



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Efecto del ambiente enriquecido, posterior a la separación materna, sobre la morfología microglial y concentración de corticosterona, en ratas Wistar adolescentes

Leidy Johanna Ceballos Ordoñez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Instituto de Genética
Bogotá, Colombia

2023

Efecto del ambiente enriquecido, posterior a la separación materna, sobre la morfología microglial y concentración de corticosterona, en ratas Wistar adolescentes

Leidy Johanna Ceballos Ordoñez

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Neurociencias

Director (a)

Ph.D., Zulma Dueñas

Línea de Investigación:

Efectos neurales y comportamentales del estrés

Grupo de investigación:

Neurobiología y comportamiento

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Instituto de Genética
Bogotá, Colombia

2023

A mi papá. mamá y mis hermanas

Es preciso que soporte dos o tres orugas si quiero conocer a las mariposas.

El Principito

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Leidy Johanna Ceballos Ordoñez

Nombre

Fecha 29/06/2023

Agradecimientos

Esta tesis se realizó gracias al apoyo financiero brindado por la Convocatoria para el apoyo a proyectos de investigación y creación artística de la sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia – 2019, de la Vicerrectoría de Investigaciones.

También agradezco al Instituto de Genética, al Departamento de Ciencias Fisiológicas y al laboratorio de Neurofisiología que me brindaron los espacios para desarrollar esta tesis.

Por último y no menos (más) importante, agradezco a las raticas de este estudio (su vida valió la pena), a los y las integrantes del Club de revista con quienes construimos un espacio de discusión académico y de vida muy cálido; a Steeven Florez, Karen Daniela Arciniegas y Joanle Mora quienes fueron un apoyo muy importante en el desarrollo de esta tesis; a mi amiga y compañera de laboratorio Marisol Murillo, quien fue mi memoria y motivación para no tener miedo a lo desconocido. Gracias a mis amigas Kelly Sepúlveda, Laura Dueñas, Jennifer Garzón y Erika Sandoval por escucharme y motivarme a seguir. A la profesora Marisol Lamprea y su laboratorio de Neurociencias LACA por permitirme trabajar en sus instalaciones y a su equipo de estudiantes, principalmente Hans Ballesteros quien me tendió la mano cuando tenía inquietudes. Muchas gracias a mi profesora, tutora y madrina académica Zulma Dueñas, quien con su confianza, apoyo, exigencia, comprensión y amistad me enseñó a manejar y disfrutar el estrés, enriqueciendo mi vida.

Agradecimiento total a mi compañero de vida Christian Reynel quien con su apoyo, espacio y tazas de café logro que terminará esta tesis. Y a mi papá, mi mamá y mis hermanas quienes me inspiraron a trabajar con un modelo de ambiente enriquecido...porque ellos son mi modelo.

Resumen

Introducción: En roedores como en humanos la separación materna durante la lactancia (SMDL) incide en el neurodesarrollo al ser un factor estresor, afectando el metabolismo, comportamiento y aprendizaje. Por otro lado, la exposición a un ambiente enriquecido (AE) activa el sistema nervioso central proporcionando estímulos físicos, sociales y sensoriales que conllevarían a una reducción del estrés y adaptación de respuestas neurobiológicas.

Objetivo: Analizar el efecto de 15 días de ambiente enriquecido, posterior a la separación materna durante la lactancia, sobre la cantidad y morfología de la microglía y la concentración de corticosterona, en ratas Wistar machos y hembras durante la adolescencia temprana.

Metodología: Se utilizaron 78 crías de ratas Wistar divididas en dos grupos, con y sin SMDL. El día 22 fueron separadas por sexo y tratamiento, y ubicadas en un AE o estándar por 15 días. Los animales se anestesiaron y perfundieron el día 37, se tomó muestra sérica para medir corticosterona y se extrajo el tejido cerebral.

Resultados: el AE posterior a la SMDL no revirtió la disminución de los niveles de corticosterona de la SMDL y AE por sí solos, pero sí disminuyó el número de microglías por debajo de los números de la SMDL sola, incidiendo en la adaptación de una morfología ramificada.

Conclusión: La SMDL puede afectar el sistema neuroendocrino y neuroinflamatorio, mediados por la expresión de corticosterona y glucocorticoides. Aunque la exposición del AE posterior a la SMDL disminuyó el número de microglías y proporcionó una morfología ramificada, este paradigma funcionaría como un modelo de estrés que adapta el sistema garantizando un adecuado funcionamiento a estresores futuros.

Palabras clave: Separación materna, Ambiente enriquecido, Corticosterona, Ratas Wistar, Sistema de recompensa.

Abstract

Effect of the enriched environment, after maternal separation, on microglial morphology and corticosterone concentration, in adolescent Wistar rats

Introduction: In rodents as in humans, maternal separation during breastfeeding (MSDB) as a stressor factor affects neurodevelopment, including alteration in metabolism, behavior and learning. On the other hand, exposure to an enriched environment (EA) activates the central nervous system by providing physical, social and sensory stimuli that would lead to a reduction in stress and adaptation of neurobiological responses. **Objective:** To analyze the effect of 15 days of enriched environment, after maternal separation during breastfeeding, on the quantity and morphology of microglia and the concentration of corticosterone, in male and female Wistar rats during early adolescence. **Methodology:** 78 offspring of Wistar rats were divided into two groups, with and without SMDL, were used. On day 22 they were separated by sex and treatment and placed in an EA or standard for 15 days. The animals were anesthetized and perfused on day 37, a serum sample was taken to measure corticosterone, and brain tissue was removed. **Results:** the EA after the MSDB did not decrease in corticosterone levels of the baseline MSDB and EA, but it did decrease the number of microglia below the numbers of the MSDB, affecting the adaptation of a branched morphology. **Conclusion:** MSDB may affect the neuroendocrine and neuroinflammatory system, mediated by the expression of corticosterone and glucocorticoids. Although exposure of the EA after MSDB decreased the number of microglia and provided a branched morphology, this paradigm would work as a stress model that adapts the system, guaranteeing proper functioning to future stressors.

Keywords: Maternal separation, Enriched environment, Corticosterone, Wistar rats, Reward system.

Tabla de contenido

Resumen.....	6
Abstract.....	7
1.Marco teórico	12
1.1 Importancia de las Experiencias Tempranas	12
1.2 Estrés durante la vida temprana: Modelo Separación materna durante la lactancia (SMDL)13	
1.3 Efectos relacionados con el estrés en la vida temprana.....	14
1.3.1 Efectos sobre el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal - HHA.....	14
1.4. Ambiente enriquecido (AE) como técnica y modelo de estrés	20
1.5 Microglía	24
2. Interacción entre el modelo de separación materna y el ambiente enriquecido	30
2.Justificación	34
3.Formulación del problema.....	37
4.Objetivos.....	38
5.1 Objetivo general	38
5.2 Objetivos específicos.....	38
5.Método	39
6.1 Sujetos	39
6.2 Diseño experimental.....	40
6.3 Procedimientos	41
6.4 Consideraciones éticas.....	52
6.Resultados.....	53
7.1 Disminución de los niveles de corticosterona en plasma	53
7.2 Diferencias en el número de células positivas para Iba-1	54
7.3 Resultados morfología células positivas para Iba-1	70
8. Discusión	84
9. Conclusiones	91
10. Producción académica.....	93
ANEXOS.....	94
Anexo 1. Tabla resumen Análisis estadístico	94
Bibliografía	96

Listado de abreviaciones

DP: Día postnatal
SMDL: Separación Materna durante la lactancia
AE: Ambiente enriquecido
HHA: Eje hipotálamo-Hipofisiario-Adrenal
ACTH: Adrenocorticotropina
CRH: Corticotropina
SHRP: Periodo hiposensible al estrés
VTA: Área tegmental ventral
NAc: Núcleo accumbens
HIP: Hipocampo
GD: Giro dentado
CA1: subcampo hipocampo CA1
CA2: subcampo hipocampo CA2
CA3: subcampo hipocampo CA3
CPF: Corteza prefrontal
IL: Infralímbica
PrL Prelímbica
Cg: Cingulada
A: Amígdala
BLA: Amígdala basolateral anterior
BLP: Amígdala basolateral posterior

Listado de gráficos

Gráfico 1. Diseño experimental y cronología de los grupos de trabajo.....	40
Gráfico 2. Protocolo separación materna durante la lactancia.....	42
Gráfico 3. Protocolo Ambiente Enriquecido.....	55
Gráfica 4. Coordenadas de Bregma de las áreas de estudio.....	49
Gráfico 5. Niveles de corticosterona.....	53
Gráfico 6. Expresión de células positivas para Iba 1 en VTA.....	56
Gráfico 7. Expresión de células positivas para Iba 1 en NAc.	58
Gráfico 8. Expresión de células positivas para Iba 1 en CA1.	59
Gráfico 9. Expresión de células positivas para Iba 1 en CA2.	61
Gráfico 10. Expresión de células positivas para Iba 1 en Hipocampo CA3.	62
Gráfico 11. Expresión de células positivas para Iba 1 en Hipocampo GD.....	63
Gráfico 12. Expresión de células positivas para Iba 1 en Hipocampo BLA.....	64
Gráfico 13. Expresión de células positivas para Iba 1 en Hipocampo BLP.....	65
Gráfico 14. Expresión de células positivas para Iba 1 en Hipocampo Cg.....	67
Gráfico 15. Expresión de células positivas para Iba 1 en Hipocampo IL.....	68
Gráfico 16. Expresión de células positivas para Iba 1 en Hipocampo PrL.....	69
Gráfico 17. Evaluación morfológica de la microglía en VTA.....	70
Gráfico 18. Evaluación morfológica de la microglía en NAc.....	71
Gráfico 19. Evaluación morfológica de la microglía en CA1.....	72
Gráfico 20. Evaluación morfológica de la microglía en CA2.....	73
Gráfico 21. Evaluación morfológica de la microglía en CA3.	74
Gráfico 22. Evaluación morfológica de la microglía en GD.....	75
Gráfico 23. Evaluación morfológica de la microglía en BLA.	76
Gráfico 24. Evaluación morfológica de la microglía en BLP.....	77
Gráfico 25. Evaluación morfológica de la microglía en Cg.....	78
Gráfico 26. Evaluación morfológica de la microglía en IL.....	79
Gráfico 27. Evaluación morfológica de la microglía en PrL.....	81

Listado de figuras

Figura 1A. Representación de los pasos para la liberación de corticosterona.....	15
Figura 1B. Efectos de la Separación materna sobre el eje HHA.....	15
Figura 2. Regiones límbicas y de recompensa en el cerebro de ratas.....	17
Figura 3. Jaula representativa del Ambiente enriquecido.	21
Figura 4. Funciones fisiológicas de la microglía durante el desarrollo y la edad adulta.....	26
Figura 5. Dibujos representativos de la microglía de los animales expuestos a la separación materna y/o al enriquecimiento ambiental.....	96

Listado de imágenes

Imagen 1. Modelo Separación materna durante la lactancia (SMDL).....	43
Imagen 2. Modelo Ambiente enriquecido: Jaulas empleadas en el proyecto.....	45
Imagen 3. Imágenes representativas de la expresión de Iba 1 en VTA.....	51
Imagen 4. Imágenes representativas de la expresión de Iba 1 en NAc.....	54
Imagen 5. Imágenes representativas de la expresión de Iba 1 en HIP.....	59
Imagen 6. Imágenes representativas de la expresión de Iba 1 en la A.....	64
Imagen 7. Imágenes representativas de la expresión de Iba 1 en la CPF.....	66

Listado de tablas

Tabla 1. Protocolo Iba 1.....	47
Tabla 2. Resumen resultados.....	82

Listado Anexo

Anexo 1. Tabla resumen Análisis estadístico.....	92
Anexo 2. Aprobación Comité de ética Acta CB-FMVZ-UN-03519.....	93

1. Marco teórico

1.1 Importancia de las Experiencias Tempranas

Los primeros años de vida han sido reconocidos por la psicología del desarrollo y la neurociencia como fundamentales para el desarrollo del cerebro y la capacidad que éste tiene para aprender y moldearse en función de la estimulación ambiental que recibe y que ayuda a sentar las bases de la maduración física, emocional y cognitiva del individuo (27, 28).

En los seres humanos, el bebé al nacer establece una relación diádica con su madre, que le permite a ambos desarrollar un vínculo empático (29), necesario para perfeccionar la habilidad de reconocer las señales (auditivas, visuales, olfativas) del otro e identificar las necesidades subyacentes para satisfacerlas (30, 31). Esta sincronía de respuestas que se da en un periodo crítico entre los 3 a los 9 meses de edad aproximadamente, gesta en el bebé la capacidad de autorregular sus emociones (32) y a medida que esto ocurre, se van formando las bases para el establecimiento de un vínculo seguro que le otorgarán sentimientos de protección y seguridad (31), a partir de los cuales, podrá ampliar sus capacidades afectivas y cognitivas a medida que va creciendo (27, 33).

En el caso de los roedores, el cuidado materno consiste en una compleja exhibición de comportamientos predecibles y coordinados que se dan como preparación para la llegada de la camada, así como para su cuidado y protección (34). La madre posterior al nacimiento de sus crías inhibe las respuestas aversivas que normalmente muestran hacia los olores de las crías recién nacidas (conducta de aceptación), para posteriormente desplegar unas conductas de proximidad, protección y cuidado hacia sus crías, facilitadas gracias a la motivación materna.

Teniendo en cuenta la información anterior, se ha demostrado que si este vínculo madre/cuidador-hijo durante los primeros años es amenazado por alguna situación adversa,

el desarrollo del individuo en esta etapa podría verse vulnerado y afectado en sus diferentes componentes comportamental, emocional o neurobiológico.

1.2 Estrés durante la vida temprana: Modelo Separación materna durante la lactancia (SMDL)

Las primeras teorías psicoanalíticas y las privaciones sociales y familiares de las poblaciones civiles durante la Segunda Guerra Mundial, especialmente la de los niños que fueron posteriormente institucionalizados, despertaron el interés por estudiar la importancia del cuidado materno sobre el desarrollo de las personas (35) e inspiraron los primeros estudios en animales en el año 1950 a cargo de Harry Harlow (36) y Seymour Levine (37), interesados en identificar los efectos de los factores adversos tempranos sobre el desarrollo, siendo la separación materna durante la lactancia en roedores uno de los paradigmas más empleados para modelar el estrés en humanos durante esta etapa.

La SMDL modela la ruptura entre el vínculo materno-filial durante los primeros años de vida en los humanos por diferentes factores como la negligencia, el abuso o el maltrato, afectando diferentes mecanismos biocomportamentales como los sistemas neurohormonales y circuitos cerebrales, que soportan estos comportamientos (32).

Estudios iniciales en humanos que fueron separados de sus madres e institucionalizados y criados en orfanatos, mostraron que estas situaciones afectan el rendimiento cognitivo, motor e intelectual, e inducen conductas de retraimiento, poca curiosidad y alegría frente al juego (38). Posteriormente, los estudios realizados con monos Rhesus, demostraron que el aislamiento social durante el primer año de vida induce alteraciones para controlar impulsos agresivos y antisociales (40), ausencia de conductas de juego y sexuales, dificultad para expresar la agresión, así como, altos niveles de miedo ante la presencia de adultos, pares e incluso monos pequeños. Sin embargo, la exposición a un periodo de adaptación a la vida social revirtió dichas conductas (41).

En modelos con roedores, la SM también tiene diversos efectos en el sistema nervioso y el periodo de la separación como el tiempo de exposición puede variar estos efectos. Una SM de 3 horas diarias durante los días postnatales (DP) 4 al 14 (periodo de hiposensibilidad al estrés) aumentó la susceptibilidad de ratas Wistar machos a experimentar conductas similares a la ansiedad y a evocar comportamientos similares al pánico (3), pero cuando esta separación se acompañó de una conducta indiferente por parte de la madre hacia sus crías, se alteró la capacidad de responder al estrés durante toda la vida. Por el contrario, el mismo tiempo de exposición, pero durante el periodo de lactancia (DP1 al 21) machos como hembras no evocaron comportamientos similares de pánico (3), pero sí una mayor capacidad de afrontamiento activa (26), en hembras se disminuyó la reacción al estrés y en los machos hubo una mejor evaluación del riesgo (28). La SM de 4.5 horas diarias, indujo en ratas Wistar machos conductas de habituación inapropiadas ante la novedad (2) y una exposición más prolongada (6 horas) indujo comportamientos similares a la ansiedad (42, 30).

A continuación, se presentan otros efectos que se han relacionado con el estrés en la vida temprana.

1.3 Efectos relacionados con el estrés en la vida temprana

1.3.1 Efectos sobre el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal - HHA

En respuesta a un factor estresante agudo, el cerebro inicia una respuesta adaptativa fisiológica para la lucha o huida (alostasis) activando el sistema nervioso simpático y el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) que se convierte en un importante mecanismo regulador de la fisiología diurna y de las respuestas al estrés. Este inicia su activación en el hipotálamo que induce la expresión de la hormona liberadora de corticotropina (CRH, Corticotropine Release Hormone, por sus siglas en inglés) y la vasopresina hacia la glándula pituitaria; estas hormonas activan la hipófisis que produce y libera la hormona adrenocorticotrópica (ACTH por sus siglas en inglés) por el torrente sanguíneo hacia las glándulas suprarrenales, que inducen la síntesis y secreción de mineralocorticosteroides y

glucocorticoesteroides (cortisol en seres humanos y corticosterona en roedores). Este último denominado la hormona del estrés y su aumento activa receptores en el hipotálamo y la hipófisis para inhibir la producción de CRH y ACTH generando así una respuesta de retroalimentación negativa permitiendo al organismo volver a su estado basal una vez hay ausencia de la amenaza (88, 93).

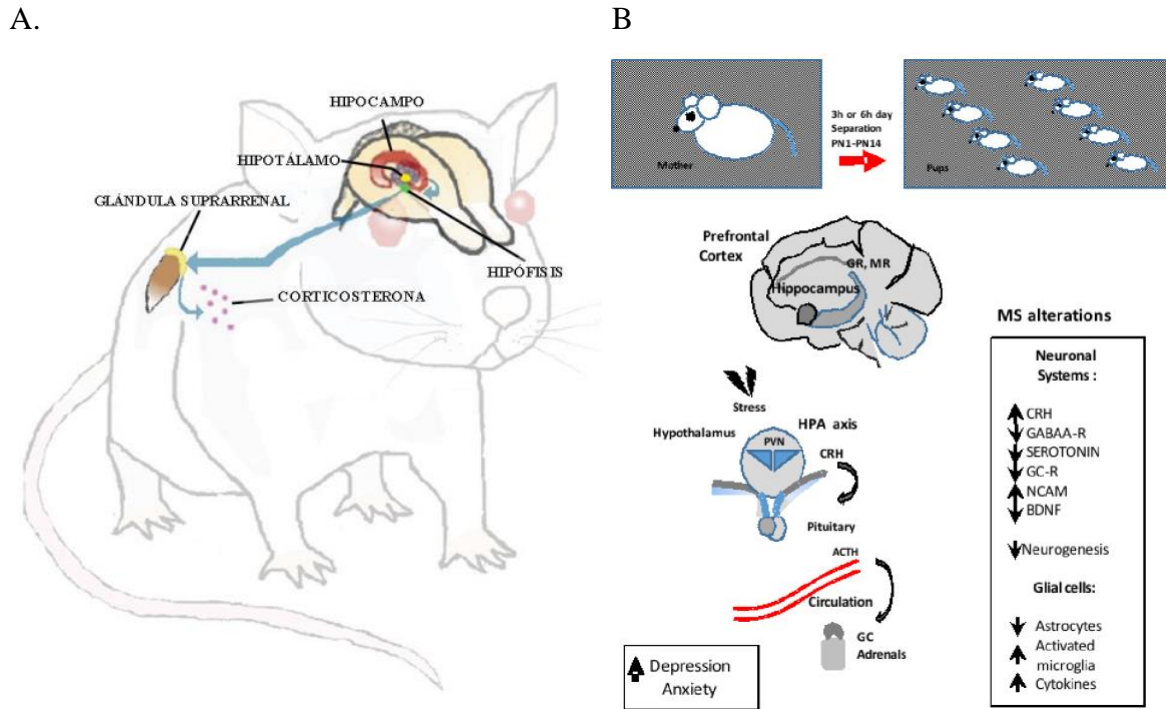


Figura 1A. Representación de los pasos para la liberación de corticosterona. Tomado de: Diseñado y realizado por L. A. León (2013) Obtenido de: Zárata, S., Cárdenas F., Triana, C., Bolaños, M., & León, L. (2014). **1B. Efectos de la Separación materna sobre el eje HHA.** Tomado de Efectos del estrés sobre los procesos de plasticidad y neurogénesis: una revisión. Univ. Psychol. 13 (3), 1-34. B. Zulma, D., CaicedoMera, J & Torner, L. (2017). Global Effects of Early Life Stress on Neurons and Glial Cells. Current Pharmaceutical Design, 23, 1-8.

La concentración de corticosterona en roedores es alta durante los últimos días de gestación e inmediatamente después del nacimiento y a partir del DP4 al 14 los niveles basales de corticosterona se vuelven mínima o casi inexistente y hay una disminución de la sensibilidad suprarrenal lo que resulta en bajos niveles de glucocorticoides circulantes, a esta se le denomina periodo de hiposensibilidad al estrés (SHRP, por sus siglas en inglés).

Sin embargo, ante una exposición repetida a factores estresantes se puede presentar una sobrecarga de la respuesta al estrés en la que la liberación de los mediadores como los

glucocorticoides y citoquinas pueden afectar el desarrollo y el adecuado funcionamiento de sistemas nervioso, neuroendocrino, inmunológico, entre otros (94).

Ahora bien, la respuesta del eje HHA puede alterarse por diferentes situaciones:

Ante un estrés leve se puede generar una respuesta adrenocortical en la que los niveles de corticotropina y corticosterona disminuyen, gracias a una condición de retroalimentación negativa (28) sin embargo, esta alteración como se mencionó anteriormente duraría hasta que la amenaza desaparece. Igualmente, se ha encontrado que ciertos comportamientos maternos de las ratas como lamer y acicalar a las crías, disminuyen la respuesta del eje HHA sobre el estrés alterando los niveles de las hormonas implicadas en este eje mencionadas anteriormente (CRH, ACTH, Corticosterona) (25). La ejecución de actividades relacionadas con la recompensa durante el estrés, activan la región mesoestriatal y se considera que esta tiene una contribución esencial en la regulación a la baja de la reacción exagerada del cortisol (111, 120), posiblemente porque modula la excitabilidad de la dopamina (121), actuando como un mecanismo de adaptación de retroalimentación para evitar respuestas exageradas y más bien, actuar de forma activa ante eventos estresantes (122).

En cuanto al impacto del sexo sobre la respuesta del eje HHA, se ha encontrado una diferencia basal entre el sexo en roedores jóvenes, siendo los machos los que presentan mayores niveles de esta hormona en comparación con las hembras, posiblemente porque estas son menos reactivas a la ansiedad por separación, sin embargo, no hay claridad sobre cuáles son los niveles basales durante la juventud, posiblemente porque las hormonas en esta etapa los enmascaran, por eso, estos datos deben leerse directamente con los grupos de cada estudio (28).

1.3.2 Efectos sobre las áreas relacionadas con el sistema de recompensa

El estrés crónico puede tener un gran impacto en las áreas relacionadas con el sistema de recompensa. Durante los primeros años de vida, en la relación diádica entre cuidador-hijo, se establecen una serie de señales entre ambos que permiten predecir y satisfacer sus necesidades, se gesta un aprendizaje adaptativo que le permitirá al individuo en desarrollo

crear estrategias de afrontamiento en la medida en que aprende a procesar información relacionada con la recompensa y a establecer asociaciones y relaciones entre estímulos. Sin embargo, cuando se presentan eventos estresantes crónicos se pueden inducir algunas alteraciones en este sistema: el proceso de aprendizaje se interrumpe o perturba, afectando la respuesta a los estímulos gratificantes, la capacidad de aprender y anticipar futuras recompensas (95,96). Se puede generar una sensibilidad del sistema de recompensa induciendo la pérdida del placer y de la motivación, que en adultos son síntomas característicos de la depresión (123).

Dentro de las áreas relacionadas con el sistema de recompensa se destacan el área tegmental ventral (VTA por sus siglas en inglés) que se comunica con el núcleo accumbens (NAc), la corteza prefrontal (CPF), el hipocampo (HIP) y la amígdala (A) (97).

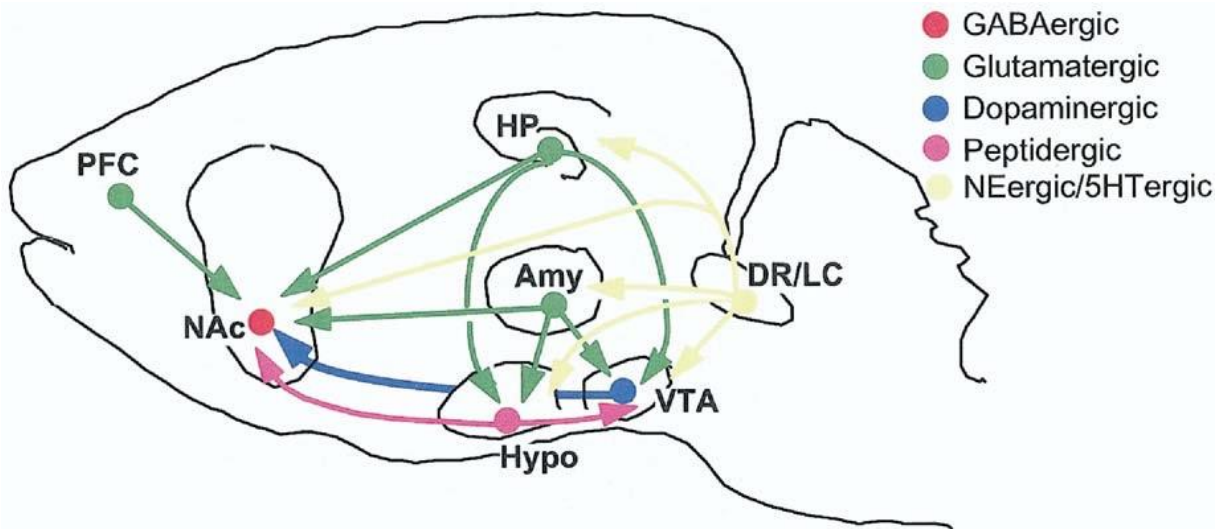


Figura 2. Regiones límbicas y de recompensa en el cerebro de ratas. Resumen muy simplificado de una serie de circuitos neuronales en el cerebro que se cree que contribuyen a la regulación del estado de ánimo. Hipocampo (HP) y la corteza cerebral (PFC), núcleo accumbens (NAc), la amígdala (Amy) y el hipotálamo (Hypo). La figura muestra solo un subconjunto de las muchas interconexiones conocidas entre estas diversas regiones del cerebro, la inervación de varias de estas regiones cerebrales por neuronas monoaminérgicas. El área tegmental ventral (VTA) proporciona información dopaminérgica a la NAc; las entradas a la mayoría de las otras áreas del cerebro no se muestran en la figura. La norepinefrina (NE, del locus coeruleus o LC) y la serotonina (5HT del rafe dorsal y otros núcleos del rafe) inervan todas las regiones que se muestran en la figura. Además, las fuertes conexiones entre el hipotálamo y la vía VTA-NAc. GABA, ácido gamma-aminobutírico; DR, rafe dorsal. **Tomado** de Nestler, E. J., & Carlezon, W. A. (2006). The Mesolimbic Dopamine Reward Circuit in Depression. *Biological Psychiatry*, 59(12), 1151–1159. doi:10.1016/j.biopsych.2005.09.

El área VTA se caracteriza por estar involucrada en el refuerzo positivo y negativo relacionado con la recompensa, la prominencia de incentivos, la cognición relacionada con

la aversión y la toma de decisiones. El 65% de sus neuronas son dopaminérgicas, 30-35% son gabaérgicas y un porcentaje pequeño del 2-3% son glutamatérgicas (98).

El NAc está ubicado en el área ventral del estriado, se compone principalmente de un 90% de neuronas espinosas gabaérgicas y recibe proyecciones dopaminérgicas del VTA y también entradas glutamatérgicas del HIP, la CPF (específicamente la corteza prelámbica-PrL e infralámbica-IL), de la Amígdala basolateral (BLA por sus siglas en inglés) y del tálamo (97, 99). Se ha sugerido que el NAc está involucrado en el aprendizaje y la selección de acciones durante el comportamiento dirigido a objetivos, así como, en las respuestas emocionales/motivacionales relacionadas con el valor (100,101).

La Amígdala (A) tiene un gran número de conexiones corticales y subcorticales que maduran hasta la adolescencia (102) y con la edad se eliminan o refinan con la maduración afectiva y social. Esta se compone de 4 núcleos que están implicados en procesos emocionales y de aprendizaje específicos, así como, en la inferencia social y la memoria contextual (103). La BLA es necesaria para integrar el refuerzo y la información de recompensa ayudando a señalar la magnitud de la recompensa y calcular el valor potencial de las acciones (104).

El HIP es una estructura límbica que tiene conexiones importantes que está involucrada en la formación y almacenamiento de la memoria (105). Este puede combinar la memoria, la recompensa e información espacial en la subregión CA3 para almacenar recuerdos episódicos (106).

La región anterior del giro del cíngulo (ACC por sus siglas en inglés) recibe información de la corteza orbitofrontal sobre los resultados de la recompensa e información espacial relacionada con la acción de las áreas corticales parietales, lo que le permite aprender de los resultados de las acciones realizadas. También, está implicada en la emoción, al vincular la información de recompensa y castigo que provoca respuestas emocionales, en el comportamiento y en particular, en las acciones (106).

Los eventos estresantes crónicos de acuerdo con algunos estudios en modelos animales pueden inducir una gran sensibilidad en las áreas relacionadas con el sistema de recompensa. En investigaciones con niños institucionalizados o que tienen factores de riesgo socioeconómicos se ha evidenciado un mayor volumen de la A (108), pero en niños que han sido maltratados se ha reducido el volumen de la CPF, la A y el HIP en comparación con los no maltratados (109). En niños de aproximadamente 10 años que habían sido expuestos a diferentes tipos de estrés durante la edad temprana como abuso, negligencia y bajo estatus socioeconómico durante la infancia, presentaron volúmenes pequeños de la A e HIP (122). En ratas a nivel morfológico, este tipo de estrés se ha relacionado con la contracción dendrítica en el HIP; la actividad inhibida en la hipófisis, el hipotálamo, el HIP, la A y la reducción de la proliferación celular en las estructuras subcorticales (109).

Respecto a los efectos que puede generar el eje HHA sobre las áreas relacionadas con el sistema de recompensa, primero se debe tener en cuenta que en este sistema se expresan los receptores de glucocorticoides (RG) y mineralocorticoides (RM) haciendo a este altamente sensible a la exposición continua al estrés, el cual con su consecuente sobreproducción de glucocorticoides circulantes en el sistema (107) provocarían una retroalimentación negativa a la baja en áreas de proyección de neuronas dopaminérgicas como la CPF, A e HIP (107, 111). Estudios en humanos han evidenciado que la inducción del estrés y la administración de cortisol disminuyen la actividad de la A específicamente en BLA, el NAc y la CPF en situaciones de gratificación y no gratificación y pueden disminuir la motivación afectando la preferencia por la recompensa (130). Así mismo, se ha encontrado que el estrés en la vida temprana puede inducir una hiperconectividad entre las redes estriatales-límbicas y límbicas-corticales (hipocampo con la corteza PrL, IL y el NAc (124) e hipoconectividad entre las redes estriatales y prefrontales, así como, entre las redes de la corteza prefrontal medial y la corteza dorsolateral (encargadas de activar el autocontrol). También se ha evidenciado la activación de la amígdala la cual estaría incidiendo positivamente en el comportamiento en la medida en que permitiría procesar adecuadamente las emociones (125).

Estos efectos a los que se enfrenta el sistema de recompensa y que lo hacen vulnerable, podrían ser el resultado, por un lado, de una plasticidad adaptativa para responder a los estímulos externos a los que se seguirá enfrentado el sujeto durante sus primeros años de vida y por otra parte una respuesta adaptativa que acelera el patrón de maduración normal de la conectividad de algunas de las áreas relacionadas con la recompensa (110).

1.4. Ambiente enriquecido (AE) como técnica y modelo de estrés

En contraste con los efectos del estrés temprano por SMDL, se ha encontrado que las condiciones de alojamiento específicas como las proporcionadas por el AE pueden ejercer un papel neuroprotector.

En efecto, es importante mencionar que aun cuando a partir del siglo XVIII se empezó a reconocer que los estímulos ambientales tenían un papel sustancial sobre la estructura cerebral (Charles Darwin, 1874) y que actividades como el ejercicio podrían favorecer el establecimiento de nuevas conexiones interneuronales y aumentarlas (Ramón y Cajal, 1911), fue sólo hasta después de la segunda guerra mundial que se propuso que el desarrollo psicológico y cerebral dependían de la estimulación del medio ambiente, principalmente de aquel que se presentaba durante la infancia, ya que en esta etapa se generaban cambios determinantes para afrontar experiencias posteriores (43, 44, 45).

El ambiente enriquecido es reconocido como una técnica de manejo de animales en tanto utiliza estrategias que ofrecen estímulos físicos (objetos que varían en forma y número), sociales (alojamiento en grupos) (46, 15) y sensoriales (variedad de materiales), que mejoran la adaptación fisiológica y psicológica durante unas condiciones experimentales (46, 47) y facilitan actividades exploratorias y cognitivas (48, 49). Por otra parte, es considerado como un modelo de estrés dado que en ratas se han encontrado efectos a nivel comportamental al mostrar una menor reactividad a nuevos estímulos, la exposición inicial a objetos nuevos y desconocidos (2, 50) incide en el aumento de los niveles de corticosterona (2,126) y la aparición de comportamientos similares a la ansiedad como consumo de sacarosa, aumento en la deposición, en la latencia de eyaculación, entre otros (45, 126).

veces semanales) o irregular (cambio no especificado), el área de la jaula varía desde los 20,000cm³ a 1161 cm³, el número de ratas por jaula varía de 2 a 12 (9).

