



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
FACULTAD DE PSICOLOGÍA

La persistencia de los efectos tipo antidepressivo de la EMTr 5Hz se acompañan de modificaciones en la microglía y en el perfil de citocinas periféricas en roedores expuestos a estrés crónico impredecible.

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA:
DANA VIANEY CASTRO DE AQUINO

TUTOR PRINCIPAL:
DR. GERARDO BERNABÉ RAMÍREZ RODRÍGUEZ
INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA
RAMÓN DE LA FUENTE MUÑÍZ

COMITÉ TUTOR

DRA. NELLY VEGA RIVERA
INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA
RAMÓN DE LA FUENTE MUÑÍZ

DR. DANIEL REYES HARO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO

JUNIO 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA
RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría del **Dr. Gerardo Bernabé Ramírez Rodríguez** en el laboratorio de Neurogénesis de la Subdirección de Investigaciones Clínicas del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, y gracias al apoyo del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, quien otorgó a la autora, una beca nacional durante la realización de éste, con número de Apoyo:778653.

Se reconoce y agradece la invaluable asesoría del comité tutorial que asesoró el desarrollo de este proyecto:

Dra. Nelly Vega

Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

Dr. Daniel Reyes Haro

Instituto de Neurobiología, UNAM.

Dr. Gerardo Bernabé Ramírez Rodríguez

Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

Se reconoce y agradece la asesoría de los integrantes que conforman el comité sinodal:

Dra. Mónica Flores Ramos

Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

Dra. Gina Lorena Quirarte

Instituto de Neurobiología, UNAM.

Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete

Centro de Investigación y Estudios Avanzados, CINVESTAV-IPN.

Se reconoce y agradece la asesoría técnica de:

QBP. Leonardo Ortiz López

Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

M. en C. David Meneses San Juan

Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

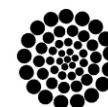
Se reconoce y agradece la gestión y apoyo administrativo de:

Dra. Nuri Aranda

Instituto de Neurobiología, UNAM.

Dra. Maricela Luna Muñoz López

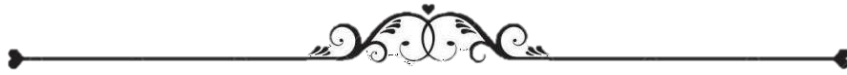
Instituto de Neurobiología, UNAM.



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología





Dedicatoria:

A Raquel de Aquino Castañeda, mi madre.
A ti te debo todo lo que tengo, y lo que soy.

A Araceli de Aquino Castañeda, mi tía.
Agradezco y reconozco una vida de sacrificio y esfuerzo
por tu familia.

Gracias a ambas por ser mi mayor ejemplo de fuerza,
amor y valentía.
Mi cariño y admiración, siempre.



Agradecimientos

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por brindarme las herramientas necesarias para la aplicación de mis conocimientos en el quehacer científico y la investigación.

Al **Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz** por brindar las facilidades necesarias para el desarrollo de este proyecto.

Al **Dr. Gerardo Bernabé Ramírez Rodríguez** por darme la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo. Por brindarnos siempre la confianza, el tiempo y la atención necesaria, y por su acertada guía en el desarrollo de los proyectos de investigación.

Al **Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete**, por representar mi primer acercamiento a la investigación científica, pero especialmente, por su invaluable aportación en mi formación personal y profesional.

Al personal del laboratorio de neurogénesis, la **Dra. Edith Cabrera Muñoz**, el **Biól. Victorino Salgado Zambrano**, y el **MVZ. Arturo Castillo Tovar**, por su valioso apoyo.

A mis compañeros y amigos de laboratorio **Andrés, Angélica, David, Diana, Jorge, María Elisa, Natalia, Vanessa, y Viridiana**, gracias por sus múltiples enseñanzas, oportunos consejos, y por todos los momentos compartidos.

A mis amigas la **Psicól. Andrea Granados** y la **Biól. Gabriela Valle**, gracias por las recomendaciones, las conversaciones, los buenos momentos, y las incontables risas; pero sobre todo gracias por su sincera amistad.

A mis amigos, el **Dr. Luis Uriel López Bailón**, el **M. en C. Alonso Cruz Cruz**, el **Dr. Carlos Samuel Galán**, el **Dr. Julio Ángel Vázquez**, la **M. en C. Gabriela Hernández Galicia**, por su invaluable amistad, por su siempre acertada asesoría y consejos, pero, sobre todo por ser motivo de mi admiración e inspiración para llegar a ser una mejor científica. Los admiro, los estimo y los quiero.

A **Allan Irasek Rico Becerra**, por aportar dicha y alegría en mi vida. Gracias por las innumerables sonrisas, la basta comprensión, la extraordinaria lírica, y los infinitos aprendizajes. Coincidir y conectar: magia y suerte a la vez.

A mi familia, especialmente a mis hermanas **Andrea, Dayana** y **Ana**, por su invaluable apoyo.



A todas y cada una de las personas que hicieron posible el comienzo, el desarrollo y la culminación de este proyecto:

Al **M. en C. Ernesto Acevedo Ochoa**, un reconocimiento por el importante apoyo durante el inicio de este, y otros procesos. Por todo el esfuerzo y sacrificio que has hecho en pro de la ciencia. Que la vida te dirija por el mejor camino, y, te mantenga siempre fiel a tus valores y convicciones.

A **María del Rosario Ochoa** por ser un faro de luz en mi vida y en la de las personas que la rodean. Estoy segura de que sus oraciones hicieron posible la continuación de mi camino. Bendiciones para usted y su familia, siempre.

A **Pimienta**, por enseñarme que el amor puede ser infinito e incondicional. Por representar un soporte único y vital en mi vida.

Ojalá,
Siempre aquí,
Contigo en casa ♥.



Tabla de contenido

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Depresión	1
1.1 Sintomatología y generalidades de la depresión.	1
2. Estrés como un factor relevante en el desarrollo de depresión.	2
3. Modelo Estrés crónico impredecible.	3
4. Neurogénesis en el hipocampo	4
4.1 Anatomía del hipocampo.	4
4.2 Neurogénesis hipocámpica	5
5. Alteración de la neurogénesis en la depresión.	6
6. Microglía	7
7. Tratamientos farmacológicos para revertir la depresión.	11
II. ANTECEDENTES	13
1. Neurogénesis en el hipocampo como sustrato para los efectos de la EMTr a 5Hz.	13
2. Persistencia de los efectos tipo antidepressivos de la EMTr a 5Hz.	14
III. JUSTIFICACIÓN	16
IV. HIPÓTESIS	16
V. OBJETIVOS	17
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	18
VII. RESULTADOS	26
VIII. DISCUSIÓN	37
IX. CONCLUSIONES	37
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
XI. ANEXO	52

Índice de figuras

Figura 1. Anatomía de la formación hipocampal.	4
Figura 2. Estados de activación de la microglía basados en el perfil inflamatorio y la función efectora.	10
Figura 3. La estimulación magnética transcraneal a 5Hz favorece la maduración de espinas dendríticas en las células granulares del giro dentado.	15
Figura 4. Efecto de la EMTr 5Hz sobre las células gliales en el hipocampo.	16
Figura 5. La estimulación magnética transcraneal a 5Hz revierte la disminución de células IBA-1 ⁺ causada por el estrés crónico.	31
Figura 6. La estimulación magnética transcraneal de 5 Hz revierte las alteraciones morfológicas en la microglía causadas por el estrés crónico.	32
Figura 7. Persistencia de los efectos de la estimulación magnética transcraneal a 5 Hz en las alteraciones morfológicas en la microglía causadas por el estrés crónico.	33
Figura 8. EMTr 5 Hz revierte la disminución de la densidad de células TMEM119 ⁺ en la capa de células granulares del giro dentado ocasionada por la exposición a estrés crónico.	36
Figura 9. Persistencia de los efectos de la estimulación magnética transcraneal a 5 Hz en la densidad de células TMEM119 ⁺ en la capa de células granulares del giro dentado ocasionada por la exposición a estrés crónico.	37
Figura 10. Persistencia de los efectos de la estimulación magnética transcraneal a 5 Hz en los niveles de citocinas proinflamatorias periféricas.	39
Figura 11. Persistencia de los efectos de la estimulación magnética transcraneal a 5 Hz en los niveles de citocinas antiinflamatorias periféricas.	40
Figura 12. La persistencia de los efectos tipo antidepressivo de la EMTr a 5Hz se acompañan de modificaciones en el nicho neurogénico del hipocampo y en el perfil de citocinas periféricas en roedores expuestos a estrés crónico impredecible	47

Abreviaturas

5-HT	5 hidroxitriptamina
ab	<i>antibody</i> , anticuerpo
ANOVA	Análisis de varianza
APA	Asociación Estadounidense de Psiquiatría
Arg1	Arginasa 1
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i> , Factor neutrófico derivado del cerebro
BH	Barrera hematoencéfalica
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , Albúmina Sérica Bovina
CA	<i>Cornu ammonis</i>
CE	Corteza entorrinal
CG	Capa granular
CPFDLI	Corteza prefrontal dorsolateral izquierda
CPFI	Corteza prefrontal izquierda
DA	Dopamina
DAB	3,3-diaminobencidina
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
DCX	Proteína doblecortina
DO	Densidad óptica
DSM-5	Manual diagnóstico y estadístico de trastornos mentales
ECI	Estrés crónico impredecible
EMTr	Estimulación magnética transcraneal repetitiva
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> , Factor de crecimiento fibroblástico
GD	Giro dentado
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> , Proteína verde fluorescente

Hz	Hertz
IBA1	Molécula adaptadora de unión a calcio ionizada 1
IDO	Indoleamina-2,3-dioxigenasa
IFN-γ	Interferón gamma
IL-10	Interleucina IL-10
IL-12	Interleucina IL-12
IL-13	Interleucina IL-13
IL-17	Interleucina IL-17
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-2	Interleucina IL-2
IL-4	Interleucina IL-4
IL-6	Interleucina IL-6
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
INPRFM	Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz
INSR	Inhibidores selectivos de la recaptura de norepinefrina
ISRS	Inhibidores selectivos de la recaptura de Serotonina
KYN	Cinurenina
MHC-II	Major histocompatibility complex II, Moléculas de histocompatibilidad II
NA	Noradrenalina
NCAM	Molécula de adhesión celular neural
NeUN	Proteína neuronal nuclear
NF-κB	Factor de transcripción nuclear- κ -beta
NMDA	Receptor N-metil-D-aspartato
NOS	Especies reactivas de nitrógeno
OMS	Organización mundial de la salud
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos



PFA	Paraformaldehído
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrón
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAM	Eje simpático adreno-medular
SEM	Error estándar de la media
SERT	Transportador de serotonina
SNC	Sistema nervioso central
TLRs	Receptores tipo toll
TMEM119	Proteína transmembranal 119
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRP	Triptofano
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> , Factor de crecimiento endotelial
ZSG	Zona subgranular



Resumen

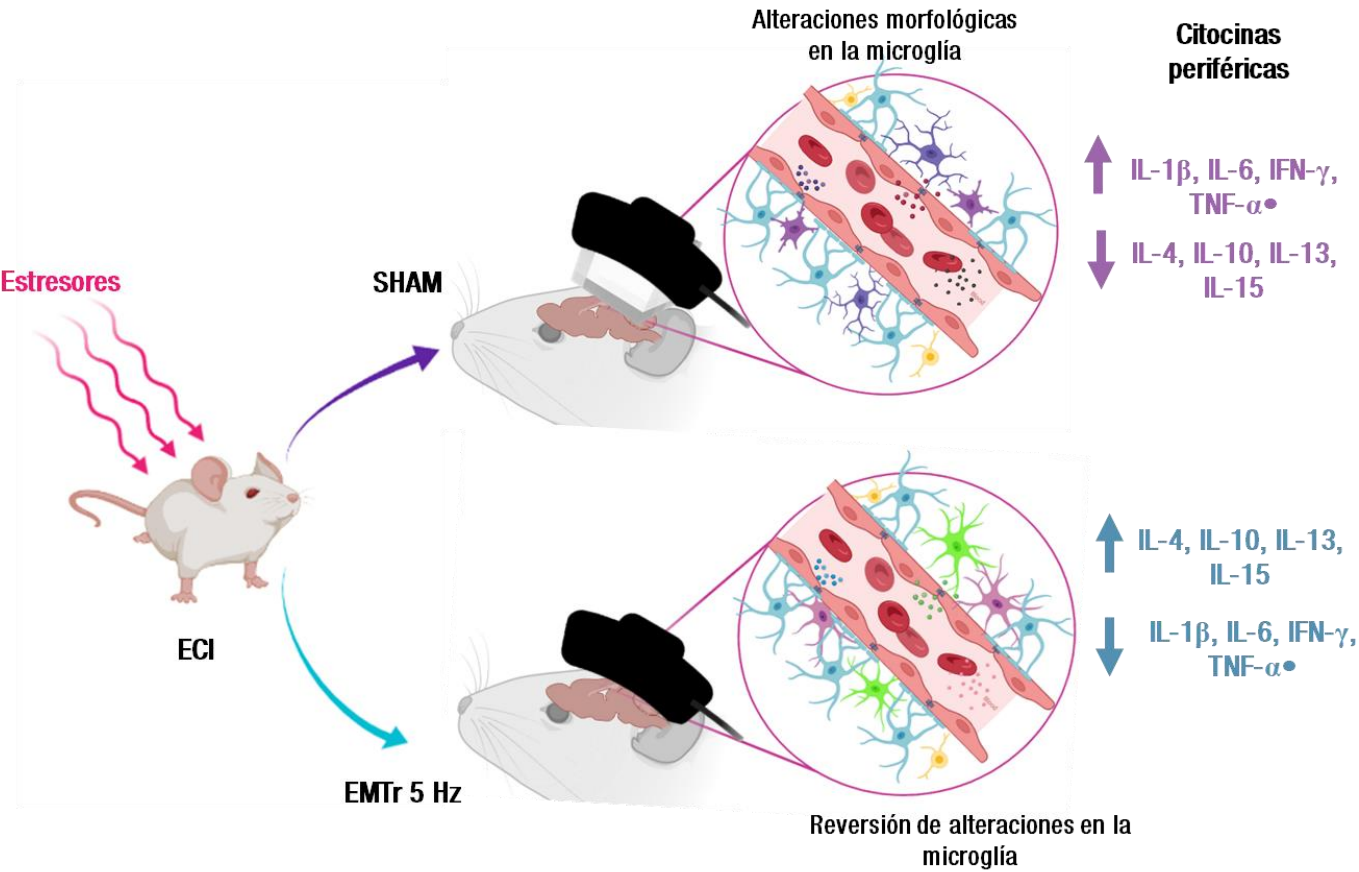
La estimulación magnética transcraneal repetitiva (EMTr) como intervención terapéutica para la depresión ha demostrado tener resultados positivos en pacientes que sufren depresión mayor, especialmente en pacientes con resistencia al tratamiento farmacológico. Existe una estrecha relación entre la neurogénesis y los efectos de la EMTr; en modelos murinos expuestos a estrés crónico impredecible (ECI) y tratados con EMTr (5 Hz), la estimulación se ha relacionado con efectos pro-neurogénicos en el hipocampo y con una disminución de los comportamientos de tipo depresivo, como la anhedonia y la desesperanza. Sin embargo, aunque se conoce la relación de la neurogénesis en el efecto antidepressivo, los mecanismos moleculares y celulares que conducen a la persistencia de sus efectos antidepressivos y a nivel plástico en el hipocampo no han sido completamente dilucidados. En este sentido, fue de interés conocer si la EMTr puede modular otros linajes celulares, como la microglía, ya que, la sobreactivación de estas células se ha correlacionado con la generación de un entorno proinflamatorio en el trastorno depresivo, que afecta a la producción de factores que modulan la proliferación, supervivencia o diferenciación de las células recién nacidas. Por lo tanto, fue importante determinar si la EMTr de 5 Hz puede revertir las alteraciones morfológicas de las células microgliales en el hipocampo de roedores expuestos a ECI, y si estas modificaciones persisten en el tiempo. Se utilizaron hembras Balb/c expuestas a ECI durante 15 semanas continuas, tratadas con una primera serie de EMTr 5Hz durante 4 semanas, y los animales que recibieron el tratamiento de mantenimiento se sometieron a una fase de disminución de sesiones durante 5 semanas más (cuatro sesiones en la semana 1, tres sesiones en la semana 2, dos en la semana 3, y una en las semanas 4 y 5), utilizando los mismos parámetros de estimulación proporcionados durante el tratamiento agudo. Para llevar a cabo la detección de células microgliales, se realizó un inmunomarcaje con IBA-1 y TMEM119, y se cuantificó el número de células IBA-1⁺ o TMEM119⁺ en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo, y se estimaron los datos morfométricos en estas células. Nuestros resultados indican que la EMTr de 5 Hz revierte las alteraciones en las células microgliales causadas por el estrés crónico, promoviendo su proliferación en la capa de células granulares del giro dentado y, este efecto se mantiene durante al menos 7 semanas, a pesar de la exposición continua al estrés crónico. Además, se observó una disminución de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF- α) a nivel periférico, y un incremento de citocinas antiinflamatorias (IL-4, I-10) en los grupos expuestos a EMTr 5 Hz.

Palabras clave:

Estimulación magnética transcraneal repetitiva, depresión, neurogénesis.



Resumen gráfico



I. INTRODUCCIÓN

1. Depresión

1.1 Sintomatología y generalidades de la depresión.

La depresión es un trastorno mental caracterizado fundamentalmente por cambios transitorios o permanentes en el estado de ánimo, por provocar en el individuo sentimientos de abatimiento, infelicidad y culpabilidad, asociados a una incapacidad total o parcial para disfrutar de los acontecimientos de la vida cotidiana (anhedonia). Además de acompañarse de otros signos y síntomas que provocan disfunción cognitiva y psicomotora, tales como: cansancio, alteraciones en el sueño y la alimentación, pérdida de libido, disminución de energía, escasa concentración y reactividad emocional, desinterés por la higiene personal; y pensamientos recurrentes de autolesión (Subiabre, 2012). El Manual diagnóstico y estadístico de trastornos mentales (DSM-5) de la Asociación Estadounidense de Psiquiatría (APA), menciona que tales síntomas deben presentarse en el individuo casi diariamente, por un periodo mínimo de dos semanas, para poder ser diagnóstico como depresión.

Este padecimiento altera significativamente las habilidades sociales y de autocuidado del individuo, y en los casos más graves, puede llevar a la autolesión o suicidio; es por ello que este trastorno contribuye de manera importante a la morbilidad mundial, ya que de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), se calcula que la depresión afecta a más de 300 millones de personas en el mundo (World Health Organization, 2020).

En México, la depresión tiene una prevalencia en la población del 32.6%, correspondiente a 4.1% en casos de depresión mayor y 18.5% en casos de depresión menor. Esta incidencia es mayor en mujeres que en hombres, 10.4% y 5.4%, respectivamente, y en personas entre 15 y 29 años (Rafful, *et al.*, 2012).



2. Estrés como un factor relevante en el desarrollo de depresión.

El estrés se define como la respuesta fisiológica del organismo para mantener la homeostasis frente a las presiones del medio ambiente, activando un conjunto de reacciones que implican respuestas conductuales y fisiológicas (neuronales, metabólicas y neuroendocrinas) que permiten al organismo responder al o los estresores. Un determinado y breve grado de estrés provee estímulos benéficos al organismo, sin embargo, la exposición continua provoca en el individuo un estado de poca resistencia ante los cambios homeostáticos (Hammen, 2005).

El estrés crónico es considerado un factor de riesgo para el inicio, desarrollo o exacerbación de los trastornos depresivos. De acuerdo con Brown (2009) una exposición crónica al estresor promueve alteraciones en el funcionamiento del circuito neurobiológico del estrés, activando el Sistema Nervioso Autónomo y el Sistema Endocrino, a través de los ejes Simpático-Adreno-Medular (SAM) e Hipotálamo-hipófisis-Adrenal (HHA), respectivamente. La respuesta al estrés se asocia directamente a la hipersecreción de glucocorticoides por el eje HHA y la síntesis de catecolaminas por el eje SAM. El nivel elevado de glucocorticoides y el eje HHA hiperactivado, también se encuentran presentes en personas con diagnóstico de depresión (Duval, González, y Rabia, 2010; Iwata, Ota, y Duman, 2013; Manji *et al.*, 2003).

La mayor cantidad de receptores de glucocorticoides se localizan en el hipocampo (Bremner, 1999), por lo cual se considera que la exposición a estrés crónico puede perjudicar la morfología de esta estructura cerebral. La atrofia del hipocampo en personas deprimidas se ha convertido en una de las pruebas más importantes para considerar el estrés crónico como un factor de riesgo en la depresión (Krishnadas y Cavanagh, 2012).

Estudios en animales de experimentación señalan que el estrés crónico perjudica la morfología del hipocampo provocando atrofia en los árboles dendríticos, pérdida de neuronas existentes e inhibición de la neurogénesis hipocámpica (Duval *et al.*,



2010). Los modelos animales de depresión han sido clave para esclarecer los mecanismos celulares, moleculares y fisiológicos que caracterizan la patogénesis de esta enfermedad. Dada la heterogeneidad en la etiología de la depresión, existen diversos modelos animales que reproducen los síntomas diacríticos de la enfermedad, como lo son la anhedonia (perdida de interés a estímulos placenteros), y la desesperanza (apatía). Uno de los más utilizados es el modelo de estrés crónico impredecible (ECI) ya que posee ventaja sobre otros modelos.

