UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA

TÍTULO:

EFECTO DEL ESTRÉS TEMPRANO POR SEPARACIÓN MATERNA SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA CORTICAL Y LA HERENCIA INTERGENERACIONAL DE CONDUCTAS SIMILARES A LA ANSIEDAD EN UN MODELO MURINO

Presentado por:

Q.F.B Marcela Rivera Delgadillo.

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA.

Monterrey N.L. Octubre del 2026

EFECTO DEL ESTRÉS TEMPRANO POR SEPARACIÓN MATERNA SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA CORTICAL Y LA HERENCIA INTERGENERACIONAL DE CONDUCTAS SIMILARES A LA ANSIEDAD EN UN MODELO MURINO

Aprobación de la tesis:

DR. C. ALBERTO CAMACHO MORALES

Director de Tesis

DR. C. JOSÉ FRANCISCO ISLAS CISNEROS

Co - Director de Tesis

DRA. C. AURORA DE JESÚS GARZA JUÁREZ

Miembro de la comisión

DR. MED. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ

Subdirector de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Alberto Camacho** por haberme recibido en su equipo de trabajo y permitido continuar con mi formación científica tras la licenciatura. Le agradezco la oportunidad de haber desarrollado mi autonomía, criterio propio y resiliencia en el ámbito de la investigación a lo largo de este proceso.

Al **Dr. José Francisco Islas** por su invaluable apoyo, tiempo y generosidad al proporcionarme los materiales necesarios para el desarrollo de este trabajo. Gracias por brindarme su orientación y asesoría experta para comprender a fondo las técnicas empleadas, así como por impulsarme a estructurar, defender y consolidar este proyecto con rigor científico. Su mentoría fue fundamental en mi formación.

Al **Dr. Kame Alberto Galan** por su valioso tiempo, disposición y por facilitarme los reactivos indispensables para mi trabajo. Agradezco profundamente su guía técnica y conocimiento especializado, los cuales resultaron claves para estandarizar una metodología totalmente nueva en nuestro grupo de trabajo. Aunque el proyecto tomo un rumbo distinto, su acompañamiento me permitió identificar áreas de oportunidades metodológicas y dejar las bases técnicas para la mejora para futuros estudiantes. Su apoyo constante y genuino interés en mi aprendizaje dejaron una marca positiva en mi etapa como investigadora.

A **Vianney**, A mi compañera de generación, amiga y roomi, te agradezco profundamente la inspiración constante y tu compañía incondicional durante prácticamente todo el posgrado. Compartir contigo desde largas jornadas académicas hasta platicas y rutinas pesadas de gym ha sido una experiencia grandiosa. Conocerte marco un antes y un después en mi vida; gracias por cada alegría, risa, desahogo y momento compartido. Tu presencia me hizo sentir acompañada en todo momento en esta ciudad, convirtiendo nuestra casa en un refugio seguro al cual llegar después de un difícil día era muy tranquilizador. Gracias por ser familia.

A **Cristina**, de las personas más maravillosas que conocí en este periodo de mi posgrado. Llegaste a mi vida de manera inesperada y te convertiste en una mujer que admiro demasiado, desde tu intelecto, tú amabilidad y curiosidad me ha hecho querer conocerte cada vez más. Gracias por aceptarme y hacerme parte de tu grupo de amigos, por procurarme y cuidarme siempre, me has dado consejos que me han ayudado en mi vida como en el proyecto de investigación, simplemente no tengo palabras para decirte lo agradecida que estoy porque formes parte de mi vida.

A **Fer**, mi gran amiga y compañera de generación, te agradezco por haber sido una fuente de constante inspiración por tu inteligencia y capacidad para abordar muchas cosas al mismo tiempo. Disfruté enormemente cada plática, cada risa y cada lágrima que compartimos, pues nos permitieron construir una amistad sincera que atesoro con el alma. Nunca faltó un solo día en que no me contaras algo nuevo de tus vivencias, permitiéndome conocerte y aprender de ti cada vez más, soy afortunada de tenerte en mi vida.

A **Angie y Lalo**, dos seres extraordinarios que no dejaron pasar un solo día sin preguntarme cómo estaba, haciéndome sentir querida y como en casa. Gracias por ser mis consejeros y por dedicar siempre el tiempo para escucharme, ya fuera para contarles algo triste, divertido o feliz. Gracias por celebrar mis logros, felicitarme de corazón y creer en mi en todo momento. Los aprecios y los quiero mucho.

Gracias enormemente **Vianney, Cristina y Angie** por ser las personas que me hicieron querer seguir cada día de pie, fuerte y feliz. Fueron un símbolo de inspiración y motivación para mí, las quiero mucho.

A **Samuel**, tengo mucho que agradecerte, ya que siempre que estuviste al pendiente de si estaba triste o feliz, si comí o no, y por recordarme en todo momento que era capaz e inteligente. Te agradezco todas las pláticas donde nos moríamos de risa o de empatía por nuestras preocupaciones; el habernos apoyado y contamos nuestras inseguridades permitieron conocernos y construir una bonita amistad.

A **Roberto**, fuiste el mejor compañero de equipo que me pudo brindar la vida científica. Gracias, primeramente, por tu gran amabilidad y por tu extraordinaria calidad humana; no hubo un solo día en el que no me hicieras sentir cómoda y respaldada. Gracias por corregirme, por quedarte hasta tarde cada vez que debía ensayar una presentación y por acompañarme al bioterio para aligerar mi estrés. Eres una de las personas más inteligentes, trabajadoras y con mayor corazón que he conocido. Agradezco infinitamente que te preocuparas por el éxito de mi proyecto, incluso cuando tú también tenías la presión de finalizar tu doctorado. En todo momento tuviste la disposición de escucharme y brindarme un buen consejo. No hay palabras suficientes para expresar lo agradecida y feliz que estoy de que formes parte de mi vida.

A **Liz**, llegaste como estudiante en realización de su servicio y terminaste siendo una gran amiga. Gracias por escuchar mis problemas y ser un gran soporte en la realización de este proyecto, aun con tu trabajo y vida académica de la licenciatura no dudaste en ayudarme hasta en un fin de semana. Eres una persona admirable, inteligente y súper capas, te quiero mucho.

A **Armando y Sofia**, no fueron solamente mis compañeros de equipo de trabajo, sino dos de mis más grandes mentores. Se convirtieron no solamente en mis maestros si no también en mis amigos, poco a poco los fui conociendo y sabiendo la capacidad e intelecto que tenían, el cual me inspiro cada día para poder llevar un proyecto digno de admiración. Aunque ya no estén en este momento presentes en mi vida estoy agradecida por que me abrieron un espacio en sus vidas.

Daniel, Juca, Diego, Camila, Danna, aunque fue un periodo corto de conocernos me apoyaron y motivaron siempre, me brindaron un lugar al cual sentí que pertenecía, con diferentes actividades cada día pude conocerlos y saber las

personas cálidas y maravillosas que son, gracias por su amistad y los múltiples consejos que me ayudaron en mi proyecto

A **Itzel** que fue como una madre y mentora en todo este proyecto. Gracias por siempre explicarme y darme lo requerido para llevar a cabo mi proyecto, siempre procuraste que no tuviera hambre, te emocionabas por cada logro que tenía y escuchabas mis problemas. Fuiste una persona de mucho apoyo y ejemplo que permitió que este proyecto pudiera culminar.

A **Víctor Karlita**, los conocí en el equipo de trabajo como voluntarios, pero se convirtieron en amigos, gracias por hacerme reír siempre e incluirme en su grupo de amigos. Además, estoy muy agradecida ya que me apoyaron con el cuidado del modelo animal cuando yo estuve de vacaciones a pesar de sus múltiples clases como estudiantes de medicina.

A **Cristian, Cristopher, Ximena y Alex**, mis amigos desde la licenciatura, gracias por haber sido el motor y la motivación inicial para emprender este camino. En todo momento estuvieron ahí para recordarme de los que soy capaz y para brindarme su apoyo incondicional, sin importar la distancia o sus propias ocupaciones. La universidad nos unión, pero el cariño mutuo consolido una amistad bonita. Guardo con enorme nostalgia y alegría los días compartidos en Aguascalientes, pues mis mejores momentos han sido a si lado. Atesoro de corazón su amistad, su cariño y sus palabras de ánimo, los amo.

A **Dariana, Paola, Ximena y Paulina**, cuatro de las personas más especiales que han permanecido en mi vida desde la preparatoria. Han sido testigos de mi crecimiento y un pilar fundamental al brindarme su apoyo incondicional, manteniéndose siempre presentes y al pendiente de mí a pesar de la distancia. Gracias por ser mujeres tan increíbles que me inspiran a ser mejor cada día; las amo con todo mi corazón.

A **Erika y Ashley**, les agradezco enormemente su compañía y apoyo durante las últimas etapas de este proyecto. Gracias por brindarme un espacio de trabajo ameno, lleno de ánimos y buena vibra, el cual fue clave para culminar este trabajo de investigación.

A mis compañeros de generación **Carlita, Oliver, Emilio, Rolando y Ángel**, gracias por haber sido parte de esta etapa compartida. Aunque cada uno enfrentó retos distintos en su camino, siempre estuvimos presentes para apoyarnos, escucharnos y brindarnos una compañía sincera a lo largo del posgrado.

DEDICATORIA

Para mis amados padres, Ruben Rivera Barbosa y Gabriela Delgadillo

A quienes les debo todo lo que soy y todo lo que he logrado.

Por ser mi pilar incondicional, mi guía y mi mayor fuente de inspiración en la vida, por cada sacrificio, por su amor infinito y por creer en mí.

Esta tesis es el fruto de su esfuerzo y del amor con el que siempre me han respaldado haciéndome sentir acompañada en todo momento.

Este logro no es solo mí, es de los tres.

Los amo

Para mis hermanos Paola Rivera y Ruben Rivera

Con la constante esperanza de ser un motivo de orgullo para ustedes, deseando algún día llegar a ser al menos la mitad de los brillantes, capaces y listos de lo que son. Gracias por su amor, su compañía y por inspirarme siempre a dar lo mejor de mí.

Para mí

Por la pasión que mueve cada uno de mis proyectos y por la fortaleza con la que sostuve este sueño. En los días más difíciles, donde rendirse parecía la opción más fácil, me elegí a mí, permanecí fiel a mis ideales y aprendí a abrazar mi proceso con paciencia y empatía.

Hoy me celebro, reconozco mi valentía y me abrazo con profundo orgullo.

INDICE

INDICE DE FIGURAS **9**

INDICE DE TABLAS **10**

ABREVIATURAS **11**

1. RESUMEN **14**

ABSTRACT **15**

2. INTRODUCCIÓN **16**

3. ANTECEDENTES **19**

3.1 Trastorno de ansiedad (TA) 19
3.2 Neurobiología de la ansiedad 20
3.3 Impacto de la adversidad en la vida temprana (ELA) en el neurodesarrollo y su participación en el comportamiento ansioso 22
3.6 Herencia del estrés debido al efecto de ELA 30

4. JUSTIFICACIÓN **33**

5. HIPÓTESIS DE TRABAJO **34**

6. OBJETIVOS **35**

6.1 Objetivo general 35
6.2 Objetivos específicos 35

7. MATERIAL Y MÉTODOS **36**

7.1 Estrategia experimental 36
7.2 Animales de laboratorio 37
7.3 Tamaño de muestra 37
7.4 Modelo de separación materna impredecible y estrés impredecible (MSUS) 40
7.5 Estrés impredecible a la madre 41
7.6 Pruebas conductuales 41
7.6.1 Laberinto elevado (EPM) *42*
7.6.2 Campo abierto (OF) *42*
7.6.3 Caja luz- oscuridad (LDB) *43*
7.7 Reproducción y obtención de F2 43
7.7.1 Z-score de emocionalidad *44*
7.8 Sacrificio 45
7.9 Obtención de tejido 46
7.10 Cuantificación de la expresión génica de genes participantes en la neuroplasticidad y desarrollo cerebral: *BDNF y GAD 1 en la corteza cerebral* 46
7.10.1 Extracción de ARN con Trizol. *46*
7.10.2 Tratamiento con DNAasa I *47*

7.10.3 Retrotrascripción para la obtención de ADN complementario 48
7.10.4 Cuantificación de la expresión de bdnf y gad 1. 48
7.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO 49
8. RESULTADOS 50
9. DISCUSIÓN 62
10. CONCLUSIONES 72
11. REFERENCIAS 73

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de los sistemas y estructuras cerebrales relacionadas a la ansiedad. 21
Figura 2. Impacto de la adversidad en la primera infancia en el desarrollo cerebral y el desarrollo a lo largo de la vida 23
Figura 3. El desbalance molecular impulsado por la adversidad en la vida temprana (ELA) 30
Figura 4. Herencia de la adversidad temprana: efectos inter y transgeneracionales. 32
Figura 5. Estrategia experimental. 36
Figura 6. Efecto de la separación materna impredecible y estrés impredecible en la conducta similar a la ansiedad en la generación F1 en la prueba conductual de Laberinto elevado (EPM). 51
Figura 7. Efecto de la separación materna impredecible y estrés impredecible en la conducta similar a la ansiedad en la generación F1 en la prueba conductual de Campo abierto (OF). 51
Figura 8. Efecto de la separación materna impredecible y estrés impredecible (MSUS) en la conducta similar a la ansiedad en la generación F1 en la prueba conductual de Caja luz - obscuridad (OF). 52
Figura 9. Índices de estandarización (Z-score) conductual y de emocionalidad integral en ratones de la generación F1 expuestos a MSUS. 53
Figura 10. Índices de estandarización (Z-score) conductual y de emocionalidad integral en ratones de la generación F1 expuestos a MSUS por sexo. 55
Figura 11. Análisis de la conducta tipo ansiedad en la descendencia (F2) procedentes de ratones sometidos a separación materna impredecible y estrés impredecible en la prueba conductual de Laberinto elevado (EPM). 56
Figura 12. Análisis de la conducta tipo ansiedad en la descendencia (F2) procedentes de ratones sometidos a separación materna impredecible y estrés impredecible en la prueba de campo abierto (OF). 57
Figura 13. Análisis de la conducta tipo ansiedad en la descendencia (F2) procedentes de ratones sometidos a separación materna impredecible y estrés impredecible en la prueba de caja luz – obscuridad (LDB). 58
Figura 14. Análisis de los niveles de emocionalidad integral en la descendencia de ratones sometidos a separación materna impredecible y estrés impredecible. 59
Figura 15. Efecto de la separación materna impredecible y estrés impredecible. sobre la expresión relativa de ARNm de BDNF exón IV en la corteza cerebral a través de las generaciones F1 y F2. 60
Figura 16. Efecto de la separación materna impredecible y estrés impredecible. sobre la expresión relativa de ARNm de gad 1 en la corteza cerebral a través de las generaciones F1 y F2. 61

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Volúmenes por reacción para el tratamiento con DNasa I 47
Tabla 2. Volúmenes para la reacción de Retrotrascripción..... 48
Tabla 3. Volúmenes por reacción de amplificación en tiempo real (Volumen final 10 µL)..... 48
Tabla 4. Primers a utilizar para la amplificación de la expresión génica del gen bdnf exón IV y gad 1 en la cepa C57BL/6 Mus Musculus 49

ABREVIATURAS

- ACTH: Hormona adrenocorticotrópica.
- ADN / DNA: Ácido desoxirribonucleico.
- DNAc: ADN convertido (por bisulfito).
- aEEG: Electroencefalografía de amplitud integrada.
- Bdnf / BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*).
- BLA PN: Neuronas piramidales de la amígdala basolateral (*Basolateral Amygdala Pyramidal Neurons*).
- BLAST: Herramienta de búsqueda de alineamiento local básico (*Basic Local Alignment Search Tool*).
- BNST / BSNT: Núcleo del lecho de la estría terminal (*Bed Nucleus of the Stria Terminalis*).
- CpG: Citocina-Fosfato-Guanina (sitios o dinucleótidos de metilación).
- CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (*cAMP Response Element-Binding Protein*).
- CRH: Hormona liberadora de corticotropina.
- CRHR1: Receptor tipo 1 de la hormona liberadora de corticotropina.
- DMD: Diferencia Mínima Detectable.
- DOHaD / LHPA: Orígenes del Desarrollo de la Salud y la Enfermedad (*Developmental Origins of Health and Disease*) / Eje límbico-hipotálamo-hipófisis-adrenal.
- DO: Densidad óptica.
- EDTA: Ácido etilendiaminatetraacético.
- ELA: Adversidad en la vida temprana (por sus siglas en ingles *Early Life Adversity*)
- / ELS: Estrés en la vida temprana (por sus siglas en ingles *Early Life Stress*).
- EMP: Laberinto elevado en cruz (*Elevated Plus Maze*).
- E/I: Excitatorio / Inhibitorio (equilibrio o desbalance sináptico).
- F0, F1, F2, F3: Generaciones del estudio (F0: Padres/Madres fundadoras; F1: Primera generación; F2: Segunda generación; F3: Tercera generación).
- FKBP5: Proteína de unión a FK506 5.
- GABA: Ácido gamma-aminobutírico.
- GABBR1: Receptor de GABA tipo B, subunidad 1
- GAB A: Receptor de ácido gamma-aminobutírico.
- GAD67: Glutamato descarboxilasa 67.
- GC: Regiones ricas en Guanina-Citosina.
- Hi-Di: Formamida altamente desionizada (*Highly Deionized Formamide*).
- IQR: Rango intercuartílico (*Interquartile Range*).
- LDB / LBD: Caja de luz-oscuridad (*Light-Dark Box*).

- MAPK / ERK: Proteína quinasa activada por mitógenos / Quinasa regulada por señales extracelulares.
- Mc / Me: Media del grupo de referencia / Media del grupo de intervención alternativa.
- MPM: Marcador de peso molecular.
- MSEW: Separación materna con destete temprano (por sus siglas en inglés *Maternal Separation with Early Weaning*).
- MSU: Separación materna impredecible (por sus siglas en inglés *Maternal Separation Unpredictable*)
- MSUS: Separación materna impredecible combinada con estrés impredecible.
- NC / Ne: Tamaño de muestra para el grupo de referencia / Tamaño de muestra para el grupo con intervención.
- NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*).
- NOM: Norma Oficial Mexicana.
- NR3C1: Receptor de glucocorticoides (subfamilia 3, grupo C, miembro 1).
- ns: No significativo.
- OF: Campo abierto (*Open Field*).
- p: Valor de significancia estadística.
- pb: Pares de bases.
- PFC: Corteza prefrontal (*Prefrontal Cortex*).
- PD / PND: Día postnatal (*Postnatal Day*).
- PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa.
- PLC-γ: Fosfolipasa C gamma.
- PV: Interneuronas de parvalbúmina.
- RRBS: Secuenciación de representación reducida por bisulfito (*Reduced Representation Bisulfite Sequencing*).
- SEM: Error estándar de la media (*Standard Error of the Mean*).
- SNC: Sistema Nervioso Central.
- SPSS: Software Estadístico (*Statistical Package for the Social Sciences*).
- TA / TAG: Trastorno de ansiedad / Trastorno de ansiedad generalizada.
- TAE: Amortiguador de Tris-Acetato-EDTA.
- TE: Amortiguador Tris-EDTA.
- TEPT: Trastorno de estrés postraumático.
- TI / TLAT: Tiempo de inactividad / Tiempo de latencia.
- Tm: Temperatura de fusión / alineamiento óptimo (*Melting Temperature*).
- TOC: Trastorno obsesivo-compulsivo.
- %TBA: Proporción del tiempo en los brazos abiertos
- %TP: Proporción del tiempo en la periferia.
- TrKB: Receptor de la quinasa b del receptor de tropomiosina (*Tropomyosin receptor kinase B*).

- TSNT: Técnica de extracción de ADN (Buffer Tritón-Sodio-NaCl-Tris).
- UV: Luz ultravioleta.
- vHIP: Hipocampo ventral.
- WT / Z-EPM / Z-OF / Z-LDB: Puntuaciones estandarizadas Z por cada prueba conductual.
- WT: Fenotipo silvestre o *naïve*

1. RESUMEN

El trastorno de ansiedad (TA) es una enfermedad prevalente vinculada a la exposición a adversidades en la vida temprana (ELA). Esta investigación evaluó el efecto de la separación materna y estrés impredecible (MSUS) durante los primeros 14 días postnatales en ratones C57BL/6J sobre el desarrollo y la herencia intergeneracional de conductas tipo ansiosas, analizando además la exposición génica cortical del trascripto con el exón IV de bdnf y gad 1 mediante RT-qPCR. En la primera generación (F1), el modelo MSUS indujo un fenotipo tipo ansioso caracterizado por un menor tiempo de permanencia y menor número de transiciones en los brazos abiertos del laberinto elevado (EMP) y un mayor tiempo de latencia de entrar en zona iluminada en la caja luz-oscuridad (LDB), lo que se reflejó en un incremento significativo en el Z-score del EPM y en la tendencia del Z-score global de emocionalidad. Al estratificar este efecto por sexo, las hembras F1 sometidas a ELA manifestaron de forma selectiva este fenotipo tipo ansioso. En la segunda generación (F2), obtenida vía materna, los descendientes no exhibieron la herencia de las alteraciones conductuales. Sin embargo, a nivel molecular se observó un incremento estadísticamente significativo en la expresión relativa del trascripto con el exón IV de bdnf exclusivamente en la corteza de la F2, manteniendo los niveles de gad 1 sin cambios en ambas generaciones. En conclusión, la sobreexpresión observada de *bdnf* en la generación F2 sugiere la activación de un mecanismo neuroprotector adaptativo que amortigua la transmisión del fenotipo ansioso en condiciones basales.