Por lo anterior, las investigaciones que abordan los efectos del ambiente enriquecido han producido tantas especificidades que es difícil generalizar, por eso, se presentan algunas de ellas a continuación.

1.4.1 Efectos del ambiente enriquecido

Unos de los primeros cambios que se evidenciaron tras la exposición de las ratas al AE fue el incremento de peso y de volumen cortical de hasta un 5% en la corteza visual, somatosensorial y frontal posterior, así como de un 6,2% de incremento en el grosor de la corteza occipital (53) y en el volumen del hipocampo (54) También, se evidenciaron cambios en la citoarquitectura neuronal relacionado con la expansión del citoplasma en rata (55). Igualmente, se ha encontrado que la morfología de la sinapsis puede cambiar, de forma que el espacio sináptico es de mayor tamaño en ratas enriquecidas, incrementando el área total de contacto sináptico y de la hendidura sináptica, fundamentalmente en la corteza occipital (56). Así como, la actividad de la sinapsis específicamente de las neuronas piramidales, a través del aumento en la ramificación dendrítica (57; 58), en el número de espinas dendríticas (59) en la densidad (60) y en la longitud dendrítica de la capa II de la corteza cerebral, de las células estrelladas de la capa IV y de las células de Purkinje del cerebelo (56).

Estas modificaciones neuromorfológicas se pueden comprender mejor teniendo en cuenta los resultados que muestran la influencia del AE sobre los parámetros neuroquímicos.

El AE incrementó los niveles totales de ARN en la corteza de ratas enriquecidas respecto a las aisladas y como la función del ARN es básicamente la fabricación de proteínas, este incremento que se presenta podría ser indicativo de una mayor actividad celular en los sujetos enriquecidos (61). También, aumentó la expresión de un gran número de genes,

muchos de los cuales están relacionados con la estructura, la plasticidad y la transmisión neuronal (62).

En cuanto a los efectos epigenéticos transgeneracionales, no todos se transmiten a través de la línea germinal, pero si se transmiten a la descendencia directamente de la madre durante la primera semana de vida posnatal (63). Se ha demostrado que las modificaciones tempranas del cuidado materno inducidas por el AE materno pre-reproductor, persisten durante los primeros 10 días de lactancia. Se considera que los mecanismos de herencia involucrados en la transmisión de la influencia ambiental de las madres a la descendencia, está mediada por modificaciones epigenéticas que implican la metilación del ADN y los cambios posteriores en la expresión de genes específicos (50). También, se ha encontrado que el AE puede influir en los parámetros fisiológicos de la descendencia a lo largo de dos generaciones. La progenie F2 femenina de abuelos expuestos a AE, responden al estrés con niveles elevados de corticosterona, mientras que los machos los reducen. Por otra parte, el AE paterno puede incidir sobre el peso corporal adulto de la descendencia F1 y F2 (64).

Aunque se ha planteado el AE como un agente estresante leve, los efectos que tiene sobre el estrés lo proponen también como un agente protector a nivel neurocomportamental y neurobiológico. El AE simple (alternancia semanal de objeto) y mejorado (traspaso a jaula más grande en la semana 5) disminuyen la ansiedad en ratas Wistar machos y este último también evita los niveles de dolor neuropático (65). Los tiempos de exposición al AE son un factor que incide en la neuroprotección, por ejemplo, una exposición de 8 días en ratas Wistar machos disminuyó la inmunorreactividad de la proteína Delta-FosB en las regiones cerebrales asociadas con la modulación de las respuestas de ansiedad (46). Una exposición de 21 días, en ratones C57BL/6 machos, aumentó la proteína Delta-FosB en las regiones relacionadas con la modulación de la derrota social (66). Así mismo, 14 días de exposición posterior al estrés agudo por restricción, previno conductas similares a la ansiedad en ratas Wistar machos y los mecanismos subyacentes que podrían estar relacionados serían la disminución aguda y sostenida de la actividad de ERK-1/2 y CREB (15). A pesar de estos hallazgos, no hay claridad sobre cuáles son los mecanismos por los cuales el AE ejerce su papel protector en el estrés y la ansiedad.

Respecto al papel que tiene el AE sobre el HHA, este aumenta los niveles séricos de corticosterona y la translocación nuclear de glucocorticoides en el área de la amígdala basolateral involucrada en el comportamiento similar a la ansiedad (15). Cuando el AE es eliminado (modelo de pérdida), se ha evidenciado que se produce conductas características de la depresión atípica, aumentando los niveles de corticosterona, disminuyendo la respuesta máxima de glucocorticoides y aumentando la ingesta de alimentos y el peso corporal en ratas (67).

Por último, es importante mencionar que aun cuando se han desarrollado diversos estudios sobre el efecto del ambiente enriquecido, los componentes de este modelo en roedores suelen variar en términos del tamaño del entorno, la estimulación utilizada, el tiempo de exposición, paradigmas a abordar, entre otras variables (52), en consecuencia, a la fecha no existe una estandarización del protocolo del AE respecto al procedimiento y la metodología para modelos animales (51).

1.5 Microglía

Se ha propuesto que un elemento importante que propicia las alteraciones inducidas por el estrés crónico es la neuroinflamación, en particular aquella causada por la actividad microglial elevada (10). La microglía son células primarias mieloides que proporcionan la forma principal de respuesta inmune adaptativa en el sistema nervioso central (10), cuyo origen en roedores se deriva de los progenitores eritromieloides que migran al cerebro a partir del día 8.5 embrionario (E8.5) y continúan hasta que se forma la barrera hematoencefálica (69); para posteriormente migrar y diseminarse por todo el SNC hasta hacer una transición morfológica a un estado ramificado (68).

A medida que el cerebro se desarrolla, la microglía debe realizar diferentes funciones para adaptarse a las necesidades que cambian temporalmente, procesar las señales relevantes del entorno y equilibrar su función, es por eso, que desde etapas tempranas la microglía sigue un programa de desarrollo gradual sincronizado con el desarrollo del cerebro que se da a

través de tres etapas temporales distintas: microglía temprana (Día embrionario E10.5 a E14); premicroglía (día E14 al DP9) etapa en la que se expresan un subconjunto genes relacionados con la migración neural, neurogénesis y secreción de citoquinas que podrían estar implicados en el papel que esta glía asume durante la poda sináptica y la maduración neuronal y posteriormente cuando el cerebro madure, entrar en la fase de vigilancia y homeostática adquiriendo funciones asociadas con el mantenimiento y la señalización de los tejidos. Por último, la etapa de microglía adulta (DP 10 en adelante) en la que se expresan diferentes genes, un número pequeño se expresan en el SNC como la CPF, el HIP y la médula espinal y otro grupo se expresa principalmente en el saco vitalino; los primeros se asocian con la respuesta de defensa y múltiples destinos hematopoyéticos y los que se expresan tanto en el saco vitalino como en el cerebro se relacionan con la proliferación y el ciclo celular (69).

La microglía cumple funciones homeostáticas diversas durante el desarrollo o en respuesta a diferentes factores ambientales, que permiten el funcionamiento normal del cerebro (71). Entre estas se destacan mantener un control estricto de las vías inflamatorias para prevenir el daño neuronal ante diferentes agentes estresores (69), modula la transmisión y poda sináptica dando forma a los circuitos cerebrales embrionarios y postnatales (74), así como, la plasticidad en el cerebro sano y la modulación de procesos que surgen como una respuesta inflamatoria (75), responde rápidamente incluso a cambios menores en el cerebro (76), monitorea el estado funcional de las sinapsis, influyen en los cambios neuroplásticos al remodelar los espacios extracelulares y eliminan los elementos sinápticos mediante fagocitosis (77).

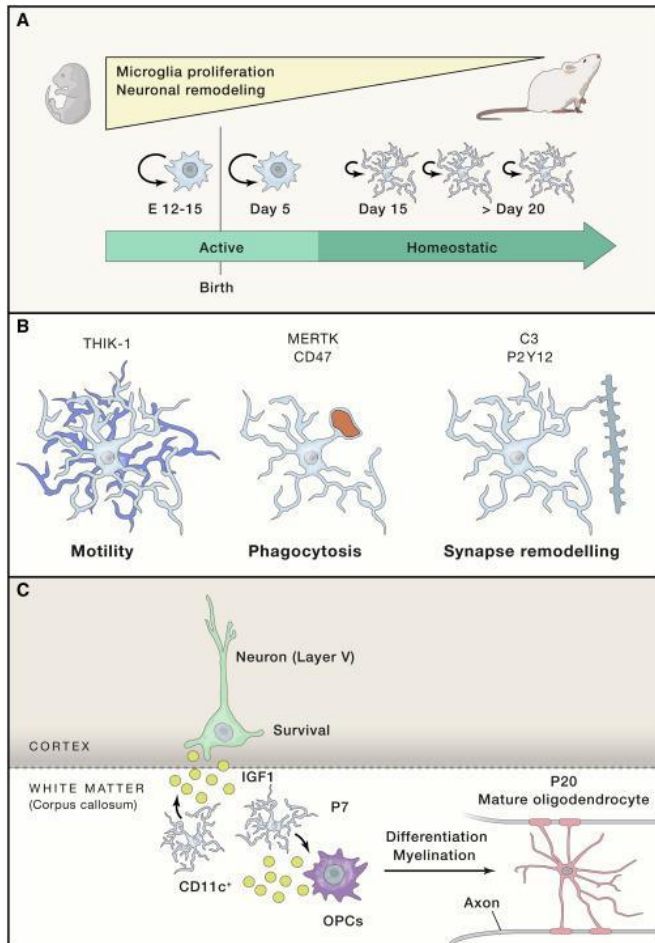


Figura 4. Funciones fisiológicas de la microglía durante el desarrollo y la edad adulta.

(A) Esquema que ilustra las características morfológicas y proliferativas de la microglía durante la ontogenia. Durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano, la microglía tiene un fenotipo activado con alta proliferación, como lo indican las flechas grandes.

(B) En condiciones de estado estacionario postnatal, la microglía cambia de la expansión a la baja proliferación homeostática, y las actividades incluyen el escaneo del entorno cerebral con extensiones dinámicas, la remodelación de las sinapsis y la fagocitosis. Se indican las moléculas involucradas en estos procesos.

(C) Durante el desarrollo postnatal temprano, la microglía produce un factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1), apoyando la supervivencia de las neuronas de la capa V en la corteza somatosensorial. Además, la microglía produce IGF1 para apoyar el desarrollo de células precursoras de oligodendrocitos (OPC) alrededor del día 7 postnatal (P7) y la homeostasis de oligodendrocitos maduros alrededor de la P20. Tomado de Prinz, M., Jung, S., & Priller, J. (2019). Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell*, 179(2), 292–311. doi:10.1016/j.cell.2019.08.05

En cuanto a su morfología, la microglía en desarrollo y postnatal presentan una morfología ameboide similar a un “macrófago” y carece de las ramificaciones características que le permiten escáner su entorno, indicando una activación celular (Lawson et al., 1990). Hasta la primera semana postnatal es considerablemente más proliferativa que la microglía adulta (72). Ante eventos nocivos, la microglía reactiva retracta sus procesos, aumenta su soma, forma nuevas protuberancias móviles y se transforma en una forma ameboide. También puede mostrar una morfología hiperrámificada (71, 72) y si la exposición al agente es crónica, el soma se hipertrofia (73). La microglía activa no sólo cambia su forma, sino que secreta citocinas como IL-1 β , IL-6 y TNF- α y es una fuente de especies reactivas de oxígeno (ROS siglas en ingles de reactive oxygen species) que deterioran la deficiencia de energía y la neurodegeneración (71). Por lo tanto, la perturbación del entorno microglial durante su desarrollo puede alterar la expresión de genes relacionadas con la inflamación, interrumpir el desarrollo neuronal y el funcionamiento de las microglías, lo cual podría incidir en la

respuesta de la microglía en las diferentes etapas del desarrollo del cerebro y en la formación de trastornos cerebrales en etapas posteriores (69).

Como hemos visto, la microglía se somete a una extensa reestructuración morfológica en respuesta al estrés que puede ser subyace a la disfunción del sistema nervioso central y para identificar la identidad de la microglía y estudiarla se deben tener varios factores en cuenta, muchos de los cuales están en discusión. Actualmente, la identificación de la microglía se debe realizar teniendo en cuenta la expresión de diferentes genes o marcadores ya que la expresión de un solo marcador no es suficiente porque este puede variar dependiendo de la adaptación microglial (133); entre los marcadores empleados se encuentra la expresión de factores de transcripción como PU.1 (134) Y marcadores citoplasmáticos como la molécula adaptadora de unión al calcio ionizado 1 (IBA1) (135). Aunque hay un interés considerable en estudiar la morfología en su estado de activación, no está claro si se requiere un cambio en la manera de describir la activación en fases M1 (Regulación) y M2 (reparación) ya que la inflamación se resuelve después del desafío inmunológico). Otro problema relacionado en la exploración de fases de activación microglial es la dependencia de la inmunoreactividad de Iba-1 para informar sobre su estado de activación. Mientras que la microglía sufre reordenamientos citoesqueléticos que alteran su morfología (72) estos cambios morfológicos pueden no representar con precisión un perfil inflamatorio "activo". Por otro lado, las limitaciones que se han encontrado sobre la nomenclatura empleada para comprender los estados microgliales (como los mencionados anteriormente: M1, M2) han despertado críticas a estas nomenclaturas ya que la neuroinflamación que se presenta en el estado M2 no siempre es perjudicial, sino que, en su lugar, representa una respuesta adaptativa al daño que a veces puede salirse de control (133).

1.5.1 Interacción entre Microglía, SMDL y AE

Como se ha mencionado, la función microglial cumple un importante papel en el funcionamiento del cerebro, por lo tanto, los cambios que se presenten en ella pueden proporcionar un modelo para explicar cómo el estrés lo altera (78). Sin embargo, aunque

muchos estudios han abordado este tema, son pocos los que han investigado los efectos que tiene el estrés crónico inducido por SMDL en estas células.

Las experiencias tempranas de estrés pueden perturbar la función microglial, estas experiencias aumentarían los niveles de corticosterona provocando que las microglías expresen altos niveles del receptor de glucocorticoides (GC) como respuesta al aumento de esta hormona y esto incidiría a su vez, en el aumento de la expresión de las. Así mismo, estas experiencias aumentarían la expresión de genes proinflamatorios como IL-1, TNF o IL-6, Fyn, Irak4, que inducirían la expresión de las microglías y aumentarían su actividad fagocítica (20).

Cuando dicha experiencia es continua, se afecta la respuesta microglial a los desafíos ambientales estresores posteriores, creando una vulnerabilidad a los “*golpes secundarios*” que contribuirán aún más al deterioro, respondiendo de manera exagerada a experiencias estresoras (71, 10) que podrían extenderse hasta el periodo juvenil e incluso hasta la edad adulta (22), porque, aun cuando haya ausencia de estrés continuo, los cambios en la expresión génica en la microglía persistirán (71).

Adicionalmente, la sensibilidad de la microglía puede ser diferente según las especies y el tiempo de exposición al estrés. Por ejemplo, la exposición continua a un agente estresor aumenta el número y el área de superficie de la microglía en el hipocampo en ratones macho adultos (22, 79) y es que la densidad microglial en ratas alcanza su punto máximo cerebral en el DP14 en esta área, siendo este un periodo crítico del desarrollo del hipocampo (80).

En otros trabajos se demostró que la exposición a la separación materna de manera progresiva (4hrs/día, DP 2-5 y 6hrs/día, DP 6-16) junto con un destete temprano (DP17) induce la activación microglial en varias regiones del hipocampo como CA3 y CA1 en ratones hembra (58). Por el contrario, la separación materna de 3 horas diarias durante el periodo de hiporespuesta (DP 1 a 14) no afecta el número total y la densidad de las células microgliales en el hilus del hipocampo de ratas Long Evans hembras, pero cuando la separación fue hasta el DP 15, las ratas macho presentaron un incremento del porcentaje (de

35% a 58%) de células gliales activadas (81). Así mismo, se ha evidenciado que la exposición a un AE durante 14 días, posterior al destete disminuye la expresión de Iba1 (molécula adaptadora de unión a calcio ionizada 1, específica de microglía) reduciendo el número de microglías específicamente en el hipotálamo (25).

2. Interacción entre el modelo de separación materna y el ambiente enriquecido

El AE puede generar efectos positivos sobre las consecuencias de la separación materna en modelos de roedores, cuando se proporciona durante la vida prepubescente y temporalmente proximal a la separación, pero aún, se desconoce si el AE proporcionado fuera de esta ventana crítica puede alterar los efectos, mejorando los procesos o mecanismos neuronales afectados.

Francis et al., (82) con el interés de identificar si el ambiente enriquecido podría revertir los efectos del estrés dado por la separación materna sobre el eje HHA, expusieron a ratas Long Evans a una SM de 180 minutos durante los días PD1 a 14, en el DP22 al 70 se destetaron y se agruparon en condiciones de AE y ambiente estándar, 8 a 10 por jaula. En el DP70 todos los animales fueron alojados en grupos del mismo tratamiento, dos por jaula y entre el DP110 a 120 se realizaron diferentes pruebas: pruebas de comportamiento para medir la supresión inducida por la novedad del comportamiento apetitoso; prueba de campo abierto; pruebas de estrés por restricción y muestreo de sangre en la vena de la cola para obtener corticosterona de plasma. Por último, se trató el cerebro para identificar la expresión del factor hipotalámico de liberación de corticotropina (CRF). Los hallazgos encontrados fueron que el AE de 48 días revirtió los efectos de la SM en la función del eje HHA y que la expresión del gen del receptor de glucocorticoides del hipocampo, que media los efectos de la experiencia temprana en la expresión de la CRF, no se vio afectada por el AE. Estos datos podrían sugerir que los efectos encontrados podrían deberse más que a una reversión de los mecanismos celulares, a una compensación que se produce en las ratas con SM como resultado del AE el cual podría estar amortiguando la actividad del eje HHA a través de efectos sobre el receptor 5-HT1A en el hipocampo y, tal vez, la corteza frontal.

Vivineto, Suarez y Rivarola (2) también tenían el interés de estudiar si la exposición al AE durante la adolescencia podría revertir o compensar los efectos de la SM sobre procesos como el aprendizaje, la memoria y la actividad neuronal del hipocampo. Para esto, durante

los DP 1 al 21 expusieron a ratas Wistar a la SM de 4.5 horas al día o condición de crianza estándar. A partir del DP 21 al 60, las ratas fueron alojados en condiciones de vivienda estándar o AE durante la infancia hasta la adolescencia en grupos de 7 a 10 animales . Para el DP 60 los animales del AE fueron alojados en parejas en jaulas estándar y el DP 67 al 74 se aplicaron pruebas comportamentales para evaluar las respuestas emocionales y cognitivas a través del campo abierto, nueva tarea de reconocimiento de objetos y la prueba aprendizaje de evitación inhibitoria descendente. Por último, mediante inmunoreactividad se evaluó la expresión de c-fos y de receptores de glucocorticoides en el hipocampo. Los resultados mostraron que los animales separados y alojados en condiciones estándar tuvieron un menor comportamiento de aseo y por el contrario, los grupos alojados en un AE presentaron significativamente esta característica. El AE revirtió los efectos de la SM en la área de evitación inhibitoria y por otro lado, aumento la expresión de c-fos, así como, el receptor de glucocorticoides en CA1 y GD.. Estos resultados les permitieron concluir que la exposición a un AE de 39 días durante la adolescencia puede alterar algunos fenotipos con alta significancia adaptativa en la edad adulta como la habituación, los comportamientos defensivos y la reactividad emocional en un contexto novedoso o evitativo, que el AE induce la expresión del gen GR en subcampos hipocampales como el CA1 y CA2, lo que podría relacionarse con cambios en la anatomía y la función neuronal atenuando las respuestas al estrés adrenocortical y permitiendo así una función neuronal hipocampal más eficiente.

Do Prado, et al (83) también identifico los efectos de la SM y subsecuentes efectos del AE en la adolescencia temprana en el rendimiento cognitivo y en la corteza prefrontal. Para ello, realizaron la SM de 4 horas al día durante los DP 2 al 20 con ratas Sprage Dawley y para el DP 21 fueron emparejadas por sexo y grupo de tres crías por jaula ya sea enriquecida o estándar. Fueron expuestas a un AE durante los DP 21 al 36 (15 días). Para el DP 36 al 54 se aplicó la prueba comportamental de laberinto y por último en el DP 56 se recolectaron las muestras de sangre y cerebro. Los resultados evidenciaron que el modelo de SM disminuyo la proteína parvalbúmina (PVB) afectando por lo tanto, las interneuronas de la CPF y la actividad proinflamatoria. Pero el AE durante los DP 21 a 36 previno la disfunción cognitiva en ratas macho y hembras, así como el aumento de las citocinas proinflamatorias circulantes que fueron evidentes en los machos, 20 días después de la exposición, lo cual

podría implicar que el AE genera una disminución proinflamatoria y previene la pérdida de las interneuronas. Aunque ni la SM ni el EE afectaron las medidas de estrés oxidativo en la CPF adolescente, la evidencia de daño oxidativo se correlacionó con las dificultades en la función cognitiva.

Dandi et al. 2018 (26) estudió los efectos que podía tener el AE posterior a la SM durante la vida adulta, así que expuso a ratas Wistar hembras a una SM de 3 horas diarias desde el DP 1 al 21 y al otro grupo no lo separo (10 a 13 por jaula). En los DP 23 al 65 las crías se alojaron en la condición estándar o AE (5 a 7 por jaula). En el DP 65 los animales se ubicaron en pares en jaulas estándar y posteriormente se les aplico pruebas de laberinto (laberinto elevado, prueba de campo, reconocimiento de objetos nuevos, laberinto acuático de Morris) para evaluar comportamientos similares a la ansiedad, locomoción, aprendizaje y memoria no espacial. Después se tomaron las muestras para evaluar corticosterona, BDNF y SYN. Los resultados arrojaron que la exposición de ratas Wistar hembras al AE durante la adolescencia atenuó las respuestas adrenocorticales inducidas por la SM. A nivel comportamental, las ratas evaluadas no presentaron síntomas similares a la ansiedad y tuvieron mejor desempeño en la prueba de memoria espacial. La SM disminuyó significativamente la expresión de BDNF y SYN (sinaptofisina) en el hipocampo dorsal, mientras que la exposición al AE aumenta los niveles, compensando posiblemente la memoria espacial asociada al estrés, el aumento de la ansiedad y la regulación de BDNF y SYN. Este fue el primer estudio que mostró que la SM y EE interactúan entre sí, modulando el comportamiento de los adultos y la respuesta neuroendocrina al estrés y la neuroplasticidad.

El AE no sólo genera efectos durante la adolescencia, sino que también durante la adultez. Koe, Ashokan, Mitra, 2016 (3), estudiaron los efectos del AE en el adulto posterior a la SM sobre el comportamiento similar a la ansiedad y la plasticidad de BLA. Para eso, expusieron a ratas a una SM de tres horas diarias o no separación durante los DP 2 al 14. En el DP 15 al 21 las camadas de ambas condiciones de crianza se alojaron con sus madres hasta el destete. Durante los DP 21 a 56 las crías machos se alojaron en grupos de 2 animales por jaula y en el DP 56 al 70 estos fueron asignados 2 a 4 por jaula a la condición de vivienda

AE o estándar. A partir del DP 70 se aplicaron pruebas comportamentales y en el DP 74 se tomaron las muestras de sangre y el cerebro. Los resultados obtenidos mostraron que la SM indujo hipertrofia de las dendritas e incremento la densidad de las espinas de las neuronas de la BLA. Sin embargo, la exposición a un AE durante 14 días en la etapa adulta normalizó la densidad de las espinas, así como los parámetros dendríticos en la BLA, pero no tuvo efectos sobre los parámetros en la CPF PrL y sobre la corticosterona, cuyos niveles basales se mantuvieron sin cambios significativos, lo que podría indicar que un modelo corto de AE (14 días) que inicia tardíamente (en la adultez) puede ser suficiente para revertir las consecuencias comportamentales y cambios neuronales subyacentes al estrés de la SM y que el AE puede inducir la plasticidad neuronal.

2. Justificación

Las experiencias tempranas son fundamentales para el desarrollo comportamental y emocional de los individuos. Durante los primeros 6 años de vida, el individuo está inmerso en una relación diádica con la madre con quien, en condiciones favorables, establece un vínculo empático (1), que le ayudará a gestar la capacidad de autorregulación emocional y lo llevará a construir sentimientos de protección y seguridad. De esta manera, se irá dotando de un componente afectivo que ampliará sus capacidades para enfrentar el proceso de maduración durante la adolescencia y posteriormente las experiencias en la adultez (2, 3).

Sin embargo, durante la primera etapa de la vida, el individuo puede exponerse a factores psicosociales como negligencia, desatención, maltrato, abuso infantil, abandono o separación materna, que alteran su desarrollo y que se vinculan con problemas nutricionales, lesiones perinatales, entre otros, volviéndose vulnerables a padecer trastornos emocionales y comportamentales en etapas posteriores (4, 5, 6).

En Colombia, de acuerdo con el Boletín de salud mental en niños, niñas y adolescentes del Ministerio de salud y protección social del 2018 (8), el 34,3% de la población corresponde a niñas, niños y adolescentes de 0 a 19 años (7) y entre 2009 y 2018 se habían atendido 2.128.573 consultas de este grupo etario con diferentes diagnósticos de trastornos mentales y del comportamiento. Por depresión consultaron 141.364 individuos de los cuales el 32,7% lo hacían por depresión moderada, el 59,3% pertenecía al sexo femenino y el grupo etario más afectado era el de 5 a 10 años. Por ansiedad consultaron 165.572 individuos; 5.991 presentaban trastorno de ansiedad por separación (50,5% del sexo femenino y el 49,5% del sexo masculino) siendo el grupo más afectado el de 10 a 19 años; 4,332 consultaron por trastorno de ansiedad social en la niñez con mayor incidencia en el grupo de 5 a 9 años; 2600 individuos consultaron por trastorno de ansiedad fóbica en la niñez; 86.269 por trastorno de ansiedad no especificada y por último, 68.880 por trastorno mixto de ansiedad y depresión. En relación con estos trastornos, es importante mencionar que para el 2021 se notificaron 29.792 casos de intento suicida y entre el 2009 y 2017 se presentaron 3.094 casos de suicidio

(65% eran hombres y el 34,9% mujeres), de los cuales el 77% (2.382) tenían entre 15 y 19 años de edad (8).

Otra situación que afectó la salud mental de los grupos etarios mencionados y la población adulta de Colombia fue el aislamiento al que se enfrentó el país debido a la pandemia durante el 2020 y 2021. Durante este tiempo se habilitaron las atenciones telefónicas para atender la demanda de salud mental durante esta emergencia sanitaria, registrando un total de 18.089 atenciones principalmente por síntomas relacionados con la ansiedad, estrés, depresión y exacerbaciones de trastornos mental previo (127). En cuanto a los síntomas de estrés, un estudio evidenció que el 88% de los niños y niñas durante el 2020 presentaron síntomas de estrés y cambios de comportamiento, según reporte de los padres (128).

De acuerdo con lo anterior, las experiencias adversas en etapas tempranas de la vida como la negligencia, maltrato emocional o físico, violencia sexual, pobreza extrema, así como situaciones externas adversas como las vividas por la pandemia, tienen un gran impacto sobre el desarrollo neuronal, psicológico y comportamental del individuo, de ahí, que sea importante reconocer las alteraciones que se presentan y la forma en que estas originan cuadros clínicos tan diversos e incapacitantes en los seres humanos (10). Para esto, se han realizado diferentes estudios; en humanos el interés inició con los “niños institucionalizados”, en los años 70 Renee Spitz en 1946 describió que estos niños que no tenían contacto social presentaban déficits a nivel físico y comportamental (12). Posteriormente, se realizaron estudios en roedores donde las crías eran expuestas a una separación materna repetida, asemejando el estrés crónico que padecen los individuos durante las experiencias adversas tempranas. Estos estudios han evidenciado que el estrés puede incidir sobre el mecanismo efector y regulador del estrés, por el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), al alterar los niveles de las hormonas como la corticosterona (13) y sobre la función neuronal, al afectar el proceso de autofagia (14, 15, 16, 17, 18) y provocar cambios permanentes en neuronas y astrocitos (19). Otro elemento importante es que el estrés crónico perturba la función microglial induciendo la liberación de moléculas proinflamatorias y hormonas del estrés (20), que sensibilizan la microglía ante posibles segundas situaciones de estrés o “*second hit*” (10) contribuyendo a un mayor deterioro (21).

Es por eso, que la sensibilidad de la microglía al estrés y su papel en la orientación de muchos procesos de desarrollo, la convierten en un objetivo de estudio celular particularmente atractivo para caracterizar las anomalías del desarrollo neurológico inducidas, particularmente, por el estrés ocasionado por la separación materna durante la lactancia (SMDL) (22).

Así mismo, es importante comprender la manera cómo estas alteraciones se pueden prevenir o tratar. Para ello, se han estudiado varias estrategias, entre ellas el ambiente enriquecido (AE), una técnica en la que se utilizan elementos que permiten incrementar la actividad física y las interacciones sociales y sensoriales y que han demostrado tener diferentes efectos sobre el desarrollo del sistema nervioso, permitiendo superar déficits conductuales y neurobiológicos provocados por estrés en la vida temprana (23-26).

No obstante, a pesar de los hallazgos individuales de los modelos mencionados, no hay suficiente claridad sobre los posibles efectos del AE posterior a la SMDL en la microglía, ni cómo estas tres variables interactúan con las respuestas del eje HHA ante el estrés crónico. No es claro cuáles son los mecanismos neuronales que subyacen a los efectos a largo plazo de las experiencias adversas tempranas y si el AE establecido poco tiempo después del cese del estrés crónico, reduce los efectos que éste ocasiona. En efecto, son pocos los estudios que han tratado de investigar en el mismo experimento si estas condiciones actúan de manera diferencial según el sexo (24, 25, 26) y aunque en este trabajo no abordaremos todas estas inquietudes (muy importantes), si nos proponemos el propósito de responder a la siguiente pregunta: ¿Cuáles son los efectos de 15 días de ambiente enriquecido posterior al cese del estrés crónico inducido por separación materna durante la lactancia, en la activación y morfología de la microglía en la corteza cerebral y sobre las concentraciones de corticosterona, en ratas Wistar machos y hembras adolescentes?

Y la hipótesis que se exploró es que 15 días de AE posterior SMDL reduce los cambios morfológicos de la microglía en la corteza cerebral de ratas Wistar machos y hembras, y afecta los niveles basales de corticosterona.

3. Formulación del problema

Para comprender si el AE tiene efectos sobre las consecuencias de la SMDL, se han realizado algunas investigaciones (2, 3, 26, 82, 83) que han tenido como objeto de estudio los procesos neuroquímicos y neurobiológicos de las neuronas de la corteza cerebral de diferentes cepas de ratas, predominando el estudio en machos, ya que el manejo de hembras implica el control del ciclo de celo y el estudio mixto tener un mayor número de muestras (9). En estos estudios se han trabajado con modelos de separación materna estandarizados, que incluyen realizar la separación durante el ciclo de luz y durante el periodo de lactancia (2, 26, 83) o antes de finalizar (3, 82), sin embargo, estos incluyen una variación y es el número de horas de separación que puede ser entre 3 (26) a 4,5 (2, 83) horas diarias. Esta última variación (4,5 hrs) aumenta los sesgos posibles por déficits de nutrición en los individuos y realizarlo durante el ciclo de luz también podría sesgar los resultados ya que no modela el ambiente natural de las ratas que son activas durante la noche. Así mismo, son tantas las variaciones que se realizan al protocolo de AE que no es posible hasta el momento encontrar un protocolo estandarizado, por ejemplo, el tiempo de exposición al AE varía de 14 (3), 15 (83), 39 (2), 44 (26) hasta 48 (82) días y sus efectos han sido evaluados finalizando la adolescencia (2, 26) o en la adultez (3, 82, 83).

De manera que existen pocos estudios que hayan analizado los efectos del AE y la SMDL en ambos sexos y hasta el momento no hay un estudio que al tiempo observe la manera como interactúan los efectos del AE sobre las consecuencias de una SMDL de 6 horas diarias divididas en dos intervalos¹ sobre la morfología de la microglía y los niveles de neurohormonas como la corticosterona durante la adolescencia temprana (DP 37), etapa particularmente sensible a las experiencias ambientales y que preparan al sistema nervioso para responder a desafíos ambientales posteriores (en este caso durante la adolescencia y adultez).

¹ En la línea de investigación se trabaja desde hace 10 años con el modelo de separación materna durante la lactancia

4. Objetivos

5.1 Objetivo general

- Analizar el efecto de 15 días de ambiente enriquecido, posterior a la separación materna durante la lactancia, sobre la cantidad y morfología de la microglía y la concentración de corticosterona, en ratas Wistar machos y hembras durante la adolescencia temprana.

5.2 Objetivos específicos

- Identificar si 15 días de ambiente enriquecido, posteriores a la separación materna durante la lactancia, afectan la concentración de corticosterona de forma distinta en machos y hembras durante la adolescencia temprana.
- Identificar si 15 días de ambiente enriquecido, posteriores a la separación materna durante la lactancia, afectan la cantidad de microglía en el Área tegmental ventral, Núcleo Accumbens, Hipocampo, Amígdala y corteza prefrontal de forma distinta en machos y hembras durante la adolescencia temprana.
- Identificar si 15 días de ambiente enriquecido, posteriores a la separación materna durante la lactancia, afectan la morfología de la microglía en el Área tegmental ventral, Núcleo Accumbens, Hipocampo, Amígdala y corteza prefrontal de forma distinta en machos y hembras durante la adolescencia temprana.

