintetiza principalmente en las neuronas magnocelulares y parvocelulares del PVN del hipotálamo (Buijs y cols., 1980). La AVP se sintetiza como parte de un péptido precursor que contiene tres pre-propéptidos que serán procesados durante el transporte axonal para dar origen a la AVP, la neurofisina II (AVP-NP II), y un glucopéptido llamado copeptina (Acher y Chauvet, 1988; Clements y Funder, 1986; McEwen, 2004). La AVP que está localizada en las neuronas magnocelulares es transportada hacia la hipófisis para ser liberada al sistema portal-hipofisiario y a la circulación sistémica (McEwen, 2004). Las neuronas parvocelulares productoras de la AVP proyectan sus axones hacia la capa externa de la eminencia media, e inducen la secreción de las

hormonas de la hipófisis, como la ACTH (Koshimizu et al., 2012). Las fibras AVP+ son de origen hipotalámico y proyectan hacia distintas áreas cerebrales como el hipocampo (Zhang y Hernández, 2013); además, la AVP también se expresa en el núcleo del lecho de la estría *terminalis*, el septo lateral y la amígdala central (DiBenedictis y cols., 2017; Rood y cols., 2013). La AVP participa en la modulación de las conductas de agresividad y territorialidad, además de su participación en procesos cognitivos de aprendizaje y memoria (Caldwell cols., 2008; de Kloet, 2010). Las funciones de AVP son mediadas por sus receptores: V1a, V1b y V2. Estos receptores se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC y la periferia. El receptor V1b se encuentra localizado en las células corticotropas de la hipófisis, en donde la AVP actúa para inducir la liberación de ACTH en respuesta al estrés (Aguilera y cols., 2008, Ma y cols., 1997, Ma y cols., 1999). Adicionalmente, el receptor V1a se expresa en el giro dentado (GD) del hipocampo, en el núcleo del lecho de la estría *terminalis*, la amígdala, el cerebelo, la corteza cerebral, el bulbo olfatorio, el núcleo paraventricular, el septo y el núcleo supraquiasmático (Gray y cols., 2014). Por otro lado, la activación del receptor V1a se ha relacionado con el desarrollo de conductas de ansiedad, alteraciones en el reconocimiento social y la conducta social (Wang y cols., 1997). La activación del receptor V1a en el cerebro anterior se relaciona con la memoria, el reconocimiento y el aprendizaje social, la orientación y la defensa de los recursos (comida, agua, territorio) (Cilz y cols., 2019; Hammock y cols., 2013; Yang y cols., 2017). Adicionalmente, el trabajo de Riveros-Barrera (2015) documentó que la expresión y distribución de la AVP y sus receptores pueden ser moduladas por la edad y el sexo de los individuos.

1.3 Modelos de estrés: Separación Maternal

Los estudios pioneros de Meaney y colaboradores, mostraron que el cuidado materno tiene efectos a largo plazo sobre la respuesta al estrés (Plotsky y Meaney, 1993). Estos estudios contribuyeron a demostrar que la exposición al estrés durante las etapas tempranas de la vida (early life stress, ELS) puede programar al eje HPA. Sus estudios en animales expuestos a ELS durante las primeras dos semanas

posnatales, mostraron un aumento plasmático de ACTH y corticosterona en la edad adulta (Plotsky y Meaney, 1993). Posteriormente, diversos grupos de investigadores desarrollaron distintos modelos de ELS, tales como la fragmentación del cuidado materno causado por la falta de material de nido (ECS) y privación de cuidados maternos por 24 horas (Ivy y cols., 2008; Maniam y cols., 2015; Mirescu y cols., 2004; Murgatroyd y cols., 2016). El modelo de ELS más utilizado es la separación maternal (MS). Este consiste en separar a las crías 3 horas al día durante las primeras dos semanas posnatales. La MS induce una disminución de la unión del receptor a GC en el hipocampo y el hipotálamo, sitios importantes para la regulación negativa de la síntesis de CRH y la respuesta al estrés (Meaney y cols., 1996).

La MS disminuye la densidad de las fibras musgosas del hipocampo, y se relaciona con un bajo desempeño en pruebas de aprendizaje y memoria en animales adultos (Huot y cols., 2002). Por otro lado, la MS induce una mayor activación de las poblaciones neurales productoras de CRH y AVP en el hipotálamo (Desbonnet y cols., 2008; Wang y cols., 1997; Zhang y cols., 2012), lo cual puede inducir una respuesta exacerbada del eje del estrés a largo plazo. Además de CRH, la AVP es un neuropéptido susceptible a los eventos adversos durante el desarrollo (Emanuel y cols., 1989), mientras otros trabajos han descrito la disminución de AVP en estructuras extra-hipotalámicas en animales adultos comparada con los adolescentes (DiBenedictis y cols., 2017).

Adicionalmente, la MS correlaciona con un aumento en la conducta de agresividad tanto en animales juveniles como adultos, la cual se acompaña de una mayor expresión del mRNA de AVP en el PVN del hipotálamo y en el núcleo del lecho de la estría *terminalis* (Veenema y Neumann, 2009). Por otra parte, al combinar la MS y un segundo estresor, como el estrés crónico psicosocial en la edad adulta, los animales responden con cambios más dramáticos como la pérdida de peso, aumento en la conducta de ansiedad y aumento en la expresión de AVP en el PVN (Veenema y cols., 2008). Lesse y colaboradores (2017) reportaron que las experiencias adversas durante la etapa posnatal temprana programan al sistema neuroendocrino para responder ante eventos estresantes en la edad adulta; así,

han descrito en ratas jóvenes adultas, una mayor vulnerabilidad a presentar una conducta tipo depresiva en la prueba de nado forzado y un incremento en la expresión del receptor V1a en el hipocampo, en la que esta última disminuye en la edad adulta (Lesse y cols., 2017). Estos datos sugieren que los animales sometidos a SM son más vulnerables a los efectos del estrés en la etapa adulta.

Otro modelo de ELS es por ECS; consiste en colocar a ratas lactantes con material de nido limitado entre los días posnatal 2-9; en este modelo se observó una mayor expresión de CRH en el PVN en condiciones basales, y un incremento de la secreción de corticosterona en el PND9; sin embargo, en la edad adulta no se observaron alteraciones de las concentraciones de corticosterona en condiciones basales, pero sí problemas de aprendizaje y memoria moderadas en la prueba del laberinto acuático de Morris (Ivy y cols., 2008; Rice, Sandman y cols., 2008). En otros trabajos con animales KO para el GCR se observó una mayor secreción de corticosterona, y una mayor expresión de ACTH y AVP en PVN al PND6, mientras que en la edad adulta no se observaron alteraciones en las concentraciones de corticosterona en condiciones basales y tampoco en la evaluación de la conducta de ansiedad o tipo depresivas (Schmidt y cols., 2009), lo cual sugiere que durante la edad posnatal ocurrieron varios fenómenos que programaron los efectos permanentes observados en la edad adulta.

Los efectos del ELS pueden inducir modificaciones epigenéticas sobre algunos genes, como lo mostraron algunos de los trabajos del grupo de Murgatroyd y colaboradores, en donde el ELS por privación maternal de 24 horas, induce un aumento en la actividad del promotor del gen de AVP en el hipotálamo (Murgatroyd y cols., 2009; Murgatroyd y Spengler, 2014), acompañado de un incremento de la expresión de AVP en la respuesta al estrés durante la edad postnatal temprana, lo que sugiere que la expresión incrementada de AVP puede conducir a alteraciones neuroendocrinas y conductuales a largo plazo (Murgatroyd y cols., 2009).

Los receptores de AVP y de CRH se expresan de manera transitoria en áreas relacionadas con el control negativo del eje del estrés, tales como la corteza y el hipocampo durante etapas críticas del desarrollo (primeras dos semanas

posnatales) (Hammock y Levitt, 2012; Kolber y cols., 2010), lo que sugiere que eventos adversos en estos estadios del desarrollo pueden alterar los patrones de expresión de genes relacionados con la respuesta al estrés a largo plazo, a nivel de hipocampo e hipotálamo.

Por otro lado, el ELS puede alterar la maduración y la conectividad neural en estructuras como el hipocampo, en particular en las células piramidales. Éstas presentan una disminución de la complejidad en el árbol dendrítico (Pedrazzoli y cols., 2019), lo cual se ha relacionado con problemas de aprendizaje y memoria. La MS como modelo de ELS puede alterar la población de las células microgliales en el hipocampo (Roque, y cols., 2016). Las células microgliales desempeñan múltiples funciones como células derivadas del sistema inmune cerebral; estas células no solo protegen contra los patógenos o del daño, sino que también durante el desarrollo cerebral cumplen una importante labor como es la participación en la poda neuronal (Catale y cols., 2020). La microglía participa en la refinación o poda sináptica que ocurre durante el neurodesarrollo temprano; su función es remodelar, modificar o eliminar los contactos sinápticos que no son necesarios (Miyamoto y cols., 2016; Acharjee y cols., 2018), por lo cual una alteración en el entorno de las poblaciones microgliales puede conducir a una poda sináptica deficiente y por lo tanto una comunicación neuronal alterada (Johnson y Kaffman, 2018).

El periodo posnatal temprano es una fase crítica para la maduración de las conexiones neurales en estructuras como el hipocampo; en donde la exposición a eventos adversos puede alterar su desarrollo (Liao, y cols., 2014) y la respuesta al estrés a largo plazo. La conectividad y el desarrollo neural normal puede afectarse por la modificación de la posa sináptica microglial y los neuropéptidos relacionados con la respuesta al estrés durante el desarrollo postnatal temprano. No obstante, aún no se cuenta con una descripción detallada de los efectos del ELS durante la ontogenia.

1.4 El hipocampo, estrés y vasopresina

La formación hipocampal se compone del cuerno de Amón (*cornus ammonis*, CA) que se divide en las regiones: CA1, CA2, CA3 y el giro dentado (GD). El GD tiene forma de V y es subdividido en tres capas: La capa de células granulares (GCL) en el estrato medio, la capa molecular y el hilio, o *hilus*, que es la capa más interna. La capa de células granulares está formada por 6 a 8 capas de los cuerpos celulares de las células granulares y las neuronas principales del GD. Las células granulares tienen una forma de cono invertido con un árbol de dendritas apicales que proyectan al estrato molecular. La capa molecular es la más superficial del GD. Contiene axones de la vía perforante que se originan en la corteza entorrinal y forman contactos sinápticos con las dendritas de las células granulares. También contiene interneuronas GABAérgicas y fibras aferentes hacia el GD. La capa más interna, el *hilus*, que también es conocida como capa polimórfica, contiene neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas, y los axones de las células granulares, y las más abundantes son las células musgosas. El borde entre la GCL y el *hilus* es la zona subgranular, una región de suma importancia, ya que es donde ocurre la neurogénesis durante toda la vida, por lo cual ésta está compuesta de células progenitoras, además de células de canasta (Toni y Schinder, 2015).

El hipocampo participa en el proceso de la formación de la memoria espacial y el recuerdo al miedo, en conjunto con la amígdala (Izquierdo, y cols., 2016, Chaaya y cols., 2018). Los receptores AMPA participan en los procesos de la plasticidad cerebral; una de las subunidades es la GluA1, cuya fosforilación aumenta en áreas como la corteza prefrontal y el hipocampo dorsal (Caudal y cols., 2010) en respuesta a un estímulo. Durante el proceso de la memoria se ha relacionado con un aumento de la síntesis de GluA1 en el hipocampo y la potenciación a largo plazo, para la consolidación de la memoria (Cammarota y cols., 1998; Lee y cols., 2010).

El hipocampo presenta un nicho neurogénico que perdura toda la vida, además de su participación en el desarrollo de conductas de depresión, del asa de retroalimentación negativa del eje del estrés y su vulnerabilidad a los efectos del ELS (Mirescu y Gould, 2004; Murray y cols., 2020; Schloesser y cols., 2009). El

estrés y la ansiedad están relacionadas al miedo. Los eventos de estrés pueden potenciar las conductas al miedo, manifestándose como pesadillas o recuerdos de algún evento traumático (Li, y cols., 2020); si bien es un proceso mediado por la amígdala basolateral, también se observa una participación del hipocampo y su plasticidad y el crecimiento dendrítico (Chaaya, y cols., 2018).

Los péptidos CRH y AVP tienen papeles diferenciales durante las respuestas fisiológicas y patológicas como el estrés. La CRH y la AVP están íntimamente involucradas en la maduración y conectividad del hipocampo durante el desarrollo posnatal temprano; por lo tanto, su expresión es sensible a los efectos de los eventos adversos (Alcántara-Alonso, y cols., 2017; Hammock y Levitt, 2012; Hammock, 2013; Li, y cols., 2017). Las células tipo Cajal-Retzius hipocampales, que presentan expresión de CRH transitoria durante las primeras semanas postnatales, participan en la maduración del hipocampo (Chen y cols., 2001). La expresión del receptor CRHR1 inicia con una distribución desorganizada en la formación hipocampal desde PN0, y esta distribución se restringe al área CA1 y GD en PN21 (Rosinger y cols., 2017). La presencia de AVP y la expresión de sus receptores en el hipocampo procedente de inervaciones de origen hipotalámico (Zhang y Hernández, 2013) se reportó durante el desarrollo y en la edad adulta (Chafai, y cols., 2012; Corbani, y cols., 2018). La expresión de AVP en el hipocampo se ha relacionado con procesos de aprendizaje y memoria (facilitador de memoria) (Alescio-Lautier y Soumireu-Mourat, 1999). Los trabajos de Hammock y Levitt (2012) muestran una expresión transitoria del receptor V1a en el hipocampo dorsal, durante las primeras tres semanas posnatales, lo cual sugiere su participación en el balance de la inhibición y excitación en estructuras límbicas. Por otro lado, la expresión del receptor V1b en las células piramidales del área de CA2 se ha relacionado con la regulación de conductas sociales, agresividad y reconocimiento social (Caldwell, Wersinger y Young, 2008; Chafai, y cols., 2012; Stevenson y Caldwell, 2012). Los trabajos de Gunn y cols. (2017), demostraron que la CRH puede modular la función hipocampal en la conectividad de la transmisión excitatoria de las células piramidales de CA3 y esto puede tener efectos sobre la memoria en situaciones de estrés. De igual forma, los animales que fueron sometidos a ELS

durante el periodo posnatal temprano y a los cuales se les administró un bloqueador del receptor CRHR1, mostraron una atenuación de los efectos del estrés sobre proteínas de plasticidad sináptica como sinaptofisina y PSD95 en el hipocampo (Liao, y cols., 2014). Mientras que, en trabajos en humanos con ELS, se ha relacionado un polimorfismo en el gen de CRHR1 y el desarrollo de depresión y alteraciones en la actividad hipocampal y las funciones cognitivas (Short y cols., 2020; Grimm y cols., 2017; Zheng y cols., 2016).

Algunos trabajos que muestran la participación de las células gliales en la memoria al miedo y el hipocampo. Li y cols. (2020) reportaron la participación de los astrocitos, en la consolidación del recuerdo al miedo dependiente de hipocampo (Li, y cols., 2020).

1.5 La microglía y el estrés en el hipocampo

Las células microgliales se originan del mesodermo. En roedores, éstas migran al SNC durante el desarrollo embrionario alrededor del día embrionario 9.5-12; posteriormente proliferan y se distribuyen durante la primera semana posnatal (Ginhoux y cols., 2013). Las microglías son fagocitos mononucleares del SNC, que dan soporte y protección a las neuronas; estas células están distribuidas en el cerebro y la espina dorsal, y son aproximadamente entre el 5-20% de la población de células gliales del SNC (Ginhoux, y cols., 2013). Las células microgliales participan en la regulación del remodelamiento del circuito sináptico y pueden fagocitar el material sináptico en un cerebro sano (Lehrman, y cols., 2018).

Durante el desarrollo cerebral ocurre un proceso muy importante como es la poda sináptica, el cual se encarga del refinamiento y eliminación de sinapsis innecesarias (Andoh, y cols., 2019; Miyamoto, y cols., 2016; Paolicelli, y cols., 2011). El proceso de la poda sináptica es mediado por las células microgliales del sistema inmune. Por mucho tiempo se consideró al cerebro como un órgano inmunoprivilegiado, pero a finales del siglo 20 salió a la luz que el sistema inmune está involucrado en la poda sináptica. Si bien los mecanismos por los cuales las células

microgliales “eligen” qué sinapsis eliminar son desconocidos, se ha mostrado que existen mecanismos para proteger algunas sinapsis, como es el caso en sistema retinogénico en el desarrollo, donde se analizaron animales de 8 y 13 días de edad, y se observó la presencia de CD47 en los botones sinápticos y su receptor SIRP alfa en las células microgliales, y la falta de estos puede conducir a una eliminación exagerada de contactos sinápticos (Lehrman, y cols., 2018). Adicionalmente, la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-I) en neuronas durante el desarrollo y células microgliales, se ha propuesto como una “marca neuronal” para la remoción de los contactos sinápticos (Cardozo, y cols., 2019; Goddard, y cols., 2007; Huh, y cols., 2000). Las células microgliales pueden interactuar con las espinas en el segmento inicial del axón (AIS) de las neuronas. El AIS es un dominio localizado en el área proximal entre el soma/axón (20-60um), que es el mayor regulador de la excitabilidad neuronal, manteniendo la polaridad celular, tanto eléctrica como química, debido al aislamiento de los compartimentos somatodendrítico y axonal (Baalman y cols., 2015; Bolós y cols., 2019). Para la interacción entre células microgliales y AIS, se necesita la presencia de una proteína de andamiaje Ankirina G, la cual se encuentra en las AIS que permite su plegamiento (Kordeli, Lambert y Bennett, 1995; Leterrier, 2018). La ausencia de Ankirina G disminuye la interacción de las células microgliales y las AIS (Baalman, y cols., 2015).

La exposición crónica a los glucocorticoides como consecuencia de eventos de estrés prolongados representa un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Swaab, y cols., 2005). La exposición a DEX (glucocorticoide sintético) disminuye la densidad de espinas dendríticas, aumenta la proliferación e induce un fenotipo activado de células microgliales en el área de CA1 del hipocampo a los 6 meses en modelos murinos de Alzheimer. Lo opuesto sucede cuando se les administra mifepristona (RU- 486) antagonista del receptor a GC, ya que aumenta la densidad de espinas y disminuye la densidad de las células microgliales (Pedrazzoli, y cols., 2019). El estrés crónico como estado pro-inflamatorio se ha propuesto que induce cambios morfológicos en las células microgliales en diferentes áreas cerebrales (hipocampo, corteza

prefrontal) y la secreción de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF- α) (Roque, y cols., 2016; Banqueri, y cols., 2019; Viviani, y cols., 2014). La MS aumenta la población de las células microgliales durante la segunda semana posnatal (Delpech, y cols., 2016) cambio que perdura hasta la edad adulta (Banqueri, y cols., 2018). Una MS breve de 1 hora incrementa el número de espinas inmaduras y disminuye las espinas maduras en el área CA1 del hipocampo en animales juveniles de 28 días de edad (Wei, y cols., 2015).

De igual manera, algunos neuropéptidos relacionados con la respuesta al estrés como la CRH, podrían estar involucrados en la plasticidad sináptica, como es la poda sináptica y la remodelación de los árboles dendríticos en estructuras como el hipocampo (Johnson y Kaffman, 2018). La CRH puede activar receptores que se encuentran en el soma y las espinas en el segmento inicial del axón, lo que en situaciones de ELS se ha relacionado con una alteración en la arborización de las espinas dendríticas y podría repercutir en la formación de la memoria dependiente de hipocampo (Short, y cols., 2020).