DR. C. ALBERTO CAMACHO MORALES

Director de Tesis

ABSTRACT

Anxiety disorders are highly prevalent conditions linked to early life adversity (ELA). This study evaluated the effect of the unpredictable maternal separation combined with unpredictable stress (MSUS) paradigm during the first 14 postnatal days in C57BL/6J mice on the development and intergenerational transmission of anxiety-like behaviors, while also analyzing the cortical gene expression of *BDNF* exon IV and *Gad1* via RT-qPCR. In the first generation (F1), the MSUS model induced an anxiety-like phenotype characterized by reduced time and transitions in the open arms of the elevated plus maze (EPM) and an increased latency in the light-dark box (LDB), which was reflected by a significant increase in the EPM Z-score and a trend toward an increased overall emotionality Z-score. Sex-stratified analysis revealed that F1 females selectively displayed this anxiety phenotype. In the second generation (F2), obtained through the maternal line, offspring did not exhibit behavioral alterations. However, molecular analysis demonstrated a statistically significant increase in the relative expression of *BDNF* exon IV exclusively in the cortex of the F2 generation, while *Gad1* levels remained unchanged across both generations. In conclusion, the observed overexpression of *BDNF* in the F2 generation suggests the activation of an adaptive neuroprotective mechanism that buffers the transmission of the behavioral anxiety phenotype under basal conditions



DR. C. ALBERTO CAMACHO MORALES

Director de Tesis

2. INTRODUCCIÓN

Dentro de los trastornos mentales más comunes a nivel mundial se encuentra el trastorno de ansiedad (TA), dentro de estos trastornos se suele experimentar miedo y preocupación de manera intensa y excesiva ante una situación específicas y en ausencia de un peligro real (Shin & Liberzon, 2010). Estos sentimientos suelen ir acompañados de tensión física y otros síntomas conductuales y cognitivos interfiriendo con la actividad de la vida cotidiana y pueden deteriorar la vida familiar, social y escolar o laboral de una persona. La patogénesis del TA es multifactorial, entre estos factores se puede encontrar factores biológicos, ambientales, genéticos, psicológicos que participan en el desarrollo de TA. Dentro de estos el medio ambiente al cual está sometido un individuo ha sido pieza clave en entender la tipología de diferentes enfermedades mentales. Por ejemplo, las exposiciones parentales adversas y las características tempranas de la vida, tanto en el desarrollo intrauterino y la primera infancia, influyen en la salud física y en la mental de la descendencia (Fleming et al., 2018; Franklin et al., 2010a; Hanson & Gluckman, 2014; Mao et al., 2024).

La ansiedad emerge de disfunciones en redes que integran estructuras corticales y subcorticales, como la amígdala, hipocampo, corteza prefrontal (PFC), BSNT, hipotálamo, estriado, ínsula y núcleo talámico, cuya dinámica anormal se ha documentado en estudios de neuroimagen y modelos animales (Jaimes Cienfuegos et al., 2024; Martin et al., 2009; Shin & Liberzon, 2010; M. Xie et al., 2024). De forma convergente, se describe hiperreactividad límbica – en particular de la amígdala- y control desecante insuficiente de regiones ejecutivas como la PFC, favoreciendo respuestas exageradas al estrés y al miedo (Martin et al., 2009; Shin & Liberzon, 2010). Este desbalance se articula con la activación del eje límbico – hipotálamo-hipófisis-adrenal (LHPA) y la secreción de CRH, ACTH y cortisol, procesos que, cuando son crónicamente desregulados, facilitan fenotipos ansiosos (Chen et al., 2022; Shin & Liberzon, 2010; S. Xie et al., 2021)

Las exposiciones ambientales tempranas constituyen un determinante central del riesgo de TA bajo el marco de los orígenes del Desarrollo de la Salud y la enfermedad. La adversidad parental y en la primera infancia, incluida la separación

materna (SM), pueden remodelar de manera persistente circuitos límbicos – prefrontales, alterando la mielinización y modular la respuesta al estrés (Chen et al., 2022; Fleming et al., 2018; Hamdan et al., 2022; Hanson & Gluckman, 2014; Mao et al., 2024). La interrupción del apego y del contacto temprano madre – cría afecta ritmos fisiológicos maduración cortical y desempeño neuroconductual, apoyando la noción de periodo crítico de alta plasticidad en los que la experiencia guía el refinamiento sináptico (Castrén & Antila, 2017; Mitchelmore & Gede, 2014; Y. Wang et al., 2022; Zhang et al., 2024).

A nivel molecular, el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y su receptor TrKB median la traducción de la experiencia en cambios de conectividad, activando vías como lo son MAPK/ERK, PI3K y PLC-γ y, en última instancia, factores de trascripción como CREB, con efectos en crecimiento neurotrófico y plasticidad sináptica. Dada su expresión en interneuronas de parvalbúmina (PV) de PFC, el BDNF es clave para el equilibrio excitatorio/inhibitorio durante periodos críticos; reducciones inducidas por estrés posnatal podrían retrasar la maduración inhibitoria y predisponer a desbalances E/I asociados con ansiedad (Adjimann et al., 2021; Sakata et al., 2009; Tenkumo et al., 2020). En paralelo, el sistema GABAérgico específicamente las enzimas glutamato descarboxilasas – GAD muestran alteraciones vinculadas a fenotipos ansiosos (Mulligan et al., 2019). La desregulación de estos sistemas, particularmente a través de cambios transcripcionales en regiones reguladoras como el exón IV de *Bdnf*, ha sido señalada como un sustrato mecanístico relevante tras la exposición a modelos de separación materna (Badowska-Szalewska et al., 2021; Fungaro Rissatti et al., 2024; Tenkumo et al., 2020).

Asimismo, las consecuencias del trauma temprano y los modelos de interacción madre – cría alterados no se limitan a los individuos directamente expuestos, sino que pueden perdurar a través del tiempo y trasmitirse hacia la descendencia mediante mecanismos intergeneracionales y transgeneracionales (Franklin et al., 2010a; Gapp, Jawaid, et al., 2014; Gapp, Soldado-Magraner, et al., 2014; Van Steenwyk et al., 2018). Entender como la exposición a la adversidad temprana reconfigura la plasticidad y trasmisión inhibitoria a nivel cortical, así como la manera

en que estas alteraciones moleculares y conductuales se transfieren a través de las generaciones, resulta fundamental para esclarecer los mecanismos de vulnerabilidad y la programación del desarrollo en los trastornos de ansiedad.

Por consiguiente, la realización de esta tesis es de importancia ya que aborda uno de los mayores desafíos a nivel de la neurobiología, donde se trata de explicar cómo la adversidad en etapas tempranas de la vida se traduce en cambios biológicos estables que predisponen a la ansiedad tanto en el individuo como en su descendencia. Al profundizar en la relación entre el estrés temprano, la desregulación de Bdnf y la maduración del sistema GABAérgico en la corteza prefrontal, este trabajo ayudara a identificar uno de los procesos celulares y moleculares que determinan la vulnerabilidad a los trastornos tipo ansiosos como la herencia de dicha alteración conductual a la descendencia.

3. ANTECEDENTES

3.1 Trastorno de ansiedad (TA)

Los trastornos mentales más numerosos en nuestra población se integran en dos categorías diagnosticas principales: los trastornos depresivos y los trastornos de ansiedad. La ansiedad es considerada una respuesta común del organismo ante situaciones de miedo o presión, sin embargo, cuando es constante puede convertirse en trastorno y requerir tratamiento psiquiátrico (Secretaria de Salud de México, 2024). Siendo así el trastorno de ansiedad un grupo de afecciones mentales caracterizadas por sentimientos de ansiedad y miedo persistente a situaciones o eventos cotidianos, e incluyen el trastorno de ansiedad generalizada (TAG), el trastorno de pánico, las fobias, el trastorno de ansiedad social, el trastorno obsesivo-compulsivo (TOC) y el trastorno de estrés postraumático (TEPT). Estos trastornos son muy prevalentes en la población (por ello que son considerados “comunes”) y afectan el estado de ánimo o los sentimientos de las personas; los síntomas varían en intensidad (de leves a graves) y en duración (de meses a años). Estas afecciones se consideran condiciones de salud diagnosticables y se distinguen de los sentimientos de tristeza, estrés o miedo que cualquiera puede experimentar de vez en cuando en la vida (World Health Organization, 2017).

La ansiedad se sitúa entre las 25 principales causas de carga de enfermedad a nivel mundial en 2019 y es uno de los trastornos mentales más comunes en la población general (Sabbah & Northoff, 2025). La Organización Mundial de la Salud estimó que, en 2015, 264 millones de personas en todo el mundo padecían un trastorno de ansiedad lo que corresponde a tasas de prevalencia del 3,6 %. Para 2019 estas cifras aumentaron a 301 millones de personas en todo el mundo, con una tasa de prevalencia del 4% (World Health Organization, 2023). Aunque su prevalencia varía ligeramente según la edad y el género, se encuentra entre los trastornos mentales más comunes en la población general (Hohls et al., 2021).

La patogénesis del TA es multifactorial, entre estos factores se puede encontrar factores biológicos, ambientales, genéticos, psicológicos que participan en el desarrollo de TA (Cunningham et al., 2021). Diversos estudios han mostrado

evidencia que los factores ambientales parentales—incluida la dieta, la composición corporal, el metabolismo y el estrés—impactan en el desarrollo embrionario y, por tanto, afectan la salud y el riesgo de enfermedades a lo largo de toda la vida, tal como refleja el concepto de Orígenes del Desarrollo de la Salud y la Enfermedad (DOHaD). Según esta perspectiva, las exposiciones parentales adversas y las características tempranas de la vida, tanto en el desarrollo intrauterino y la primera infancia, influyen en la salud física y en la mental de la descendencia (Fleming et al., 2018; Hanson & Gluckman, 2014; Mao et al., 2024). En la siguiente sección describiremos las causas neurobiológicas del desarrollo de ansiedad.

3.2 Neurobiología de la ansiedad

La neurobiología del cerebro involucra las estructuras anatómicas, neurotransmisores, distintos subtipos de receptores, hormonas y vías cerebrales (Martin et al., 2009). El cerebro tiene la capacidad de realizar cambios estructurales reversibles que permiten adaptar al organismo al entorno cambiante. Entre los cambios neuronales se incluye la remodelación dendrítica (expansión y contracción de árboles dendríticos), la renovación de las conexiones sinápticas y la limitación del reemplazo neuronal mediante neurogénesis (Persaud & Cates, 2023). Las investigaciones en neuroimágenes se han centrado en determinar circuitos cerebrales asociados con la respuesta al miedo, principalmente en roedores (Shin & Liberzon, 2010).

Los componentes que abarcan la conexión entre regiones corticales como subcorticales, importantes relacionadas con los trastornos de ansiedad, incluyen BNST, corteza prefrontal, amígdala, hipocampo, el núcleo accumbens, el hipotálamo, la sustancia gris periacueductal, varios núcleos del tronco encefálico, los núcleos talámicos y la corteza insular (Shin & Liberzon, 2010; M. Xie et al., 2024). Los estudios de neuroimágenes han demostrado una heterogeneidad fenotípica según los diferentes trastornos de ansiadas, donde se han revelado principalmente la hiperactivación de áreas cerebrales específicas como la corteza cingulada anterior, la corteza prefrontal dorsolateral, la amígdala, la ínsula y la circunvolución parahipocampal (Jaimes Cienfuegos et al., 2024). Incluso se ha

reportado que los trastornos de la ansiedad tienen en común la hiperactividad funcional en las regiones límbicas, en particular la amígdala, y la incapacidad de las áreas ejecutivas corticales superiores para normalizar la respuesta límbica a los estímulos (Martin et al., 2009).

Los trastornos de ansiedad presentan anomalías en el proceso cognitivo, el condicionamiento del miedo, la anticipación de la incertidumbre, el sesgo de motivación y la regulación del estrés (Shin & Liberzon, 2010).

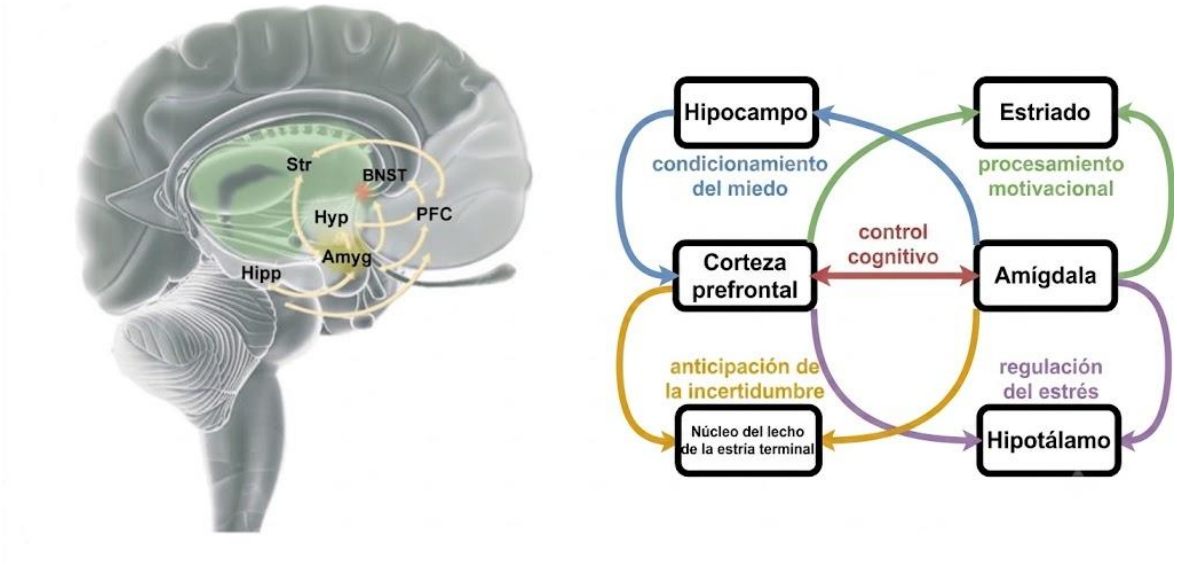


Figura 1. Representación esquemática de los sistemas y estructuras cerebrales relacionadas a la ansiedad*. La interacción patológica de las seis regiones críticas de la red neuronal de la ansiedad provoca anomalías funcionales en pacientes con trastorno de ansiedad. Amyg (Amígdala); BNST (Núcleo del lecho de la estría terminal); Hipp (Hipocampo); Hyp (Hipotálamo); PFC (Corteza prefrontal); Str (Estriado)(S. Xie et al., 2021).*

La falla de la regulación del estrés se asocia a un reclutamiento anormal del hipotálamo, la amígdala y la corteza prefrontal. La amígdala detecta estímulos amenazantes, enviando señales excitatorias al hipocampo y el cual desencadena la activación del eje límbico-hipotálamo-hipofisario-adrenal (LHPA) y la secreción de hormonas del estrés, como la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y el cortisol, lo cual en un trastorno de ansiedad se intensifica debido a una sobreactivación de la amígdala lo que promueve una conducta ansiosa debido a la amplificación de la respuesta al estrés por estrés. Además de recibir estas señales participa en a la expresión generalizada

del miedo, se ha observado que la desactivación de sus neuronas de orexina puede reducir el miedo excesivo. Por su parte la corteza prefrontal juega papel modulador clave, enviando proyecciones a hipotálamo para regular la actividad emocional y controlar la conducta. En condiciones de ansiedad, esta puede activar aún más la amígdala mediante liberación de dopamina, además al ser deficiente pierde el control descendente lo que favorece una respuesta exagerada al estrés (Shin & Liberzon, 2010; S. Xie et al., 2021). La PFC ha sido en los últimos años de mucho interés ya que es una región crucial implicada en la fisiopatología de los trastornos emocional sensible a la exposición al estrés en las primeras etapas. Esta región mantiene un alto grado de conectividad con áreas límbicas como el núcleo accumbens y la amígdala, y cada una de estas conexiones funcionales contribuyen de manera distinta a la regulación del comportamiento emocional y la patología de los trastornos neuropsiquiátricos. (Chen et al., 2022).

3.3 Impacto de la adversidad en la vida temprana (ELA) en el neurodesarrollo y su participación en el comportamiento ansioso

El desarrollo del cerebro en los humanos abarca tantas etapas prenatales genéticamente guiada in útero y una etapa de alta sensibilidad a la experiencia que se extiende hasta el periodo posnatal (Kolb et al., 2014). Se sabe que el cerebro tanto de animales altriciales, incluidos los humanos coma los primates no humanos y los roedores, continúan desarrollándose después del nacimiento. También está bien establecido que la experiencia en las primeras etapas de la vida interactúa con factores genéticos para moldear la estructura y función cerebral, si bien en la etapa prenatal procesos como la neurogénesis, la migración neuronal, el crecimiento axonal y dendrítico y la sinaptogénesis establecen los circuitos neuronales subyacentes a la cognición, emoción y la conducta social en la etapa posnatal se desempeña un papel critico en el refinamiento y establecimiento de las redes neuronales, particularmente durante la infancia temprana donde la plasticidad sináptica es máxima permitiendo que estímulos ambientales, como es el cuidado y el apego, influyan fuertemente en la supervivencia neuronal, la densidad sináptica y la organización de los circuitos (Sullivan, 2012).Por lo tanto,la importancia de un entorno adecuado y seguro en los humanos radica en el hecho de que los individuos

con un entorno favorable tienen una mayor probabilidad de madurar hacia una buena salud mental, mientras que los individuos con entornos deficientes o abusivos tienen una mayor probabilidad de experimentar problemas mentales en la edad adulta (Moriceau et al., 2010).En este contexto ha sido reportado específicamente que la exposición significativa a estímulos adversos en la vida temprana (por sus signas en ingles ELA) como el abuso y la negligencia infantil, la exposición a la violencia, el divorcio de los padres, las enfermedades físicas infantiles y las dificultades económicas familiares, influyen profundamente en el desarrollo cerebral e inducen cambios neurobiológicos persistentes que pueden predisponer a un individuo a trastornos del estado de ánimo, salud mental y uso de sustancias en la edad adulta (Hamdan et al., 2022; Speranza et al., 2024).

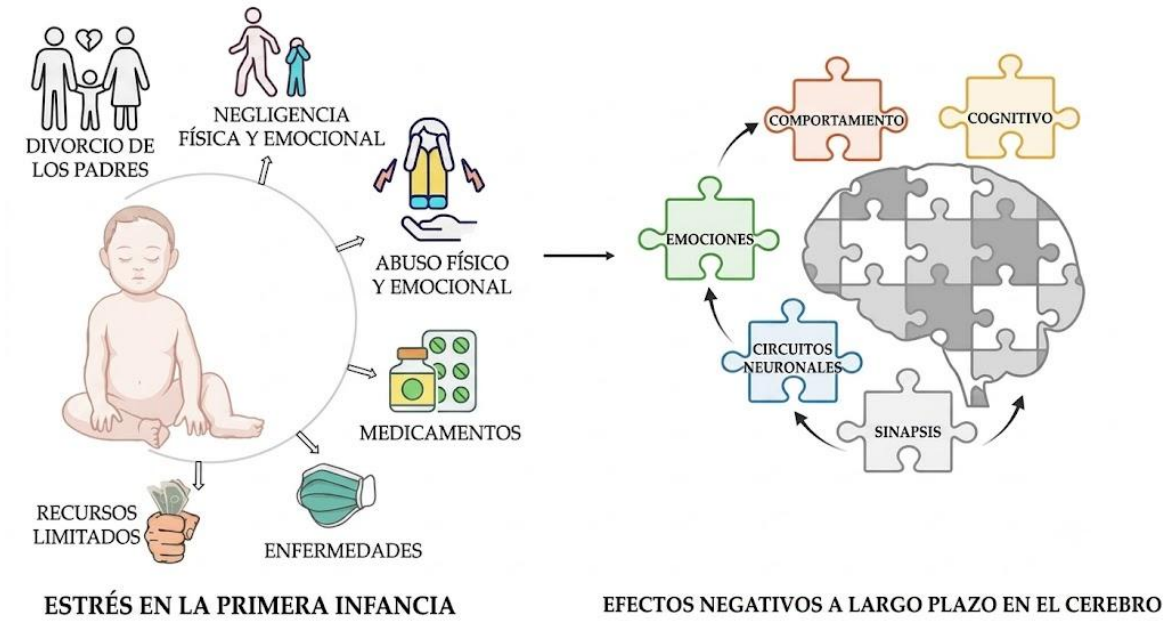


Figura 2. Impacto de la adversidad en la primera infancia en el desarrollo cerebral y el desarrollo a lo largo de la vida (Speranza et al., 2024).

La investigación en neuroimagen indica que la experiencia temprana en niños con desarrollo típico se asocia con patrones distintos de activación a través de las redes frontales, límbicas y de los ganglios basales cuando el sistema de apego se activa, lo que sugiere que la seguridad del apego y el ambiente favorable está respaldada por una actividad coordinada dentro de los circuitos neuronales involucrados en la

regulación emocional, la motivación y el procesamiento social (Choi et al., 2018; Madden et al., 2023). Se demostró que las condiciones de cuidado adverso temprano, particularmente durante la infancia, se asocian con una actividad amigdalina atípicamente elevada en la niñez, junto con hipertrofia estructural e incremento de dificultades emocionales y relacionadas con la ansiedad (Tottenham et al., 2011). Los niños expuestos a privación materna temprana muestran patrones de conectividad amígdala-corteza prefrontal medial atípicos y prematuramente maduros, semejantes a los que normalmente se observan durante la adolescencia. Este desarrollo acelerado de la mecadística fronto-amigdalina se caracteriza por un acoplamiento amígdala-mPFC prematuramente negativo (Gee, Gabard-Durnam, et al., 2013; Gee, Humphreys, et al., 2013

En nuestra población y de importancia para dicho estudio, uno de los inductores principales de ELA es la separación materna (SM) en etapas tempranas de la vida. La interacción dinámica entre bebes y sus padres representan una relación esencial, que configura y moldea el sistema nervioso del bebé, incluyendo la arquitectura de los circuitos cerebrales y, en consecuencia, el desarrollo conductual. El apego temprano entre madre y recién nacidos pueden regular positivamente el sueño neonatal, las hormonas, la respuesta conductual y el desarrollo (Y. Zhang et al., 2024). El contacto piel a piel promueve vinculo y liberación de hormonas saludables como regulación de la temperatura corporal y frecuencia cardiaca. Incluso el calor y los latidos del corazón de la madre proporcionan comodidad y ayudan a regulación de temperatura corporal como patrones de respiración del bebe (Y. Zhang et al., 2024). Un ensayo mostro que el contacto temprano entre madre e hijo tiene una actividad más madura en la electroencefalografía de amplitud integrada (aEEG) y presenta un mejor rendimiento neuroconductual en bebes prematuros (Y. Wang et al., 2022; Zhang et al., 2024). La SM a reportado la activa respuesta neuroinflamatoria, desregulación del eje HPA, desregulación del sistema dopaminérgico, alteración de la mielinización axonal y reconfigura a los circuitos neuronales alterando la plasticidad y transmisión de señales en redes y regiones implicadas en la regulación emocional y el afrontamiento al estrés. Investigaciones

han recalcado que la SM produce disminución en la excitabilidad neuronal y una formación anormal de mielina en la corteza prefrontal medial (Chen et al., 2022)

Incluso el impacto a largo plazo del trauma temprano se ha presenciado en modelos de estrés temprano en roedores utilizando el paradigma de SM el cual modela la interacción madre – hijo perturbado, la privación del cuidado en la vida temprana y/o la negligencia (Speranza et al., 2024). Diversos estudios en humanos, primates y roedores han documentado que el apego inseguro y los cuidados poco fiables, desorganizados o deficientes influyen negativamente en las respuestas conductuales adecuadas y provocan comportamientos desadaptativos. En este contexto, se ha reportado por *Hamdan et al. (2022)* un aumento de los niveles basales del comportamiento similar a la ansiedad en ratas sometidas a separación materna en comparación con los animales de control. Además, otras investigaciones han mostrado que la separación materna impredecible (MSU) en ratones C57BJ/6 es uno de los modelos inter – transgeneracional que han sido ampliamente utilizado para reproducir en roedores el impacto del estrés temprano afectando a la descendencia en el neurodesarrollo y en los comportamientos sociales y cognitivos (Franklin et al., 2010b; Van Steenwyk et al., 2018; Weiss et al., 2011).