5. Método

6.1 Sujetos

Se trabajó con la especie *Rattus Norvegicus*, cepa Wistar obtenidas del Bioterio de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia. Las ratas progenitoras fueron hembras adultas (peso aproximado de 250 gramos) y machos adultos (280-300 gramos) que estuvieron anidadas de forma individual por un periodo de una semana para permitir la habituación a las condiciones del experimentador, de la temperatura (22 ± 2 °C), humedad y ciclo invertido de luz/oscuridad comenzando con oscuridad a las 7:00 a.m. y luz a la 7:00 p.m. Tuvieron acceso a agua y alimento ad-libitum (Lab Diet® - Laboratory Rodent Diet).

Las ratas parentales al cumplir el tiempo de habituación se anidaron por parejas de hembras y macho durante 8 días, posteriormente se retiraron los machos de los nidos y se dejaron las hembras sin manipulación hasta el alumbramiento, excepto para cambio y limpieza de la jaula.

Para determinar el número de animales con los cuales se trabajó, se tuvieron en cuenta los trabajos previos de la línea de investigación² en los cuales se señalaba que la comparación de grupos entre 8 y 10 animales permitía identificar diferencias estadísticas entre ellos en caso de encontrarlos, y la fórmula que se tendría en cuenta para estimar el número sería³ $n = z_{2.p.(1-p)} / e^2$ donde:

Z = nivel de confianza 95% (Z=1,96)

p = es la probabilidad positiva del fenómeno (88%)

e² = error de estimación (que para el 95% de confianza es de 0,0025)

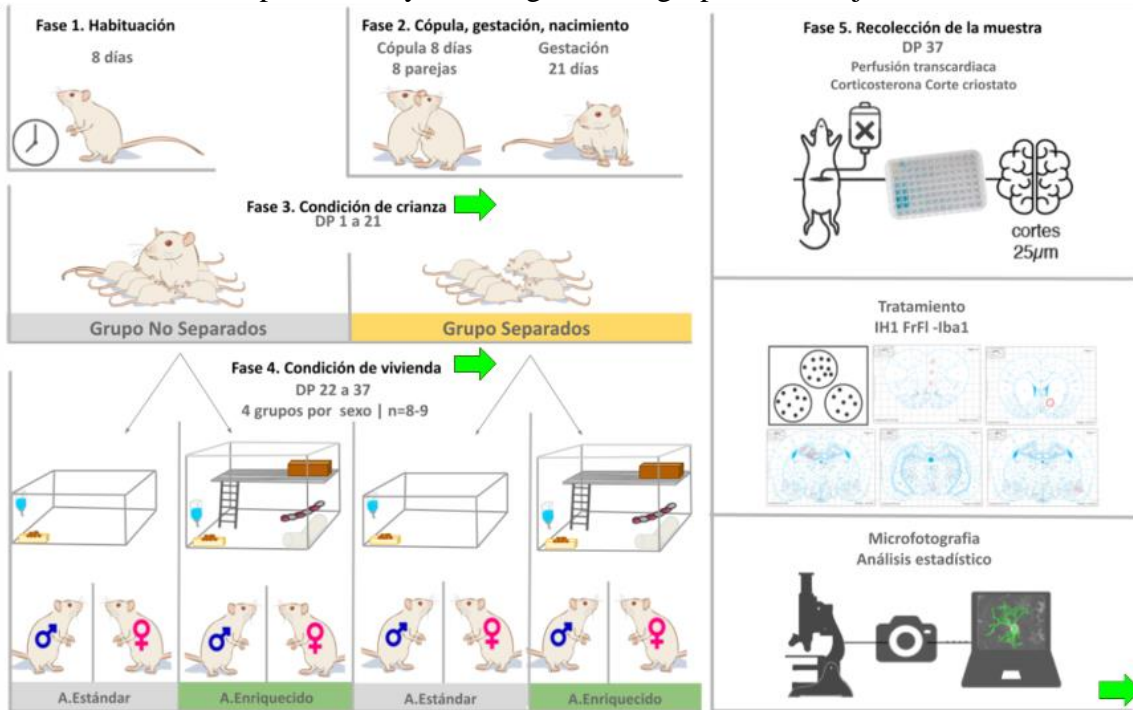
² Tesis de la maestría en Fisiología: Aya-Ramos L, Contreras-Vargas C, Rico JL, Dueñas Z. Early maternal separation induces preference for sucrose and aspartame associated with increased blood glucose and hyperactivity. *Food Funct.* 2017 Jul 19;8(7):2592-2600.

³ Reynoso-Robles, Ponce-Macotela, Rosas-López, & Ramos-Morales, 2015

6.2 Diseño experimental

El siguiente gráfico ilustra la distribución que tuvieron los sujetos de acuerdo con la exposición o no a los protocolos de Separación Materna Durante la Lactancia (SMDL) y el Ambiente Enriquecido (AE).

Gráfico 1. Diseño experimental y cronología de los grupos de trabajo



Posterior al nacimiento, se realizó homogenización entre crías de dos madres para después realizar una distribución aleatoria de las crías en el grupo de condición de crianza, así se evitaría el sesgo del efecto de la camada y al mismo tiempo permitiría tener un número manejable de animales. En ese caso, dado que se eliminó el sesgo de camada, no se consideró necesario aleatorizar el tratamiento de vivienda. Por otra parte, teniendo en cuenta las normas éticas que rigen la investigación con animales, no se descartó ninguna cría y en todo caso se ajustaron las camadas.

6.3 Procedimientos

6.3.1 Separación materna durante la lactancia (SMDL)

Se usó el modelo de SMDL⁴ durante 6 horas diarias, el cual es trabajado por la línea de investigación *efectos neuronales y comportamentales del estrés* desde hace 10 años.

El grupo con tratamiento de crianza se sometió al protocolo de SMDL⁵ durante los días postnatales 1 al 21 (DP) (El día 0 corresponde al nacimiento y no se incluye). Este procedimiento se llevó a cabo durante 21 días, cada día las crías fueron separadas 3 horas en la mañana (7:00 -10:00) y 3 horas en la tarde (13:00- 16:00), para un total de 6 horas diarias. Durante la separación se mantuvo con una temperatura de 25-28 °C (leve aumento), luz de día con tubo de encendido controlado por timer y dadas las condiciones de ubicación del cuarto, el ruido fue mínimo.

Las separaciones de seis horas divididas en dos intervalos son relativamente novedosas resultando apropiadas para disminuir posibles sesgos por déficits de nutrición en los individuos (84) y se realizaron en el periodo de oscuridad teniendo en cuenta que la actividad de este tipo de animales es nocturna (Munn, 1950, citado en 85) permitiendo inferir que las crías como la madre podrán “percatarse” de la separación debido a esa misma activación comportamental.

El protocolo de separación materna se realizó de la siguiente manera:

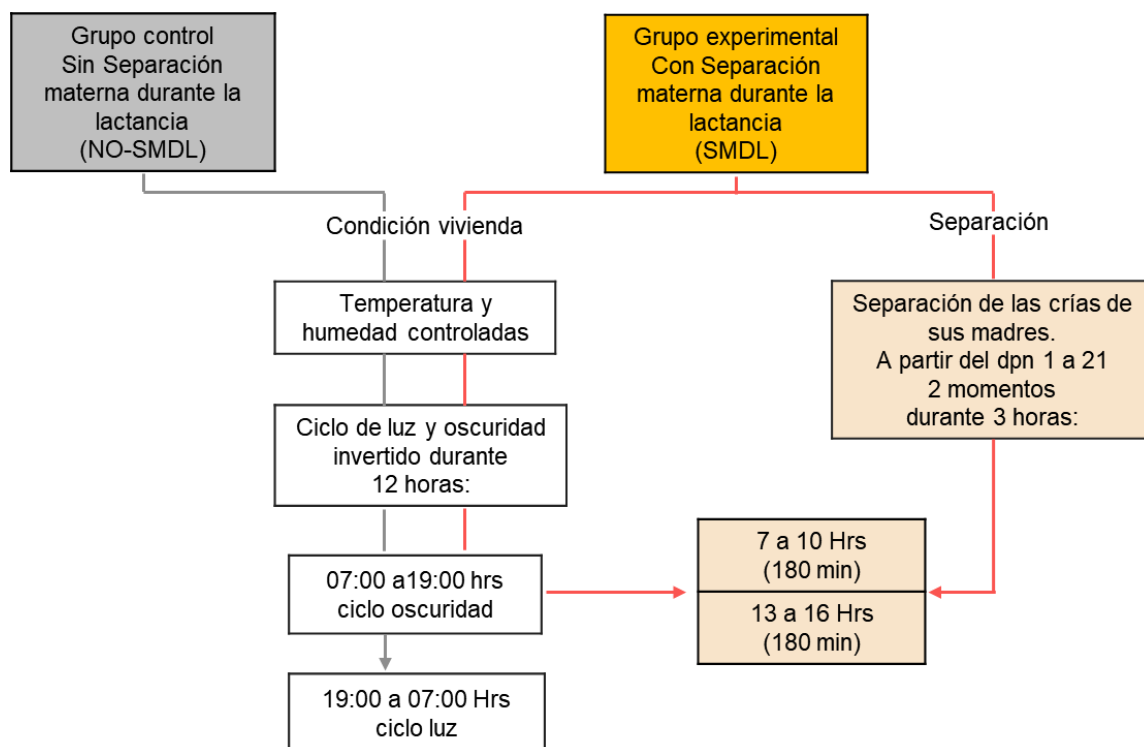
1. Separación: Entre los DP 1 al 21, se separaron las crías de las madres tomando las crías una por una de las jaulas de los grupos sometidos al protocolo.

⁴ Este protocolo de SMDL es una condición que genera un distrés en la cría y en la madre por lo cual su grado de invasividad es severa según lo reportado por Diario Oficial de la Unión Europea. (2010). Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo. 2010, Sep, 1-47. Reportado en <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:es:PDF>

⁵ En la línea de investigación se trabaja desde hace 10 años con el modelo de separación materna durante la lactancia reportado por Hofer MA. The role of nutrition in the physiological and behavioral effects of early maternal separation on infant rats. *Psychosom Med.* 1973 Jul-Aug;35(4):350-9.

2. Cuidado durante la separación: a) Las crías fueron puestas en una jaula estándar diferente a la inicial que fue previamente acondicionada con viruta tomada del nido materno, con el propósito de evitar el rechazo por parte de la madre al momento de retornarlas a la jaula inicial. b) Las jaulas con las crías fueron trasladadas a otra habitación donde permanecieron en condiciones de temperatura estable mediante el uso de un sistema portátil de calefacción, humedad y control de ruidos.
3. Fin de la separación: Finalizado el periodo de separación, se retornaron las jaulas a la habitación original y se devolvieron una a una las crías al nido materno correspondiente.

Gráfico 2. Protocolo separación materna durante la lactancia



Grupo control
Sin separación materna durante la lactancia. (SMDL)



Grupo experimental
Con separación materna durante la lactancia. (SMDL)



Imagen 1. Separación materna durante la lactancia (SMDL). Fotos propias.

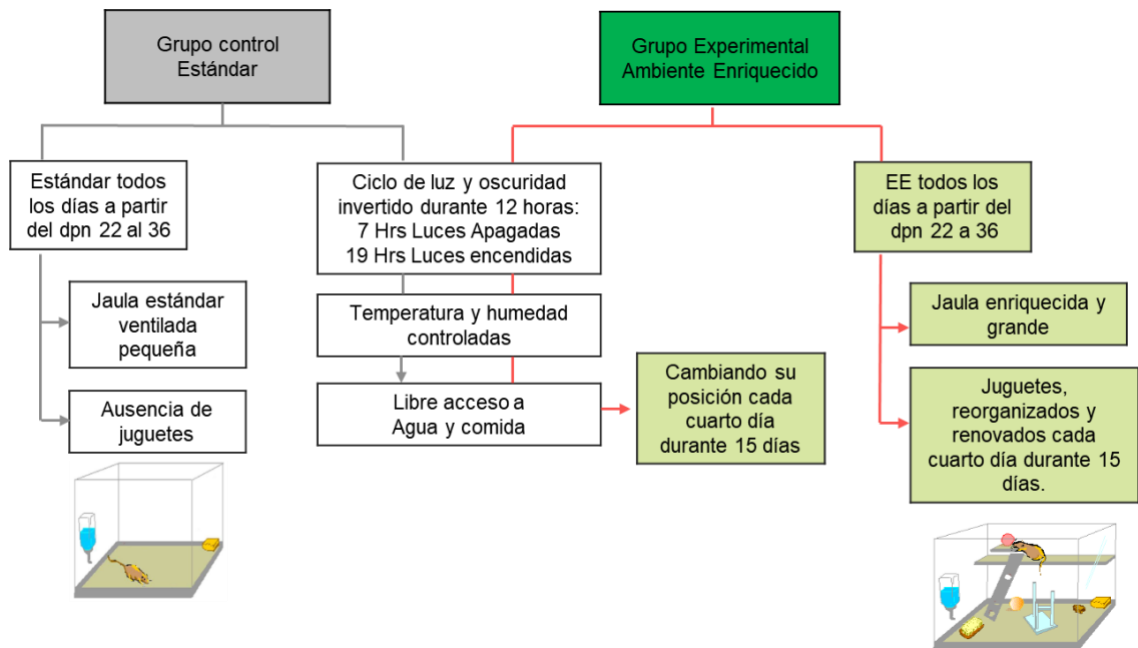
6.3.2 Ambiente enriquecido

Los protocolos empleados del AE son muy diversos, pero también, suelen tener algunos elementos comunes (52, 9). Y para el diseño del protocolo en este estudio se tuvieron en cuenta aquellos que han demostrado efectos positivos contra el estrés, así como, las variables de interés que se querían estudiar. Estas variables sólo se emplearon en el grupo que vivió en el ambiente enriquecido:

- **Duración AE:** La exposición fue de 15 días (DP 22 al 36) (duración comúnmente empleada en los estudios y que además abarca hasta el inicio de la adolescencia)
- **Tiempo de exposición a objetos:** 24 horas, durante 15 días.

- **Número de objetos:** un total de 6 objetos: 2 bloque de madera, 2 tubos de plástico cilíndricos, 1 material de anidación, 1 canasta.
- **Cambio de objetos:** Los objetos se reorganizaron y renovaron cada cuarto día, 5 objetos estuvieron dentro de la jaula y 1 estuvo afuera para ser usado como recambio cada cuarto día
- **Jaula:** se construyó una jaula de dos niveles, la base con un organizador de material plástico y las paredes con rejillas, garantizando mayor espacio para las ratas, con una dimensión aproximada de 51x82x40cm de alto.
- **Alimentación:** Alimentación y agua constante, reemplazados dos veces por semana y reubicados en diferentes lugares para favorecer el comportamiento exploratorio.
- **Limpieza:** Las jaulas fueron limpiadas y reorganizadas una vez por semana

Gráfico 3. Protocolo Ambiente Enriquecido⁶



⁶ *Imagen ambiente enriquecido tomado de: <http://neurociencia-educacao.pbworks.com/w/page/9051873/est%C3%ADmulos>

Jaula AE: Posición 1



Jaula AE: Posición 2



Jaula AE: Posición 3



Jaula AE: Posición 4



Jaula AE: vista frontal



Imagen 2. Modelo Ambiente enriquecido: Jaulas empleadas en el proyecto. Fotos propias.

6.3.3 Grupo control para ambos grupos experimentales

Cada grupo experimental (SMDL y AE) durante los dos tipos de tratamientos, tuvieron un grupo estándar. Los animales que no fueron separados durante la lactancia, continuaron con su alojamiento en la jaula de medidas estándar (17,5x31x40), no fueron molestados, excepto por el cambio del material de la cama y las crías permanecieron con sus madres hasta el destete. Los animales de la condición de vivienda, el día DP 22 se dividieron en dos subgrupos de vivienda, AE (N-A, n=8-9; S-A, n=8-9) o vivienda estándar (N-E, n=8-9; S-E, n=8-9). Los animales fueron alojados en grupos de 8 a 9, con material para la cama, temperatura estándar, ciclo luz oscuridad invertido, ingesta de comida (Lab Diet®) y agua como única fuente de líquido, disponibles a voluntad que permanecieron en una sola ubicación.

6.3.4 Concentración corticosterona

La corticosterona se midió mediante un ensayo inmunoenzimático hecho con el plasma de las ratas tomado al finalizar el tratamiento de ambiente enriquecido (DP 37), el procedimiento realizado fue el siguiente: se llevó a cabo a en una sala experimental sin la presencia de otros animales; los animales se prepararon para la perfusión transcardiaca, inmediatamente antes de iniciar la perfusión con solución salina, se corta la aurícula y se colectó la sangre en un tubo eppendorf de 3ml; cada muestra se centrifugo inmediatamente durante 10 minutos a 3000 rpm para eliminar los glóbulos rojos y obtener el plasma; el plasma se recolectó con una pipeta en un tubo eppendorf de 1.5ml; las muestras de suero

separadas se almacenaron a -20°C hasta su uso. Se utilizó un espectrofotómetro (BIORAD Ultramark, Microplate Imaging System) para leer la absorbancia y los niveles de concentración de corticosterona en las muestras.

Las concentraciones de corticosterona se cuantificaron con la prueba ELISA ab108821 Abcam, siguiendo las instrucciones del proveedor. Se elaboró una curva estándar de la hormona utilizando 100µm de muestra previamente reconstituida con 200µm de la solución tampón de ensayo. La muestra por duplicado se incubó en cajas de 96 pozos que, además de esta, incluían los pozos blancos, el control positivo y los controles negativos. Todo el protocolo se desarrolló con base en los lineamientos de las hojas técnicas del proveedor respectivo.

6.3.5 Inmunohistoquímica

• Eutanasia - Perfusión

Las ratas fueron preparadas para estudio inmunohistoquímico el DP 37, mediante eutanasia, conservación de tejidos mediante perfusión transcardiaca, el protocolo a seguir fue el empleado en el grupo de investigación:

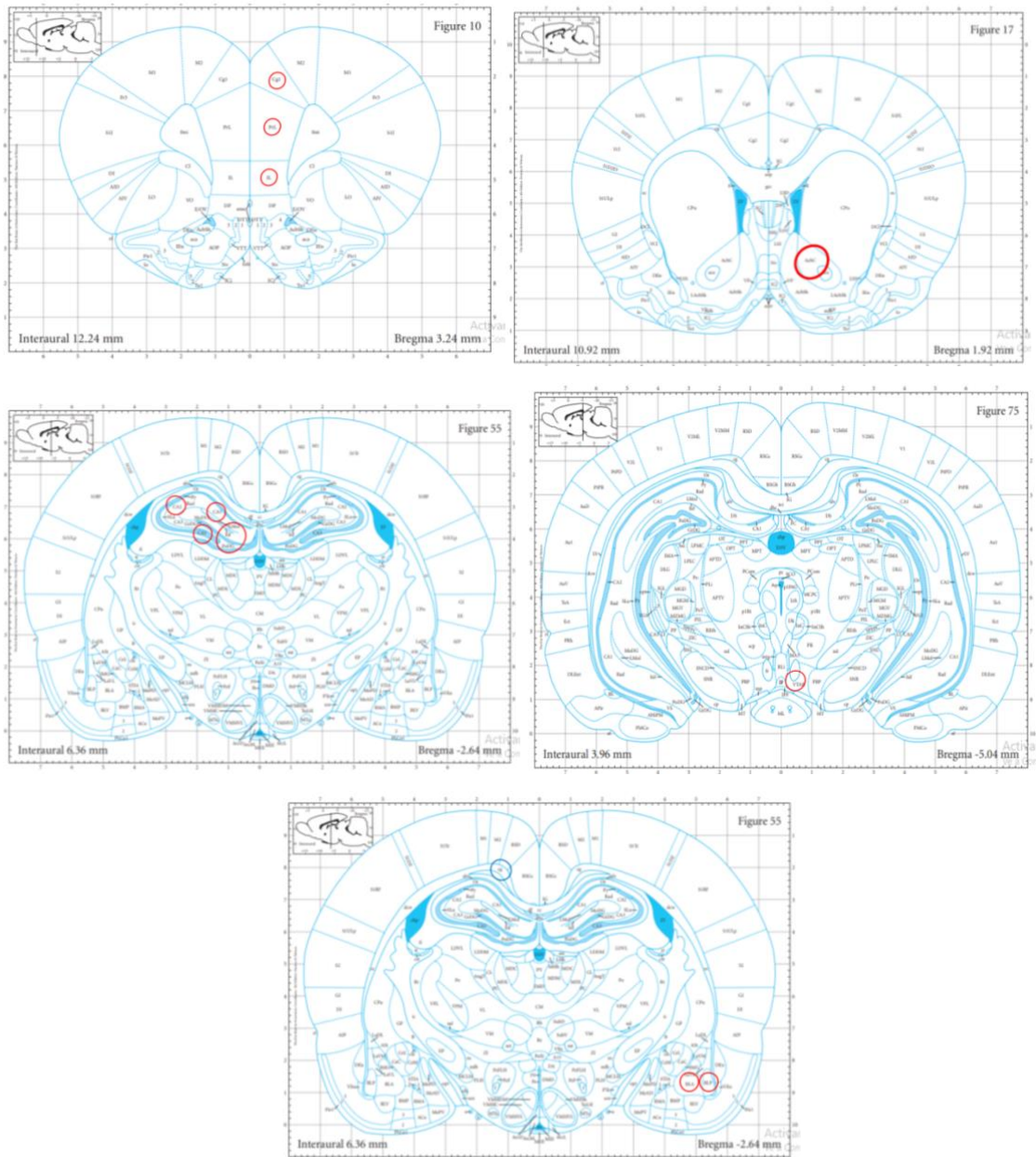
- El método que se empleó para realizar la eutanasia fue la inyección intraperitoneal de Euthanex, un eutanásico en solución inyectable que contenía Pentobarbital sódico 390mg/ml, Difenilhidantoina sódica 50mg/ml.
- Se calcularon las dosis indicadas para cada sujeto de experimentación de acuerdo con su peso en razón de 300 microlitros de solución de Euthanex por kilogramo de peso. Se usó una concentración menor al 20% para no causar irritación peritoneal en la ratona y se empleó el triple de la dosis anestésica para garantizar la anestesia profunda (91, 92) La inyección fue por vía intraperitoneal con punción única con aguja hipodérmica.
- Se vigiló la acción efectiva de la sustancia, evaluando el grado de anestesia alcanzado.

- Se confirmó mediante estimulación sensorial, que el sujeto de experimentación hubiese alcanzado el plano anestésico profundo.
- Una vez anestesiados los sujetos, se pusieron boca arriba sobre una canastilla ubicada en el sitio de manipulación de animales para perfusión. Se palpó el tórax y se ubicó el esternón. Con las tijeras se cortó la piel y músculo, para eso, se abrió la cavidad torácica a la altura del esternón y se cortó lateralmente hasta la línea medio clavicular derecha e izquierda rompiendo costillas y ascendiendo hasta el segundo-tercer espacio intercostal. Se hizo visible el corazón para introducir la aguja del sistema de perfusión con el flujo de solución salina al 0.9% en el ventrículo izquierdo, inmediatamente se cortó la aurícula derecha para permitir la salida de la sangre y demás fluidos. El goteo se reguló por gravedad y se dejó fluir la solución salina al 0.9% por 15 minutos aproximadamente (volumen de 250ml). Al finalizar se procedió a la fijación de los tejidos mediante el paso de paraformaldehído al 4% en solución amortiguadora de fosfatos recientemente preparadas durante 20 minutos (unos 150ml).
- El sistema de perfusión estuvo conformado por un equipo de venoclisis, con una llave de tres vías, donde una vía lleva la solución salina al 0.9% y la otra la solución de paraformaldehído al 4%.
- Finalizado el proceso de fijación (20 minutos aprox.), se procedió a la decapitación post-mortem. Con unas tijeras se cortó la cabeza de la rata empezando por la piel hasta dejar descubierto el cráneo. Con la gubia se quitó el hueso para poder extraer el cerebro, el cual se almacenó en un tubo eppendorf de 50ml con paraformaldehído al 4%; donde se mantuvo a 4°C hasta su uso (entre 30 a 60 días).

- **Corte con criostato**

Posterior a la perfusión se extrajo la masa encefálica que fue almacenada en solución fijadora. Después, se transfirieron a una solución de sacarosa al 30% durante 24 horas aproximadamente, para su protección en frío. Al finalizar este período, los cerebros se congelaron en isopentano en hielo seco (-70 °C), para después obtener cortes de tejido de 25µm de grosor con el criostato marca Leica. De cada uno de los animales se recolectaron 5

cortes coronales de acuerdo con el Atlas Páxinis (87), las coordenadas de Bregma de las áreas de estudio fueron las siguientes:



Gráfica 4. Coordenadas de Bregma de las áreas de estudio. Tomado de Paxinos G. & Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Hard Cover Edition, (2006), 6th Edition. (129).

- **Anticuerpos Anti Iba-1 para detectar Microglía**

Se utilizó el protocolo de inmunohistoquímica estandarizado por el grupo de Neurobiología comportamiento para la detección de la Microglía mediante el marcador proteína Iba-1 proteína de unión al calcio ionizada 1

Tabla 1. Protocolo Iba-1

PROTOCOLO IHQ-IBA1-ABCAM				
AC1_1:1000 (Iba 1, abcam- 153696)				
AC2_2:1000 (Antirabbit biotilnado - Vectastain PK4001)				
Item	Procedimiento	Preparación reactivos		Tiempo
		Materiales	Cantidad ul	
SESIÓN 1:				
1	Recuperación antigénica con EDTA pH 0.6%	0,37224mg de EDTA para 100ml	0,3722	10 minutos
	Lavar EDTA pH 0.6%	Lavados agua ultrapura tipo 1 (agua destilada)	5ml por tubo	15
2	Lavar anticongelante con etanol	Etanol	1000	4 minutos
	Lavar etanol con agua destilada	Agua destilada	1000	2 minutos
	Lavar agua destilada con PBS 0.1M	PBS 0.1M	1000	15 min
3	Incubar en bloqueo de peroxidasa (H2O2), agitación suave.	PBS 0.2M	500	15 min
		Metanol	200	
		Tween	2	
		Peroxidasa Hidrogena	50	
		Aforar con Agua destilada	248	
4	Lavar con PBS 0.1M/Tween al 0.1	Tween 20X	1	45 min
		PBS 0.1M	999	
5	Incubar en suero de bloqueo (o tampón de bloqueo)	Tween 0.1%	1	1 Hora
		Suero goat vector 1%	10	
		Aforar con PBS 0.1M a 1ml	989	
6	Lavar con PBS 0.1M/Tween al 0.1	Tween 20X	1	45 min
		PBS 0.1M	999	
7	Incubar con anticuerpo primario IBA-1	Ac1	1	36 horas
		Suero de bloqueo	1000	
SESIÓN 2:				
8	Lavar Ac1 en PBS 0.1M/Tween al 0.1	PBS Tween 0.1%	1000	45 min
9	Incubar con anticuerpo secundario biotilnado (Kit Vectastain, vector)	Ac2	2	2 Horas
		PBS Tween 0.1%	1000	
10	Lavar Ac2 con PBS 0.1M	PBS 0.1M	1000	45 min
11	Lavar con PBS 0.01M	PBS 0.01M	1000	5min
12	Incubar con complejo AB (Kit Vectastain, Vector)	A	9	1 Hora y 30min
		B	9	
		PBS 0.1M	982	
13	Lavar con PBS 0.01M	PBS 0.01M	1000	12min
14		Buffer (2 gotas)	5	2 a 10 min

	Aplicar DAB (Diaminobenzidina, Peroxidasa substrate Kit DAB, Vector)	DAB (4 gotas)	5	
		Hydrogeno peroxide (2 gotas)	5	
15	Lavar DAB con PBS 0,01M	PBS 0.01M	1000	15 MIN
16	Montar en porta objetos			

- **Cuantificación de las células inmuno marcadas**

Todas las imágenes fueron capturadas con un microscopio óptico (Carl Zeiss-AxioVert 40 CFL) y con cámara digital con el programa ZEN 2.3. Los sitios neuroanatómicos se identificaron con la ayuda del atlas de cerebro de rata de Paxinos (Paxinos y Watson, 2007). La cuantificación de la expresión de Iba-1 para el Área tegmental ventral, Núcleo Accumbens, Corteza cingulada anterior, Hipocampo, Amígdala y corteza prefrontal se realizó a través del software específico Image-J. Se tomaron 3 fotografías en cada región, por individuo. El conteo de las células inmunorreactivas para Iba-1 se realizó de manera manual a través del software específico Image-J. Para cada sujeto de todos los grupos se tomaron 3 fotos de las regiones inmunomarcadas. Como control de sesgo, otro investigador que no tenía conocimiento de las muestras de los grupos experimentales, repitió el conteo.

- **Análisis morfológico**

Se realizó con el software específico Image-J y bajo la técnica de tamaño del soma, número puntos de rama, número de ramas primarias y longitud de las ramas, para lo cual, se escogieron 3 a 5 células por área y sujeto tomadas con el objetivo de 40X. Se seleccionaron células teniendo en cuenta que no se encontraran yuxtapuestas con otras. Se realizó una conversión de la imagen a escala de grises (8 bits), la reconstrucción de la célula se hizo de forma manual y se realizó la respectiva cuantificación. Todas las imágenes utilizadas en el análisis se tomaron con el mismo microscopio y la misma configuración óptica (Banqueri et al., 2019; Bautista y Dueñas, 2012).

6.3.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico para la cuantificación de las células inmuno marcadas, para identificar la morfológicas y concentración de la corticosterona, se realizó determinando si existían diferencias estadísticamente significativas intergrupos (control vs experimental) para posteriormente realizar comparación de medianas de los grupos estudiados.

Se aplicaron dos pruebas estadísticas para comprobar los supuestos de normalidad: el Test de Shapiro Wilk para determinar la distribución de los datos y el Test de Levene para analizar las varianzas. Para las comparaciones de los grupos en los factores estudiados, que no cumplían con los supuestos de normalidad se realizó el análisis estadístico con la prueba no paramétrica Kruskal Wallis (KW). Para los datos que cumplieron con los supuestos se aplicó un ANOVA (A) de dos vías con los factores Crianza (No separados o Separados) y vivienda (Estándar o Ambiente enriquecido) (Ver Anexo 1). El análisis se realizó con el software estadístico R, la significancia estadística se consideró como $p < 0,05$ para todos los análisis y para identificar a que factor se le atribuyen las diferencias, se realizaron comparaciones *post hoc* (Tukey HSD). Los datos se presentan en graficas box plot o cajón de bigotes elaboradas con este mismo programa, con las cuales se puede visualizar la variabilidad y el comportamiento del 50% de los datos por factores y variables estudiadas.

6.4 Consideraciones éticas

Todos los procedimientos que se llevaron a cabo durante el desarrollo de esta investigación se basan estrictamente en lo estipulado por la Ley 84 de 1989, especialmente lo mencionado en el capítulo VI: *Del uso de animales vivos en experimentos e investigación*; así mismo la reglamentación estipulada en la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia, en la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, cumpliendo a cabalidad especialmente lo mencionado en Título V, en donde se mencionan los requisitos para llevar a cabo investigación biomédica con animales, siendo la presente investigación justificada en revisiones previas de artículos concernientes a modelos animales de Ambiente Enriquecido y su importancia para estudiar si es posible revertir los efectos posteriores a la separación materna durante la lactancia, así como, su importancia para la prevención y control de la salud humana y para el avance del conocimiento biológico acerca de los efectos del estrés

neonatal, el ambiente enriquecido en las áreas de estudio. Para el desarrollo de esta investigación se seleccionaron y adquirieron legalmente ratas de la cepa Wistar, de las cuales se hizo uso del mínimo número requerido (mencionado en el apartado “Método”) para obtener resultados científicamente válidos y se mantuvieron en adecuadas condiciones sanitarias cumpliendo las reglamentaciones en vigencia. Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, Acta CB-FMVZ-UN-035-19 del 11 de septiembre de 2019, la cual se adjunta al final del documento.

6. Resultados

7.1 Disminución de los niveles de corticosterona en plasma

Respecto a si el ambiente enriquecido posterior a la separación materna genera efectos sobre los niveles de corticosterona, no se encontraron cambios significativos en la interacción de los factores crianza: vivienda en hembras (KW, grupo SAH vs SEH, $p=0.48$), ni machos (KW, grupo SAH vs SEH, $p=0.453$) (Gráfico 5A). Referente a los efectos de la separación materna por sí sola, se encontró en el factor crianza una disminución significativa en el nivel de corticosterona en los machos (KW, SEH vs NEH, $p= 0.001$) (Gráfico 5B). En cuanto a los niveles de corticosterona debido al ambiente enriquecido por sí solo (factor vivienda) se evidenció una disminución significativa en hembras (KW, NAH vs NEH, $p=0.003$) (Gráfico 5C).