1.6 Plasticidad sináptica y la conducta

Los eventos adversos durante la infancia no solo tienen consecuencias sobre los procesos moleculares y fisiológicos del individuo, sino que también se ven reflejados en sus acciones conductuales. Las interacciones sociales, los estados de ánimo (ansiedad, tristeza, depresión), así como los procesos cognitivos que ocurren en la conducta humana pueden ser abordados utilizando modelos murinos. El estrés altera los patrones de arborización dendrítica de las células piramidales del hipocampo durante el desarrollo (Zhou, y cols., 2010), y provoca una disminución de marcadores de plasticidad sináptica como PSD95 y sinaptofisina durante el desarrollo (Andersen y Teicher, 2004; Liao, y cols., 2014); algunos autores han propuesto una relación con deficiencias en los procesos de aprendizaje y memoria a largo plazo (Lajud, y cols., 2012). De acuerdo con esto, Lesuis y cols. (2019) mostraron que el ELS altera el recuerdo al miedo y provoca una disminución de subunidades del receptor NMDA (GluN2B) en el hipocampo en animales adultos (6 meses).

El ELS altera la sincronización de las redes neuronales de la corteza prefrontal, el hipocampo y la corteza perirrinal en tareas de evaluación de habilidades cognitivas (reconocimiento de objetos y desplazamiento de objetos) en animales juveniles, siendo los machos los más afectados, mientras que las hembras no muestran un deterioro (Reincke y Hanganu-Opatz, 2017).

La expresión del gen c-Fos se utiliza para analizar la actividad y la plasticidad neuronal relacionado con una tarea, como el laberinto acuático de Morris, toma de decisiones (prueba de Iowa Gambling), entre otras (Hasselt, y cols., 2012; Hernández-Pérez, y cols., 2019). El estrés es un estímulo que induce la activación de diferentes estructuras cerebrales (Horii-Hayashi, y cols., 2013; Kovács, y cols., 2018). La exposición repetida a un mismo estresor reduce la expresión de c-Fos, lo cual se relaciona con una disminución de activación neuronal (Girotti, y cols, 2006; Weinberg, y cols., 2009). La SM aumenta la activación neuronal de estructuras como el hipocampo, la corteza cingulada y la amígdala medial en animales de dos meses de edad, esto se asoció con el desarrollo de conductas de tipo depresivas al evaluarlas en el laberinto elevado en cruz (Troakes y Ingram, 2009). Adicionalmente, la SM altera el aprendizaje y la memoria en tareas específicas, como en tareas de evitación inhibitoria en las cuales observan una disminución en el aprendizaje, mientras que en reconocimiento de objetos no se observan diferencias significativas. El patrón de expresión de c-Fos y GCR se modifica en el hipocampo de los animales sometidos a estrés y después de exponerlos a un ambiente enriquecido (Vivinetto, y cols., 2013).

Estos eventos muestran una interacción de factores como el estrés durante el desarrollo y los procesos celulares cerebrales, lo que podría resultar en una conducta que puede ser maladaptativa en un entorno social.

2. Planteamiento del problema

El ELS produce una respuesta pro-inflamatoria asociada a las células microgliales que afectan la plasticidad sináptica del hipocampo (PSD95 y sinaptofisina) lo que induce deficiencias cognitivas en la memoria.

3. Hipótesis

La MS180 disminuirá la expresión de algunos marcadores asociados a la plasticidad sináptica del hipocampo (PSD95, sinaptofisina, Glu1A y c-Fos), e inducirá un aumento de espinas sinápticas en el segmento inicial del axón de las neuronas de la zona subgranular del giro dentado hipocampal, lo cual se asociará a los incrementos en la expresión de AVP hipotalámica y se manifestará en deficiencias cognitivas y conductuales.

4. Objetivos

General:

Investigar los efectos del estrés crónico por separación maternal sobre la plasticidad sináptica asociada a las alteraciones morfológicas de la microglía, las espinas dendríticas en el segmento inicial del axón de las neuronas de la zona subgranular del giro dentado hipocampal, y evaluar las consecuencias en el balance neuroendocrino y las alteraciones conductuales y cognitivas en la edad adulta.

Particulares:

4.1 Determinar los efectos del ELS sobre la morfología de las células microgliales en el hipocampo

4.2 Analizar los efectos de la MS180 sobre las espinas dendríticas en el segmento inicial del axón de las neuronas de la zona subgranular del giro dentado del hipocampo.

4.3 Evaluar los efectos de la MS180 sobre la expresión de AVP hipotalámica, la conducta y la memoria.

5. Materiales y métodos

5.1 Animales

Se utilizaron ratas de las cepas Wistar y Sprague Dawley (Bioterio de la facultad de medicina y del INB, UNAM). Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de bioterio (22° C de temperatura, 12 h luz/oscuridad, agua y comida *ad libitum*). Se tomaron 4 crías de rata de 5 días de edad (PND5) (2 machos y 2 hembras), para la analizar el AISS basal por medio de la tinción Golgi-Cox; otras 3 crías de PND9 fueron usadas para el marcaje ex vivo de DGC para el AISS en las sinapsis excitatorias; 10 animales jóvenes de PND50 (5 machos y 5 hembras) fueron usados para realizar pruebas de memoria de referencia al miedo. Todos los experimentos se realizaron siguiendo las normas de manejo y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-z001999), y las guías de American National Institutes of Health (ANIH). El diseño experimental utilizado para este trabajo se muestra en la figura 1.

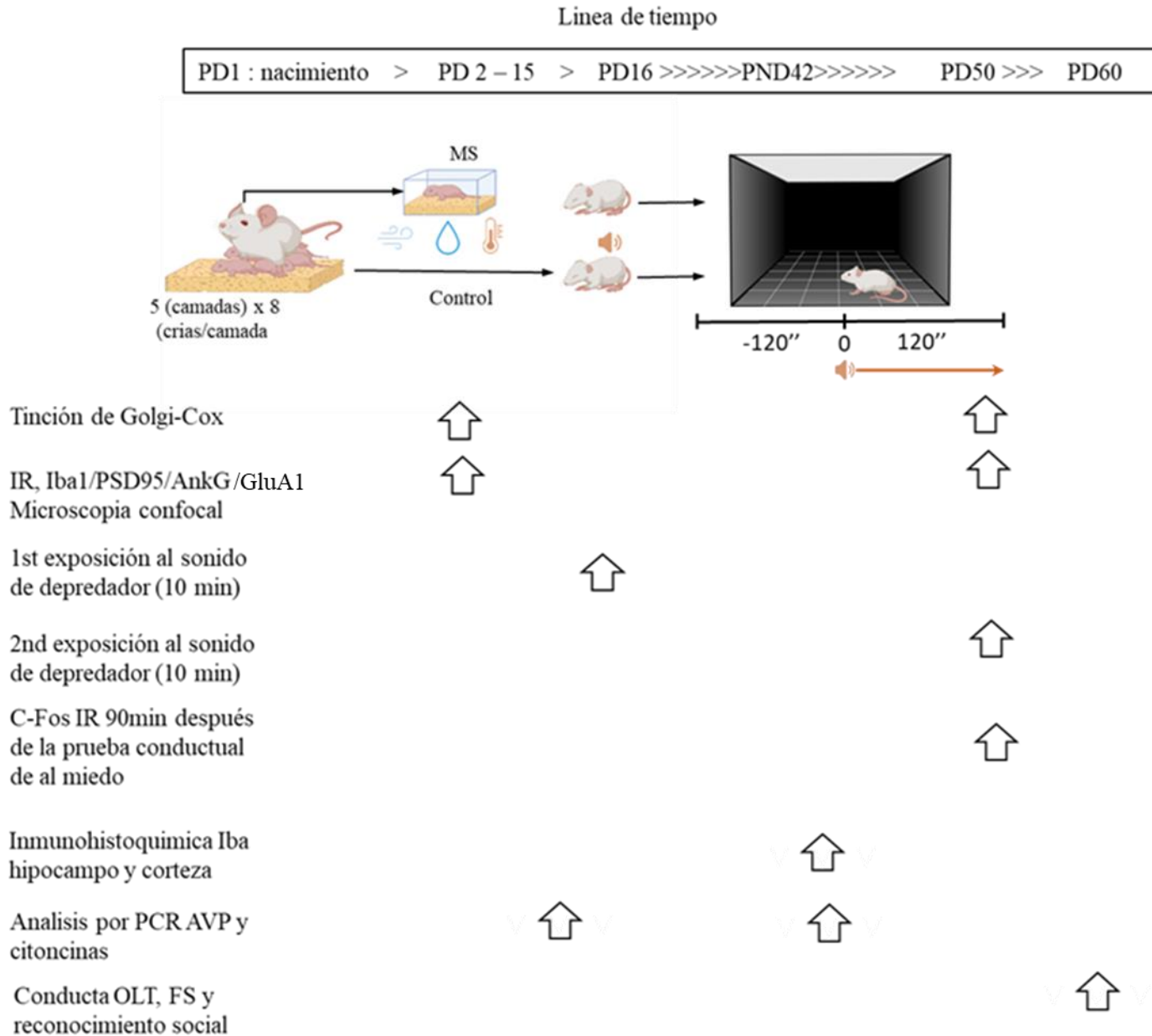


Figura 1. Diseño experimental. En la línea de tiempo se esquematiza las diferentes edades de los grupos utilizados para este trabajo. El día de nacimiento se consideró el día posnatal (PND)1, al PND2 se ajustaron las camadas, y se asignaron aleatoriamente los grupos control (CONT) o separación materna (MS). La MS se realizó del PND2-15. En la parte inferior se menciona los diferentes tipos de técnicas y tareas aplicadas en los grupos de animales en las diferentes edades. IR, inmunohistoquímica, PSD95, proteína de la densidad postsináptica 95, Ank-G, Ankirina G, GluA1, PCR, reacción en cadena de la polimerasa, AVP, arginina vasopresina, OLT, prueba de localización de objetos.

5.2 Estrés temprano por separación maternal (MS)

M. C. Ma. Angelica Roque Galicia. Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas.

El día de nacimiento se designó como día posnatal (PND) 1. Al PND 2 todas las crías se mezclaron. Las camadas se ajustaron a 8 individuos (6 machos y 2 hembras) y se distribuyeron aleatoriamente al grupo control, el cual se mantuvo bajo condiciones estándares de bioterio, y al grupo sometido a separación maternal (MS). A partir del PND2 las crías MS fueron separadas del nido y la madre, y transferidas todas juntas a una caja de plexiglás llena con una mezcla de aserrín limpio. Posteriormente fueron colocadas sobre un colchón térmico ajustado a 30-32°C en un cuarto independiente durante tres horas. El protocolo se repitió sistemáticamente del PND2 al PND15. Se sacrificaron camadas de animales al PND15. Se destinaron tres camadas por grupo para cada edad, para evitar efectos por camada; solo se utilizaron machos en esta parte de los experimentos.

Una cohorte de animales diferentes fue sometida al protocolo de la MS, y posteriormente las ratas fueron asignadas para el análisis de los efectos de la MS sobre la poda sináptica en crías (PND15) y juveniles (PND50); para esta parte del trabajo se utilizaron machos y hembras.

5.3 Reacciones inmuno-histoquímicas para Iba-1, PSD-95, GluA1, Ank-G y c-Fos

Los animales fueron anestesiados con una dosis letal de pentobarbital sódico (Sedalpharma, México, 63 mg/kg) y perfundidos vía aorta ascendente con solución salina al 0.9%; posteriormente los tejidos fueron fijados con solución fría (4° C) de paraformaldehído al 4% y ácido pícrico al 15% en amortiguador de fosfatos (PB) al 0.1 M a pH 7.4. Los cerebros fueron disecados y divididos en dos hemisferios, uno de los cuales fue utilizado para el análisis inmunohistológico y el otro para la tinción de Golgi. Para los análisis de inmunohistoquímica contra Iba-1, se tomaron diferentes cohortes de animales a diferentes edades de PND15, PND42, y después de las pruebas conductuales al PND50.

Se obtuvieron cortes coronales de un grosor de 70 µm en un vibratomo (LEica). Las secciones fueron colectadas e incubadas con anticuerpos de conejo

anti iba-1 (rabbit anti Iba-1, SKU: 290, 1:500, Biocare Medical, No. Cat. 019-19741, 1:1000, Wako) y de ratón anti PSD95 (mouse anti - PSD95, no. Cat. 75-028, 1:500, NeuroMab); ratón anti-ankirina G (Ank-G, 1:100, UC Davis, CA, USA; K2843) como anticuerpos primarios. Se mantuvieron en incubación durante 24 h a 4° C. Posteriormente fueron sometidos a varios lavados con PB, y las secciones fueron incubadas con los anticuerpos secundarios Alexa 488 anti conejo IgG (1:1000, Molecular Probes Inc. Eugene, OR) y Alexa Fluor 594 anti ratón (1:1000, Molecular Probes Inc. Eugene, OR), en solución TBST + suero de caballo al 1% por 24 h a 4°C. En seguida, las secciones fueron montadas con el medio de montaje para tejidos fluorescentes Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). Los cortes fueron analizados utilizando un microscopio confocal (Leica). Se analizó el marcaje de las células microgliales y su co-localización con PSD95 en la capa de células subgranulares del giro dentado (sGCL) en la formación hipocampal. Utilizamos la expresión del producto de la proteína del gen de respuesta temprana *c-fos* para analizar la activación neuronal. Tras la prueba conductual de la memoria al miedo, los animales se sacrificaron 90 minutos después y se realizó una inmunohistoquímica usando el anticuerpo primario de conejo anti c-Fos (Santa Cruz, SC-52, 100 µg/ ml, 1:1000, CA, USA) y se revelaron y se montaron en laminillas para su posterior análisis.

Se analizó el efecto del neuropéptido AVP sobre la morfología de las células microgliales. Se realizaron cortes coronales de una rata macho PND15 de la cepa Wistar. Se tomaron dos cortes de Bregma -3.00mm a -4.00mm. Los cortes fueron incubado a 37°C por 2 horas con CSF (corte control) o CSF con vasopresina 100nm (AVP, donado por el Dr. Maurice Manning, Universidad de Toledo, OH, USA). Posteriormente, los cortes fueron observados en un microscopio invertido (Nikon Eclipse E600FN), se eligieron las neuronas con buena visibilidad (células con núcleos grandes). Los cortes fueron fijados en paraformaldehído al 4% por 30 minutos, posteriormente con solución amortiguadora Trizma-base, y se realizó una inmunohistoquímica contra Iba1 y PSD95 como se describió antes. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio confocal como se describió antes.

5.4 Tinción de Golgi

Para esta parte del trabajo se utilizaron machos y hembras. Como se describió anteriormente, solo un hemisferio cerebral fue utilizado para el análisis de las espinas dendríticas mediante la tinción de Golgi. Se utilizó un kit comercial GolgiStain (FD Neurotechnologies), y se siguieron las especificaciones del fabricante. El tejido se dejó por dos semanas en una solución de impregnación, posteriormente se pasó a una solución amortiguadora y se procedió a cortarlo. El tejido cerebral fue procesado en un vibratomo (Leica) a 150 μm de grosor, los cortes fueron montados en laminillas gelatinizadas y se dejaron secar toda la noche. Las laminillas fueron lavadas en agua bidestilada y sometidas a una solución de revelado por 10 minutos, posteriormente se lavaron con agua bidestilada y se procedió a deshidratar los cortes en una serie de alcoholes (50%, 75%, 95% y 100%). Luego se sumergieron en xilol para aclarar el tejido. Por último, se utilizó Permunt como medio de montaje para cubrir las secciones y se dejaron secar. Las células granulares de la sGCL de la formación hipocampal fueron seleccionadas para el análisis de espinas dendríticas y en el segmento inicial del axón (AIS). Las células fueron dibujadas utilizando una cámara lucida para trazar todas sus proyecciones. Los criterios de inclusión de las células fueron que estuvieran completas para poder dibujarlas; la densidad fue reportada como el número de espinas por 10 μm de la longitud de la AIS. Finalmente, neuronas representativas fueron seleccionadas para realizar la reconstrucción completa de la morfología de las mismas.

5.5 Evaluación del recuerdo del miedo

La MS se asocia con alteraciones en el aprendizaje, la memoria del miedo y la conducta defensiva en la edad adulta cuya base morfológica podría ser una alteración en la morfología de la microglía y de las espinas del segmento inicial del axón al PND15 que se debería a la activación neuronal del hipocampo. Para este análisis se utilizó una cohorte diferente de animales y un diseño experimental para evaluar la memoria al miedo y la conducta defensiva. Se realizó la primera manipulación experimental al PND16, cuando se expusieron los animales (machos

y hembras) de ambos grupos control y MS180 a las vocalizaciones de gato (<https://www.youtube.com/watch?v=nwv1U7SI-c4>), con una duración de 10 minutos en una caja de madera con divisiones (60X60X40 cm³) independiente del bioterio. Posteriormente los animales fueron regresados al nido con sus madres. La segunda manipulación se llevó a cabo al PND50. Los animales fueron puestos de nuevo de manera individual en la caja de madera sin divisiones, durante 5 minutos y se les permitió explorar; en los próximos 5 minutos fueron expuestos a la misma grabación de vocalizaciones de gato. La conducta fue grabada. El análisis de la conducta fue realizado por un investigador sin conocimiento de los tratamientos. Las evaluaciones conductuales fueron realizadas cada 5 segundos (modificado de la literatura Detke, Rickels y cols., 1995, Zhang y cols., 2016, Zhang y cols., 2018); para el análisis se tomaron los primeros 120 segundos antes del sonido y los 120 segundos después del sonido. Los parámetros conductuales considerados y el puntaje que se les asignó fueron como sigue: congelamiento = 3 puntos, trepado = 2 puntos y levantado en dos patas = 1 punto. Después del experimento los animales fueron regresados a sus cajas de mantenimiento, en donde permanecieron con el menor ruido posible durante 90 minutos antes de la perfusión para la inmunohistoquímica de c-Fos.

5.6 Prueba de localización de objetos (OLT)

Al PND60 las ratas (macho) fueron sometidas a la prueba de localización de objeto; esta prueba evalúa la memoria espacial dependiente de hipocampo. Se realizó de acuerdo a lo descrito por el grupo de Lucassen y colaboradores (Loi, y cols., 2015). Se utilizó una caja de acrílico para la exploración de los objetos (80 cm × 60 cm × 30 cm). Alrededor de la arena en las paredes del cuarto se colgaron figuras geométricas. Se utilizaron dos objetos idénticos para la exploración. Para la prueba de localización de objetos (OLT), los animales fueron expuestos a una sesión de habituación de 10 min un día antes de la prueba, una fase de entrenamiento o exploración durante 10 min, y una fase de prueba durante 10 min. Una hora después de la exploración, uno de los objetos fue movido en diagonal con respecto al otro objeto. Todas las pruebas fueron video grabadas. Los videos se analizaron usando

el programa EVENTLOG (versión 1.0 October 1986, R Hendersen). El índice de discriminación fue calculado como lo describió Vogel-Ciernia y Wood (Vogel-Ciernia y Wood, 2014) (tiempo de exploración del objeto en la nueva localización – tiempo de exploración del objeto en la localización familiar) / (tiempo total explorando ambos objetos). En el análisis solo se reportaron los primeros 3 min de la prueba.

5.7 Prueba de discriminación social.

Al PND64 las ratas (macho) fueron sometidas a la prueba de discriminación social. Esta prueba se realizó de acuerdo con lo descrito por Neumann and colaboradores, (Lukas y cols., 2011). La habilidad de discriminación entre un individuo conocido y uno nuevo fue analizada. Las ratas fueron puestas individualmente en una arena (80 cm × 60 cm × 30 cm) con material de nido limpio. Las ratas se dejaron por 15 min de habituación 24 h antes de la prueba. Una rata hembra (periodo pro-estro) fue introducida en la arena de la rata experimental por 4 min (periodo de adquisición). Se dejó pasar un intervalo de una hora después de la adquisición, para posteriormente exponer a la rata hembra conocida con una rata hembra nueva, por 4 min (periodo de discriminación social). Todas las pruebas fueron grabadas. Los videos de analizaron usando el programa EVENTLOG (versión 1.0 October 1986, R Hendersen). Se analizó el tiempo de investigación con la rata conocida y la nueva (tiempo de investigación de la rata conocida o nueva / tiempo de investigación total con la rata conocida y la rata nueva X 100).