3. Modelo de estrés crónico impredecible.

El modelo de estrés crónico impredecible fue propuesto por primera vez por Katz (1982) y desarrollado por Papp y Willner en los años noventa. (Nollet, Le Guisquet, y Belzung 2013). Este modelo reproduce las principales alteraciones conductuales de la depresión (Anhedonia y apatía), así como también induce algunas alteraciones fisiológicas presentes en las personas deprimidas, tales como el aumento en los niveles de corticosterona en plasma (Vega-Rivera *et al.* 2016), disminución en la neurogénesis hipocámpica (Alonso *et al.* 2004) y disfunción del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (Zhao *et al.* 2018). Además de que tiene la ventaja sobre otros modelos, de reproducir la condición clínica del tratamiento farmacológico, ya que la administración crónica, pero no aguda, disminuye las conductas tipo depresivas generadas en este modelo (Nollet, Le Guisquet, y Belzung, 2013). De tal modo que el modelo de estrés crónico impredecible es uno de los más usados para generar conductas depresivas en modelos animales y estudiar el efecto de distintos tratamientos antidepresivos (Willner, 2016).



4. Neurogénesis en el hipocampo

4.1 Anatomía del hipocampo.

El hipocampo presenta una neuroanatomía perfectamente diferenciada morfológica y funcionalmente en dos regiones principales: el giro dentado (GD) y el *cornu ammonis* (CA), el cual a su vez se subdivide en CA3, CA2 y CA1, principalmente (Figura 1). El giro dentado está formado por tres capas celulares. La capa más externa, es la capa molecular, se encuentra constituida por las dendritas de las células granulares y por los axones procedentes de la corteza entorrinal (CE). Por debajo de la capa molecular se sitúa la capa principal del GD denominada capa granular (CG), formada por células granulares empaquetadas. La tercera es la capa situada en la base de la capa granular, denominada zona subgranular (ZSG), región en la que se encuentra el nicho neurogénico hipocámpico (Cameron *et al.*, 1993; Gould *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2003).

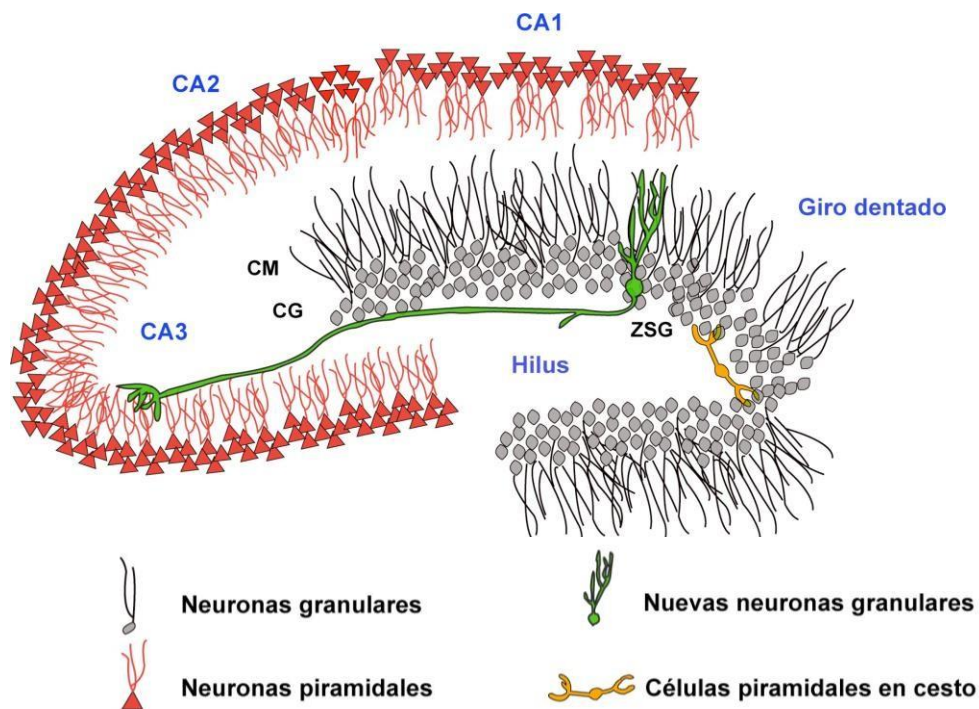


Figura 1.- Anatomía de la formación hipocámpica. CM: Capa molecular; CG: Capa granular; ZSG: Zona subgranular; CA: *Cornu ammonis*. Tomada de Liu *et al.*, 2003.

4.2 Neurogénesis hipocampal

La neurogénesis es un proceso característico de las etapas iniciales del desarrollo de los organismos. Hasta hace algún tiempo, se pensaba que el sistema nervioso adulto permanecía estático y sin renovación neuronal. Sin embargo, en la década de los sesenta fueron presentados los primeros reportes de la existencia de neurogénesis en algunas regiones del cerebro adulto en roedores (Altman y Das, 1965). La neurogénesis ocurre de forma restringida en dos regiones cerebrales que son remanentes de zonas germinativas; la zona subventricular (en los ventrículos laterales) y la zona subgranular del giro dentado (Niv *et al.*, 2012).

De acuerdo con Sheline *et al.* (2002) la neurogénesis hipocámpica puede dividirse en tres etapas importantes: proliferación, diferenciación y supervivencia celular. El proceso de diferenciación neuronal se refiere a la distinción celular, en el cual las células inician la expresión fenotípica de las características particulares del tipo celular en que se convertirán (neuronas o células gliales). Estudios en roedores sugieren que alrededor de un 80 a 95% de células se convierten en neuronas, mientras que el resto en glía, principalmente astrocitos (Kempermann *et al.*, 2004; Ramirez *et al.*, 2006; Snyder *et al.*, 2009; Deng *et al.*, 2010).

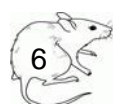
Las células madre neuronales comienzan a sufrir cambios bioquímicos, dejando de expresar proteínas como nestina y proteína ácida fibrilar glial (GFAP), características de células gliales y empiezan a expresar algunas otras proteínas tales como doblecortina (DCX), una proteína asociada a microtúbulos; proteína neuronal nuclear (NeuN), expresada predominantemente en el núcleo de las neuronas postmitóticas; y molécula de adhesión celular neural (NCAM), implicada en el reconocimiento celular y la adhesión célula-célula a través de un mecanismo de unión homofílico e independiente del Ca^{2+} , estos cambios en la expresión de proteínas, promueven el desarrollo de características histológicas y fisiológicas típicas de neuronas Eriksson, 1998; Van Praag *et al.*, 1999; Kempermann *et al.*, 2004; Jessberger *et al.*, 2007;)

5. Alteración de la neurogénesis en la depresión.

El proceso neurogénico es complejo y está regulado por diversos factores que lo regulan positivamente. Aun cuando se sabe que el estrés afecta la formación de neuronas en el hipocampo y que esto se asocia con el aumento en los niveles de glucocorticoides, el mecanismo que subyacía a la inhibición de la neurogénesis causada por el estrés era desconocido, hasta que en estudios recientes se demostró que la exposición al estrés incrementa significativamente los niveles de la citocina proinflamatoria interleucina1 β (IL-1 β) en diferentes regiones cerebrales. Aunado a esto, la administración de IL-1 β produce efectos similares a los provocados por el estrés, como son la alteración en la formación de neuronas y la disminución en los niveles de BDNF (Deak *et al*, 2005; Barrientos *et al*, 2003; Nguyen *et al*, 1998).

En el mismo estudio se demostró que la IL-1 β actúa a través de su receptor (IL-1RI), que es expresado por las células precursoras (Deak *et al*, 2005). De tal modo que a través de la activación del IL-1RI, la IL-1 β inhibe la proliferación celular. Esta vía de señalización involucra al factor de transcripción nuclear- κ -beta (*NF- κ B*). Asimismo, se ha demostrado que la disminución en la proliferación celular causada por el estrés también ocurre de manera paralela al aumento en la expresión de los mensajeros de la IL-6 y del TNF- α . En conjunto, estos trabajos indican que las citocinas proinflamatorias forman parte de los mediadores críticos de los efectos anti neurogénicos causados por el estrés agudo y crónico (Koo y Duman, 2008).

Además del aumento en los niveles de las citocinas, se ha reportado que los glucocorticoides también regulan la expresión de factores neurotróficos importantes para la neurogénesis hipocampal, entre los que se encuentran el BDNF, la NT-3, el FGF y el VEGF. En este sentido, se ha observado que la expresión del BDNF está afectada en el GD del hipocampo en modelos animales de estrés agudo y crónico (Toth, 2008). Por otro lado, también se ha observado que el estrés puede afectar la neurogénesis a través de la activación de los receptores NMDA. Aunque no se conoce en su totalidad el mecanismo por el cual los receptores NMDA reducen la



neuroplasticidad, se cree que niveles altos de glucocorticoides pueden producir niveles altos de glutamato, lo que estaría provocando excitotoxicidad por la entrada excesiva de calcio, con lo que se compromete la viabilidad de la célula (Cameron, McEwen, y Gould, 1995).

En diversos modelos animales de depresión, se ha observado una sobreactivación de la microglía, que correlaciona con un alto nivel de citocinas proinflamatorias en múltiples regiones cerebrales (Sugama *et al.*, 2007; Tynan *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2019); Además se ha reportado que la inhibición de la neuroinflamación mediada por la microglía, alivia los comportamientos depresivos (Zhao *et al.*; 2019). De igual forma, se ha demostrado que la alteración de la estructura y la sobreactivación de la microglía contribuye a la etiología de la depresión (Deng, Chen y Wang, 2020).

La microglía también afecta de forma benéfica a la neurogénesis, ya que es capaz de producir factores que modulan la proliferación o la supervivencia de diferentes células dentro del linaje neuronal. Estudios *in vitro* demuestran que los cultivos de microglía promueven la diferenciación de las células precursoras (Aarum *et al.*, 2003), mientras que los medios condicionados por la microglía mejoran la producción de neuroblastos y la supervivencia neuronal (Morgan *et al.*, 2004; Walton *et al.*, 2006). Recientemente, en experimentos que utilizan la ablación de la microglía (inducida por la toxina de la difteria) proponen que la microglía es esencial para la supervivencia de los neuroblastos (Kreisel *et al.*, 2019); Sin embargo, los mecanismos que subyacen a la regulación de la neurogénesis del hipocampo por parte de la microglía son poco conocidos (Sierra *et al.*, 2014).

6. Microglía

La microglía son las células fagocíticas mononucleares residentes en el SNC que comprenden 5-20% del total de la población glial (Franco *et al.*, 2015). Durante la embriogénesis, estas células son originadas a partir de células precursoras



mieloides en el saco vitelino embrionario, las cuales posteriormente migran al área del SNC (Ginhoux *et al.*, 2010).

En estado quiescente o de reposo, llevan a cabo diversas funciones relacionadas con el mantenimiento de la homeostasis del SNC, y entre las diversas funciones fisiológicas también se incluye su participación en la sinaptogénesis, ya que, durante el desarrollo postnatal, la microglía elimina las neuronas redundantes que no establecen circuitos funcionales, además remodela las sinapsis neuronales fagocitando las espinas dendríticas que no reciben entradas de contactos sinápticos (Colonna y Butovsky, 2017; Kettenmann *et al.*, 2013).

Por otra parte, son responsables de montar una respuesta inmunológica ante patógenos, células apoptóticas, sinapsis redundantes, agregados de proteínas y otros antígenos particulados y solubles provenientes de lesiones en el SNC, tales como derrames cerebrales, traumatismos y las causadas por enfermedades neurodegenerativas (Colonna y Butovsky, 2017). Además, como fuente principal de citocinas proinflamatorias, las células de la microglía son mediadores fundamentales de la neuroinflamación y pueden inducir o modular un amplio espectro de respuestas celulares (Goldman *et al.*, 2016).

En condiciones homeostáticas, la microglía adopta una morfología ramificada caracterizada por un cuerpo celular pequeño y múltiples procesos ramificados largos y delgados que pueden extenderse hasta 50 μm desde el soma. Cuando las células microgliales adoptan estas características morfológicas, se les denomina microglía quiescente o en reposo (Smolders, 2019; Prinz y Priller, 2017).

Sin embargo, ante un estímulo patógeno o de daño, cambian a un estado activado, también denominado estado ameboide, de tipo proinflamatorio (activación clásica o M1), debido a que presentan en su membrana receptores de reconocimiento de patrón (PRRs) como los receptores tipo toll (TLR), los receptores NOD, entre otros. Estos receptores, inician señales en respuesta a diversos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), y están encargados de promover una respuesta

inmune innata, incrementando la producción y expresión de diversas citocinas, quimiocinas, receptores de superficie, enzimas metabólicas, óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno, que permiten que, la microglía M1 sea capaz de fagocitar y eliminar patógenos. Por otro lado, en respuesta al daño tisular la respuesta de la microglía se origina por la activación de TLR endógenos, quienes reconocen a sus ligandos, conocidos como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) (Okun *et al.*, 2011). Asimismo, para detectar factores inflamatorios extrínsecos la microglía expresa receptores a citocinas (Gertig y Hanisch, 2014).

Cuando la respuesta inflamatoria disminuye, la microglía se puede activar hacia un perfil antiinflamatorio (activación alterna o M2), que se encarga de promover la cicatrización, la regeneración del tejido y la angiogénesis. Asimismo, se caracteriza por la secreción de diversas quimiocinas y citocinas antiinflamatorias como IL- 10, IL-4, y TGF- β (Wang *et al.*, 2015), BDNF y arginasa 1 (Arg1) (Parisi *et al.*, 2016). A su vez se ha subdividido a la microglía en diferentes subtipos M2 (Figura 2) dependiendo de la expresión de receptores específicos y de las citocinas secretadas (Orihuela *et al.*, 2016).

La microglía reactiva modifica su morfología, presentando hipertrofia del soma y retracción de los procesos, el cambio en la forma puede estar influido por la Molécula adaptadora de unión a calcio ionizada 1 (IBA- 1). IBA-1 es una proteína de unión a calcio que se expresa en el linaje monocítico (especialmente en la microglía y macrófagos circundantes), interactúa con la L-fimbrina, promoviendo la reorganización de actina, modulando los procesos de migración y fagocitosis en la microglía reactiva (Ohsawa *et al.*, 2004). También ha sido utilizada como marcador para identificar a la microglía, sin embargo, recientemente se ha propuesto utilizar a la proteína transmembranal 119 (TMEM119), como un marcador microglial específico. TMEM119 es una proteína de superficie celular, que facilita el transporte de algunos iones y moléculas al interior de la célula; al utilizarse como marcador, permite discriminar entre la microglía residente del SNC de los macrófagos que

pueden infiltrarse cuando ocurre algún cambio en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Sato *et al.*, 2015).

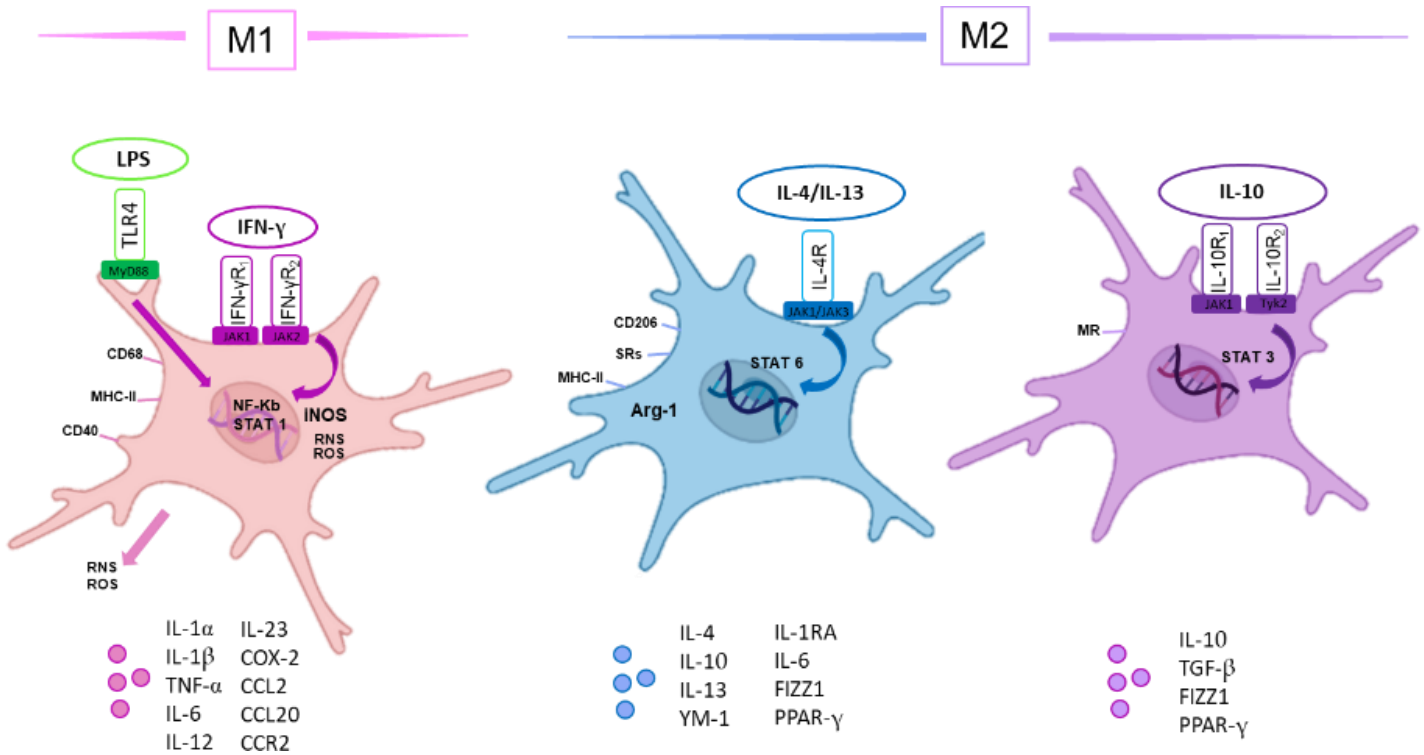


Figura 2.- Estados de activación de la microglía basados en el perfil inflamatorio y la función efectora. En el estado M1 clásico, la exposición a LPS y/o IFN- γ estimula los receptores TLR4 o IFN- γ 1 y 2, respectivamente, lo que conduce a la activación de los factores de transcripción NF- κ B y STAT1, y al aumento de la expresión de CD86 y MHC-II. El aumento de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) produce una explosión de especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS) y la liberación de citocinas proinflamatorias, como IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12, IL-23, las quimiocinas CCL2 y CCL20, y los receptores CCR2, y COX2. Se han propuesto estados M2 tras varios factores estimulantes. Por ejemplo, tras la estimulación con IL-4/IL-13, la unión del receptor de IL-4 (IL-4R) inicia la activación de STAT6, cambiando las células hacia un fenotipo antiinflamatorio con un aumento de Arg-1, expresión de CD206 y receptor de manosa (MR) y la liberación de factores antiinflamatorios (IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-1RA, FIZZ1 y PPAR- γ). La exposición de las células a la IL-10 activa a STAT6a través de la estimulación de los receptores 1 y 2 de esta citocina. La activación de esta vía promueve a las células a un estado inmunosupresor, aunado a la expresión de CD206 y la liberación de IL-10, TGF- β , FIZZ1 y PPAR- γ . Basado en Martínez y Gordon (2014).

7. Tratamientos farmacológicos para revertir la depresión.

Para contrarrestar los efectos del estrés y la depresión sobre la organización estructural y funcional del hipocampo, se han utilizado diversas estrategias terapéuticas, como lo son la psicoterapia, la terapia electroconvulsiva y la farmacoterapia. Siendo los fármacos antidepresivos inhibidores selectivos de la recaptura de Serotonina (ISRS) y norepinefrina (INSR), los tratamientos de primera elección, ya que, han demostrado tener efectos terapéuticos en la neurogénesis hipocámpica, después de un tratamiento de 2-4 semanas (Willner *et al.*, 1987; Boldrini *et al.*, 2009).

La mayoría de los fármacos utilizados ejercen acción sobre el sistema monoaminérgico. Independientemente de su mecanismo de acción, el resultado final es la regulación de alguno de los siguientes neurotransmisores: serotonina (5-HT), dopamina (DA), noradrenalina (NA). El incremento de la disponibilidad de neurotransmisores en la hendidura sináptica permite la regulación a la baja de los receptores postsinápticos, así como su desensibilización, estos cambios adaptativos en los receptores resultan en alteraciones en la expresión de determinados genes, incluidos factores neurotróficos como el BDNF, que permiten la sinaptogénesis (Stahl, 2013).

Sin embargo, a pesar de la eficiencia antidepresiva de estos fármacos, alrededor de un 37% de pacientes con depresión mayor no responde al tratamiento tras 6-12 semanas, y un 53% no alcanza la remisión (Turner, 2008). Además, de que no ha sido posible reducir completamente los efectos secundarios asociados a las dosis (Tabla 1) y a la eventual tolerancia que pueden generar los tratamientos farmacológicos (Choi *et al.*, 2010). En este sentido, la importancia de buscar la eficiencia en la disminución de síntomas depresivos y la minoración de reacciones agresivas para el organismo ha llevado a optar por tratamientos alternativos a los farmacológicos, como la Estimulación Magnética Transcraneal repetitiva (EMTr).