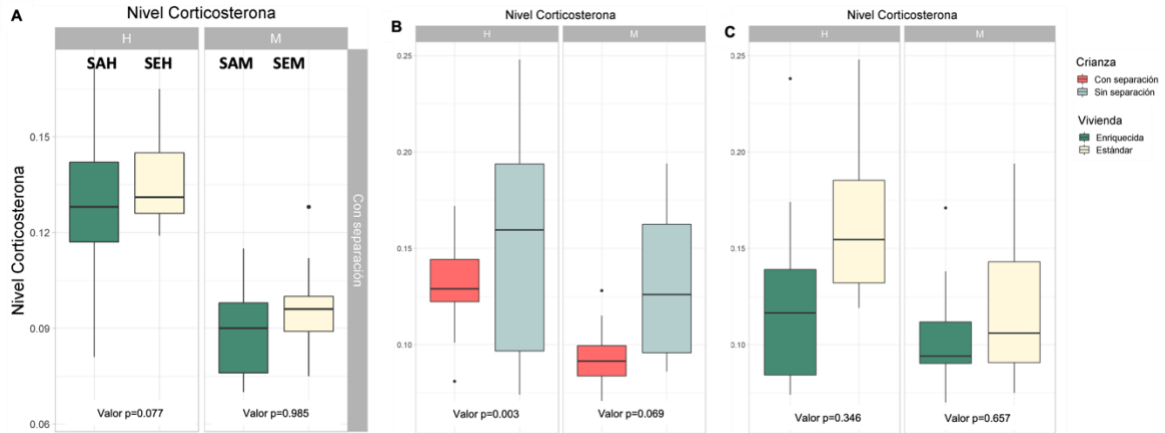
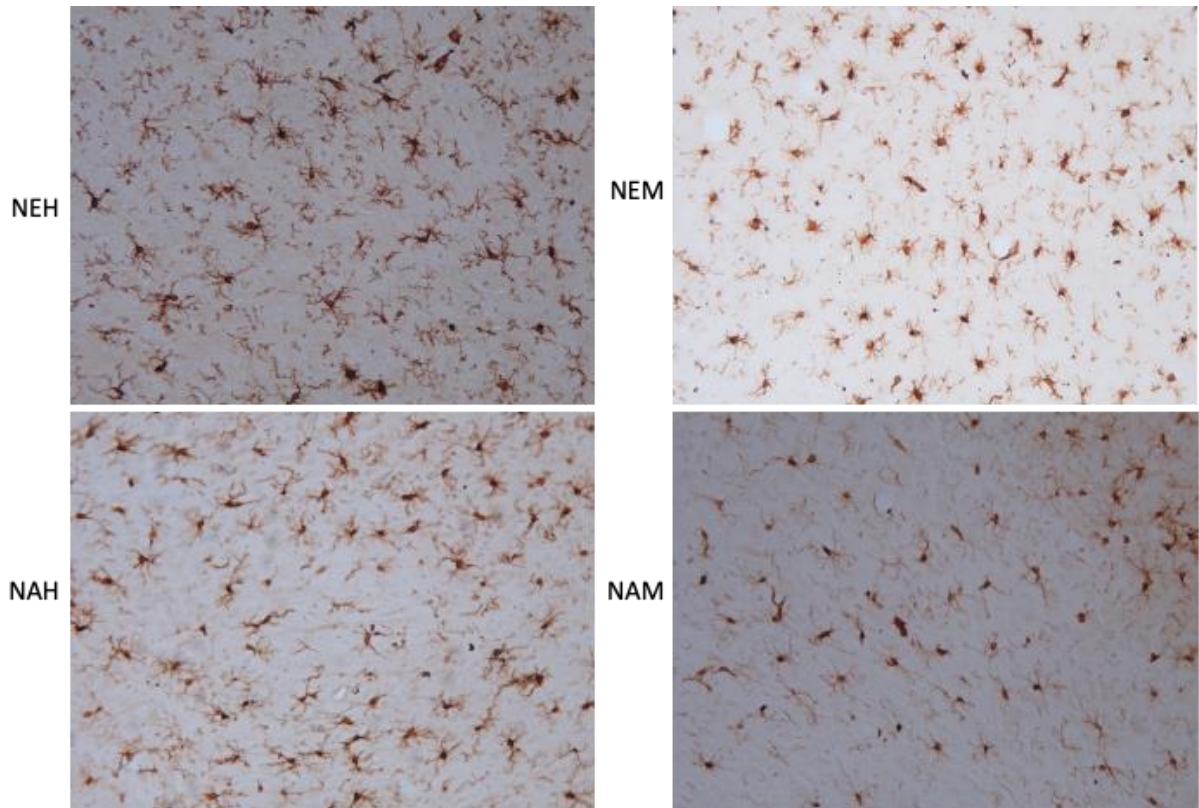


Gráfico 5. Niveles de corticosterona. Comparación de medias \pm . **A.** Interacción Factor de crianza vs vivienda. **B** Factor de crianza. **C.** Factor vivienda. **NEH** (No separadas-Estándar Hembras; n=8), **NAH** (No separadas- A. enriquecido- Hembras; n=8); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; n=8); **SAH** (Separadas-A.enriquecido- Hembras; n=8). **NEM** (No separadas-Estándar-Machos; n=8); **NAM** (No separados- A. enriquecido-Machos; n=8); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; n=8), **SEM** (Separadas-Estándar-Machos; n=8); **SAM** (Separadas-A.enriquecido- Machos; n=8).

7.2 Diferencias en el número de células positivas para Iba-1

7.2.1 El AE posterior a la SMDL no afecta el número de células positivas para Iba-1 en el Área tegmental ventral (VTA por sus siglas en ingles)

Para identificar la presencia de microglías reactivas se evaluó el número de células positivas para Iba 1 en VTA.



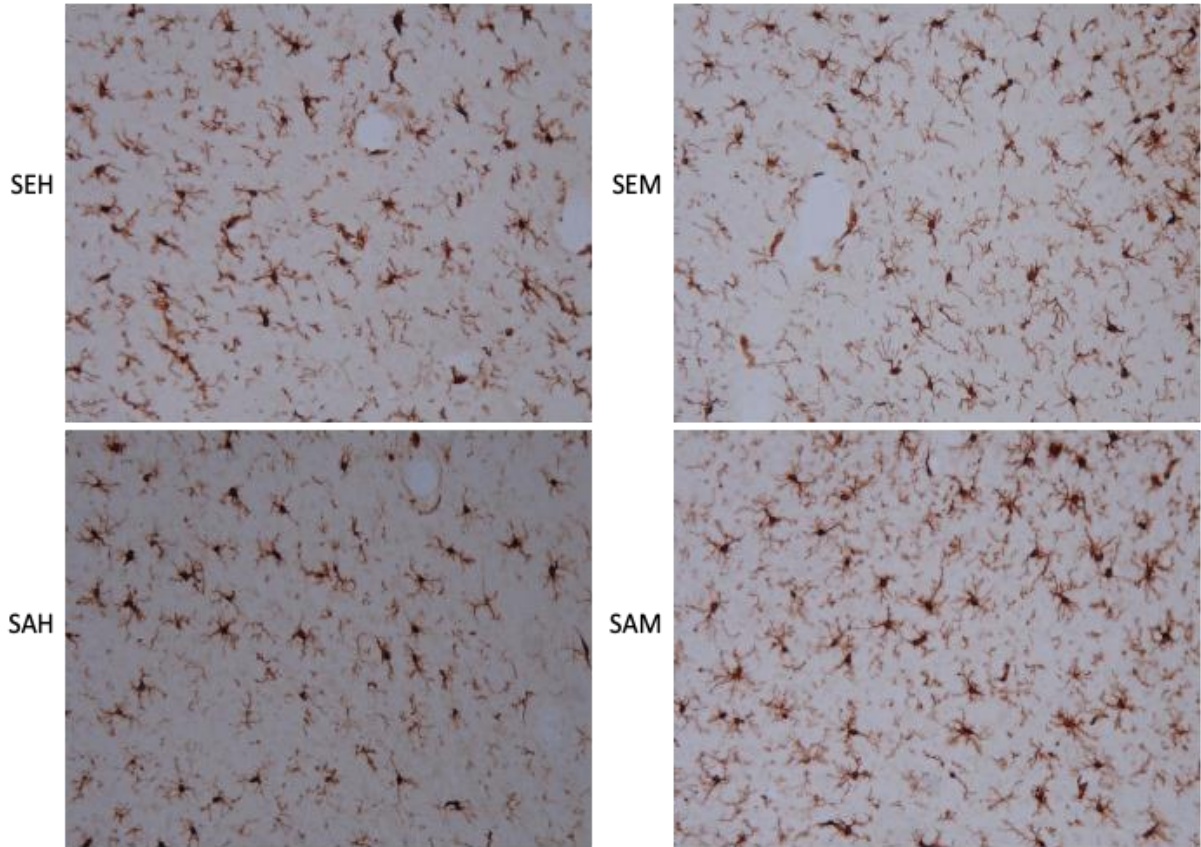


Imagen 3. Imágenes representativas de la expresión de Iba 1 en VTA. NEH (No separados-Estándar hembras). **NEM** (No separados-Estándar machos). **NAH** (No separados-Ambiente enriquecido hembras). **NAM** (No separados-Ambiente enriquecido machos). **SEH** (Separados-Estándar hembras). **SEM** (Separados-Estándar machos). **SAH** (Separados-Ambiente enriquecido hembras). **SAM** (Separados-Ambiente enriquecido). Fotografías tomadas a un aumento óptico de 10X, cortes de 25um.

El ANOVA realizado mostró unas diferencias estadísticamente significativas en el número de células positivas para Iba 1 para los siguientes factores: para la interacción entre los factores crianza:vivienda, se presentó un aumento significativo en el número de células en machos ($F=22.158$, $p<0$) y el *post hoc* no mostró cambios significativos en el grupo SAM con respecto a su grupo control SEM ($F=20.060$, $p=0,378$) (Gráfico 6A). En el factor crianza no se presentaron cambios significativos ($F=0.452$, $p=0,506$), pero al interactuar con un ambiente estándar se evidenció una disminución del número de células con respecto al grupo control ($F=-4.939$, $p=0.003$) (Gráfico 6B). En el factor vivienda se evidenció una disminución significativa ($F=5.768$, $p=.023$) (Gráfico 6C).

En hembras, la interacción entre los factores crianza:vivienda mostró una disminución significativa en el número de células ($F=5.311$, $p=0.028$), sin embargo, este cambio no

obedece a la interacción del ambiente enriquecido posterior a la separación donde los grupos SAH vs SEH no obtuvieron cambios significativos ($F=11.887$, $p=0,972$) (Gráfico 6A). Respecto al factor crianza, este no evidenció cambios significativos por sí solo ($F=3.194$, $p=0,084$), no obstante, sí mostró diferencias disminuyendo el número de células cuando esta condición interactuaba con un ambiente estándar SEH vs NEH (*Post hoc*, $F=-0.612$, $p=0.034$) (Gráfico 6B). Lo mismo ocurrió con el factor vivienda que por sí solo no generó cambios significativos ($F=2.867$, $p=0.101$), pero al interactuar con un ambiente estándar disminuyó el número de celular respecto al grupo control (*Post hoc*, $F=0.362$, $p=0.040$) (Gráfico 6C).

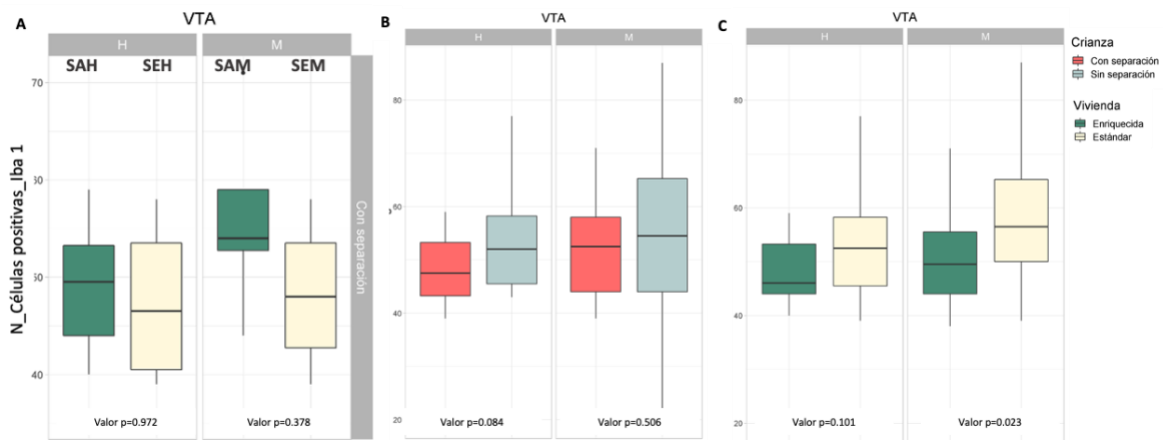


Gráfico 6. Expresión de células positivas para Iba 1 en VTA. Comparación de medias \pm sobre VTA. **A.** Interacción Factor de crianza vs vivienda. **B** Factor de crianza. **C.** Factor vivienda. **NEH** (No separadas-Estándar Hembras; n=8), **NAH** (No separadas- A. enriquecido- Hembras; n=8); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; n=8); **SAH** (Separadas-A.enriquecido- Hembras; n=8). **NEM** (No separadas- Estándar-Machos; n=8); **NAM** (No separados- A. enriquecido-Machos; n=8); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; n=8), **SEM** (Separadas-Estándar-Machos; n=8); **SAM** (Separadas-A.enriquecido- Machos; n=8).

7.2.2 El AE posterior a la SMDL aumenta el número de células positivas para Iba-1 en el Núcleo Accumbens (NAc) en machos.

Para identificar la presencia de microglías reactivas se evaluó el número de células positivas para Iba1 en NAc.

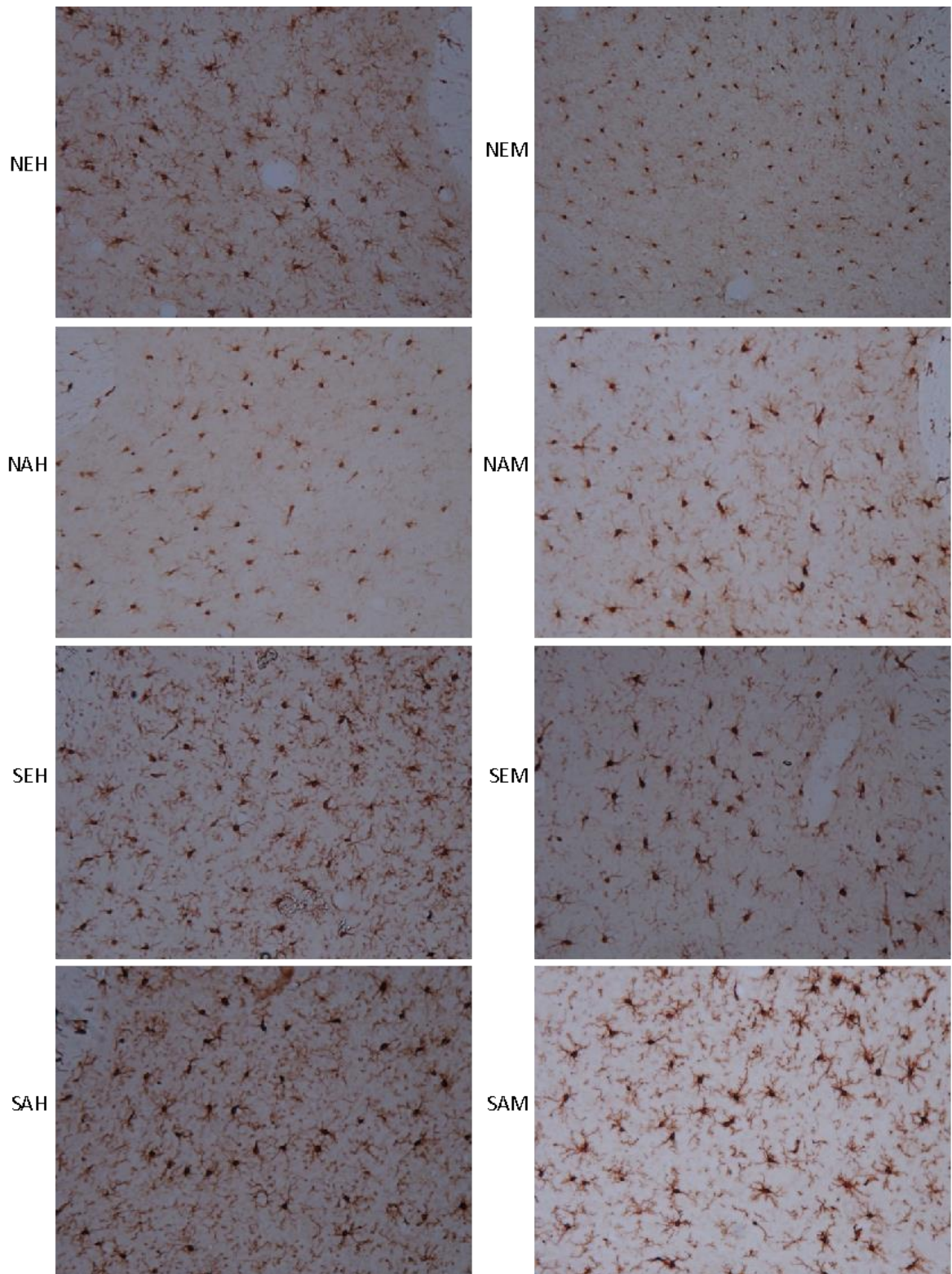


Imagen 4. Imágenes representativas de la expresión de Iba 1 en NAc. NEH (No separados-Estándar hembras). **NEM** (No separados-Estándar machos). **NAH** (No separados-Ambiente enriquecido hembras). **NAM** (No separados-Ambiente enriquecido machos). **SEH** (Separados-Estándar hembras). **SEM** (Separados-Estándar machos). **SAH** (Separados-Ambiente enriquecido hembras). **SAM** (Separados-Ambiente enriquecido). Fotografías tomadas a un aumento óptico de 10X, cortes de 25um.

Se realizó un ANOVA para el grupo de los machos, que mostró diferencias estadísticamente significativas. El número de células positivas para Iba 1 para la interacción del factor crianza aumentó ($p < 0$), mostrando el *post hoc* un incremento en el grupo SAM con respecto a su grupo control SEM ($p = 0,009$) (Gráfico 7A). En la condición de crianza no se encontraron cambios significativos (NEM+NAM vs SEM+SAM, $p = 0,577$) (Gráfico 7B).

Para las hembras se aplicó la prueba Kruskal Wallis que mostró diferencias estadísticamente significativas en el factor vivienda aumentando el número de células positivas para Iba 1 (NEH+SEH vs NAH+SAH, $p = 0,035$) (Gráfico 7C). En la interacción entre el factor crianza:vivienda no se encontraron cambios significativos ($p = 0,324$) (Gráfico 7A) y tampoco en el factor de crianza (NEH+NAH vs SEH+SAH, $p = 0,365$) (Gráfico 7B).

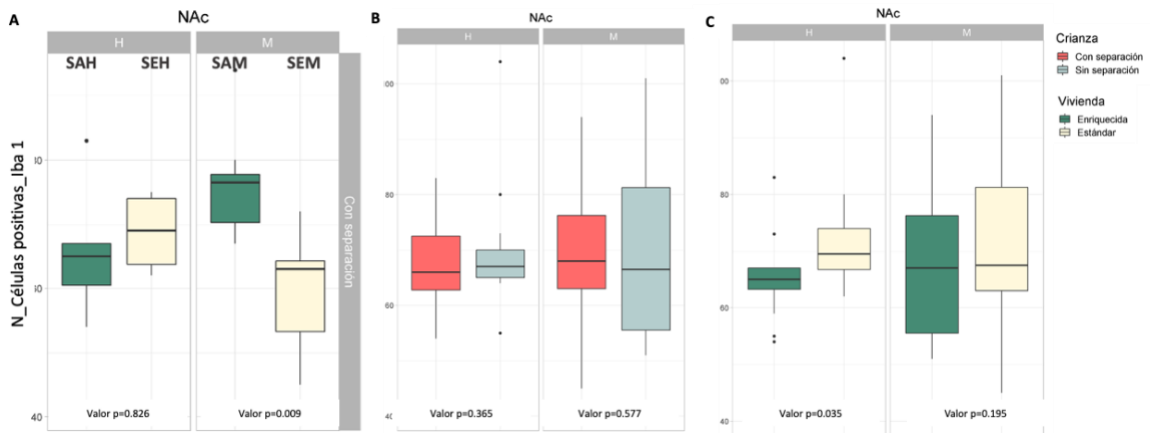


Gráfico 7. Expresión de células positivas para Iba 1 en NAc. Comparación de medias \pm sobre NAc. **A.** Interacción Factor de crianza vs vivienda. **B** Factor de crianza. **C.** Factor vivienda. **NEH** (No separadas-Estándar Hembras; n=8), **NAH** (No separadas- A. enriquecido- Hembras; n=8); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; n=8); **SAH** (Separadas-A.enriquecido- Hembras; n=8). **NEM** (No separadas-Estándar-Machos; n=8); **NAM** (No separados- A. enriquecido-Machos; n=8); **SEM** (Separadas-Estándar- Machos; n=8); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; n=8), **SEM** (Separadas-Estándar-Machos; n=8); **SAM** (Separadas-A.enriquecido- Machos; n=8).

7.2.3 El AE posterior a la SMDL no afectó el número de células positivas para Iba-1 en el Hipocampo

Para identificar la presencia de microglías reactivas se evaluó el número de células positivas para Iba 1 en el subcampo CA1, CA2, CA3 y Giro dentado (GD).

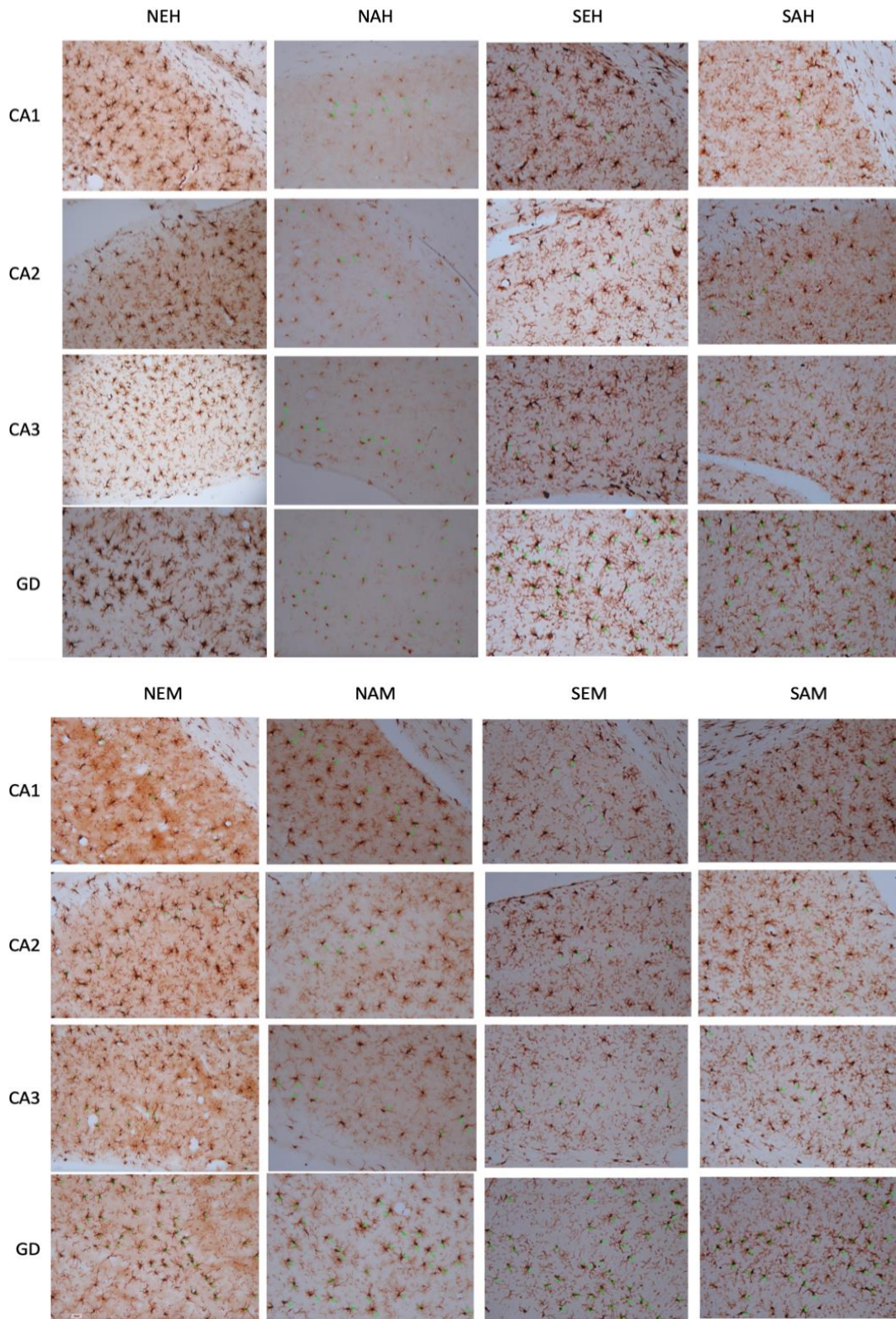


Imagen 5. Imágenes representativas de la expresión de Iba 1 en Hipocampo. NEH (No separados-Estándar hembras). NEM (No separados-Estándar machos). NAH (No separados-Ambiente enriquecido hembras). NAM (No separados-Ambiente enriquecido machos). SEH (Separados-Estándar hembras). SEM (Separados-Estándar machos). SAH (Separados-Ambiente enriquecido hembras). SAM

(Separados-Ambiente enriquecido). Fotografías tomadas a un aumento óptico de 10X, cortes de 25um.

El ANOVA realizado para CA1 mostró unas diferencias estadísticamente significativas en el número de células positivas para Iba 1 para los siguientes factores. En hembras, la interacción del factor crianza:vivienda no presentó cambios significativos ($p=0.855$. *Post hoc* grupo SA vs SE, $p=0.285$) (Gráfico 8A). El factor de crianza evidenció diferencias significativas ($p=0.000$), sin embargo, en el *post hoc* el grupo de separación materna que interactúa con el ambiente estándar no tuvo cambios significativos ($p=0.285$) (Gráfico 8B). En el factor de vivienda si se presentaron diferencias significativas, pero de acuerdo con el *post hoc*, el grupo de No separado que interactúa con el A. enriquecido no presentó cambios ($p=0.416$) (Gráfico 8C). En machos, la interacción entre el factor de crianza:vivienda no tuvo cambios significativos ($p=0.097$) (Gráfico 8A), pero el factor de crianza si tuvo diferencias significativas ($p=0.020$) y en el *post hoc* de la interacción de los factores crianza:vivienda, el grupo SEM vs NEH disminuyó significativamente el número de células ($p=0.030$) (Gráfico 8B). El factor vivienda tampoco tuvo cambios significativos ($p=0.0971$) (Gráfico 8C).

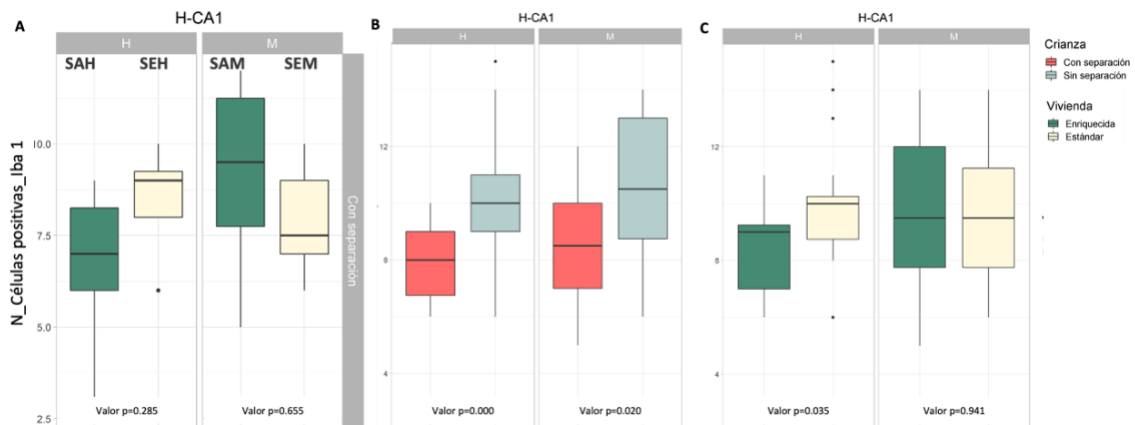


Gráfico 8. Expresión de células positivas para Iba 1 en CA1. Comparación de medias \pm sobre CA1. **A.** Interacción Factor de crianza vs vivienda. **B** Factor de crianza. **C.** Factor vivienda. **NEH** (No separadas-Estándar Hembras; n=8), **NAH** (No separadas- A. enriquecido- Hembras; n=8); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; n=8); **SAH** (Separadas-A.enriquecido- Hembras; n=8). **NEM** (No separadas- Estándar-Machos; n=8); **NAM** (No separados- A. enriquecido-Machos; n=8); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; n=8), **SEM** (Separadas-Estándar-Machos; n=8); **SAM** (Separadas-A.enriquecido- Machos; n=8).

El ANOVA realizado para CA2 en hembras no mostró diferencias estadísticamente significativas en el número de células positivas para Iba 1 en la interacción de los factores crianza:vivienda ($p=0.102$) (Gráfico 9A), el factor crianza ($p=0.060$) (Gráfico 9B) y factor

vivienda ($p=0.102$) (Gráfico 9C). En machos tampoco se evidenciaron cambios significativos en ninguno de las interacciones crianza:vivienda ($p=0.436$) (Gráfico 9A), el factor crianza ($p=0.232$) (Gráfico 9B) y el factor vivienda ($p=0.109$) (Gráfico 9C).

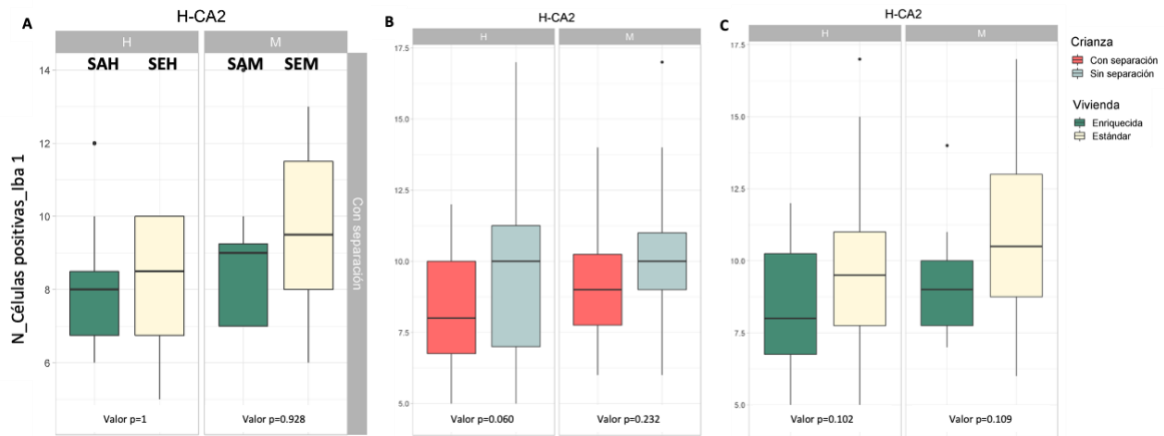


Gráfico 9. Expresión de células positivas para Iba 1 en CA2. Comparación de medias \pm sobre CA2. **A.** Interacción Factor de crianza vs vivienda. **B** Factor de crianza. **C.** Factor vivienda. **NEH** (No separadas-Estándar Hembras; n=8), **NAH** (No separadas- A. enriquecido- Hembras; n=8); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; n=8); **SAH** (Separadas-A.enriquecido- Hembras; n=8). **NEM** (No separadas- Estándar-Machos; n=8); **NAM** (No separados- A. enriquecido-Machos; n=8); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; n=8), **SEM** (Separadas-Estándar-Machos; n=8); **SAM** (Separadas-A.enriquecido- Machos; n=8).

El Kruskal Wallis realizado para CA3 mostró unas diferencias estadísticamente significativas en el número de células positivas para Iba 1 para los siguientes factores. Para la interacción entre los factores crianza:vivienda, el grupo No separados y A.enriquecido respecto a tu control no tuvieron cambios significativos (SAH:SEH $p:0.553$) (Gráfico 10A). Para el factor de crianza el grupo Separados disminuyó significativamente el número de células con respecto a su grupo control (NEH:NAH vs SEH:SAH, $p=0.006$) (Gráfico 10B). En el factor vivienda no se presentaron cambios significativos (NEH:SEH vs NAH:SAH, $p=0.064$) (Gráfico 10C). En machos, en ninguno de los factores se presentaron cambios estadísticamente significativos, ni en la interacción entre los factores crianza:vivienda (SAM vs SEM, $p=0.534$) (Gráfico 10A), ni en el factor de crianza (NEM:NAM vs SEM:SAM, $p=0.363$) (Gráfico 10B), ni en el factor de vivienda(NEM:SEM vs NAM:SAM, $p=0.384$) (Gráfico 10C).