5.8 Colección de tejido y muestras de plasma de neonatos

Los animales se sustrajeron del nido y fueron inmediatamente sacrificados por decapitación, cuidando de que no transcurrieran más de tres minutos desde el inicio de la manipulación. Se disecó el hipocampo y el hipotálamo, las muestras fueron almacenadas en solución de trizol (Invitrogen) y se mantuvieron a -30 °C, hasta su procesamiento. También se tomaron muestras de sangre troncal para determinar concentraciones de corticosterona. Las muestras se colectaron en tubos con aprotinina y EDTA (ácido etilendiamino-tetra-acético 10% a pH 8) y se centrifugaron para separar el plasma. Posteriormente, el plasma fue almacenado a -20° C hasta su procesamiento.

5.9 Extracción de mRNA y reacción de RT-PCR

Al PND15 una cohorte de animales fue destinada para el análisis de expresión de genes, y se disecó el hipocampo y el hipotálamo. La extracción de mRNA del hipotálamo y el hipocampo se realizó siguiendo las indicaciones del distribuidor (Trizol reagent, Invitrogen). Para la reacción de RT-PCR se utilizó 1 µg de la muestra de RNA, y se utilizó el kit de la M-MLV RT (200 U, Invitrogen). Por último, se cuantificó en un espectrofotómetro el cDNA para determinar la cantidad y pureza del mismo. Se diseñaron las secuencias de oligonucleótidos (tabla 1) para la determinación de la expresión de AVP en el hipotálamo y citocinas (IL-1β, IL-6 y TNF-α) en el hipocampo. Se utilizó Veriquest Fast Sybr Green Master Mix (USB Affymetrix inc.), oligonucleótido directo y reverso (Eurofins MWG Operon) y cDNA (250 ng), para obtener un volumen final de 10 µl por reacción. Se utilizó un termociclador para PCR en tiempo real (Step One plus, Applied biosystems). Las temperaturas fueron: de desnaturalización 95° C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94° C por 15 s; alineamiento a 58°C-62°C por 30 s, y extensión a 72° C por 30 s. Posteriormente se normalizaron los datos con el gen endógeno, y se analizaron por el método delta-delta CT considerando a los animales adultos como referencia. Las muestras se corrieron por duplicado.

Gen (Número de acceso)	Posición de la secuencia	Secuencia de oligonucleótidos (5'-3')	Temp (°C)	Longitud de producto
AVP NM_016992.2	Directo Reverso	GCAAGAGGGCCACATCCGACAT GCAGGGCGAGGGCAGGTAGTTCT	58°C	170bp
TNF-α NM_12675.3	Directo Reverso	TGGCGTGTTCATCCGTTCTCTACC CCCGCAATCCAGGCCACTACTT	62°C	215 bp
IL-1β NM_031512.2	Directo Reverso	TGAGGCTGACAGACCCCAAAGAT GCTCCACGGGCAAGACATAGGTAG	60°C	181 bp
IL-6 NM_012589.2	Directo Reverso	AGCCACTGCCTTCCCTACTTCA GCCATTGCACAACCTTTTTCTCA	59°C	154 bp
GAPDH NC_005103.4	Directo Reverso	CACGGCAAGTTCAACGGCACAGT TCAGCGGAAGGGGCGGAGAT	60°C	224 bp

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos

5.10 Análisis Estadístico

M. C. Ma. Angelica Roque Galicia. Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas.

Calculamos la media y el error estándar (EST) de los valores obtenidos. Posteriormente, realizamos un análisis de varianza de dos vías (ANOVA). También realizamos un análisis comparativo pos-hoc de Tukey, así también realizamos análisis con prueba T de Student.

6. Resultados

Las células granulares del giro dentado del hipocampo se ilustran con imágenes representativas de un macho y una hembra en PND5 (Figs 2A, B). Una de las células granulares ejemplifica el marcaje con neurobiotina, lo que permite visualizar las espinas en el segmento inicial del axón (Fig. 2C). La expresión de la subunidad del receptor ionotrópico de glutamato GluA1 se muestra en una célula granular (Figs 2E, F); también se presenta una sinapsis de tipo uno en la que un axón inmunopositivo al AVP contacta una AIS (Fig 2G).

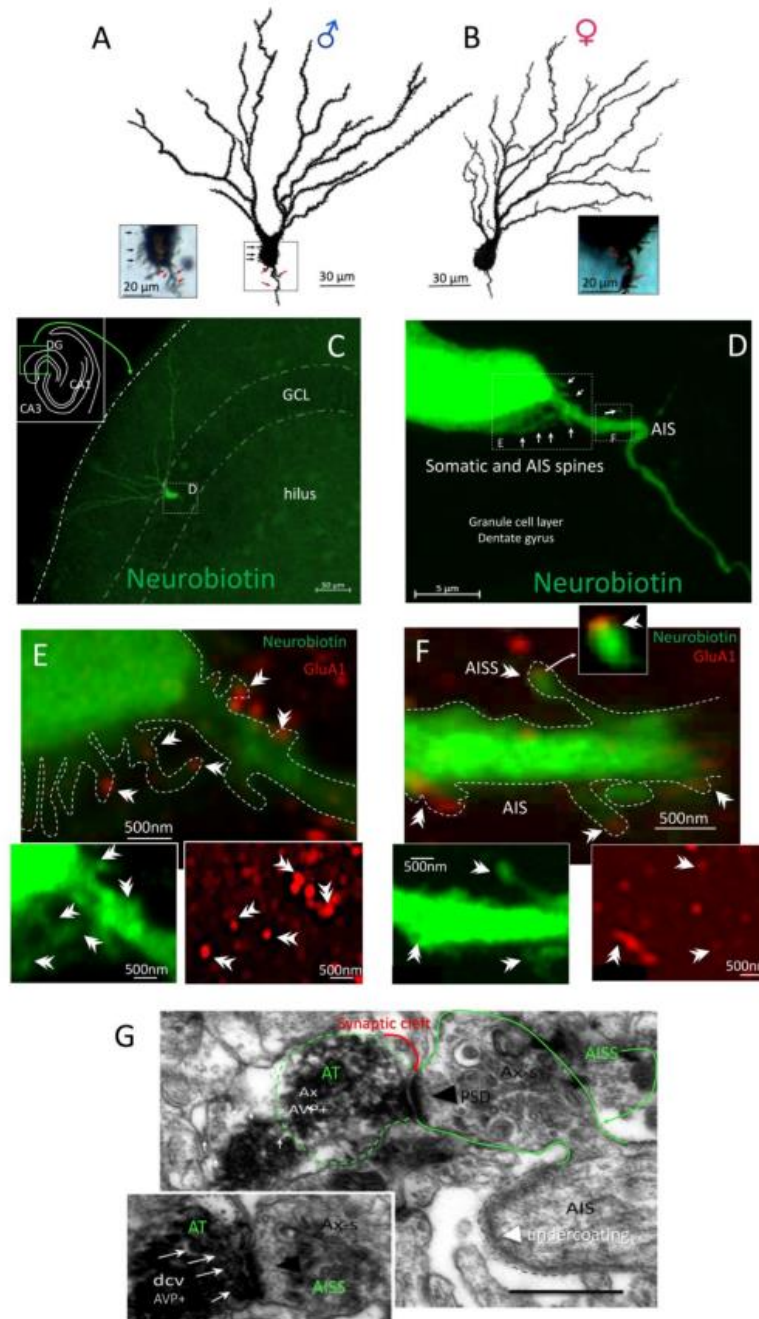


Fig. 2 Las células granulares en el giro dentado presentan espinas en el segmento inicial del axón/soma al PND5. Las ilustraciones mostradas en A y B se muestran reconstrucciones representativas hechas en cámara lucida de células granulares teñidas con la técnica Golgi-Cox de un macho (A) y una hembra (B) en ratas al PND5. Las fechas negras indican las espinas somáticas y las fechas rojas las espinas del AIS. En el inciso C se muestra una proyección de una neurona

granular con neurobiotina de una rata macho al PND9. En el inserto se muestra la localización en el corte hipocampal. En el inciso D, se muestra una magnificación de una región del segmento inicial del axón con procesos parecidos a espinas. En los incisos E y F se muestran células positivas a neurobiotina y al receptor de glutamato AMPA, la subunidad GluA1 y los puntos que co-localizan con las cabezas de los AISS (fecha doble) en los planos confocales sencillos (fotos de abajo). En la fotomicrografía G se muestra una microscopia electrónica de una AISS (línea verde continua) que recibe una sinapsis Gray tipo I (asimétrica, con densidad postsináptica (PSD, flechas negras)) hecha por un axón terminal (Ax, línea punteada), la cual es inmuno positiva a vasopresina (AVP). Las flechas blancas en el inserto muestran las vesículas de núcleo denso (dcv) de AVP. Estos experimentos se realizaron en ratas de la cepa Wistar.

Posteriormente, se analizó la densidad de las AISS en las células granulares del hipocampo de machos y hembras sometidas a MS180 fueron reconstruidas con la cámara lúcida en PND15 y PND50 (Fig. 3A-B). Al PND15, observamos que los machos MS180 tienen una mayor densidad de AISS por segmento axonal de 10 μm que el grupo control (Cont Vs Ms180; Prom \pm EST; 2.75 ± 0.18 Vs 5.35 ± 0.25 , $n=20$); de manera similar se observó en las hembras sometidas a MS180 (Cont Vs Ms180; Prom \pm EST; 2.5 ± 0.18 Vs 5.35 ± 0.20 , $n=20$), también se observó una mayor densidad de AISS al PD50 tanto en machos (Cont Vs Ms180; Prom \pm EST; 1.65 ± 0.15 Vs 2.65 ± 0.16 , $n=20$) como hembras (Cont Vs Ms180; Prom \pm EST; 1.3 ± 0.19 Vs 3.85 ± 0.15 , $n=20$) (Fig. 3.C). El análisis de ANOVA de tres vías no encontró efecto del sexo ($F_{1,152} = 1.3$, $P=0.26$), mientras que la edad ($F_{1,152} = 149$, $P<0.001$) y el tratamiento ($F_{1,152} = 286$, $P<0.001$) si mostraron significancia en la densidad de AISS, mientras que la interacción de los tres factores fue estadísticamente significativa ($F_{1,152} = 6$, $P=0.02$). Se realizó una prueba de comparaciones múltiples de Tukey para comparar las medias; los resultados se muestran en la tabla de la figura 3C'.

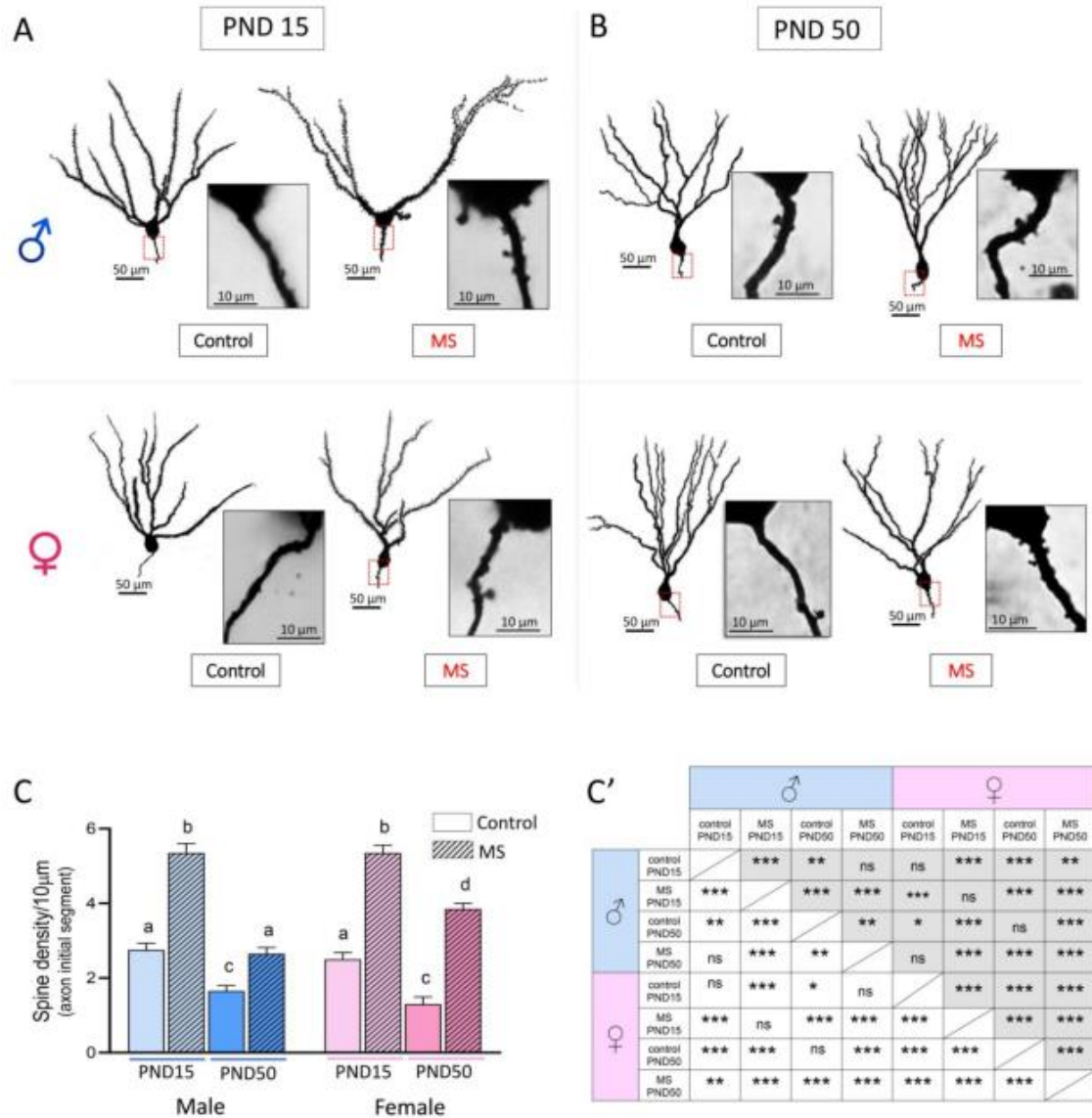


Fig. 3 La densidad de las espinas del segmento inicial del axón (AISS) de las células granulares del giro dentado es incrementada por la MS y disminuida por la edad entre PND15 y PND50, pero no afectada por el sexo. En los incisos A y B se muestran reconstrucciones de la cámara lucida de células inmunoteñidas con la técnica Golgi-Cox; en los insertos se muestran microfotografías de los AIS que muestran espinas, esto tanto en machos como en hembras de los grupos control y MS al PND15 (A) y al PND50 (B). En el panel C se muestra un histograma de la densidad de las espinas del segmento inicial del axón (AISS) de las células granulares del giro dentado de acuerdo a sexo, edad y tratamiento, y el resultado del análisis de ANOVA de tres vías. Se seleccionaron cuatro neuronas por rata (n=5, ratas de la cepa Wistar) de cada grupo. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes (P<0.05). Los detalles de los valores de P en las comparaciones múltiples se muestran en la tabla C' donde: *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001.

Al PND50 los animales fueron sometidos a una prueba en la caja de campo abierto (OFB) para evaluar el recuerdo al miedo; en la figura 4 se muestran los resultados. Los datos antes de la exposición al sonido del depredador del grupo control y MS, en los puntajes paramétricos de la conducta de los machos (Cont Vs Ms180; Prom \pm EST; 16.4 ± 1.02 vs 22.4 ± 1.02 , n=5) y las hembras (Cont Vs Ms180; 16 ± 0.7 vs 17.2 ± 0.3 , n=5), se realizó por separado el análisis de ANOVA de dos vías con el tratamiento y el sexo como factores (Fig. 4A). El análisis antes de la exposición al sonido mostró efecto significativo del tratamiento ($F_{1,16} = 8.35$, $p < 0.001$), del sexo ($F_{1,16} = 11.4$, $p < 0.01$) y de la interacción ($F_{1,16} = 18.8$, $p = 0.01$) de estos factores. Similar a lo anterior, se comparó a los grupos después de la exposición al sonido; los puntajes paramétricos en los machos (Cont vs Ms180; Prom \pm EST; 25.4 ± 1.66 Vs 39.4 ± 2.1 , n=5) y en las hembras (Cont vs Ms180; 27.6 ± 1.9 Vs 40.4 ± 1.6 , n=5). El análisis de ANOVA después de la exposición al sonido mostró efecto significativo del tratamiento ($F_{1,16} = 51.5$, $p < 0.001$), pero no del sexo ($F_{1,16} = 0.735$, $p = 0.4$) y tampoco de la interacción ($F_{1,16} = 0.103$, $p = 0.75$) de estos factores.

Las conductas activa y pasiva de los animales se evaluaron con la prueba de recuerdo al miedo. El análisis de las conductas activas (trepadora, levantarse en dos patas) o pasiva (congelamiento). Los datos de la conducta pasiva de los grupos control y MS mostraron que los puntajes paramétricos de los machos (Cont vs Ms180; Prom \pm EST; 1.8 ± 0.7 Vs 2.4 ± 1.12 , n=5) y las hembras (Cont vs Ms180; 10.8 ± 1.12 Vs 21 ± 1.5 , n=5) responden de manera diferencial. Se realizó el análisis de ANOVA de dos vías con el tratamiento y el sexo como factores. Este análisis mostró efecto significativo del tratamiento ($F_{1,16} = 22.4$, $p < 0.001$) del sexo ($F_{1,16} = 33.03$, $p < 0.001$), pero no de la interacción ($F_{1,16} = 1.02$, $p = 0.33$) de estos factores (Fig. 4B). Se utilizó una prueba t para comparar a los machos y hembras de los grupos control y MS; se observó que los machos y las hembras MS son diferentes de los controles (machos: $p < 0.05$; hembras: $p < 0.01$). Mientras en los datos de la conducta activa, observamos que los puntajes paramétricos de los machos (Cont vs Ms180; 23 ± 1.2 vs 30.4 ± 1.6 , n=5) y las hembras (Cont Vs Ms180; 16.8 ± 1.39 vs 19.4 ± 2.01 , n=5) tienen comportamientos distintos. El análisis de ANOVA de dos

vías con el tratamiento y el sexo como factores mostró un efecto significativo del tratamiento ($F_{1,16} = 9.84, p < 0.01$) y del sexo ($F_{1,16} = 29.12, p < 0.001$), pero no de la interacción ($F_{1,16} = 2.26, p = 0.15$) de estos factores. Se realizó una prueba t para comparar a los machos y hembras de los grupos control y MS; se observó que los machos MS son diferentes con respecto al grupo control ($p < 0.01$), mientras que las hembras no son diferentes entre ellas ($p = 0.31$) (Fig, 4B).