Tabla 1. Efectos farmacológicos de los distintos grupos de antidepresivos. AIRS: antagonista de serotonina e inhibidor de recaptura de serotonina; AMT: agonista de receptores de melatonina; ATC: anti- depresivo tricíclico; A α 2: antagonista de receptores α 2 de noradrenalina; DAT: transportador de dopamina; IRND: inhibidor de recaptura de noradrenalina y dopamina; IRSN: inhibidor de recaptura de serotonina y noradrenalina; ISRN: inhibidor selectivo de recaptura de noradrenalina; ISRS: inhibidor selectivo de recaptura de serotonina; MM: antidepresivo multimodal; MT: receptor de melatonina; NAT: transportador de noradrenalina; SERT: transportador de serotonina. Modificado de Pérez-Esparza, 2017

Grupo	Mecanismo de acción antidepresivo	Fármacos	Efectos clínicos	Efectos adversos comunes
ISRS	Inhibición de SERT	Fluoxetina, sertralina, fluvoxamina, paroxetina, citalopram, escitalopram	Antidepresivo, ansiolítico	Náusea, diarrea, boca seca, disfunción sexual, ansiedad inicial
IRSN	Inhibición de SERT y NAT	Venlafaxina, desvenlafaxina, duloxetina, milnacipran	Antidepresivo, ansiolítico	Cefalea, insomnio, náusea, diarrea, hiporexia, disfunción sexual, aumento de tensión arterial
IRND	Inhibición de NAT y DAT	Anfebutamona	Antidepresivo, ansiolítico	Boca seca, constipación, náusea, hiporexia, insomnio, cefalea, ansiedad, aumento de tensión arterial
ISRN	Inhibición de NAT	Reboxetina, atomoxetina	Antidepresivo, ansiolítico	Hiporexia, insomnio, mareo, ansiedad, boca seca, constipación, náusea, disfunción sexual
AMT	Agonismo MT1/MT2	Agomelatina	Antidepresivo, ansiolítico	Náusea, mareo, somnolencia, cefalea
A α 2	Antagonismo α -2	Mirtazapina	Antidepresivo, ansiolítico	Aumento de apetito, boca seca, constipación, sedación, mareo, hipotensión
AIRS	Inhibición de SERT y antagonismo 5HT _{2A/2C}	Trazodona	Antidepresivo, ansiolítico, hipnótico	Náusea, edema, visión borrosa, boca seca, constipación, mareo, sedación, hipotensión
ATC	Inhibición de SERT y NAT	Amitriptilina, imipramina, desipramina	Antidepresivo, ansiolítico	Visión borrosa, constipación, aumento de apetito, boca seca, náusea, diarrea, fatiga, sedación, disfunción sexual, aumento de tensión arterial
MM	Inhibición de SERT	Vortioxetina	Antidepresivo, procognitivo, ansiolítico	Náusea, cefalea, mareo, boca seca

II. ANTECEDENTES

1. Estimulación magnética transcraneal a 5 Hz (EMTr 5 Hz).

La eficiencia de la EMTr como intervención terapéutica para la depresión ha sido respaldada por diversos autores, ya que es un método indirecto y no invasivo, que ha mostrado tener resultados positivos en la clínica, sobre todo en pacientes que sufren de depresión mayor (Gross *et al.*, 2007).

Debido a que en la EMTr se producen pulsos electromagnéticos capaces de atravesar el cuero cabelludo y el cráneo, este método se ha utilizado para estimular o inhibir distintas áreas del cerebro, induciendo cambios en la excitabilidad neuronal (Klomjai, Katz, y Vallée, 2015). Todas las partes del cerebro, debajo del cráneo pueden ser influenciadas, pero gracias a estudios de neuroimagen en pacientes con depresión, la terapia se ha dirigido a la corteza prefrontal dorsolateral izquierda (CPFOLI), zona que participa en la integración de las experiencias emocionales y cognitivas de los individuos (Stuss y Levine, 2000).

La mayoría de los estudios realizados con EMTr en humanos ha sido a frecuencias altas (10 y 20 Hz), siendo escasos los trabajos referentes al efecto antidepresivo de la EMTr a 5 Hz. Sin embargo, Armas-Castañeda y colaboradores (2015) reportan que la aplicación de EMTr a 5 Hz en la CPFOLI disminuye los síntomas en pacientes con depresión, y que esta mejoría se puede mantener hasta tres meses después del inicio del tratamiento. También se ha demostrado que la estimulación a frecuencia de 5 Hz en la corteza prefrontal izquierda (CPFIL) posee la misma eficiencia antidepresiva y ansiolítica que la frecuencia de 10 Hz (Philip *et al.* 2015), incluso existen reportes de similitudes entre el efecto antidepresivo entre protocolos de estimulación a 5 y 20 Hz (George *et al.* 2000). Aunque en la actualidad se desconoce el mecanismo completo mediante el cual actúa la EMTr, algunos estudios han sugerido que está relacionado con la disminución de dopamina en la

corteza frontal, y un aumento de ésta en el hipocampo (Chervyakov *et al.*, 2015). Además, de que la estimulación favorece la síntesis del factor neurotrófico derivado del cerebro (*brain-derived neurotrophic factor*, BDNF), el cual se relaciona con la neurogénesis, la migración y diferenciación neuronal, el desarrollo dendrítico y axonal, y formación de sinapsis (Chervyakov *et al.*, 2015; Lisanby y Belmaker, 2000; Muller *et al.*, 2000).

Como se ha mencionado con anterioridad, existe una estrecha relación entre la neurogénesis y los efectos de la EMTr a 5 Hz, en este sentido, la afectación del hipocampo a causa del trastorno depresivo, resulta ser una zona adecuada para recibir estímulos que favorezcan el proceso neurogénico.

2. Persistencia de los efectos tipo antidepresivos de la EMTr a 5Hz.

Los efectos de la EMTr a 5 Hz en ratones expuestos a ECI, se han visto relacionados a efectos pro-neurogénicos en el hipocampo. En este sentido se ha observado el aumento de la glía radial, incremento en la proliferación de neuronas maduras y de fibras musgosas, además, de favorecer la disminución de conductas depresivas como la anhedonia y la desesperanza (Meneses, 2018). Armas-Castañeda y colaboradores (2015) han reportado no sólo los efectos EMTr a 5 Hz en pacientes con diagnóstico de depresión y ansiedad, sino la persistencia de sus efectos antidepresivos durante los tres meses siguientes, después de la última sesión de tratamiento (medido en base a la escala de Hamilton).

Recientemente, Rocha (2020) reportó que la estimulación en la CPFDLI, en ratones BALB/c expuestos a ECI, tratados durante 4 semanas con sesiones de EMTr a 5 Hz, que además recibieron sesiones de mantenimiento (EMTr a 5Hz) durante 5 semanas, favorece la maduración de las espinas dendríticas en las células granulares del giro dentado (Figura 2A); Asimismo los ratones expuestos a sesiones de mantenimiento mejoraron su comportamiento al revertir los efectos

tipo depresivos del ECI observado como condición del estado del pelaje (autocuidado) y prueba de nado forzado (desesperanza) (Figura 2B). Sin embargo, a pesar de que se conoce la relación que tiene la neurogénesis hipocampal en el efecto antidepresivo, los mecanismos moleculares y celulares por los cuales se lleva a cabo aún no han sido totalmente determinados.

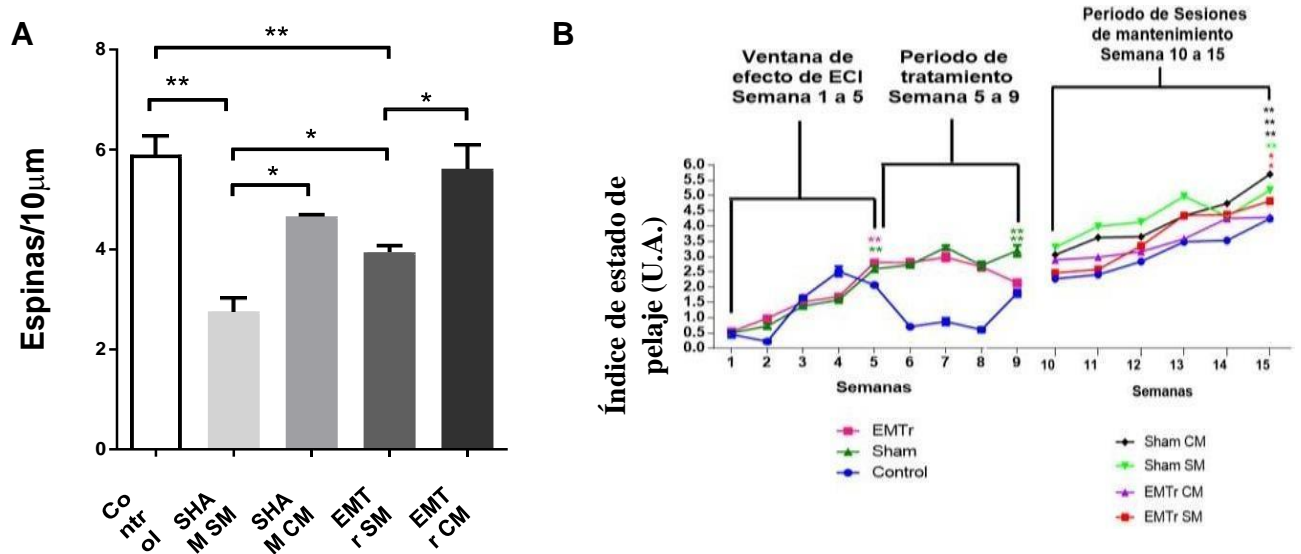


Figura 3.- La estimulación magnética transcranial a 5Hz favorece la maduración de espinas dendríticas en las células granulares del Giro dentado. Ratones expuestos a estrés crónico impredecible (ECI) y tratados con Estimulación magnética transcranial 5Hz sin sesiones de mantenimiento (EMTr SM) o con sesiones de mantenimiento (EMTr CM). El grupo SHAM SM (ratones con exposición a ECI, y exposición a EMTr sin pulso), grupo SHAM CM (con exposición a ECI, exposición a EMTr y sesiones de mantenimiento, ambas sin pulso). A) Los datos representan el número de espinas dendríticas en 10 micras, observadas mediante Colgi-Cox. Se muestra la media \pm el error estándar de la media (SEM). ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Bonferroni (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). B) Se muestra la determinación semanal del estado de pelaje. En la primera parte de la gráfica (lado izquierdo) se muestra el estado del pelaje de la semana 1 a la 5 en las que se determinó el efecto del estrés crónico impredecible sobre el deterioro del pelaje. En la parte media de la gráfica se observa el periodo en el que se aplicó el tratamiento de la semana 6 a la semana 10 y en la parte del lado derecho se muestra el tiempo en el que se aplicaron las sesiones de mantenimiento. Tomado de Rocha, 2020.

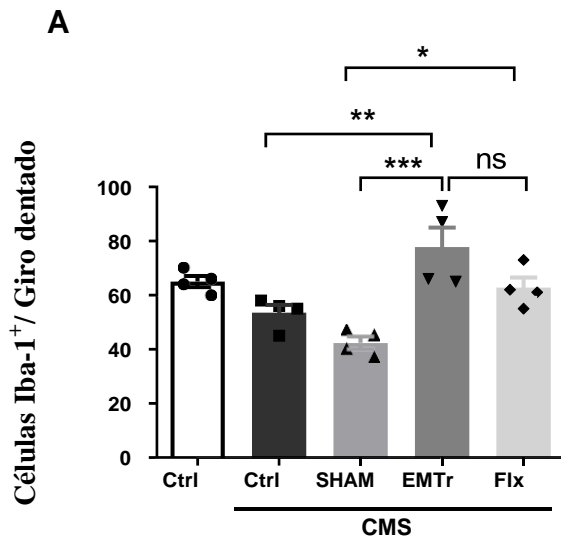


Figura 4. Efecto de la EMTr 5Hz sobre las células gliales en el hipocampo. A) Microglía total en el giro dentado. ANOVA unidireccional. Bonferroni pos hoc $p < 0,001$, ANOVA de dos vías. (Factor de tratamiento: $F = 6,248$, $p < 0,001$, factor Morfología: $F = 58,920$, $p < 0,001$, Factor de interacción: $F = 5,293$, $p = 0,002$). Bonferroni pos hoc. $p = 0,009$. $n = 4$. $\alpha = 0,05$. El símbolo # representa la comparación del grupo Ctrl con el grupo CMS y Sham y el símbolo * representa la comparación del grupo de tratamiento con el grupo Ctrl, CMS y Sham. Tomado de Meneses, 2021.

Dada la participación de las células gliales en la neurogénesis, Meneses *et al*, (2021, artículo en preparación) analizó si la EMTr 5 Hz afectaba otras poblaciones celulares. Las células de la astrogliá no presentaron cambios al analizar la densidad celular mediante inmunomarcaje con GFA; Sin embargo, se observó un incremento de las células IBA-1⁺ en ratones Balb/c expuestos a estrés crónico que, posteriormente recibieron tratamiento con EMTr 5 Hz durante 4 semanas. Además, al analizar la morfología de las células IBA-1⁺, se logró identificar que la mayoría de estas células correspondía a una morfología ramificada, que se ha relacionado directamente a un perfil microglial antiinflamatorio.

No obstante, se considera relevante realizar estudios que ayuden a comprender cuales son las modificaciones causadas por la EMTr a 5 Hz en la microglía que conllevan a la persistencia de sus efectos antidepresivos y a nivel plástico en el hipocampo.

III. JUSTIFICACIÓN

La depresión es un trastorno neuropsiquiátrico que cursa con alteraciones plásticas en el sistema límbico. Además, la depresión se ha asociado con procesos inflamatorios conocidos como neuroinflamación. Estas alteraciones son revertidas por fármacos antidepresivos que muestran poca eficiencia en estudios clínicos. A razón de esto, se han buscado alternativas terapéuticas entre las que se encuentra la estimulación magnética transcraneal repetitiva. En este sentido, diversos estudios clínicos han revelado los efectos benéficos de la EMTr para revertir las alteraciones producidas por la depresión. Sin embargo, no se conoce si la EMTr tiene la capacidad de modular a la microglía para que los efectos de esta alternativa terapéutica tanto a nivel conductual como plástico perduren.

IV. HIPÓTESIS

La EMTr 5 a Hz revierte las alteraciones en la microglía y el incremento en citocinas proinflamatorias producidas por el ECI en el nicho pro-neurogénico del hipocampo para mantener sus efectos tipo antidepresivos.

V. OBJETIVOS

⌘ General

- Determinar la capacidad de la EMTr para revertir los efectos producidos por el ECI en la microglía y en las citocinas pro-inflamatorias en el hipocampo.

⌘ Particulares

- Cuantificar el número de células positivas a Iba-1 en el hipocampo de roedores expuestos a ECI que fueron o no tratados con EMTr a 5 Hz.
- Determinar las alteraciones morfológicas de las células positivas a Iba-1 en el hipocampo de roedores expuestos a ECI que fueron o no tratados con EMTr a 5 Hz.
- Cuantificar la expresión del TMEM119 en el hipocampo de roedores expuestos a ECI que fueron o no tratados con EMTr a 5 Hz.
- Cuantificar la expresión de las interleucinas IL1- β , IL-6, TNF- α e IFN- γ en el hipocampo de roedores expuestos a ECI que fueron o no tratados con EMTr a 5 Hz.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Para este proyecto se utilizaron cerebros de animales que se obtuvieron de dos proyectos. El primero, titulado: “EMTr 5 Hz induce cambios micro y macroestructurales en dendritas en modelo murino de estrés”, para observar los cambios producidos durante un primer set de estimulación, y el segundo “Estudio de la persistencia del efecto tipo antidepresivo de la estimulación magnética transcraneal repetitiva (5Hz) en un modelo murino de depresión: implicación de la neuroplasticidad”, para analizar los cambios producidos por la implementación de sesiones de mantenimiento EMTr 5 Hz.

1. Animales

Se utilizaron ratones hembra de 10 semanas de edad de la cepa Balb/c obtenidos del Bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INPRFM). El alojamiento de los animales se realizó en cajas de policarbonato, las cuales se colocaron en una habitación a temperatura $25^{\circ} \pm 1$ °C y en condiciones de ciclo invertido 12-h luz/12-h oscuridad. Un total de 35 ratones, distribuidos aleatoriamente en 5 grupos de 7 individuos (Tabla 1) se mantuvieron con acceso a alimento y agua *ad libitum*. Los animales fueron manejados de acuerdo con los principios generales de cuidados de animales de laboratorio (Comité del consejo Nacional de investigación, 2011) y todos los procedimientos experimentales se hicieron con base a la NOM- 062-ZOO-1999, aprobados por el Comité de Ética del INPRFM.

Tabla 2. Grupos experimentales. Ratonos hembra BALB/c fueron distribuidos en cinco grupos experimentales durante 15 semanas, más una semana previa de aclimatación. Grupo 1: Control (sin exposición a ECI ni a tratamiento); Grupo 2: EMTr S/M (con exposición a ECI y a EMTr 5 Hz); Grupo 3: EMTr C/M (con exposición a ECI, EMTr 5Hz y sesiones de mantenimiento EMTr 5 Hz); Grupo 4: Sham S/M (con exposición a ECI, y exposición a EMTr sin pulso); Grupo 5: Sham C/M (con exposición a ECI, exposición a EMTr y mantenimiento, ambas sin pulso).

Grupo	Estatus	ECI	EMTr (5hz)	Sesiones de mantenimiento	Individuos por grupo (n)
1	Control	-	-	-	7
2	EMTr S/M	+	+	-	7
3	EMTr C/M	+	+	+	7
4	Sham S/M	+	Exposición sin pulso	-	7
5	Sham C/M	+	Exposición sin pulso	Exposición sin pulso	7

2. Modelo de estrés crónico impredecible

El protocolo de estrés crónico impredecible (ECI) fue adaptado de un protocolo original propuesto por Willner, *et al.* (1992) y de modificaciones propuestas por Vega Rivera, *et al.* (2016). Durante una semana previa al inicio del ECI los ratones se mantuvieron en habituación, y posteriormente fueron expuestos a dos o tres estresores diarios elegidos al azar, durante 15 semanas (Tabla 3).

De la semana 5-9, los animales fueron tratados con Estimulación magnética transcraneal de 5Hz (EMTr 5Hz). Al término de la novena semana se realizó el primer set de pruebas conductuales (nada forzado, rotarod y campo abierto), y, posteriormente se iniciaron las sesiones de mantenimiento EMTr 5 Hz durante 5

semanas (semana 10-15). Al finalizar estas sesiones, se aplicó el segundo set de pruebas conductuales, y una vez concluidas, los animales fueron eutanizados mediante decapitación, para obtener muestras de cerebro y sangre. Al inicio de la quinta semana los ratones recibieron una dosis de cloro-2'-desoxiuridina (CIdU; 50 mg / kg; i.p.). y en la décima semana una dosis única de yododesoxiuridina (IdU ;50 mg / kg; i.p.).

Tabla 3. Estresores utilizados en el desarrollo de estrés crónico impredecible (ECI). Durante el protocolo de ECI, dos o tres estresores fueron aplicados diariamente. En la columna derecha de la tabla, se muestra el tiempo de exposición de los animales a cada estresor.

Estresor	Tiempo de exposición (h)
Oscuridad continua	3
Restricción de movimiento	1
Caja en rotación (35-45 rpm)	1
Luz continua	8
Frío (4 °C)	1
Ruido blanco	3
Luz estroboscópica	6
Caja inclinada (45 °)	3
Cama mojada	6
Hacinamiento	1
Olor a rata	3
Privación de comida	12

3. Estimulación Magnética Transcraneal repetitiva (EMTr).

Se utilizó un estimulador Mag Pro R30 y una bobina refrigerada para estimular la corteza prefrontal izquierda de los individuos. La EMTr se realizó aplicando treinta trenes de estimulación de 5 Hz, con 10 pulsos por tren e intervalos de 10 segundos entre trenes (Armas-Castañeda *et al.*, 2015). En los ratones del grupo 4 y 5 (Tabla 1), se empleó un bloque de acrílico de 6 cm de grosor para evitar el contacto entre

el cráneo y los pulsos magnéticos. En todos los animales la bobina fue colocada sobre la cabeza del ratón y en posición paralela a la columna vertebral. Las sesiones de mantenimiento se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones descritas para la estimulación EMTr 5 Hz. Sin embargo, los animales que recibieron sesiones de mantenimiento se sometieron a una disminución gradual de sesiones (cuatro sesiones en la semana 1, tres sesiones en la semana 2, dos en la semana 3, y una en las semanas 4 y 5).

4. Procesamiento de cerebros

Dos horas después de finalizar el segundo set de pruebas conductuales, los ratones fueron sacrificados mediante decapitación, y posteriormente se obtuvieron los cerebros, los cuales fueron separados en hemisferio izquierdo y derecho, inmediatamente se colocaron en paraformaldehído (PFA) al 4% en una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M (PBS, pH=7.4) y se mantuvieron en refrigeración. Después de 24 horas, las muestras se transfirieron a sacarosa al 30% en PBS. Eventualmente, el hemisferio derecho fue cortado en secciones sagitales de 40 μm de grosor con un microtomo deslizante, y los cortes fueron almacenados a 4° C en una solución crioprotectora (25% de etilenglicol y 25% de glicerina en un tampón de fosfato 0,05 M) hasta su futuro procesamiento para inmunohistoquímica.

5. Inmunohistoquímica

Para realizar la detección de células microgliales, se identificó mediante inmunomarcaje a la molécula adaptadora de unión a calcio ionizada 1 (IBA- 1) y a la proteína transmembranal 119 (TMEM119); para ello, los cortes se lavaron con una solución TBS 1x (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 7.5) para retirar la solución crioprotectora. Posteriormente se incubaron con una solución de peróxido de hidrógeno al 0.6% durante 30 minutos, y al término, se retiró con una solución TBS 1x. En seguida, el tejido se incubó a 90 °C durante 30 minutos con Buffer de citratos (Sodio citrato tribásico dihidrato, 0.1% Tween 20), finalizada la incubación, se

realizaron dos lavados de 5 minutos con Buffer de citratos frío, y después tres lavados con TBS 1x de 5 minutos cada uno.