3.4 El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) modula la Plasticidad cerebral en la ELA

Durante el desarrollo temprano del cerebro, el periodo crítico se caracteriza por una mayor plasticidad neuronal y es un periodo importante para la formación de circuitos neuronales, incluidos los mecanismos subyacentes a la arborización axonal/dendrítica y la sinaptogénesis (Castrén & Antila, 2017).

Los factores estresantes que ocurren en los periodos críticos del desarrollo, como la vida perinatal, producen efectos adversos en numerosos comportamientos y funciones fisiológicas, incluyendo el crecimiento, el metabolismo, la reproducción, el sueño y la respuesta inflamatoria/inmunitaria. Por ejemplo, se ha informado que las interrupciones de las interacciones típicas entre madre y cría inducen cambios persistentes en la neurobiología, la fisiología y el comportamiento emocional de

animales adolescentes y adultos al alterar la capacidad de respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (HPA)(Endo et al., 2021).

La plasticidad se intensifica durante este periodo crítico lo que permite un arreglo fino y eficiente de las redes neuronales en desarrollo, este proceso es impulsado por la experiencia, es decir, el entorno externo e interno de un individuo gradualmente se representa en la estructura y función neuronal durante el desarrollo y el aprendizaje. En si la plasticidad no tiene una dirección en particular; es la actividad dependiente de la experiencia dentro de la red neurona la que determina cuales conexiones se fortalecen y mantienen y cuales se eliminan, es decir, es adaptativa cuando esta guiada por el estímulo ambiental beneficiosos, pero si la experiencia que la guían es adversa pueden ser desadaptativas (Mitchelmore & Gede, 2014).

El BDNF, una proteína secretora de la familia de las neutrofinas, es un mediador central de la plasticidad mediante la cual las experiencias ambientales, como la información sensorial se traduce en la estructura y función de las redes neuronales. La síntesis, liberación y acción de BDNF está regulada por la actividad neuronal, y el BDNF a su vez produce efectos tróficos como la formación, estabilización y potenciación de sinapsis a través de su unión a los receptores TrkB de alta afinidad (Ali et al., 2024). La unión de BDNF a su receptor TrkB conduce la fosforilación de residuos de tirosina en el dominio subcelular de TrkB activa varias vías de señalización dentro de la célula, entre ellas la MAPK (quinasa activada por mitógenos), la PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa) y la PLC-γ (fosfolipasa C gamma), estas rutas de señalización finalmente conducen a la activación de CREB, descendente de la diferenciación y supervivencia neuronal, el crecimiento de neuritas y la plasticidad sináptica (Ali et al., 2024; Ikegame et al., 2013) además promueve el aprendizaje, la memoria y la función cognitiva, al mismo tiempo que favorece la disminución de la ansiedad (Bach et al., 2023). Por otro lado, se incluye procesos atróficos como la apoptosis, la retracción axonal, la poda dendrítica y la pérdida de sinapsis mediante su proforma, pro-BDNF, al unirse a p75NTR (Castrén & Antila, 2017). El BDNF tiene una compleja regulación ya que consta de 9 exones

no codificantes en el extremo 5´denominados I – IXa, cada uno con un promotor único, los exones no codificantes se empalman con el exón codificante común en extremo 3´(IX), de modo que todas las variantes de transcripción de BDNF producen la misma proteína. La regulación transcripcional de los promotores de BDNF controlan la expresión temporal, espacial y dependiente de la actividad de BDNF(Bach et al., 2024; Badowska-Szalewska et al., 2021). Se ha reportado cambios en la expresión de moduladores neurogénicos como el BDNF después de protocolos de estrés postnatal temprano (Adjimann et al., 2021). La interrupción de la señalización de BDNF en el cerebro, sea por la disminución en la expresión o liberación, se ha vinculado a una variedad de trastornos psiquiátricos y neurológicos (Mitchelmore & Gede, 2014). Recientemente el exón IV y su promotor han despertado interés debido a su sensibilidad frente a los factores de estrés ambiental, demostrando que mediante diversos procesos de regulación epigenética y transcripcionales pueden alterar significativamente la expresion de BDNF (Fungaro Rissatti et al., 2024). Respecto al estrés en etapas tempranas del desarrollo se ha reportado que la separación materna (SM) entre los días posnatales (PND) 2 – 14 induce un aumento transitorio de los niveles de bdnf en el hipocampo, la corteza prefrontal y la amígdala en ratas Wistar (Badowska-Szalewska et al., 2021). Sin embargo, los hallazgos en la literatura muestran ciertas variaciones, por ejemplo O'Sullivan et al. (2011) observaron que la SM aumentó los niveles totales de BDNF sin generar cambios en la expresion del exón IV. De manera interesante estudios han revelado que los cambios de expresion de bdnf total y de sus diferentes trascriptos en el hipocampo exhibir una marcada dependencia del punto temporal de evaluación (Nair et al., 2007). Por ejemplo, los animales expuestos a SM crónica (3h diarias, P2–P14) induce un aumento selectivo del transcritos que contiene el exón II en el PND 14, seguido de un aumento selectivo del trascripto que contiene el exón IV y V en PND 21 para finalmente retornar los niveles normales en la edad adulta. Aunque se desconoce las consecuencias de dicho incremento de BDNF tras la SM es posible que esta represente una respuesta adaptativa a las experiencias adversasen la vida temprana. (Nair et al., 2007). Esto se refuerza con lo reportado por Suri et al. (2013) donde los animales sometidos a estrés temprano (SM 3 h diarias del PND 2-14)

exhibieron una regulación bimodal de la expresión de *Bdnf* dependiente de la edad. En etapas jóvenes (2 meses) indujo una mayor expresión que contiene el exón IV de *Bdnf*, sin embargo, al alcanzar la mediana edad (15 meses) provocó una disminución de dicho trascripto.

3.5 El ácido gama - aminobutírico (GABA) modula la Plasticidad cerebral en la ELA

Además de la importancia de los factores neurotróficos el período crítico del neurodesarrollo depende también de un equilibrio adecuado entre excitación e inhibición neuronal. La maduración deficiente de neuronas inhibidoras puede retrasar su inicio y cierre, favoreciendo alteraciones sinápticas y déficits sociales, como los observados en trastornos del desarrollo neurológico (Tenkumo et al., 2020). El (GABA) es un aminoácido proteico que funciona como el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central (SCN). A través de la señalización GABAergica, la excitabilidad neuronal se regula estrechamente aumentando el umbral de activación y reduciendo la conductividad sináptica, atenuando así la transmisión del estímulo. Este sistema inhibidor desempeña un papel crítico en la remodelación sináptica y la diferenciación neuronal garantizando un procesamiento eficiente de la información a través de los circuitos neuronales. La interacción entre los sistemas inhibidores y excitadores influyen en la motivación la conducta, la percepción sensorial, la regulación del dolor y el procesamiento visual (Grzesińska, 2025). El GABA se sintetiza a partir del glutamato mediante la acción de la enzima glutamato de carboxilasa (GAD), con fosfato de priridoxal como cofactor. Dos isoformas GAD 67 (GAD 1) y Gad 65 (GAD 2), son responsables de la síntesis de GABA y se regulan de manera diferencial. Evidencia indica que la exposición al estrés conduce a una disponibilidad reducida de GABA y una señalización inhibitoria alterada (Grzesińska, 2025; McArdle et al., 2023).

Para investigar como la exposición a un entorno de desarrollo adverso afecta la sociabilidad y la conducta, Ohta et al. (2020) examinaron el equilibrio excitador e inhibidor (E/I) en la corteza prefrontal medial (mPFC) de ratas macho adultas jóvenes expuestas a separación materna (MS). En este modelo, las crías fueron

separadas de su madre durante 3 horas dos veces al día desde el día posnatal 2 al 20. A las 9 semanas de edad, las ratas expuestas a MS mostraron una expresión proteica pre- y post-sináptica reducida en las neuronas inhibidoras, una disminución en el número de interneuronas GAD 67–positivas y un menor número de sinapsis inhibidoras en la mPFC, hallazgos que se asociaron con déficits sociales. Adema reforzando la importancia del entorno temprano otro estudio demostró que la calidad de cuidado materno participa en la modulación del desarrollo de los sistemas GABAérgico a, ya que las crías de madres con alto nivel de lamido/acicalamiento (alto-LG) mostraron un aumento en la expresión de ARNm de GAD 1 en el hipocampo en comparación con las crías de madres con bajo – LG (T. Y. Zhang et al., 2010)

Una de las numerosas funciones de BDNF en el cerebro es la regulación de las neuronas GABAérgico en la corteza prefrontal. Se ha visto que los receptores de BDNF TrkB se expresan abundantemente en interneuronas de parvalbúmina (PV) las cuales ejercen un poderoso control negativo sobre las células piramidales disparando potenciales de acción no adaptativos (de picos rápidos) de alta frecuencia controlando así la sinapsis excitatoria. En ratones la sobreexpresión BDNF genera una maduración acelerada de interneuronas PV mientras que la eliminación de BDNF o TrkB reduce el número de neuronas PV corticales (Sakata et al., 2009). El BDNF que regula el periodo crítico a través de la maduración de neuronas inhibitorias

Tenkumo et al. (2020) reportan que una disminución en la expresión de BDNF alrededor del PD 7 por SM repetida podría alterar el desarrollo del circuito inhibitorio entre la primera y segunda semana posnatal, lo que sería responsable de causar un desequilibrio E/I en la corteza prefrontal después de la maduración, sin embargo, los autores mencionan que la poca evidencia científica de la influencia de la exposición repetida a la SM durante el periodo crítico aun requiere un mayor investigación para esclarecer con precisión los mecanismos que median los efectos y su impacto en los comportamiento s relacionados.

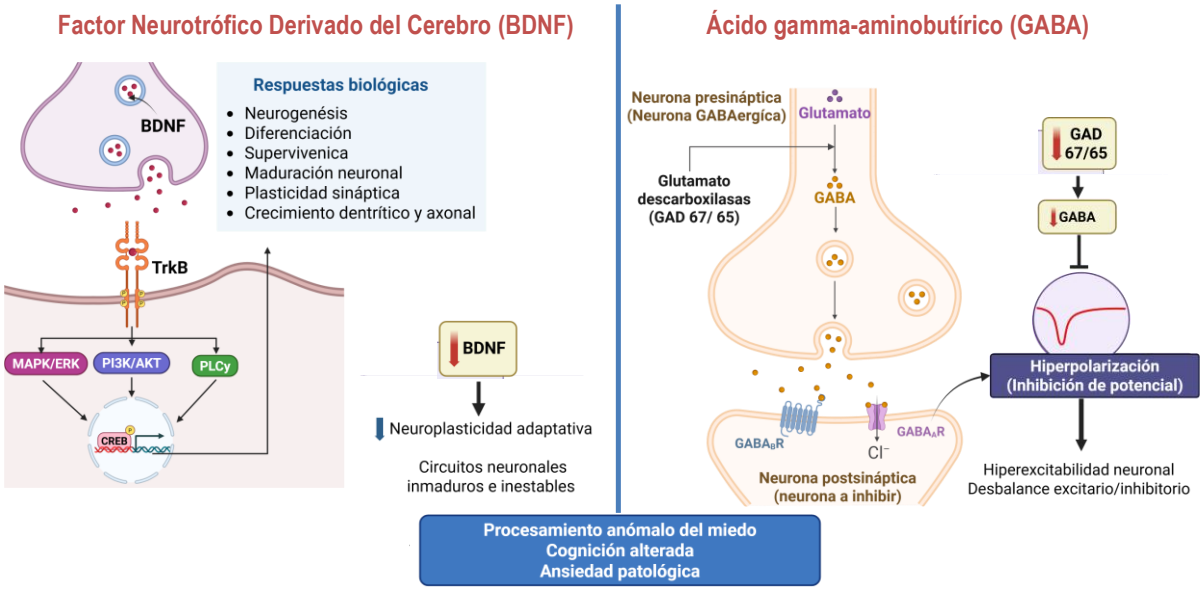


Figura 3. **El desbalance molecular impulsado por la adversidad en la vida temprana (ELA) [Creación propia]**

En conjunto, la evidencia sugiere que la adversidad en las primeras etapas de la vida puede alterar tanto la señalización de BDNF como la regulación GABAérgico, dos sistemas que son críticos para la plasticidad dependiente de la experiencia y el equilibrio E/I durante periodos sensibles del desarrollo. La alteración de estas vías puede comprometer la maduración de los circuitos inhibidores y la estabilidad cortical, proporcionando un vínculo mecanicista entre el trauma temprano, la adversidad relacionada con el apego y la vulnerabilidad socioemocional a largo plazo.

3.6 Herencia del estrés debido al efecto de ELA

Las condiciones ambientales adversas en la vida temprana pueden perdurar hasta la edad adulta no solo en los individuos directamente expuestos, sino también en su descendencia, trasmitiéndose a lo largo de varias generaciones (Gapp, Soldado-Magraner, et al., 2014). Este fenómeno, a menudo denominado “programación del desarrollo”, explica cómo el estilo de vida parental puede incrementar los riesgos a largo plazo de morbilidades en la progenie no solo neurológicas si no también

cardiovasculares, metabólicas e inmunitarias (Fleming et al., 2018; Hanson & Gluckman, 2014; Mao et al., 2024). Recientemente, nuestro grupo documento la programación fetal por dieta hipercalórica en ratas Wistar, favorece la aparición de conductas ansiosas en la descendencia. Adicionalmente el equipo de trabajo identifico alteraciones morfológicas y volumétricas en regiones clave del cerebro tales como amígdala, corteza prefrontal, hipocampo e hipotálamo; asociando dicho fenotipo ansioso con las modificaciones anteriormente mencionadas (Trujillo-Villarreal, 2022). Esto sugiere que las alteraciones moleculares podrían favorecer cambios en distintas regiones cerebrales programando un fenotipo ansioso en la descendencia.

Los efectos de la exposición parental en la descendencia pueden involucrar una respuesta inter o transgeneracional que es dependiente del momento de la exposición en relación con la concepción y si esta tiene un efecto directo o indirecto en la salud de sus descendientes (National Academies of Sciences, 2018). La transmisión intergeneracional implica la exposición directa al estresor de la generación parental (F0) y subsiguiente (F1) por medio de células germinales en desarrollo o al feto. Cuando la exposición al factor ambiental ocurre antes de la concepción, las células germinales de ambos progenitores (masculino y femenino) se ven afectadas por igual, dando lugar a transmisión intergeneracional hacia la generación F1. Sin embargo, si la exposición tiene lugar durante la gestación o en el periodo postnatal temprano, no solo se expone al feto o cría (F1), sino también a las células germinales en desarrollo de esa generación. En ese caso, las alteraciones se transmiten hasta la generación F2. Una transmisión transgeneracional se da cuando surge la primera generación que no está expuesta directamente a la exposición al factor ambiental (Bhattacharya et al., 2019; Klengel et al., 2016; Mbiydzenyuy et al., 2022).

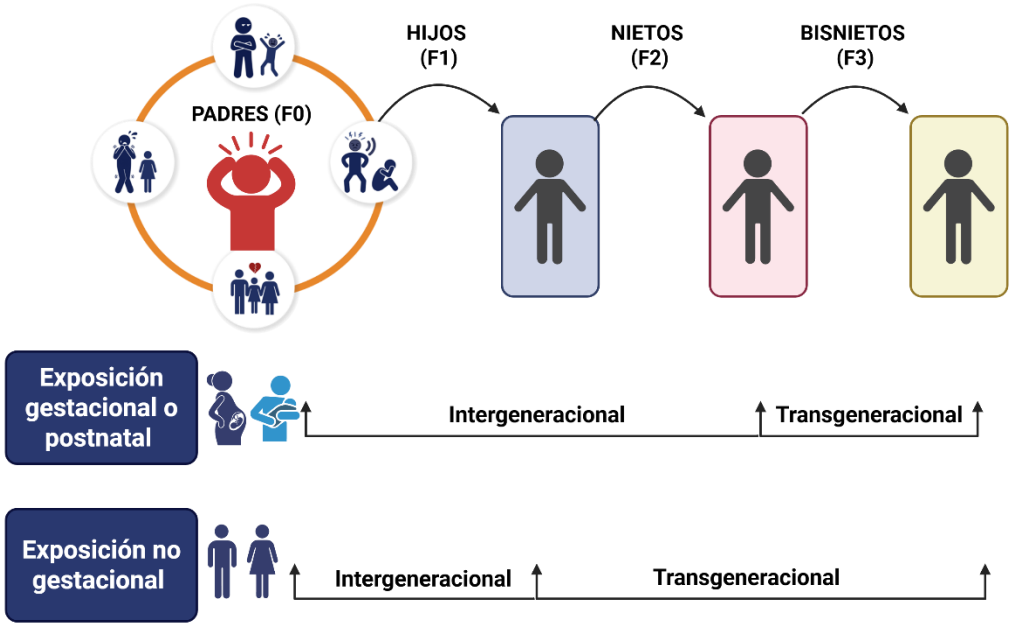


Figura 4. **Herencia de la adversidad temprana: efectos inter y transgeneracionales.**

4. JUSTIFICACIÓN

Los trastornos de ansiedad (TA) afectan a millones de personas en el mundo, disminuyendo su calidad de vida. Se ha identificado a la adversidad en la vida temprana *(early life adverity, ELA)* como un factor de riesgo que altera los procesos neurobiológicos, aumentando la vulnerabilidad a desarrollar trastornos de ansiedad en la vida adulta, no solo en los individuos directamente expuestos, sino también en su descendencia.

Además, se ha reportado que el periodo crítico del neurodesarrollo es susceptible a cambios en la transcripción génica en la corteza cerebral donde estímulos adversos pueden alterar la neuroplasticidad y la respuesta al estrés. Sin embargo, aún se desconocen con precisión los mecanismos específicos de expresión génica en la corteza cerebral que sostienen la susceptibilidad al fenotipo tipo ansioso. Por ello, este proyecto se enfoca en caracterizar el efecto de la ELA en el desarrollo de conductas similares a la ansiedad en un modelo murino, a través del análisis de la expresión génica en la corteza cerebral y evaluar la herencia intergeneracional de dichas alteraciones.

5. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La separación materna impredecible combinado con estrés impredecible (MSUS) genera la aparición y herencia intergeneracional de una conducta similar a la ansiedad a través de la alteración de la expresión génica de *bdnf y gad 1* en la corteza cerebral.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Caracterizar el efecto de la separación materna impredecible y estrés impredecible en el desarrollo de conducta similar a la ansiedad en la generación F1 y su herencia intergeneracional en la generación F2 a través de cambios en la expresión génica de *bdnf y gad 1* en la corteza cerebral.

6.2 Objetivos específicos

1. Identificar la conducta similar a la ansiedad en la generación F1 de ratones en respuesta a la separación materna impredecible combinado con estrés impredecible.
2. Examinar la herencia del comportamiento similar a la ansiedad en la generación F2 provenientes de la generación F1 con fenotipo ansioso.
3. Cuantificar los niveles de expresión génica de bdnf y gad 1 en la corteza cerebral en respuesta a la separación materna impredecible combinado con estrés impredecible en la generación F1 y su descendencia F2.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Estrategia experimental

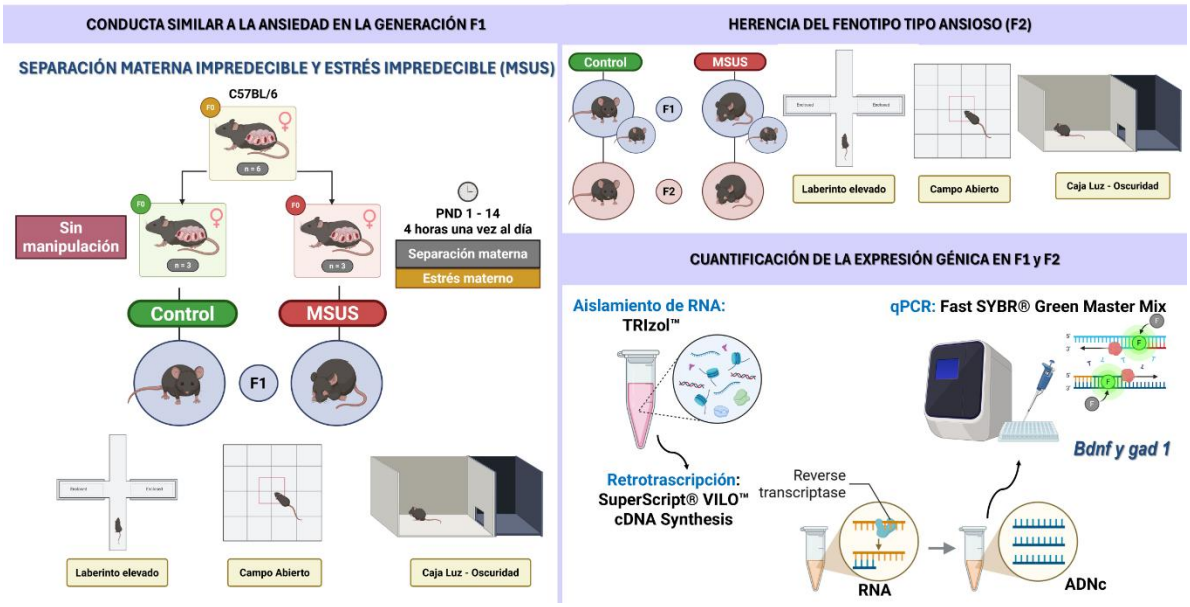


Figura 5. Estrategia experimental. *En este estudio se empleó ratones C57BL/6 sometidos al paradigma de separación materna y estrés impredecible (MSUS) durante los primeros 14 días posnatales, con el fin de inducir un estrés temprano. Primero, se analizó en la generación F1 los efectos del estrés temprano mediante pruebas conductuales que permitan determinar un comportamiento similar a la ansiedad, entre ellas, laberinto elevado, caja luz – oscuridad y campo abierto. A continuación, se reprodujo a estos animales con un ratón del sexo opuesto en condiciones WT/naïve lo que permitió obtener a su progenie F2, de esta se analizó la herencia intergeneracional de los fenotipos tipo ansiosos. Una vez finalizadas las pruebas conductuales, se extrajo el ARN de la corteza de F1 y F2, y se procedió a su tratamiento con DNasa I, retrotrascripción para obtención del ADNc y finalmente la amplificación en tiempo real (qPCR) para la cuantificación de la expresion génica del Bdnf exón IV y Gad 1, genes que participa en el neurodesarrollo, plasticidad y regulación del SNC.*

7.2 Animales de laboratorio

Los experimentos se realizarán empleando ratones hembra y machos de la cepa C57BL/6J de 8 – 10 semanas de edad (20 – 30 g), mantenidos en una instalación con control de temperatura (20 - 23°C) y humedad, bajo un ciclo de luz – oscuridad de 12 horas, con acceso *at libitum* de comida (Labdiet 5000) y agua.