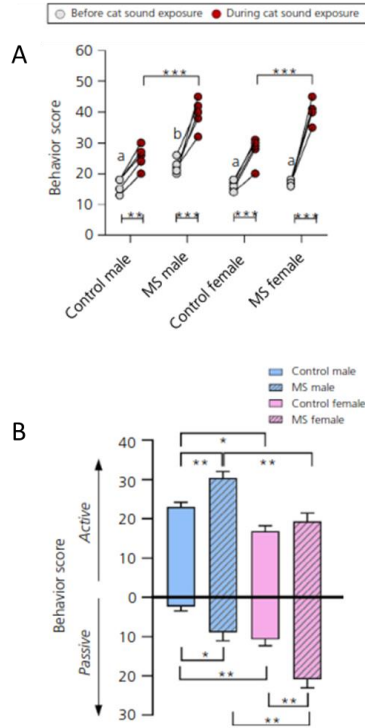


Figura 4. El estrés en las etapas tempranas de la vida de manera sub-crónica y a corto plazo impacta el comportamiento en respuesta al miedo en animales adolescentes. La caja de campo abierto (OFB) modificada fue usada para analizar la conducta defensiva antes y después de la exposición al sonido de un depredador. Los registros fueron realizados por investigadores a ciegas de los grupos experimentales. Los puntajes paramétricos fueron tomados cada 5 segundos para el levantamiento de dos patas (asignado como 1), trepadora (asignada como 2) y congelamiento (asignada como 3) y "0" fue asignada cuando realizaba alguna conducta diferente a las antes mencionadas. Para este experimento participaron los grupos control y MS de ambos sexos. La primera parte del experimento consistió en exponer a los grupos control y MS a un evento de estrés al PND16 (edad infantil equivalente a los 5 años en humanos), es decir al sonido de un depredador por 10 minutos. La segunda parte del experimento consistió en analizar la conducta al PND50 (una edad juvenil en rata equivalente a la adolescencia en humanos). La primera parte de la prueba se dejó a los animales explorar libremente por la OFB por 5 minutos. En la segunda parte fueron expuestos a una grabación del sonido de gato a lo que previamente fueron expuestos los grupos control y MS, por 5 minutos. Se tomaron los primeros 120 segundos previos y después del inicio del sonido para el análisis. En el panel A se muestran los resultados de la prueba de recuerdo-memoria, comparando las conductas de los grupos control y MS. Los puntos grises indican el puntaje de la conducta antes del sonido del gato y los puntos rojos indican los puntajes durante la exposición al sonido de gato. En el panel B se muestran los resultados comparativos de la conducta que fue

analizada como activa o pasiva de los grupos control y MS. Las conductas defensivas que fueron divididas en activas (levantamiento de dos patas y trepadora) o pasiva (congelamiento). N=5 ratas de la cepa Wistar/grupo; *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001 con respecto a su grupo control. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes (P<0.05).

Posteriormente se analizó la activación neuronal usando a la proteína c-Fos en las células granulares del giro dentado del hipocampo ventral y dorsal (figuras 5B y 5C, respectivamente), 90 minutos después de la prueba OFB. El número de núcleos c-Fos+ en el giro dentado ventral de los machos (Cont vs Ms180; Prom \pm EST; 39.2 ± 1.4 vs 45.4 ± 1.1 , n=10, dos campos por rata) y hembras (Cont vs Ms180; 47.1 ± 1.8 vs 70.5 ± 0.96 , n=10, dos campos por rata) se estimó y se realizó un análisis de ANOVA de dos vías, con los factores tratamiento y sexo. El análisis mostró un efecto del tratamiento ($F_{1, 36} = 115$, p<0.001), del sexo ($F_{1, 36} = 143$, p<0.001) y de la interacción ($F_{1, 36} = 38.8$, p<0.001) de factores. El análisis post-hoc con la prueba de Tukey mostró diferencias entre los machos (p<0.05) y hembras (p<0.001) del grupo MS comparado a los grupos control. De manera similar se analizó el número de núcleos c-Fos+ en el giro dentado dorsal del hipocampo de los diferentes grupos de machos (Cont vs Ms180; 29.2 ± 1.73 vs 39.2 ± 1.43 , n=10, dos campos por rata) y hembras (Cont vs Ms180; 46.3 ± 1.72 vs 67.8 ± 1.97 , n=10, dos campos por rata). En el análisis de ANOVA de dos vías, se observó un efecto del tratamiento ($F_{1, 36} = 88.87$, p<0.001), del sexo ($F_{1, 36} = 187$, p<0.001) y de la interacción ($F_{1, 36} = 11.84$, p<0.01) de factores. El análisis post-hoc con la prueba de Tukey, mostró diferencias entre los machos (p<0.001) y hembras (p<0.001) del grupo MS comparado a los grupos control. En la figura 5D se muestra una fotografía representativa de las inmunotinciones de c-Fos para los diferentes grupos.

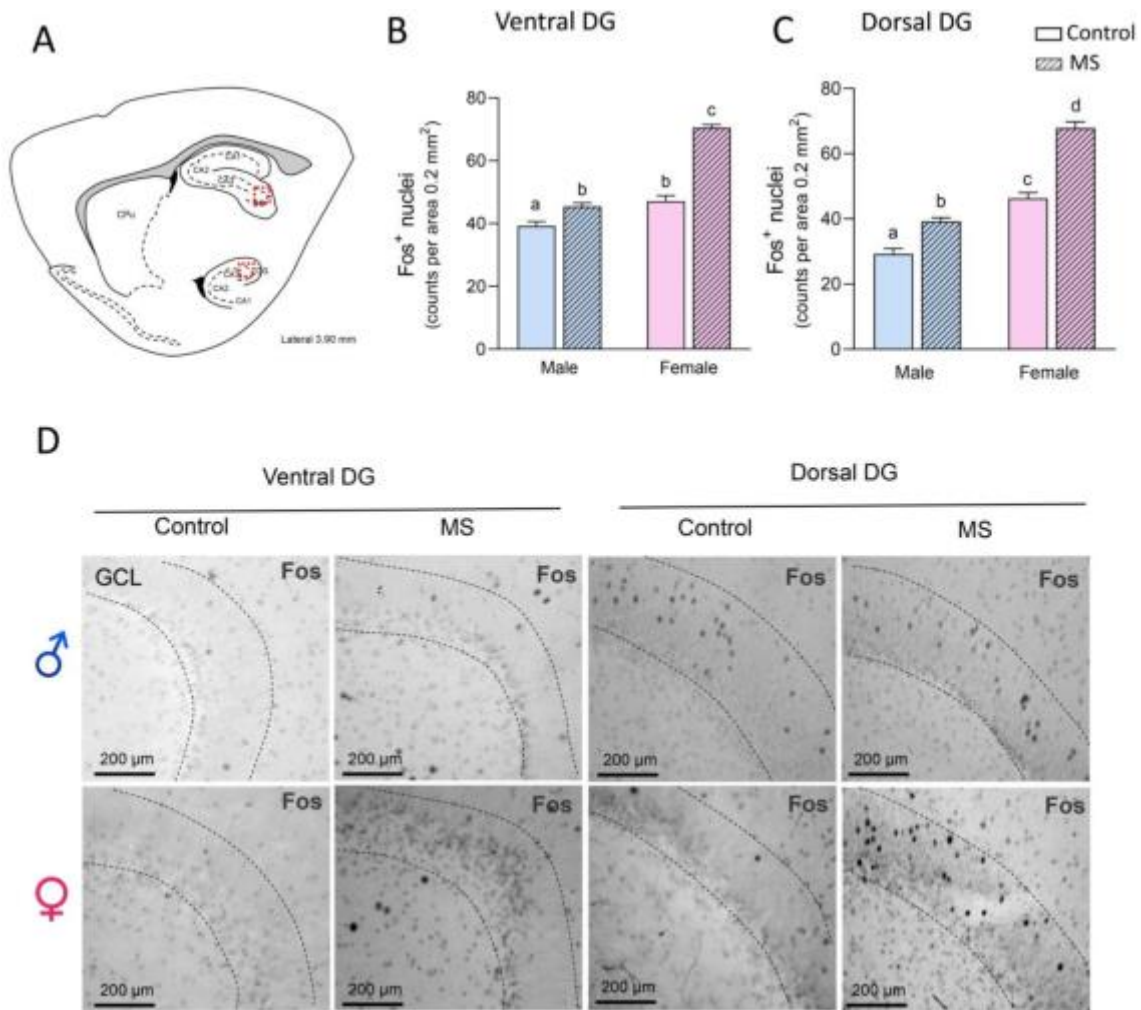


Figura 5. La MS incrementa la activación neuronal en el giro dentado ventral y dorsal después de la prueba del recuerdo del miedo al PND50. En el panel A se muestra la localización del análisis de activación por c-Fos. En los incisos B y C, se muestra la cuantificación de los núcleos c-Fos+ en el giro dentado ventral (B) y dorsal (C). En el panel D se muestran microfotografías de los grupos analizados. N=2 campos por rata, se analizaron n=5 ratas por grupo/ratas de la cepa Wistar. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

A continuación, describimos la presencia de células microgliales durante el desarrollo (PND15) en la capa granular del hipocampo y que esta microglía puede estar asociada con el AISS. En la figura 6, se muestran fotografías de la capa granular del hipocampo, estas muestran una inmunotinción para microglía (Iba 1, verde) y ankirina G (Ank-G, rojo).

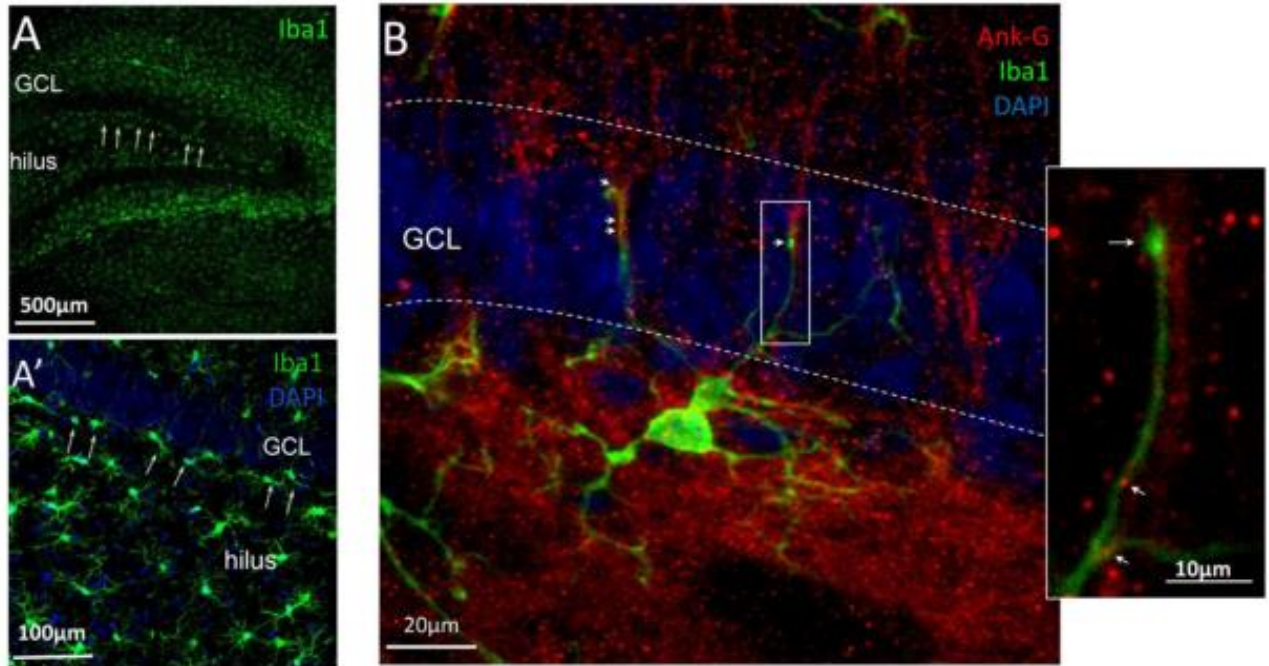


Fig. 6 Células microgliales son asociadas al AIS en la formación hipocampal dorsal, en la zona subgranular (sGCZ) al PND15. En los paneles A y A' se muestra una subpoblación de microglía inmuno positiva a Iba-1 localizada en el hilus alineada con las sGCZ (flechas blancas). En el panel B se muestra una co-tinción con ankirina G e Iba-1, así como su localización en la densidad postsináptica y la interacción de los procesos marcados. Las flechas blancas indican la co-localización de ankirina G con los procesos de Iba-1. La tinción con DAPI fue usada como contratinción para visualizar los núcleos de las células de la capa granular (GCL), estos experimentos se realizaron en ratas de la cepa Wistar.

Posteriormente realizamos un análisis de la morfología de las células microgliales durante el desarrollo (PND15) y la presencia de la proteína de la post-sinapsis PSD95. En la figura 7A-D, se muestran fotografías representativas de inmunotinciones contra Iba-1 y PSD95 en la capa granular del giro dentado, y en los paneles 7E-H se muestran fotos y sus magnificaciones de una célula microglial y la presencia de PSD95, en cada uno de los grupos Control y MS (machos y hembras) al PND15. En este análisis se cuantificaron el número de ramificaciones de las células microgliales de los machos (Cont vs Ms180; 29.2 ± 1.54 vs 49.5 ± 1.7 , $n=10$, dos campos por rata) y de las hembras (Cont vs Ms180; 1.4 ± 2.32 vs 70.9 ± 3.96 , $n=10$, dos campos por rata) (figura 7I). También se analizaron el número de los puntos PSD95+. En el análisis de ANOVA de dos vías, se observó un efecto del tratamiento ($F_{1,36} = 99.27$, $p < 0.0001$), y del sexo ($F_{1,36} = 46.27$, $p < 0.0001$), pero no

de la interacción ($F_{1, 36} = 2.4$, $p=0.1$) de factores. Se compararon los grupos utilizando un t de Student, y observamos que los machos MS son diferentes de los controles ($p<0.00001$) y lo mismo se observa en las hembras MS ($p<0.00001$) en el número de ramificaciones de las células microgliales. En la gráfica 7J se muestra el análisis del número de los puntos PSD95+ por célula Iba-1 en los machos (Cont Vs Ms180; 4 ± 0.3 vs 1.8 ± 0.2 , $n=10$, dos campos por rata) y hembras (Cont vs Ms180; Prom \pm EST; 4.5 ± 0.5 vs 1.3 ± 0.2 , $n=10$, dos campos por rata). En el análisis de ANOVA de dos vías, se observó un efecto del tratamiento ($F_{1, 36} = 59.38$, $p<0.0001$), pero no del sexo ($F_{1, 36} = 0$, $p>0.9$), ni de la interacción ($F_{1, 36} = 2.36$, $p=0.1$) de factores. Se compararon los grupos utilizando un t de Student, y observamos que los machos MS son diferentes de los controles ($p<0.0001$) y lo mismo se observa en las hembras MS ($p<0.00001$) en el número de puntos PSD95+.

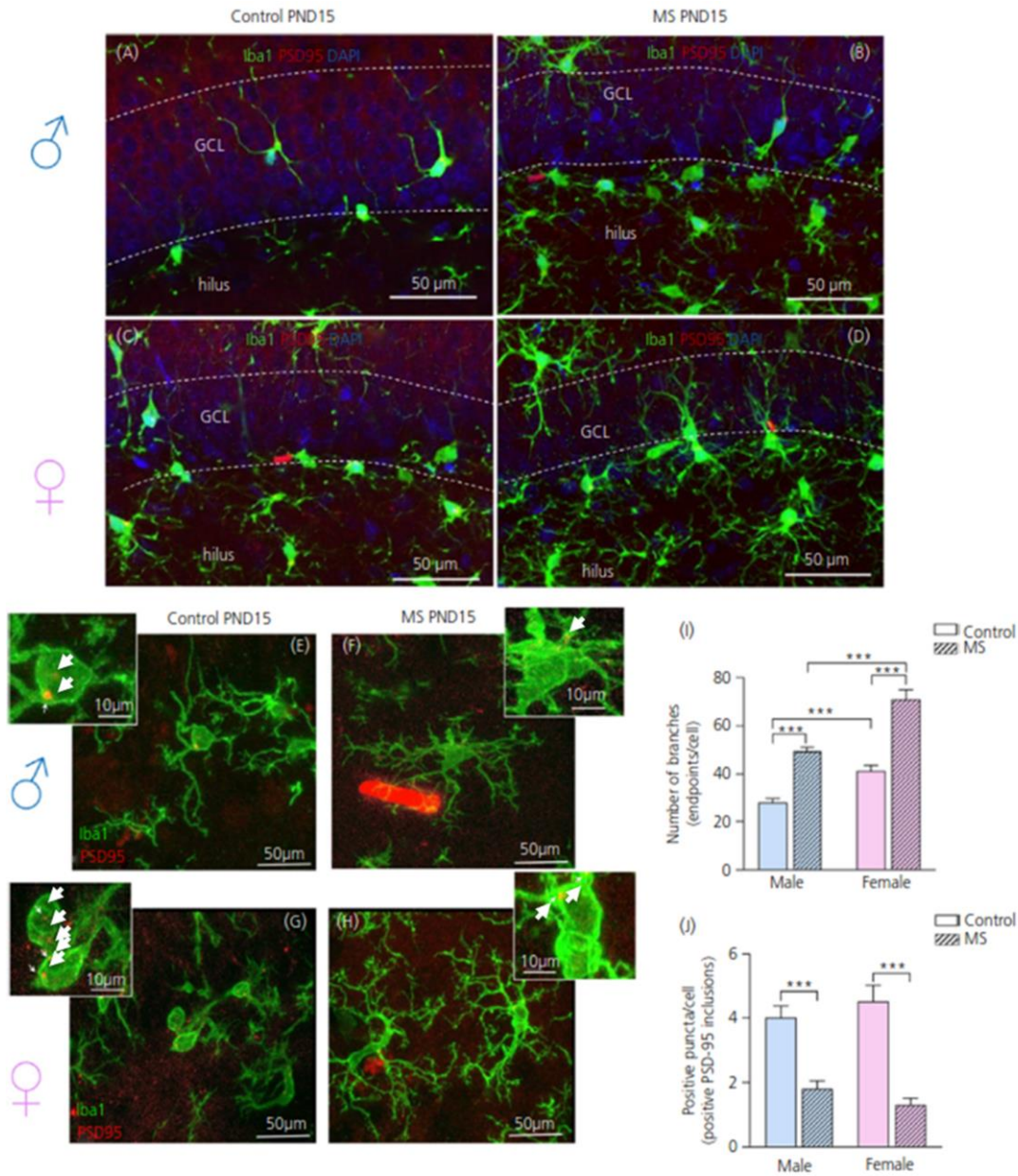


Figura 7. La MS incrementa la morfología hiper-ramificada de la microglia y disminuye la engullición de los puntos PSDS-95 por la microglia. Las fotomicrografías de los paneles A-D muestran ejemplos de células microgliales con diferente morfología (hiper-ramificada en machos y hembras MS, paneles B y D; animales control macho y hembras A y C). Los puntos PSD-95 positivos localizados en el interior de células microgliales en la zona subgranular del giro dentado. En los paneles E-H se muestran las fotomicrografías representativas de los grupos; se observa un incremento de los puntos PSD-95 en el citoplasma de las células Iba-1 positivas, tanto en machos como en hembras MS; en el inserto de flechas muestran los puntos PSD-95. El panel I muestra la cuantificación de la ramificación de las microglia, mientras que en el panel J se muestra en análisis de los puntos positivos PSD-95 por célula Iba-1. Cada barra muestra la media + EST de las células microgliales, n=10 por grupo/ratas de la cepa Wistar.

Posteriormente, se analizó el efecto de AVP sobre las células microgliales en cortes hipocampales ex vivo (Figs. 8A, B). Se realizó un análisis comparativo del número de ramificaciones de células microgliales con incubación de líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) y las células incubadas con AVP (ACSF vs AVP; 7.6 ± 0.7 vs 13.27 ± 0.9 , $n=10$ células), para ello utilizamos una t de Student y se observó una diferencia significativa entre el grupo ACSF y AVP ($p<0.001$) (Fig. 8C).