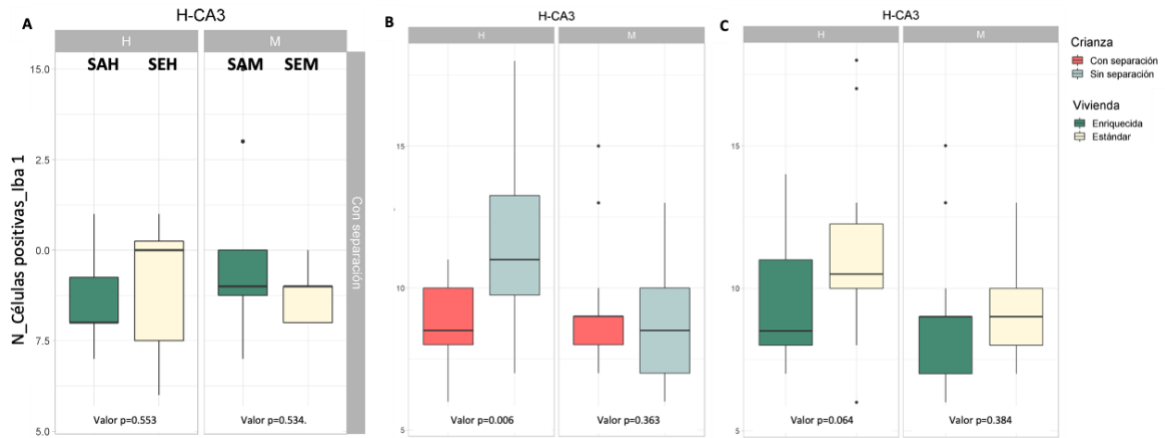
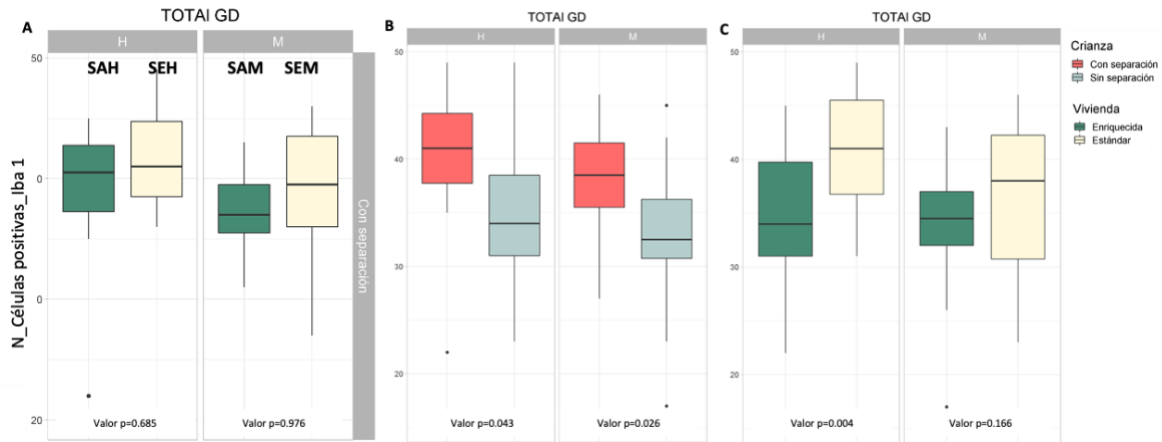


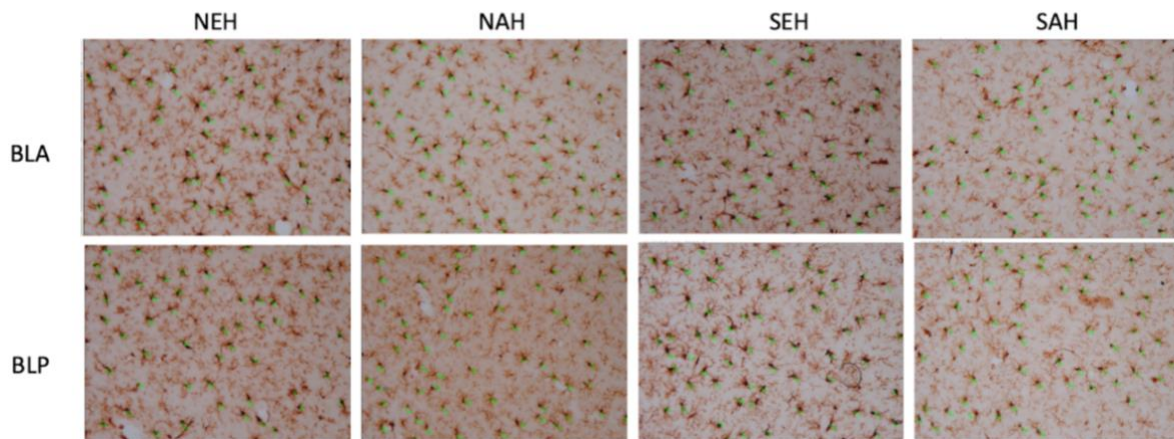
Gráfico 10. Expresión de células positivas para Iba 1 en Hipocampo CA3. Comparación de medias \pm sobre CA3. **A.** Interacción Factor de crianza vs vivienda. **B** Factor de crianza. **C.** Factor vivienda. **NEH** (No separadas-Estándar Hembras; n=8), **NAH** (No separadas- A. enriquecido- Hembras; n=8); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; n=8); **SAH** (Separadas-A.enriquecido- Hembras; n=8). **NEM** (No separadas-Estándar-Machos; n=8); **NAM** (No separados- A. enriquecido-Machos; n=8); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; n=8), **SEM** (Separadas-Estándar-Machos; n=8); **SAM** (Separadas-A.enriquecido- Machos; n=8).

El ANOVA aplicado para el área GD mostró unas diferencias estadísticamente significativas del número de células positivas para Iba 1 en algunos de los factores estudiados. En las hembras, la interacción de los factores crianza:vivienda no fue significativo ($p=0.141$) (Gráfico 11A), el factor crianza presento cambios significativos ($p=0.043$), no obstante en el *Post hoc* del grupo No separados que interactúa con el A.estándar respecto a su control no tuvo cambios significativos (SEH vs NEH, $p:0.973$) (Gráfico 11B). El factor de vivienda también presentó cambios significativos ($F=9.508$, $p=0.004$) y en el *Post hoc*, el grupo No separado que interactúa con el A.enriquecido respecto a su control disminuyó significativamente el número de microglías (NAH vs NEH, $p:0.015$) (Gráfico 11C). En los machos, no se presentaron cambios estadísticamente significativos en la interacción de los factores de crianza:vivienda ($p: 0.407$) (Gráfico 11A), pero sí en el factor de crianza ($p=0.026$), sin embargo, en el *post hoc* cuando se observa la interacción entre el grupo Separados con A. estándar respecto a su grupo control no se evidencian cambios significativos ($p=0.712$) (Gráfico 11B). En el factor vivienda tampoco se encontraron cambios significativos ($p=0.166$) (Gráfico 11C).



7.2.4 El AE posterior a la SMDL no afecta el número de células positivas para Iba-1 en la Amígdala

Para identificar la presencia de microglías reactivas se evaluó el número de células positivas para Iba 1 en los subcampos de la amígdala BLA (amígdala basolateral) y BLP (amígdala basolateral posterior).



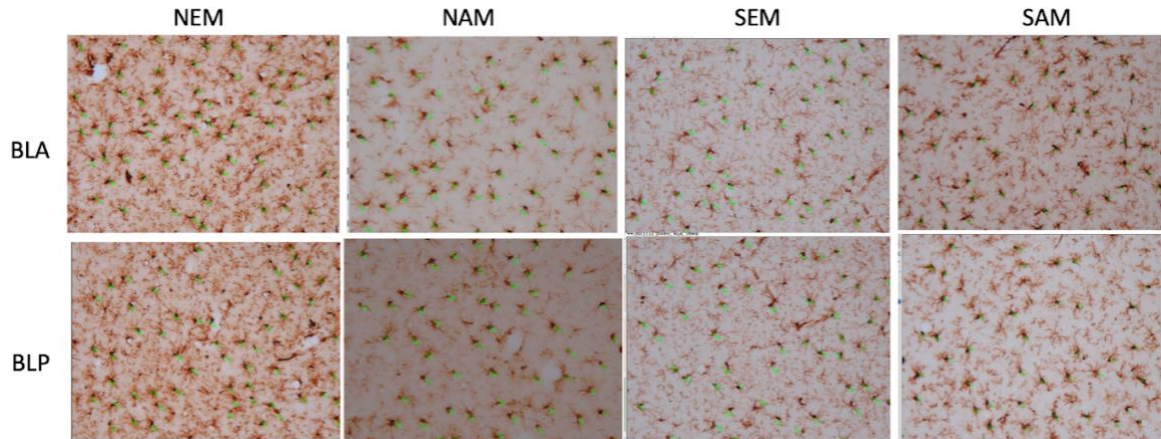


Imagen 6: Imágenes representativas de la expresión de Iba 1 en la Amígdala. NEH (No separados-Estándar hembras). NEM (No separados-Estándar machos). NAH (No separados-Ambiente enriquecido hembras). NAM (No separados-Ambiente enriquecido machos). SEH (Separados-Estándar hembras). SEM (Separados-Estándar machos). SAH (Separados-Ambiente enriquecido hembras). SAM (Separados-Ambiente enriquecido). Fotografías tomadas a un aumento óptico de 10X, cortes de 25um.

En el área BLA (por sus siglas en inglés), se realizó la prueba Kruskal Wallis para las hembras quienes no mostraron cambios significativos. En la interacción de los factores crianza:vivienda no se encontraron cambios ($p=0.173$) (Gráfico 12A). Tampoco en el factor crianza ($p=0.186$) (Gráfico 12B), ni el factor vivienda ($p=0.734$) (Gráfico 12C). Para los machos, se realizó un ANOVA y la interacción entre los factores crianza:vivienda no mostraron cambios significativos ($p=0.575$) (Gráfico 12A). Al ver los efectos en el factor de crianza tampoco se encontró cambios significativos ($p=0.724$) (Gráfico 12B), ni en el factor vivienda ($p=0.769$) (Gráfico 12C).

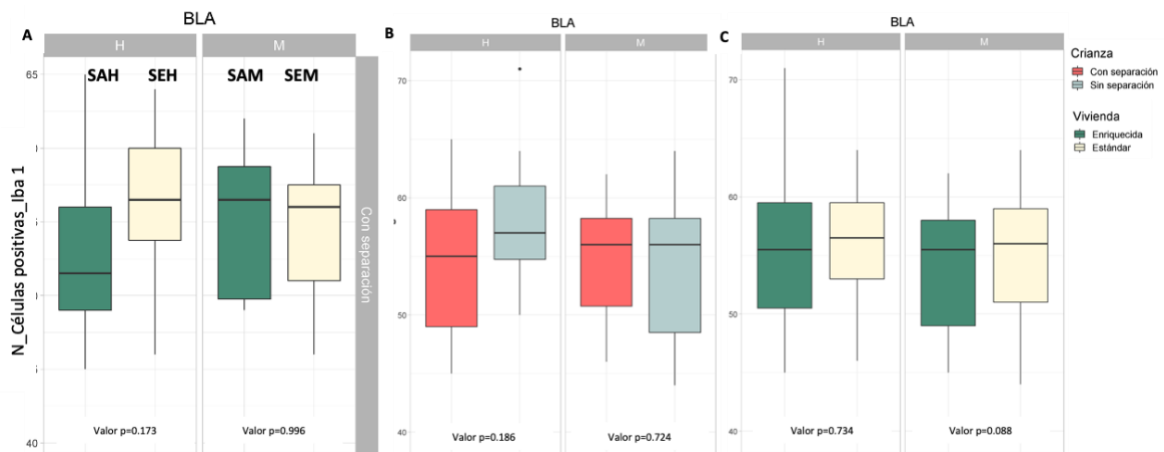


Gráfico 12. Expresión de células positivas para Iba 1 en Hipocampo BLA. Comparación de medias \pm sobre BLA. **A.** Interacción Factor de crianza vs vivienda. **B** Factor de crianza. **C.** Factor vivienda. NEH (No separadas-Estándar Hembras; n=8), NAH (No separadas-A. enriquecido- Hembras; n=8); SEH (Separadas-Estándar- Hembras; n=8); SAH (Separadas-A.enriquecido- Hembras; n=8). NEM (No separadas-Estándar-Machos; n=8); NAM (No separados- A. enriquecido-Machos; n=8); SEM (Separadas-Estándar- Hembras; n=8), SEM (Separadas-Estándar-Machos; n=8); SAM (Separadas-A.enriquecido- Machos; n=8).

En el área BLP (por sus siglas en inglés), se realizó la prueba Kruskal Wallis para las hembras quienes no mostraron cambios significativos en la interacción de los factores crianza:vivienda ($p=0.291$) (Gráfico 13A), ni en el factor de crianza ($p=0.336$) (Gráfico 13B). En el factor vivienda si se evidenció un cambio significativo al disminuir el número de células con respecto al grupo control que vivió en condición estándar ($p=0.034$) (Gráfico 13C). Para los machos, se realizó un ANOVA que no arrojó cambios significativos en la interacción de los factores crianza:vivienda ($p=0.957$) (Gráfico 13A), factor de crianza ($p=0.306$) (Gráfico 13B) ni en el factor vivienda ($p=0.986$) (Gráfico 13C).

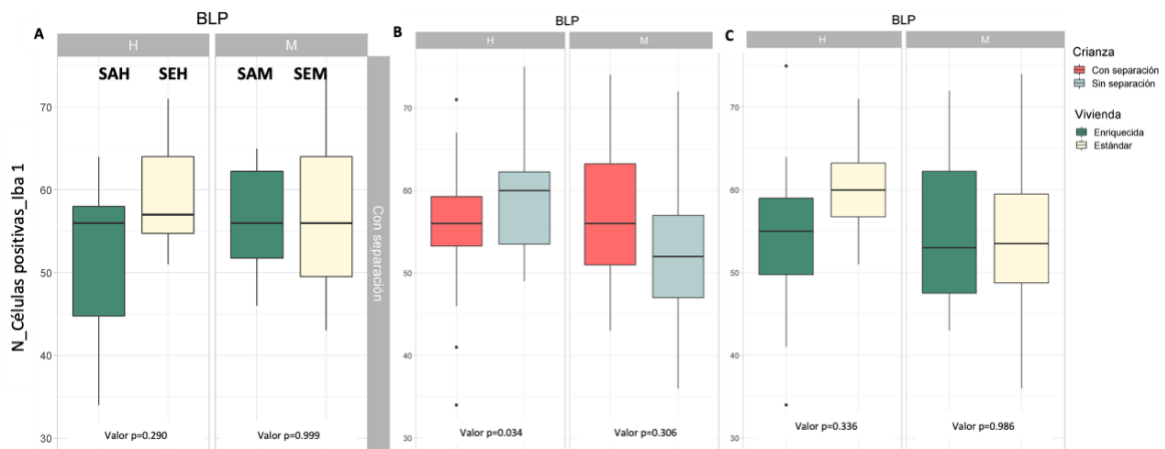


Gráfico 13. Expresión de células positivas para Iba 1 en Hipocampo BLP. Comparación de medias \pm sobre BLP. **A.** Interacción Factor de crianza vs vivienda. **B** Factor de crianza. **C.** Factor vivienda. **NEH** (No separadas-Estándar Hembras; $n=8$), **NAH** (No separadas- A. enriquecido- Hembras; $n=8$); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; $n=8$); **SAH** (Separadas-A.enriquecido- Hembras; $n=8$). **NEM** (No separadas-Estándar-Machos; $n=8$); **NAM** (No separados- A. enriquecido-Machos; $n=8$); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; $n=8$), **SEM** (Separadas-Estándar-Machos; $n=8$); **SAM** (Separadas-A.enriquecido- Machos; $n=8$).

7.2.5 En la Corteza prefrontal el AE posterior a la SMDL disminuye en IL y PrL el número de células positivas para Iba-1

Para identificar la presencia de microglías reactivas se evaluó el número de células positivas para Iba 1 en corteza cingulada anterior (Cg), corteza prelímbica (PrL) y corteza infralímbica (IL).

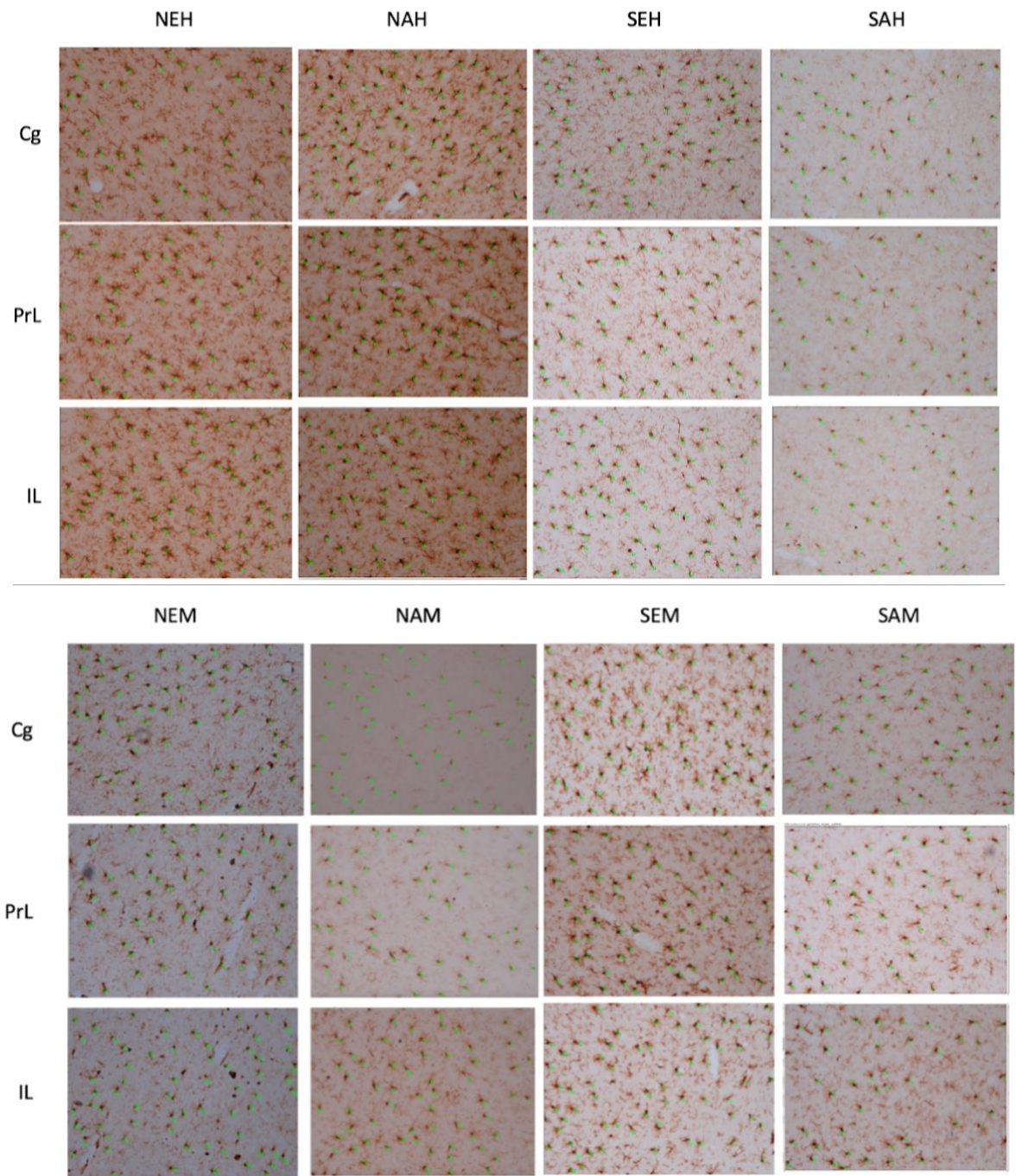
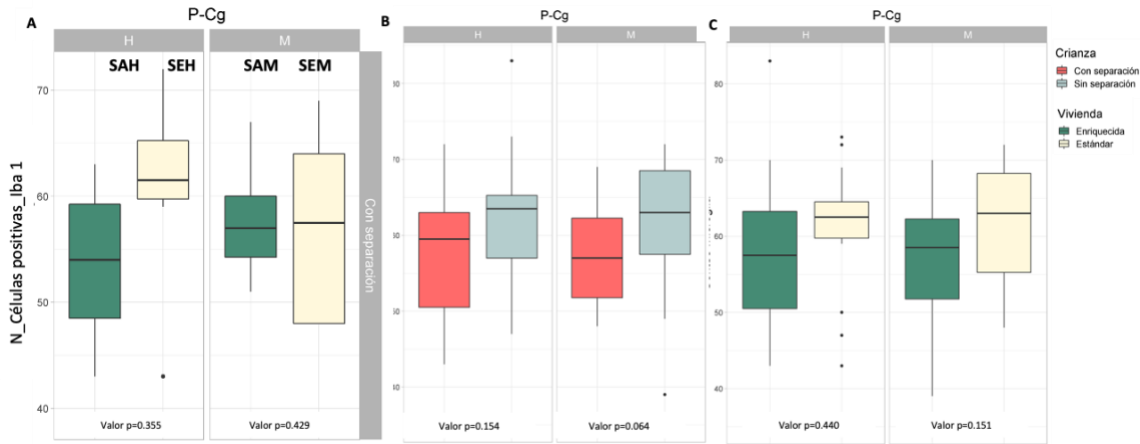


Imagen 7. Imágenes representativas de la expresión de Iba 1 en la Corteza prefrontal en las áreas Cg, PrL, IL. **NEH** (No separados-Estándar hembras). **NEM** (No separados-Estándar machos). **NAH** (No separados-Ambiente enriquecido hembras). **NAM** (No separados-Ambiente enriquecido machos). **SEH** (Separados-Estándar hembras). **SEM** (Separados-Estándar machos). **SAH** (Separados-Ambiente enriquecido hembras). **SAM** (Separados-Ambiente enriquecido). Fotografías tomadas a un aumento óptico de 10X, cortes de 25um.

Para el área Cg, se realizó en hembras un ANOVA que no mostró diferencias estadísticamente significativas en el número de células positivas para Iba 1 en hembras para los siguientes factores: interacción entre los factores crianza:vivienda ($p=0.124$; *Post hoc*

grupo SA vs SE, $F=4.651$, $p=0.355$) (Gráfico 14A), factor de crianza ($p=0.154$) (Gráfico 14B), factor de vivienda ($p=0.440$) (Gráfico 14C). En machos, se aplicó la prueba Kruskal Wallis y tampoco se encontraron cambios significativos en el número de células positivas para Iba 1 en ninguno de los factores: interacción de los factores crianza:vivienda ($p=0.958$) (Gráfico 14^a), factor de crianza ($p=0.064$) (Gráfico 14B), factor vivienda ($p=0.151$) (Gráfico 14C).



Para el área IL, se realizó un ANOVA para hembras y machos encontrando diferencias estadísticamente significativas en el número de células positivas para Iba 1 para los siguientes factores. En Hembras, la interacción entre los factores crianza:vivienda, presentó una disminución significativo en el número de células ($p=0.002$; post hoc cambios significativos en el grupo SAM con respecto a su grupo control SEM ($p=0,013$) (Gráfico 15A). En el factor crianza se presentaron cambios significativos ($p=0,003$), pero al interactuar la separación materna con un ambiente estándar no se evidenciaron cambios significativos (Post hoc, grupo SEH vs NEM, $p=998$) (Gráfico 15B). En el factor vivienda no se encontraron cambios significativos ($p=.0.214$) (Gráfico 15C). En machos, la interacción entre los factores crianza:vivienda no tuvo cambios significativos en la expresión de células positivas para Iba1 ($p=0.451$, Post hoc, grupo SAM vs SEM, $p=0.991$) (Gráfico 15A). En el factor de crianza si se presentaron cambios significativos ($p=0,001$) y en el

grupo Separados que interactúa con el ambiente estándar, respecto al grupo control, mostró diferencias significativas (SEH vs NEH, $p=0.019$). En el factor vivienda no se evidenciaron cambios significativos ($p=0.726$) (Gráfico 15C).

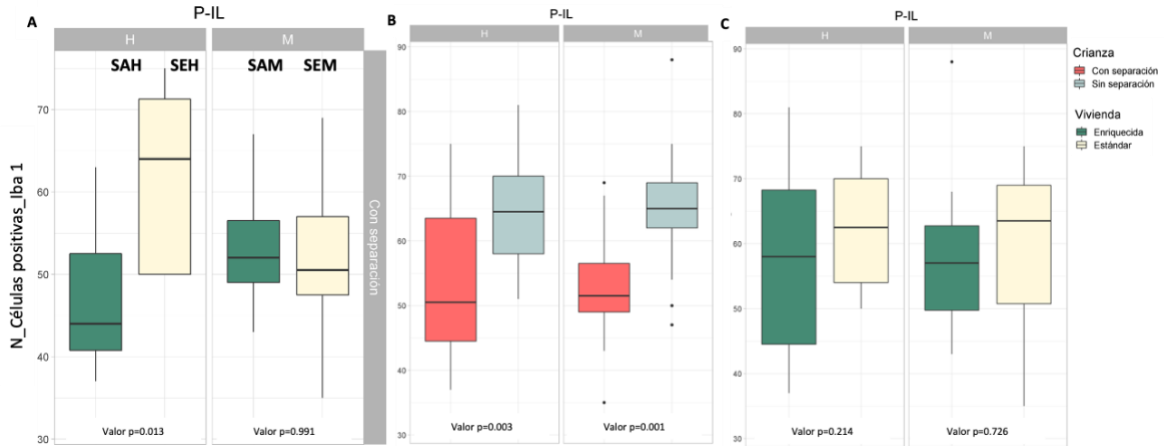


Gráfico 15. Expresión de células positivas para Iba 1 en Hipocampo IL. Comparación de medias \pm sobre IL. **A.** Interacción Factor de crianza vs vivienda. **B.** Factor de crianza. **C.** Factor vivienda. **NEH** (No separadas-Estándar Hembras; $n=8$), **NAH** (No separadas- A. enriquecido- Hembras; $n=8$); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; $n=8$); **SAH** (Separadas-A.enriquecido- Hembras; $n=8$). **NEM** (No separadas-Estándar-Machos; $n=8$); **NAM** (No separados- A. enriquecido-Machos; $n=8$); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; $n=8$), **SEM** (Separadas-Estándar-Machos; $n=8$); **SAM** (Separadas-A.enriquecido- Machos; $n=8$).

Para el área PrL, se realizó un ANOVA para hembras y machos encontrando diferencias estadísticamente significativas en el número de células positivas para Iba 1 para los siguientes factores. En Hembras se presentaron cambios significativos en la interacción entre los factores crianza:vivienda ($=0.014$), no obstante, el post hoc no mostró cambios en el grupo SAM con respecto a su grupo control SEM ($p=0,077$) (Gráfico 16A). En el factor crianza se presentaron cambios significativos (NEH:NAH vs SEH:SAH, $p=0.003$), sin embargo, cuando el factor de crianza Separados interacciona con el ambiente estándar no se muestran cambios significativos ($p=0.977$) (Gráfico 16B). En el factor vivienda no se encontraron cambios significativos ($p=0.346$) (Gráfico 16C).

En los machos no se encontraron cambios significativos en la interacción de los factores crianza:vivienda ($p=0.175$) (Gráfico 16A), factor de crianza ($p=0.069$) (Gráfico 16B) ni en el factor vivienda ($p= 0.657$) (Gráfico 16C).

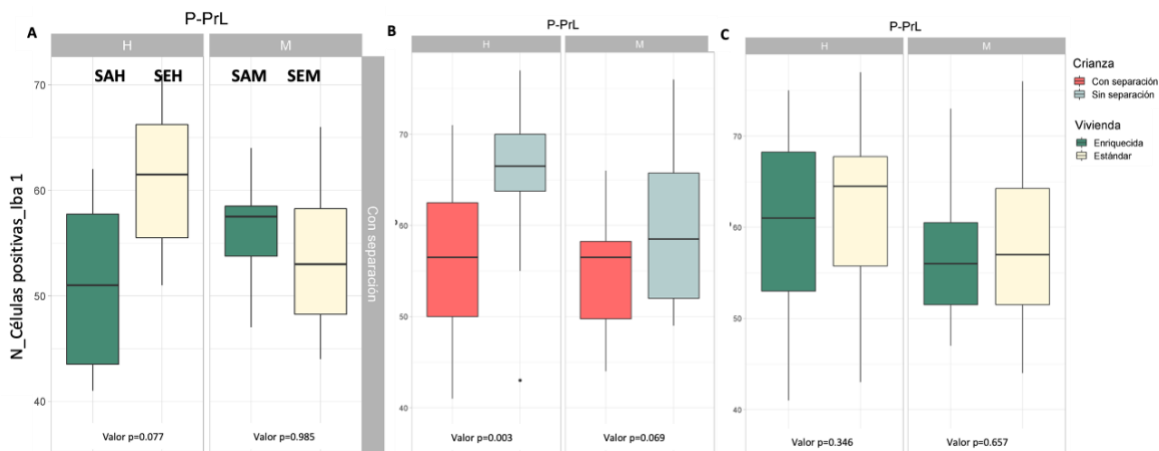


Gráfico 16. Expresión de células positivas para Iba 1 en Hipocampo PrL. Comparación de medias \pm sobre PrL. **A.** Interacción Factor de crianza vs vivienda. **B** Factor de crianza. **C.** Factor vivienda. **NEH** (No separadas-Estándar Hembras; n=8), **NAH** (No separadas- A. enriquecido- Hembras; n=8); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; n=8); **SAH** (Separadas-A.enriquecido- Hembras; n=8). **NEM** (No separadas-Estándar-Machos; n=8); **NAM** (No separados- A. enriquecido- Machos; n=8); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; n=8), **SEM** (Separadas-Estándar-Machos; n=8); **SAM** (Separadas-A.enriquecido- Machos; n=8).

7.3 Resultados morfología células positivas para Iba-1

Para identificar las variaciones morfológicas de la microglía se realizó un análisis morfológico del tamaño del soma, número de ramas primarias, número de puntos de rama y longitud de la rama presentes en las áreas de estudio.

7.3.1 El AE posterior a la SMDL genera cambios en la morfología microglial en Área tegmental ventral

La interacción de los factores crianza:vivienda en las hembras mostró una disminución estadísticamente significativa en la longitud de ramas (ANOVA, $p=0.035$; Post hoc grupo SA vs SE $p=0.033$) y No de puntos de ramas (ANOVA, $p=0.079$; no obstante el Post hoc del grupo SA vs SE fue significativo $p=0.033$) (Gráfico 17B). Los factores de crianza y vivienda por sí solos no tuvieron efectos significativos sobre las variables morfológicas estudiadas (Gráfico 17B y C). En los machos, la interacción de los factores crianza:vivienda mostró una disminución estadísticamente significativa en la longitud de ramas (KW grupo SA vs SE, $p=0.016$) y en el No de puntos de ramas (ANOVA, $p=0.004$; Post hoc del grupo SA vs SE $p=0.000$) (Gráfico 17A). Los factores de crianza y vivienda por sí solos tampoco tuvieron efectos significativos sobre las variables morfológicas estudiadas (Gráfico 17B y

C).

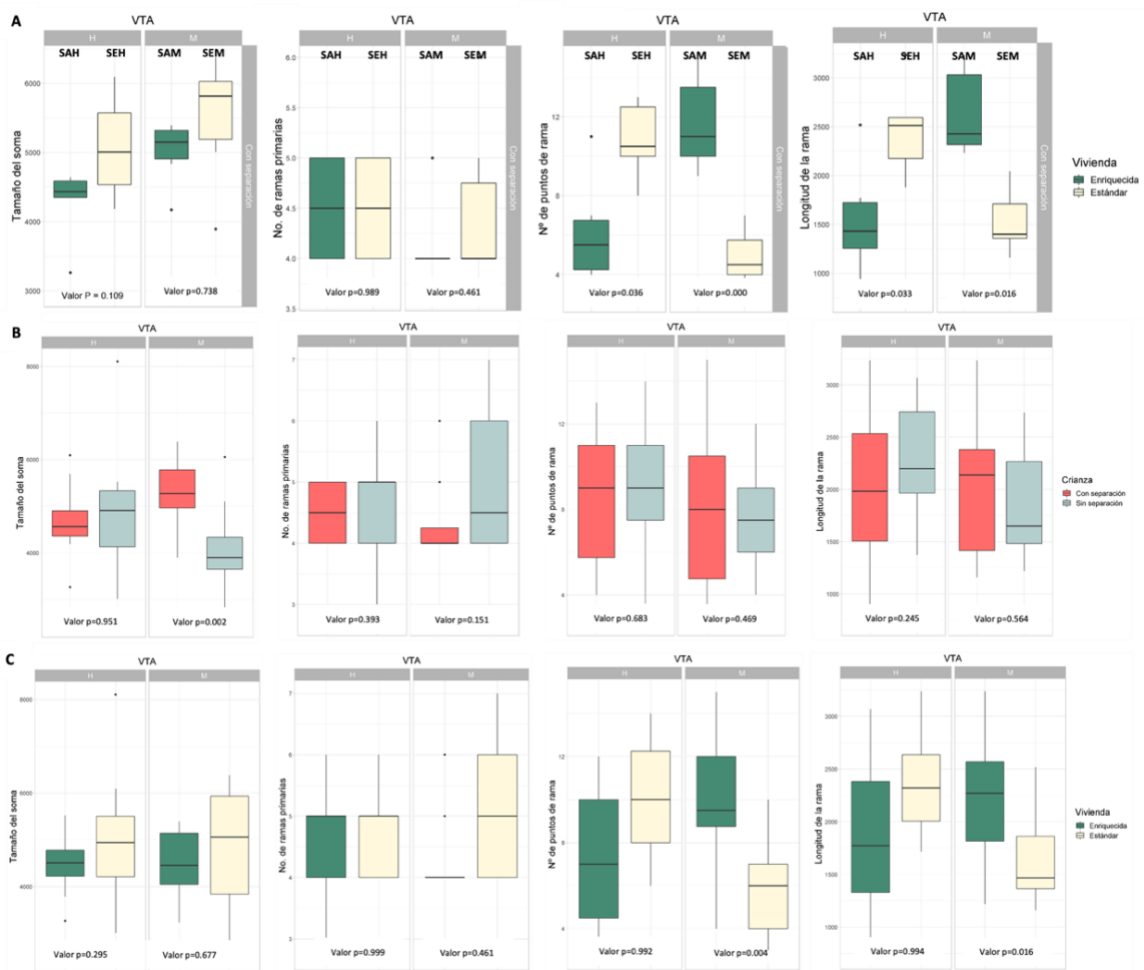


Gráfico 17. Evaluación morfológica de la microglía en VTA. Comparación de medias \pm sobre VTA **A.** Interacción Factor de crianza vs vivienda. **B** Factor de crianza. **C.** Factor vivienda. **NEH** (No separadas-Estándar Hembras; n=8), **NAH** (No separadas- A. enriquecido-Hembras; n=8); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; n=8); **SAH** (Separadas-A.enriquecido- Hembras; n=8). **NEM** (No separadas-Estándar-Machos; n=8); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; n=8), **SEM** (Separadas-Estándar-Machos; n=8); **SAM** (Separadas-A.enriquecido- Machos; n=8).

7.3.2 El AE posterior a la SMDL no afecta la morfología de la microglía en el Núcleo Accumbens (NAc)

La interacción de los factores crianza:vivienda en las hembras mostró un aumento estadísticamente significativo en el tamaño del soma (ANOVA, $p=0.008$; Post hoc grupo SA vs SE $p=0.031$), aunque la variable No de puntos de rama fue significativa (ANOVA, $p=0.047$) el *Post hoc* de la interacción del grupo SA vs SE no fueron significativos $p=0.965$) (Gráfico 18A). En el factor de crianza, se encontró una disminución significativa para la longitud de las ramas (KW, $p=0.034$) (Gráfico 18B) y en el ANOVA del factor vivienda se

presentó una disminución del tamaño del soma ($p=0.022$, *Post hoc* $p=0.004$) y en el No de ramas primarias ($p=0.004$, *Post hoc* $p=0.004$) (Gráfico 18C). Las demás características morfológicas estudiadas no tuvieron efectos significativos. En los machos, la interacción de los factores crianza:vivienda no mostró en el ANOVA diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables estudiadas: Tamaño del soma ($p=0.749$), No de ramas primarias ($p=0.688$), No de puntos de rama ($p=0.48$) y Longitud de la rama ($p=0.848$) (Gráfico 18A).