7.3 Tamaño de muestra

El tamaño de muestra estimado en este protocolo contempla aproximadamente 18 animales para F1 y 24 animales para F2 por grupo experimental (Control y MSUS) para las pruebas conductuales. Por ende, se precisan 6 ratone hembras fundadoras WT (naïve) control para el apareamiento, ya que se estima que cada hembra tiene en promedio 6.2 ratones. Esta decisión se basa en el cálculo para el tamaño de muestra, empleando la diferencia de dos medias independientes: fórmula utilizada es nc=ne=2*S2D2*Zα/2*Zβ2, donde nc es el tamaño de muestra para el grupo de referencia, ne es el del grupo con una intervención alternativa, D=(Mc-Me), Mc es la media del primer grupo y Me es la media del segundo, S2 es la varianza de ambas distribuciones, que se suponen iguales, Zβ es el valor del eje de las abscisas de la función normal estándar en dónde se acumula la probabilidad de (1 - β). Esta fórmula para estimar nc = ne se emplea cuando se trata de un contraste de hipótesis bilateral; en caso de un contraste unilateral, se sustituirá Zα/2 por Zα (García-García et al., 2013).

Ecuación 1. Tamaño de muestra	
Cálculo del tamaño de muestra para una diferencia de 2 medias	$n = \frac{(\mathrm{Z}\alpha/2 + \mathrm{Z}\beta)^2 \cdot (2\mathrm{s}^2)}{D^2}$

Donde:

- s = 40, Desviación estándar de la muestra (ambos grupos iguales)
- α = 0.05, nivel de significancia estadística
- Potencia = 0.80, 80 % de probabilidad de detectar una diferencia
- Zα/2 = 1.96, Valor Z asociado a α = 0.05 en prueba bilateral

- Zβ = 0.84, Valor Z asociado a potencia del 80 %
- Constante K = ⟦(Zα/2+Zβ)^2 = (1.96+0.84)2 = 7.84

D =μ1 – μ2;

- μ1 = Media del grupo control
- μ_2 = Media del grupo tratado (MSUS)

Para este cálculo, se seleccionó como variable primaria la respuesta en el Laberinto Elevado en Cruz (EPM), específicamente la latencia de entrada a brazos abiertos. Esta variable fue elegida por ser el indicador conductual más robusto y replicable de alteraciones en la emocionalidad (comportamiento tipo ansioso) en el modelo MSUS con cepa C57BL/6. Los parámetros ingresados en la fórmula se basan en los datos empíricos de Gapp et al. (2014) [Nature Communications], quienes reportan una media de 100 ± 40 para el grupo control, frente a 69 ± 40 para el grupo MSUS. Se aplicó un poder estadístico del 80% y un nivel de confianza del 95% (α = 0.05). Esta decisión se respalda adicionalmente en la evidencia literaria que reporta tamaños de efecto moderados a grandes en modelos de ansiedad con la cepa C57BL/6, permitiendo trabajar con un número de animales suficiente para obtener resultados confiables sin violar el principio de reducción.

Por lo tanto, sustituyendo los valores:

$$n = \frac{7.84(2\ (40)^2)}{(100-69)^2} = \frac{7.84(3200)}{961} = \frac{25088}{961} = 26.10\ ratones/grupo$$

Al considerar una potencia de 80% y un valor de significancia estadística de 0.05, el cálculo a priori genera un tamaño de muestra con un total de 26 ratones por grupo, es decir 53 ratones en total. Sin embargo, este número sobrepasa la cantidad de animales que pueden ser sostenibles en el bioterio, con respecto a espacio y número de cajas de almacenamiento, y desacata el incumplimiento de los lineamientos del principio de las 3Rs. Por ello se procederá a llevar un estudio piloto debido a la naturaleza y primer acercamiento a este efecto en nuestro equipo de trabajo, para ello se empleará un tamaño de muestra de18 animales

por grupo. Para justificar esta elección nos basamos en el cálculo de la diferencia mínima detectable con n = 18, como se muestra a continuación:

Ecuación 2. Calculo para determinación de la Diferencia Mínima Detectable a partir del despeje de D en la ecuación 1.

Ecuación DMD	
Diferencia mínima detectable (D)	$DMD = (\mathrm{Z}\alpha/2 + \mathrm{Z}\beta) \cdot \sqrt{\frac{2\sigma^2}{n}}$

Donde: n = 18, por grupo; **α = 0.05,** Nivel de significancia; **potencia = 0.80,** 80 % de probabilidad de detectar una diferencia; **Zα/2 = 1.96,** Valor Z asociado a α = 0.05 en prueba bilateral; **Zβ = 0.84,** Valor Z asociado a potencia del 80 %; **σ = 40,** Desviación estándar esperada en la latencia de entrada a brazos abiertos.

Por lo tanto, sustituyendo los valores:

$$DMD = (1.96 + 0.84) \cdot \sqrt{\frac{2(40)^2}{18}} = (2.8)\sqrt{\frac{3200}{18}} = (2.8)(\sqrt{177.78}) \quad \cdot$$

$$DMD = (2.8)(13.33)$$

$$DMD = 37.33$$

Con base en un análisis de sensibilidad, al fijar el tamaño de muestra en n = 18 animales por grupo (considerando una potencia estadística del 80%, un nivel de significancia de α= 0.05 y asumiendo una desviación estándar de s = 40), se determina que el estudio tendrá la capacidad de detectar una Diferencia Mínima Detectable de 37.33 segundos en la latencia de entrada a los brazos abiertos del EPM, esta magnitud de diferencia es biológicamente factible y esperable dado el severo impacto del modelo MSUS. La magnitud de la diferencia observada en la generación F1 es biológicamente plausible y consistente con el impacto fenotípico reportado en el modelo MSUS. Sin embargo, para la generación F2, considerando que la transmisión epigenética puede presentar una atenuación del fenotipo (menor tamaño del efecto), se determinó incrementar el número de cruza muestral

para asegurar un poder estadístico suficiente que permita detectar estas variaciones intergeneracionales más sutiles. Incluso este tamaño de muestra coincide con la evidencia en la literatura, la cual reporta tamaños de efecto moderados a grandes en modelos de ansiedad en ratones de la cepa C57BL/6 lo que permite trabajar con un número de animales suficiente para obtener resultados confiables sin usar más animales de los necesarios. Dentro de la literatura, se identificó una revisión sistemática y metaanálisis que analiza el efecto de la separación materna sobre el comportamiento ansioso en roedores. El tamaño de muestra más comúnmente reportado en la literatura se sitúa entre 10 y 16 animales por grupo, particularmente en pruebas conductuales como Laberinto elevado – EPM (Wang et al., 2020). Además, este tamaño de muestra se sitúa en el rango de las publicaciones de los laboratorios pioneros que utilizaron el modelo MSUS (Franklin et al., 2010a; Gapp et al., 2014). Mientras que Franklin validó efectos conductuales empleando 18-20 ratones, Gapp demostró que, para la latencia en el EPM, n = 15 es suficiente para alcanzar significancia estadística. Este tamaño muestral de 18 garantiza un poder del 80% frente al impacto biológico esperado del MSUS, cumpliendo con el rigor científico y el compromiso ético de minimizar el uso de animales vivos.

7.4 Modelo de separación materna impredecible y estrés impredecible (MSUS)

Se iniciará con el apareamiento de hembras vírgenes de edad de 8 – 10 semanas, con machos de la misma edad en una proporción 1:2 (1 macho con 2 hembras); tras una semana de la confirmación los machos se retirarán para no interferir con la gestación. Al nacer, las madres y crías serán asignadas al azar a los grupos MSUS o control:

- **Grupo control:** No se sometió al protocolo de separación materna impredecible y estrés impredecible (MSUS).
- **Grupo MSUS:** El evento de separación temprana tiene como meta establecer una conducta similar a la ansiedad en F1, la cual en la vida adulta permitió analizar la transmisión intergeneracional del fenotipo ansioso a F2

y asociar dicho comportamiento a cambios específicos en la metilación del ADN en la corteza prefrontal.

Tras el parto (PND 1 – 14) se sometió diariamente a 4 horas de separación materna impredecible combinada con estrés materno impredecible 1 vez al día durante este periodo. Durante la separación, madres y crías permanecieron en jaulas separada. La madre fue colocada en una jaula limpia la cual contó con alimento y agua, una vez separadas la madre fueron colocadas en otra habitación para perder contacto visual como olfativo de las jaulas donde se encontrarán las crías. Las crías fueron colocadas sobre una almohadilla térmica a 37 °C para evitar hipotermia. El momento de la separación fue siempre impredecible, es decir, se programó un horario diferente para la aplicación de la separación para evitar la adaptación al efecto, además en este tiempo de separación, se aplicó el estrés a la madre como se describe en el siguiente apartado (7.5). Tras finalizar las 4 horas de separación, las crías y las madres se devolvieron a sus jaulas originales. Tras finalizar este periodo de separación, PND 15, las camadas de crías permanecieron con su madre de forma continua hasta PND 21 momento en que se destetaron a las crías, y entre PND 22 – 28, se agruparon en jaulas de 3 ratones, emparejados por sexo y tratamiento, distribuyendo los hermanos en distintas jaulas para evitar efecto de camada. (Franklin et al., 2010b; Van Steenwyk et al., 2018; Weiss et al., 2011)

7.5 Estrés impredecible a la madre

El estrés materno consistio en restricción física en tubo plexiglás por 20 min o nado forzado en agua fría (25°C) por 5 min, se aplicó uno de estos estresores de manera aleatoria e impredecible, es decir la hora en la que se aplicó fue diferente durante cada sesión de separación, y nunca los dos juntos.

7.6 Pruebas conductuales

Para identificar si el modelo MSUS presento un comportamiento similar a la ansiedad que próximamente pudiera asociarse con los cambios en el ADN metilado, los ratones F1 fueron sometidos a pruebas conductuales, y

próximamente en la F2 se analizó la herencia mediante esta misma batería conductual.

Tanto los ratones del grupo control y MSUS se evaluaron de forma alterna para evitar efecto circadiano o sesgo por grupos, estas pruebas fueron llevadas a cabo antes de la reproducción y cuando los ratones alcanzaron la vida adulta (aproximadamente PND 60 - 90), con el fin de evitar interferencias en las pruebas conductuales debido al apareamiento. Las pruebas se realizaron con un día de separación entre cada una de ellas como tiempo de recuperación para minimizar los efectos de estrés acumulado. Antes de cada evaluación, los ratones fueron aclimatados a la sala de pruebas durante una hora, y el mismo experimentador, se realizó los procedimientos para minimizar el estrés. Entre los sujetos todos los aparatos se limpiaron con etanol al 70%, de esta manera se evita sesgo por pistas olfativas. La actividad de los ratones fue grabada en video durante 5 para laberinto elevado y caja luz – oscuridad o 10 minutos para campo abierto (OMNIALVA, Inc).

7.6.1 Laberinto elevado (EPM)

El laberinto elevado se basa en las tendencias duales (contrastadas) del roedor hacia lugares novedosos con deseo tanto exploratorio como de evitar espacios desconocidos que están elevados y abiertos. El aparato cosiste en una plataforma de plexiglás negro de cuatro brazos con forma de “más” suspendida a 50 cm sobre el suelo. Los brazos están confinados por paredes bajas (abiertos, 30 x 5 x 1 cm) o altas (cerradas; 30 x 5 x 15 cm), de modo que los brazos similares se enfrentan entre sí. Los ratones se colocaron individualmente en la plataforma central mirando hacia un brazo cerrado y se les permitió explorar libremente el laberinto durante 5 minutos. Se cuantifico el tiempo que pasaron en cada brazo y el número de tradiciones reales.

7.6.2 Campo abierto (OF)

Permite evaluar sistemáticamente la exploración de entornos novedosos y la actividad locomotora en general y se basa en la tendencia de los roedores a evitar las áreas expuestas. Proporciona una prueba inicial para detectar comportamientos similares a la ansiedad en roedores. Cada ratón se colocó de

manera individual en la esquina de una caja de plexiglás de campo abierto (50 x 50 x 20 cm) y se registró su comportamiento durante 10 minutos. Posteriormente se midió la distancia total recorrida para el análisis de actividad locomotora y el tiempo que pasa en las orillas, centro de la arena y tiempo de inmovilidad empleando el software ToxTrack.

7.6.3 Caja luz- oscuridad (LDB)

Esta prueba se basa en el conflicto natural de los animales entre buscar protección y explorar un nuevo entorno, siendo propensos a la ansiedad al estar en un área brillante iluminada. El aparato consta de una caja con dos cámaras: un tercio de la caja cubierta en la parte superior generando oscuridad con paredes de acrílico de color negro y los dos tercios restantes abiertos e iluminados con paredes de acrílico blanco. Una pequeña puerta (5 x 7 cm) permite a los ratones moverse entre los compartimientos. Los ratone se colocaron en el compartimento oscuro y se les permitió explorar libremente durante 5 minutos. Se midió el tiempo de latencia para entrar al compartimiento iluminado, el tiempo que pasan en cada uno de los compartimentos y número de transiciones.

7.7 Reproducción y obtención de F2

Para la obtención de la descendencia F2, tanto del grupo control como MSUS, se trabajó con el sexo que haya mostrado un mayor comportamiento similar a la ansiedad, determinada mediante las mediciones de las pruebas conductuales: laberinto elevado, campo abierto y caja luz – oscuridad. A partir de esta población, se organizó los valores de Z-score de emocionalidad de cada uno de los ratones para poder seleccionar los 4 ratones con mayor comportamiento similar a la ansiedad en el caso del grupo MSUS y los 4 ratones con menor comportamiento a la ansiedad en el grupo Control, y de esta manera posteriormente analizar la herencia de este comportamiento de interés. La reproducción de F1 se realizó tras las pruebas conductuales y con 2 semanas de reposo entre las pruebas y el apareamiento (aproximadamente para el PND 109).

7.7.1 Z-score de emocionalidad

Para el análisis de los datos conductuales nosotros implementamos el cálculo de Z-score este puntaje es una herramienta matemáticas adimensionales que permiten la normalización de la media de los resultados dentro de los estudios y la posterior comparación de datos entre ellos. La puntación Z indican cuántas desviaciones típicas (σ) una observación (X) está por encima o por debajo de la media de un grupo de referencia (μ).

$$z = \frac{X - \mu}{\sigma}$$

X = representa los datos individuales para el parámetro observado.
σ = Desviación estándar para el grupo de referencia.
μ = Media para el grupo de referencia.

En el presente trabajo, como investigamos los efectos del estrés y el sexo, el grupo de control masculino se definió como el grupo de control. Se calcularon valores de la puntación Z para cada animal utilizando los parámetros más utilizados en la medición de la conducta por estas pruebas. Para el puntaje de campo abierto (Z_{OF}) se emplearon los valores de la proporción del tiempo que pasaban en la periferia (%TP) y el tiempo de inactividad de los roedores (TI). De manera similar, en el laberinto elevado (Z_{EMP}) para cada animal, para obtener el cálculo se empleará la proporción del tiempo en los brazos abiertos (%TBA) y las transiciones reales. Y para la puntación Z en la caja luz – oscuridad (Z_{LDB}) se empleará el tiempo de latencia (TLat - tiempo que tarda en entrar en la zona iluminada), tiempo en la zona iluminada. La selección de estas dimensiones específicas se hizo en base al hecho de que estos parámetros son los más utilizados en la medición de un comportamiento tipo ansioso. La direccionalidad de las puntaciones se ajustó de modo que los valores de puntación aumentados reflejan mayor dimensionalidad, es decir, mayor emocionalidad.

Para mitigar la variabilidad y los sesgos inherentes a los ensayos individuales, se calculó una puntuación integrada de emocionalidad mediante el promedio de los valores Z obtenidos en toda la batería conductual Z_{EPM} , Z_{OF} y Z_{LDB}:

$$\textbf{\textit{Emotionality Score}} = \frac{Z_{OF} + Z_{EPM} + Z_{LDB}}{Number\ of\ tests}$$

7.8 Sacrificio

El método empleado para el sacrificio fue la dislocación cervical conforme a las recomendaciones establecidas por la NOM-062-ZOO-1999. Esta es un método físico que genera la inconsciencia rápidamente, se aplica porque no contamina los tejidos con substancias químicas. Consiste en separar manualmente el cráneo y el encéfalo de la médula espinal mediante presión dirigida anteriormente sobre la base del cráneo. La dislocación cervical causa pérdida de consciencia casi inmediata debido al shock cerebral. Todas las funciones motoras y sensoriales voluntarias cesan debido al daño a la médula espinal. Sin embargo, puede producirse una considerable actividad muscular involuntaria (Otto & von Thaden, 2012). La confirmación de la muerte se llevará a cabo mediante la verificación de signos vitales, incluyendo el cese definitivo de la respiración, ausencia de reflejo corneal y pedal, y pupilas fijas y dilatadas.

Se evitó el uso de sobredosis con agentes anestésicos debido a que estos afectan los cerebros animales y modifican la actividad neuronal regular. Se ha reportado que uno de los problemas de la experimentación con animales anestesiados es el amplio y desconocido impacto de los agentes anestésicos en el cerebro. La actividad neuronal normal y la respuesta a los transmisores neuronales se ven alteradas por los agentes anestésicos. Probablemente, algunas transmisiones sinápticas y actividades neuronales se verían potenciadas, mientras que otras se verían inhibidas en cierto grado. En otras palabras, la actividad cerebral se modifica de forma específica para el agente anestésico en animales anestesiados. Por lo tanto, la investigación funcional en el centro cerebral superior podría no ser adecuada bajo anestesia en general. Por ejemplo, el pentobarbital ha sido uno de los principales agentes anestésicos utilizados en el sacrificio de roedores de experimentación. Este se une a los receptores del ácido gamma-aminobutírico (GABA) induciendo una apertura más

prolongada de los canales de cloruro, potencia los efectos del GABA e induce una hiperpolarización más prolongada (Nagayama et al., 2024)

Nuestro principal interés es que el animal caiga en inconciencia inmediata sin estimular directamente el sistema nervioso y conservar intacto el cerebro.

El sacrificio se realizó de la siguiente forma en cada generación:

- F1: A la finalización del modelo animal, la realización de pruebas conductuales y la reproducción para obtención de F2.
- F2: 1 semana tras realizar las pruebas conductuales.

7.9 Obtención de tejido

Posteriormente se retiró la cabeza del ratón y la parte superior del cráneo, procediendo con un corte en el centro del cráneo por debajo del gancho post-timpánico izquierdo; y un último corte entre los ojos para remover el hueso frontal y parietal y finalmente se obtuvo el cerebro. A continuación, se identificará la corteza, la cuál, se separó utilizando un bisturí.

7.10 Cuantificación de la expresión génica de genes participantes en la neuroplasticidad y desarrollo cerebral: *bdnf y gad 1 en la corteza cerebral*

Dado que el ambiente en etapas tempranas del desarrollo desempeña un papel fundamental en la regulación de la expresión génica, se evaluaron los niveles de trascripción de genes claves en la corteza cerebral involucrados en las alteraciones de la conducta. Para determinar si existen diferencias en a la expresión génica entre ratones del grupo control y aquellos expuestos al protocolo de MSUS, se realizó el análisis cuantitativo por RT-qPCR.

7.10.1 Extracción de ARN con Trizol.

El tejido recolectado fue respondido en 750 mL de Trizol (Fisher scientific; 15596018) frio, se procedió a su homogenización por sonicación (Fisherbrand™ Desmembrador sónico modelo 120) durante 15 segundos a 5 pulsos y con una amplitud de 30%. Se continuo con una incubación a T° ambiente durante 5 minutos. Se agrego 200 µL de cloroformo frio (Sigma-Aldrich; UN1888) procediendo a darle un ciclo en el vortéx (SI-0236) de 15 segundos. Se volvió a

incubar por 5 minutos a T° ambiente para próximamente centrifugar a 14, 000 rpm por 15 min a 4°C (Eppendorf™ Centrifuge 5425/5425 R). Se recupero la fase acuosa a la que se le agrego 500 µL de isopropanol frio (Quality Chemical) y se reposo durante 1 hora a - 80°C. Pasada la incubación las muestras fueron centrifugadas a 14, 000 rpm por 15 min a 4°C lo que no permitió tener la pastilla de ARN. Se descarto el sobrenadante y se realizó dos lavados: uno con Etanol 100% (Quality Chemical) y otro-segundo con etanol al 70%, entre cada lavado las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos y se descartó el Etanol. Se retiro cuidadosamente con una puntilla el excedente de etanol y se dejó secar la pastilla durante 5 - 10 min. El RNA se resuspendío en 25 µL de agua mili Q con DEPC (Invitrogen™ DEPC-Treated Water). Se midió la calidad del ARN con ayuda de un Nandrop (ThermoFisher Scientific™ NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers). Se busco que las relaciones de absorbancia A260/A280 = 1.8-2.0 y A260/A230 > 2.0. Las muestras se llevaron a una concentración de 1,000 ng/µL y se almacenaron a -20°C

7.10.2 Tratamiento con DNAasa I

Se utilizo la DNasa I, sin RNasa (1 U/µl) (Thermo Scientific™; EN0521) para eliminar la contaminación por ADN genómico y prevenir la amplificación inespecífica durante la qPCR. Se inicio agregando los volúmenes que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Volúmenes por reacción para el tratamiento con DNasa I

Reactivo	Cantidades
RNA	1 µg
10 x reaction buffer with $MgCl_2$	1 µL
DNasa I, RNase-free (EN0521)	1 µL (1U)
DEPC- treated Water (#R0601)	To 10 µL

Se procedió a su incubación a 37°C durante 30 min en el Termociclador Veriti 96-Well, Applied Biosystems. Terminando este periodo se agregó 1 µL de 50 mM EDTA y se procedió a su incubación en el termociclador a 65°C durante 10 min.