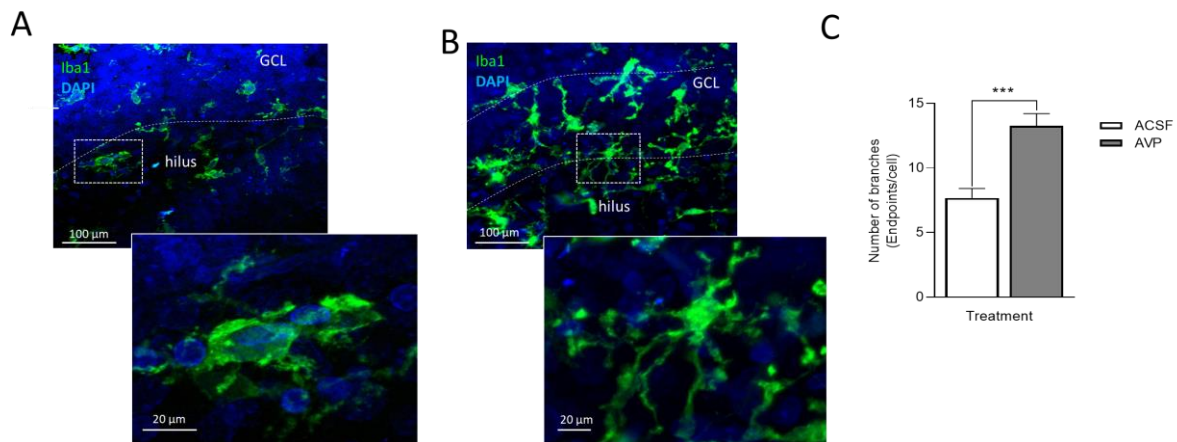


Fig. 8 El tratamiento con AVP en cortes hipocampales ex vivo mimetiza los efectos de la MS sobre el fenotipo de las microglías. En los paneles A y B se muestran inmunohistoquímicas representativas de la morfología de las células microgliales después de dos horas de incubación con líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) (A) y AVP en una concentración de 100nM (B); los insertos muestran una magnificación de las microfotografías de las regiones correspondientes. Los cortes corresponden a un animal macho de PND15, de la cepa Wistar. En la gráfica del panel C se muestra el promedio del número de ramificaciones por microglía. Se realizó un análisis de t-Student, $p<0.001$, $n=10$ por grupo. GCL: capa de células granulares,

Posteriormente, la expresión del neuropéptido AVP se analizó en hipotálamo al PND21 para corroborar los efectos del ELS durante el desarrollo. Los resultados mostraron una mayor expresión de AVP en el hipotálamo (Cont Vs MS180; 1 ± 0.3 vs 2.79 ± 0.7) y un efecto significativo sobre la expresión de AVP en el grupo MS al PND21 ($p=0.03$, Fig. 9).

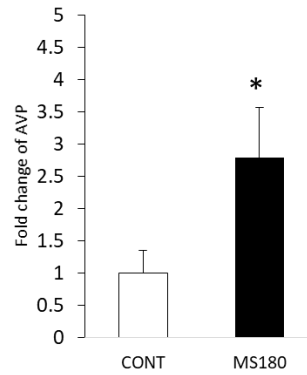


Fig. 9 La MS aumenta la expresión de AVP hipotalámica a PND21. Expresión relativa (fold change) del ARNm para AVP, en el hipotálamo de ratas macho control (CONT) y sometidas a ELS por separación maternal (MS). (Prom \pm EST. T de Student * $p < 0.05$. n =8).

El porcentaje de activación de las células microgliales en CA1 y el hilus del giro dentado se analizó y no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de activación en el hilus del hipocampo en animales juveniles (Cont vs MS180; 30.23 ± 2.8 vs 36.80 ± 4.64 ; $p = 0.2$). En la figura 10 se muestran unas microfotografías del área de estudio (hilus del giro dentado del hipocampo) y la tinción de Iba-1 para el análisis de las células microgliales de los diferentes grupos.

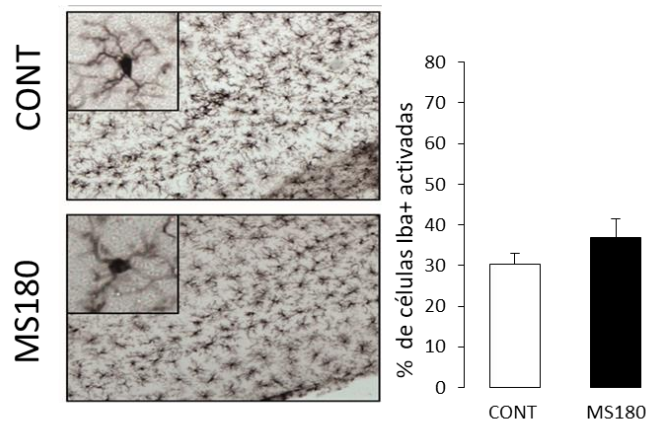


Fig.10 La MS no cambia el porcentaje de células IBA-1+ activadas en el hilus del hipocampo al PND42 en ratas macho. En el panel de la izquierda se muestran microfotografías representativas de las inmunotinciones de IBA-1 de los grupos Cont y MS180, en el hilus del giro dentado (barra de escala=200 μ m). A la derecha se muestra el porcentaje de las células microgliales con morfología activada. (Prom \pm EST, N=8).

El porcentaje de activación de las células microgliales en CA1 no se modificó significativamente entre los distintos grupos experimentales (Cont vs MS180; 24.18 ± 3.67 vs 31.97 ± 4.65 ; $p=0.2$) (Fig. 11).

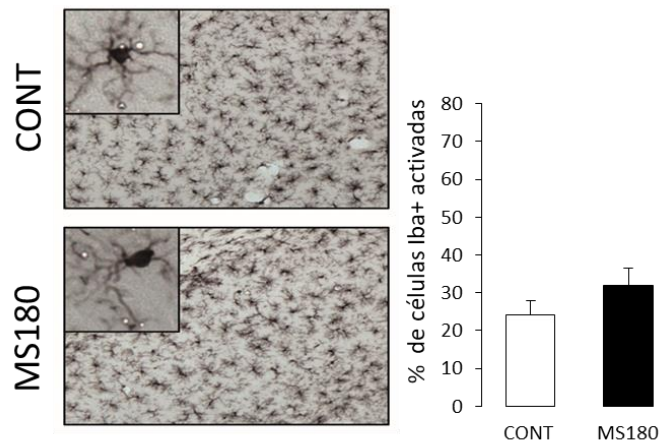


Fig. 11 La MS no cambia el porcentaje de células IBA-1+ activadas en el área CA1 del hipocampo al PND42 en ratas macho. En el panel de la izquierda se muestran microfotografías representativas de las inmunotinciones de IBA de los grupos Cont y MS180, en el área de CA1 del hipocampo (barra de escala=200 μ m). En la derecha se muestra el porcentaje de células microgliales con morfología activada. (Prom \pm EE, N=8).

La expresión relativa de algunas citocinas proinflamatorias (IL-1 β , il-6 y TNF- α) se evaluó por estudios de RT-PCR y no se encontraron diferencias significativas para 1 β (Cont vs MS180; 1.0 ± 0.13 vs 0.9 ± 0.20 ; $p=0.7$), IL- 6 (Cont Vs MS180; 1.0 ± 0.14 vs 1.4 ± 0.22 ; $p=0.1$) y TNF- α (Cont vs MS180; 1.0 ± 0.19 vs 0.9 ± 0.24 ; $p=0.8$) (Fig. 11).

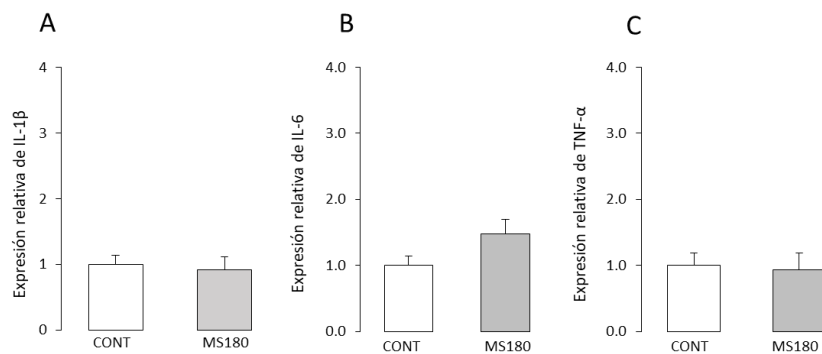


Figura 12 La MS180 no altera la expresión relativa de citocinas en el hipocampo al PND42 de rata macho. Expresión relativa (Fold change) de la citocina A) interleucina 1 β (IL-1 β), B) interleucina 6 (IL-6) y el C) Factor de necrosis tumoral α (TNF α) de los grupos Control (CONT) barras blancas y separación maternal (MS180) barras grises. (PROM \pm EST, N=8).

La expresión relativa en el hipotálamo de los neuropéptidos relacionados con la respuesta al estrés, CRH y AVP al PND42, no mostro diferencias significativas (CRH: Cont vs MS180; 1.0 ± 0.41 vs 0.52 ± 0.26 ; $p=0.1$) (AVP; Cont vs MS180; 1.0 ± 0.32 vs $2.90 \pm 0.1.8$; $p=0.1$) en el hipotálamo (Fig. 13A, B). Adicionalmente se analizaron las concentraciones de corticosterona de las muestras de plasma sanguíneo troncal. Los animales sometidos a MS180 tuvieron una mayor concentración de corticosterona (Cont vs MS180; 161 ± 30 vs 623 ± 164 ; $p < 0.05$) en plasma comparada a los grupos control (Figura 13C).

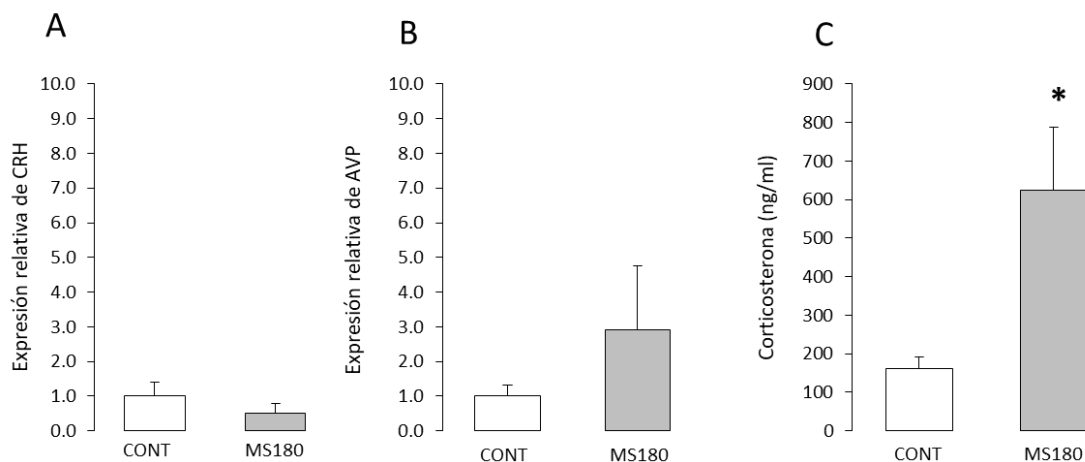


Fig. 13 La MS no cambia la concentración de los transcritos de AVP y CRH en el hipotálamo pero incrementa la concentración plasmática de corticosterona en animales macho adolescentes (PND42). Expresión relativa (Fold change) de los neuropéptidos A) CRH y B) AVP en hipotálamo; C) concentración de corticosterona en plasma al sacrificio de los grupos control (Cont), barras blancas y separación maternal (MS180), barras grises. (Prueba T de Student; PROM \pm EST; * $p < 0.05$; $n=8$).

El OLT es una prueba de memoria vinculada al hipocampo. En esta prueba se observó que los animales del grupo control exploran más tiempo (%) el objeto en la localización nueva (Objeto familiar vs objeto desplazado; 19.8 ± 4.8 vs 80.16 ± 4.8 ; $p < 0.001$), mientras que los animales sometidos a MS180 exploran de la misma manera ambos objetos (Objeto familiar vs objeto desplazado; 43.96 ± 7.1 vs 50.03 ± 7.1 ; $p=0.2$) en las diferentes localizaciones (Figura 14A); lo mismo se

observa en el índice de discriminación; los animales MS180 presentan un menor índice de discriminación que los animales control (Cont vs MS180; 0.6 ± 0.09 vs 0.12 ± 0.1 ; $p=0.01$) (Figura 14B). En el análisis de ANOVA, se observó efecto por tratamiento ($F_{1,37} = 0.04$, $p=0.0001$) y por la interacción ($F_{1,37} = 6.9$, $p=0.01$) pero no por la localización de objeto ($F_{1,37} = 42.4$, $p=0.4$).

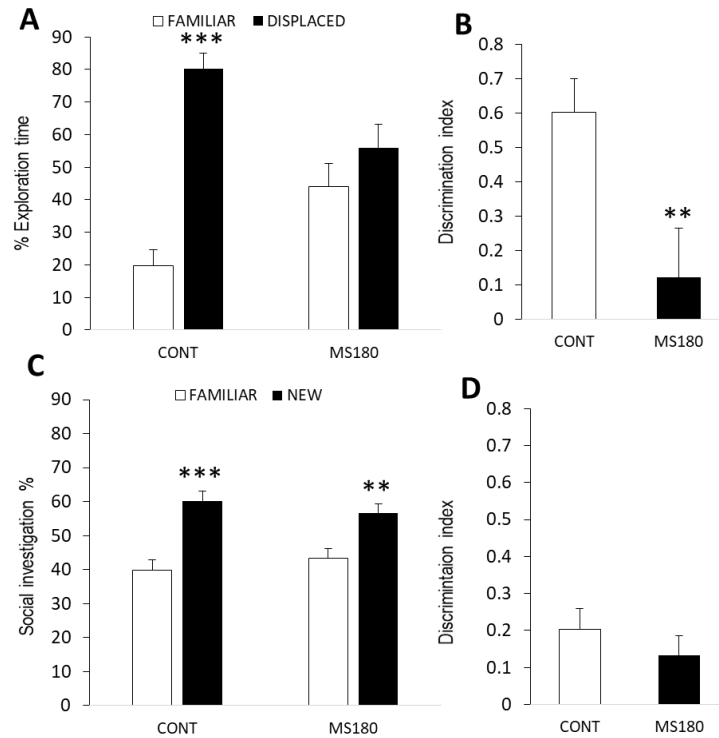


Fig. 14 La MS altera la memoria espacial dependiente de hipocampo, pero no el reconocimiento social, en animales macho adultos (PND60-64). A) Tiempo de exploración en porcentaje e B) índice de discriminación del OLT; C) Investigación social en porcentaje e D) índice de discriminación de la prueba de reconocimiento social de ratas control (CONT) y sometidas a ELS por separación materna (MS180); ratas Sprague Dawley. Prom \pm EST. T de Student ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ($n = 9-10$).

Mientras que en la prueba de reconocimiento social, se observa que ambos grupos control (Rata familiar vs rata nueva; 39.8 ± 2.8 Vs 60.1 ± 2.8 ; $p < 0.001$) y MS180 (Rata familiar vs rata nueva; 43.4 ± 2.6 vs 56.5 ± 2.6 ; $p < 0.01$) pasan mayor porcentaje de tiempo con la rata nueva (Fig. 14C), y como se puede observar en la gráfica del índice de discriminación de la rata nueva y la familiar, no hay diferencias significativas entre los grupos Cont vs MS180; 0.2 ± 0.05 vs 0.13 ± 0.05 ; ($p=0.3$)

(Figura 14D). En el análisis de ANOVA, no se observa un efecto por tratamiento ($F_{1,37} = 0.005$, $p=0.9$), pero si de reconocimiento de la rata nueva ($F_{1,37} = 12.3$, $p=0.002$) y no hay interacción de factores ($F_{1,37} 0.5$ $p=0.7$).

7. Discusión

En este trabajo, se describe la presencia de espinas en el segmento inicial del axón (AISS) en las células granulares del hipocampo durante dos etapas del desarrollo postnatal (PND15 y PND50). Por otro lado, se analizaron los efectos del ELS, usando el modelo de la MS, sobre el AISS en machos y hembras, observándose un aumento de éste en las células granulares del hipocampo en PND15 y PND50. La MS induce un fenotipo hiper-ramificado en las células microgliales en el giro dentado del hipocampo en PND15; sin embargo, este efecto es transitorio, ya que no se observan diferencias significativas en PND50. Por otro lado, se analizó la presencia de PSD95 en las células microgliales, y se observó una disminución de PSD-95 en el grupo sometido a MS. Posteriormente, se analizó la expresión de c-Fos después de la prueba de memoria del miedo, y se observó una mayor expresión en el hipocampo dorsal y ventral de los animales sometidos a MS. Adicionalmente, la expresión de AVP aumentó en el hipotálamo de los animales sometidos a MS; además, por primera vez, mostramos que AVP tiene un efecto directo sobre la morfología de las células microgliales en cultivo. Por último, observamos que los animales MS presentan estrategias diferentes en la prueba del recuerdo del miedo; sin embargo, en pruebas donde se evalúa la memoria social no se observa efecto de la MS, pero si en la memoria espacial en la prueba de localización de objetos.

El giro dentado del hipocampo es un nicho neurogénico ampliamente estudiado (Mirescu y Gould, 2004; Murray, y cols., 2020; Schloesser, y cols., 2009); sin embargo, el segmento inicial del axón es poco estudiado. El trabajo de Bolós y cols. (2019) reportó cambios dinámicos de los AIS en las células granulares nuevas, por lo que los han llamado reguladores maestros de la plasticidad y la excitabilidad, además de ser sensibles a los estímulos extrínsecos y dañinos. En nuestro trabajo, el análisis de la densidad de las espinas en el segmento inicial del axón, en las células granulares del giro dentado del hipocampo, mostró un aumento en el número de espinas en machos y hembras sometidos a MS comparado con sus grupos control. Sin embargo, no hay trabajos comparativos sobre los efectos del estrés temprano sobre las AISS, aunque los estudios sobre espinas dendríticas y el estrés posnatal temprano; también reportaron un aumento de la densidad de espinas en el hipocampo y la corteza (Poeggel, y cols., 2003; Wei, y cols., 2015). Por otro lado,

otros estudios reportaron una disminución de la densidad de espinas en áreas hipocámpales como CA1 y CA3 en respuesta al ELS (Ohta, y cols., 2017; Wang, y cols., 2011), lo que podría representar alteraciones en la conectividad. Un análisis más detallado de la forma de las espinas reveló que los filamentos son más abundantes en un estado maduro (Wei, y cols., 2015), lo que es importante en los procesos de aprendizaje y memoria. De igual manera, se observaron efectos por la edad en la densidad de espinas, siendo más abundantes durante las primeras dos semanas (PND 15) y disminuyendo hacia PND50, lo cual concuerda con lo reportado previamente sobre la maduración y el refinamiento de la conectividad neuronal en el hipocampo (Buzáki, 2015; Pelkey, y cols., 2017; Wei, y cols., 2015).

Los receptores AMPA son participantes activos de los procesos de la plasticidad cerebral; una de las subunidades estudiadas es la GluA1, cuya expresión es sensible a los eventos de estrés. En los procesos de memoria y aprendizaje la fosforilación de esta subunidad se incrementa en áreas cerebrales como la corteza prefrontal y el hipocampo dorsal (Caudal, y cols., 2010). En nuestro estudio se describió la distribución de GluA1 en las cabezas del AIS de las células granulares del giro dentado, lo que sugiere la existencia de sinapsis glutamatérgicas en esta área sobre las AIS. Las espinas dendríticas son altamente plásticas y susceptibles a los cambios en el ambiente (Huang y Rasband, 2018), y los eventos adversos, como el estrés durante el desarrollo posnatal temprano podrían afectarlas. De acuerdo a nuestros datos, utilizando la MS, observamos la expresión de GluA1 en la cabeza de las AIS y proponemos que estas espinas pueden recibir contactos sinápticos de axones vasopresinérgicos. De acuerdo con esto, algunos autores han demostrado la presencia de neuropéptidos como AVP en el hipocampo durante el desarrollo posnatal temprano, y se ha propuesto a AVP para promover la sobrevivencia en la transición del ambiente extrauterino y su relevancia en la maduración neuronal del hipocampo (Spoljaric, y cols., 2017).

Por otro lado, la presencia de la proteína Ankirina G en las AIS, permite el andamiaje y la organización del andamiaje del AIS, con un sitio de dominio de membrana rico en serina (Kordeli, Lambert & Bennett, 1995; Leterrier, 2018).