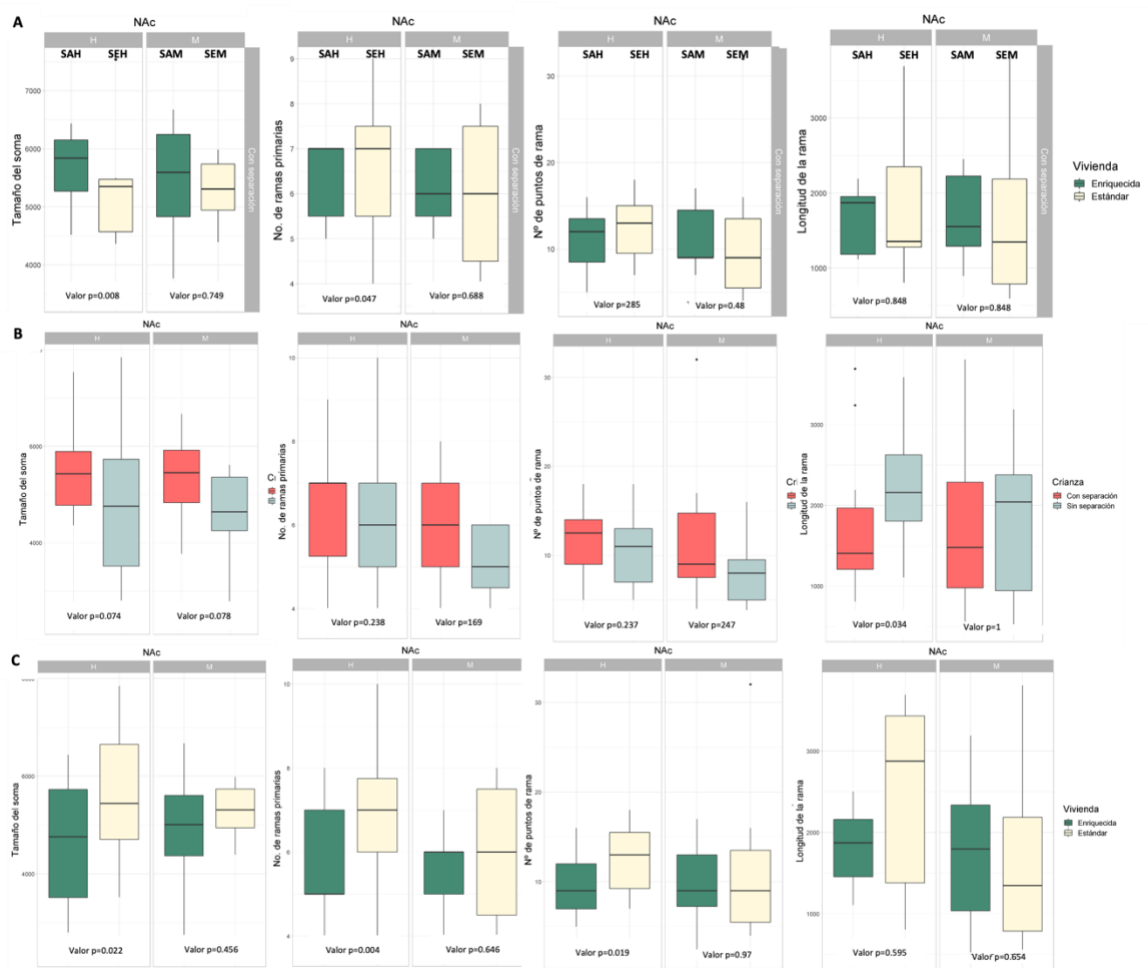


Gráfico 18. Evaluación morfológica de la microglía en NAc. Comparación de medias \pm sobre NAc. **A.** Interacción Factor de crianza vs vivienda. **B** Factor de crianza. **C.** Factor vivienda. **NEH** (No separadas-Estándar Hembras; $n=8$), **NAH** (No separadas- A. enriquecido-Hembras; $n=8$); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; $n=8$); **SAH** (Separadas-A.enriquecido- Hembras; $n=8$). **NEM** (No separadas-Estándar-Machos; $n=8$); **NAM** (No separados- A. enriquecido-Machos; $n=8$); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; $n=8$), **SEM** (Separadas-Estándar-Machos; $n=8$); **SAM** (Separadas-A.enriquecido- Machos; $n=8$).

7.3.3 El AE posterior a la SMDL genera cambios en la morfología microglial en el hipocampo (HIP)

En el área CA1 no se encontraron cambios estadísticamente significativos en las variables morfológicas del factor de interacción crianza:vivienda (Gráfico 19A), crianza (Gráfico 19B) y vivienda (Gráfico 19C) en hembras como en machos. El único resultado encontrado fue el aumento de la longitud de ramas en el factor de crianza en hembras (KW, $p=0.049$) (Gráfico 19B).

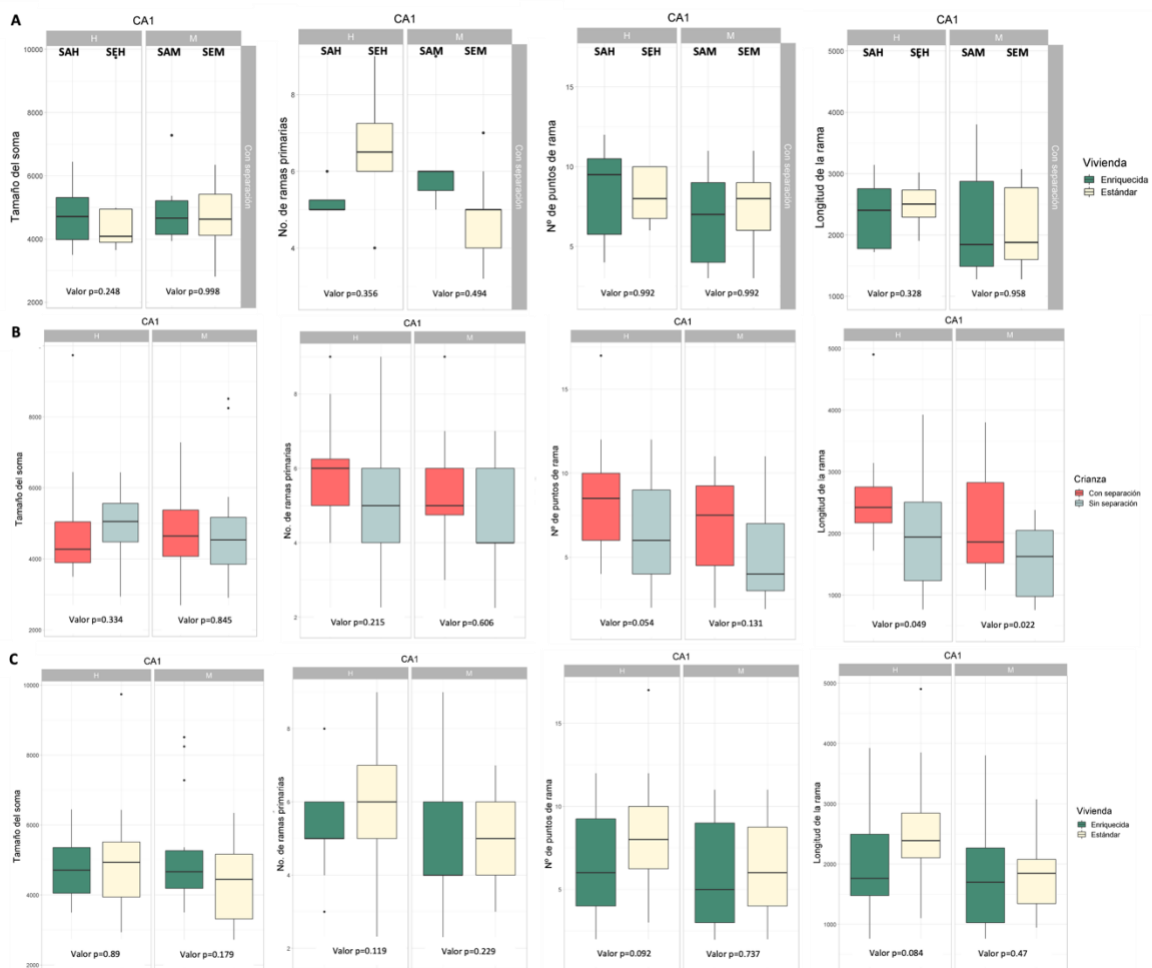


Gráfico 19. Evaluación morfológica de la microglía en CA1. Comparación de medias \pm sobre CA1. **A.** Interacción Factor de crianza vs vivienda. **B** Factor de crianza. **C.** Factor vivienda. **NEH** (No separadas-Estándar Hembras; n=8), **NAH** (No separadas- A. enriquecido-Hembras; n=8); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; n=8); **SAH** (Separadas-A.enriquecido- Hembras; n=8). **NEM** (No separadas- Estándar-Machos; n=8); **NAM** (No separados- A. enriquecido-Machos; n=8); **SEM** (Separadas-Estándar- Hembras; n=8), **SEM** (Separadas-Estándar-Machos; n=8); **SAM** (Separadas-A.enriquecido- Machos; n=8).

En el área CA2 sólo se encontraron dos cambios estadísticamente significativos. En hembras disminuyó el No de ramas primarias en el factor de vivienda (ANOVA, $p=0.120$, pero en el Post hoc el grupo de interacción NA vs NE tuvo un valor $p=0.001$ (Gráfico 20C). En machos aumento el tamaño del soma (ANOVA, $p=0.019$, *Post hoc* $p=0.012$) (Gráfico 20C).

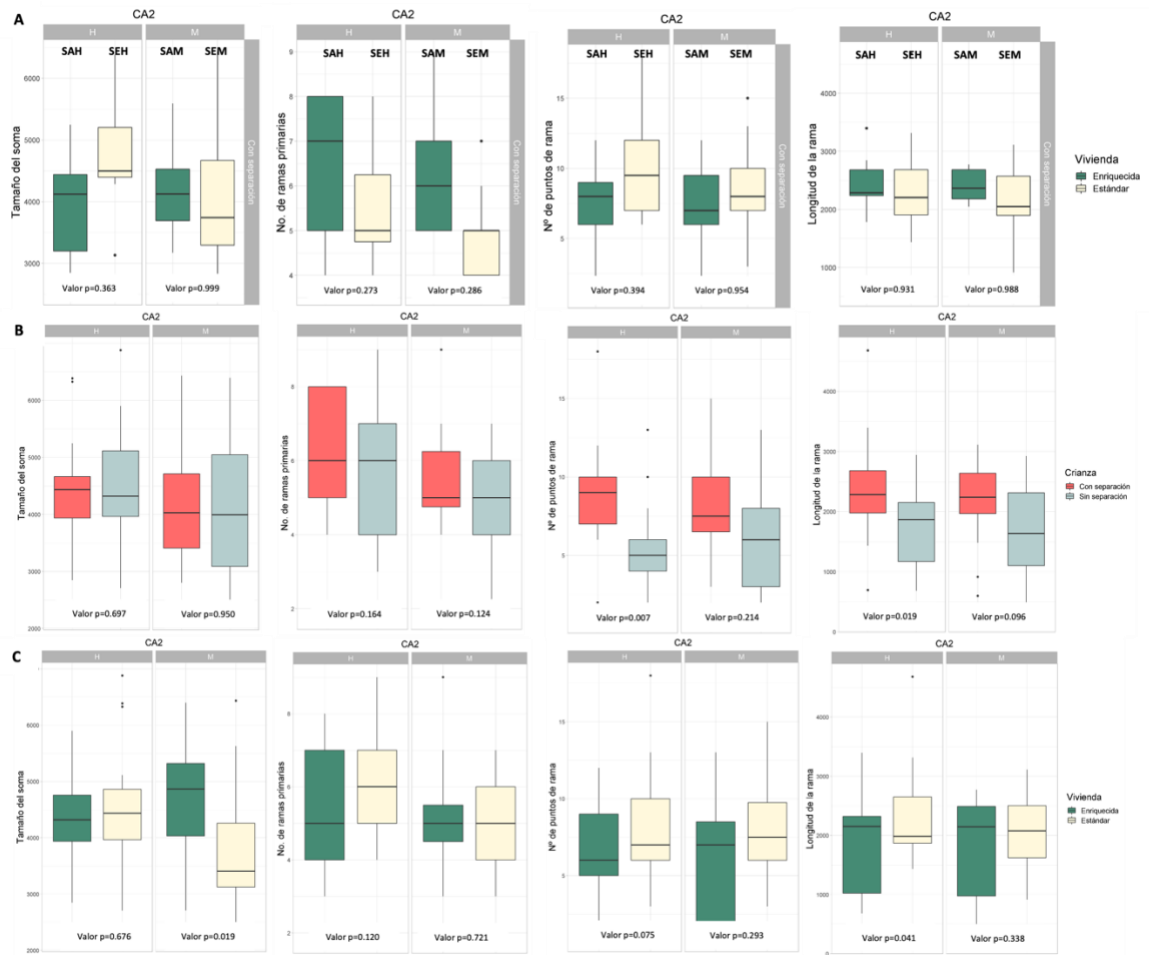


Gráfico 20. Evaluación morfológica de la microglía en CA2. Comparación de medias \pm sobre CA2. **A.** Interacción Factor de crianza vs vivienda. **B** Factor de crianza. **C.** Factor vivienda. **NEH** (No separadas-Estándar Hembras; $n=8$), **NAH** (No separadas- A. enriquecido- Hembras; $n=8$), **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; $n=8$), **NEM** (No separadas- Estándar-Machos; $n=8$), **NAM** (No separados- A. enriquecido-Machos; $n=8$), **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; $n=8$), **SEM** (Separadas-Estándar-Machos; $n=8$), **SAM** (Separadas-A.enriquecido- Machos; $n=8$).

En el área CA3 sólo se encontró en hembras un cambio estadísticamente significativo. El No de ramas primarias disminuyo en el factor de vivienda (ANOVA, $p=0.050$, no obstante, el Post hoc del grupo de interacción NA vs NE fue significativo, $p=0.022$) (Gráfico 21A). En los demás factores no se encontraron variables morfológicas con cambios significativos y tampoco se evidenciaron estos en los machos (Gráfico 21B y C).

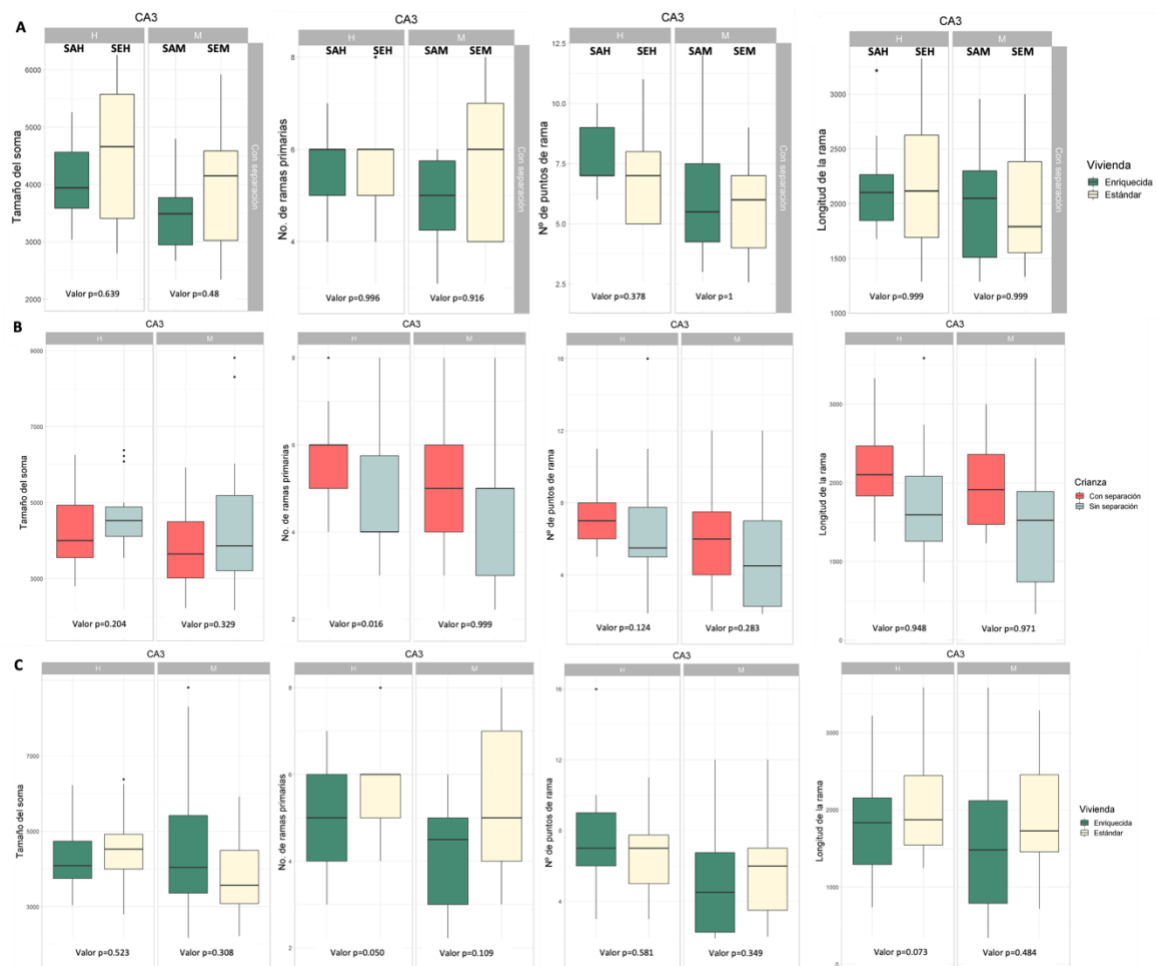


Gráfico 21. Evaluación morfológica de la microglía en CA3. Comparación de medias \pm sobre CA3. **A.** Interacción Factor de crianza vs vivienda. **B** Factor de crianza. **C.** Factor vivienda. **NEH** (No separadas-Estándar Hembras; n=8), **NAH** (No separadas- A. enriquecido-Hembras; n=8); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; n=8); **SAH** (Separadas-A.enriquecido- Hembras; n=8). **NEM** (No separadas-Estándar-Machos; n=8); **NAM** (No separados- A. enriquecido-Machos; n=8); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; n=8), **SEM** (Separadas-Estándar-Machos; n=8); **SAM** (Separadas-A.enriquecido- Machos; n=8).

En el área GD sólo se encontró en hembras cambios estadísticamente significativo en el factor vivienda en el No de ramas primarias disminuyo (KW, $p=0.036$), así como el No de puntos de ramas (KW, $p=0.03$) (Gráfico 22C). En los machos se presentaron cambio significativo en el factor crianza al aumentar significativamente el No de ramas primarias (KW, $p=0.001$) (Gráfico 22B). En los demás factores o variables morfológicas no se encontraron cambios significativos.

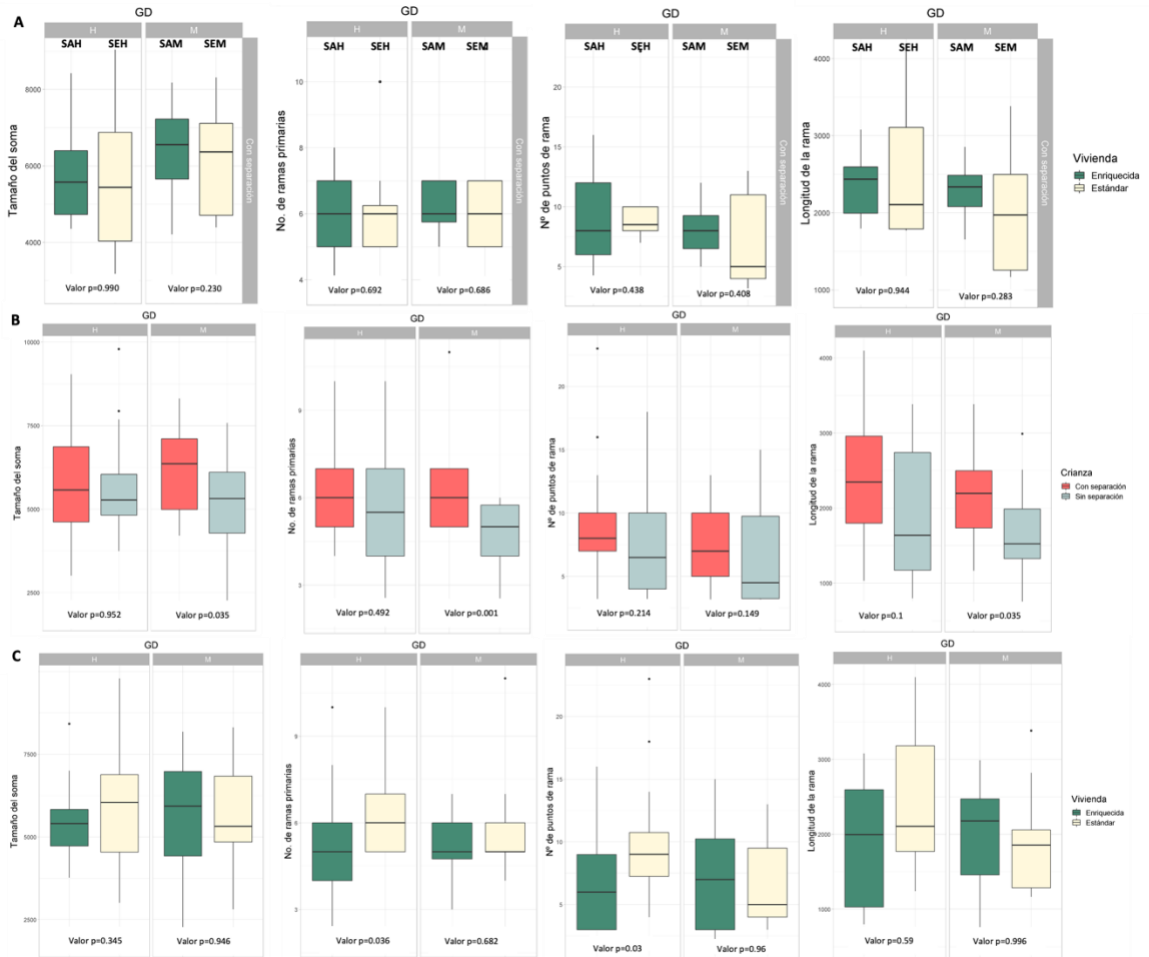


Gráfico 22. Evaluación morfológica de la microglía en GD. Comparación de medias \pm sobre GD. **A.** Interacción Factor de crianza vs vivienda. **B** Factor de crianza. **C.** Factor vivienda. **NEH** (No separadas-Estándar Hembras; n=8), **NAH** (No separadas- A. enriquecido- Hembras; n=8); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; n=8); **SAH** (Separadas-A.enriquecido-Hembras; n=8). **NEM** (No separadas-Estándar-Machos; n=8); **NAM** (No separados- A. enriquecido-Machos; n=8); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; n=8), **SEM** (Separadas-Estándar-Machos; n=8); **SAM** (Separadas-A.enriquecido-Machos; n=8).

7.3.4 El AE posterior a la SMDL generó cambios en la Morfología microglial en la amígdala (A)

En BLA sólo se encontraron en hembras cambios estadísticamente significativos en el factor crianza. El tamaño del soma disminuyó (ANOVA $p=0.039$, Post hoc grupo SE VS NE, $p=0.049$), así como, el Número de puntos de ramas (KW, $p=0.002$) (Gráfico 23B). En los machos sólo se presentó un cambio significativo en el factor crianza, al aumentar significativamente el No de ramas primarias (KW, $p=0.018$) (Gráfico 23B),. En los demás

factores o variables morfológicas, no se encontraron cambios significativos.

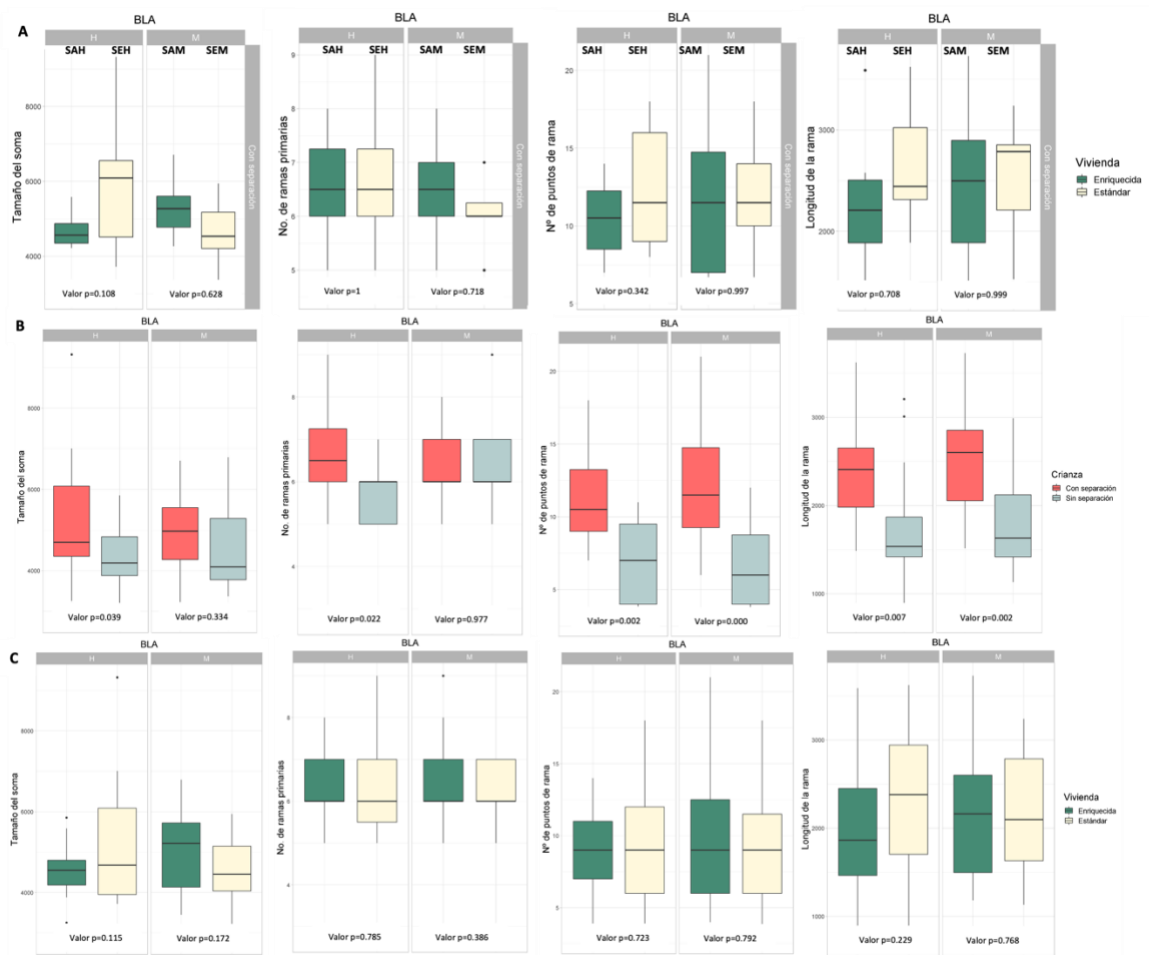


Gráfico 23. Evaluación morfológica de la microglía en BLA. Comparación de medias \pm sobre BLA. **A.** Interacción Factor de crianza vs vivienda. **B** Factor de crianza. **C.** Factor vivienda. **NEH** (No separadas-Estándar Hembras; n=8), **NAH** (No separadas- A. enriquecido- Hembras; n=8); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; n=8); **SAH** (Separadas-A.enriquecido- Hembras; n=8). **NEM** (No separadas- Estándar-Machos; n=8); **NAM** (No separados- A. enriquecido-Machos; n=8); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; n=8), **SEM** (Separadas-Estándar-Machos; n=8); **SAM** (Separadas-A.enriquecido- Machos; n=8).

En el área BLP sólo se encontró en hembras cambios estadísticamente significativo en el factor crianza. El tamaño del soma aumentó (KW $p=0.043$), el No de puntos de rama (ANOVA, $p=0.029$, Post hoc grupo SE VS NE, $p=0.027$) y la longitud de las ramas (ANOVA, $p=0.025$, Post hoc grupo SE VS NE, $p=0.049$) (Gráfico 24B), En los demás factores o variables morfológicas, tanto en hembras como en machos no se encontraron cambios significativos.

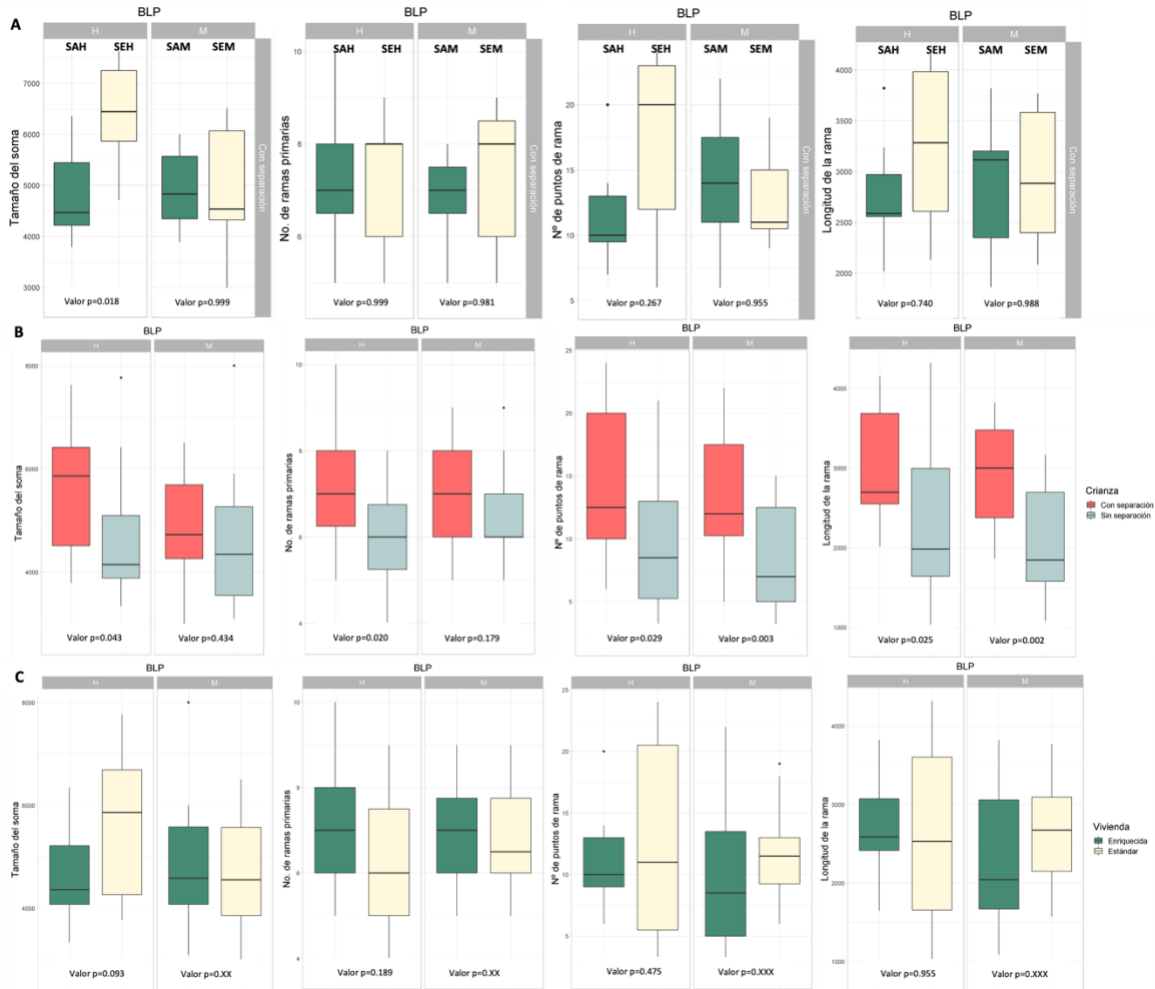


Gráfico 24. Evaluación morfológica de la microglía en BLP. Comparación de medias \pm sobre BLP. **A.** Interacción Factor de crianza vs vivienda. **B** Factor de crianza. **C.** Factor vivienda. **NEH** (No separadas-Estándar Hembras; n=8), **NAH** (No separadas-A. enriquecido-Hembras; n=8); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; n=8); **SAH** (Separadas-A.enriquecido- Hembras; n=8). **NEM** (No separadas-Estándar-Machos; n=8); **NAM** (No separados- A. enriquecido-Machos; n=8); **SEM** (Separadas-Estándar- Hembras; n=8), **SEM** (Separadas-Estándar-Machos; n=8); **SAM** (Separadas-A.enriquecido- Machos; n=8).

7.3.5 El AE posterior a la SMDL genera cambios en la morfología microglial en la corteza prefrontal (CPF)

En el área Cg se encontró en hembras cambios estadísticamente significativos. En la interacción entre ambos factores, se presentó una disminución en el tamaño del soma (ANOVA, $p=0.520$, no obstante, el Post hoc del grupo SA vs SE fue $p=0.025$) (Gráfico 25A). En el factor de crianza aumento el número de puntos de rama (ANOVA, $p=0.000$, Post hoc del grupo SA vs SE fue $p=0.000$) y la longitud de las ramas (ANOVA, $p=0.000$,

Post hoc del grupo SA vs SE fue $p=0.001$) (Gráfico 25B). En machos, los cambios estadísticamente significativos se evidenciaron en la interacción de los factores crianza:vivienda, al disminuir el tamaño del soma (ANOVA, $p=0.008$, Post hoc del grupo SA vs SE fue $p=0.000$) (Gráfico 25A). En el factor de crianza se presentaron cambios significativos en las tres variables, el ANOVA aplicado mostró un aumento del tamaño del soma ($p=0.008$, Post hoc del grupo SA vs SE fue $p=0.000$), No de ramas primarias ($p=0.07$, Post hoc del grupo SA vs SE fue $p=0.010$), No de puntos de ramas ($p=0.000$, Post hoc del grupo SA vs SE fue $p=0.000$) y en la longitud de la rama (KW, $p=0.001$) (Gráfico 25B). En el factor vivienda sólo se presentó una disminución en la longitud de las ramas (KW, $p=0.0199$) (Gráfico 25C).