7.10.3 Retrotrascripción para la obtención de ADN complementario

El ADN complementario se sintetizo utilizando el kit SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis (Invitrogen™; 11754050) preparando cada reacción con los volúmenes que se menciona en la Tabla 2.

Tabla 2. Volúmenes para la reacción de Retrotrascripción

Reactivo	Cantidades
5X VILO™ Reaction Mix	4 µL
10X SuperScript™ Enzyme Mix	2 µL
RNA (up to 2.5 µg)	x µL
DEPC-treated water	To 20 µL

Se mezcló gentilmente y se realizaron las respectivas incubaciones en el equipo Termociclador Veriti 96-Well, Applied Biosystems configurado de la siguiente manera: Paso 1 (25°C durante 10 minutos), Paso 2 (42°C durante 60 minutos), Paso 3 (85°C durante 5 minutos).

7.10.4 Cuantificación de la expresión de bdnf y gad 1.

Para finalmente realizar la cuantificación de la expresión de los genes blanco, se utilizó el Kit Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems™; 4385612) utilizando los volúmenes que se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Volúmenes por reacción de amplificación en tiempo real (Volumen final 10 µL)

Reactivo	Cantidades
Fast SYBR® Green Master Mix (2×)	5 µL
Forward and Reverse Primers (10 µM)	0.2 µL
ADNc (hasta 20 ng)	1 µL
DEPC-treated water	3.6 µL

Las reacciones fueron preparadas en una placa de MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plat en el StepOne and StepOnePlus Real-Time PCR Systems de Applied Biosystems. Se evaluó la expresión del ARNm de los genes relacionados a neuroplasticidad (*bdnf)* y sistema GABAérgico (*gad 1)* con los primers que se muestran en la tabla 4, los cuales fueron obtenidos de bibliografía, en los cuales se reportó una eficiencia adecuada como el análisis de las curvas Melt con 1 solo

pico (Son et al., 2015; Urrutia et al., 2016). Se utilizó como gen endógeno GAPDH y se cuantificó relativamente su expresión por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Todos los primers se adquirieron de la casa comercial T4 oligo.

***Tabla 4. Primers a utilizar para la amplificación de la expresión génica del gen* bdnf exón IV y gad 1 en la cepa C57BL/6 Mus Musculus**

Gen		Secuencia	Referencia
Bdnf (exón IV)	F	5´-AGCATGAAATCTCCCAGCCT-3´	Son et al. (2015)
	R	5´-CGGTCCCCAAGGTTCTAGAC-3´	
Gad 1 (gad 67)	F	5'-AAG GAC CAA TAG CCT GGA AGA -3'	Urrutia et al. (2016)
	R	5'-GTT GGA GAA GTC GGT CTC TGT -3'	
Gapdh	F	5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'	N/A
	R	5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'	

7.11 Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados utilizando el software estadístico GraphPad Prism (versión 8.0.2). En primer lugar, se determinó la distribución de las variables mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Las comparaciones estadísticas entre los grupos de estudio se efectuaron empleando la prueba t de Student para muestras independientes (en el caso de datos paramétricos) o la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney (para datos que no seguían una distribución normal). Los valores se expresaron como media ± error estándar de la media (SEM) / o mediana con rango intercuartílico según la normalidad obtenida. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

8. RESULTADOS

7.1 La separación materna impredecible y estrés impredecible (MSUS) en etapas posnatales induce comportamiento similar a la ansiedad en la vida adulta.

Para medir el efecto de la adversidad en la vida temprana se expuso al grupo tratado al paradigma de separación materna impredecible y estrés impredecible (MSUS) midiendo su conducta en la vida adulta (PND 90 F1 y PND 65 F2). Por ende, para identificar una conducta similar a la ansiedad en nuestro modelo se implementó una batería conductual, donde la primera prueba analizada fue laberinto elevado (EPM), dentro de los valore obtenidos se encontró unas diferencias estadísticamente significativas. Se identifico que los ratones que sufrieron el estrés en la vida temprana por MSUS demuestran una disminución significativa en el tiempo que pasan en los brazos abiertos ($p = 0.0067$; Figura 6A) y en la cantidad de transiciones reales ($p = 0.0158$; Figura 6C), de la misma manera se encontró que dichos ratones pertenecientes a MSUS presentaron un aumento significativo en el tiempo que disponen en los brazos cerrados ($p = 0.0134$; Figura 6B) al ser comparados con el control que no sufrió ninguna manipulación durante su desarrollo.

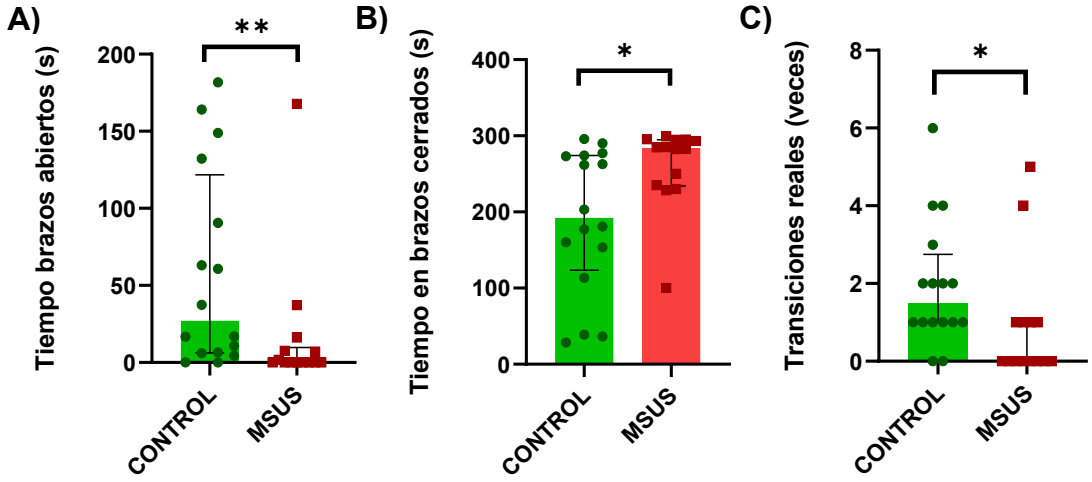


Figura 6. Efecto de la separación materna impredecible y estrés impredecible en la conducta similar a la ansiedad en la generación F1 en la prueba conductual de Laberinto elevado (EPM). *Los paneles representan las variables registradas durante la prueba: A) tiempo de permanencia en brazos abiertos expresado en segundos (s), B) tiempo de permanencia en brazos cerrados en segundos (s), y C) número de transiciones reales realizadas entre los brazos. La diferencia entre grupos se analizó mediante la prueba la U - Mann Whitney para analizar la diferencia entre grupos. Los asteriscos representan (#) 0.05 < p < 0.1, (*) p < 0.05, (**) p < 0.01, (***) p < 0.001, (ns) no significativo. Control, n = 16; MSUS, n = 14 donde cada punto representa los valores individuales de cada sujeto y las barras indican la mediana con rango intercuartílico.*

Los ratones macho y hembras bajo estrés por MSUS no mostraron alteraciones en la distancia total (p = 0.4961; Figura 7A), frecuencia en la periferia (p = 0.3997; Figura 7B) ni tiempo de inmovilidad (p = 0.6155; Figura 7C) durante la prueba de campo abierto.

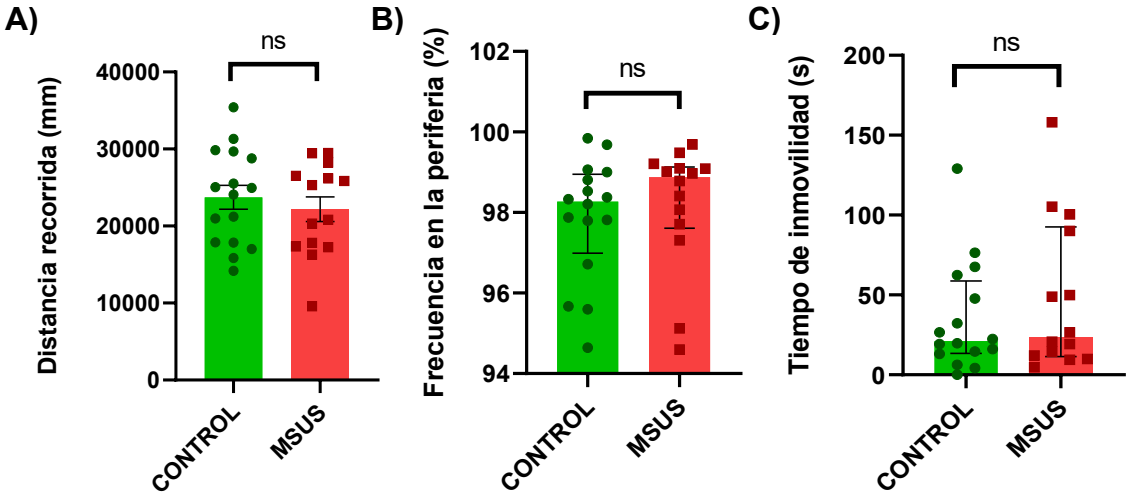


Figura 7. Efecto de la separación materna impredecible y estrés impredecible en la conducta similar a la ansiedad en la generación F1 en la prueba conductual de Campo abierto (OF). *Los paneles representan las variables registradas durante la prueba: A) Distancia recorrida tiempo de expresado en milímetros (mm) como medida de locomoción, B) Frecuencia en la periferia (%), y C) Tiempo de inmovilidad expresado en segundos (s). La diferencia entre grupos se analizó mediante la prueba t de Student para muestras independientes en A) y U - Mann Whitney en B) y C). Control, n = 16; MSUS, n = 14 donde cada punto representa los valores individuales de cada sujeto expresados como media ± SEM para A) y mediana con rango intercuartílico en*

B) y C). Los asteriscos representan (#) 0.05 < p < 0.1, (*) p < 0.05, (**) p < 0.01, (***) p < 0.001, (ns) no significativo.

Por otro lado, en la prueba de caja luz-oscuridad (LDB) se observaron cambios significativos en el tiempo de la latencia (p = 0.0116; Figura 8A), caracterizados por un aumento en el tiempo que tarda el organismo en salir por primera vez a la zona iluminada en el grupo expuesto a estrés temprano por MSUS. Sin embargo, dicha significancia no se observó en el tiempo de permanencia total en la zona iluminada para los ratones de este grupo (p = 0.3083; Figura 8B).

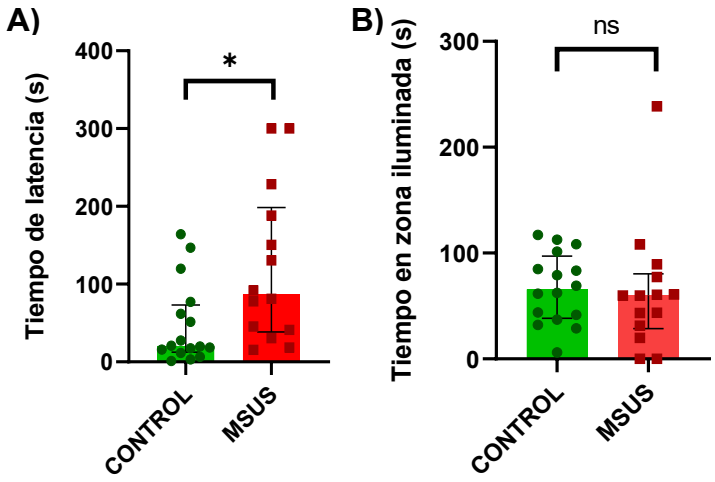


Figura 8. Efecto de la separación materna impredecible y estrés impredecible (MSUS) en la conducta similar a la ansiedad en la generación F1 en la prueba conductual de Caja luz - obscuridad (OF). *Los paneles representan las variables registradas durante la prueba: A) tiempo de latencia en salir a la zona iluminada mostrada en segundos (s) y B) El tiempo en zona iluminada mostrada en segundos (s). La diferencia entre grupos se analizó mediante la prueba U - Mann Whitney. Control, n = 16; MSUS, n = 14 donde cada punto representa los valores individuales de cada sujeto expresados como mediana con rango intercuartílico (IQR). Los asteriscos representan (#) 0.05 < p < 0.1, (*) p < 0.05, (**) p < 0.01, (***) p < 0.001, (ns) no significativo.*

Finalmente, se calculó el índice de emocionalidad integral (Z-score de emocionalidad) mediante la unificación de todos los parámetros de la batería conductual, complementado con un análisis individualizado para cada paradigma. De manera global, se observó una tendencia hacia el incremento en el puntaje de emocionalidad en los roedores sometidos al modelo MSUS (p = 0.0787; Figura 9A). Sin embargo, al desglosar los valores por prueba, se denotó

que el grupo MSUS presentó un aumento significativo exclusivamente en el Z-score del laberinto elevado (Z-EPM) en comparación con el grupo control (p = 0.0107; Figura 9B). Este comportamiento diferencial no se replicó en las pruebas de campo abierto (OF) ni en la caja de luz-oscuridad (LDB), donde no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre ambas condiciones experimentales (p = 0.4741; Figura 9C y p = 0.1225; Figura 9D respectivamente).

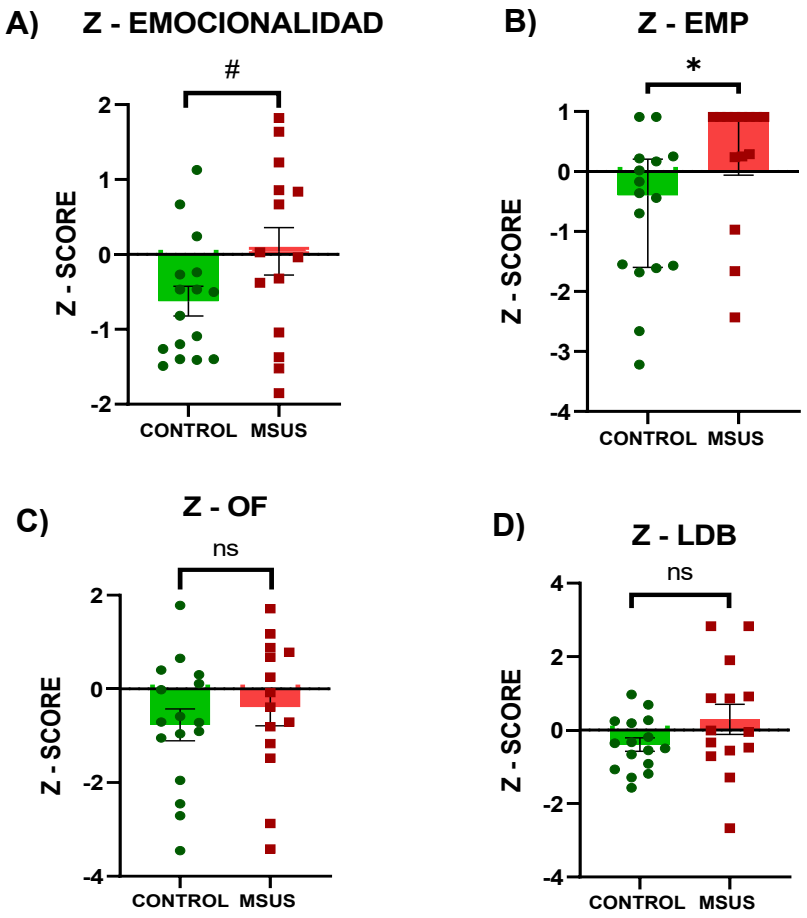


Figura 9. Índices de estandarización (Z-score) conductual y de emocionalidad integral en ratones de la generación F1 expuestos a MSUS. *Los paneles muestran los valores individuales estandarizados para cada prueba neuroconductual: A) Z – score de Emocionalidad Integral, calculado mediante la integración matemática de los parámetros anteriormente obtenidos de la batería conductual, B) Z – score Laberinto Elevado (Z – EMP), C) Z – score Campo Abierto (Z – OF) y D) Z – score Caja Luz Obscuridad (Z – LBD). La diferencia entre grupos se analizó mediante la prueba t de Student para muestras independientes en A) y U - Mann Whitney de B – D). Control, n = 16; MSUS, n = 14 donde cada punto representa los valores individuales de cada sujeto*

expresados como media ± SEM para A) y mediana con rango intercuartílico (IQR). para B – C). Los asteriscos representan (#) 0.05 < p < 0.1, (*) p < 0.05, (**) p < 0.01, (***) p < 0.001, (ns) no significativo.

7.2 La exposición al estrés por separación materna impredecible y estrés impredecible (MSUS) promueve el desarrollo de conductas de tipo ansiedad en hembras F1.

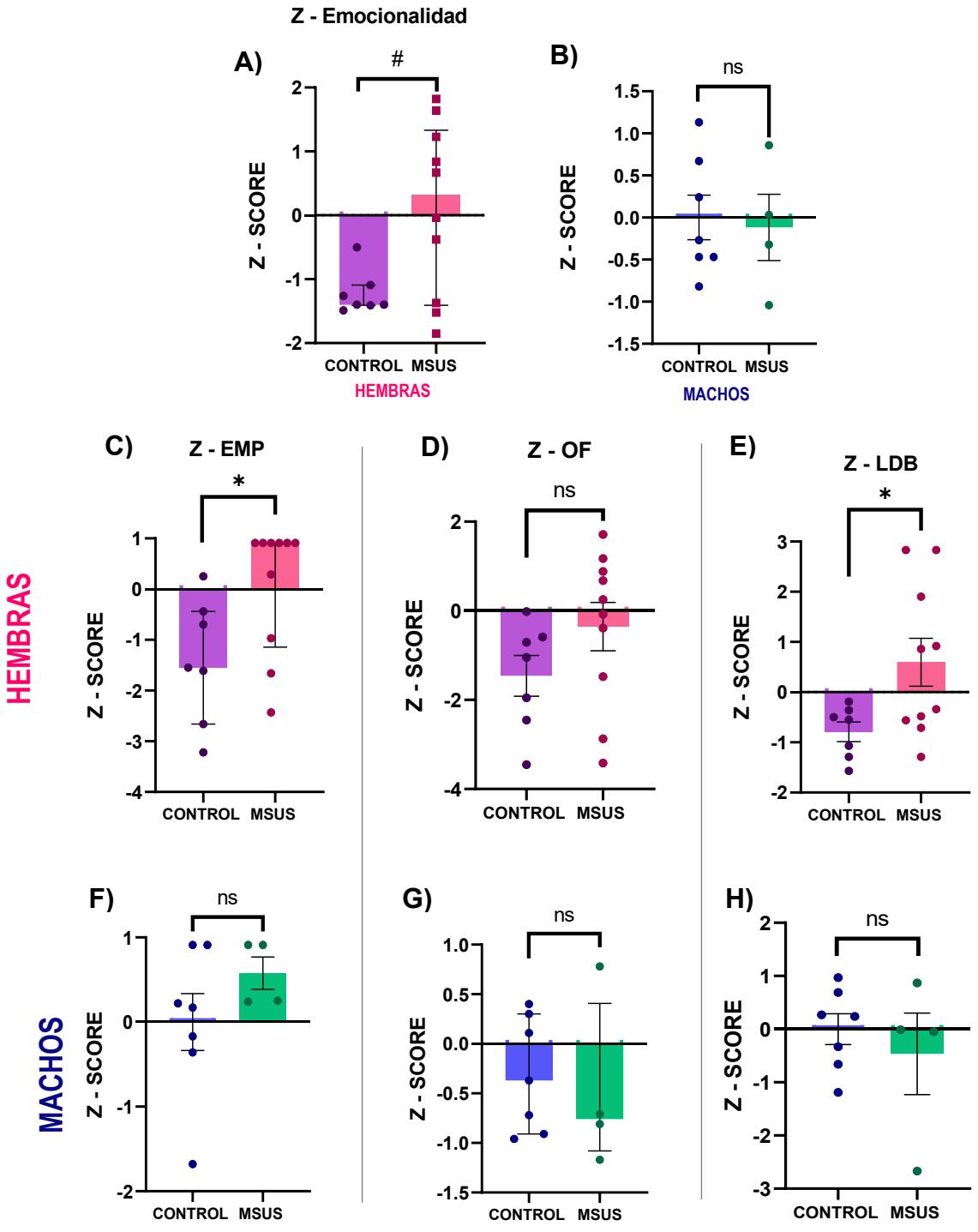


Figura 10. Índices de estandarización (Z-score) conductual y de emocionalidad integral en ratones de la generación F1 expuestos a MSUS por sexo. *Los paneles muestran los valores individuales estandarizados para cada prueba neuroconductual en machos y hembras: A – B) Z – score de Emocionalidad Integral, calculado mediante la integración matemática de los parámetros anteriormente obtenidos de la batería conductual de hembras y machos respectivamente. C – E) Se muestra para el sexo de hembras los valores obtenidos del Z – score Laberinto Elevado (Z – EMP), Z – score Campo Abierto (Z – OF) y Z – score Caja Luz Obscuridad (Z – LBD) respectivamente. F – H) Se muestra para el sexo de machos los valores obtenidos del Z – score Laberinto Elevado (Z – EMP), Z – score Campo Abierto (Z – OF) y Z – score Caja Luz Obscuridad (Z – LBD) respectivamente. La diferencia entre grupos se analizó mediante la prueba U - Mann Whitney de A, C y F) y la prueba t de Student para muestras independientes en B, D, E, G y H). Hembras: Control, n = 7; MSUS, n = 10; Machos: Control, n = 7; MSUS, n = 4, donde cada punto representa los valores individuales de cada sujeto expresados como media ± SEM para B, D, E, G y H) y mediana con rango intercuartílico (IQR) para A, C y F). Los asteriscos representan (#) 0.05 < p < 0.1, (*) p < 0.05, (**) p < 0.01, (***) p < 0.001, (ns) no significativo.*

Derivado de los hallazgos significativos observados en diversos parámetros del laberinto en cruz elevado y la caja de luz-oscuridad, así como en los índices globales (Z - score de emocionalidad y Z-EPM), se procedió a evaluar si el impacto de la separación materna y el estrés impredecible (MSUS) presentaba un componente de dimorfismo sexual. Con este propósito, se estratificaron y analizaron de manera independiente los Z – score tanto de la emocionalidad integral como de cada prueba conductual, con el fin de determinar la existencia de una susceptibilidad diferencial entre ratones macho y hembras sometidas a estrés en la vida temprana. Se observó que las hembras sometidas al paradigma MSUS presentaron una tendencia al incremento en el Z-score compuesto de emocionalidad ($p = 0.0831$; Figura 10A). Aunado a esto, se registró un aumento estadísticamente significativo en los puntajes Z de la prueba de laberinto elevado ($p = 0.0274$; Figura 10C) y de la caja de luz-oscuridad ($p = 0.0351$; Figura 10E); en contraste, no se detectaron diferencias significativas entre los grupos experimentales en la prueba de campo abierto ($p = 0.1648$; Figura 10D). Por el contrario, el análisis de los machos sometidos a la misma batería conductual no reveló modificaciones significativas en el Z-score de emocionalidad ($p = 0.8016$; Figura 10B), ni en los puntajes estandarizados de laberinto elevado ($p = 0.1424$;

Figura 10F), campo abierto (p = 0.7011; Figura 10G) o caja de luz-oscuridad (p = 0.5114; Figura 10H).