Nosotros observamos la presencia de Ankirina G en las células microgliales proximales a las células granulares del giro dentado del hipocampo, con lo cual proponemos que las células microgliales están participando en el refinamiento y maduración neuronal (poda sináptica) de las células granulares; sin embargo, se requieren estudios adicionales para soportar esta hipótesis. Las células microgliales son plásticas y detectan los cambios en la homeostasis neuronal, y por lo tanto son sensibles a los efectos del estrés. Los eventos adversos durante las etapas tempranas del neurodesarrollo inducen cambios morfológicos en las células microgliales (Banqueri, y cols., 2019; Roque, y cols., 2016; Reshetnikov, y cols., 2020), lo que concuerda con nuestros resultados. Algunos grupos de trabajo proponen que los eventos adversos como el estrés (MS) puede inducir activación del sistema neuroinmune, predisponen a las células microgliales a quedar improntadas o sensibles a los efectos del estrés temprano, y con una susceptibilidad exacerbada a largo plazo (Saavedra, y cols., 2017; Johnson y Kaffman, 2018). Adicionalmente, las hormonas sexuales como los estrógenos pueden tener efectos sobre la población de células microgliales, ya que estas presentan receptores a estrógenos (ER) y pueden modular la respuesta inflamatoria (Baker, y cols., 2004); por lo que podrían estar implicadas en los cambios morfológicos y la sensibilidad al sentir las señales en el medio (Villa, y cols., 2018). En especies como los topos de la pradera, por ejemplo, se observó que las células microgliales de los machos, a diferencia de las hembras, presentan un fenotipo activado ante una situación amenazante (Polh, y cols., 2021). En el presente trabajo mostramos que la MS aumenta las ramificaciones de las células microgliales en machos y hembras durante la segunda semana postnatal. Sin embargo, los cambios morfológicos observados durante el desarrollo son transitorios; pues no se observaron diferencias significativas en animales adultos. Los datos en la literatura proponen que los eventos adversos durante la infancia pueden sensibilizar el sistema neuroinmune, dejándolo listo para un segundo reto en la edad adulta (Ganguly y Brenhouse, 2015; Ferle, y cols., 2020; Saavedra, y cols., 2017; Wei, y cols., 2012). Por otro lado, el trabajo de Banqueri y cols., (2019) muestra que la separación materna breve provoca cambios en las poblaciones microgliales de algunas áreas cerebrales,

siendo mayor el número de células en CA3, núcleo acumbens y el estriado dorsal, sin observar diferencias significativas en el giro dentado del hipocampo en respuesta al ELS.

Durante las etapas posnatales tempranas se llevan a cabo procesos importantes como lo es la poda sináptica; este proceso es mediado por las células microgliales (Cardozo, y cols., 2019; Paolicelli, y cols., 2011). Las células microgliales pueden engullir fragmentos de PSD95 de las células neuronales (Graeber, 2010), lo que se conoce como poda sináptica. De acuerdo con nuestros datos, observamos que los animales sometidos a la MS tienen un menor número de puntos PSD95+ que co-localizan con las células microgliales en el giro dentado del hipocampo tanto en machos como hembras durante la segunda semana posnatal. De manera similar otros estudios reportaron una disminución de la expresión de PSD95 en algunas áreas cerebrales como del hipocampo murino sometido a eventos de estrés durante las etapas tempranas (Liao, y cols., 2014; Ohta, y cols., 2017; Wei, y cols., 2015).

Por otro lado, las células microgliales secretan mensajeros químicos como las citocinas (Ganguly y Brenhouse, 2015). Algunos de los efectos de la MS sobre el sistema neuroinmune incluyen la estimulación de la expresión de citocinas proinflamatorias (*IL-1 β* , *IL-6* y *TNF- α*) a nivel cerebral como en el hipocampo al PND15 (Roque, y cols., 2016), mientras que otros trabajos muestran una mayor expresión de *IL-6* pero no de *TNF- α* en el hipocampo al PND21 (Banqueri, y cols., 2019). Estas alteraciones en la expresión de genes de *IL-1 β* , *IL-6* y *TNF- α* a no se observaron en el adulto, lo que sugiere un efecto transitorio de la MS sobre la expresión de estas citocinas proinflamatorias. Los estudios de Viviani y cols. (2014) tampoco muestran un efecto sobre la expresión de *IL-1 β* en diferentes áreas cerebrales como el hipocampo y la corteza cerebral al PND45, una edad cercana a la estudiada.

La MS puede alterar la expresión de los neuropéptidos hipotalámicos como AVP (Alcántara-Alonso, y cols., 2017; Zhang, y cols., 2012). En este trabajo mostramos que la MS aumenta inicialmente la expresión del gen de AVP con respecto al control, como se esperaba. Por otro lado, uno de nuestros hallazgos

importantes es que observamos que AVP puede inducir un aumento en las ramificaciones de las células microgliales (*in vitro*), es decir este neuropéptido puede mimetizar los efectos inducidos por la MS en estas poblaciones de células. La presencia de AVP en el hipocampo se reportó previamente, como resultado de las innervaciones de células vasopresinérgicas de origen hipotalámico que llegan al hipocampo (Zhang, y cols., 2013), por lo que se ha propuesto que AVP en el hipocampo podría participar en los procesos de memoria social (Chafai, y cols., 2012; Ciliz, y cols., 2019) y la regulación de la respuesta al estrés (Perkeybile y Bales, 2015; Stevenson y Caldwell, 2012). Con base en estos resultados se propone que la AVP podría participar en procesos cognitivos en los que participe el hipocampo. Por otro lado, la maduración de las células granulares del hipocampo se ha correlacionado con la expresión transitoria del receptor de vasopresina V1a con un pico máximo de expresión durante las primeras dos semanas y desapareciendo hacia la tercera del desarrollo postnatal (Hammock, y cols., 2012). En este sentido también se propone a AVP como un neuropéptido protector y necesario para la maduración de los circuitos neuronales del hipocampo durante el desarrollo (Spoljaric, y cols., 2017). Nuestros datos apoyan a la importancia de AVP en el hipocampo durante el desarrollo postnatal temprano, por lo cual es pertinente realizar estudios a futuro sobre su relevancia en las distintas poblaciones celulares y sus efectos a largo plazo.

Con relación a nuestros estudios con los animales adultos (PND50) se analizó el eje HPA. En nuestros datos observamos un aumento de la concentración de corticosterona en condiciones basales en los animales sometidos a MS, confirmando lo reportado en estudios anteriores (Daskalakis et al., 2014; Gareau, y cols., 2006; Lajud, y cols., 2012; Roque, y cols., 2016). Por otro lado, la expresión del *RNA*m de los neuropéptidos AVP y CRH en el hipotálamo no mostró diferencias significativas. Contrario a nuestros resultados en animales adolescentes, otros modelos de ELS inducen aumento de la expresión de AVP y CRH hipotalámico, tanto en crías, como en animales adultos de 3 meses a un año (Yi & Baram, 1994; Chen et al., 2004; Zhang et al., 2012). Adicionalmente, algunos grupos de trabajo han observado una disociación de las concentraciones de glucocorticoides y los

neuropéptidos, por lo cual se ha propuesto que otros mediadores como las citocinas (Sierra, y cols., 2008; Tanaka, y cols., 1997; Verstraeten, y cols., 2019;) u hormonas (estrógenos, testosterona, oxitocina) (Windle, y cols., 2004) pudieran estar participando en la modulación de la secreción de corticosterona.

La MS es un estímulo lo suficientemente fuerte para inducir la activación de distintas áreas cerebrales durante el desarrollo (Daskalakis, y cols., 2011; Desbonnet, y cols., 2008; Ohta, y cols., 2019); sin embargo, al ser este estímulo homotípico y repetitivo no incrementa más la activación de las áreas cerebrales (Banqueri, y cols., 2018; Ohta, y cols., 2019), ya que las células de estas áreas neurales se desensibilizan, por lo cual someter a los individuos a un evento novedoso puede ser una mejor estrategia para analizar los efectos a largo plazo del estrés sobre las áreas cerebrales. El análisis de la expresión de c-Fos nos permitió evaluar el recuerdo del miedo en los adultos sometidos a MS. Los resultados mostraron la activación de las células en el giro dentado del hipocampo dorsal y ventral, tanto en machos y hembras. Generalmente el hipocampo ventral es un área que se relaciona con el control negativo del eje del estrés y las conductas tipo ansiedad (Çalışkan, y cols., 2020; Van der Kooij, y cols., 2015; Windle, y cols., 2004), mientras que al hipocampo dorsal está implicado con el aprendizaje espacial, el reconocimiento social y la memoria (Alescio-Lautier y Soumireu-Mourat, 1999; Caudal, y cols., 2010; Herrera, y cols., 2019; Lesuis, y cols., 2019; Vivinetto, y cols., 2013;). En nuestro estudio se evaluó una respuesta ante un estímulo que puede ser percibido como amenazante (sonido depredador), al cual la rata fue expuesta durante su infancia (memoria), y por lo cual observamos una activación neuronal del hipocampo.

En el análisis de la conducta del recuerdo del miedo observamos una respuesta diferencial entre machos y hembras; los animales sometidos a MS presentaron una conducta pasiva (congelamiento) en ambos sexos (machos, 2% y hembras, 17.5%); sin embargo, los machos MS presentaron una conducta activa (25.3%) comparada con su grupo control. Un estudio previo propuso que los animales expuestos a eventos de estrés tienden a presentar una conducta pasiva

como una estrategia adaptativa al ambiente (De Kloet y Molendijk, 2016); mientras que, los animales MS machos presentan una conducta más activa a diferencia de las hembras MS en pruebas de campo abierto (Jin, y cols., 2018). Adicionalmente, se evaluó el reconocimiento social y no se observaron diferencias significativas entre los grupos control y MS, por lo que su memoria social estaría intacta. Sin embargo, al evaluar una tarea de memoria tipo espacial utilizando la prueba de desplazamiento de objetos, observamos que los animales sometidos a MS no distinguieron entre el objeto en la nueva localización y el objeto en la misma localización, a diferencia de los animales del grupo control que presentaron más tiempo explorando al objeto desplazado. Este efecto es similar a lo reportado por otros grupos de trabajo que realizaron estudios con animales sometidos a MS, donde también se reportó una menor interacción con el objeto relocalizado y este efecto lo observaron tanto en machos como en hembras (Reincke y Hanganu-Opatz, 2017). Al analizar otra memoria como la memoria social, observamos que ésta no se ve afectada por los efectos de la MS, y estos datos están en concordancia con el trabajo de Lukas y cols (2011), en el cual se muestra que los animales sometidos a MS no presentan un deterioro en el reconocimiento social. Adicionalmente, en otras tareas como el reconocimiento de objetos los animales MS pueden discriminar entre el objeto novedoso y el conocido (Aisa, y cols., 2007; Reincke y Hanganu-Opatz, 2017); mientras que en tareas como el laberinto en “Y” los efectos del estrés durante las etapas tempranas de desarrollo también afectan la cognición (Wang, y cols., 2011).

Estos datos en conjunto sugieren que los eventos adversos durante la infancia pueden modificar los patrones de expresión de algunos neuropéptidos como la AVP y estado de activación de las células microgliales durante el desarrollo postnatal temprano (PND15); sin embargo, estos cambios son transitorios, y promueven cambios permanentes sobre la conducta y la memoria a largo plazo.

8. Conclusión

Con base en los resultados del presente estudio se concluye que hay una interacción entre ELS, las células microgliales y la vasopresina sobre la plasticidad sináptica en las espinas del segmento inicial del axón en el giro dentado del hipocampo, y que estos efectos pueden verse reflejados en paradigmas de memoria a largo plazo.

9. Referencias

- Acharjee, S., Verbeek, M., Gomez, C. D., Bisht, K., Lee, B., Benoit, L., Sharkey, K. A., Benediktsson, A., Tremblay, M.-E., & Pittman, Q. J. (2018). Reduced Microglial Activity and Enhanced Glutamate Transmission in the Basolateral Amygdala in Early CNS Autoimmunity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 38(42), 9019–9033. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0398-18.2018>
- Acher, R., & Chauvet, J. (1988). Structure, processing and evolution of the neurohypophysial hormone-neurophysin precursors. *Biochimie*, 70(9), 1197–1207. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(88\)90185-X](https://doi.org/10.1016/0300-9084(88)90185-X)
- Aguilera, G., Subburaju, S., Young, S., & Chen, J. (2008). The parvocellular vasopressinergic system and responsiveness of the hypothalamic pituitary adrenal axis during chronic stress. *Progress in Brain Research*, 170, 29–39. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)00403-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)00403-2)
- Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Río, J., & Ramírez, M. J. (2007). Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 32(3), 256–266. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2006.12.013>
- Alcántara-Alonso, V., Amaya, M. I., Matamoros-Trejo, G., & de Gortari, P. (2017). Altered functionality of the corticotrophin-releasing hormone receptor-2 in the hypothalamic paraventricular nucleus of hyperphagic maternally separated rats. *Neuropeptides*, 63, 75–82. <https://doi.org/10.1016/J.NPEP.2017.01.006>
- Alescio-Lautier, B., & Soumireu-Mourat, B. (1999). Role of vasopressin in learning and memory in the hippocampus. *Progress in Brain Research*, 119, 501–521. [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)61590-3](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)61590-3)
- Andersen, S. L., & Teicher, M. H. (2004). Delayed effects of early stress on hippocampal development. *Neuropsychopharmacology*, 29(11), 1988–1993. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300528>
- Andoh, M., Ikegaya, Y., & Koyama, R. (2019). Synaptic Pruning by Microglia in Epilepsy. *Journal of Clinical Medicine*, 8(12), 2170. <https://doi.org/10.3390/jcm8122170>
- Authement, M. E., Langlois, L. D., Shepard, R. D., Browne, C. A., Lucki, I., Kassis, H., & Nugent, F. S. (2018). A role for corticotropin-releasing factor signaling in the lateral habenula and its modulation by early-life stress. *Science Signaling*, 11(520), eaan6480. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aan6480>
- Baalman, K., Marin, M. A., Ho, T. S. Y., Godoy, M., Cherian, L., Robertson, C., & Rasband, M. N. (2015). Axon initial segment-associated microglia. *Journal of Neuroscience*, 35(5), 2283–2292. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3751-14.2015>
- Baker, A. E., Brautigam, V. M., & Watters, J. J. (2004). Estrogen Modulates Microglial Inflammatory Mediator Production via Interactions with Estrogen Receptor β . *Endocrinology*, 145(11), 5021–5032. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0619>

- Banqueri, M., Méndez, M., & Arias, J. L. (2018). Why are maternally separated females inflexible? Brain activity pattern of COx and c-Fos. *Neurobiology of Learning and Memory*, 155, 30–41. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.06.007>
- Banqueri, M., Méndez, M., Gómez-Lázaro, E., & Arias, J. L. (2019). Early life stress by repeated maternal separation induces long-term neuroinflammatory response in glial cells of male rats. *Stress*, 22(5), 563–570. <https://doi.org/10.1080/10253890.2019.1604666>
- Bolós, M., Terreros-Roncal, J., Perea, J. R., Pallas-Bazarra, N., Ávila, J., & Llorens-Martín, M. (2019). Maturation dynamics of the axon initial segment (AIS) of newborn dentate granule cells in young adult C57BL/6J mice. *Journal of Neuroscience*, 39(9), 1605–1620. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2253-18.2019>
- Buijs, R. M., Velis, D. N., & Swaab, D. F. (1980). Ontogeny of vasopressin and oxytocin in the fetal rat: Early vasopressinergic innervation of the fetal brain. *Peptides*, 1(4), 315–324. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(80\)90009-1](https://doi.org/10.1016/0196-9781(80)90009-1)
- Buzsáki, G. (2015). Hippocampal sharp wave-ripple: A cognitive biomarker for episodic memory and planning. *Hippocampus*, 25(10), 1073. <https://doi.org/10.1002/HIPO.22488>
- Caldwell, H. K., Wersinger, S. R., & Young, W. S. (2008). The role of the vasopressin 1b receptor in aggression and other social behaviours. *Progress in Brain Research*, 170, 65–72. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)00406-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)00406-8)
- Çalışkan, G., Müller, A., & Albrecht, A. (2020). Long-Term Impact of Early-Life Stress on Hippocampal Plasticity: Spotlight on Astrocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 1–19. <https://doi.org/10.3390/IJMS21144999>
- Cammarota, M., Bernabeu, R., De Stein, M. L., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1998). Learning-specific, time-dependent increases in hippocampal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II activity and AMPA GluR1 subunit immunoreactivity. *European Journal of Neuroscience*, 10(8), 2669–2676. <https://doi.org/10.1046/J.1460-9568.1998.00254.X>
- Cardozo, P. L., de Lima, I. B. Q., Maciel, E. M. A., Silva, N. C., Dobransky, T., & Ribeiro, F. M. (2019). Synaptic Elimination in Neurological Disorders. *Current Neuropharmacology*, 17(11), 1071–1095. <https://doi.org/10.2174/1570159x17666190603170511>
- Catale, C., Gironda, S., Lo Iacono, L., & Carola, V. (2020). Microglial Function in the Effects of Early-Life Stress on Brain and Behavioral Development. *Journal of Clinical Medicine*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/jcm9020468>
- Caudal, D., Godsil, B. P., Mailliet, F., Bergerot, D., Rè Se, T., & Jay, M. (2010). Acute Stress Induces Contrasting Changes in AMPA Receptor Subunit Phosphorylation within the Prefrontal Cortex, Amygdala and Hippocampus. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015282>
- Chaaya, N., Battle, A. R., & Johnson, L. R. (2018). An update on contextual fear memory mechanisms: Transition between Amygdala and Hippocampus. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 92, pp. 43–54). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.05.013>

- Chafai, M., Corbani, M., Guillon, G., & Desarmenien, M. G. (2012). Vasopressin inhibits LTP in the CA2 mouse hippocampal area. *PloS One*, 7(12), e49708. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049708>
- Chen, Y., Bender, R. A., Frotscher, M., & Baram, T. Z. (2001). Novel and transient populations of corticotropin-releasing hormone-expressing neurons in developing hippocampus suggest unique functional roles: A quantitative spatiotemporal analysis. *Journal of Neuroscience*, 21(18), 7171–7181. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-18-07171.2001>
- Cilz, N. I., Cymerblit-Sabba, A., & Young, W. S. (2019a). Oxytocin and vasopressin in the rodent hippocampus. In *Genes, Brain and Behavior* (Vol. 18, Issue 1). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/gbb.12535>
- Cilz, N. I., Cymerblit-Sabba, A., & Young, W. S. (2019b). Oxytocin and vasopressin in the rodent hippocampus. In *Genes, Brain and Behavior* (Vol. 18, Issue 1, p. e12535). Wiley/Blackwell (10.1111). <https://doi.org/10.1111/gbb.12535>
- Clements, J. A., & Funder, J. W. (1986). Arginine Vasopressin (AVP) and AVP-Like Immunoreactivity in Peripheral Tissues. *Endocrine Reviews*, 7(4), 449–460. <https://doi.org/10.1210/edrv-7-4-449>
- Coleman, G., & Canal, M. M. (2017). Postnatal Light Effects on Pup Stress Axis Development Are Independent of Maternal Behavior. *Frontiers in Neuroscience*, 11, 46. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00046>
- Corbani, M., Marir, R., Trueba, M., Chafai, M., Vincent, A., Borie, A. M., Desarménien, M. G., Ueta, Y., Tomboly, C., Olma, A., Manning, M., & Guillon, G. (2018). Neuroanatomical distribution and function of the vasopressin V1B receptor in the rat brain deciphered using specific fluorescent ligands. *General and Comparative Endocrinology*, 258, 15–32. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.10.011>
- Daskalakis, N. P., Claessens, S. E. F., Laboyrie, J. J. L., Enthoven, L., Oitzl, M. S., Champagne, D. L., & de Kloet, E. R. (2011). The newborn rat's stress system readily habituates to repeated and prolonged maternal separation, while continuing to respond to stressors in context dependent fashion. *Hormones and Behavior*, 60(2), 165–176. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.04.003>
- Daskalakis, N. P., Diamantopoulou, A., Claessens, S. E. F., Remmers, E., Tjälve, M., Oitzl, M. S., Champagne, D. L., & de Kloet, E. R. (2014). Early experience of a novel-environment in isolation primes a fearful phenotype characterized by persistent amygdala activation. *Psychoneuroendocrinology*, 39(1), 39–57. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.09.021>
- Davies, K. J. A. (2016). Adaptive homeostasis. *Molecular Aspects of Medicine*, 49, 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2016.04.007>
- De Kloet, E. R., & Molendijk, M. L. (2016). Coping with the Forced Swim Stressor: Towards Understanding an Adaptive Mechanism. In *Neural Plasticity* (Vol. 2016). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/6503162>