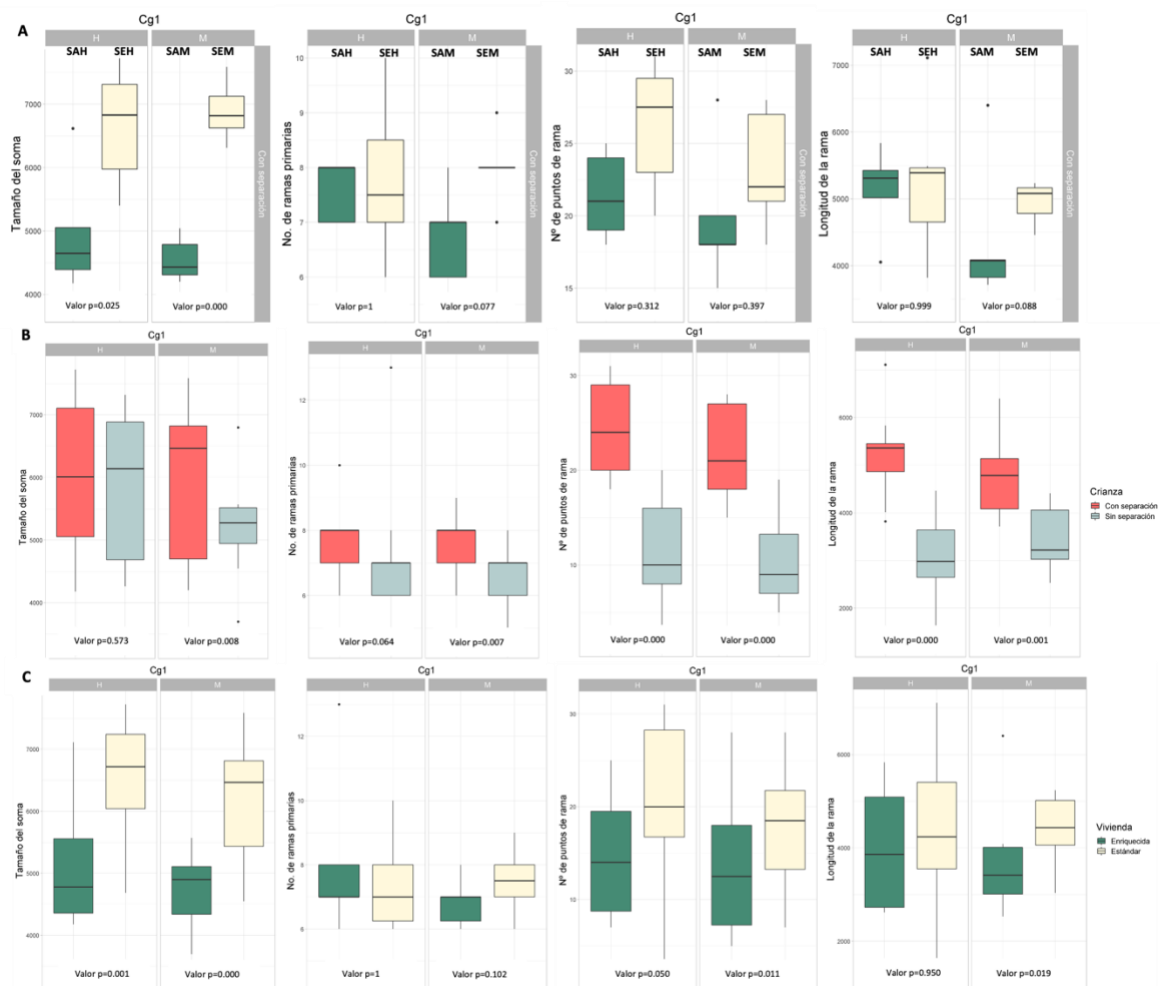


Gráfico 25. Evaluación morfológica de la microglía en Cg. Comparación de medias \pm sobre Cg. **A.** Interacción Factor de crianza vs vivienda. **B** Factor de crianza. **C.** Factor vivienda. **NEH** (No separadas-Estándar-Hembras; $n=8$); **NAH** (No separadas- A. enriquecido-Hembras; $n=8$); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; $n=8$); **NEM** (No separadas-Estándar-Machos; $n=8$); **NAM** (No separados- A. enriquecido-Machos; $n=8$); **SEM** (Separadas-Estándar- Hembras; $n=8$); **SEH** (Separadas-Estándar- Machos; $n=8$); **SAM** (Separadas-A.enriquecido- Machos; $n=8$).

En el área IL se encontró en hembras cambios estadísticamente significativos. En la interacción entre los factores crianza:vivienda se presentó una disminución en el tamaño del soma (ANOVA, $p=0.097$, no obstante, el análisis Post hoc del grupo SA vs SE fue $p=0.007$) (Gráfico 26A). En el factor de crianza influye en el aumento el tamaño del soma (ANOVA, $p=0.042$, Post hoc del grupo SA vs SE fue $p=0.028$), y en un aumento del número de puntos de rama (ANOVA, $p=0.006$, Post hoc del grupo SA vs SE fue $p=0.037$) (Gráfico 26B). En los machos también se evidenciaron cambios estadísticamente significativos. En el factor de interacción crianza:vivienda disminuyó el tamaño del soma (KW grupo SAH vs SEH $p=0.012$) (Gráfico 26A). En el factor crianza, en el grupo SE vs NE aumentó el tamaño del soma (KW, $p=0.001$) el No de puntos de ramas (ANOVA, $p=0.041$) y la longitud de las ramas (KW, $p=0.001$) (Gráfico 26B). En el factor de vivienda disminuyó el No de ramas primarias (ANOVA, $p=0.003$) (Gráfico 26C).

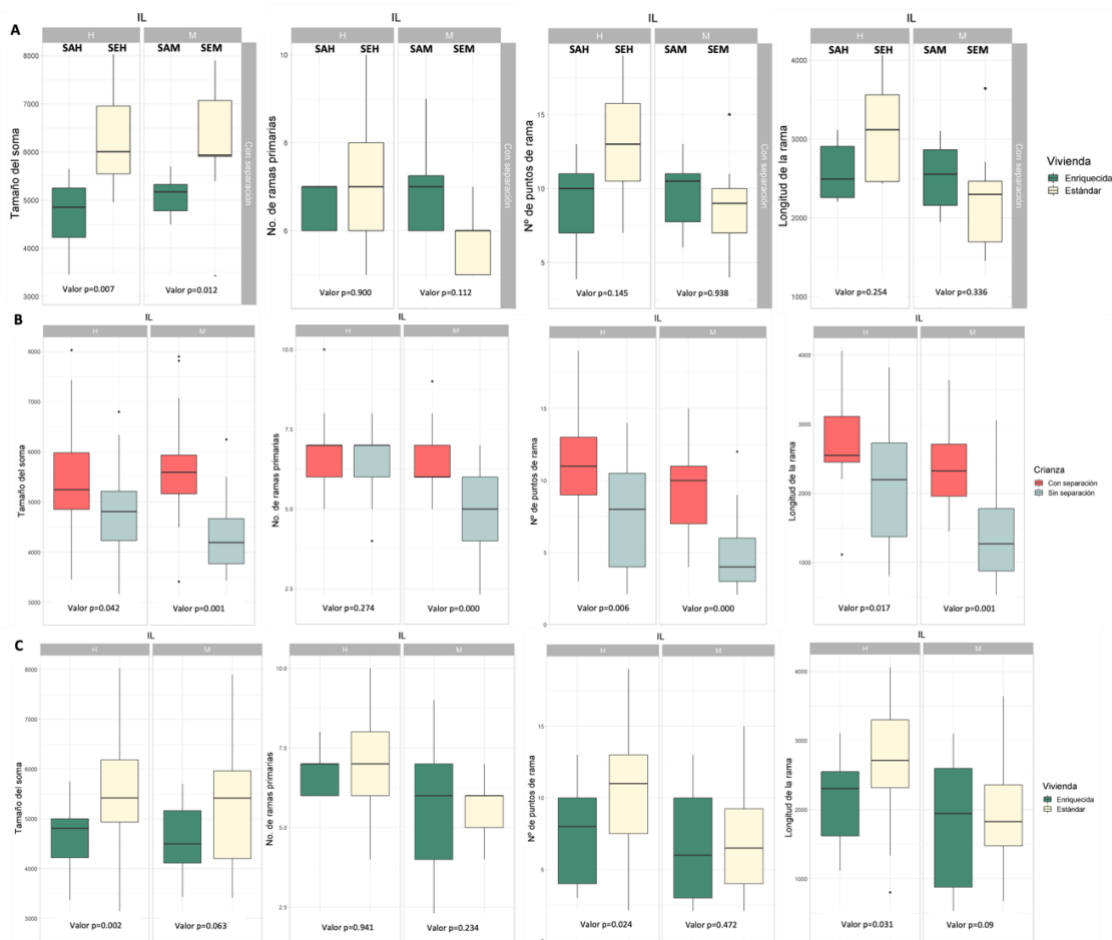


Gráfico 26. Evaluación morfológica de la microglía en IL. Comparación de medias \pm sobre IL. **A.** Interacción Factor de crianza vs vivienda. **B** Factor de crianza. **C.** Factor vivienda. **NEH** (No separadas-Estándar Hembras; $n=8$), **NAH** (No separadas- A. enriquecido- Hembras; $n=8$); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; $n=8$); **SAH** (Separadas-A.enriquecido- Hembras; $n=8$). **NEM** (No separadas-

Estándar-Machos; n=8); **NAM** (No separados- A. enriquecido-Machos; n=8); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; n=8), **SEM** (Separadas-Estándar-Machos; n=8); **SAM** (Separadas-A.enriquecido- Machos; n=8).

En el área PrL se encontró en hembras cambios estadísticamente significativos. En la interacción de los factores crianza:vivienda se encontró una disminución en el tamaño del soma (ANOVA, $p=0.102$, no obstante, el Post hoc del grupo SA vs SE fue $p=0.003$) y en el No de puntos de rama (KW, grupo SAH vs SEH, $p=0.002$) (Gráfico 27A). En el factor de crianza en el grupo SE vs NE aumento el No de puntos de rama (KW, $p=0.002$) y la longitud de ramas (ANOVA, $p=0.006$, Post hoc del grupo SA vs SE fue $p=0.024$) (Gráfico 27B).

En los machos se identificaron cambios significativos en diferentes factores. En la interacción de los factores de crianza:vivienda disminuyo el tamaño del soma (ANOVA, grupo SAH vs SEH, $p=0.038$, Post hoc grupo SAH vs SEH, $p=0.006$), No de puntos de rama (ANOVA, $p=0.004$, Post hoc grupo SAH vs SEH, $p=0.000$) y la longitud de la rama (ANOVA, $p=0.052$, no obstante el Post hoc del grupo SAH vs SEH fue $p=0.031$) (Gráfico 27A). En el factor de crianza, aumento el tamaño del soma (ANOVA, $p=0.002$, Post hoc grupo SAH vs SEH, $p=0.003$), el No de ramas primarias (ANOVA, $p=0.000$, Post hoc grupo SAH vs SEH, $p=0.000$), el No de puntos de ramas (ANOVA, $p=0.004$, Post hoc grupo SAH vs SEH, $p=0.000$) y la longitud de las ramas (ANOVA, $p=0.004$, Post hoc grupo SAH vs SEH, $p=0.000$) (Gráfico 27B).

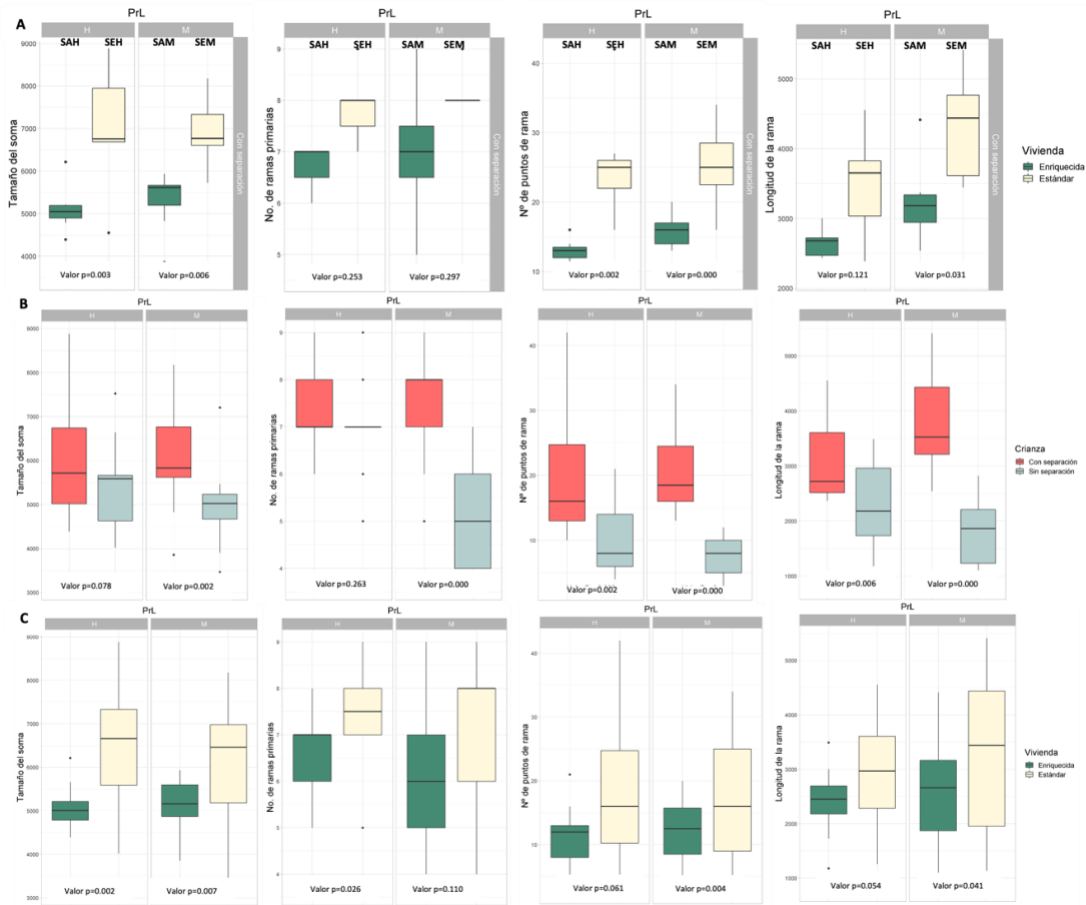


Gráfico 27. Evaluación morfológica de la microglía en PrL Comparación de medias \pm sobre PrL. **A.** Interacción Factor de crianza vs vivienda. **B** Factor de crianza. **C.** Factor vivienda. **NEH** (No separadas-Estándar Hembras; n=8), **NAH** (No separadas- A. enriquecido-Hembras; n=8); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; n=8); **SAH** (Separadas-A.enriquecido- Hembras; n=8). **NEM** (No separadas- Estándar-Machos; n=8); **SEH** (No separados- A. enriquecido-Machos; n=8); **SEH** (Separadas-Estándar- Hembras; n=8), **SEM** (Separadas-Estándar-Machos; n=8); **SAM** (Separadas-A.enriquecido- Machos; n=8).

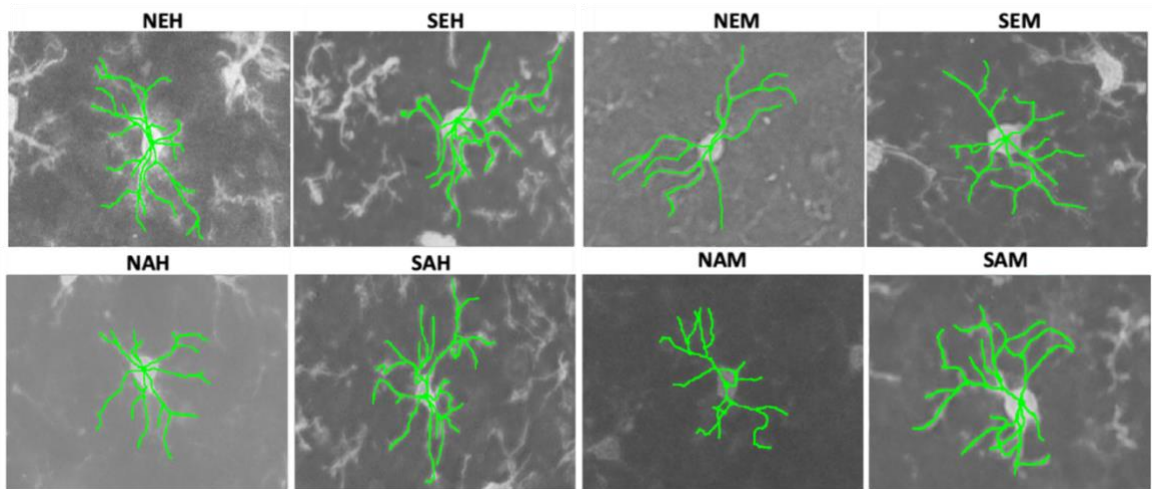


Figura 5. Dibujos representativos de la microglía de los animales expuestos a la separación materna y/o al enriquecimiento ambiental. Cortes a 25 μ m, objetivo 40X.

Tabla 2. Resumen resultados

ÁREA	VARIABLE	HEMBRAS			MACHOS		
		INTERACCIÓN	Factor SM	Factor AE	INTERACCIÓN	Factor SM	Factor AE
		SA vs SE	SE vs NE	NA-NE	SA vs SE	SE vs NE	NA-NE
Corticosterona	Corticosterona			-		-	
VTA	N Celulas positivas Iba1		-	-		-	-
NAc					-	-	-
CA1						-	
CA2							
CA3			-				
GD							-
BLA							
BLP							
Cg							
IL			-				-
PrL							
VTA	Tamaño del soma						
	No de ramas primarias						
	No de puntos de rama	-			+		-
	Longitud de la rama	-			-		-
NAc	Tamaño del soma	+		-			
	No de ramas primarias			-			
	No de puntos de rama						
	Longitud de la rama		-				
CA1	Tamaño del soma						
	No de ramas primarias						
	No de puntos de rama						
	Longitud de la rama		+				
CA2	Tamaño del soma						
	No de ramas primarias			-			
	No de puntos de rama						
	Longitud de la rama						+
CA3	Tamaño del soma						
	No de ramas primarias			-			
	No de puntos de rama						
	Longitud de la rama						
GD	Tamaño del soma						
	No de ramas primarias			-		+	
	No de puntos de rama			-			
	Longitud de la rama						
BLA	Tamaño del soma		+				
	No de ramas primarias						
	No de puntos de rama		+			+	
	Longitud de la rama						
BLP	Tamaño del soma		+				
	No de ramas primarias						
	No de puntos de rama		+				
	Longitud de la rama		+				
Cg	Tamaño del soma	-			-	+	
	No de ramas primarias					+	
	No de puntos de rama		+			+	
	Longitud de la rama		+			+	-
IL	Tamaño del soma	-	+		-	+	
	No de ramas primarias						
	No de puntos de rama		+			+	-
	Longitud de la rama					+	
PrL	Tamaño del soma	-			-	+	
	No de ramas primarias					+	
	No de puntos de rama	-	+		-	+	
	Longitud de la rama		+		-	+	

Cambios de expresión: ● no hay cambios | + Aumenta la expresión-cambio | - disminuye la expresión-cambio

8. Discusión

- **Efectos de 15 días de ambiente enriquecido, posterior a la separación materna durante la lactancia sobre los niveles de corticosterona en plasma**

Los niveles de corticosterona mostraron diferencias significativas entre sexo, siendo las hembras las que presentaron mayores niveles que los machos. Sin embargo, los resultados posteriores a los tratamientos evidenciaron que la SMDL generó cambios en los machos al disminuir significativamente los niveles de corticosterona y fue la condición de vivienda, específicamente el AE, quien afectó a las hembras al disminuir los niveles de la hormona. Y la interacción del AE posterior a la SMDL no revirtió ni afectó significativamente estos resultados en ninguno de los dos sexos.

Si bien los resultados de este estudio no son consecuentes con otros reportes, esto podría deberse a diferentes factores. Respecto a las hembras, que no presentaron cambios por la exposición a la SMDL, estas podrían no haberse afectado debido a que este estrés se presentó durante los DP 1 al 21, abarcando las primeras dos semanas de vida en la que el HHA se encuentra en un periodo hiporesponsivo al estrés provocando que no haya un aumento de los glucocorticoides, ni mucho menos una respuesta del eje. (3). Ahora, Borgues-Aguilar, Schaffer y Kloet, 2018, encontraron que posterior a este periodo, el eje HHA se activa y ante una situación de estrés podría volverse altamente sensible, sin embargo, en este momento interferirían otros factores que continuarían explicando la ausencia de efectos en las hembras como la exposición repetida a un factor de estrés como esta separación que sobrecargarían la respuesta del eje HHA, disminuyendo los niveles de corticosterona por una posible condición de retroalimentación negativa mediada por los receptores de glucocorticoides a nivel del eje HHA (13, 94). Otro factor que podría incidir es el comportamiento materno de la madre hacia las crías durante este periodo de lactancia; si bien, en nuestro estudio las crías se expusieron a una SMDL 3 hrs en la mañana y 3 en la tarde, probablemente se ven afectados comportamientos de la madre a la cría tales como la estimulación táctil, posibilitando que se estuvieran inhibiendo algunos cambios generados

en el cerebro posterior a la SMDL, de hecho en un trabajo reportado por Seymour Levine en 2001, en el que resume como las relaciones sociales iniciales con la madre, influye en el desarrollo del eje HHA, señala que la estimulación táctil, la lactancia materna y el contacto pasivo, son importantes en la regulación de este eje. En efecto, la estimulación táctil se incrementa una vez retornan las crías con su progenitora y servirían para contrarrestar posibles alteraciones del eje (131). La estimulación táctil, se ve disminuida en este protocolo y se estaría promoviendo la respuesta suprarrenal para reducir la expresión de las hormonas implicadas en la activación del eje HHA (132).

Otro factor que puede incidir es la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis gonadal, el cual tiene una relación directa con el HHA y desde la vida temprana hasta la edad adulta puede afectarlo diferencialmente según el sexo, si bien se ha encontrado que las ratas hembras son las que muestran una respuesta más fuerte del HHA, como sucedió en este estudio, gracias a los niveles de estradiol circulantes que elevan los niveles de la corticosterona durante factores estresante; posterior a la SMDL los niveles de corticosterona disminuyeron en las hembras más que en los machos y esto podría estar influenciado por neuronas hipotalámicas que quizás expresaron mayores receptores de hormonas gonadales regulando así el eje HHA (136).

Por otra parte, el AE en nuestro estudio que implicó la exposición continua durante 15 días de estímulos físicos, sociales y sensoriales sí generó efectos en las hembras disminuyendo la concentración de corticosterona y probablemente actuando como un modelo de estrés (2, 50). En este sentido, Rivarola y cols., mostraron un aumento en el inmunomarcaje para GR en los animales sometidos a AE que no fueron separados, mostrando que en efecto puede considerarse como un factor que genera estrés (50). En este estudio, también se mostró que el AE propicia una disminución de los niveles de corticosterona por debajo de los estados basales y al estar estimulando las áreas relacionadas con el sistema de recompensa mediante los diferentes objetos empleados, posiblemente contribuyó al aumento de la excitabilidad de la dopamina (DA), como lo sugieren Douma y de Kloet (121), quienes sugieren que un estresor crónico disminuye la actividad del circuito VTA-DA, actuando como un mecanismo de adaptación de retroalimentación a la baja que evitaría respuestas exageradas de la

corticosterona (111,120), ejerciendo a su vez, como un posible factor protector ante enfermedades relacionadas con el estrés (12).

- **Efectos de 15 días de ambiente enriquecido, posteriores a la separación materna durante la lactancia sobre el número de las microglías**

El factor de crianza, específicamente la SMDL disminuyó el número de microglías en VTA (en ambos sexos), NAc (en machos), Hipocampo (CA1 en machos, CA3 en hembras) y corteza prefrontal (IL en machos), áreas relacionadas con el sistema de recompensa. En cuanto al factor de vivienda, el AE, disminuyó el número de microglías, pero sólo en VTA (en ambos sexos), NAc (en machos) y en el hipocampo específicamente en GD (en machos). Ahora bien, el AE posterior a la SMDL disminuyó el número de microglías por debajo de los números de la SMDL por sí sola en el NAc en machos y en el área prefrontales IL en hembras.

Los estudios que investigan los efectos de diferentes modelos de estrés en los primeros años de vida han encontrado de manera general un aumento en el número de células microgliales en las áreas cerebrales. Algunos trabajos han reportado cambios en el número de estas células después de 3 horas de SM diaria en crías de rata de 14 días (115, 116) y una posterior disminución de estas en el DP 28 (117, 22); los resultados de nuestro trabajo son consecuentes con los reportados por estos estudios donde la disminución de las microglías se evidenció en áreas específicas como el VTA, NAc, HIP (CA1 y CA3) el subárea IL de la CPF. Estos efectos podrían estar asociados a varios factores: Teniendo en cuenta el aumento microglial que se presenta hasta el DP 14, asociado a cambios de la expresión de genes tales como Creb1, Sp1 y RelA, involucrados en la progresión del ciclo celular y la inflamación de la migración celular, la disminución que se presenta podría deberse justamente a una alteración en la actividad transcripcional de genes implicados en el desarrollo como PU.1, Creb1, Sp1 y RelA y a una alta tasa de actividad fagocítica (117). Lo anterior podría sugerir que la SMDL afectaría de manera perjudicial la maduración normal de las microglías, principalmente en el VTA, NAc, seguido de algunas subáreas del HIP y CPF.

En cuanto a los efectos del AE posterior a la SMDL, se evidenció una disminución del número de microglías por debajo de los números del factor de crianza de SMDL, pero solamente en las áreas prefrontales NAc en machos e IL en hembras y estos resultados apoyarían los resultados de algunos estudios en donde el AE posterior a un factor estresante no tuvo efectos sobre la expresión de microglía en la corteza o en áreas como el hipocampo, excepto en GD (119). Esta disminución del número de microglías que se presentó en nuestro estudio en las áreas mencionadas, podría estar influenciada por las características del AE empleado; el modelo implementado, que se construyó con base en otros estudios (52) y teniendo en cuenta los elementos que habían funcionado, también se caracterizó por estar presente tiempo completo durante 15 días y es posible que este paradigma sea más estresante que aquellos que usan medio tiempo (119), sin embargo, no observamos ninguna diferencia entre los niveles de corticosterona entre SMDL y AE que nos dijera que este AE fue más estresante, pero, si podríamos plantear que sus efectos fueron similares a la disminución encontrada en el factor de crianza de SMDL reforzando este tratamiento como un modelo de estrés que podría estar actuando como protector.

Por otro lado, teniendo en cuenta que la microglía está en un constante movimiento, sobre todo en la edad temprana, que le permite explorar el medio ambiente para limpiar y remodelar la matriz extracelular, esto podría generar una mayor movilidad hacia otras áreas del cerebro que se vieron afectadas por el estrés por SMDL o por el AE (137).

- **Efectos de 15 días de ambiente enriquecido, posteriores a la separación materna durante la lactancia sobre la morfología de la microglía**

En VTA, el factor de crianza de SMDL no generó efectos en los parámetros estudiados de la morfología microglial en ningún sexo. Por el contrario, el AE por sí solo disminuyó el número de ramas primarias y la longitud de la rama en machos y el factor de interacción del AE posterior a la SMDL en ambos sexos aumentó la longitud de las ramas, aumento el no de puntos de rama en machos y lo disminuyo en hembras. En NAc, el factor de SMDL disminuyó el tamaño del soma sólo en hembras y el factor de AE disminuyó el número de ramas primarias y el tamaño del soma en hembras. Por otra parte, el factor de interacción

del AE posterior a la SMDL sólo aumento el tamaño del soma en hembras. En el HIP, el factor de crianza-SMDL, en CA1 aumentó la longitud de las ramas en hembras. El factor de vivienda-AE aumentó el tamaño del soma en CA2 en machos y disminuyo el número de ramas primarias en hembras, así como en CA3 y GD y disminuyo también en esta última el No de puntos de rama. El factor de interacción AE posterior a la SMDL, no generó ningún cambios en las variables morfológicas. En la amígdala, el factor de SMDL en BLA aumento el tamaño del soma y el No de puntos de rama en hembras y esta última también en machos, BLP presento cambios sólo en hembras al aumentar el tamaño del soma, el No de puntos de rama y la longitud de la rama. El factor de AE y el de interacción del AE posterior a la SMDL no generó cambios en ninguna de las variables. Por último, en la CPF, el factor SMDL en Cg aumentó el tamaño del soma, el No de ramas primarias en machos y el No de puntos de rama y la longitud de la rama en ambos sexos. El factor de AE sólo disminuyo la longitud de las ramas en machos y el factor de interacción AE posterior a la SMDL disminuyo el tamaño del soma en ambos sexos respecto a su control; en IL el factor de crianza aumento la longitud de la rama en machos y el tamaño del soma y el No de puntos de rama en ambos sexos; el factor de vivienda sólo disminuyo el No de ramas primarias en machos y el factor de interacción AE posterior a la SMDL disminuyo el tamaño del soma en ambos sexos. En PrL, el factor de crianza-SMDL aumento el tamaño del soma y el número de ramas primarias en machos y el No de puntos de rama y la longitud de la rama en ambos sexos; el factor de vivienda-AE no generó efectos y la interacción del AE posterior a la SMDL disminuyo la longitud de la rama en machos y el tamaño del soma y el No de puntos de rama en ambos sexos.

Teniendo en cuenta que la evidencia reciente sugiere que diferentes grupos de microglía podría mostrar propiedades intrínsecas distintas que se adquieren durante su maduración o función dentro del SNC (113), en este estudio encontramos que en la SMDL sola se identifican más células con una morfología ramificada (Tipo I a III) caracterizada por un aumento significativo en los puntos de rama, longitud de las ramas en las regiones BLA, BLP, Cg, IL y PrL en hembras y en machos en las áreas anteriores excepto en BLP. En el factor de AE no se encontraron microglías de tipo ramificada (Tipo I a III) en ningún sexo, De acuerdo con esto, se podría mencionar que tanto la SM y AE sólo como el tratamiento

del AE posterior a la SMDL no cambian necesariamente la microglía a un fenotipo “activado” tipo IV a V y esto estaría en consonancia con algunos estudios que mencionan que la exposición a estos tratamientos generaría primordialmente un fenotipo ramificado como una respuesta adaptativa a entornos estresantes al principio de la vida (119). Por otro lado, durante la “activación” (Fenotipo IV a V) de la microglía se presenta la liberación de citoquinas que podrían afectar el funcionamiento neuroquímico y procesos como la plasticidad neuronal que podrían incidir en la aparición de trastornos psiquiátricos, sin embargo, en nuestro estudio al no presentarse este fenotipo, podríamos plantear la posibilidad que esta respuesta adaptativa de la microglía en su forma ramificada funcionaría como un mecanismo protector ante futuros eventos estresores que disminuiría la posibilidad de padecer trastornos emocionales o conductuales.

Algunos estudios han evidenciado que el estrés crónico durante los primeros años de vida podría suscitar respuestas alteradas del sistema de recompensa debido a la disminución de la conectividad en la corteza prefrontal, que resultaría en la dificultad para activar el autocontrol, conduciendo a comportamientos y enfermedades relacionadas con el estrés como la anhedonia y la depresión. Podría disminuir la conectividad del NAc, afectando la capacidad para identificar el valor de la recompensa y actuar de manera adaptativa para reaccionar y hacer frente a los cambios en el entorno (97). Podría generar una maduración acelerada en la conectividad frontolímbica afectando la capacidad para procesar la información emocional. Por el contrario, en la amígdala se ha encontrado un aumento en su activación que incidiría de manera beneficiosa en los comportamientos relacionados con el vínculo materno como lo es el contacto materno durante la relación diádica entre cuidador e hijo (28).

Esta alteración en el sistema de recompensa para procesar y regular la información emocional estaría relacionada con la aparición de trastornos emocionales como la depresión, consumo de sustancias y trastornos de conducta (12).

En función de la discusión planteada anteriormente, en la que se expone que el estrés crónico por SMDL y el AE puede ejercer efectos sobre el cerebro los cuales no necesariamente se

relacionan con una respuesta negativa, podríamos considerar que estos resultados nos muestran que las áreas VTA, NAc y CPF son las áreas más sensibles a estos tratamientos provocando una respuesta adaptativa fisiológica para garantizar un adecuado funcionamiento neuronal durante la exposición a una situación que demanda durante un largo tiempo, la activación y respuesta del sistema nervioso.

A partir de este trabajo surgen varias hipótesis y preguntas interesantes que se podrían resolver con nuevas investigaciones, en las que se contemple el estudio de los posibles factores que estarían implicados en los resultados obtenidos. Identificar la expresión de los los receptores dopaminérgicos y glucocorticoides en las áreas del sistema de recompensa. Registrar la concentración de corticosterona en diferentes edades postnatales como el DP 14, para conocer el impacto que pueden tener otros factores del desarrollo. Estudiar los efectos de los modelos de separación materna y ambiente enriquecido sobre los comportamientos relacionados con trastornos emocionales, el consumo de sustancias, etc, característicos de la alteración del sistema de recompensa.

Para continuar profundizando en la hipótesis del ambiente enriquecido como un modelo de estrés, sería muy importante caracterizar los efectos de cada uno de los objetos empleados en esta estrategia de enriquecimiento para identificar el impacto que cada uno tiene sobre las variables estudiadas (niveles de corticosterona, microglía) y evaluar los efectos que puede generar una menor exposición a este tratamiento.