7.3 Los descendientes de ratones que sufrieron separación materna impredecible y estrés impredecible no conservan la conducta similar a la ansiedad en la vida adulta

Una vez demostrado únicamente la susceptibilidad del estrés en la vida temprana en las hembras a nivel fenotípica de la conducta similar a la ansiedad, se procedió a examinar la herencia de dicho efecto a la descendencia a partir de la línea materna, para ello se seleccionaron las 4 hembras más ansiosas por medio del Z-score de emocionalidad, mientras que para el control se optó por las 4 hembras con menor comportamiento similar a la ansiedad. En la prueba de Laberinto Elevado se identificó que los ratones descendientes de progenitores que sufrieron el estrés en la vida temprana por MSUS no mostraron diferencias significativa en el tiempo que pasan en los brazos abiertos (p = 0.3343; Figura 11A), en el tiempo que disponen en los brazos cerrados (p = 0.2053; Figura 11B) y en la cantidad de transiciones reales (p = 0.7946; Figura 11C) al ser comparados con los ratones descendientes de progenitores controles que no sufrió ninguna manipulación durante su desarrollo.

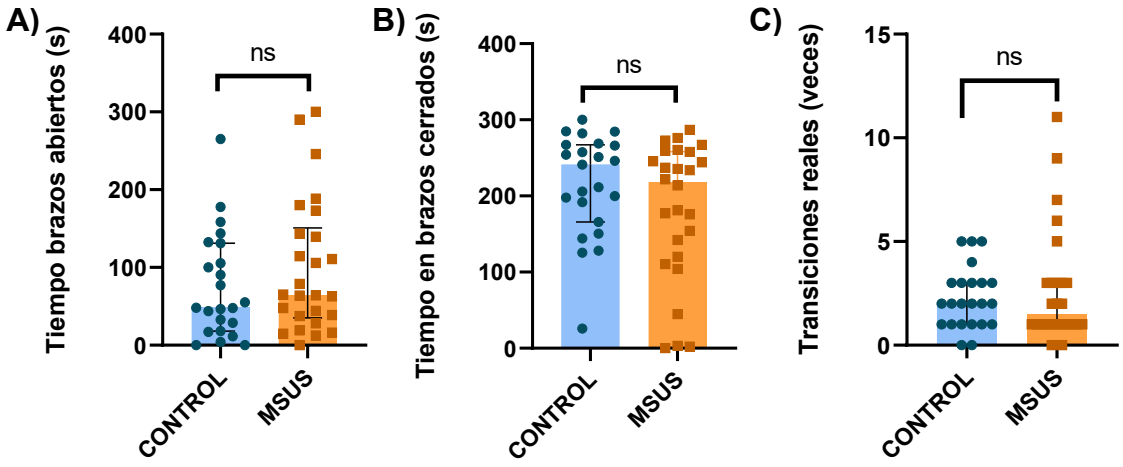


Figura 11. Análisis de la conducta tipo ansiedad en la descendencia (F2) procedentes de ratones sometidos a separación materna impredecible y estrés impredecible en la prueba conductual de Laberinto elevado (EPM). *Los paneles representan las variables registradas durante la prueba: A) tiempo*

de permanencia en brazos abiertos expresado en segundos (s), B) tiempo de permanencia en brazos cerrados en segundos (s), y C) número de transiciones reales realizadas entre los brazos. La diferencia entre grupos se analizó mediante la prueba la U - Mann Whitney para analizar la diferencia entre grupos. Control, n = 23; MSUS, n = 26 donde cada punto representa los valores individuales de cada sujeto y las barras indican la mediana con rango intercuartílico. Los asteriscos representan (#) 0.05 < p < 0.1, (*) p < 0.05, (**) p < 0.01, (***) p < 0.001, (ns) no significativo.

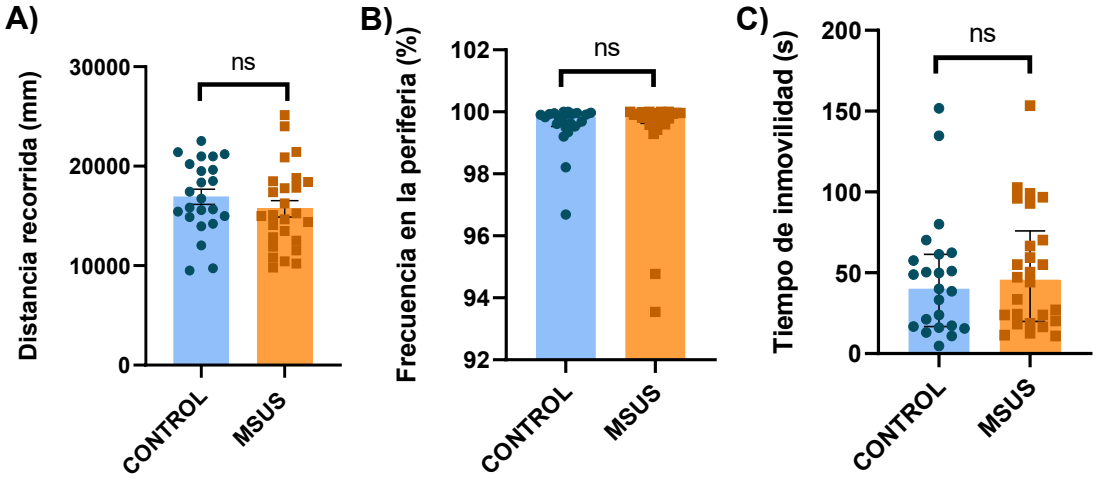


Figura 12. Análisis de la conducta tipo ansiedad en la descendencia (F2) procedentes de ratones sometidos a separación materna impredecible y estrés impredecible en la prueba de campo abierto (OF). *Los paneles representan las variables registradas durante la prueba: A) Distancia recorrida tiempo de expresado en milímetros (mm) como medida de locomoción, B) Frecuencia en la periferia (%), y C) Tiempo de inmovilidad expresado en segundos (s). La diferencia entre grupos se analizó mediante la prueba t de Student para muestras independientes en A) y U - Mann Whitney en B) y C). Control, n = 23; MSUS, n = 26 donde cada punto representa los valores individuales de cada sujeto expresados como media ± SEM para A) y mediana con rango intercuartílico en B) y C). Los asteriscos representan (#) 0.05 < p < 0.1, (*) p < 0.05, (**) p < 0.01, (***) p < 0.001, (ns) no significativo.*

En la prueba de campo abierto, no se encontraron diferencias significativas en la distancia total recorrida (p = 0.2839; Figura 12A), la frecuencia de visitas a la periferia (p = 0.3671; Figura 12B) o el tiempo de inmovilidad (p = 0.5346; Figura 12C). De manera homóloga, en el paradigma de caja luz-oscuridad no se registraron variaciones estadísticas en la latencia de emergencia (p = 0.7469;

Figura 13A) ni en el tiempo de permanencia en la zona iluminada (p = 0.2839; Figura 13B) en los descendientes de progenitores que sufrieron de MSUS.

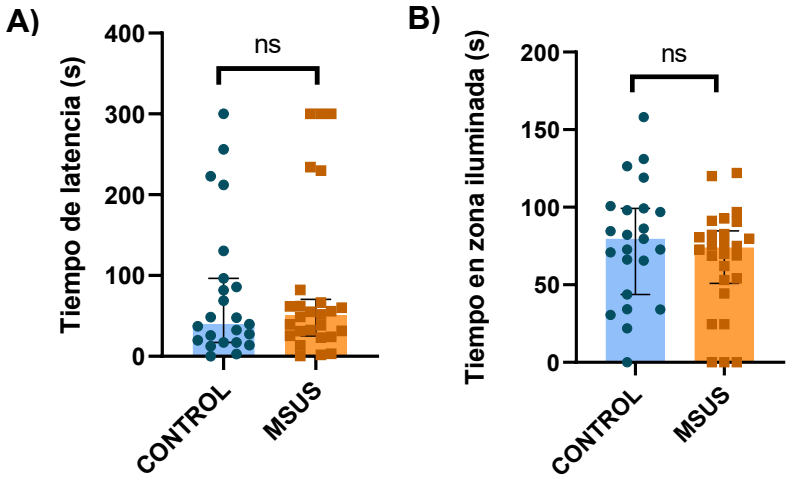
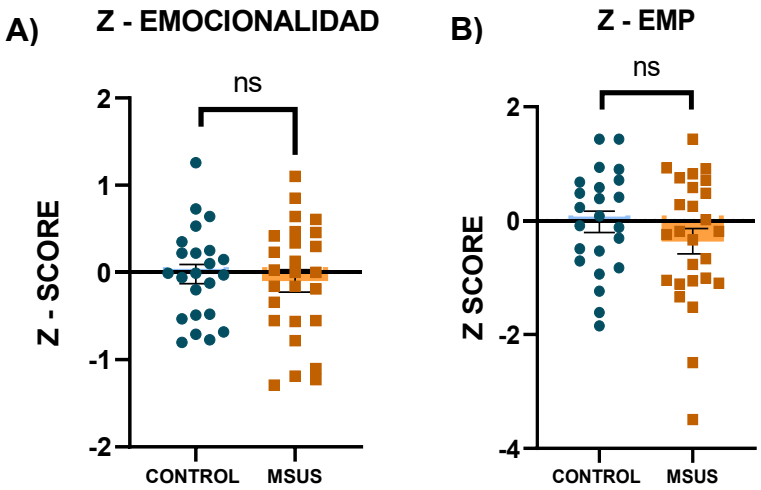


Figura 13. Análisis de la conducta tipo ansiedad en la descendencia (F2) procedentes de ratones sometidos a separación materna impredecible y estrés impredecible en la prueba de caja luz – obscuridad (LDB). *Los paneles representan las variables registradas durante la prueba: A) tiempo de latencia en salir a la zona iluminada mostrada en segundos (s) y B) El tiempo en zona iluminada mostrada en segundos (s). La diferencia entre grupos se analizó mediante la prueba U - Mann Whitney. Control, n = 23; MSUS, n = 26 donde cada punto representa los valores individuales de cada sujeto expresados como mediana con rango intercuartílico (IQR). Los asteriscos representan (#) 0.05 < p < 0.1, (*), p < 0.05, (**), p < 0.01, (***), p < 0.001 y (ns) no significativo.*



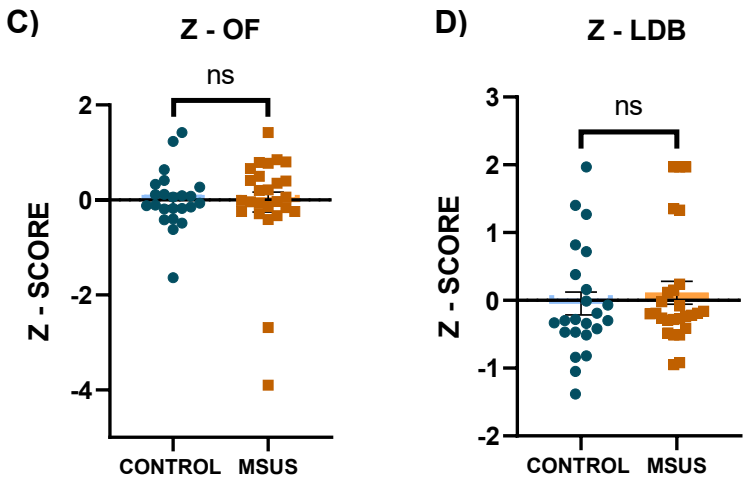


Figura 14. Análisis de los niveles de emocionalidad integral en la descendencia de ratones sometidos a separación materna impredecible y estrés impredecible. *Los paneles muestran los valores individuales estandarizados para cada prueba neuroconductual: A) Z – score de Emocionalidad Integral, calculado mediante la integración matemática de los parámetros anteriormente obtenidos de la batería conductual, B) Z – score Laberinto Elevado (Z – EMP), C) Z – score Campo Abierto (Z – OF) y D) Z – score Caja Luz Obscuridad (Z – LBD). La diferencia entre grupos se analizó mediante la prueba t de Student para muestras independientes de A – B) y U - Mann Whitney de B – D). Control, n = 23; MSUS, n = 26 donde cada punto representa los valores individuales de cada sujeto expresados como media ± SEM para A – B) y mediana con rango intercuartílico (IQR) para C – D). Los asteriscos representan (#) 0.05 < p < 0.1, (*) p < 0.05, (**) p < 0.01, (***) p < 0.001, (ns) no significativo.*

Como ultimo análisis conductual, se determinaron los índices de emocionalidad global y por paradigma conductual en los descendientes de la generación F2, con el objetivo de verificar la consistencia intergeneracional de las variables analizadas. El perfil estandarizado confirmó la ausencia de cambios significativos en el Z-score integrado de emocionalidad (p = 0.6536; Figura 14A), así como en los puntajes individuales de laberinto elevado (p = 0.2536; Figura 14B), campo abierto (p = 0.4176; Figura 14C) y caja de luz-oscuridad (p = 0.3730; Figura 14D)

7.4 El estrés temprano promueve un incremento intergeneracional en la expresión del exón IV de bdnf en la corteza cerebral sin alterar los niveles de Gad 1

Una vez analizando el efecto de la separación materna impredecible con estrés impredecible se continuo con su análisis molecular para identificar los posibles cambios que podría generar el estrés por la adversidad en la vida temprana sobre la expresión génica en la corteza cerebral. Por ello, se midió la expresión relativa de ARNm de dos genes clave ampliamente reportados en la literatura por su participación en la plasticidad sináptica y la regulación del equilibrio en el sistema E/I en la modulación del estrés, dentro de estos se analizó el exón IV de Bdnf y Gad1.

Al evaluar el exón IV de Bdnf, se observó que la generación F1 no presento diferencias significativas en la expresion relativa del ARNm entre el grupo MSUS y el grupo control (Figura 15; p = 0.1160). En contraste, la generación F2 expuesta al estrés de manera indirecta mostro un incremento estadísticamente significativo en la expresión de este trascripto en comparación con su respectivo control (Figura 15; p =0.0017)

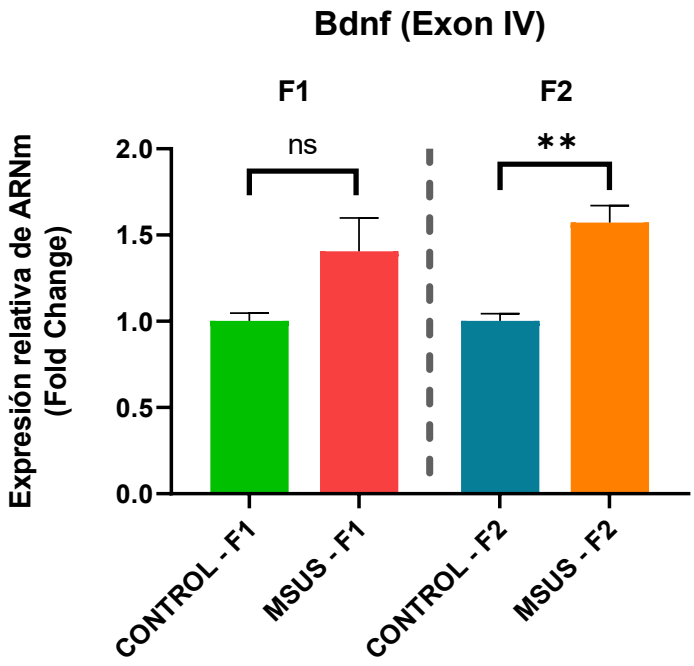


Figura 15. Efecto de la separación materna impredecible y estrés impredecible. sobre la expresión relativa de ARNm de BDNF exón IV en la corteza cerebral a través de las generaciones F1 y F2.

La expresión de ARNm fue evaluada mediante RT-qPCR en ratones hembra. La diferencia entre grupos se analizó mediante la prueba t de Student para muestras independientes. Generación F1: Control, n = 4; MSUS, n = 5; Generación F2: Control, n = 4; MSUS, n = 4 donde cada barra representa los valores individuales de cada sujeto expresados como media ± SEM. Los asteriscos representan (#) 0.05 < p < 0.1, (*) p < 0.05, (**) p < 0.01, (***) p < 0.001, (ns) no significativo.

Po otra parte, la evaluación de la expresion relativa de *Gad 1* en la misma región cerebral no revelo cambios estadísticamente significativos en ninguna de las generaciones evaluadas (Figura 16). En la generación F1, la comparación entre grupo MSUS y el grupo control no mostraron variaciones respecto a los niveles de expresión (p= 0.5921). De manera similar, en la generación F2, los niveles de ARNm de *Gad1* en el grupo MSUS se mantuvieron equivalentes a los observados en el grupo control (p= 0.8084)

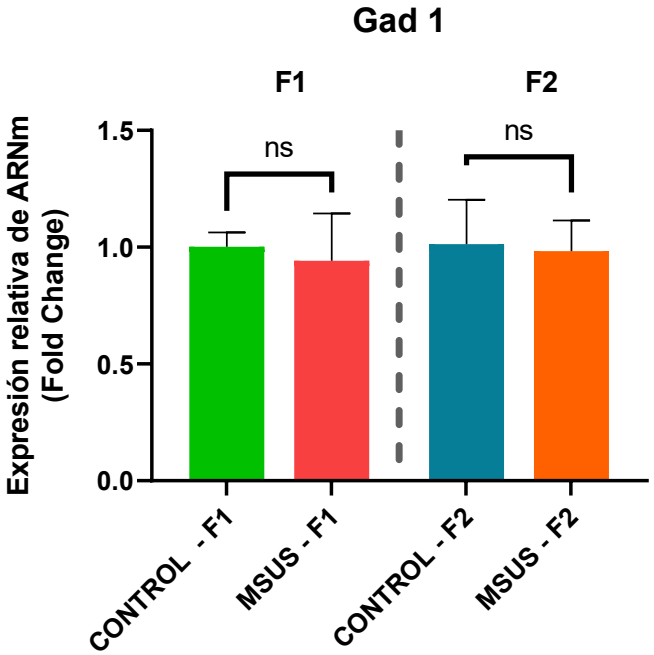


Figura 16. Efecto de la separación materna impredecible y estrés impredecible. sobre la expresión relativa de ARNm de gad 1 en la corteza cerebral a través de las generaciones F1 y F2.

La expresión de ARNm fue evaluada mediante RT-qPCR en ratones hembra. La diferencia entre grupos se analizó mediante la prueba t de Student para muestras independientes. Generación F1: Control, n = 4; MSUS, n = 5; Generación F2: Control, n = 4; MSUS, n = 4 donde cada barra representa los valores individuales de cada sujeto expresados como media ± SEM. Los asteriscos representan (#) 0.05 < p < 0.1, (*) p < 0.05, (**) p < 0.01, (***) p < 0.001, (ns) no significativo.

9. DISCUSIÓN

La adversidad en la vida temprana ha sido considerada como un factor de riesgo bien establecido que incrementa la susceptibilidad a los individuos a un problema de salud mental, asociada principalmente con la depresión, trastornos de ansiedad y trastorno de estrés postraumático (TEPT) en la edad adulta, o con alteraciones duraderas en los procesos cognitivos relacionados con la memoria (Abate et al., 2024; Hanert & Pedersen, 2026). En este trabajo, evaluamos el efecto de un modelo animal análogo a la adversidad en la vida temprana de los humanos basada en la separación materna y todo el contexto de adversidad que conlleva dicho modelo sobre la conducta similar a la ansiedad en roedores y su posible herencia a la descendencia. Se identifico que la separación materna en periodos críticos del desarrollo como lo es la etapa postnatal temprana es un factor desfavorable para el desarrollo del cerebro, alterando los circuitos que sostienen la función cognitiva y emocional a lo largo de toda la vida manifestándose con fenotipos conductuales alterados, principalmente destacamos que el estrés en esta etapa genera una vulnerabilidad en los ratones que sufrieron separación materna bajo MSUS observándose una dismorfia sexual en la hembras, las cuales al ser analizadas por separado son las que presentaron un comportamiento similar a la ansiedad. Además, se examinó la segunda generación para identificar una herencia intergeneracional de dicho comportamiento tipo ansioso, sin embargo, en esta generación no se encontró el mismo efecto que en la generación F1.

Dentro de los primeros resultados en los ratones bajo un entorno adverso, es decir, provenientes de la separación materna bajo el paradigma de MSUS, presentaron alteraciones en la conducta evidenciadas por la prueba de laberinto elevado y caja luz - obscuridad, de los cuales se mantuvieron robustas tras su estandarización mediante el índice de Z - emocionalidad y Z – EPM reflejando un comportamiento similar a la ansiedad. Este hallazgo sugiere que el estrés en la vida temprana podría estar contribuyendo con cambios neurobiológicos persistentes que incrementan la vulnerabilidad a una conducta tipo ansiosa (Rice et al., 2008). A diferencia de los protocolos convencionales, u otro tipo de

paradigma, el modelo MSUS combina el aislamiento en horarios impredecibles con estresores directos a la madre, lo que evita la habituación de las crías y genera una dinámica de crianza errática que simula un entorno de negligencia crónica y caótica. Además, la impredecibilidad de la separación es podría ser la responsable de exacerbar los defectos conductuales, debido a que la observación previa donde el estrés crónico en los roedores ha sido un factor más perjudicial cuando es impredecible que cuando es predecible (Araujo et al., 2003), incluso en humanos la imprevisibilidad de las señales parentales y del hogar ha sido expresado como el predictor más fuerte de la función ejecutiva (Short et al., 2024).