Se procedió a realizar un bloqueo inespecífico con una solución proteica (1% Tritón X-100, 3% suero de cabra en TBS 1x) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se removió la solución de bloqueo, y se incubaron los cortes de tejido cerebral por 24 horas a 4°C con los anticuerpos primarios anti-Iba1 (1:1500, abcam, ab178847), y anti-TMEM119 (1:1000, ab209064) diluidos en solución bloqueadora. Posteriormente se realizaron lavados consecutivos con TBS 1x para eliminar el exceso de anticuerpo. Para la detección del anticuerpo primario se utilizó anticuerpo secundario biotinilado (1:250, Jackson immunoresearch, 111-065-003), el cual se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente, y posteriormente se quitó el excedente de anticuerpo con lavados de TBS 1x. Después se añadió al tejido solución de tinción complejo avidina-biotina (ABC Kit Peroxidase-HRP standard, Vector laboratories, PK-4000) incubado a temperatura ambiente durante 30 minutos. Al finalizar, se realizaron lavados con TBS 1x. Para el revelado colorimétrico, a las muestras se les añadió substrato DAB (3,3-diaminobencidina, DAB Peroxidase Substrate, Vector laboratories, SK-4100) durante 10 minutos, al término, se lavó el excedente con agua desionizada.

Finalmente, los cortes fueron montados en medio Neumount (Merck, Naucalpan, Estado de México, México), y observados al microscopio (LEICA DM500 concámara acoplada ICC50; Buffalo Grove, IL, USA) para cuantificar el número de células IBA-1 positivas (IBA-1⁺) en la capa de células granulares y a través de la zona subgranular del giro dentado del hipocampo. La medición del área del giro dentado se llevó a cabo utilizando el software ImageJ versión 1.41 (NIH, Bethesda, MA, USA), y el ratio células Iba-1⁺/ área, se determinó dividiendo estos dos valores. Para el inmunomarcaje con TMEM119, la cuantificación se realizó mediante densitometría óptica. Las laminillas fueron fotografiadas digitalmente utilizando un sistema previo de calibración para estandarizar cada imagen en tamaño e intensidad de iluminación. Se establecieron 20 cuadrantes de 50x50 μm a través de

la zona subgranular del giro dentado del hipocampo, y se realizó la lectura de la densidad óptica relativa (DO) con ayuda del software ImageJ versión 1.41 (NIH, Bethesda, MA, USA). Se utilizó una escala monocromática para establecer la cuantificación relativa del inmunomarcaje con TMEM119, donde la intensidad de la coloración se consideró proporcional a la cantidad de inmunoreactividad del marcador.

8. Análisis morfométricos

Para estimar los datos morfométricos, las células se analizaron en toda la extensión rostro-caudal de la capa celular granular (Bregma 1,34 a 3,20) utilizando el objetivo a 40X. La evaluación de las células microgliales, se llevó a cabo utilizando el software ImageJ versión 1.41 (NIH, Bethesda, MA, USA). Se midió el área total de la célula, el perímetro del soma, el número de procesos y la longitud de los procesos en células marcadas con IBA-1, en base a los siguientes criterios: células sin solapamiento o con un solapamiento mínimo con los procesos de las células adyacentes. Los datos morfométricos se estimaron para todos los grupos experimentales.

9. Inmunofluorescencia

Para descartar que el incremento de células IBA-1⁺ era originado por la infiltración de células monocíticas en el giro dentado del hipocampo, se identificó mediante inmunofluorescencia el marcaje de células positivas a IBA-1 y TMEM119. Para ello, los cortes se lavaron con una solución TBS 1x (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 7.5) para retirar la solución crioprotectora. Posteriormente se incubaron con una solución de peróxido de hidrógeno al 0.6% durante 30 minutos, y al término, se retiró con una solución TBS 1x. En seguida, el tejido se incubó a 90 °C durante 30 minutos con Buffer de citratos (Sodio citrato tribásico dihidrato, 0.1% Tween 20), finalizada

la incubación, se realizaron dos lavados de 5 minutos con Buffer de citratos frío, y después tres lavados con TBS 1x de 5 minutos cada uno.

Se procedió a realizar un bloqueo inespecífico con una solución proteica (1% Tritón X-100, 3% suero de burro en TBS 1x) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se removió la solución de bloqueo, y se incubaron los cortes de tejido cerebral por 48 horas a 4°C con el anticuerpo primario anti-TMEM119 (1:500, ab209064) diluido en solución bloqueadora. Posteriormente se realizaron lavados consecutivos con TBS 1x para eliminar el exceso de anticuerpo. Para la detección del anticuerpo primario se utilizó anticuerpo secundario biotinilado (1:250, Jackson immunoresearch, 111-065-003), el cual se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente, y posteriormente se quitó el excedente de anticuerpo con lavados de TBS 1x. Después se añadió al tejido solución de tinción complejo avidina-biotina (ABC Kit Peroxidase-HRP standard, Vector laboratories, PK-4000) incubado a temperatura ambiente durante 30 minutos. Al finalizar, se realizaron lavados con TBS 1x. Para el revelado colorimétrico, a las muestras se les añadió como substrato de amplificación de señal, tiramida Alexa fluor[®]-488 (ThermoFisher scientific, B40953) diluido en buffer de reacción (TBS 1x, peróxido de hidrogeno 0.0015%, pH 7.5) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, el tejido cerebral se lavó con TBS 1x, seguido de un bloqueo con anticuerpo IgG (H+L) F(ab')₂ de conejo (10µg/ml, Jackson immunoresearch, 711-006-152) diluido en solución bloqueadora durante 30 minutos, al término se realizaron lavados con TBS 1x. En seguida, se realizó un bloqueo inespecífico con una solución proteica (1% Tritón X-100, 3% suero de burro en TBS 1x) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar, el tejido se incubó por 24 horas a 4°C con anticuerpo primario anti-Iba1 (1:1000, abcam, ab178847) diluido en solución bloqueadora. Posteriormente se realizaron lavados consecutivos con TBS 1x para eliminar el exceso de anticuerpo. Para la detección del anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo secundario acoplado a Alexa fluor[®]-647 (1:500, abcam, ab150115), el cual se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente, posteriormente se quitó el excedente con lavados

de TBS 1x. Finalmente, los cortes fueron montados en medio Aqua-Poly/Mount (Polyscience Inc.,18606-20, Warrington, PA, USA) y observados al microscopio confocal LSM-500 (Zeiss, TH, DEU).

10. Obtención de suero.

Las muestras de sangre fueron obtenidas de ratones de todos los grupos experimentales. Se colocó la muestra en microtubos de polipropileno 600 μ l, y se mantuvieron en hielo hasta la centrifugación. Las células se centrifugaron a 950 g, para permitir la eliminación de eritrocitos y la extracción de suero.

11. Cuantificación de proteínas

La determinación total de proteína sérica se llevó a cabo mediante el método de Bradford. Se realizó una solución de Albúmina Sérica Bovina (*Bovine Serum Albumin*, BSA. Sigma Aldrich, 9048-46-8) de concentración 1 mg/ml, a partir de la cual se hicieron diluciones seriadas para la elaboración de una curva estándar de concentraciones conocidas. Se midió la absorbancia en un lector de microplacas multimodo GloMax® Explorer (Promega, FRA) a 600 nm. Se calcularon los microgramos de proteína por microlitro en el volumen total de las muestras.

12. Arreglo de proteínas

Para estimar la secreción de citocinas pro y antiinflamatorias se utilizaron muestras de proteína obtenidas de suero de sangre periférica de los diferentes grupos de animales. La identificación del contenido proteico se analizó mediante arreglos de anticuerpos (Mouse Cytokine Array C1000, RayBiotech, AAM-CYT-1000, GA, USA). Los ensayos se realizaron por duplicado, y la cantidad de proteína utilizada en cada membrana fue de 400 μ m. Se siguieron las especificaciones del fabricante, iniciando con un bloqueo de las membranas. Se colocaron las membranas en diferentes

placas y se adicionó 2 ml de Solución Buffer de Bloqueo en cada una, posteriormente se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación constante. Una vez terminado el bloqueo, se retiró la solución de las placas y se añadió la muestra de suero sanguíneo diluida en solución bloqueadora en cada membrana. La incubación de las membranas se realizó durante 24 horas a 4° C. Una vez terminada la incubación, se retiró el exceso de buffer y se continuo con una serie de lavados durante 5 minutos a temperatura ambiente y agitación constante con solución 1X de lavado I y II, respectivamente (RayBiotech, GA, USA). Después de retirar las soluciones de lavado, se adicionó 1 ml del cóctel de ab biotinilado C3 o C4 a cada membrana correspondiente, la incubación se llevó a cabo durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación constante. Posterior al tiempo de incubación, se retiró el cóctel de anticuerpo y se procedió a realizar otra serie de lavados. A continuación, se colocaron 2 ml de la solución 1X HRP-estreptavidina para cada membrana, incubando por 2 horas a temperatura ambiente. Posterior al tiempo de incubación, se retiró la solución HRP-estreptavidina y se realizó una serie de lavados, como se describió anteriormente. Finalmente se procedió a la detección por quimioluminiscencia, para ello las membranas lavadas y húmedas se colocaron sobre una hoja de acetato, posteriormente se adicionó 500 μ l de la solución preparada con los buffer de detección C y D a cada membrana, y se incubaron a temperatura ambiente por dos minutos. Inmediatamente después, se colocó otra hoja de acetato sobre las membranas. Las membranas se procesaron en el fotodocumentador (*ChemiDoc Touch Imaging System*, BIORAD, 17001401, CA, USA).

13. Análisis Estadístico

Para evaluar las diferencias en los distintos parámetros medidos, los resultados se analizaron con el programa *SigmaStat* versión 12.0 (*Systat Software Inc.*). Se utilizaron pruebas estadísticas de análisis de varianza (ANOVA) de una vía o de dos vías dependiendo de los parámetros analizados. Las comparaciones múltiples

se realizaron aplicando la prueba post hoc de Bonferroni estableciendo un valor de $p \leq 0.05$.

VII. RESULTADOS

EMTr 5 Hz incrementa el número de células IBA-1⁺ en la capa de células granulares del giro dentado.

Considerando los reportes anteriores que indican la importancia de la respuesta del Sistema inmunológico al estrés crónico y las alteraciones que éste provoca en la microglía (Kreisel *et al.*, 2014; Milior *et al.*, 2016), examinamos las modificaciones en el estado de las células microgliales (número de células en la capa granular del giro dentado y morfología) tras la exposición al estrés crónico y al tratamiento con EMTr a 5 Hz. La cuantificación de la microglía se realizó en dos grandes agrupaciones; la primera, a la cual pertenecían los grupos que recibieron un primer set de estimulación a 5 Hz durante 4 semanas (Fig. 5B); y la segunda, en la que se incluyeron los grupos que recibieron o no sesiones de mantenimiento con EMTr a 5 Hz (Fig. 5C).

El número de células marcadas con IBA-1 se redujo significativamente (Fig. 5B) en el grupo expuesto a estrés crónico impredecible (37.45 ± 6.6) en comparación con el grupo control sin estrés (48.6 ± 5 , $p < 0.001$).

Por el contrario, en comparación con el grupo estresado, el tratamiento con EMTr 5 Hz incremento significativamente el número de células IBA-1⁺ (63.8 ± 6.6 , $p < 0.001$).

Dicho aumento también es significativo al compararlo con los ratones del grupo control ($F_{2,9} = 87.926$, $p < 0.001$). En comparación con el grupo estresado, el tratamiento con EMTr 5 Hz incremento significativamente el número de células IBA-

1⁺ (63.8 ± 6.6 , $p < 0.001$). Dicho aumento también es significativo al compararlo con los ratones del grupo control.

Hallazgos similares, se observan aún en los grupos expuestos a sesiones de mantenimiento (Fig. 5C), donde los individuos estresados pertenecientes al grupo SHAM SM y SHAM CM muestran una reducción significativa de la densidad microglial (35.4 ± 7.4 , $p < 0.005$; 39.65 ± 3.4 , $p < 0.005$, respectivamente) comparados con el grupo no estresado (45.95 ± 3.7). Además, se observa un aumento en la población celular Iba 1⁺ en los individuos sometidos a EMTr 5 Hz tanto con sesiones de mantenimiento (51.65 ± 3.55) como sin ellas (55.6 ± 5.3) comparados con el grupo control. Sin embargo, las sesiones de mantenimiento con EMTr 5 Hz parecen no influir en la modificación de la densidad microglial, comparado con el grupo EMTr SM ($p = 0.866$) cuando el factor estrés permanece constante. Este incremento también es significativo al compararlo con los ratones del grupo control ($p < 0.001$).

Por el contrario, en comparación con el grupo estresado, el tratamiento con EMTr 5 Hz incrementa significativamente el número de células IBA-1⁺ (63.8 ± 6.6 , $p < 0.001$, $F_{2,9} = 87.926$, $p < 0.001$).

La EMTr 5 Hz modifica la morfología de las células IBA-1 positivas en el giro dentado de ratones expuestos a un estrés crónico.

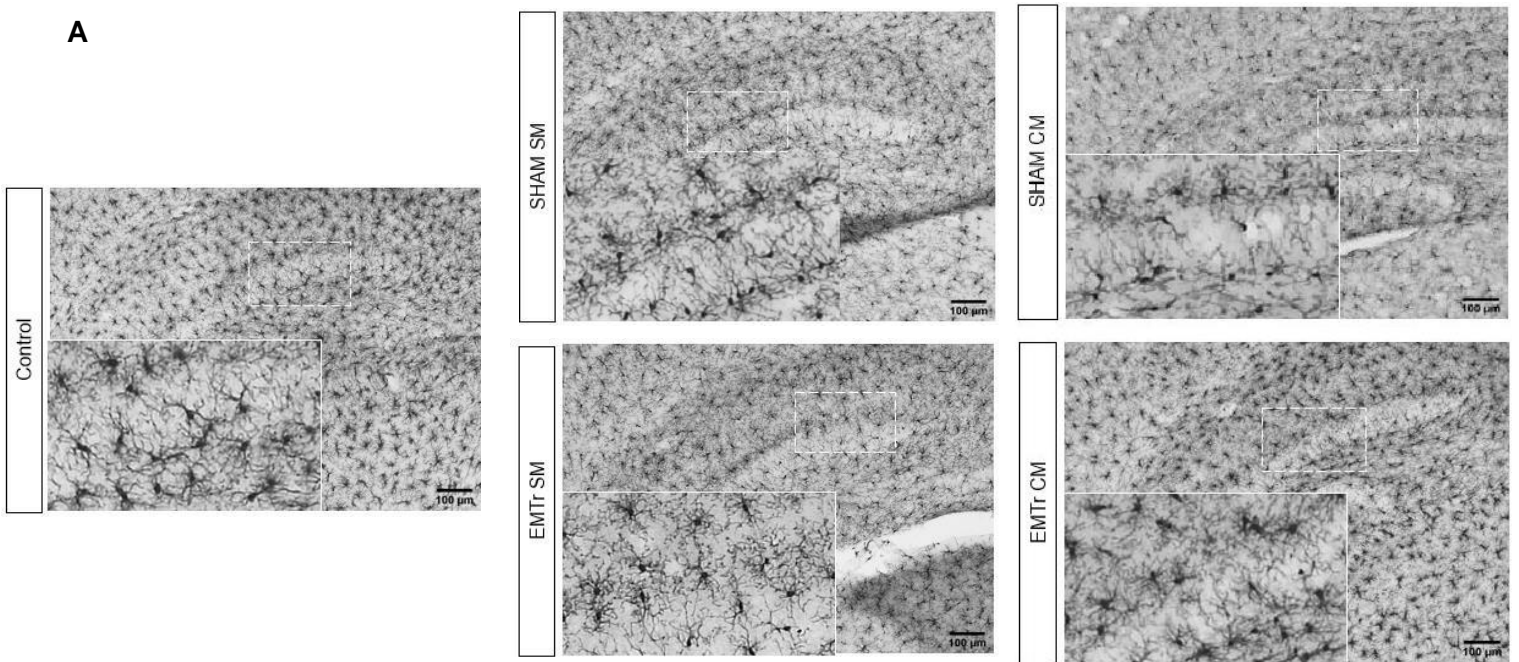
Se sabe que la morfología y la función de la microglía están estrechamente relacionadas, y que los cambios en estos parámetros pueden corresponder con cambios en el perfil de activación microglial (Orihuela *et al.*, 2016), para abordar esta cuestión, se analizó la morfología de las células IBA-1⁺ en el giro dentado. El análisis morfológico se realizó en dos grandes agrupaciones; la primera, a la cual pertenecían los grupos que recibieron un primer set de estimulación a 5 Hz durante 4 semanas (Fig. 6); y la segunda, en la que se incluyeron los grupos que recibieron sesiones de mantenimiento con EMTr a 5 Hz (Fig. 7).

Los datos muestran que el estrés crónico reduce significativamente el número de procesos (Fig. 6A y 7B; 2.92 ± 1.1 , $p < 0.001$) y la longitud de estos (Fig. 6B, C; 7C, D; 60 ± 4.15 , $p < 0.001$) con respecto al grupo control sin estrés (5.58 ± 0.42 , $p < 0.001$; 93.42 ± 5.89 , $p < 0.001$); Sin embargo, esta disminución logra revertirse por efecto de la EMTr a 5 Hz, tanto en individuos que recibieron sesiones de estimulación sin mantenimiento (4.865 ± 0.95 , $p < 0.001$; 80.46 ± 2.46 , $p < 0.001$) como los que recibieron sesiones de estimulación con mantenimiento (4.925 ± 1.25 , $p < 0.001$; 99.32 ± 3.68 , $p < 0.001$).

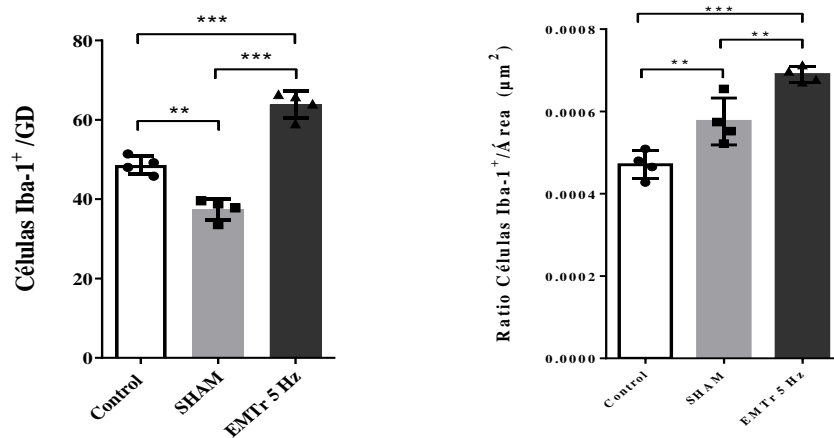
Estos datos son consistentes con lo observado en las figuras 6D y 7E, donde se representa el área total de la célula. La disminución del área celular es directamente proporcional al acortamiento de los procesos por la exposición al estrés crónico (731.572 ± 10.5 , $p < 0.001$; 739.175 ± 9.80 , $p < 0.001$), dicho fenómeno se ve atenuado por el tratamiento con EMTr 5 Hz, tanto con sesiones de mantenimiento (2023.08 ± 12.8 , $p < 0.001$), como sin ellas (2102.75 ± 15.3 , $p < 0.001$).

En este mismo sentido, la reducción del perímetro del soma de células IBA-1⁺ bajo condiciones de estrés crónico, es consistente con lo reportado por Kreisel *et al.*, (2014). Sin embargo, esta condición es revertida por la exposición a EMTr 5 Hz ($F_{4,15} = 56.03$, $p < 0.001$).

Es de destacar, que la EMTr a 5 Hz revirtió las alteraciones de estas células, aún bajo la constante exposición a estrés crónico durante todo el desarrollo experimental tanto en los grupos que recibieron solo un set de estimulación, como los que además recibieron sesiones de mantenimiento. Estas observaciones indican que las modificaciones en la morfología de la microglía ocasionadas por el efecto de la EMTr a 5 Hz persisten por al menos 7 semanas aún en presencia de estrés crónico impredecible.