Por otro lado, es importante mencionar que algunas de las limitaciones que se pueden presentar para continuar profundizando en este tema, podrían ser las dificultades desde la academia para acceder a técnicas novedosas que permitan investigar cómo la microglía se relaciona con el estrés y la psicopatología y la dificultad para obtener el presupuesto que permitan acceder a dichas técnicas o materiales.

9. Conclusiones

El estrés crónico por SMDL puede ejercer efectos sobre el cerebro, mediados por la expresión de corticosterona y glucocorticoides los cuales no necesariamente se relacionan con una respuesta negativa, sino que, podría ser una respuesta adaptativa fisiológica para garantizar un adecuado funcionamiento neuronal durante la exposición a una situación que demanda durante un largo tiempo la activación y respuesta del sistema nervioso. Aunque el AE posterior a la SMDL no revirtió los efectos generados por la SMDL en el número de microglías, sí disminuyó en machos en el área PrL algunas características morfológicas ramificadas (tamaño del soma, No. puntos de rama, Longitud de la rama) que se habían presentado, y el factor de AE mostró tener efectos a nivel de la expresión de la microglía disminuyendo su número en áreas puntuales como VTA, NAc y GD, indicándonos posiblemente que este paradigma estaría ejerciendo como un modelo de estrés que no necesariamente perjudica el trabajo de las microglías, sino que, adapta el sistema para garantizar un adecuado funcionamiento para posibles eventos estresores futuros.

Esta investigación contribuye al reconocimiento de los múltiples factores que pueden incidir en la respuesta del sistema nervioso ante eventos estresores y uno de ellos, que está relacionado con este trabajo es el tiempo de exposición a los eventos estresantes (SMDL) o de intervención (AE), los cuales pueden generar cambios adaptativos o no adaptativos dependiendo de la región estudiada, las células gliales implicadas, el tipo de microglías, el sexo, entre otros.

El estudio de los efectos de modelos de intervención como el ambiente enriquecido posterior a eventos estresores como la separación materna, son más complejos de lo propuesto en este trabajo y esto lo hace más cautivador, posiblemente, por eso cada vez se encuentren más investigaciones interesadas en identificar los efectos que tienen las experiencias estresantes crónicas como la pobreza, maltrato o negligencia infantil, sobre el sistema neuroendocrino, en la estructura y la función del cerebro y la manera como se asocian con el funcionamiento de áreas del sistema de recompensa relacionadas con trastornos psicológicos. Por eso, es muy importante continuar profundizando en estudios con modelos animales, para identificar

cuáles son los efectos que tienen diferentes eventos específicos de estrés en el cerebro en diferentes momentos del desarrollo. Así mismo, se requiere impulsar la investigación clínica para verificar y confirmar la relevancia de este fenómeno en los seres humanos que permitan dilucidar el funcionamiento cerebral ante estos eventos, con el propósito de diseñar planes de prevención e intervención antes que se desarrollen psicopatologías y que permitan un manejo de la salud pública desde el ámbito preventivo.

10. Producción académica

Teniendo en cuenta los diferentes resultados obtenidos en este trabajo, una fracción de estos fue presentado bajo la modalidad de poster en el XII Congreso Nacional y el XIII Seminario Internacional de Neurociencias COLNE realizado en el año 2021, se adjunta certificado.



Los resultados obtenidos específicamente en la CPF fueron presentados bajo modalidad de póster en el XIII Congreso Nacional | XIV Seminario Internacional de Neurociencias que se llevará a cabo del 20 al 22 de Abril en la Pontificia Universidad Javeriana en la ciudad de Cali.

Anexo 2. Aprobación Comité de ética Acta CB-FMVZ-UN-035-19

Comité de Bioética
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
Sede Bogotá



Bogotá D.C, septiembre 11 de 2019

[CB-FMVZ-UN-035-19]

Doctora
ZULMA JANETH DUEÑAS GÓMEZ
Investigadora principal
Universidad Nacional de Colombia –Sede Bogotá

Apreciada doctora:

Amablemente le comunico que el Comité de Bioética en sesión extraordinaria, Acta 05 de 2019, luego de la revisión de la documentación al siguiente proyecto acordó emitir el respectivo concepto, así:

Proyecto	EFFECTO DEL AMBIENTE ENRIQUECIDO, POSTERIOR A LA SEPARACIÓN MATERNA, SOBRE LA MORFOLOGÍA MICROGLIAL Y CONCENTRACIÓN DE CORTICOSTERONA, EN RATAS WISTAR ADOLESCENTES
Responsables del proyecto	Investigador Principal: Zulma Janeth Dueñas Martínez Estudiante de Maestría en Neurociencias Universidad Nacional: Leidy Johanna Ceballos Ordoñez
Concepto	AVALADO

Es importante tener en cuenta que **este concepto sólo aplica para los procedimientos en las condiciones y con las características indicadas en el formato final y documentos presentados**. El investigador deberá informar sobre cualquier cambio que se proponga incluir y que esté relacionado con la ubicación, el cuidado y bienestar de los animales, estas modificaciones no podrán ejecutarse sin el aval previo del Comité; así mismo, se debe dar aviso sobre cualquier situación imprevista que se considere implique algún riesgo para los animales o la comunidad o el medio en el cual se lleva a cabo el estudio.

Cordialmente,



LUCÍA BOTERO ESPINOSA

Coordinadora Comité de Bioética

[Página 1 de 1]
Elaboró: Diana María Cendales

Carrera 30 No. 45-03. Ciudad Universitaria. **Patrimonio de todos los colombianos**
Edificio 561B, piso 2, oficina 22
Teléfono directo: 57-1-3165693 | Conmutador: 57-1-3165000 Ext. 19469
Email: comibio_fmzbog@unal.edu.co
Bogotá D.C., Colombia

Bibliografía

1. Swain J., Lorberbaum J., Kose S. & Strathearn, L. Brain basis of early parent-infant interactions: psychology, physiology, and in vivo functional neuroimaging studies. *Child Psychol. Psychiatry*. 2007; 48(3-4): 262-87.
2. Vivineto A., Suárez M., Rivarola M. Neurobiological effects of neonatal maternal separation and post-weaning environmental enrichment. *Behavioural Brain Research*. 2013(240): 110-8.
3. Koe A., Ashokan A., Mitra R. Short environmental enrichment in adulthood reverses anxiety and basolateral amygdala hypertrophy induced by maternal separation. *Translational Psychiatry*. 2016(6), e729; doi:10.1038/tp.2015.217
4. Ministerio de salud y protección social. Encuesta nacional de salud mental. 2015. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/presentacion-encuesta-nacional-salud-mental-2015.pdf>
5. Patiño J., Corredor L., & Dueñas Z. Impacto de la separación materna durante la lactancia sobre el tamaño del cerebro y la inmunorreacción al receptor Gaba-A. *Revista Investig.Salud Univ. Boyacá*. 2013,1(1): 31-44.
6. Noble KG., Houston SM., Brito NH., Bartsch H., Kan E., Kuperman JM., et al. Family income, parental education and brain structure in children and adolescents. *Nature Neuroscience*. 2015; 18(5): 773–78.doi:10.1038/nn.3983
7. Departamento Administrativo Nacional de Estadística – DANE. Disponible en: <https://www.dane.gov.co/>
8. Ministerio de salud y protección social. Boletín de salud mental en niños, niñas y adolescentes, 2017.Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ENT/boletin-4-salud-mental-nna-2017.pdf>
9. Ball N., Mercado E., & Orduña I. Enriched Environments as a Potential Treatment for Developmental Disorders: A Critical Assessment. *Frontiers in Psychology*. 2019; 10:466. doi: 10.3389/fpsyg.2019.00466
10. Calcia M., Bonsall D., Bloomfield P., Selvaraj S., Barichello T., & Howes O. Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness. *Psychopharmacology*.2016(233):1637-50.
12. Novick A, Levandowski M, Laumann L., Philip N., Price L, & Tyrka, A. The effects of early life stress on reward processing. *Journal of Psychiatric Research*. 2018. 101, 80–103.doi:10.1016/j.jpsychires.2018.0

13. Barrera I., Dueñas Z. La separación materna durante la lactancia altera los niveles basales del sistema neuroendocrino en ratas adolescentes y adultas. *Biomédica*, 2016; 36, 67-77.
14. Liu C, Hao S, Zhu M, Wang Y, Zhang T, Yang Z. Maternal separation induces different autophagic responses in the hippocampus and prefrontal cortex of adult rats. *Neuroscience*. 2018 374:287–94. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.01.043
15. Liu S., & Zhao M. Neuroprotective effect of estrogen: Role of nonsynaptic NR2B-containing NMDA receptors. *Brain Research Bulletin*. 2013; 93: 27–31. doi:10.1016/j.brainresbull.2012.10.004
16. Liu Y., Wong T., Aarts M., Rooyackers A., Liu L., Lai T., et al. NMDA Receptor Subunits Have Differential Roles in Mediating Excitotoxic Neuronal Death Both In Vitro and In Vivo. *Journal of Neuroscience*. 2007; 27(11): 2846–57. doi:10.1523/jneurosci.0116-07.2007
17. Aparicio I., Muñoz P., Salido G., Peña F., & Tapia J. The autophagy-related protein LC3 is processed in stallion spermatozoa during short-and long-term storage and the related stressful conditions. *Animal*. 2016; 10(07): 1182–91. doi:10.1017/s1751731116000240
18. Chen W., Sun Y., Liu K., & Sun X. Autophagy: a double-edged sword for neuronal survival after cerebral ischemia. *Neural Regeneration research*. 2014; 9(12): 1210-16. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4146291/>
19. Dueñas Z; Caicedo-Mera JC & Torner L. Global Effects of Early Life Stress on Neurons and Glial Cells. *Current Pharmaceutical Design*, 2017, 23, 1-8. DOI: 10.2174/1381612823666170224111641
20. Johnson F., & Kaffman A. Early life stress perturbs the function of microglia in the developing rodent brain: New insights and future challenges. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2018; 69: 18–27. doi:10.1016/j.bbi.2017.06.008
21. Hanamsagar R. & Bilbo S. Environment matters: microglia function and dysfunction in a changing world. *Current Opinion in Neurobiology*. 2017; 47: 146–55. doi:10.1016/j.conb.2017.10.007
22. Delpech J., Wei L., Hao J., Yu X., Madore C., Butovsky O., & Kaffman A. Early life stress perturbs the maturation of microglia in the developing hippocampus. *Brain Behav Immun*. 2016 (57): 79-93.
23. Neal S., Kent M., Bardi M., Lambert K. Enriched Environment Exposure Enhances Social Interactions and Oxytocin Responsiveness in Male Long-Evans Rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2018 (12):1-10.

24. Novaes L., Barreto dos Santos N., Batalhote R., Malta M., Camarini R., Scavone, C. et al. Environmental enrichment protects against stress-induced anxiety: Role of glucocorticoid receptor, ERK, and CREB signaling in the basolateral amygdala. 2017 (113): 457-66.
25. Cao, W., Hu, Z., Xu, Y., Zhang, W., Huang, F., Qiao, X., Cui, Y., Wan, W., Wang, X., Liu, D., Dai, R., Li, D., Li, C. Role of early environmental enrichment on the social dominance tube test at adulthood in the rat. *Psychopharmacology*. 2017 (22), 234: 3321-34.
26. Dandi E., Kalamari A., Touloumi O., Lagoudaki R., Nousiopoulou E., Simeonidou, et al. Beneficial effects of environmental enrichment on behavior, stress reactivity and synaptophysin/BDNF expression in hippocampus following early life stress. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2018(67):19-32.
27. Hofer M. Psychobiological Roots of Early Attachment. 2006. *Current Directions in Psychological Science*. 15(2), 84–88. doi:10.1111/j.0963-7214.2006.00412.x
28. Herzberg M., & Gunnar, M. Early life stress and brain function: Activity and connectivity associated with processing emotion and reward. 2019. *NeuroImage*, 116493. doi:10.1016/j.neuroimage.2019.1
29. Swain J, Lorberbaum J, Kose S, Strathearn, L. Brain basis of early parent-infant interactions: psychology, physiology, and in vivo functional neuroimaging studies. 2007. *J. Child Psychol. Psychiatry* ;48(3-4):262-87
30. Strathearn L, Li J, Fonagy P, Montague PR. What's in a smile? Maternal brain responses to infant facial cues. 2008. *Pediatrics*;122(1):40-51.
31. Bowlby J. Grief and mourning in infancy and early childhood. 1960. *Psychoanal Study Child*; 15:9-52
32. Feldman R. Oxytocin and social affiliation in humans. 2012. *Hormones and Behavior*; 61:380-91.
33. Winnicott D. Nuevas observaciones sobre la teoría de la relación parento-filial. 1961. *Obras Completas*.
34. Kristal M. The Biopsychology of Maternal Behavior in Nonhuman Mammals. 2009. *ILAR Journal*. 50(1): 51–63. doi:10.1093/ilar.50.1.51
35. Suomi S, van der Horst F, Van der Veer R. Rigorous experiments on monkey love: an account of Harry F. Harlow's role in the history of attachment theory. 2008. *Integr Psychol Behav Sci*;42:354–369. <https://doi.org/10.1007/s12124-008-9072-9>.
36. Harlow H. Love in Infant Monkeys. 1959. . *Scientific American*. 200(6), 68–74. doi:10.1038/scientificamerican0659-68
37. Levine S. Infantile Experience and Resistance to Physiological Stress. 1957. *Science*., 126 (3270), 405–405. doi:10.1126/science.126.3270.

38. Spitz R. Hospitalism; an inquiry into the genesis of psychiatric conditions in early childhood. 1945. *Psychoanal Study Child*; 1:53-74.
40. Harlow H, Dodsworth R, Harlow M. Total social isolation in monkeys. 1965. *Proc Natl Acad Sci USA* 1965; 54:90-7
41. Mitchell, G, Raymond E, Ruppenthal G, Harlow H. Long-term effects of total social isolation upon behavior of rhesus monkeys. *Psychological Reports* 1966;18;567-80.
42. Rodríguez D., & Dueñez Z. efectos de la separación materna temprana sobre el desempeño en el laberinto en cruz elevado en ratas adultas. *Acta biol. Colomb.* 2012 (17); 1:129-42.
43. Hebb D. The mammal and his environment. *Annual American Psychiatry Association.* 1955; 111: 826-31.
44. Hunt J. Psychological development: Early Experience. *Annual reviews psychological.* 1979; 30: 103-43.
45. Diamond, M. Response of the Brain to Enrichment. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 2001 (2); 73.
46. Lopes D., Souza T., Andrade J., Silva M, Antunes H., LeSueur-Maluf L. et al. Environmental enrichment decreases avoidance responses in the elevated Tmaze and delta FosB immunoreactivity in anxiety-related brain regions. *Behavioural Brain Research.* 2018; 344: 65-72.
47. Yeshurun S., Corto A., Bredy T., Pang T., & Hannan A. Paternal environmental enrichment transgenerationally alters affective behavioral and neuroendocrine phenotypes. *Psychoneuroendocrinology.* 2017; 77: 225-35.
48. Rosenzweig M., Bennett E. Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav. Brain Res.* 1966; 78: 57-65.
49. Rosenzweig M., Bennett E., Hebert M., Morimoto H. Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. *Brain Res.* 1978;153: 563-76.
50. Cutuli D., Berretta E., Caporali P., Sampedro-Piquero P., De Bartolo P., Laricchiuta, et al. Effects of pre-reproductive maternal enrichment on maternal care, offspring's play behavior and oxytocinergic neurons. *Neuropharmacology*, 2018: 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.02.015>
51. Petrosini, et al. On whether the environmental enrichment may provide cognitive and brain reserves. *Brain Research Reviews*, 2009;61(2): 221-39
52. Simpson J. & Kelly J. The impact of environmental enrichment in laboratory rats Behavioural and neurochemical aspects. *Behavioural Brain Research*, 2011;222 (1), 246-64.

53. Rosenzweig M, Krech D, Bennett E, Diamond M. Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: A replication and extension. *J Comp Physiol Psychol* 1962; 55:429-37.
54. Walsh EG Sense of Visual Direction in Normal Subjects and Neurological Patients. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 1969;11(3): 333-45. doi:10.1111/j.1469-8749.1969.tb01440.
55. Greenough W., Volkmar F. & Juraska J. Effects of rearing complexity on dendritic branching in frontolateral and temporal cortex of the rat. *Experimental Neurology*. 1973; 41(2): 371- 78. doi:10.1016/0014-4886(73)90278-1
56. Floeter M. & Greenough W. Cerebellar plasticity: modification of Purkinje cell structure by differential rearing in monkeys. *Science*. 1979; 206(4415): 227-29. doi:10.1126/science.113873
57. Volkmar F. & Greenough W. Rearing Complexity Affects Branching of Dendrites in the Visual Cortex of the Rat. *Science*, 1972; 176(4042): 1445 - 47. doi:10.1126/science.176.4042.1445
58. Pascual R. & Figueroa H. Effects of Prewaning Sensorimotor Stimulation on Behavioral and Neuronal Development in Motor and Visual Cortex of the Rat. *Neonatology*. 1996; 69(6): 399–404. doi:10.1159/000244337
59. Rampon C., Jiang C., Dong H., Tang Y., Lockhart D., Schultz P. et al. Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000; 97(23): 12880–84. doi:10.1073/pnas.97.23.12880
60. Comery T., Shah R. & Greenough W. Differential Rearing Alters Spine Density on Medium-Sized Spiny Neurons in the Rat Corpus Striatum: Evidence for Association of Morphological Plasticity with Early Response Gene Expression. *Neurobiology of Learning and Memory*. 1995; 63(3): 217–19. doi:10.1006/nlme.1995.1025
61. Ferchmin P., Eterovic V. & Caputto R. Studies of brain weight and RNA content after short periods of exposure to environmental complexity. *Brain Research*. 1970; 20(1): 49–57. doi:10.1016/0006-8993(70)90153-8
62. Rampon C, Tang Y, Goodhouse J, Shimizu E, Kyin M, Tsien J. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosciences*. 2000; 3(3): 238-44.
63. Meaney M. Epigenetics and the Biological Definition of Gene × Environment Interactions. *Child Development*. 2010; 81(1): 41–79. doi:10.1111/j.1467-8624.2009.01381.

64. Yeshurun S., Short A., Bredy T., Pang T. & Hannan, A. J. Paternal environmental enrichment transgenerationally alters affective behavioral and neuroendocrine phenotypes. *Psychoneuroendocrinology*. 2017; 77: 225–35. doi:10.1016/j.psyneuen.2016.11.013
65. Kimura L., Mattaraia V. de M. & Picolo G. Distinct environmental enrichment protocols reduce anxiety but differentially modulate pain sensitivity in rats. *Behavioural Brain Research*. 2017. doi:10.1016/j.bbr.2017.11.012
66. Lehmann M. & Herkenham M. Environmental Enrichment Confers Stress Resiliency to Social Defeat through an Infralimbic Cortex-Dependent Neuroanatomical Pathway. *Journal of Neuroscience*. 2011; 31(16): 6159–73. doi:10.1523/jneurosci.0577-11.2011
67. Smith B., Lyons C., Correa F., Benoit S., Myers B., Solomon M., et al. Behavioral and physiological consequences of enrichment loss in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2017; 77: 37–46. doi:10.1016/j.psyneuen.2016.11.040
68. Ginhoux F., Greter M., Leboeuf M., Nandi S., See P., Gokhan, S, et al. Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science*. 2010; 330(6005): 841–45. doi:10.1126/science.119463
69. Matcovitch-Natan O., Winter DR., Giladi A., Vargas Aguilar S., Spinrad A., Sarrazin S., et al. Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis. *Science*. 2016; 353(6301), aad8670–aad8670. doi:10.1126/science.aad8670
70. Nimmerjahn A. Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science*. 2005; 308(5726): 1314–18. doi:10.1126/science.1110647
71. Prinz, M., Jung, S., & Priller, J. (2019). Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell*, 179(2), 292–311. doi:10.1016/j.cell.2019.08.053
72. Grutzendler J., Yang G., Kim J., Zuo Y., Jung S. et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience*. 2005; 8(6): 752–58. doi:10.1038/nn1472
73. Loane D., Kumar A., Stoica BA., Cabatbat R. & Faden A. Progressive Neurodegeneration After Experimental Brain Trauma. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2014; 73(1): 14–29. doi:10.1097/nen.0000000000000021
74. Paolicelli R., Bolasco G., Pagani F., Maggi L., Scianni M., Panzanelli P., et al. Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. *Science*. 2011; 333(6048): 1456–58. doi:10.1126/science.1202529
75. Parkhurst C., Yang G., Ninan I., Savas J., Yates J., Lafaille J., et al. Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Cell*. 2013; 155(7): 1596–609. doi:10.1016/j.cell.2013.11.030

76. Lawson L., Perry V., Dri, P., & Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*. 1990; 39(1): 151–70. doi:10.1016/0306-4522(90)90229-w
77. Brown, G., & Neher, J. Microglial phagocytosis of live neurons. *Nature Reviews Neuroscience*. 2014 15(4), 209–216. doi:10.1038/nrn3710
79. Beumer W., Gibney S., Drexhage RC., Pont-Lezica L., Doorduyn J., Klein H., et al. The immune theory of psychiatric diseases: a key role for activated microglia and circulating monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*. 2012; 92(5): 959–75. doi:10.1189/jlb.0212100
80. Nelson L., & Lenz K. Microglia depletion in early life programs persistent changes in social, mood-related, and locomotor behavior in male and female rats. *Behavioural Brain Research*. 2017; 316: 279–93. doi:10.1016/j.bbr.2016.09.006
81. Baudin A., Blot K., Verney C., Estevez L., Santamaria J., Gressens P., et al. Maternal deprivation induces deficits in temporal memory and cognitive flexibility and exaggerates synaptic plasticity in the rat medial prefrontal cortex. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2012; 98(3): 207–14. doi:10.1016/j.nlm.2012.08.004
82. Francis D., Dioro J., Plotsky P., Meaney M. Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. *Journal of Neuroscience*, 2002; 22(18): 7840–43.
83. Do Prado C., Narahari T., Lee H., Murthy S., & Brenhouse H. Effects of Early Adolescent Environmental Enrichment on Cognitive Dysfunction, Prefrontal Cortex Development, and Inflammatory Cytokines After Early Life Stress. *Developmental Psychobiology*. 2015; (4): 482–91.
84. Eklund M., & Arborelius L. Twice daily long maternal separations in Wistar rats decreases anxiety-like behaviour in females but does not affect males. *Behavioural Brain Research*. 2016; 172(2): 278–85. doi:10.1016/j.bbr.2006.05.015
85. Moreno L., Lamprea M. & Dueñez Z. Diferencias en los comportamientos asociados con la ansiedad de ratas macho y hembra expuestas a un protocolo de estrés crónico por separación maternal temprana. *Suma Psicológica*. 2009; (16): 31–43.
86. Cerón J., & Troncoso J. Alteraciones de las células de la microglía del sistema nervioso central provocadas por lesiones del nervio facial. *Biomédica*. 2016; 36: 619–
87. Paxinos G., & Watson C. *The Rat Brain in stereotaxic coordinates*. Cuarta edición, Academic Press, 1998.
88. George, E. D. (2010). Maternal Separation With Early Weaning: A Novel Mouse Model Of Early Life Neglect. *BMC Neurosciences*, 11:123.
89. Hofer MA. The role of nutrition in the physiological and behavioral effects of early maternal separation on infant rats. *Psychosom Med*. 1973 Jul-Aug;35(4):350–9

90. León Rodríguez D, Dueñas Z. Maternal Separation during Breastfeeding Induces Gender-Dependent Changes in Anxiety and the GABA-A Receptor Alpha-Subunit in Adult Wistar Rats. 2013 PLoS ONE 8(6): e68010
91. Milligan M. & Yates. Experimental Techniques and Anaesthesia in the Rat and Mouse. (1994) Anzccart Facts Sheet, pp 1-4.
92. Noonan D. The Guinea Pig. (1994). Anzccart Facts Sheet, pp 1-8.
93. Bates R., Militello L., Barker E., Gonzalez H., and Schmeer K. Early childhood stress responses to psychosocial stressors: The state of the science. *Dev Psychobiol.* 2022 Nov; 64(7). doi: 10.1002/dev.22320
94. Condon E. Chronic Stress in Children and Adolescents: A Review of Biomarkers for Use in Pediatric Research. *Biological Research For Nursing.* 2018. 109980041877921. doi:10.1177/1099800418779214
95. Pollak, S. (2015). Multilevel developmental approaches to understanding the effects of child maltreatment: Recent advances and future challenges. *Development and Psychopathology*, 27(4pt2), 1387–1397. doi:10.1017/s0954579415000826,
96. Rizvi, S., Pizzagalli, D., Sproule, B., & Kennedy, S. (2016). Assessing anhedonia in depression: Potentials and pitfalls. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 65, 21–35. doi:10.1016/j.neubiorev.2016.0
97. Baik, J. Stress and the dopaminergic reward system. *Experimental & Molecular Medicine.* 2020. 52(12), 1879–1890. doi:10.1038/s12276-020-00532-4
98. Bromberg-Martin, E., Matsumoto, M., & Hikosaka, O. (2010). Dopamine in Motivational Control: Rewarding, Aversive, and Alerting. *Neuron*, 68(5), 815–834. doi:10.1016/j.neuron.2010.11.0)
99. Basar, K., Sesia, T., Groenewegen, H., Steinbusch, H., Visser-Vandewalle, V., & Temel, Y. Nucleus accumbens and impulsivity. *Progress in Neurobiology.* 2010. 92(4), 533–557. doi:10.1016/j.pneurobio.2010)
100. Kelley A. Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* 2004. 27(8), 765–776. doi:10.1016/j.neubiorev.2003.1
101. Kupchik Y, Brown R., Heinsbroek J., Lobo M, Schwartz D & Kalivas P. Coding the direct/indirect pathways by D1 and D2 receptors is not valid for accumbens projections. *Nature Neuroscience.* 2015.18(9), 1230–1232. doi:10.1038/nn.4068
102. Monk C, McClure E, Nelson E, Zarahn E, Bilder RM, Leibenluft E, et al. Inmadurez adolescente en el compromiso cerebral relacionado con la atención con las expresiones faciales emocionales. *Neuroimage.* 2003. 20:420–428
103. LeDoux J. Redes emocionales y control motor: una visión temerosa. *Prog Brain Res.* 1996. 107:437-446.

104. Fobbs W & Mizumori S. Cost–Benefit Decision Circuitry. *Molecular Basis of Memory*. 2014. 233–261. doi:10.1016/b978-0-12-420170-5.00009-x
105. Paquola C., Bennett M, & Lagopoulos, J. Understanding heterogeneity in grey matter research of adults with childhood maltreatment—A meta-analysis and review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2016. 69, 299–312. doi:10.1016/j.neubiorev.2016.0
106. Rolls E. The cingulate cortex and limbic systems for emotion, action, and memory. *Brain Structure and Function* 2019. doi:10.1007/s00429-019-01945-2
107. Kinner V. Wolf O. & Merz. C. Cortisol alters reward processing in the human brain. *Hormones and Behavior*. 2016. 84, 75–83. doi:10.1016/j.yhbeh.2016.05.00
108. Evans G, Swain J., King A., Wang X. Javanbakht A., Ho S. et al. Childhood Cumulative Risk Exposure and Adult Amygdala Volume and Function. *Journal of Neuroscience Research*. 2015. 94(6), 535–543. doi:10.1002/jnr.23681.
109. McEwen B., Bowles N., Gray J., Hill M. Hunter R. Karatsoreos I & Nasca C. . Mechanisms of stress in the brain. *Nature Neuroscience*. 2015. 18(10), 1353–1363. doi:10.1038/nn.4086
110. Gee D, Gabard-Durnam L, Flannery J, Goff G, Humphreys K, Telzer E, Hare T, Bookheimer S, Tottenham N. A aparición temprana en el desarrollo de la conectividad amígdala humana-prefrontal después de la privación materna. *Proc Nat Acad Sci*. 2013;110:15638–15643.
111. Dutcher J., & Creswell J. The role of brain reward pathways in stress resilience and health. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2018. 95, 559–567. doi:10.1016/j.neubiorev.2018.1;
112. Hanson J., Nacewicz B, Sutterer M., Cayo A., Schaefer, S., Rudolph K., et al. Behavioral Problems After Early Life Stress: Contributions of the Hippocampus and Amygdala. *Biological Psychiatry*. 2015. 77(4), 314–323. doi:10.1016/j.biopsych.2014.
113. Stratoulia V., Venero J, Tremblay M., Joseph B. Subtipos microgliales: Diversidad dentro de la comunidad microglial. *EMBO J*. 2019;38:e101997. doi:10.15252/embj.2019101997
114. McCormick C., & Hodges T. Stress, Glucocorticoids, and Brain Development in Rodent Models. *Stress: Neuroendocrinology and Neurobiology*. 2017. 197–206. doi:10.1016/b978-0-12-802175-0.00019-x
115. Chocyk A., Dudys D., Przyborowska A., Majcher I., Maćkowiak M., & Wędzony K. Maternal separation affects the number, proliferation and apoptosis of glia cells in the substantia nigra and ventral tegmental area of juvenile rats. *Neuroscience*. 2011. 173, 1–18. doi:10.1016/j.neuroscience.20

116. Saavedra L., Fenton Navarro B., Torner L. Early Life Stress Activates Glial Cells in the Hippocampus but Attenuates Cytokine Secretion in Response to an Immune Challenge in Rat Pups. *Neuroimmunomodulation*. 2017;24:242–255. doi: 10.1159/000485383.
117. Roque A., Ochoa-Zarzosa A., & Torner L. Maternal separation activates microglial cells and induces an inflammatory response in the hippocampus of male rat pups, independently of hypothalamic and peripheral cytokine levels. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2017. 55, 39–48. doi:10.1016/j.bbi.2015.09.017
118. Bellavance M, Rivest S. The HPA - immune axis and the immunomodulatory actions of glucocorticoids in the brain. *Front. Immunol*. 2014;5:136.
119. Chao W., A., & Bilbo, S. Environmental enrichment alters glial antigen expression and neuroimmune function in the adult rat hippocampus. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2012. 26(3), 500–510. doi:10.1016/j.bbi.2012.01.003
120. Van Steenberg H., de Bruijn E., van Duijvenvoorde A., & van Harmelen A L. How positive affect buffers stress responses. 2021. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 39, 153–160. doi:10.1016/j.cobeha.2021.03.0
121. Douma E, & de Kloet E. Stress-Induced Plasticity and Functioning of Ventral Tegmental Dopamine Neurons. 2019. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. doi:10.1016/j.neubiorev.2019.1
122. Cabib S., Puglisi-Allegra S. The mesoaccumbens dopamine in coping with stress. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2012;36:79–89. doi: 10.1016/j.neubiorev.2011.04.012
123. Ironside M., Kumar P., Kang M.-S., & Pizzagalli D. A. Brain mechanisms mediating effects of stress on reward sensitivity. 2018. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 22, 106–113. doi:10.1016/j.cobeha.2018.01.0
124. Nephew C., Huang W., Poirier L., Payne L., & King A. Altered neural connectivity in adult female rats exposed to early life social stress. 2017. *Behavioural Brain Research*, 316, 225–233. doi:10.1016/j.bbr.2016.08.051
125. Javanbakht A., Kim P., Swain J., Evans G., Phan K., & Liberzon, I. Sex-Specific Effects of Childhood Poverty on Neurocircuitry of Processing of Emotional Cues: A Neuroimaging Study. 2016. *Behavioral Sciences*, 6(4), 28. doi:10.3390/bs6040028
126. Benaroya-Milshtein N., Hollander N., Apter A., Kukulansky T., Raz, N., Wilf A. Pick, C. G. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. 2004. *European Journal of Neuroscience*, 20(5), 1341–1347. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03587.x
127. Boletín de prensa No 473 de 2021. 2021, Tomado de <https://www.minsalud.gov.co/Paginas/Mas-de-18-mil-atenciones-en-salud-mental-en-opcion-4-de-Linea-192.aspx>
128. Eslava J, Mejía de Eslava L, Ramos-Rodríguez M, Uscategui A, Eslava Mejía J, Natalia MF, et al. Emergencia Sanitaria y su Impacto Sobre Nuestros Niños [Internet].

Vol. Especiales. Bogotá D.C.; 2020. Available from: <https://www.neurociencias.org.co/especiales/2020/emergencia-sanitaria-y-su-impacto-sobre-nuestros-ninos/>

129. Paxinos G. & Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Hard Cover Edition, 2006, 6th Edition.

130. Montoya, R., Bos, A., Terburg, D., Rosenberger, A., & van Honk, J. Cortisol administration induces global down-regulation of the brain's reward circuitry. 2014 *Psychoneuroendocrinology*, 47, 31–42. doi:10.1016/j.psyneuen.2014.

131. Levine S. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the rat. 2001. *Physiology & Behavior*. Volume 73, Issue 3, June 2001, Pages 255-260

132. Levine S. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the neonatal rat: The role of maternal behavior. 2002. *Neurotoxicity Research*, 4(5-6), 557–564. doi:10.1080/10298420290030569

133. Paolicelli R, et al. Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. 2022. *Neuron*. Nov 2; 110(21): 3458–3483. doi: 10.1016/j.neuron.2022.10.020

134. Kierdorf K., et al. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. 2013. *Nature Neuroscience*, 16(3), 273–280. doi:10.1038/nn.3318

135. Grabert K, et al. A Transgenic Line That Reports CSF1R Protein Expression Provides a Definitive Marker for the Mouse Mononuclear Phagocyte System. 2020. *J. Immunol* 205, 3154–3166. doi:10.1093/jimmunol/2000835.

136. Oyola M., & Handa R. Hypothalamic–pituitary–adrenal and hypothalamic–pituitary–gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. 2017. *Stress*, 20(5), 476–494. doi:10.1080/10253890.2017.136

137. Gildawie K, Orso R., Peterzell S., Thompson V., & Brenhouse H. Sex differences in prefrontal cortex microglia morphology: Impact of a two-hit model of adversity throughout development. 2020. *Neuroscience Letters*, 135381. doi:10.1016/j.neulet.2020.135381