



EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIDEPRESIVO DEL
SECRETOMA DERIVADO DE CÉLULAS MADRE
MESENQUIMÁTICAS PRECONDICIONADAS EN UN
MODELO ANIMAL DE TRASTORNO DEPRESIVO MAYOR

POR: ALBA LILIANA ÁVILA SUÁREZ

Tesis presentada a la Facultad de Medicina-Clínica Alemana de la
Universidad del Desarrollo para optar al grado de Doctor (PhD) en
Ciencias e Innovación en Medicina

PROFESORES GUÍA:
Dr. FERNANDO EZQUER
DRA. MARIA EUGENIA RIVEROS VALLE

Junio 2022
SANTIAGO

© Copyright Se autoriza la reproducción de fragmentos de esta obra para fines académicos, educativos o de investigación, siempre que se incluya la referencia bibliográfica.

A mi familia,
A mis amigos,
Al Centro de Medicina Regenerativa

“La imaginación es el comienzo de la creación. Imaginas lo que deseas y luego crees que es verdad. Todos los sueños pueden ser realizados por aquellos que son lo suficientemente disciplinados como para creerlo.”

Neville Goddard.

AGRADECIMIENTOS

Fernando Ezquer, por su paciencia, por sus enseñanzas y su gran experiencia como investigador que me hicieron formarme como investigadora y por sobre todo por creer, confiar en mis capacidades y acogerme en esa familia maravillosa que es el Centro de Medicina Regenerativa.

María Eugenia Riveros, por guiarme con su experiencia en este mundo desconocido para mí de la neurociencia y comportamiento animal y por sobre todo su empatía, comprensión y ayuda en los momentos en los que más los necesité.

Lorena Lobos, por transmitirme su fortaleza, por sus palabras de ánimo, su alegría, su amistad sincera e incondicional y por ser ese bálsamo, consuelo y orientación en los días en los que me sentía atribulada.

Marcelo Ezquer, por su solidaridad y apoyo en todo momento oportuno y a veces anticipadamente.

Belén Olivares, por brindarme su amistad, cariño, fortaleza, ánimo, alegría y acompañarme en este tránsito de mi vida.

A mis padres, aunque no estén presentes físicamente, sé que me acompañan y están felices con cada proceso y triunfo obtenidos en mi vida.

A mis hermanos, que siempre están ahí para ayudarme y alentarme a que continúe avanzando en mi vida personal y profesional.

Al equipo de trabajo en CMR, por ese calor de amistad y camaradería.

A Dios y al universo, por este regalo tan esplendoroso de conocer a todas estas maravillosas personas y por esta gran experiencia de aprendizaje y crecimiento en mi vida intelectual, personal y espiritual.

CONTENIDO

Contenido.....	vii
Figuras.....	xi
Tablas.....	xiii
Tablas suplementarias.....	xiv
Lista de abreviaciones.....	xv
Resumen.....	xviii
Abstract.....	xx
1. INTRODUCCION	1
1.1 Definiendo depresión y su nivel de gravedad.	1
1.2 Etiología y fisiopatología de la depresión.....	3
1.2.1 Hipótesis del déficit de monoaminas.....	3
1.2.2 Hipótesis de la reducción en la neurogénesis.....	4
1.2.3 Hipótesis de la neuroinflamación.	5
1.3 Tratamiento actual para el TDM.	8
1.4 Citoquinas y TDM.	10
1.5 Neurogénesis hipocampal adulta y TDM.	13
1.6 Células madre mesenquimáticas (MSCs) y TDM.	16
1.7 Modelos animales utilizados para el estudio del TDM.	19
1.7.1 Desesperanza o impotencia aprendida (LH).....	20
1.7.2 Estrés de restricción o inmovilización repetida.	21
1.7.3 Comportamiento depresivo inducido por administración de lipopolisacárido (LPS).....	21
1.7.4 Estrés crónico moderado impredecible (chronic unpredictable mild stress, CUMS).	22
2. HIPÓTESIS.....	24
3. OBJETIVO GENERAL	25
3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	25