Al romper la predictibilidad del vínculo y la ausencia materna, se activan respuestas neuroinflamatorias, neuroendocrinas y de actividad eléctrica neuronal para regular el estrés (Y. Zhang et al., 2024); cuando estas perturbaciones ocurren durante periodos críticos del desarrollo, se altera patológicamente la maduración normativa del sistema nervioso (Coley et al., 2019). De este modo, la fragmentación de la interacción madre-cría sugiere que la calidad y predictibilidad del vínculo, más que la cantidad total de tiempo compartido es el factor determinante en la programación del fenotipo ansioso observado en la descendencia (Rice et al., 2008). Esto es consistente debido a que, en especies altriciales, el contacto materno regula la homeostasis del neonato mediante estímulos multisensoriales (Graf et al., 2022). Aunque el apego emerge de forma robusta para asegurar la supervivencia, incluso bajo condiciones de maltrato, la adversidad temprana interrumpe el procesamiento de estas señales, alterando el desarrollo de los circuitos cerebrales del miedo y programando una vulnerabilidad persistente hacia psicopatologías afectivas (Opendak et al., 2020).

La literatura ha reportado por diferentes parámetros en distintas pruebas conductuales alteraciones a nivel de la conducta en murinos debido al efecto de la adversidad en la vida temprana. Estudios previos han reportado que la separación materna en ratones incrementa significativamente el comportamiento tipo ansiedad en la vida adulta, evidenciado por una reducción en el tiempo de

permanencia en los brazos abiertos del EPM. Se ha sugerido que las alteraciones en la actividad neuronal y en la transmisión sináptica de las neuronas piramidales de la amígdala basolateral (BLA PN) son responsables de este fenotipo (Qin et al., 2021). De manera consistente, variantes metodológicas más severas, como el modelo de separación materna con destete temprano (MSEW), provocan un incremento robusto y reproducible de la ansiedad en ratones macho. Este efecto ha sido validado en cohortes independientes que replican de forma sistemática la disminución en las entradas a los brazos abiertos y el aumento en el tiempo en los brazos cerrados del EPM; alteraciones conductuales que, a nivel de circuito, se vinculan con oscilaciones neuronales anómalas en el hipocampo ventral (vHIP) (Murthy et al., 2019).

Al contrastar nuestros hallazgos en otras pruebas conductuales con la literatura, emergen divergencias metodológicas clave. Por un lado los ratones macho Balb/cJ expuestos a la separación materna exhiben un comportamiento similar a la ansiedad aumentado en las pruebas de campo abierto (redujo significativamente el tiempo en la zona central) y caja luz/oscuridad (menos tiempo en el compartimento iluminado de la caja), sin embrago en este estudio no se observaron diferencias en el EPM (Malcon et al., 2020), Esta discrepancia con nuestros datos se podría deber a un efecto de cepa-dependencia ya que la cepa BalB/cJ posee un trasfondo basal de alta reactividad al estrés y neofobia comparado con la cepa C57B/L6. Por otro lado, resulta fundamental discutir la discrepancia con el trabajo de Weiss et al. (2011), el cual comparte una alta homología con nuestro diseño experimental al emplear el paradigma MSUS en ratones C57BL/6. Mientras que nuestro estudio identificó una evitación clásica del riesgo (menor tiempo en brazos abiertos), Weiss et al. reportaron que el estrés crónico e impredecible exacerba las respuestas conductuales en entornos desconocidos, induciendo un aparente efecto "ansiolítico" caracterizado por un incremento en el tiempo en los brazos abiertos del EPM. Lejos de ser una contradicción biológica, este fenómeno ha sido descrito como una alteración en los mecanismos de evaluación del riesgo, dejando incapaces a los ratones de evaluar cuidadosamente territorios amenazantes.

La implementación del *Z-score* en pruebas de comportamiento reduce drásticamente el ruido metodológico y la variabilidad intrínseca del ensayo, incrementando la potencia estadística y la robustez de los datos en comparación con el análisis de parámetros aislados.

Para reducir drásticamente el ruido metodológico y la variabilidad intrínseca del ensayo, se implementó la estandarización de los datos mediante el *Z-score* para obtener un índice compuesto de ansiedad (*Z*-emocionalidad) y puntuaciones individuales por prueba conductual incrementando la potencia estadística y la robustez de los datos en comparación con el análisis de parámetros aislados (Guilloux et al., 2011). El análisis global reveló una tendencia al incremento en el puntaje de *Z*-emocionalidad en el grupo MSUS. Aunque en nuestro estudio este índice compuesto no alcanzó significancia estadística, la dirección del efecto reproduce consistentemente el fenotipo de ansiedad descrito por Orso et al. (2020) quienes emplearon la misma batería de pruebas para el cálculo de dicha puntuación integral. Cabe destacar que en dicho estudio el efecto pudo verse exacerbado debido a la incorporación del paradigma de material de cama limitada, el cual actúa como un estresor crónico adicional para las crías durante el desarrollo postnatal.

Conceptualmente, los paradigmas empleados en el presente estudio se basan en la libre exploración de entornos novedosos para medir la ansiedad. Sin embargo, se ha demostrado que diferentes pruebas de ansiedad (entre ellas, el EPM, OF y la caja de luz-oscuridad) parecen medir distintos componentes del comportamiento similar a la ansiedad, dado que los parámetros utilizados habitualmente en estas pruebas presentan una baja correlación entre ellos (Van Gaalen & Steckler, 2000). Si bien las tres pruebas se basan en el conflicto de "aproximación-evitación", cada tarea genera una amenaza distinta para el animal, que consiste en: un espacio amplio y desprotegido en el OF, un área elevada e insegura basada en la aversión natural de los roedores a las alturas y los espacios abiertos en el EPM, y un espacio muy iluminado en la caja de luz-

oscuridad debido a la naturaleza aversiva de un área abierta y brillantemente iluminada (Malcon et al., 2020). Estas diferencias en la forma en que cada tarea impone una amenaza a los roedores explican por qué observamos diferencias al evaluar al grupo MSUS. El hecho de que las alteraciones se manifestaran exclusivamente en el *Z-score* del laberinto elevado sugiere que el estrés en la vida temprana reconfiguró a los ratones hacia un miedo más específico ante situaciones de altura y espacios abiertos, más que a una ansiedad generalizada.

La selectividad observada en nuestros resultados coincide con el metaanálisis de D. Wang et al. (2020), el cual reporta una alta heterogeneidad en las respuestas debido a la variabilidad en los protocolos de separación materna, la cepa o especie, el sexo y la prueba conductual utilizada. Estos autores señalan que dichas divergencias no implican que los ratones sean modelos inadecuados para estudiar el estrés temprano, sino que la evaluación de sus conductas defensivo-exploratorias representa un desafío metodológico que requiere una mejor estandarización y un mayor tamaño de muestra. Bajo esta perspectiva, se sugiere que el fenotipo en ratones podría requerir de un "segundo golpe" (*second hit*) en la edad adulta como la derrota social (Jaric et al., 2019; Peña et al., 2017) o la combinación simultánea de estresores posnatales, como acoplar material de cama limitada con la separación materna (Orso et al., 2020) para desencadenar respuestas de ansiedad robustas y generalizadas tanto en el OF como en el LDB.

Al evaluar el impacto del sexo en el fenotipo conductual, los resultados obtenidos revelaron que el efecto de MSUS estuvo impulsado de manera exclusiva por las hembras, siendo el único grupo que manifestó una tendencia en aumento en el índice de emocionalidad (Z- emocionalidad) y un aumento significativo en el Z-score de laberinto elevad y caja luz – oscuridad.

Un de los aspectos importantes a considerar fue la diferenciación del efecto sobre cada sexo, el propósito principal era saber cuál línea seria la seleccionada para seguir la trasmisión del fenotipo tipo ansioso. No obstante, al evaluar el impacto del sexo en el fenotipo conductual, nuestros resultados revelaron que el efecto del MSUS estuvo impulsado de manera selectiva por las hembras. Esta

susceptibilidad dismórfica coincide con la literatura clínica y preclínica, la cual establece que el impacto de la adversidad temprana depende críticamente de la etapa del desarrollo en la que ocurre; mientras que los machos muestran una vulnerabilidad preferencial ante el estrés prenatal debido a una desventaja placentaria (Bale, 2016), los modelos de estrés posnatal sugieren una mayor susceptibilidad en las hembras (Davis & Glynn, 2024; Short et al., 2024). Bajo esta perspectiva, se ha descrito que las fluctuaciones de las hormonas esteroideas a lo largo de la vida influyen directamente en la salud cerebral y contribuyen al riesgo de desarrollar patologías psiquiátricas, por lo que es crucial considerar los efectos específicos de sexo (Lee et al., 2025). En alineación con esto, Jaric et al. (2019) demostraron que las experiencias adversas durante la infancia interrumpen de forma específica el papel protector que ejercen los estrógenos en el cerebro femenino, promoviendo una vulnerabilidad que mimetiza los estados de bajo estrógeno. Dado que estas variaciones endocrinas modulan de manera directa la exploración en pruebas de conflicto como el EPM y el campo abierto, la desregulación de este mecanismo inducida por el MSUS explica por qué el fenotipo ansioso se manifestó de forma exclusiva en las hembras de nuestro estudio.

Una vez establecido que la adversidad manifestaba una conducta similar a la ansiedad de manera selectiva en las hembras de la generación F1, se quiso examinar la posible transmisión hereditaria de este fenómeno. Diversos estudios han demostrado que la separación materna impredecible (MSUS), particularmente en ratones C57BL/6, es uno de los modelos intergeneracionales y transgeneracionales más utilizados para reproducir el impacto del estrés temprano, afectando tanto el neurodesarrollo de la descendencia como sus conductas sociales, metabólicas o cognitivas. Al respecto, la literatura reporta que los rasgos conductuales de la F1 se transmiten con éxito a la generación F2; específicamente en el laberinto elevado (EPM), donde los ratones F2 procedentes de la línea de estrés muestran una menor latencia para ingresar a los brazos abiertos pero una actividad locomotora normal, así como un mayor tiempo de permanencia en el compartimento iluminado de la caja de luz-

oscuridad (Gapp, Jawaid, et al., 2014). Incluso, estudios basados en cohortes transversales masivas procedentes de cruces realizados con diez años de diferencia por distintos investigadores, demuestran que estas alteraciones conductuales se transmiten de forma persistente hasta la tercera generación (F3), respaldando la solidez del MSUS como un modelo robusto de herencia transgeneracional (Van Steenwyk et al., 2018). Sin embargo, nuestros resultados en la generación F2 resultan aparentemente contradictorios con estos reportes previos, ya que los descendientes evaluados bajo nuestro diseño no mostraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros individuales de la batería conductual, ni en los índices compuestos de emocionalidad. Esta discrepancia se fundamenta críticamente en el diseño del linaje y la ruta de transmisión seleccionada. Mientras que la literatura clásica del modelo MSUS, fundamenta la evaluación de las generaciones F2 y F3 exclusivamente a través de la vía paterna para aislar el impacto epigenético gamético de los machos, nuestro estudio continuó la descendencia por vía materna. Al evaluar el linaje por la línea de las hembras, se incorpora la influencia directa del entorno de cuidado posnatal proporcionado por la madre F1. Dado que las hembras F1 en nuestro diseño no fueron expuestas a estresores durante su etapa reproductiva ni durante la crianza de sus camadas, el despliegue de cuidados maternos estables podría estar funcionando como un mecanismo de amortiguación conductual capaz de contener la manifestación de la ansiedad basal en la F2. No obstante, la ausencia de variaciones a nivel conductual en la F2 no implica necesariamente una interrupción en la transferencia biológica del estrés. El estudio de Franklin et al. (2010a) determinó que la herencia transgeneracional del trauma opera a través de un modo complejo, no lineal y dependiente del sexo. Los autores demostraron que existen subgrupos dentro de la descendencia que no externalizan ninguna anomalía en las pruebas exploratorias, actuando como portadores silenciosos o asintomáticos de alteraciones específicas. Bajo esta perspectiva, es altamente plausible que nuestra generación F2 conserve la huella del MSUS de forma latente en sus circuitos reguladores, donde los mecanismos de compensación biológica mantuvieron el fenotipo defensivo encubierto ante la falta de un estresor agudo

posterior o "segundo golpe" en su vida adulta. Este escenario de latencia conductual abre el panorama hacia nuestro siguiente objetivo, el cual fue cuantificar los niveles de expresión génica en genes reguladores clave del tejido cerebral. Esta aproximación a nivel molecular es indispensable para determinar si, a pesar de la normalización conductual propiciada por el cuidado y la estabilidad ambiental de la madre F1, la huella epigenética del MSUS logró transferirse y consolidarse en la generación F2, desenmascarando una vulnerabilidad biológica silenciosa que las pruebas conductuales no logran.

Se comenzó con la cuantificación del nivel de expresión de *bdnf*, como se mencionó anteriormente, esta neurotrofina es esencial en el desarrollo neuronal, el mantenimiento y la plasticidad sináptica, además se ha demostrado que la expresión del gen y proteína cambian significativamente en respuesta al estrés (Fungaro Rissatti et al., 2024). Por ejemplo, ha sido reportado una disminución de la expresion génica de *bdnf* en respuesta al estrés en la vida temprana en ratas hembra (Coley et al., 2019). Al evaluar la expresión en nuestro modelo se encontró un aumento significativo en la expresion relativa del exón IV de BDNF exclusivamente en la generación F2 provenientes de hembras que sufrieron MSUS, mientras que la F1 no tuvo cambios significativos. Este resultado estaría sugiriendo que la respuesta de *bdnf* depende de si el estrés se experimentó de forma directa o heredada. Sin embargo, esta repuesta transcripcional en aumento se alinea con lo reportado por diversos autores, quienes señalan que la inducción de *bdnf* en regiones corticales y límbicas constituyen un mecanismo clave a través del cual el sistema nervioso responde dinámicamente ante el estrés ambiental (Badowska-Szalewska et al., 2021; Chung et al., 2009).

En este sentido la literatura ha demostrado que las variaciones en al expresion de los trascriptos de *bdnf* no son estáticos, sino que dependen de la ventana temporal de evaluación y la edad del animal de experimentación. Por ejemplo, Nair et al. (2007) reportaron que la separación materna crónica (3 h/día, PND 2–14) provoca un incremento selectivo y transitorio en el trascripto que contiene el exón IV a los PND 21, el cual posteriormente se normaliza en la adultez. De manera similar Suri et al. (2013) evidenciaron un patrón bimodal dependiente del

tiempo, donde el estrés temprano incrementa la expresión del exón IV en etapas jóvenes (2 meses), mientras que en la mediana edad (15 meses) este mismo trascripto disminuye de forma drástica mediante mecanismos de precisión epigenética. La ausencia de cambios significativos en la expresión del exón IV en la generación F1 de nuestro modelo coincide con observaciones como las de O'Sullivan et al. (2011), quienes señalaron que ciertos paradigmas de separación materna no alteran de manera inmediata la trascripción medida por este promotor específico en edades adultas. No obstante, el incremento significativo observado en la generación F2 podría estar siguiendo que la experiencia de estrés intergeneracional podría remodelar la expresión génica por mecanismos regulatorios epigéneticos de dicha región de bdnf haciéndolo susceptible a una respuesta de sobreexpresión en la descendencia que no se manifiesta en la F1.

En neurobiología el aumento de la expresión de *bdnf* en estructuras del sistema nervioso central es reconocido como un mecanismo de resiliencia y neuroprotección adaptativa, específicamente la sobreexpresión *bdnf* en el eje HPA es indispensable para prevenir la manifestación de comportamientos tipos ansiosos o depresivos frente el estrés (Taliaz et al., 2011). Incluso otros estudios han reportado que una mayor resistencia al estrés exhibe un incremento significativo en los niveles de *bdnf* en áreas como el hipocampo y la corteza, actuando como un amortiguador dinámico frente al impacto de los glucocorticoides (Schulte-Herbrüggen et al., 2006). En este contexto diversos autores sugieren que este aumento en la expresión del trascripto que contiene el exón IV de *bdnf* podrían representar una respuesta adaptativa del tejido cerebral para compensar la experiencia adversa recibida directamente en etapas tempranas o de manera indirecta por vía heredada (Nair et al., 2007; Suri et al., 2013).Sin embargo la efectividad de este mecanismo protector difiere según el tipo de exposición al estresor. De acuerdo con Nair et al. (2007) sugieren que la experiencia directa de la separación materna en la vida temprana genera una impronta en los circuitos neuronales del miedo y del estrés alterando la forma en que el gen *bdnf* responde en la vida adulta, aumentando la vulnerabilidad a presentar un comportamiento anómalo. Esto permite hipotetizar que la

generación F1, al haber sufrido el estrés de forma directa, la corteza cerebral no pudo activar el incremento protector y/o compensatorio del exón IV de bdnf manteniéndose sin cambios significativos respecto al control, el cual es necesarios para contrarrestar el estrés derivando en la manifestación de una conducta tipo ansiosa. Mientras tanto la generación F2, aun sin presentar el trauma muestra un aumento significativo de la expresión del trascripto con el exón IV de *bdnf*. La posibilidad de que una marca epigenética heredada induzca una respuesta compensatoria en la dependencia en lugar de un daño estructural se encuentra respaldado por hallazgos como los de Vassoler et al. (2013) quienes demostraron que la experiencia adversa por consumo de sustancias en los progenitores reprograma la línea germinal para inducir una sobreexpresión adaptativa de *bdnf* en la corteza prefrontal de los descendientes, confiriéndoles resistencia fenotípica la sustancia.

10. CONCLUSIONES

1. En nuestro modelo el estrés en la vida temprana (MSUS) induce un fenotipo tipo ansioso en la generación F1, evidenciado por el aumento significativo en el Z-score del Laberinto Elevado (EMP) y respaldado por la tendencia en la emocionalidad global, validando la alteración una respuesta ante situaciones de conflicto.

2. Las hembras F1 sometidas a estrés en la vida temprana (MSUS) exhibieron susceptibilidad en el desarrollo de una conducta similar a la ansiedad respecto a sus controles. Por el contrario, los machos no manifestaron cambios conductuales significativos en esta batería conductual

3. El comportamiento tipo ansioso en la F1 vía materna no fue detectable en la generación F2.

4. Se observó únicamente la sobreexpresión del trascripto con el exón IV de Bdnf en la corteza de la descendencia (F2) sin alteraciones en Gad1; sugiriendo un posible mecanismo neuroprotector heredado que amortiguo la transmisión del fenotipo tipo ansioso.

11. REFERENCIAS

1. Abate, B. B., Sendekie, A. K., Merchaw, A., Abebe, G. K., Azmeraw, M., Alamaw, A. W., Zemariam, A. B., Kitaw, T. A., Kassaw, A., Wodaynew, T., Kassie, A. M., Yilak, G., & Kassa, M. A. (2024). Adverse Childhood Experiences Are Associated with Mental Health Problems Later in Life: An Umbrella Review of Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuropsychobiology*, *84*(1), 48–64. https://doi.org/10.1159/000542392
2. Adjimann, T. S., Argañaraz, C. V., & Soiza-Reilly, M. (2021). Serotonin-related rodent models of early-life exposure relevant for neurodevelopmental vulnerability to psychiatric disorders. In *Translational Psychiatry* (Vol. 11, Number 1). Springer Nature. https://doi.org/10.1038/s41398-021-01388-6
3. Ali, N. H., Al-Kuraishy, H. M., Al-Gareeb, A. I., Alexiou, A., Papadakis, M., AlAseeri, A. A., Alruwaili, M., Saad, H. M., & Batiha, G. E. S. (2024). BDNF/TrkB activators in Parkinson's disease: A new therapeutic strategy. In *Journal of Cellular and Molecular Medicine* (Vol. 28, Number 10). John Wiley and Sons Inc. https://doi.org/10.1111/jcmm.18368
4. Araujo, A. P. N., DeLucia, R., Scavone, C., & Planeta, C. S. (2003). Repeated predictable or unpredictable stress: effects on cocaine-induced locomotion and cyclic AMP-dependent protein kinase activity. *Behavioural Brain Research*, *139*(1–2), 75–81. https://doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00088-8
5. Bach, S. V., Bauman, A. J., Hosein, D., Tuscher, J. J., Ianov, L., Greathouse, K. M., Henderson, B. W., Herskowitz, J. H., Martinowich, K., & Day, J. J. (2023). *Distinct roles of* Bdnf I *and* Bdnf IV *transcript variant expression in hippocampal neurons*. https://doi.org/10.1101/2023.04.05.535694
6. Bach, S. V., Bauman, A. J., Hosein, D., Tuscher, J. J., Ianov, L., Greathouse, K. M., Henderson, B. W., Herskowitz, J. H., Martinowich, K., & Day, J. J. (2024). Distinct roles of Bdnf I and Bdnf IV transcript variant expression in hippocampal neurons. *Hippocampus*, *34*(5), 218–229. https://doi.org/10.1002/hipo.23600

7. Badowska-Szalewska, E., Lietzau, G., Moryś, J., & Kowiański, P. (2021). Role of brain-derived neurotrophic factor in shaping the behavioural response to environmental stressors. In *Folia Morphologica (Poland)* (Vol. 80, Number 3, pp. 487–504). Via Medica. https://doi.org/10.5603/FM.a2021.0079
8. Bale, T. L. (2016). The placenta and neurodevelopment: sex differences in prenatal vulnerability. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *18*(4), 459–464. https://doi.org/10.31887/DCNS.2016.18.4/tbale
9. Bhattacharya, S., Fontaine, A., Maccallum, P. E., Drover, J., & Blundell, J. (2019). Stress across generations: DNA methylation as a potential mechanism underlying intergenerational effects of stress in both post-traumatic stress disorder and pre-clinical predator stress rodent models. In *Frontiers in Behavioral Neuroscience* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00113
10. Castrén, E., & Antila, H. (2017). Neuronal plasticity and neurotrophic factors in drug responses. In *Molecular Psychiatry* (Vol. 22, Number 8, pp. 1085–1095). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/mp.2017.61
11. Chen, Y., Zheng, Y., Yan, J., Zhu, C., Zeng, X., Zheng, S., Li, W., Yao, L., Xia, Y., Su, W. W., & Chen, Y. (2022). Early Life Stress Induces Different Behaviors in Adolescence and Adulthood May Related With Abnormal Medial Prefrontal Cortex Excitation/Inhibition Balance. *Frontiers in Neuroscience*, *15*. https://doi.org/10.3389/fnins.2021.720286
12. Choi, E. J., Taylor, M. J., Hong, S. B., Kim, C., & Yi, S. H. (2018). The neural correlates of attachment security in typically developing children. *Brain and Cognition*, *124*, 47–56. https://doi.org/10.1016/j.bandc.2018.04.003
13. Chung, E. K. Y., Bian, Z.-X., Xu, H.-X., & Sung, J. J.-Y. (2009). Neonatal maternal separation increases brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B expression in the descending pain modulatory system. *Neuro-Signals*, *17*(3), 213–221. https://doi.org/10.1159/000224631
14. Coley, E. J. L., Demaestri, C., Ganguly, P., Honeycutt, J. A., Peterzell, S., Rose, N., Ahmed, N., Holschbach, M., Trivedi, M., & Brenhouse, H. C. (2019). Cross-generational transmission of early life stress effects on HPA

regulators and bdnf are mediated by sex, lineage, and upbringing. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *13*. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00101