- de Kloet, E. Ronald. (2010). From vasotocin to stress and cognition. *European Journal of Pharmacology*, 626(1), 18–26. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2009.10.017>
- De Kloet, E. Ronald. (2000). Stress in the brain. *European Journal of Pharmacology*, 405(1–3), 187–198. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(00\)00552-5](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(00)00552-5)
- de Kloet, E. Ronald, Vreugdenhil, E., Oitzl, M. S., & Joëls, M. (1998). Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease*. *Endocrine Reviews*, 19(3), 269–301. <https://doi.org/10.1210/edrv.19.3.0331>
- Delpéch, J.-C., Wei, L., Hao, J., Yu, X., Madore, C., Butovsky, O., & Kaffman, A. (2016). Early life stress perturbs the maturation of microglia in the developing hippocampus. *Brain, Behavior, and Immunity*, 57, 79–93. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.06.006>
- Desbonnet, L., Garrett, L., Daly, E., McDermott, K. W., & Dinan, T. G. (2008a). Sexually dimorphic effects of maternal separation stress on corticotrophin-releasing factor and vasopressin systems in the adult rat brain. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 26(3–4), 259–268. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2008.02.004>
- Desbonnet, L., Garrett, L., Daly, E., McDermott, K. W., & Dinan, T. G. (2008b). Sexually dimorphic effects of maternal separation stress on corticotrophin-releasing factor and vasopressin systems in the adult rat brain. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 26(3–4), 259–268. <https://doi.org/10.1016/J.IJDEVNEU.2008.02.004>
- Detke, M. J., Rickels, M., & Lucki, I. (1995). Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology*, 121(1), 66–72. <https://doi.org/10.1007/BF02245592>
- Deussing, J. M., & Chen, A. (2018). The corticotropin-releasing factor family: Physiology of the stress response. In *Physiological Reviews* (Vol. 98, Issue 4, pp. 2225–2286). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2017>
- DiBenedictis, B. T., Nussbaum, E. R., Cheung, H. K., & Veenema, A. H. (2017). Quantitative mapping reveals age and sex differences in vasopressin, but not oxytocin, immunoreactivity in the rat social behavior neural network. *Journal of Comparative Neurology*, 525(11), 2549–2570. <https://doi.org/10.1002/cne.24216>
- Emanuel, D. L., Thull, D. L., Girard, D. M., & Majzoub, J. A. (1989). Developmental expression of corticotropin releasing hormone mRNA and peptide in rat hypothalamus. *Peptides*, 10(11), 1165–1169.
- Ferle, V., Repouskou, A., Aspiotis, G., Raftogianni, A., Chrousos, G., Stylianopoulou, F., & Stamatakis, A. (2020). Synergistic effects of early life mild adversity and chronic social defeat on rat brain microglia and cytokines. *Physiology and Behavior*, 215, 112791. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112791>
- Galeeva, A., Pelto-Huikko, M., Pivina, S., & Ordyan, N. (2010). Postnatal Ontogeny of the Glucocorticoid Receptor in the Hippocampus. *Vitamins & Hormones*, 82, 367–389. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(10\)82019-9](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(10)82019-9)

- Ganguly, P., & Brenhouse, H. C. (2015). Broken or maladaptive? Altered trajectories in neuroinflammation and behavior after early life adversity. *Developmental Cognitive Neuroscience*, 11, 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.dcn.2014.07.001>
- Gareau, M. G., Jury, J., Yang, P. C., Macqueen, G., & Perdue, M. H. (2006). Neonatal maternal separation causes colonic dysfunction in rat pups including impaired host resistance. *Pediatric Research*, 59(1), 83–88. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000190577.62426.45>
- Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., & Huber, T. (2013). Origin and differentiation of microglia. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 7, Issue MAR). *Front Cell Neurosci*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00045>
- Girotti, M., Pace, T. W. W., Gaylord, R. I., Rubin, B. A., Herman, J. P., & Spencer, R. L. (2006). Habituation to repeated restraint stress is associated with lack of stress-induced c-fos expression in primary sensory processing areas of the rat brain. *Neuroscience*, 138(4), 1067–1081. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2005.12.002>
- Goddard, C. A., Butts, D. A., & Shatz, C. J. (2007). Regulation of CNS synapses by neuronal MHC class I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(16), 6828–6833. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702023104>
- Goldstein, D. S., & Kopin, I. J. (2007). Evolution of concepts of stress. *Stress*, 10(2), 109–120. <https://doi.org/10.1080/10253890701288935>
- Goncharova, N. D. (2013). Stress Responsiveness of the Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis: Age-Related Features of the Vasopressinergic Regulation. *Frontiers in Endocrinology*, 4, 26. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00026>
- Gray, M., Innala, L., & Viau, V. (2014). Central vasopressin V1A receptor blockade alters patterns of cellular activation and prevents glucocorticoid habituation to repeated restraint stress exposure. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 17(12), 2005–2015. <https://doi.org/10.1017/S1461145714000935>
- Grimm, S., Wirth, K., Fan, Y., Weigand, A., Gärtner, M., Feeser, M., Dziobek, I., Bajbouj, M., & Aust, S. (2017). The interaction of corticotropin-releasing hormone receptor gene and early life stress on emotional empathy. *Behavioural Brain Research*, 329, 180–185. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2017.04.047>
- Gunn, B. G., Cox, C. D., Chen, Y., Frotscher, M., Gall, C. M., Baram, T. Z., & Lynch, G. (2017). The endogenous stress hormone CRH modulates excitatory transmission and network physiology in hippocampus. *Cerebral Cortex*, 27(8), 4182–4198. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhx103>
- Hammock, E. A. D., Law, C. S., & Levitt, P. (2013). Vasopressin eliminates the expression of familiar odor bias in neonatal female mice through V1aR. *Hormones and Behavior*, 63(2), 352–360. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.12.006>
- Heim, C., & Nemeroff, C. B. (2001). The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biological Psychiatry*, 49(12), 1023–1039. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11430844>

Heim, Christine, & Binder, E. B. (2012). Current research trends in early life stress and depression: Review of human studies on sensitive periods, gene-environment interactions, and epigenetics. In *Experimental Neurology* (Vol. 233, Issue 1, pp. 102–111). <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.10.032>

Herman, J. P., McKlveen, J. M., Ghosal, S., Kopp, B., Wulsin, A., Makinson, R., Scheimann, J., & Myers, B. (2016). Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. *Comprehensive Physiology*, 6(2), 603–621. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150015>

Hernandez, V. S., Ruíz-Velazco, S., & Zhang, L. (2012). Differential effects of osmotic and SSR149415 challenges in maternally separated and control rats: The role of vasopressin on spatial learning. *Neuroscience Letters*, 528(2), 143–147. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.09.002>

Herrera, G., Calfa, G., Schiöth, H. B., Lasaga, M., & Scimonelli, T. (2019). Memory consolidation impairment induced by Interleukin-1 β is associated with changes in hippocampal structural plasticity. *Behavioural Brain Research*, 370, 111969. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2019.111969>

Hofer, M. A. (1973). The role of nutrition in the physiological and behavioral effects of early maternal separation on infant rats. *Psychosomatic Medicine*, 35(4), 350–359. <https://doi.org/10.1097/00006842-197307000-00009>

Horii-Hayashi, N., Sasagawa, T., Matsunaga, W., Matsusue, Y., Azuma, C., & Nishi, M. (2013). Developmental changes in desensitisation of c-Fos expression induced by repeated maternal separation in pre-weaned mice. *Journal of Neuroendocrinology*, 25(2), 158–167. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2826.2012.02377.X>

Huang, C. Y.-M., & Rasband, M. N. (2018). Axon initial segments: structure, function, and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1420(1), 46–61. <https://doi.org/10.1111/nyas.13718>

Hügin-Flores, M. E., Steimer, T., Schulz, P., Vallotton, M. B., & Aubert, M. L. (2003). Chronic corticotropin-releasing hormone and vasopressin regulate corticosteroid receptors in rat hippocampus and anterior pituitary. In *Brain Research* (Vol. 976, Issue 2, pp. 159–170). [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)02585-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02585-X)

Huh, G. S., Boulanger, L. M., Du, H., Riquelme, P. A., Brotz, T. M., & Shatz, C. J. (2000). Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity. *Science (New York, N.Y.)*, 290(5499), 2155–2159. <https://doi.org/10.1126/science.290.5499.2155>

Inda, C., Armando, N. G., Dos Santos Claro, P. A., & Silberstein, S. (2017). Endocrinology and the brain: corticotropin-releasing hormone signaling. *Endocrine Connections*, 6(6), R99–R120. <https://doi.org/10.1530/EC-17-0111>

Ivy, A. S., Brunson, K. L., Sandman, C., & Baram, T. Z. (2008). Dysfunctional nurturing behavior in rat dams with limited access to nesting material: A clinically relevant model for early-life stress. *Neuroscience*, 154(3), 1132–1142. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.04.019>

- Izquierdo, I., Furini, C. R. G., & Myskiw, J. C. (2016). Fear memory. *Physiological Reviews*, 96(2), 695–750. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2015>
- Johnson, F. K., & Kaffman, A. (2018). Early life stress perturbs the function of microglia in the developing rodent brain: New insights and future challenges. *Brain, Behavior, and Immunity*, 69, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.06.008>
- Kolber, B. J., Boyle, M. P., Wiczorek, L., Kelley, C. L., Onwuzurike, C. C., Nettles, S. A., Vogt, S. K., & Muglia, L. J. (2010). Transient early-life forebrain corticotropin-releasing hormone elevation causes long-lasting anxiogenic and despair-like changes in mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(7), 2571–2581. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4470-09.2010>
- Kordeli, E., Lambert, S., & Bennett, V. (1995). Ankyrin: A NEW ANKYRIN GENE WITH NEURAL-SPECIFIC ISOFORMS LOCALIZED AT THE AXONAL INITIAL SEGMENT AND NODE OF RANVIER (*). *Journal of Biological Chemistry*, 270(5), 2352–2359. <https://doi.org/10.1074/JBC.270.5.2352>
- Korosi, A., Naninck, E. F. G., Oomen, C. A., Schouten, M., Krugers, H., Fitzsimons, C., & Lucassen, P. J. (2012). Early-life stress mediated modulation of adult neurogenesis and behavior. In *Behavioural Brain Research* (Vol. 227, Issue 2, pp. 400–409). <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.07.037>
- Korosi, Aniko, & Baram, T. Z. (2008). The central corticotropin releasing factor system during development and adulthood. *European Journal of Pharmacology*, 583(2–3), 204. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2007.11.066>
- Koshimizu, T., Nakamura, K., Egashira, N., Hiroyama, M., Nonoguchi, H., & Tanoue, A. (2012). Vasopressin V1a and V1b Receptors: From Molecules to Physiological Systems. *Physiological Reviews*, 92(4), 1813–1864. <https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2011>
- Kovács, L. Á., Schiessl, J. A., Nafz, A. E., Csernus, V., & Gaszner, B. (2018). Both Basal and Acute Restraint Stress-Induced c-Fos Expression Is Influenced by Age in the Extended Amygdala and Brainstem Stress Centers in Male Rats. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10(AUG). <https://doi.org/10.3389/FNAGI.2018.00248>
- Lajud, N., Roque, A., Cajero, M., Gutiérrez-Ospina, G., & Torner, L. (2012). Periodic maternal separation decreases hippocampal neurogenesis without affecting basal corticosterone during the stress hyporesponsive period, but alters HPA axis and coping behavior in adulthood. *Psychoneuroendocrinology*, 37(3). <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.07.011>
- Laryea, G., Arnett, M. G., & Muglia, L. J. (2012). Behavioral Studies and Genetic Alterations in Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) Neurocircuitry: Insights into Human Psychiatric Disorders. *Behavioral Sciences (Basel, Switzerland)*, 2(2), 135–171. <https://doi.org/10.3390/bs2020135>
- Lee, H. K., Takamiya, K., He, K., Song, L., & Huganir, R. L. (2010). Specific roles of AMPA receptor subunit GluR1 (GluA1) phosphorylation sites in regulating synaptic plasticity in the CA1 region of hippocampus. *Journal of Neurophysiology*, 103(1), 479–489. <https://doi.org/10.1152/JN.00835.2009>

Lehrman, E. K., Wilton, D. K., Litvina, E. Y., Welsh, C. A., Chang, S. T., Frouin, A., Walker, A. J., Heller, M. D., Umemori, H., Chen, C., & Stevens, B. (2018). CD47 Protects Synapses from Excess Microglia-Mediated Pruning during Development. *Neuron*, 100(1), 120-134.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.09.017>

Lesse, A., Rether, K., Gröger, N., Braun, K., & Bock, J. (2017). Chronic Postnatal Stress Induces Depressive-like Behavior in Male Mice and Programs second-Hit Stress-Induced Gene Expression Patterns of OxtR and AvpR1a in Adulthood. *Molecular Neurobiology*, 54(6), 4813–4819. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0043-8>

Lesuis, S. L., Lucassen, P. J., & Krugers, H. J. (2019). Early life stress impairs fear memory and synaptic plasticity; a potential role for GluN2B. *Neuropharmacology*, 149, 195–203. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2019.01.010>

Leterrier, C. (2018). The Axon Initial Segment: An Updated Viewpoint. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 38(9), 2135–2145. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1922-17.2018>

Li, C.-Y., Zhang, L., Li, J., Qi, C.-L., Li, D.-Y., Liu, X., & Qu, X. (2017). Effect of Endogenous Arginine-Vasopressin Arising from the Paraventricular Nucleus on Learning and Memory Functions in Vascular Dementia Model Rats. *BioMed Research International*, 2017, 3214918. <https://doi.org/10.1155/2017/3214918>

Li, Y., Li, L., Wu, J., Zhu, Z., Feng, X., Qin, L., Zhu, Y., Sun, L., Liu, Y., Qiu, Z., Duan, S., & Yu, Y. Q. (2020). Activation of astrocytes in hippocampus decreases fear memory through adenosine A1 receptors. *ELife*, 9, 1–25. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.57155>

Liao, X. M., Yang, X. D., Jia, J., Li, J. T., Xie, X. M., Su, Y. A., Schmidt, M. V., Si, T. M., & Wang, X. D. (2014). Blockade of corticotropin-releasing hormone receptor 1 attenuates early-life stress-induced synaptic abnormalities in the neonatal hippocampus. In *Hippocampus* (Vol. 24, Issue 5, pp. 528–540). <https://doi.org/10.1002/hipo.22254>

Loi, M., Koricka, S., Lucassen, P. J., & Joëls, M. (2014). Age- and Sex-Dependent Effects of Early Life Stress on Hippocampal Neurogenesis. *Frontiers in Endocrinology*, 5, 13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00013>

Lukas, M., Toth, I., Reber, S. O., Slattery, D. A., Veenema, A. H., & Neumann, I. D. (2011). The neuropeptide oxytocin facilitates pro-social behavior and prevents social avoidance in rats and mice. *Neuropsychopharmacology*, 36(11), 2159–2168. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.95>

Lupien, S. J., Buss, C., Schramek, T. E., Maheu, F., & Pruessner, J. (2005). Hormetic Influence of Glucocorticoids on Human Memory. *Nonlinearity in Biology, Toxicology, Medicine*, 3(1), nonlin.003.01.0. <https://doi.org/10.2201/nonlin.003.01.003>

Ma, X. M., Levy, A., & Lightman, S. L. (1997). Emergence of an Isolated Arginine Vasopressin (AVP) Response to Stress after Repeated Restraint: A Study of Both AVP and Corticotropin-Releasing Hormone Messenger Ribonucleic Acid (RNA) and Heteronuclear RNA. *Endocrinology*, 138(10), 4351–4357. <https://doi.org/10.1210/ENDO.138.10.5446>

- Ma, X. M., Lightman, S. L., & Aguilera, G. (1999). Vasopressin and corticotropin-releasing hormone gene responses to novel stress in rats adapted to repeated restraint. *Endocrinology*, 140(8), 3623–3632. <https://doi.org/10.1210/ENDO.140.8.6943>
- Maniam, J., Antoniadis, C. P., Wang, K. W., & Morris, M. J. (2015). Early Life Stress Induced by Limited Nesting Material Produces Metabolic Resilience in Response to a High-Fat and High-Sugar Diet in Male Rats. *Frontiers in Endocrinology*, 6, 138. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00138>
- Marco, E. M., Valero, M., de la Serna, O., Aisa, B., Borcel, E., Ramirez, M. J., & Viveros, M.-P. (2013). Maternal deprivation effects on brain plasticity and recognition memory in adolescent male and female rats. *Neuropharmacology*, 68, 223–231. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2012.08.014>
- McEwen, B. B. (2004). General Introduction to Vasopressin and Oxytocin: Structure / Metabolism, Evolutionary Aspects, Neural Pathway / Receptor Distribution, and Functional Aspects Relevant to Memory Processing. *Advances in Pharmacology*, 50, 1–50. [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(04\)50001-7](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(04)50001-7)
- McEwen, B. S., Gould, E. A., & Sakai, R. R. (1992). The vulnerability of the hippocampus to protective and destructive effects of glucocorticoids in relation to stress. *British Journal of Psychiatry*, 160(FEB. SUPPL. 15), 18–24. <https://doi.org/10.1192/s0007125000296645>
- McEwen, Bruce S. (2002). Sex, stress and the hippocampus: Allostasis, allostatic load and the aging process. *Neurobiology of Aging*, 23(5), 921–939. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00027-1](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00027-1)
- McEwen, Bruce S. (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiological Reviews*, 87(3), 873–904. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00041.2006>
- McEwen, Bruce S. (2017). Allostasis and the Epigenetics of Brain and Body Health Over the Life Course. *JAMA Psychiatry*, 74(6), 551. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2017.0270>
- McIlwrick, S., Rechenberg, A., Matthes, M., Burgstaller, J., Schwarzbauer, T., Chen, A., & Touma, C. (2016). Genetic predisposition for high stress reactivity amplifies effects of early-life adversity. *Psychoneuroendocrinology*, 70, 85–97. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.04.023>
- Meaney, M. J., Diorio, J., Francis, D., Widdowson, J., LaPlante, P., Caldji, C., Sharma, S., Seckl, J. R., & Plotsky, P. M. (1996). Early Environmental Regulation of Forebrain Glucocorticoid Receptor Gene Expression: Implications for Adrenocortical Responses to Stress; pp. 49–60. *Developmental Neuroscience*, 18(1–2), 49–60. <https://doi.org/10.1159/000111395>
- Mirescu, C., Peters, J. D., & Gould, E. (2004). Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nature Neuroscience*, 7(8), 841–846. <https://doi.org/10.1038/nn1290>
- Miyamoto, A., Wake, H., Ishikawa, A. W., Eto, K., Shibata, K., Murakoshi, H., Koizumi, S., Moorhouse, A. J., Yoshimura, Y., & Nabekura, J. (2016). Microglia contact induces