B



C

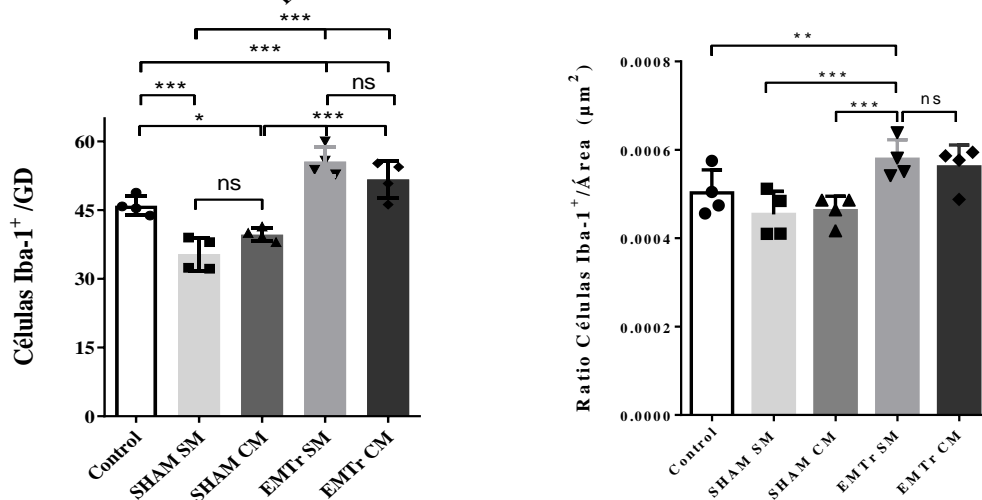


Figura 6.- La estimulación magnética transcraneal de 5 Hz revierte las alteraciones morfológicas en la microglía causadas por el estrés crónico. A) Los datos muestran el número de procesos por célula (N=4). B) La longitud total de los procesos se estimó con la sumatoria de la longitud de los procesos por célula (N=4). C) Los datos muestran la longitud del proceso más largo de cada célula. D) Los datos representan el área total del cuerpo celular (N=4). E) Los datos muestran el perímetro del soma (N=4). Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (SEM). ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

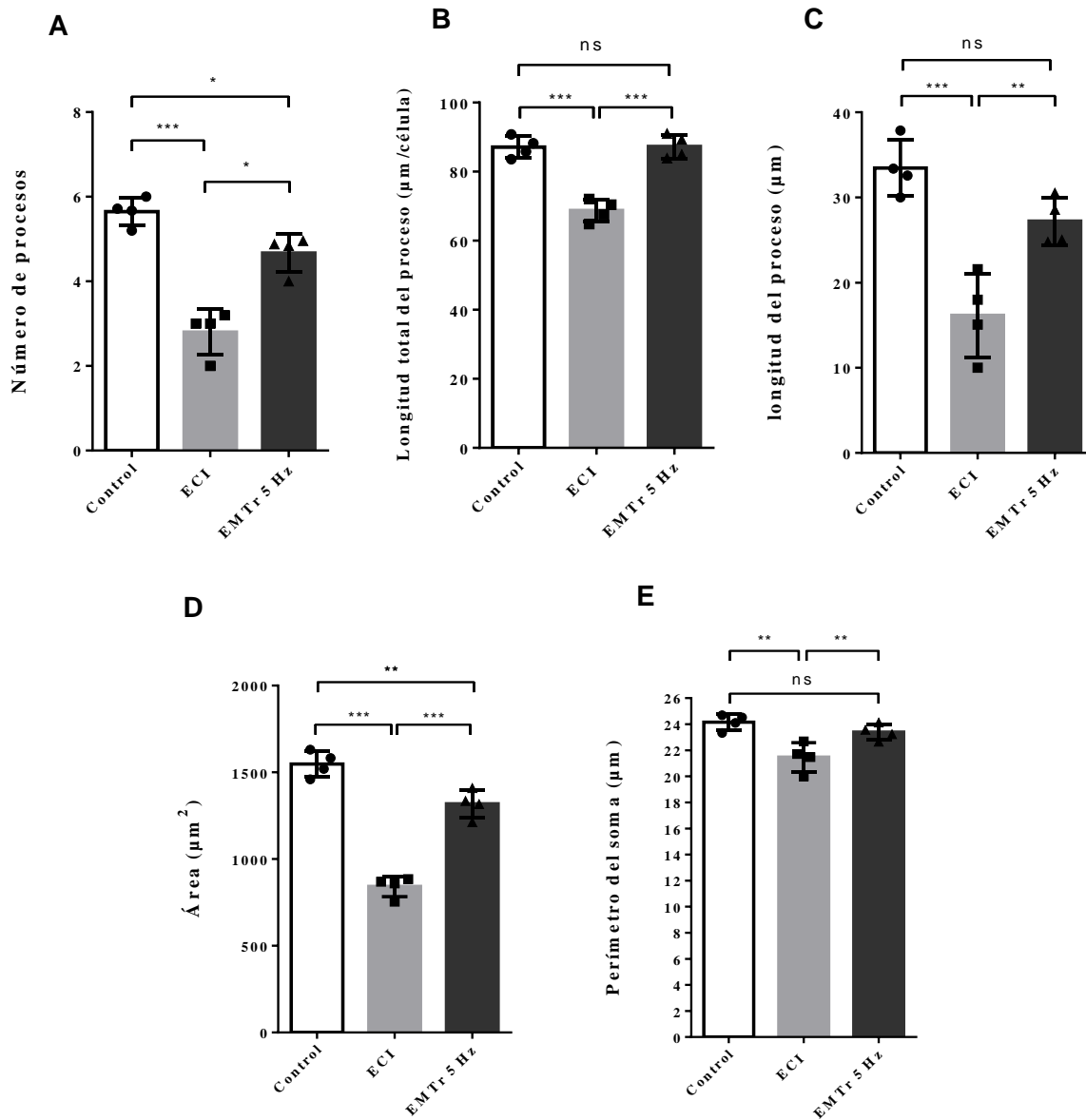


Figura 6.- La estimulación magnética transcraneal de 5 Hz revierte las alteraciones morfológicas en la microglía causadas por el estrés crónico. A) Los datos muestran el número de procesos por célula (N=4). B) La longitud total de los procesos se estimó con la sumatoria de la longitud de los procesos por célula (N=4). C) Los datos muestran la longitud del proceso más largo de cada célula. D) Los datos representan el área total del cuerpo celular (N=4). E) Los datos muestran el perímetro del soma (N=4). Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (SEM). ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

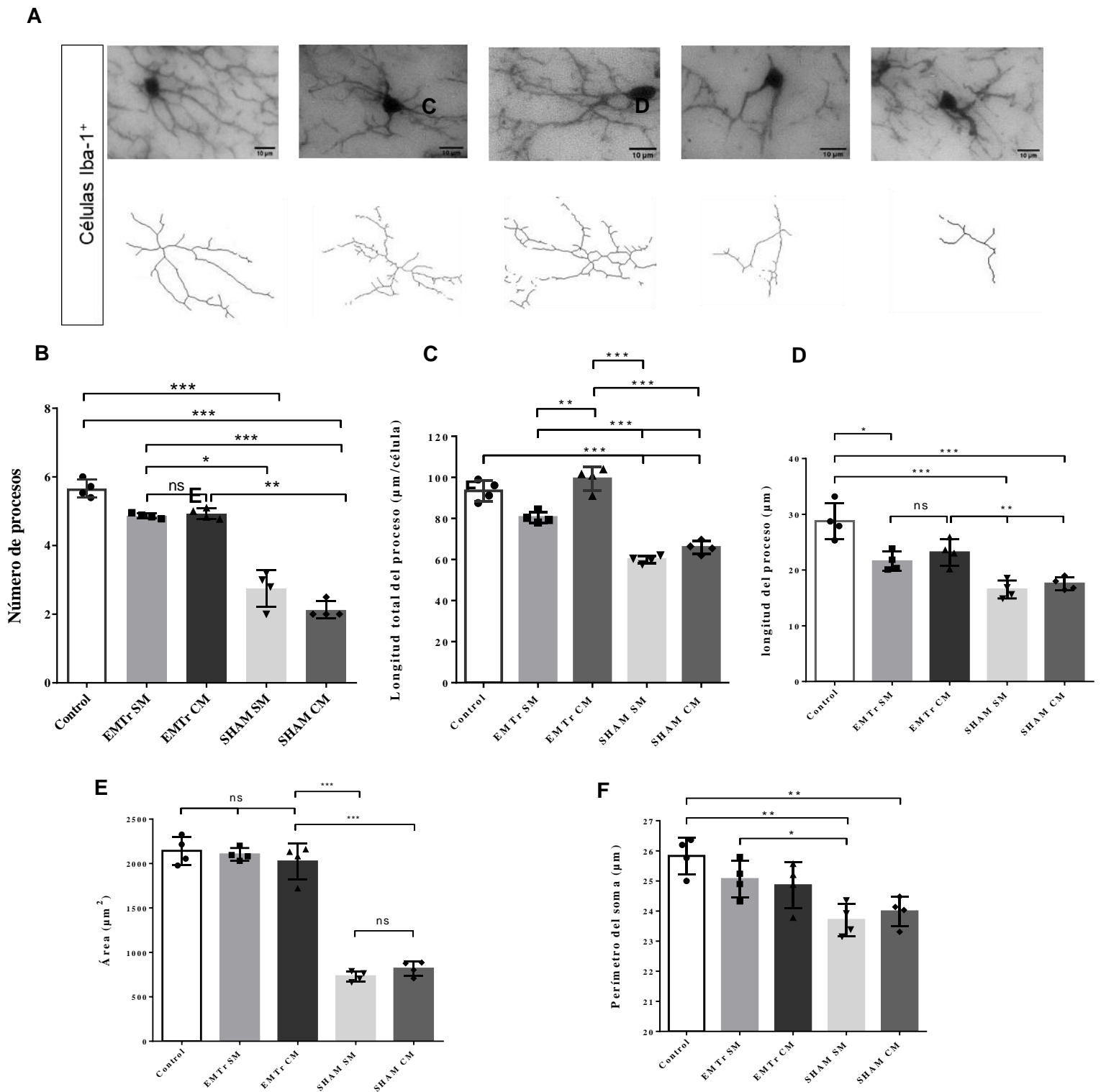


Figura 7.- Persistencia de los efectos de la estimulación magnética transcraneal a 5 Hz en las alteraciones morfológicas en la microglía causadas por el estrés crónico. A) Se muestran microfotografías representativas de células de la microglía 40X (Control, EMTr SM, EMTr CM, SHAM SM, SHAM CM, respectivamente). Barra de escala = 10 μm. B) Los datos muestran el número de procesos por célula (N=4). C) La longitud total de los procesos se estimó con la sumatoria de la longitud de los procesos por célula (N=4). D) Los datos muestran la longitud del proceso más largo de cada célula. E) Los datos representan el área total del cuerpo celular (N=4). F) Los datos muestran el perímetro del soma (N=4). Los datos representan la media ± el error estándar de la media (SEM). ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni (*p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001).

EMTr 5 Hz revierte la disminución de la densidad de células TMEM119⁺ en la capa de células granulares del giro dentado ocasionada por la exposición a estrés crónico.

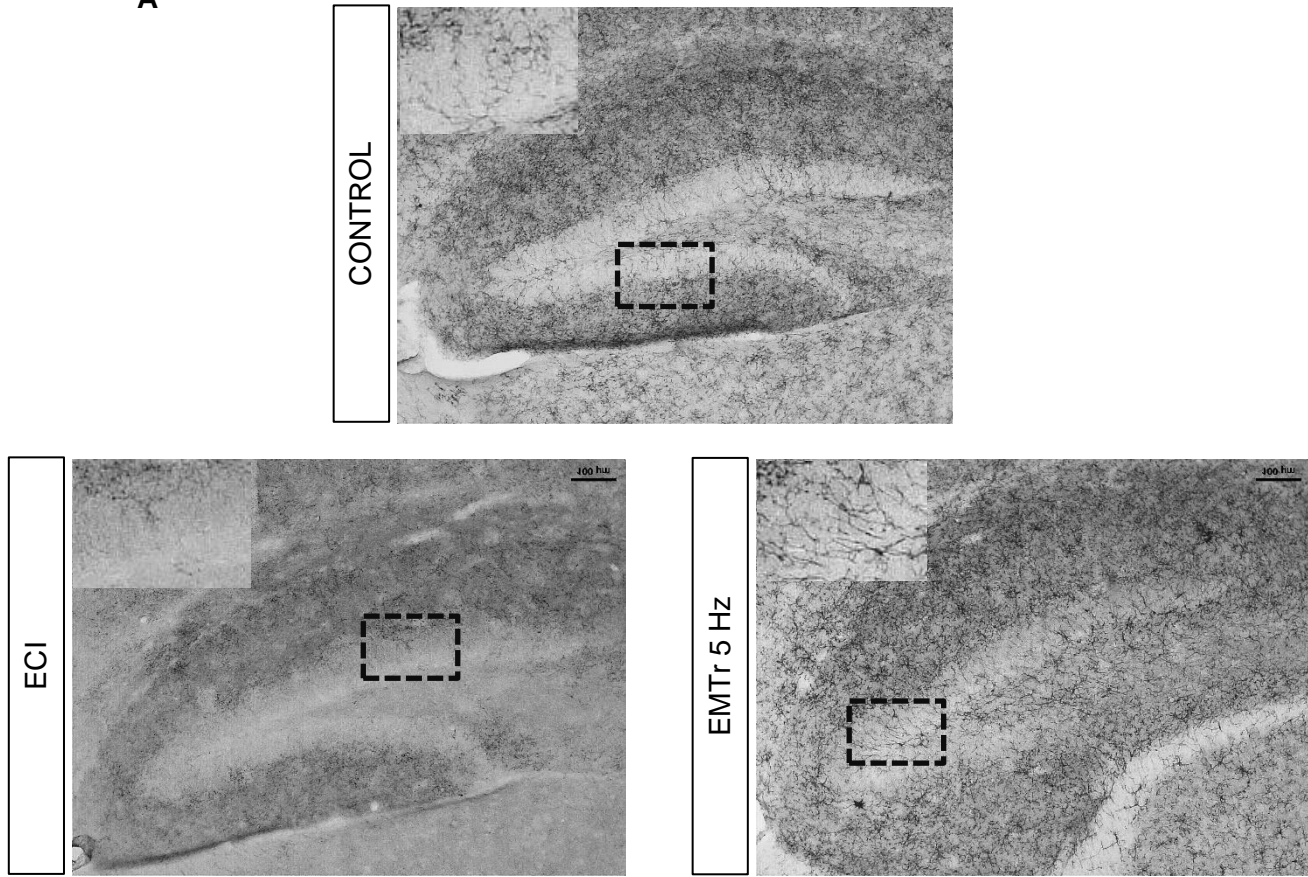
Debido a que IBA-1 se encuentra presente en células del linaje monocítico como macrófagos periféricos y monocitos; y, que el estrés crónico puede afectar la homeostasis de la barrera hematoencefálica afectando su permeabilidad y permitiendo la migración transendotelial de macrófagos, era necesario corroborar si el incremento de células IBA-1⁺ en el giro dentado se debía exclusivamente a células microgliales. Para ello se cuantificó la densidad celular utilizando la expresión de TMEM119. La cuantificación se realizó en dos grandes agrupaciones; la primera, a la cual pertenecían los grupos que recibieron un primer set de estimulación a 5 Hz durante 4 semanas (Fig. 8); y la segunda, en la que se incluyeron los grupos que recibieron sesiones de mantenimiento con EMTr a 5 Hz (Fig. 9).

Las observaciones indican que la densidad de células TMEM119⁺ se redujo significativamente (Fig. 8B) en el grupo expuesto a estrés crónico impredecible (288.211 ± 9.26) en comparación con el grupo control sin estrés (370.84 ± 8.137 , $p < 0.001$). Por el contrario, en comparación con el grupo estresado, el tratamiento con EMTr 5 Hz incrementó significativamente la densidad de estas células (492.23 ± 11.24 , $p < 0.001$).

Dicho aumento también es significativo al compararlo con los ratones del grupo control. En comparación con el grupo estresado, el tratamiento con EMTr 5 Hz incrementó significativamente el número de células TMEM119⁺ (492.23 ± 11.24 , $p < 0.001$). Estas mismas observaciones se mantienen en los grupos expuestos a sesiones de mantenimiento (Fig. 9B), donde los individuos estresados pertenecientes al grupo SHAM SM y SHAM CM muestran una reducción significativa de la densidad microglial (292.353 ± 7.52 , $p < 0.001$; 285.176 ± 3.4 , $p < 0.001$, respectivamente) comparados con el grupo no estresado (359.761 ± 7.52 , $F_{2,9} = 113.423$, $p < 0.001$).

Además, se observa un aumento en la población celular TMEM119⁺ en los individuos sometidos a EMTr 5 Hz tanto con sesiones de mantenimiento (428.865 ± 7.52) como sin ellas (438.786 ± 7.52) comparados con el grupo control ($F_{4,15} = 93.205$, $p < 0.001$). Sin embargo, las sesiones de mantenimiento con EMTr 5 Hz parecen no influir en la modificación de la densidad microglial, comparado con el grupo EMTr SM ($p = 0.9321$) cuando el factor estrés permanece constante.

A



B

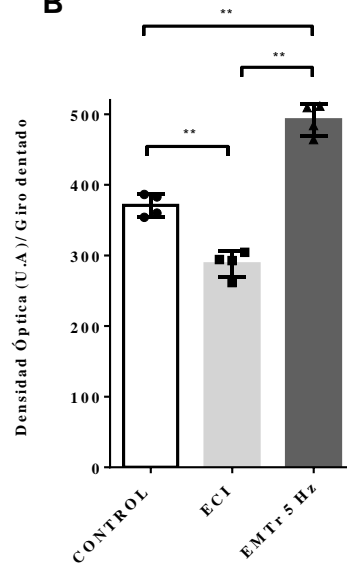


Figura 8.- EMTr 5 Hz revierte la disminución de la densidad de células TMEM119⁺ en la capa de células granulares del giro dentado ocasionada por la exposición a estrés crónico. A) Se muestran microfotografías representativas de células microgliales en el hipocampo de ratones expuestos a estrés crónico (ECI), tratados con estimulación magnética transcranial (EMTr 5 Hz), o sin exposición a estrés (Control) a 10X. Barra de escala = 100 μm. B) Los datos representan la media ± el error estándar de la media (SEM). ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni (*p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001).

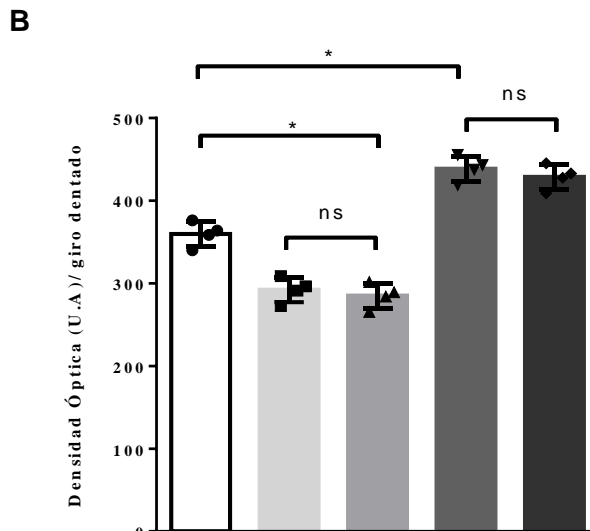
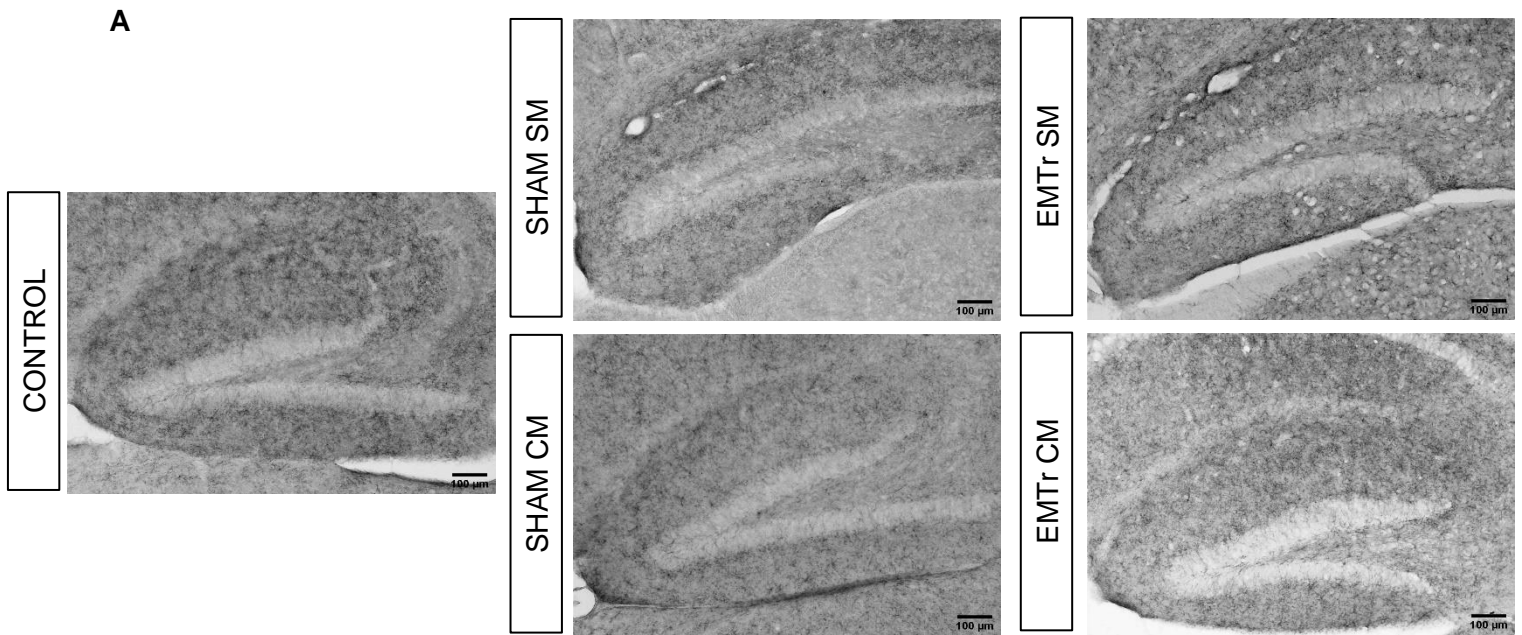


Figura 9.- Persistencia de los efectos de la estimulación magnética transcraneal a 5 Hz en la densidad de células TMEM119⁺ en la capa de células granulares del giro dentado ocasionada por la exposición a estrés crónico. A) Se muestran microfotografías representativas de células microgliales en el hipocampo de ratones expuestos a estrés crónico (SHAM SM, SHAM CM), y a estimulación magnética transcraneal a 5 Hz (EMTr SM), a sesiones de mantenimiento con EMTr 5 Hz (EMTr CM), o sin exposición a estrés (Control). Barra de escala = 100 µm. B) Los datos representan la media ± el error estándar de la media (SEM). ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni (*p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001).