15. Cunningham, A. M., Walker, D. M., & Nestler, E. J. (2021). Paternal transgenerational epigenetic mechanisms mediating stress phenotypes of offspring. In *European Journal of Neuroscience* (Vol. 53, Number 1, pp. 271–280). Blackwell Publishing Ltd. https://doi.org/10.1111/ejn.14582
16. Davis, E. P., & Glynn, L. M. (2024). Annual Research Review: The power of predictability – patterns of signals in early life shape neurodevelopment and mental health trajectories. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, *65*(4), 508–534. https://doi.org/10.1111/jcpp.13958
17. Endo, N., Makinodan, M., Mannari-Sasagawa, T., Horii-Hayashi, N., Somayama, N., Komori, T., Kishimoto, T., & Nishi, M. (2021). The effects of maternal separation on behaviours under social-housing environments in adult male C57BL/6 mice. *Scientific Reports*, *11*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-020-80206-3
18. Fleming, T. P., Watkins, A. J., Velazquez, M. A., Mathers, J. C., Prentice, A. M., Stephenson, J., Barker, M., Saffery, R., Yajnik, C. S., Eckert, J. J., Hanson, M. A., Forrester, T., Gluckman, P. D., & Godfrey, K. M. (2018). Origins of lifetime health around the time of conception: causes and consequences. In *The Lancet* (Vol. 391, Number 10132, pp. 1842–1852). Lancet Publishing Group. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30312-X
19. Franklin, T. B., Russig, H., Weiss, I. C., Grff, J., Linder, N., Michalon, A., Vizi, S., & Mansuy, I. M. (2010a). Epigenetic transmission of the impact of early stress across generations. *Biological Psychiatry*, *68*(5), 408–415. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.05.036
20. Franklin, T. B., Russig, H., Weiss, I. C., Grff, J., Linder, N., Michalon, A., Vizi, S., & Mansuy, I. M. (2010b). Epigenetic transmission of the impact of early stress across generations. *Biological Psychiatry*, *68*(5), 408–415. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.05.036
21. Fungaro Rissatti, L., Wilson, D., Palace-Berl, F., de Mello Ponteciano, B., Sardela de Miranda, F., Alece Arantes Moreno, I., dos Santos Vieira, T., Pereira Sorroche, B., Rebolho Batista Arantes, L. M., Madeira Alvares da

Silva, A., D'Almeida, V., Demarzo, M., & Rodrigues de Oliveira, D. (2024). BDNF methylation associated with stress in women: Novel insights in epigenetics and inflammation. *Brain, Behavior, & Immunity - Health*, *42*, 100900. https://doi.org/10.1016/j.bbih.2024.100900

22. Gapp, K., Jawaid, A., Sarkies, P., Bohacek, J., Pelczar, P., Prados, J., Farinelli, L., Miska, E., & Mansuy, I. M. (2014). Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice. *Nature Neuroscience*, *17*(5), 667–669. https://doi.org/10.1038/nn.3695
23. Gapp, K., Soldado-Magraner, S., Alvarez-Sánchez, M., Bohacek, J., Vernaz, G., Shu, H., Franklin, T. B., Wolfer, D., & Mansuy, I. M. (2014). Early life stress in fathers improves behavioural flexibility in their offspring. *Nature Communications*, *5*. https://doi.org/10.1038/ncomms6466
24. Graf, N., Zanca, R. M., Song, W., Zeldin, E., Raj, R., & Sullivan, R. M. (2022). Neurobiology of Parental Regulation of the Infant and Its Disruption by Trauma Within Attachment. In *Frontiers in Behavioral Neuroscience* (Vol. 16). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.806323
25. Grzesińska, A. D. (2025). The Involvement of the Endocannabinoid, Glutamatergic, and GABAergic Systems in PTSD. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 26, Number 13). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/ijms26135929
26. Guilloux, J.-P., Seney, M., Edgar, N., & Sibille, E. (2011). Integrated behavioral z-scoring increases the sensitivity and reliability of behavioral phenotyping in mice: relevance to emotionality and sex. *Journal of Neuroscience Methods*, *197*(1), 21–31. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.01.019
27. Hamdan, J. N., Sierra-Fonseca, J. A., Flores, R. J., Saucedo, S., Miranda-Arango, M., O'Dell, L. E., & Gosselink, K. L. (2022). Early-life adversity increases anxiety-like behavior and modifies synaptic protein expression in a region-specific manner. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *16*. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.1008556
28. Hanert, A., & Pedersen, A. (2026). Contextual elaboration shapes object recognition memory across levels of childhood adversity in healthy adults.

Scientific Reports, *16*(1), 15343. https://doi.org/10.1038/s41598-026-53083-5

29. Hanson, M. A., & Gluckman, P. D. (2014). Later Health and Disease: Physiology or Pathophysiology? *Physiol Rev*, *94*, 1027–1076. https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2013.-Extensive
30. Hohls, J. K., König, H. H., Quirke, E., & Hajek, A. (2021). Anxiety, depression and quality of life—a systematic review of evidence from longitudinal observational studies. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 18, Number 22). MDPI. https://doi.org/10.3390/ijerph182212022
31. Ikegame, T., Bundo, M., Murata, Y., Kasai, K., Kato, T., & Iwamoto, K. (2013). DNA methylation of the BDNF gene and its relevance to psychiatric disorders. In *Journal of Human Genetics* (Vol. 58, Number 7, pp. 434–438). https://doi.org/10.1038/jhg.2013.65
32. Jaimes Cienfuegos, J., Jaimes García, J., & del Carmen Guzmán Márquez Editores, M. (2024). *La intersección de la ciencia y el dolor: ansiedad, depresión, commotio cordis y el proceso de duelo*.
33. Jaric, I., Rocks, D., Cham, H., Herchek, A., & Kundakovic, M. (2019). Sex and Estrous Cycle Effects on Anxiety- and Depression-Related Phenotypes in a Two-Hit Developmental Stress Model. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *12*. https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00074
34. Klengel, T., Dias, B. G., & Ressler, K. J. (2016). Models of Intergenerational and Transgenerational Transmission of Risk for Psychopathology in Mice. In *Neuropsychopharmacology* (Vol. 41, Number 1, pp. 219–231). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/npp.2015.249
35. Kolb, B., Mychasiuk, R., & Gibb, R. (2014). Brain development, experience, and behavior. In *Pediatric Blood and Cancer* (Vol. 61, Number 10, pp. 1720–1723). John Wiley and Sons Inc. https://doi.org/10.1002/pbc.24908
36. Lee, B. H., Eid, R. S., Hodges, T. E., Barth, C., & Galea, L. A. M. (2025). Leveraging research into sex differences and steroid hormones to improve brain health. *Nature Reviews Endocrinology*, *21*(4), 214–229. https://doi.org/10.1038/s41574-024-01061-0

37. Madden, R. A., Atkinson, K., Shen, X., Green, C., Hillary, R. F., Hawkins, E., Såge, E., Sandu, A.-L., Waiter, G., McNeil, C., Harris, M., Campbell, A., Porteous, D., Macfarlane, J. A., Murray, A., Steele, D., Romaniuk, L., Lawrie, S. M., McIntosh, A. M., & Whalley, H. C. (2023). Structural brain correlates of childhood trauma with replication across two large, independent community-based samples. *European Psychiatry*, *66*(1). https://doi.org/10.1192/j.eurpsy.2022.2347
38. Malcon, L. M. C., Wearick-Silva, L. E., Zaparte, A., Orso, R., Luft, C., Tractenberg, S. G., Donadio, M. V. F., de Oliveira, J. R., & Grassi-Oliveira, R. (2020). Maternal separation induces long-term oxidative stress alterations and increases anxiety-like behavior of male Balb/cJ mice. *Experimental Brain Research*, *238*(9), 2097–2107. https://doi.org/10.1007/s00221-020-05859-y
39. Mao, Y., Meng, Y., Zou, K., Qin, N., Wang, Y., Yan, J., Chen, P. J., Cheng, Y., Shi, W., Zhou, C., Chen, H., Sheng, J., Liu, X., Pan, J., & Huang, H. (2024). Advanced paternal age exacerbates neuroinflammation in offspring via m6A modification-mediated intergenerational inheritance. *Journal of Neuroinflammation*, *21*(1), 249. https://doi.org/10.1186/s12974-024-03248-8
40. Martin, E. I., Ressler, K. J., Binder, E., & Nemeroff, C. B. (2009). The Neurobiology of Anxiety Disorders: Brain Imaging, Genetics, and Psychoneuroendocrinology. In *Psychiatric Clinics of North America* (Vol. 32, Number 3, pp. 549–575). https://doi.org/10.1016/j.psc.2009.05.004
41. Mbiydzenyuy, N. E., Hemmings, S. M. J., & Qulu, L. (2022). Prenatal maternal stress and offspring aggressive behavior: Intergenerational and transgenerational inheritance. In *Frontiers in Behavioral Neuroscience* (Vol. 16). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.977416
42. McArdle, C. J., Arnone, A. A., Heaney, C. F., & Raab-Graham, K. F. (2023). A paradoxical switch: the implications of excitatory GABAergic signaling in neurological disorders. In *Frontiers in Psychiatry* (Vol. 14). Frontiers Media SA. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2023.1296527

43. Mitchelmore, C., & Gede, L. (2014). Brain derived neurotrophic factor: Epigenetic regulation in psychiatric disorders. In *Brain Research* (Vol. 1586, pp. 162–172). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.06.037
44. Moriceau, S., Roth, T. L., & Sullivan, R. M. (2010). Rodent model of infant attachment learning and stress. *Developmental Psychobiology*, *52*(7), 651–660. https://doi.org/10.1002/dev.20482
45. Mulligan, M. K., Abreo, T., Neuner, S. M., Parks, C., Watkins, C. E., Houseal, M. T., Shapaker, T. M., Hook, M., Tan, H., Wang, X., Ingels, J., Peng, J., Lu, L., Kaczorowski, C. C., Bryant, C. D., Homanics, G. E., & Williams, R. W. (2019). Identification of a functional non-coding variant in the GABAA receptor α2 subunit of the C57BL/6J mouse reference genome: Major implications for neuroscience research. *Frontiers in Genetics*, *10*(MAR). https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00188
46. Murthy, S., Kane, G. A., Katchur, N. J., Lara Mejia, P. S., Obiofuma, G., Buschman, T. J., McEwen, B. S., & Gould, E. (2019). Perineuronal Nets, Inhibitory Interneurons, and Anxiety-Related Ventral Hippocampal Neuronal Oscillations Are Altered by Early Life Adversity. *Biological Psychiatry*, *85*(12), 1011–1020. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.02.021
47. Nagayama, S., Hasegawa-Ishii, S., & Kikuta, S. (2024). Anesthetized animal experiments for neuroscience research. In *Frontiers in Neural Circuits* (Vol. 18). Frontiers Media SA. https://doi.org/10.3389/fncir.2024.1426689
48. Nair, A., Vadodaria, K. C., Banerjee, S. B., Benekareddy, M., Dias, B. G., Duman, R. S., & Vaidya, V. A. (2007). Stressor-specific regulation of distinct brain-derived neurotrophic factor transcripts and cyclic AMP response element-binding protein expression in the postnatal and adult rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology*, *32*(7), 1504–1519. https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301276
49. National Academies of Sciences, E. and M. H. and M. D. B. on P. H. and P. H. P. & C. on G. W. and H. V. 11: G. H. E. of S. in the G. War. (2018). *Gulf War and Health*. National Academies Press. https://doi.org/10.17226/25162
50. Ohta, K., Suzuki, S., Warita, K., Sumitani, K., Tenkumo, C., Ozawa, T., Ujihara, H., Kusaka, T., & Miki, T. (2020). The effects of early life stress on

the excitatory/inhibitory balance of the medial prefrontal cortex. *Behavioural Brain Research*, *379*, 112306. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112306

51. Opendak, M., Theisen, E., Blomkvist, A., Hollis, K., Lind, T., Sarro, E., Lundström, J. N., Tottenham, N., Dozier, M., Wilson, D. A., & Sullivan, R. M. (2020). Adverse caregiving in infancy blunts neural processing of the mother. *Nature Communications*, *11*(1). https://doi.org/10.1038/s41467-020-14801-3
52. Orso, R., Creutzberg, K. C., Kestering-Ferreira, E., Wearick-Silva, L. E., Tractenberg, S. G., & Grassi-Oliveira, R. (2020). Maternal Separation Combined With Limited Bedding Increases Anxiety-Like Behavior and Alters Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Function of Male BALB/cJ Mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *14*. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.600766
53. O'Sullivan, E., Barrett, E., Grenham, S., Fitzgerald, P., Stanton, C., Ross, R. P., Quigley, E. M. M., Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2011). BDNF expression in the hippocampus of maternally separated rats: Does Bifidobacterium breve 6330 alter BDNF levels? *Beneficial Microbes*, *2*(3), 199–207. https://doi.org/10.3920/BM2011.0015
54. Otto, K., & von Thaden, A. K. (2012). Anaesthesia, Analgesia and Euthanasia. In *The Laboratory Mouse* (pp. 739–759). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382008-2.00032-5
55. Peña, C. J., Kronman, H. G., Walker, D. M., Cates, H. M., Bagot, R. C., Purushothaman, I., Issler, O., Loh, Y.-H. E., Leong, T., Kiraly, D. D., Goodman, E., Neve, R. L., Shen, L., & Nestler, E. J. (2017). Early life stress confers lifelong stress susceptibility in mice via ventral tegmental area OTX2. *Science*, *356*(6343), 1185–1188. https://doi.org/10.1126/science.aan4491
56. Persaud, N. S., & Cates, H. M. (2023). The Epigenetics of Anxiety Pathophysiology: A DNA Methylation and Histone Modification Focused Review. In *eNeuro* (Vol. 10, Number 4). Society for Neuroscience. https://doi.org/10.1523/ENEURO.0109-21.2021
57. Qin, X., Liu, X.-X., Wang, Y., Wang, D., Song, Y., Zou, J.-X., Pan, H.-Q., Zhai, X.-Z., Zhang, Y.-M., Zhang, Y.-B., Hu, P., & Zhang, W.-H. (2021). Early life

stress induces anxiety-like behavior during adulthood through dysregulation of neuronal plasticity in the basolateral amygdala. *Life Sciences*, *285*, 119959. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119959

58. Rice, C. J., Sandman, C. A., Lenjavi, M. R., & Baram, T. Z. (2008). A Novel Mouse Model for Acute and Long-Lasting Consequences of Early Life Stress. *Endocrinology*, *149*(10), 4892–4900. https://doi.org/10.1210/en.2008-0633
59. Sabbah, S. G., & Northoff, G. (2025). The self in depression and anxiety as a transdiagnostic and differential-diagnostic neural marker: A systematic review. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 169). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2025.106034
60. Sakata, K., Woo, N. H., Martinowich, K., Greene, J. S., Schloesser, R. J., Shen, L., & Lu, B. (2009). *Critical role of promoter IV-driven BDNF transcription in GABAergic transmission and synaptic plasticity in the prefrontal cortex*. www.pnas.org/cgi/content/full/
61. Schulte-Herbrüggen, O., Chourbaji, S., Ridder, S., Brandwein, C., Gass, P., Hörtnagl, H., & Hellweg, R. (2006). Stress-resistant mice overexpressing glucocorticoid receptors display enhanced BDNF in the amygdala and hippocampus with unchanged NGF and serotonergic function. *Psychoneuroendocrinology*, *31*(10), 1266–1277. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2006.09.008
62. Secretaria de Salud de México. (2024, April 4). *136. Ansiedad puede evolucionar y convertirse en trastorno de salud mental*. https://www.gob.mx/salud/prensa/136-ansiedad-puede-evolucionar-y-convertirse-en-trastorno-de-salud-mental
63. Shin, L. M., & Liberzon, I. (2010). The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. In *Neuropsychopharmacology* (Vol. 35, Number 1, pp. 169–191). https://doi.org/10.1038/npp.2009.83
64. Short, A. K., Weber, R., Kamei, N., Wilcox Thai, C., Arora, H., Mortazavi, A., Stern, H. S., Glynn, L., & Baram, T. Z. (2024). Individual longitudinal changes in DNA-methylome identify signatures of early-life adversity and correlate

with later outcome. *Neurobiology of Stress*, *31*, 100652. https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2024.100652

65. Son, Y., Yang, M., Kang, S., Lee, S., Kim, J., Kim, J., Park, S., Kim, J. S., Jo, S. K., Jung, U., Shin, T., Kim, S. H., Wang, H., & Moon, C. (2015). Cranial irradiation regulates CREB-BDNF signaling and variant BDNF transcript levels in the mouse hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, *121*, 12–19. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.03.002
66. Speranza, L., Filiz, K. D., Lippiello, P., Ferraro, M. G., Pascarella, S., Miniaci, M. C., & Volpicelli, F. (2024). Enduring Neurobiological Consequences of Early-Life Stress: Insights from Rodent Behavioral Paradigms. In *Biomedicines* (Vol. 12, Number 9). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/biomedicines12091978
67. Sullivan, R. M. (2012). *The Neurobiology of Attachment to Nurturing and Abusive Caregivers*.
68. Suri, D., Veenit, V., Sarkar, A., Thiagarajan, D., Kumar, A., Nestler, E. J., Galande, S., & Vaidya, V. A. (2013). Early stress evokes age-dependent biphasic changes in hippocampal neurogenesis, Bdnf expression, and cognition. *Biological Psychiatry*, *73*(7), 658–666. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.10.023
69. Taliaz, D., Loya, A., Gersner, R., Haramati, S., Chen, A., & Zangen, A. (2011). Resilience to Chronic Stress Is Mediated by Hippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor. *The Journal of Neuroscience*, *31*(12), 4475–4483. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5725-10.2011
70. Tenkumo, C., Ohta, K. ichi, Suzuki, S., Warita, K., Irie, K., Teradaya, S., Kusaka, T., Kanenishi, K., Hata, T., & Miki, T. (2020). Repeated maternal separation causes transient reduction in BDNF expression in the medial prefrontal cortex during early brain development, affecting inhibitory neuron development. *Heliyon*, *6*(8). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04781
71. Tottenham, N., Hare, T. A., Millner, A., Gilhooly, T., Zevin, J. D., & Casey, B. J. (2011). Elevated amygdala response to faces following early deprivation. *Developmental Science*, *14*(2), 190–204. https://doi.org/10.1111/j.1467-7687.2010.00971.x

72. Urrutia, M., Fernández, S., González, M., Vilches, R., Rojas, P., Vásquez, M., Kurte, M., Vega-Letter, A. M., Carrión, F., Figueroa, F., Rojas, P., Irarrázabal, C., & Fuentealba, R. A. (2016). Overexpression of glutamate decarboxylase in mesenchymal stem cells enhances their immunosuppressive properties and increases GABA and nitric oxide levels. *PLoS ONE*, *11*(9). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163735
73. Van Gaalen, M. M., & Steckler, T. (2000). Behavioural analysis of four mouse strains in an anxiety test battery. *Behavioural Brain Research*, *115*(1), 95–106. https://doi.org/10.1016/S0166-4328(00)00240-0
74. Van Steenwyk, G., Roszkowski, M., Manuella, F., Franklin, T. B., & Mansuy, I. M. (2018). Transgenerational inheritance of behavioral and metabolic effects of paternal exposure to traumatic stress in early postnatal life: Evidence in the 4th generation. *Environmental Epigenetics*, *4*(2), 1–8. https://doi.org/10.1093/eep/dvy023
75. Vassoler, F. M., White, S. L., Schmidt, H. D., Sadri-Vakili, G., & Pierce, R. C. (2013). Epigenetic inheritance of a cocaine-resistance phenotype. *Nature Neuroscience*, *16*(1), 42–47. https://doi.org/10.1038/nn.3280
76. Wang, D., Levine, J. L. S., Avila-Quintero, V., Bloch, M., & Kaffman, A. (2020). Systematic review and meta-analysis: effects of maternal separation on anxiety-like behavior in rodents. *Translational Psychiatry*, *10*(1). https://doi.org/10.1038/s41398-020-0856-0
77. Wang, Y., Dong, W., Zhang, L., & Zhang, R. (2022). The effect of kangaroo mother care on aEEG activity and neurobehavior in preterm infants: a randomized controlled trial. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, *35*(25), 6483–6488. https://doi.org/10.1080/14767058.2021.1916460
78. Weiss, I. C., Franklin, T. B., Vizi, S., & Mansuy, I. M. (2011). Inheritable effect of unpredictable maternal separation on behavioral responses in mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, (FEBRUARY). https://doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00003
79. World Health Organization. (2023, September 27). *Trastornos de ansiedad*. https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/anxiety-disorders

80. Xie, M., Xiong, Y., & Wang, H. (2024). The regulative role and mechanism of BNST in anxiety disorder. In *Frontiers in Psychiatry* (Vol. 15). Frontiers Media SA. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2024.1437476
81. Xie, S., Zhang, X., Cheng, W., & Yang, Z. (2021). Adolescent anxiety disorders and the developing brain: Comparing neuroimaging findings in adolescents and adults. In *General Psychiatry* (Vol. 34, Number 4). BMJ Publishing Group. https://doi.org/10.1136/gpsych-2020-100411
82. Zhang, T. Y., Hellstrom, I. C., Bagot, R. C., Wen, X., Diorio, J., & Meaney, M. J. (2010). Maternal care and DNA methylation of a glutamic acid decarboxylase 1 promoter in rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*, *30*(39), 13130–13137. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1039-10.2010
83. Zhang, Y., Wang, S., & Hei, M. (2024). Maternal separation as early-life stress: Mechanisms of neuropsychiatric disorders and inspiration for neonatal care. In *Brain Research Bulletin* (Vol. 217). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2024.111058