- synapse formation in developing somatosensory cortex. *Nature Communications*, 7, 12540. <https://doi.org/10.1038/ncomms12540>
- Murgatroyd, C. A., Hicks-Nelson, A., Fink, A., Beamer, G., Gurel, K., Elnady, F., Pittet, F., & Nephew, B. C. (2016). Effects of chronic social stress and maternal intranasal oxytocin and vasopressin on offspring interferon- γ and behavior. *Frontiers in Endocrinology*, 7(DEC), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00155>
- Murgatroyd, C., Patchev, A. V., Wu, Y., Micale, V., Bockmühl, Y., Fischer, D., Holsboer, F., Wotjak, C. T., Almeida, O. F. X., & Spengler, D. (2009). Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress. *Nature Neuroscience*, 12(12), 1559–1566. <https://doi.org/10.1038/nn.2436>
- Murgatroyd, C., & Spengler, D. (2014). Polycomb Binding Precedes Early-Life Stress Responsive DNA Methylation at the Avp Enhancer. *PLoS ONE*, 9(3), e90277. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090277>
- Murray, K. D., Liu, X.-B., King, A. N., Luu, J., & Cheng, H.-J. (2020). Age-related changes in synaptic plasticity associated with mossy fiber terminal integration during adult neurogenesis. *ENeuro*. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0030-20.2020>
- Nishi, M. (2020). Effects of Early-Life Stress on the Brain and Behaviors: Implications of Early Maternal Separation in Rodents. In *International journal of molecular sciences* (Vol. 21, Issue 19). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/ijms21197212>
- 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. <https://doi.org/10.1111/jnc.13977>
- Ohta, K., Suzuki, S., Warita, K., Sumitani, K., Tenkumo, C., Ozawa, T., Ujihara, H., Kusaka, T., & Miki, T. (2019). The effects of early life stress on the excitatory/inhibitory balance of the medial prefrontal cortex. *Behavioural Brain Research*, 112306. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2019.112306>
- Ottenhausen, M., Bodhinayake, I., Banu, M. A., Stieg, P. E., & Schwartz, T. H. (2016). Vincent du Vigneaud: following the sulfur trail to the discovery of the hormones of the posterior pituitary gland at Cornell Medical College. *Journal of Neurosurgery*, 124(5), 1538–1542. <https://doi.org/10.3171/2015.5.JNS141952>
- Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T. A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., & Gross, C. T. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*, 333(6048), 1456–1458. <https://doi.org/10.1126/science.1202529>
- Pedrazzoli, M., Losurdo, M., Paolone, G., Medelin, M., Jaupaj, L., Cisterna, B., Slanzi, A., Malatesta, M., Coco, S., & Buffelli, M. (2019). Glucocorticoid receptors modulate dendritic spine plasticity and microglia activity in an animal model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 132, 104568. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104568>

- Pelkey, K. A., Chittajallu, R., Craig, M. T., Tricoire, L., Wester, J. C., & McBain, C. J. (2017). Hippocampal gabaergic inhibitory interneurons. *Physiological Reviews*, 97(4), 1619–1747. <https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2017>
- Perkeybile, A. M., & Bales, K. L. (2015). Early rearing experience is associated with vasopressin immunoreactivity but not reactivity to an acute non-social stressor in the prairie vole. *Physiology & Behavior*, 147, 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.04.024>
- Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (1993). Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Molecular Brain Research*, 18(3), 195–200. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(93\)90189-V](https://doi.org/10.1016/0169-328X(93)90189-V)
- Poeggel, G., Helmeke, C., Abraham, A., Schwabe, T., Friedrich, P., & Braun, K. (2003). Juvenile emotional experience alters synaptic composition in the rodent cortex, hippocampus, and lateral amygdala. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), 16137–16142. <https://doi.org/10.1073/pnas.2434663100>
- Pohl, T. T., Jung, O., Di Benedetto, B., Young, L. J., & Bosch, O. J. (2021). Microglia react to partner loss in a sex- and brain site-specific manner in prairie voles. *Brain, Behavior, and Immunity*, 96, 168–186. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2021.05.026>
- Reincke, S. A. J., & Hanganu-Opatz, I. L. (2017). Early-life stress impairs recognition memory and perturbs the functional maturation of prefrontal-hippocampal-perirhinal networks. *Scientific Reports*, 7, 42042. <https://doi.org/10.1038/srep42042>
- Reppucci, C. J., Gergely, C. K., & Veenema, A. H. (2018). Activation patterns of vasopressinergic and oxytocinergic brain regions following social play exposure in juvenile male and female rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 30(8), e12582. <https://doi.org/10.1111/jne.12582>
- Reshetnikov, V. V., Kovner, A. V., Lepeshko, A. A., Pavlov, K. S., Grinkevich, L. N., & Bondar, N. P. (2020). Stress early in life leads to cognitive impairments, reduced numbers of CA3 neurons and altered maternal behavior in adult female mice. *Genes, Brain and Behavior*, 19(3). <https://doi.org/10.1111/gbb.12541>
- Rice, C. J., Sandman, C. A., Lenjavi, M. R., & Baram, T. Z. (2008). A novel mouse model for acute and long-lasting consequences of early life stress. *Endocrinology*, 149(10), 4892–4900. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0633>
- Riveros-Barrera, I., & Dueñas, Z. (2016). La separación materna durante la lactancia altera los niveles basales del sistema neuroendocrino en ratas adolescentes y adultas. *Biomedica*, 36(1), 67–77. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i1.2830>
- Rood, B. D., Stott, R. T., You, S., Smith, C. J. W., Woodbury, M. E., & De Vries, G. J. (2013). Site of origin of and sex differences in the vasopressin innervation of the mouse (*Mus musculus*) brain. *Journal of Comparative Neurology*, 521(10), 2321–2358. <https://doi.org/10.1002/cne.23288>

- Roque, A., Ochoa-Zarzosa, A., & Torner, L. (2016). Maternal separation activates microglial cells and induces an inflammatory response in the hippocampus of male rat pups, independently of hypothalamic and peripheral cytokine levels. *Brain, Behavior, and Immunity*, 55, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.09.017>
- Rosinger, Z. J., Jacobskind, J. S., Park, S. G., Justice, N. J., & Zuloaga, D. G. (2017). Distribution of corticotropin-releasing factor receptor 1 in the developing mouse forebrain: A novel sex difference revealed in the rostral periventricular hypothalamus. *Neuroscience*, 361, 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.08.016>
- Ruiz, R., Roque, A., Pineda, E., Licona-Limón, P., José Valdéz-Alarcón, J., & Lajud, N. (2018). Early life stress accelerates age-induced effects on neurogenesis, depression, and metabolic risk. *Psychoneuroendocrinology*, 96, 203–211. <https://doi.org/10.1016/J.PSYNEUEN.2018.07.012>
- Rundle, S. E., & Funder, J. W. (1988). Ontogeny of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin in the rat. *Neuroendocrinology*, 47(5), 374–378. <https://doi.org/10.1159/000124941>
- Saavedra, L. M., Fenton Navarro, B., & Torner, L. (2017). Early Life Stress Activates Glial Cells in the Hippocampus but Attenuates Cytokine Secretion in Response to an Immune Challenge in Rat Pups. *Neuroimmunomodulation*, 24(4–5), 242–255. <https://doi.org/10.1159/000485383>
- Sandman, C. A., Curran, M. M., Davis, E. P., Glynn, L. M., Head, K., & Baram, T. Z. (2018). Cortical Thinning and Neuropsychiatric Outcomes in Children Exposed to Prenatal Adversity: A Role for Placental CRH? *The American Journal of Psychiatry*, 175(5), 471–479. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2017.16121433>
- Schloesser, R. J., Manji, H. K., & Martinowich, K. (2009). Suppression of adult neurogenesis leads to an increased hypothalamo-pituitary-adrenal axis response. *Neuroreport*. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e3283293e59>
- Schmidt, M. V., Sterlemann, V., Wagner, K., Niederleitner, B., Ganea, K., Liebl, C., Deussing, J. M., Berger, S., Schütz, G., Holsboer, F., & Müller, M. B. (2009). Postnatal Glucocorticoid Excess Due to Pituitary Glucocorticoid Receptor Deficiency: Differential Short- and Long-Term Consequences. *Endocrinology*, 150(6), 2709–2716. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1211>
- Shin, S. Y., Han, S. H., Woo, R.-S., Jang, S. H., & Min, S. S. (2016). Adolescent mice show anxiety- and aggressive-like behavior and the reduction of long-term potentiation in mossy fiber-CA3 synapses after neonatal maternal separation. *Neuroscience*, 316, 221–231. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2015.12.041>
- Short, A. K., Maras, P. M., Pham, A. L., Ivy, A. S., & Baram, T. Z. (2020). Blocking CRH receptors in adults mitigates age-related memory impairments provoked by early-life adversity. *Neuropsychopharmacology*, 45(3), 515–523. <https://doi.org/10.1038/s41386-019-0562-x>

- Sierra, A., Gottfried-Blackmore, A., Milner, T. A., McEwen, B. S., & Bulloch, K. (2008). Steroid hormone receptor expression and function in microglia. *GLIA*, 56(6), 659–674. <https://doi.org/10.1002/glia.20644>
- Spoljaric, A., Seja, P., Spoljaric, I., Virtanen, M. A., Lindfors, J., Uvarov, P., Summanen, M., Crow, A. K., Hsueh, B., Puskarjov, M., Ruusuvoori, E., Voipio, J., Deisseroth, K., & Kaila, K. (2017). Vasopressin excites interneurons to suppress hippocampal network activity across a broad span of brain maturity at birth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(50), E10819–E10828. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717337114>
- Squire, L. R. (2003). *Fundamental neuroscience*. Academic Press.
- Stevenson, E. L., & Caldwell, H. K. (2012). The vasopressin 1b receptor and the neural regulation of social behavior. In *Hormones and Behavior* (Vol. 61, Issue 3, pp. 277–282). *Horm Behav.* <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.11.009>
- Sugama, S., Takenouchi, T., Fujita, M., Conti, B., & Hashimoto, M. (2009). Differential microglial activation between acute stress and lipopolysaccharide treatment. *Journal of Neuroimmunology*, 207(1), 24–31. <https://doi.org/10.1016/J.JNEUROIM.2008.11.007>
- Suri, D., Bhattacharya, A., & Vaidya, V. A. (2014). Early stress evokes temporally distinct consequences on the hippocampal transcriptome, anxiety and cognitive behaviour. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 17(02), 289–301. <https://doi.org/10.1017/S1461145713001004>
- Swaab, D. F., Bao, A.-M., & Lucassen, P. J. (2005). The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Research Reviews*, 4(2), 141–194. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2005.03.003>
- Tanaka, J., Fujita, H., Matsuda, S., Toku, K., Sakanaka, M., & Maeda, N. (1997). Glucocorticoid- and mineralocorticoid receptors in microglial cells: The two receptors mediate differential effects of corticosteroids. *GLIA*, 20(1), 23–37. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199705\)20:1<23::AID-GLIA3>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199705)20:1<23::AID-GLIA3>3.0.CO;2-6)
- Toni, N., & Schinder, A. F. (2015). Maturation and Functional Integration of New Granule Cells into the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(1), a018903. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018903>
- Troakes, C., & Ingram, C. D. (2009). Anxiety behaviour of the male rat on the elevated plus maze: associated regional increase in c-fos mRNA expression and modulation by early maternal separation. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 12(4), 362–369. <https://doi.org/10.1080/10253890802506391>
- Tsigos, C., & Chrousos, G. P. (2002). Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research*, 53(4), 865–871. [https://doi.org/10.1016/S0022-3999\(02\)00429-4](https://doi.org/10.1016/S0022-3999(02)00429-4)
- van der Kooij, M. A., Grosse, J., Zanoletti, O., Papilloud, A., & Sandi, C. (2015). The effects of stress during early postnatal periods on behavior and hippocampal neuroplasticity markers in adult male mice. *Neuroscience*, 311, 508–518. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2015.10.058>

- van Hasselt, F. N., de Visser, L., Tieskens, J. M., Cornelisse, S., Baars, A. M., Lavrijsen, M., Krugers, H. J., van den Bos, R., & Joëls, M. (2012). Individual Variations in Maternal Care Early in Life Correlate with Later Life Decision-Making and c-Fos Expression in Prefrontal Subregions of Rats. *PLOS ONE*, 7(5), e37820. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0037820>
- 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), 463–467. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.10.017>
- Veenema, A. H., Reber, S. O., Selch, S., Obermeier, F., & Neumann, I. D. (2008). Early Life Stress Enhances the Vulnerability to Chronic Psychosocial Stress and Experimental Colitis in Adult Mice. *Endocrinology*, 149(6), 2727–2736. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1469>
- Verstraeten, B. S. E., McCreary, J. K., Weyers, S., Metz, G. A. S., & Olson, D. M. (2019). Prenatal two-hit stress affects maternal and offspring pregnancy outcomes and uterine gene expression in rats: Match or mismatch? *Biology of Reproduction*, 100(1), 195–207. <https://doi.org/10.1093/biolre/iyoy166>
- Villa, A., Vegeto, E., Poletti, A., & Maggi, A. (2016). Estrogens, neuroinflammation, and neurodegeneration. In *Endocrine Reviews* (Vol. 37, Issue 4, pp. 372–402). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1210/er.2016-1007>
- Viviani, B., Boraso, M., Valero, M., Gardoni, F., Marco, E. M., Llorente, R., Corsini, E., Galli, C. L., Di Luca, M., Marinovich, M., López-Gallardo, M., & Viveros, M.-P. (2014). Early maternal deprivation immunologically primes hippocampal synapses by redistributing interleukin-1 receptor type I in a sex dependent manner. *Brain, Behavior, and Immunity*, 35, 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.09.008>
- Vivinetto, A. L., Suárez, M. M., & Rivarola, M. A. (2013). Neurobiological effects of neonatal maternal separation and post-weaning environmental enrichment. *Behavioural Brain Research*, 240, 110–118. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2012.11.014>
- Wang, X. D., Rammes, G., Kraev, I., Wolf, M., Liebl, C., Scharf, S. H., Rice, C. J., Wurst, W., Holsboer, F., Deussing, J. M., Baram, T. Z., Stewart, M. G., Müller, M. B., & Schmidt, M. V. (2011). Forebrain CRF1 modulates early-life stress-programmed cognitive deficits. *Journal of Neuroscience*, 31(38), 13625–13634. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2259-11.2011>
- Wang, Z., Young, L. J., Liu, Y., & Insel, T. R. (1997). Species differences in vasopressin receptor binding are evident early in development: Comparative anatomic studies in prairie and montane voles. *The Journal of Comparative Neurology*, 378(4), 535–546. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19970224\)378:4<535::AID-CNE8>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19970224)378:4<535::AID-CNE8>3.0.CO;2-3)
- Wei, L., Hao, J., Lacher, R. K., Abbott, T., Chung, L., Colangelo, C. M., & Kaffman, A. (2015). Early-life stress perturbs key cellular programs in the developing mouse hippocampus. *Developmental Neuroscience*, 37(6), 476–488. <https://doi.org/10.1159/000430861>

- Wei, L., Simen, A., Mane, S., & Kaffman, A. (2012). Early life stress inhibits expression of a novel innate immune pathway in the developing hippocampus. *Neuropsychopharmacology*, 37(2), 567–580. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.239>
- Weinberg, M. S., Bhatt, A. P., Girotti, M., Masini, C. V., Day, H. E. W., Campeau, S., & Spencer, R. L. (2009). Repeated Ferret Odor Exposure Induces Different Temporal Patterns of Same-Stressor Habituation and Novel-Stressor Sensitization in Both Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity and Forebrain c-fos Expression in the Rat. *Endocrinology*, 150(2), 749. <https://doi.org/10.1210/EN.2008-0958>
- Windle, R. J., Kershaw, Y. M., Shanks, N., Wood, S. A., Lightman, S. L., & Ingram, C. D. (2004). Oxytocin Attenuates Stress-Induced c-fos mRNA Expression in Specific Forebrain Regions Associated with Modulation of Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Activity. *Journal of Neuroscience*, 24(12), 2974–2982. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3432-03.2004>
- Yang, C., Zhang, X., Gao, J., Wang, M., & Yang, Z. (2017). Arginine vasopressin ameliorates spatial learning impairments in chronic cerebral hypoperfusion via V1a receptor and autophagy signaling partially. *Translational Psychiatry*, 7(7), e1174. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.121>
- Yi, S. J., & Baram, T. Z. (1994). Corticotropin-releasing hormone mediates the response to cold stress in the neonatal rat without compensatory enhancement of the peptide's gene expression. *Endocrinology*, 135(6), 2364–2368. <https://doi.org/10.1210/endo.135.6.798841>
- Zhang, L., & Hernández, V. S. (2013). Synaptic innervation to rat hippocampus by vasopressin-immuno-positive fibres from the hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei. *Neuroscience*, 228, 139–162. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2012.10.010>
- Zhang, L., Hernández, V. S., Liu, B., Medina, M. P., Nava-Kopp, A. T., Irlles, C., & Morales, M. (2012). Hypothalamic vasopressin system regulation by maternal separation: Its impact on anxiety in rats. *Neuroscience*, 215, 135–148. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2012.03.046>
- Zhang, Limei, Hernández, V. S., Swinny, J. D., Verma, A. K., Giesecke, T., Emery, A. C., Mutig, K., Garcia-Segura, L. M., & Eiden, L. E. (2018). A GABAergic cell type in the lateral habenula links hypothalamic homeostatic and midbrain motivation circuits with sex steroid signaling. *Translational Psychiatry*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0099-5>
- Zhang, Limei, Hernández, V. S., Vázquez-Juárez, E., Chay, F. K., & Barrio, R. A. (2016). Thirst Is Associated with Suppression of Habenula Output and Active Stress Coping: Is there a Role for a Non-canonical Vasopressin-Glutamate Pathway? *Frontiers in Neural Circuits*, 10, 13. <https://doi.org/10.3389/fncir.2016.00013>
- Zheng, Y., Zhang, Y.-M., & Ni, X. (2016). Urocortin 2 But Not Urocortin 3 Promotes the Synaptic Formation in Hippocampal Neurons via Induction of NGF Production by Astrocytes. *Endocrinology*, 157(3), 1200–1210. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1812>
- Zhou, H., Liu, Y., Liang, J. P., & Shao, J. L. (2010). Effect of maternal isolation stress on epilepsy susceptibility in young rats. *Chinese Journal of Contemporary Pediatrics*, 12(8), 662–665. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20704804/>

Lista de abreviaturas

ACTH	Hormona adenocorticotropica
AIS	Segmento inicial del axón (Axon initial segment)
AISS	Espinas del Segmento inicial del axón (Axon initial segment spines)
ANIH	Instituto Nacional Americano de la salud (American National Institutes of Health)
ANOVA	Análisis de Varianza
AVP	Arginina vasopresina
CA	Cornus Ammon, cuerno de Ammon
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CONT	Grupo control
CORT	Corticosterona
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
CRHR1	Receptor 1 de CRH
CRHR2	Receptor 2 de CRH
CT	Cycle threshold, ciclo de detección de fluorescencia
DEX	Dexametasona
E	Día embrionario
ECS	Estrés crónico durante el desarrollo posnatal temprano (Early chronic stress)
EDTA	Ácido etilendiamino-tetra-acético
ELISA	Enzyme linked immuno-sorbent assay
ELS	Estrés durante las etapas tempranas de la vida (Early life stress)
FS	Nado forzado
GAPDH	Gliceraldehído-fosfato deshidrogenasa
GC	Glucocorticoides
GCL	Capa de células granulares (Granular cells layer)
GCR	Receptor a Glucocorticoides

GD	Giro dentado
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
HPA	Eje Hipotálamo-hipófisis-glándulas suprarrenales
Iba-1	Molécula adaptadora de unión de calcio ionizado 1 (Ionized calcium-binding adapter molecule 1)
IL-1B	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
MHC-1	Complejo mayor de histocompatibilidad I
MR	Receptor a Mineralocorticoides
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
MS180	Separación maternal de 180minutos
OLT	Prueba de localización de objetos
OXT	Oxitocina
PB	Amortiguador de fosfato de sodio
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD	Día postnatal
POMC	Proopiomelanocortina
PSD95	Proteína de la densidad postnaptica 95
PVN	Núcleo paraventricular
q-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
RU-486	Mifepristona
EE	Error estándar del promedio
sGCL	Capa de la células subgranulares
SNC	Sistema nervioso central
SYN	Sinaptofisina
TBST	Amortiguador de Tris + NaCl 0.9% y Tritón 100x al 0.3%
TNF-a	Factor de necrosis tumoral alfa

- V1A Receptor de vasopresina V1A
- V1B Receptor de vasopresina V1B
- V2 Receptor de vasopresina V2