EMTr 5 Hz induce la expresión de citocinas antiinflamatorias provocando la disminución de citocinas proinflamatorias generadas por la exposición a estrés crónico impredecible

Las citoquinas son mensajeros clave entre la respuesta central y periférica, que median la iniciación, desarrollo, y señalización de procesos inflamatorios, al ser esta una señalización bidireccional, fue de importancia conocer si los efectos de la EMTr 5Hz ocasionaba también cambios a nivel periférico. De los arreglos de 96 proteínas se seleccionaron las principales citocinas proinflamatorias, y se analizaron en dos grandes agrupaciones; la primera, a la cual pertenecían los grupos que recibieron un primer set de estimulación a 5 Hz durante 4 semanas (Fig. 10A); y la segunda, en la que se incluyeron los grupos que recibieron sesiones de mantenimiento con EMTr a 5 Hz (Fig. 10B). En el grupo SHAM, la secreción de citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17, IFN- γ , y TNF- α , tuvo un incremento comparado con los grupos estimulados (79.58 ± 7.60 , $p < 0.001$; 30.89 ± 7.60 , $p < 0.001$, respectivamente) comparados con el grupo no estresado (79.58 ± 7.60 , $p < 0.001$; 1.09 ± 7.60 , $p < 0.001$ $F_{(4,12)} = 54.25$, $p < 0.001$). Este fenómeno se mantuvo incluso cuando se aplicaron sesiones de mantenimiento ($F_{(4,20)} = 14.70$, $p < 0.0013$).

Las citocinas antiinflamatorias tuvieron cambios por efecto de la EMTr 5 Hz. Del set de arreglo de proteínas se seleccionaron las principales citocinas antiinflamatorias, y se analizaron en dos grandes agrupaciones; la primera, a la cual pertenecían los grupos que recibieron un primer set de estimulación a 5 Hz durante 4 semanas (Fig. 11A); y la segunda, en la que se incluyeron los grupos que recibieron sesiones de mantenimiento con EMTr a 5 Hz (Fig. 11B). En los grupos estimulados (sin sesiones de mantenimiento), la secreción de citocinas antiinflamatorias IL-4, IL-10, IL-13, IL-15 tuvo un incremento considerable comparado con los grupos SHAM (108.4 ± 20.63 , $p < 0.0045$; 9.488 ± 20.63 , $p < 0.0013$, respectivamente) comparados con el

grupo no estresado (108.4 ± 20.63 , $p < 0.001$; 23.93 ± 20.63 , $p < 0.0001$ $F(4,12) = 13.40$, $p < 0.001$). Sin embargo, aún con sesiones de mantenimiento este fenómeno se mantuvo ($F(4,20) = 16.13$, $p < 0.0001$). De acuerdo con las observaciones, la EMTr 5 Hz induce la expresión de citocinas antiinflamatorias, el incremento de estas interleucinas provoca la disminución de citocinas proinflamatorias generadas por la exposición a estrés crónico impredecible.

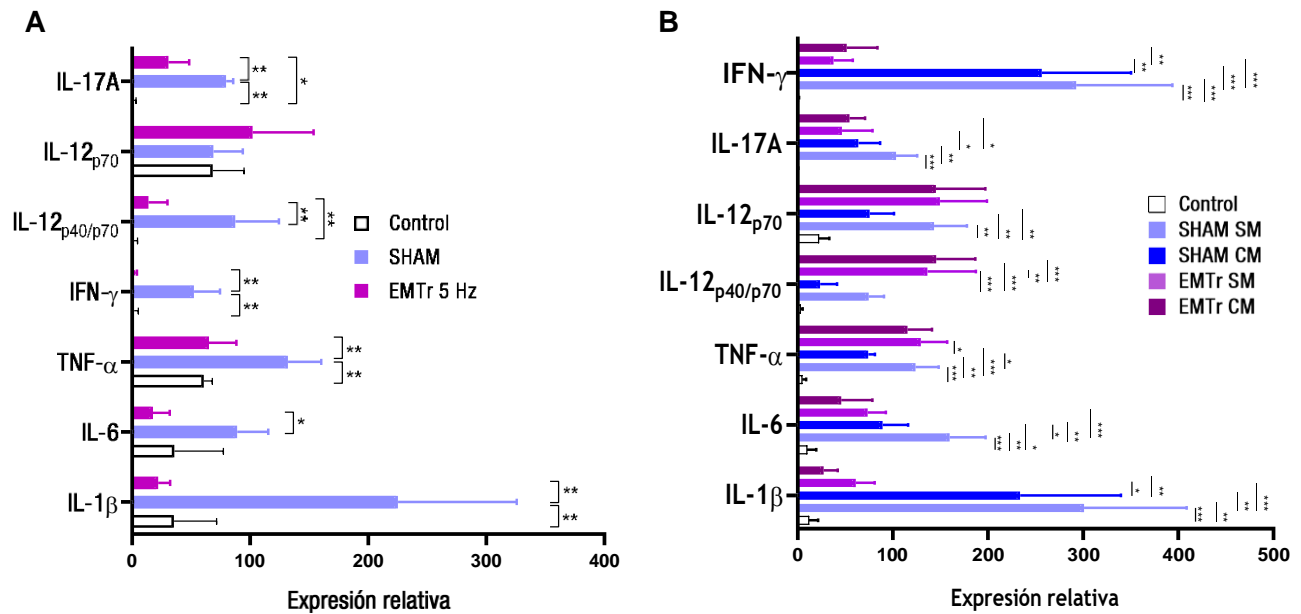


Figura 10.- Persistencia de los efectos de la estimulación magnética transcranial a 5 Hz en los niveles de citocinas proinflamatorias periféricas. A) Se muestra la expresión relativa de citocinas proinflamatorias en ratones expuestos a estrés crónico impredecible (SHAM), y a estimulación magnética transcranial a 5 Hz (EMTr 5 Hz), o sin exposición a estrés (Control). B) Se muestra la expresión relativa de citocinas proinflamatorias en ratones expuestos a estrés crónico impredecible (SHAM SM, SHAM CM), y a estimulación magnética transcranial a 5 Hz (EMTr SM) sin o con sesiones de mantenimiento (EMTr CM), y sin exposición a estrés (Control). Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (SEM). ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

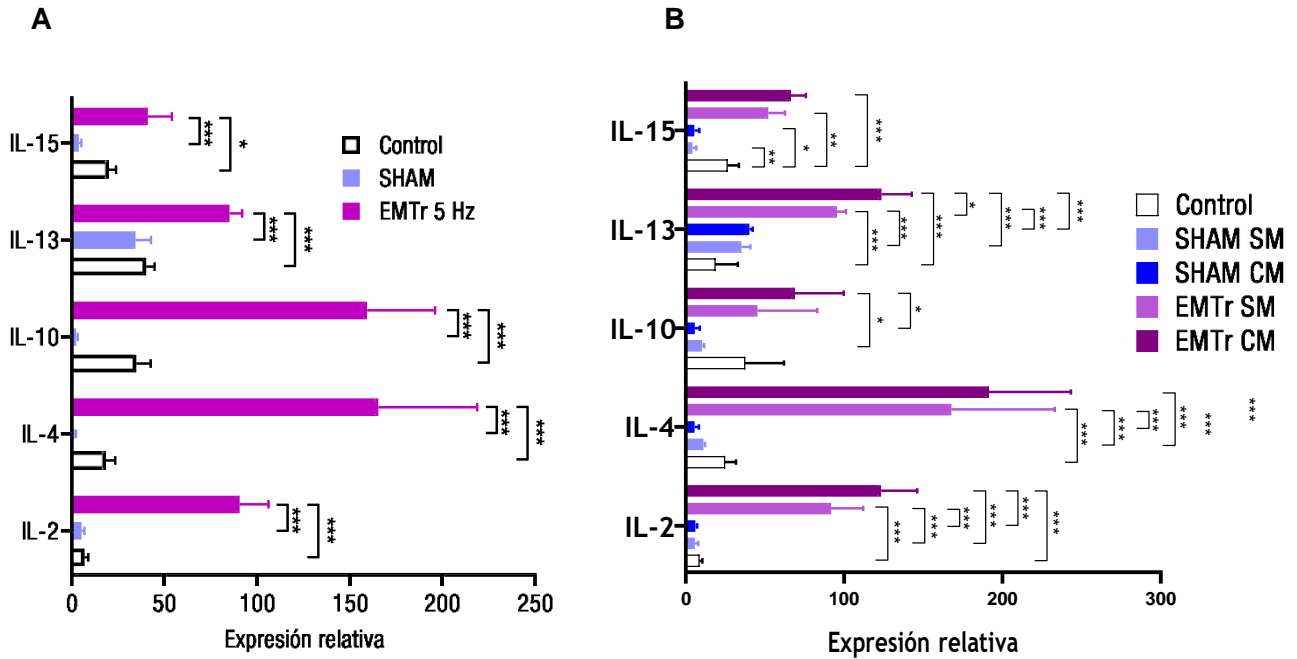


Figura 11.- Persistencia de los efectos de la estimulación magnética transcraneal a 5 Hz en los niveles de citocinas antiinflamatorias periféricas. A) Se muestra la expresión relativa de citocinas proinflamatorias en ratones expuestos a estrés crónico impredecible (SHAM), y a estimulación magnética transcraneal a 5 Hz (EMTr 5 Hz), o sin exposición a estrés (Control). B) Se muestra la expresión relativa de citocinas proinflamatorias en ratones expuestos a estrés crónico impredecible (SHAM SM, SHAM CM), y a estimulación magnética transcraneal a 5 Hz (EMTr SM) sin o con sesiones de mantenimiento (EMTr CM), y sin exposición a estrés (Control). Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (SEM). ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

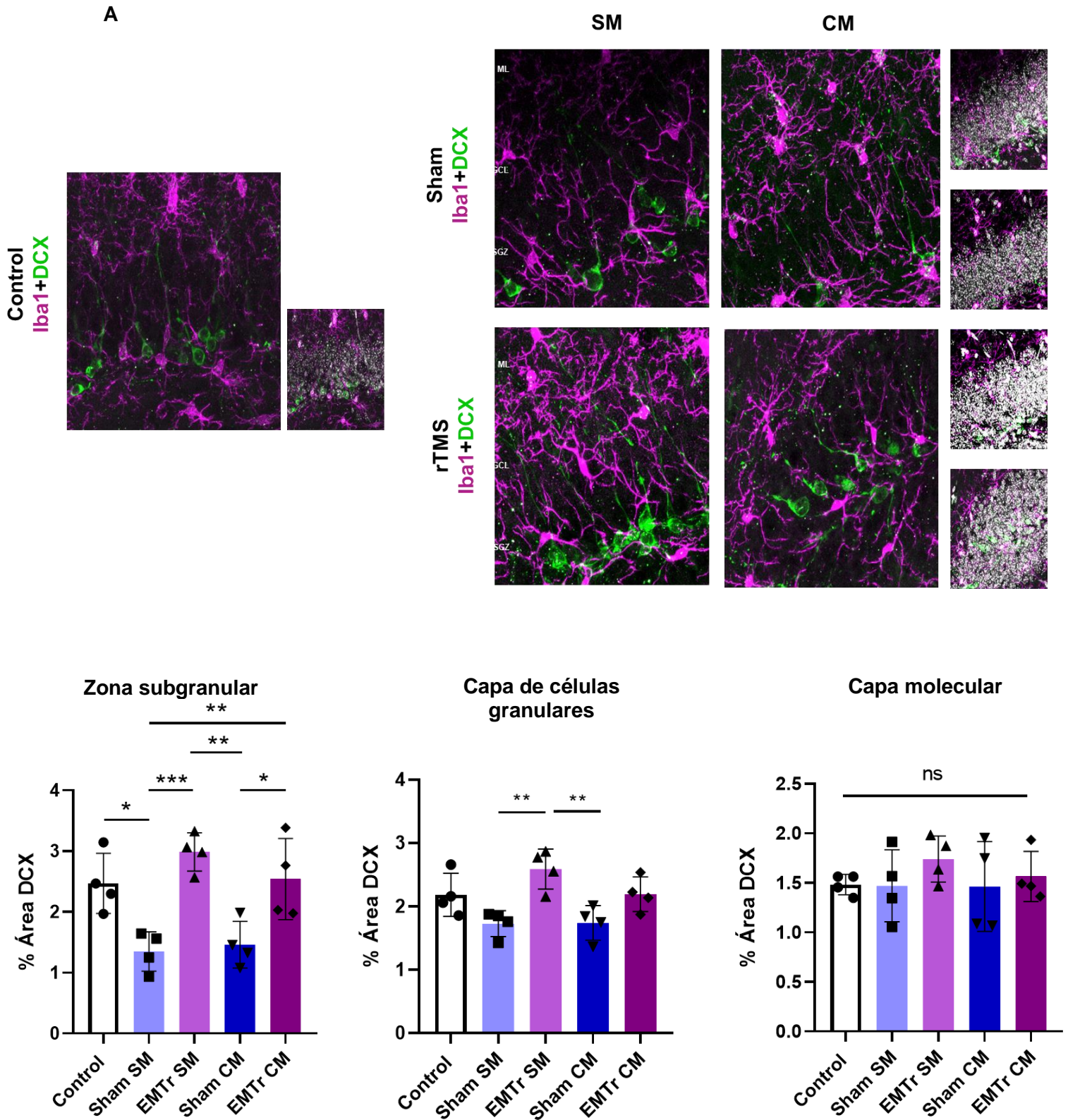


Figura 12. Efectos de la estimulación magnética transcranial a 5 Hz en la neurogénesis. A) microfotografías representativas de la interacción de células DCX⁺ (Verde, Alexa 488) e IBA-1⁺ (Morado, Alexa 647). Imágenes tomadas por microscopía confocal a 40X. B) Se muestra la expresión en ratones expuestos a estrés crónico impredecible (SHAM), y a estimulación magnética transcranial a 5 Hz (EMTr 5 Hz), o sin exposición a estrés (Control). B) Se muestra la expresión relativa de citocinas proinflamatorias en ratones expuestos a estrés crónico impredecible (SHAM SM, SHAM CM), y a estimulación magnética transcranial a 5 Hz (EMTr SM) sin o con sesiones de mantenimiento (EMTr CM), y sin exposición a estrés (Control) Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (SEM). ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

VII. DISCUSIÓN

En el presente estudio, se encontró que la persistencia de los efectos tipo antidepresivo de la EMTr a 5Hz se acompañan de modificaciones de la microglía en el nicho neurogénico del hipocampo en roedores expuestos a estrés crónico impredecible.

De acuerdo con Rocha (2020), el protocolo de estrés crónico utilizado en este estudio produjo en ratones hembra de la cepa Balb/c conductas tipo depresivas, tales como pérdida del autocuidado (observado como un mayor deterioro del estado del pelaje) y desesperanza. Además, reportó que la estimulación en la CFDLI, en ratones hembra BALB/c expuestos a ECI, tratados durante 4 semanas con sesiones de EMTr a 5 Hz, que además recibieron sesiones posteriores de mantenimiento (EMTr a 5Hz) durante 5 semanas más, favorece la maduración de las espinas dendríticas en las células granulares del giro dentado del hipocampo. Sin embargo, se desconocía si los efectos a largo plazo de la EMTr 5 Hz eran promovidos exclusivamente por células neuronales, ya que anteriormente se ha observado que, durante procesos de estrés, las alteraciones en la microglía contribuyen a la reducción de la neurogénesis y la plasticidad neuronal, además de que representan un componente importante en la patogénesis de la depresión (Kreisel *et al.*, 2014; Sierra *et al.*, 2014). En nuestro modelo experimental se observó que el número de células microgliales se redujo significativamente (Fig. 5, 8 y 9) en los grupos expuestos a estrés crónico impredecible en comparación con el grupo control sin estrés, y que, además en comparación con el grupo estresado, el tratamiento con EMTr a 5 Hz incrementó significativamente el número de células de la microglía. En diversos estudios se han analizado los cambios que induce el estrés sobre la densidad microglial. Kreisel *et al.* demostraron que la exposición a corto plazo (2 días) a estrés impredecible aumentó el número de microglía CX3CR1-GFP⁺ en el giro dentado, aunado a un incremento de las células microgliales marcadas con bromodesoxiuridina, lo que sugirió que este tipo de estrés inducía proliferación de la microglía.

Por otra parte, la exposición a estrés crónico (durante 5 semanas) redujo el número

de microglía CX3CR1- GFP⁺ en el giro dentado, y además indujo apoptosis en estas células que fueron positivas para caspasa-3⁺. Estos resultados sugieren que la exposición al estrés agudo induce una proliferación transitoria de la microglía, mientras que la exposición prolongada al estrés provoca la apoptosis de éstas, lo cual conlleva a la reducción de la densidad microglial. Esta citopenia microglial parece desempeñar un papel fundamental en los efectos conductuales del estrés, pero el mecanismo de acción por el cual se lleva a cabo permanece en discusión. La activación microglial inducida por el estrés agudo, se caracteriza generalmente por cambios morfológicos y activaciones funcionales. Una vez que la microglía es activada, libera factores neurotóxicos, como NO, citocinas, quimiocinas y ROS (Nair y Bonneau, 2006). Por otra parte, en diversas condiciones fisiológicas o neuropatológicas, se ha asociado a la microglía con la expresión y secreción de sustancias neurotróficas, como el IGF-1 (factor de crecimiento similar a la insulina 1) y el factor neurotrófico derivado del cerebro (Ekdahl *et al.*, 2009; Kettenmann *et al.*, 2011). Por lo tanto, aún no está claro el momento preciso en la microglía inducida por estrés pasa de ser proinflamatoria a presentar propiedades antiinflamatorias, o viceversa (Tynan *et al.*, 2010). Otras observaciones han atribuido el incremento de células positivas a Iba-1, Cd11b y MHC-II (moléculas que comparten su expresión tanto en células del linaje monocítico como la microglía), en procesos de estrés a alteraciones de la barrera hematoencefálica (BH), ya que la neuroinflamación ocasionada por estrés pueden provocar una alteración de la BH que permita que los macrófagos se infiltren e influyan en el proceso de lesión y reparación (Hinwood *et al.*, 2012; Wang, *et al.*, 2018). Sin embargo, una respuesta dirigida de la microglía residente también puede ocurrir en ausencia de monocitos infiltrados (Peng *et al.*, 2008; Funk *et al.*, 2011). Distinguir entre las señales de la microglía residente y los macrófagos infiltrantes sigue siendo un factor de confusión a la hora de identificar señales exclusivas del SNC. Se ha sugerido que las células infiltrantes están implicadas en las lesiones inflamatorias graves, mientras que la microglía residente se centra en el mantenimiento de la homeostasis tisular (Ginhoux y Jung, 2014). No obstante, en años recientes se ha optado por inmunomarcaje con moléculas específicas, que solo son expresadas por la microglía residente, como en el caso de TMEM119 que se ha convertido en un marcador fiable de células de la microglía, sobre todo en inflamaciones crónicas como las ocurridas en enfermedades

neurodegenerativas (Bohnert *et al.*, 2020). Los datos obtenidos en el presente trabajo han remarcado la importancia de analizar marcadores específicos de la microglía cuando se trata de identificar densidad microglial en condiciones de estrés, gracias a ello se pudo confirmar que el incremento de células IBA-1⁺ tras el tratamiento con estimulación magnética transcraneal correspondían exclusivamente a células microgliales (Figura 8 y 9). También se realizó un doble marcaje IBA-1⁺/TMEM119 (Fig. S1) y se confirmó mediante inmunofluorescencia la coexpresión de ambas moléculas en las células del giro dentado.

El estrés no solo es capaz de inducir cambios en la densidad microglial, también puede ocasionar alteraciones morfológicas. Kreisel *et al.* (2014) describieron que ante el estrés agudo (2 días) se aumentaba el tamaño del soma microglial, mientras que 2 y 4 días de exposición a estrés impredecible disminuían tanto el tamaño del soma celular como la longitud de los procesos de la microglía, lo cual coincide con lo observado en este estudio, donde la exposición a ECI indujo cambios en la morfología de las células IBA-1⁺, tales como reducción en el número y la longitud de los procesos, y el perímetro del soma celular (Fig. 6 y 7). Es importante destacar que los efectos del estrés sobre la morfología de la microglía, de acuerdo con diversos estudios, no muestra un patrón claro de sus efectos, y que la heterogeneidad de estos resultados corresponde a la heterogeneidad de los modelos de estrés utilizados (Button *et al.*, 2013; De Pablos *et al.*, 2014; Wohleb *et al.*, 2018).