4. MATERIALES Y METODOS	26
4.1 Establecimiento del modelo de depresión inducido por estrés moderado crónico e impredecible (CUMS) en ratas.	26
4.1.1 Animales.	26
4.1.2 Alojamiento de los animales.	27
4.1.3 Batería de estresores aplicados para inducir depresión.	27
4.1.4 Pruebas para evaluar conducta tipo depresiva.	29
4.1.4.1 Pruebas para evaluar cambios en el comportamiento hedónico	30
4.1.4.1.1 Prueba de preferencia a la sacarosa (sucrose preference test SPT).....	30
4.1.4.1.2 Test de olfateo de orina de hembra receptiva (female urine sniffing test, FUST).	31
4.1.4.2 Cambios en el comportamiento asociados con alteraciones en la regulación emocional.....	32
4.1.4.2.1 Prueba de campo abierto (Open field test OF).	32
4.1.4.3 Cambios en el comportamiento relacionados con la función ejecutiva.....	33
4.1.4.3.1 Prueba de rociado de solución azucarada (Sucrose Splash Test SST).	34
4.1.4.3.2 Evaluación del estado del pelaje (Status of coat SC).	34
4.1.5 Cálculo del tamaño muestral.	35
4.1.6 Puntaje diseñado para evaluar conducta depresiva (score).	37
4.1.7 Diseño experimental	39
4.2 Evaluar y comparar conductas y fenotipo depresivo en ratas sometidas a CUMS con y sin administración intranasal de secretoma.	40
4.2.1 Producción y administración intranasal de secretoma derivado de células madre mesenquimáticas precondicionadas.	41
4.2.1.1 Aislamiento y expansión de células madre mesenquimáticas derivadas de tejido adiposo humano (hAD-MSCs).....	41
4.2.1.2 Caracterización de las hAD-MSCs.....	42
4.2.1.3 Precondicionamiento de AD-MSC y obtención de secretoma.	43
4.2.1.4 Administración intranasal de secretoma derivado de MSC o vehículo.	45

4.2.1.5 Diseño experimental para la evaluación de conductas y fenotipo depresivo en ratas sometidas a CUMS y tratadas con secretoma o vehículo.	47
4.3. Determinación de inflamación local (corteza prefrontal e hipocampo) en ratas sometidas a CUMS tratadas con administración intranasal de secretoma o vehículo.	49
4.4 Evaluación de neurogénesis hipocampal adulta en ratas sometidas a CUMS con administración intranasal de secretoma o vehículo.	52
5. RESULTADOS	55
5.1. Resultados del experimento piloto de trastorno depresivo mayor inducido por CUMS en ratas.	55
5.1.1 Características conductuales.....	55
5.1.1.1 Cambios en el peso corporal de los animales.	55
5.1.1.2. Cambios en el comportamiento hedónico, prueba de preferencia a la sacarosa al 1% (PS)	56
5.1.1.3 Cambios en el comportamiento relacionados con la función ejecutiva, estado del pelaje y rociado de sacarosa al 10%.	57
5.1.1.4 Cambios en el comportamiento asociados con alteraciones en la regulación emocional, prueba de campo abierto (Open Field OF)	58
5.1.1.5 Elaboración del puntaje o score y puntuación global del comportamiento similar a la depresión.....	59
5.1.2 Efecto del protocolo CUMS en los parámetros neuromoleculares.....	63
5.1.2.1 Neurogénesis hipocampal adulta.....	63
5.1.2.2 Neuroinflamación en corteza prefrontal e hipocampo.....	67
5.2. Evaluación del potencial antidepresivo del secretoma derivado de hAD-MSC precondicionadas.....	68
5.2.1 Niveles de expresión de citoquinas anti-inflamatorias y factores neuroprotectores en hAD-MSC precondicionadas.....	69
5.2.2 Línea de tiempo del experimento CUMS para la evaluación del potencial antidepresivo del secretoma derivado de hAD-MSC precondicionadas.	71
5.2.3 Características conductuales.....	72
5.2.3.1 Cambios en el peso corporal de los animales.	72
5.2.3.2 Evaluación del comportamiento hedónico.	73