Por otra parte, se observó que la estimulación magnética transcraneal a 5 Hz revierte las alteraciones en las células de la microglía causadas por el estrés crónico, promoviendo su proliferación en la capa de células granulares del giro dentado, y, este efecto se mantiene pese a la continua exposición a estrés crónico (Fig. 7, 8, 9). El efecto de la EMTr en la microglía no ha sido ampliamente explorado. Sin embargo, se ha observado que, en ratas sanas, la aplicación de EMTr de alta intensidad y baja frecuencia no afecta al número de microglías en la corteza motora o el hipocampo (Liebetanz *et al.*, 2003). Por otro lado, la aplicación de EMTr de muy baja intensidad, pero de alta frecuencia, después de una lesión isquémica, o posterior a la inducción de desmielinización, parece activar la microglía, lo que conduce a un aumento de la expresión de Iba1 (Fang *et al.*, 2010; Raus *et al.*, 2013). En cambio, la EMTr de alta intensidad y frecuencia aplicada al SC lesionado, atenúa la activación microglial (Kim *et al.*, 2013). Aunque aún no es posible establecer el efecto de la EMTr sobre la microglía a partir de un número tan reducido de estudios, es de esperar que la EMTr afecte al comportamiento de estas células, debido a la

comunicación bidireccional entre las neuronas y las células microgliales. Se conoce que la microglía fagocita preferentemente las terminales presinápticas débiles o terminales o inactivas, guiadas por la expresión dependiente de la actividad de complemento (Schafer *et al.*, 2012; Morris *et al.*, 2013). Igualmente, secreta factores neurotróficos como el BDNF, además de diversas citocinas como la interleucina 1 β , que han demostrado facilitar la LTP (Rogers *et al.*, 2011; Ferrini y De Koninck, 2013). Aunque aún no se conoce como la microglía influye en la actividad neuronal y responde a las señales que son alteradas por efecto de la EMTr, es de reconocer que poseen un papel importante como mediadores celulares en la respuesta a ésta.

La creciente evidencia ha demostrado que las citoquinas inflamatorias juegan un papel importante en los procesos depresivos, además de estar asociadas con la respuesta a los tratamientos (Haapakoski *et al.*, 2015). En pacientes con trastorno de depresión mayor se ha observado el incremento de niveles de citoquinas proinflamatorias, principalmente el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina 6 (IL-6) y la interleucina IL-1 β en comparación con los controles sanos. Estos hallazgos han sido validados por metanálisis (Dowlati *et al.*, 2010; Köhler *et al.*, 2017). Los niveles de citocinas antiinflamatorias incluyendo la IL-4, la IL-10 y la IL-13, también muestran anormalidades en estos trastornos (Pariante, 2017).

Recientemente un estudio indicó que el tratamiento antidepresivo se asocia con una disminución significativa de los niveles de IL-1 β e IL-6 (Hannestad *et al.*, 2011). Además, se ha observado que las citocinas antiinflamatorias, como la IL-10, revierten los comportamientos tipo depresivo en un modelo murino (Mesquita *et al.*, 2010). Los datos observados en los ratones expuestos a estrés crónico (Fig. 10A y B) muestran resultados similares a los antes mencionados, un incremento en las citocinas de tipo inflamatorias en los grupos SHAM.

Además, la EMTr 5 Hz indujo un aumento de citocinas antiinflamatorias (Fig. 11 A y B), mismo fenómeno que se ha observado en pacientes bajo tratamiento farmacológico antidepresivo (Song *et al.*, 2009), el cual se ha visto relacionado con

la mejoría de los episodios depresivos. Todos estos hallazgos sugieren que las citocinas inflamatorias pueden ser un mediador vital en la depresión, y que un desequilibrio entre las citocinas pro y antiinflamatorias contribuye a los síntomas depresivos (Woelfer *et al.*, 2019). Las hipótesis inflamatorias de la depresión han recibido atención en las últimas décadas, se han propuesto algunos mecanismos que podrían subyacer a la relación entre las citocinas y la depresión. En el trastorno depresivo mayor un aumento de las citoquinas proinflamatorias como la IL-6 y el TNF- α , están relacionadas con la hiperactividad del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal, que estimula la secreción de la hormona liberadora de corticotropina y la hormona adrenocorticotrópica, la cual estimula secundariamente la secreción de glucocorticoides (Pariante y Lightman, 2008). Además, las citocinas están implicadas en la neurotransmisión monoamínica y glutamatérgica en el sistema nervioso central (Herbert *et al.*, 2006).

Las citocinas proinflamatorias están relacionadas con la alteración del recambio de la 5 hidroxitriptamina (5-HT) en las regiones cerebrales, lo que se traduce en una disminución del nivel de 5-HT en la hendidura sináptica, que puede influir en la neuroplasticidad y, en última instancia, participar en el desarrollo de la depresión (Mattson *et al.*, 2004; Hayley *et al.*, 2005). Mientras tanto, la actividad de las citocinas conduce a un aumento de la expresión de la indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO), que convierte el precursor de la 5-HT, el triptófano (TRP), en cinurenina (KYN) y regula aún más la síntesis de la 5-HT (Woelfer *et al.*, 2019).

Particularmente, en un modelo murino de estrés crónico por restricción, se correlacionó el incremento de conductas tipo depresivas con la expresión de IL-1 β , TNF- α e IL-6, y la regulación de estas de estas citocinas proinflamatorias fue revertida por la administración de ketamina (Tan *et al.*, 2017). Otros estudios en animales han observado que la administración de ketamina regula a la baja los niveles de IL-1 β e IL-6 en la corteza prefrontal y el hipocampo (Yang *et al.*, 2013).

y disminuye los niveles de TNF- α y proteína C-reactiva en sangre periférica. Estos efectos inmunorreguladores se observan principalmente en la microglía (Walker *et al.*, 2015).

De acuerdo con diversos estudios es claro que la vía inflamatoria está implicada en los efectos antidepresivos. Sin embargo, las vías de señalización que subyacen particularmente a los efectos antidepresivos de la EMTr no han sido del todo dilucidadas. Este proyecto vislumbra algunos cambios a nivel central y periférico que están relacionados con ello, y son un parteaguas para conocer las vías de señalización y fenómenos implicados en la persistencia de los efectos tipo antidepresivo de la estimulación magnética transcraneal.

IX. CONCLUSIONES

La Estimulación Magnética Transcraneal a 5 Hz revierte las alteraciones en las células IBA-1⁺ causadas por el estrés crónico, promoviendo su proliferación en la capa de células granulares del giro dentado, y, este efecto se mantiene al menos 7 semanas, pese a la continua exposición a estrés crónico. La exposición a ECI indujo cambios en la morfología de las células IBA-1⁺, tales como reducción en el número y la longitud de los procesos, sin embargo, el tratamiento con EMTr 5 Hz logró revertir estos efectos, y modular su persistencia por al menos 7 semanas.

Además, la EMTr 5 Hz provocó un incremento en la secreción de citocinas antiinflamatorias periféricas, lo cual redujo los niveles de interleucinas proinflamatorias de la periferia. Este fenómeno aparece desde las primeras sesiones de estimulación y se mantiene con o sin sesiones de mantenimiento por al menos 7 semanas.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso, R, G Griebel, G Pavone, J Stemmelin, G Le Fur, and P Soubrié. 2004. Blockade of CRF1 or V1b Receptors Reverses Stress-Induced Suppression of Neurogenesis in a Mouse Model of Depression. *Molecular Psychiatry* 9 (3): 278–86. doi:10.1038/sj.mp.4001464.
- American Psychiatric Association. 2013. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5ta edición. Washington, DC: <http://dx.doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596>
- Armas-Castañeda, G., Ricardo-Garcell, J., Romo-Nava, F., Heinze-Martin, G., y González-Olvera, J. 2015. “Transcranial Magnetic Stimulation: Antidepressant Efficacy and Three-Month Follow-Up.” *Brain Stimulation* 8 (2): 343. doi:10.1016/j.brs.2015.01.108
- Aarum J, Sandberg K, Haerberlein SL, Persson MA (2003) Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15983–15988
- Barrientos RM, Sprunger DB, Campeau S et al. 2003. Brain-derived neurotrophic factor mRNA downregulation produced by social isolation is blocked by intrahippocampal interleukin-1 receptor antagonist. *Neuroscience*;121:847-853.
- Belmaker, R.H., Agam, G. 2008. Major Depressive Disorder. *The new England Journal of Medicine*. 358: 55-68.
- Bernstein, BE., Meissner, A., Lander, ES. 2007. The mammalian epigenome. *Cell*; 128: 669-81.
- Bohnert, S., Seiffert, A., Trella, S. et al. TMEM119 as a specific marker of microglia reaction in traumatic brain injury in postmortem examination. *Int J Legal Med* **134**, 2167–2176 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02384-z>
- Bremner, J. D. 1999. Does stress damage the brain? *Biological Psychiatry*, 45 (7), 797-805. doi: 10.1016/S0006-3223(99)00009-8
- Brown, E. S., Rush, A. J., y McEwen, B. S. 2009. Hippocampal remodeling and damage by corticosteroids: Implications for mood disorders. *Neuropsychopharmacology*, 21(4), 474-484.
- Boldrini M, Underwood MD, Hen R, Rosoklija GB, Dwork AJ, John Mann J, Arango V. 2009. Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus. *Neuropsychopharmacology*. 34(11):2376-89. doi:

10.1038/npp.2009.75. Epub 2009 Jul 15. PMID: 19606083; PMCID: PMC2743790

Button, K., Ioannidis, J., Mokrysz, C. *et al.* Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience. *Nat Rev Neurosci* **14**, 365–376 (2013). <https://doi.org/10.1038/nrn3475>

Cameron, H.A., Woolley, C.S., McEwen, B.S., and Gould, E. 1993. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* **56**, 337-344.

Cameron HA, McEwen BS, Gould E. 1995. Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *J Neuroscience*; **15**:4687-4692.

Cavalli, G., Heard, E., 2019. Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. *Nature*.;571(7766):489-499. doi: 10.1038/s41586-019-1411-0.

Chervyakov, Alexander V., Andrey Yu. Chernyavsky, Dmitry O. Sinitsyn, and Michael A. Piradov. 2015. "Possible Mechanisms Underlying the Therapeutic Effects of Transcranial Magnetic Stimulation." *Frontiers in Human Neuroscience* **9** (June): 1–14. doi:10.3389/fnhum.2015.00303

Choi, D. C., Rothbaum, B. O., Gerardi, M., & Ressler, K. J. 2010. Pharmacological enhancement of behavioral therapy: focus on posttraumatic stress disorder. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, **2**, 279-299.

De Pablos, R.M., Herrera, A.J., Espinosa-Oliva, A.M. *et al.* (2014). Chronic stress enhances microglia activation and exacerbates death of nigral dopaminergic neurons under conditions of inflammation. *J Neuroinflammation* **11**, 34. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-34>

Deak T, Bordner, KA, McElderry N. (2005). Stress-induced increases in hypothalamic IL-1: a systematic analysis of multiple stressor paradigms. *Brain Res Bull* ;**64**:541-556.

Deng, W., Aimone, J.B., and Gage, F.H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neuroscience* **11**, 339-350.

Deng, Sl., Chen, Jg. & Wang, F. (2020). Microglia: A Central Player in Depression. *CURR MED SCI* **40**, 391–400. <https://doi.org/10.1007/s11596-020-2193-1>

Diaz-Aparicio I, Paris I, Sierra-Torre V, Plaza-Zabala A, Rodríguez-Iglesias N, Márquez-Ropero M, Beccari S, Huguet P, Abiega O, Alberdi E, Matute C,

- Bernales I, Schulz A, Otrókocsi L, Sperlagh B, Happonen KE, Lemke G, Maletic-Savatic M, Valero J, Sierra A. (2020). Microglia Actively Remodel Adult Hippocampal Neurogenesis through the Phagocytosis Secretome. *J Neurosci* 12;40(7):1453-1482. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0993-19.2019
- Duval, F., González, F., y Rabia, H. 2010. Neurobiología del estrés. *Revista chilena de neuropsiquiatría*, 48(4), 307–318. doi: 10.4067/S0717-92272010000500006.
- Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O. 2009. Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. *Neuroscience* ; 158: 1021–1029.
- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., and Gage, F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4, 1313-1317.
- Etiévant, A., Manta, S., Latapy, C., Magno, L. A., Fecteau, S., & Beaulieu, J. M. (2015). Repetitive transcranial magnetic stimulation induces long-lasting changes in protein expression and histone acetylation. *Scientific reports*, 5, 16873. <https://doi.org/10.1038/srep16873>
- Ferrini, F., and De Koninck, Y. (2013). Microglia control neuronal network excitability via BDNF signalling. *Neural Plast.* 2013:429815. doi: 10.1155/2013/429815
- Fuchikami M, Morinobu S, Segawa M, Okamoto Y, Yamawaki S, Ozaki N, et al. (2011). DNA methylation profiles of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene as a potent diagnostic biomarker in major depression. *PLoS One*; 623881.
- Funk JA, Gohlke J, Kraft AD, McPherson CA, Collins JB, Harry GJ. (2011). Voluntary exercise protects hippocampal neurons from trimethyltin injury: possible role of interleukin-6 to modulate tumor necrosis factor receptor-mediated neurotoxicity. *Brain Behav Immun* 25: 1063–1077.
- Franco R, Fernández-Suárez D. (2015). Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Prog Neurobiol.* 131:65-86.
- George, M. S., Nahas, Z., Molloy, M., Speer, A., Oliver, N., Li, X., Arana, S. Craig, y Ballenger, J C. 2000. A Controlled Trial of Daily Left Prefrontal Cortex TMS for Treating Depression. *Biological Psychiatry* 48(10): 962–70.
- Gertig, U., and Hanisch, U. K. (2014). Microglial diversity by responses and responders. *Front. Cell Neurosci.* 8:101. doi: 10.3389/fncel.2014.00101
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F.,

- Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M., & Merad, M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6005), 841-845. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>
- Ginhoux F, Jung S (2014). Monocytes and macrophages: development pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol* 14: 392–404.
- Goldmann T, Blank T, Prinz M. (2016). Fine-tuning of type I IFN-signaling in microglia—implications for homeostasis, CNS autoimmunity and interferonopathies. *Curr. Opin. Neurobiol.* 36:38–42
- Gould, E., Tanapat, P., Hastings, N.B., and Shors, T.J. (1999). Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. *Trends Cogn Sci* 3, 186-192.
- Gross M, Nakamura L, Pascual-Leone A et al. (2007). Has repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) treatment for depression improved? A systematic review and meta-analysis comparing the recent vs. the earlier rTMS studies. *Acta Psychiatr Scand*; 116:165-173
- Hammen, C. (2005). stress and depression. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* 1:293–319.
- Hinwood M., Morandini, J., Day, F. R. Walker. 2012. Evidence that Microglia Mediate the Neurobiological Effects of Chronic Psychological Stress on the Medial Prefrontal Cortex, *Cerebral Cortex*, Volume 22: 1442–1454, <https://doi.org/10.1093/cer cor /bhr229>
- Iwata, M., Ota, K. T. y Duman, R. S. (2013). The inflammasome: pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses. *Brain, Behavior, and Immunity*, 31. doi: 105-114. 10.1016/j.bbi.2012.12.008
- Jäkel, S., & Dimou, L. (2017). Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00024>
- Jessberger, S., Zhao, C., Toni, N., Clemenson, G.D., Li, Y., and Gage, F.H. (2007). Seizure-associated, aberrant neurogenesis in adult rats characterized with retrovirus-mediated cell labeling. *J Neurosci* 27, 9400-9407.
- Katz RJ. 1982. Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. *Pharmacol Biochem Behav.* 16(6):965-8. doi: 10.1016/0091-3057(82)90053-3. PMID: 7202217.
- Kim, J. Y., Choi, G.-S., Cho, Y.-W., Cho, H., Hwang, S.-J., and Ahn, S.-H. (2013). Attenuation of spinal cord injury-induced astroglial and microglial activation by

- repetitive transcranial magnetic stimulation in rats. *J. Korean Med. Sci.* 28, 295–299. doi: 10.3346/jkms.2013.28.2.295
- Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A. 2013. Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron* 77:10–18.
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. 2011. Physiology of microglia. *Physiol Rev*; 91: 461–553.
- Kreisel T, Frank MG, Licht T, Reshef R, Ben-Menachem-Zidon O, Baratta MV, Maier SF, Yirmiya R. Dynamic microglial alterations underlie stress-induced depressive-like behavior and suppressed neurogenesis. 2014. *Mol Psychiatry*. (6):699-709. doi: 10.1038/mp.2013.155.
- Kreisel T, Wolf B, Keshet E, Licht T (2019) Unique role for dentate gyrus microglia in neuroblast survival and in VEGF-induced activation. *Glia* 67:594 –618.
- Klomjai, Wanalee, Rose Katz, and Alexandra Lackmy-Vallée. 2015. “Basic Principles of Transcranial Magnetic Stimulation (TMS) and Repetitive TMS (RTMS).” *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine* 58 (4). Elsevier Masson SAS: 208–13. doi:10.1016/j.rehab.2015.05.005.
- Koo JW, Duman RS. IL-1beta is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:751-756.
- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007; 128: 693-705.
- Krishnadas, R. & Cavanagh, J. (2012). Depression: An inflammatory illness? *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 83(5), 495-502. doi: 10.1136/jnnp-2011-301779.
- Li H, Sagar AP, Keri S. (2018). Translocator protein (18kDa TSPO) binding, a marker of microglia, is reduced in major depression during cognitive-behavioral therapy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 83:7. 10.1016/j.pnpbp.2017.12.011
- Liebetanz, D., Fauser, S., Michaelis, T., Czeh, B., Watanabe, T., Paulus, W., et al. (2003). Safety aspects of chronic low-frequency transcranial magnetic stimulation based on localized proton magnetic resonance spectroscopy and histology of the rat brain. *J. Psychiatr. Res.* 37, 277–286. doi: 10.1016/s0022- 3956(03)00017-7
- Lisanby, S. H., Belmarker, R. H., 2000. Animal models of the mechanism of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS): Comparisons with electroconvulsive shock (ECS). *Depression and anxiety*. 12: 178-187.
- Liu, H., Kaur, J., Dashtipour, K., Kinyamu, R., Ribak, C.E., and Friedman, L.K. (2003). Suppression of hippocampal neurogenesis is associated with

developmental stage, number of perinatal seizure episodes, and glucocorticosteroid level. *Exp Neurol* 184, 196-213

Meneses, JD. 2018. Efecto antidepressivo de la EMTr a 5 Hz en un modelo murino de depresión inducido por estrés crónico impredecible (Tesis de maestría). Universidad autónoma de México. México.

Morgan SC, Taylor DL, Pockock JM. (2004). Microglia release activators of neuronal proliferation mediated by activation of mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and delta-notch signalling cascades. *J Neurochem* 90:89 –101.

Morris, G. P., Clark, I. A., Zinn, R., and Vissel, B. (2013). Microglia: a new frontier for synaptic plasticity, learning and memory and neurodegenerative disease research. *Neurobiol. Learn. Mem.* 105, 40–53. doi: 10.1016/j.nlm.2013.07.002

Muller, M.B., Toschi, N., Kresse, A.E., Post, A., y Keck, M .2000. Long-term repetitive transcranial magnetic stimulation increases the expresión of brain derived neurotrophic factor and cholecystokin in mRNA, but not neuropeptide tyrosine mRNA in specific áreas of rat brain. *Neuropsychopharmacology* 23, 205–215.

Nair, A., y Bonneau, R. 2006. Stress-induced elevation of glucocorticoids increases microglia proliferation through NMDA receptor activation, *Journal of Neuroimmunology*, Volume 171. doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.09.012.

Nestler EJ. Epigenetic Mechanisms in Psychiatry. *Biol Psychiatry* 2009; 65: 189-9

Niv, F., Keiner, S., Krishna, -, Witte, O.W., Lie, D.C., and Redecker, C. (2012). Aberrant neurogenesis after stroke: a retroviral cell labeling study. *Stroke* 43, 2468- 2475.

Nollet, Mathieu, Anne-Marie Le Guisquet, and Catherine Belzung. 2013. Models of Depression: Unpredictable Chronic Mild Stress in Mice. *Current Protocols in Pharmacology / Editorial Board*, S.J. Enna. doi:10.1002/0471141755.ph0565s61

Nguyen KT, Deak T, Owens SM et al. 1998. Exposure to acute stress induces brain interleukin-1beta protein in the rat. *J Neurosci.* 18:2239-2246

Okun, E., Griffioen, K. J., & Mattson, M. P. (2011). Toll-like receptor Signaling in Neural Plasticity and Disease. *Trends in neurosciences*, 34(5), 269-281. https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.02.005

Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. 2016. Microglial M1/ M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol.*173(4):649-65.

- Parisi, C., Napoli, G., Pelegrin, P., & Volonté, C. (2016). M1 and M2 Functional Imprinting of Primary Microglia: Role of P2X7 Activation and miR-125b [Review Article]. *Mediators of Inflammation*; Hindawi. <https://doi.org/10.1155/2016/2989548>
- Peng H, Whitney N, Wu Y, Tian C, Dou H, Zhou Y et al. (2008). HIV-1-infected and/or immune-activated macrophage-secreted TNF-alpha affects human fetal cortical neural progenitor cell proliferation and differentiation. *Glia* 56: 903–916.
- Pérez Esparza, Rodrigo. (2017). Tratamiento farmacológico de la depresión: actualidades y futuras direcciones. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 60(5), 7-16
- Philip, N., Carpenter, S.L., et al. 2015. 5Hz Repetitive transcranial magnetic stimulation to left prefrontal cortex for major depression. *Journal of Affective Disorders*. 186. pp 13-17.
- Prinz M, Priller J. The role of peripheral immune cells in the CNS in steady state and disease. (2017). *Nat Neurosci*. 20(2):136-44.
- Rafful C, Medina-Mora ME, Borges G, Benjet C, Orozco R. Depression, gender, and the treatment gap in Mexico. 2012. *J Affect Disord*. Apr; 138(1-2):165-9. doi: 10.1016/j.jad.2011.12.040.
- Rauš, S., Selakovi ´c, V., Manojlovi ´c-Stojanoski, M., Radenovi ´c, L., Proli ´c, Z., and Jana ´c, B. (2013). Response of hippocampal neurons and glial cells to alternating magnetic field in gerbils submitted to global cerebral ischemia. *Neurotox. Res*. 23, 79–91. doi: 10.1007/s12640-012-9333-8
- Richards, B.A., and Frankland, P.W. 2017. The Persistence and Transience of Memory. *Neuron* 94, 1071-1084.
- Rocha, ER. 2020. Estudio de la persistencia del efecto tipo antidepresivo de la estimulación magnética transcranial repetitiva (5hz) en un modelo murino de depresión: implicación de la neuroplasticidad. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Rogers, J. T., Morganti, J. M., Bachstetter, A. D., Hudson, C. E., Peters, M. M., Grimmig, B. A., et al. (2011). CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity. *J. Neurosci*. 31, 16241–16250. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3667-11.2011

- Satoh J, Kino Y, Asahina N, Takitani M, Miyoshi J, Ishida T, Saito Y. TMEM119 marks a subset of microglia in the human brain. (2015). *Neuropathology*. 2016 Feb;36(1):39-49. doi: 10.1111/neup.12235. PMID: 26250788.
- Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., et al. (2012). Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74, 691–705. doi: 10.1016/j.neuron.2012.03.026
- Sheline Y, Mittler B, Mintun M. The hippocampus and depression. *Eur Psychiatry* 2002; 17 (Suppl 3): 299-305.
- Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, Chancey JH, Enikolopov G, OverstreetWadiche LS, Tsirka SE, Maletic-Savatic M. 2010. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* 7:483–495.
- Sierra A, Beccari S, Diaz-Aparicio I, Encinas JM, Comeau S. Surveillance, phagocytosis, and inflammation: how never-resting microglia influence adult hippocampal neurogenesis. 2014. *Neural Plast*. doi: 10.1155/2014/610343.
- Snyder, J.S., Ferrante, S.C., and Cameron, H.A. 2012. Late maturation of adult born neurons in the temporal dentate gyrus. *PLoS One* 7, e48757.
- Stahl S M. (2013). *Stahl's Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications*. New York, United States of America: Cambridge University Press.
- Steiner J, Walter M, Gos T. (2011) Severe depression is associated with increased microglial quinolinic acid in subregions of the anterior cingulate gyrus: evidence for an immune-modulated glutamatergic neurotransmission? *J Neuroinflammation* 8:94.
- Stuss, D. T., & Levine, B. (2000). Adult clinical neuropsychology, lessons from studies of the frontal lobes. *Annual Review of Psychology*, 53, 401-403.
- Subiabre, Alexies Dagnino. 2012. "Modelos Animales Para El Estudio Del Estrés Y Las Conductas Depresivas." *Revista de Farmacología de Chile* 5 (1): 19–26.
- Sweatt JD. Experience-dependent epigenetic modifications in the central nervous system. *Biol Psychiatry* 2009; 65(3): 191-7.

- Tynan R., Naicker S., Hinwood M., Nalivaiko E., Buller K., Pow D., Walker F. 2010. Chronic stress alters the density and morphology of microglia in a subset of stress-responsive brain regions. *Brain, Behavior, and Immunity*, Vol.24. doi.org/10.1016/j.bbi.2010.02.001.
- Tsankova NM, Berton O, Renthal W, Kumar A, Neve RL, Nestler EJ. 2006. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat Neurosci.*(4):519-25. doi: 10.1038/nn1659.
- Toni, N., Laplagne, D.A., Zhao, C., Lombardi, G., Ribak, C.E., Gage, F.H., and Schinder, A.F. 2008. Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat Neurosci* 11, 901-907.
- Toni, N., Teng, E.M., Bushong, E.A., Aimone, J.B., Zhao, C., Consiglio, A., van Praag, H., Martone, M.E., Ellisman, M.H., and Gage, F.H. 2007. Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat Neurosci* 10, 727-734.
- Toth E, Gersner R, Wilf-Yarkoni A et al. Age-dependent effect of chronic stress on brain plasticity and depressive behavior. 2008. *J Neurochem.* 107:522-532
- Turner E H., Matthews AM., Linardatos E., Tell RA., y Rosenthal R. 2008. Selective publication of antidepressant trials and its influence on apparent efficacy. *N Engl J Med.*;358:252- 260.
- Vega-Rivera, N.M., Ortiz-López, L., Gómez-Sánchez, A., Oikawa- Sala, J., Estrada-Camarena, EM., y Ramírez-Rodríguez, G.B. 2016. "The Neurogenic Effects of an Enriched Environment and Its Protection against the Behavioral Consequences of Chronic Mild Stress Persistent after Enrichment Cessation in Six-Month-Old Female Balb/C Mice." *Behavioural Brain Research* 301. Elsevier B.V.: 72– 83. doi:10.1016/j.bbr.2015.12.028.
- Vega-Rivera NM, Ortiz-López L, Granados-Juárez A, Estrada-Camarena EM, Ramírez-Rodríguez GB. (2020). Melatonin Reverses the Depression-associated Behaviour and Regulates Microglia, Fractalkine Expression and Neurogenesis in Adult Mice Exposed to Chronic Mild Stress. *Neuroscience.* 1;440:316-336. doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.05.014.
- Verkhatsky, A., Ho, M. S., Zorec, R., & Parpura, V. (2019). The Concept of Neuroglia. *Advances in experimental medicine and biology*, 1175, 1–13. https://doi.org/10.1007/978-981-13-9913-8_1

- Walton NM, Sutter BM, Laywell ED, Levkoff LH, Kearns SM, Marshall GP, Scheffler B, Steindler DA. (2006). Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia* 54:815–825.
- Wang, W.-Y., Tan, M.-S., Yu, J.-T., & Tan, L. (2015). Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Annals of Translational Medicine*, 3(10). <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.03.49>
- Wang YL, Han QQ, Gong WQ, Pan DH, Wang LZ, Hu W, Yang M, Li B, Yu J, Liu Q. 2018. Microglial activation mediates chronic mild stress-induced depressive- and anxiety-like behavior in adult rats. *J Neuroinflammation*. 15(1):21. doi: 10.1186/s12974-018-1054-3.
- Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci.*;7(8):847-54. doi: 10.1038/nn1276.
- Webster MJ, Knable MB, O'Grady J, Orthmann J, Weickert CS. 2002. Regional specificity of brain glucocorticoid receptor mRNA alterations in subjects with schizophrenia and mood disorders *Mol Psychiatry* 7:985–994., 924
- Wikstrom AC. Glucocorticoid action and novel mechanisms of steroid resistance: role of glucocorticoid receptor-interacting proteins for glucocorticoid responsiveness. 2003. *J Endocrinol*. 178: 331-7.
- Willner, Paul. 2016. The Chronic Mild Stress (CMS) Model of Depression: History, Evaluation and Usage. *Neurobiology of Stress* 6. Elsevier Inc: 78–93. doi:10.1016/j.ynstr.2016.08.002.
- Willner, P, Muscat, R., y Papp, M. 1992. Chronic Mild Stress-Induced Anhedonia: A Realistic Animal Model of Depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. doi:10.1016/S0149-7634(05)80194-0.
- Wohleb E., Terwilliger R., Duman R., Duman S. 2018. Stress-Induced Neuronal Colony Stimulating Factor 1 Provokes Microglia-Mediated Neuronal Remodeling and Depressive-like Behavior. *Biological Psychiatry*, Volume 83 (38-49) <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.05.026>.
- World Health Organization. 1992. The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders. *International Classification 10*: 1–267. doi:10.1002/1520-6505(2000)9:5

Yasuda, M., Johnson-Venkatesh, E.M., Zhang, H., Parent, J.M., Sutton, M.A., and Umemori, H. (2011). Multiple forms of activity-dependent competition refine hippocampal circuits in vivo. *Neuron* 70, 1128-1142.

Zhao, C., Teng, E.M., Summers, R.G., Ming, G.L., and Gage, F.H. 2006. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 26, 3-11.

Zhao, L., Huicong, R., Shina, G., Xiaodan, L., Cuihong, J., Li, J., Zhang, M. 2018. RTMS Ameliorated Depressive-like Behaviors by Restoring HPA Axis Balance and Prohibiting Hippocampal Neuron Apoptosis in a Rat Model of Depression. *Psychiatry Research* 269. B.V.: 126–33. doi:10.1016/j.psychres.2018.08.017.

X. ANEXO

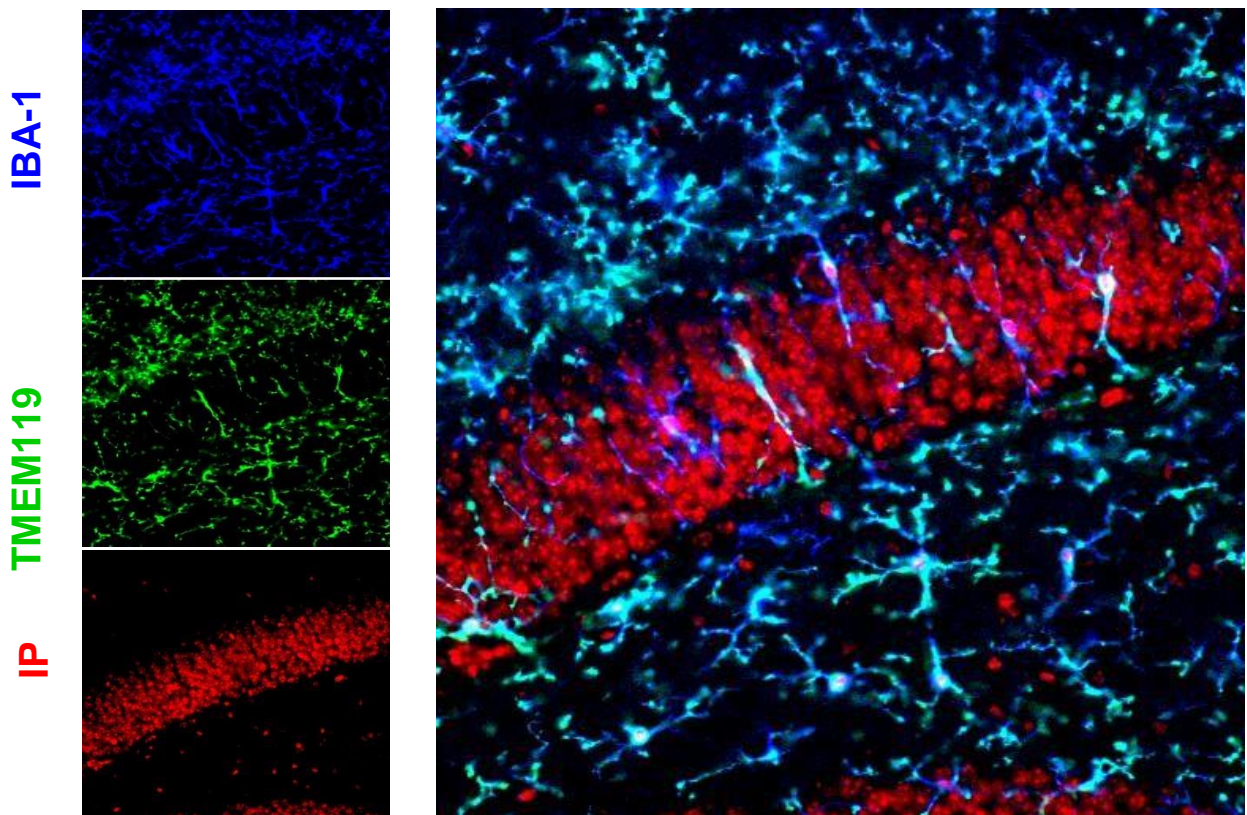


Figura suplementaria S1. Persistencia de los efectos de la estimulación magnética transcraneal a 5 Hz en la densidad de células IBA-1⁺/TMEM119⁺ en la capa de células granulares del giro dentado ocasionada por la exposición a estrés crónico. A) Se muestran microfotografías representativas de células microgliales en el hipocampo de ratones expuestos a estrés crónico, y estimulación magnética transcraneal a 5 Hz con sesiones de mantenimiento con EMTr 5 Hz (EMTr CM). Barra de escala = 100 μ m.

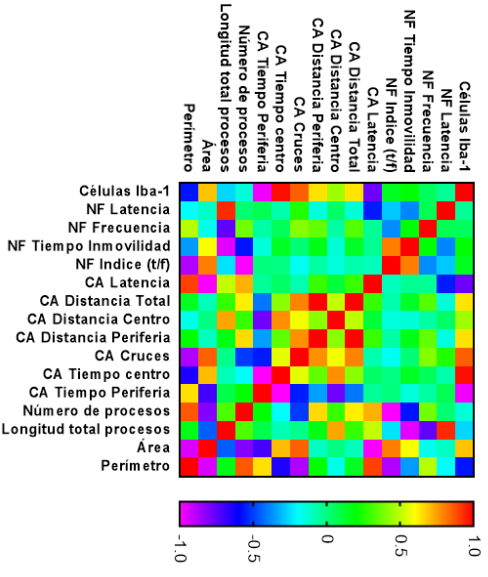
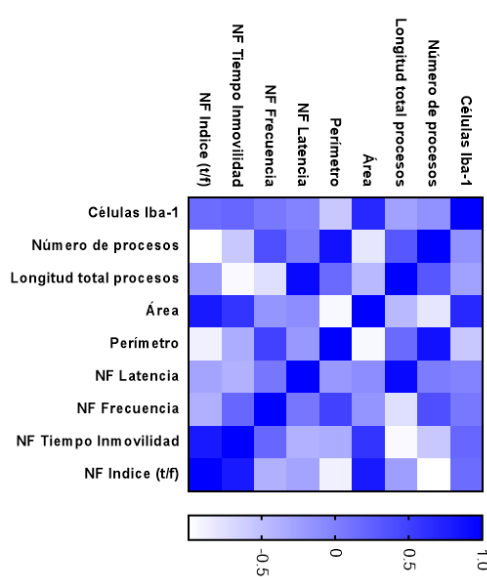
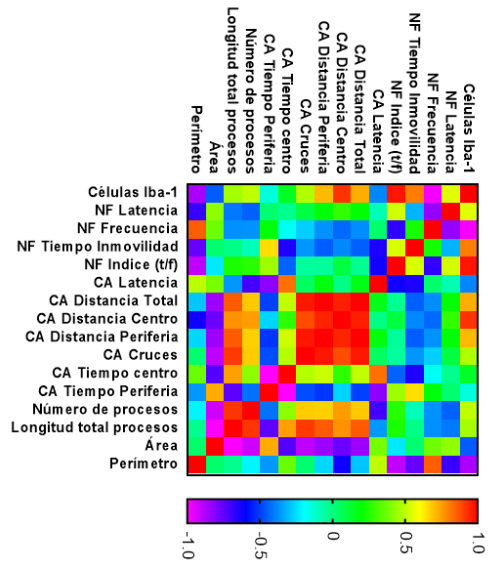
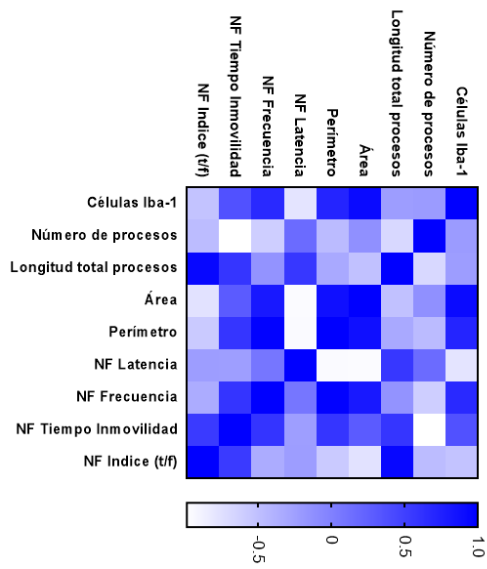
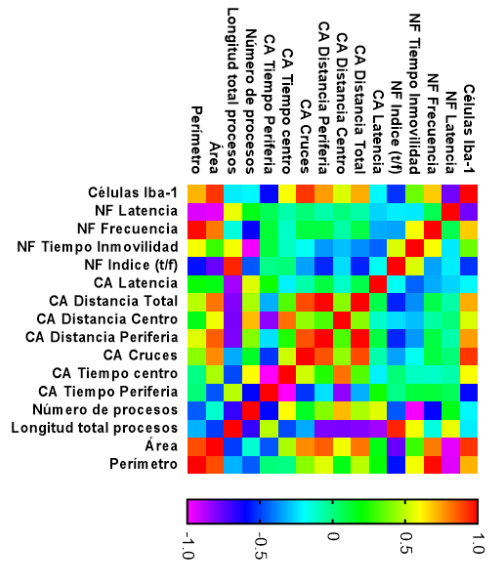
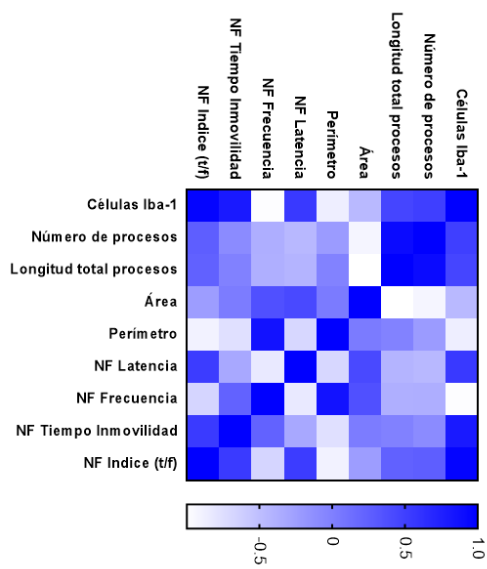


Figura suplementaria S2. Correlaciones entre variables de conducta y densidad microglial. A) Control, B) Sham y C) EMT 5 Hz.

A) Publicaciones





Physiology & Behavior

Volume 254, 1 October 2022, 113878





Brief communication

Environmental enrichment: dissociated effects between physical activity and changing environmental complexity on anxiety and neurogenesis in adult male Balb/C mice.

Gerardo Bernabé Ramírez-Rodríguez^a  , Beatriz Gutiérrez-Vera^a,
Leonardo Ortiz-López^a, Nelly Maritza Vega-Rivera^b, David Meneses-San Juan^a,
Andrea Granados-Juárez^a, Dana Vianey Castro-de Aquino^a, Mario Castro-García^c,
Mónica Flores Ramos^d

Show more 

+ Add to Mendeley  Share  Cite

<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2022.113878> ↗

[Get rights and content](#) ↗



Se otorga la presente

CONSTANCIA a:

Dana Vianey Castro de Aquino

Por su asistencia y presentación del trabajo titulado:

The persistence of antidepressant-like effects of rTMS at 5Hz is associated with microglial modifications in the hippocampal neurogenic niche in rodents exposed to unpredictable chronic mild stress

Por:

Dana Vianey Castro de Aquino, Eunice Raziel Rocha Martínez, David Meneses San Juan,
Andrea Granados Juárez, Gerardo Bernabé Ramírez Rodríguez

En la modalidad de cartel en el IV Congreso de Neurobiología
de la Sociedad Mexicana de Bioquímica
del 3 al 7 de abril de 2022, en la ciudad de Oaxaca, Oax.

Atentamente

Por el Comité Organizador

Dra. Leonor Pérez Martínez

Dr. Iván Velasco





SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA
RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ

**EL INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA
RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ
OTORGA LA PRESENTE**

CONSTANCIA

A

Castro de Aquino Dana Vianey, Rocha Martínez Eunice Raziel, Meneses San Juan David, Ramírez Rodríguez Gerardo Bernabé

POR HABER PARTICIPADO EN EL 20° CONCURSO DE CARTELES
CATEGORÍA **ESTUDIANTES** DE LA **SUBDIRECCIÓN DE INVESTIGACIONES
CLÍNICAS** CON EL TRABAJO:

La persistencia de los efectos tipo antidepressivo de la EMTr a 5Hz se acompañan de modificaciones en la microglía en el nicho neurogénico del hipocampo

EN EL MARCO DE LA **XXXVI REUNIÓN ANUAL DE INVESTIGACIÓN**
QUE SE LLEVÓ A CABO LOS DÍAS 29 Y 30 DE SEPTIEMBRE
Y 1° DE OCTUBRE DE 2021

DRA. MÓNICA FLORES RAMOS
DIRECTORA DE ENSEÑANZA



CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE 2021

NNB_ZkhaD`

C) Premios/ Distinciones





SALUD
SECRETARÍA DE SALUD


INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA
RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ

EL INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA
RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ
OTORGA LA PRESENTE

CONSTANCIA

A

**CASTRO DE AQUINO DANA VIANEY,
ROCHA MARTÍNEZ EUNICE RAZIEL,
MENESES SAN JUAN DAVID,
RAMÍREZ RODRÍGUEZ GERARDO BERNABÉ**

POR HABER OBTENIDO **MENCIÓN HONORÍFICA** EN EL 21° CONCURSO DE CARTELES
CATEGORÍA **ESTUDIANTES DE LA SUBDIRECCIÓN DE INVESTIGACIONES
CLÍNICAS CON EL TRABAJO:**

**LA PERSISTENCIA DE LOS EFECTOS ANTIDEPRESIVOS DE LA
EMTR A 5 HZ SE ASOCIA A MODIFICACIONES MICROGLIALES EN
EL NICHU NEUROGÉNICO DEL HIPOCAMPO EN ROEDORES
EXPUESTOS A ESTRÉS CRÓNICO IMPREDECIBLE**

EN EL MARCO DE LA **XXXVII REUNIÓN ANUAL DE INVESTIGACIÓN
QUE SE LLEVÓ A CABO DEL 5 AL 7 DE OCTUBRE DE 2022**

DR. EDUARDO Á. MADRIGAL DE LEÓN
DIRECTOR GENERAL DEL INPRFM

CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE 2022