5.2.3.3 Cambios en el comportamiento relacionado con la función ejecutiva.	76
5.2.3.4 Cambios en el comportamiento asociados con alteraciones en la regulación emocional.....	79
5.2.3.5 Puntuación global del comportamiento similar a la depresión.	82
6. DISCUSIÓN	97
7. CONCLUSIÓN	112
8. TABLAS SUPLEMENTARIAS..	113
9. PRODUCTOS GENERADOS DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS.....	117
10. REFERENCIAS	120

FIGURAS

Figura 1. Esquema del proceso de neurogénesis hipocampal adulta.	15
Figura 2. Panel de estresores utilizados en el procedimiento piloto CUMS para inducir un estado similar a la depresión en humanos	29
Figura 3. Diseño experimental del estudio piloto CUMS.	40
Figura 4. Procedimiento de administración intranasal de secretoma o vehículo..	47
Figura 5. Diseño experimental para la evaluación del potencial antidepresivo del secretoma derivado de hAD-MSCs preconicionadas.....	49
Figura 6. Ganancia acumulativa de peso.....	56
Figura 7. Porcentaje de preferencia a la sacarosa a las 8 semanas de CUMS.	57
Figura 8. Cambios en el comportamiento relacionado con las funciones ejecutivas a las ocho semanas de CUMS.....	58
Figura 9. Evaluación de alteraciones en la regulación emocional en ratas sometidas a las 8 semanas de CUMS.	59
Figura 10. Comparación de puntaje total entre el grupo de control sin estrés con el grupo de ratas sometidas a CUMS a las ocho semanas.....	63
Figura 11. Evaluación de neurogenesis hipocampal adulta mediante inmunofluorescencia luego de ocho semanas de CUMS.....	65
Figura 12. Niveles de expresión de BDNF en ratas sometidas a CUMS durante ocho semanas.....	67
Figura 13. Niveles de expresión de citoquinas pro-inflamatorias en corteza prefrontal e hipocampo en ratas sometidas a CUMS durante ocho semanas..	68
Figura 14. El preconicionamiento de hAD-MSCs por incubación con citoquinas pro-inflamatorias aumenta la expresión de moléculas con potencial terapéutico.....	70
Figura 15. Línea de tiempo del experimento CUMS para evaluar el potencial antidepresivo del secretoma.	71

Figura 16. Ganancia acumulativa de peso.....	73
Figura 17. Pruebas evaluativas de comportamiento hedónico.....	75
Figura 18. Pruebas de comportamiento relacionadas con la función ejecutiva..	78
Figura 19. Evaluación del comportamiento asociado a la regulación emocional.....	81
Figura 20. Puntaje global de comportamiento similar a la depresión.....	85
Figura 21. Evaluación de niveles de citoquinas pro-inflamatorias.....	87
Figura 22. Microfotografías representativas obtenidas con microscopía láser confocal del la región CA1 del hipocampo	89
Figura 23. Evaluación estructural de neuroinflamación en corteza prefrontal de ratas sometidas a CUMS durante once semanas y tratadas con administración intranasal de secretoma o vehículo	91
Figura 24. Microfotografías representativas obtenidas con microscopia láser confocal del giro dentado.....	93
Figura 25. Cuantificación de neuronas en el giro dentado del hipocampo de ratas sometidas a CUMS durante once semanas y tratadas con administración intranasal de secretoma o vehículo..	94
Figura 26. Evaluación de niveles de factores neurotróficos en el hipocampo....	95

TABLAS

Tabla 1. Resultados de los análisis de pruebas conductuales de todas las ratas del experimento piloto.....	60
Tabla 2. Valores de media, desviación estándar (DS) y puntos de corte de las pruebas conductuales y asignación del puntaje del experimento piloto.....	61
Tabla 3. Puntaje parcial y total por prueba conductual de todas las ratas del experimento piloto a las ocho semanas.....	62
Tabla 4. Datos crudos del experimento realizado para la evaluación del potencial antidepresivo del secretoma.....	83
Tabla 5. Puntaje global obtenido, a las 8 semanas y 11 semanas, por los animales sometidos a CUMS en la evaluación del potencial antidepresivo del secretoma.....	84

TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla suplementaria 1. Resultados de las pruebas basales para la separación en grupos experimentales en el estudio piloto.....	113
Tabla suplementaria 2. Días de aplicación de los estresores propuestos, al grupo de ratas del experimento piloto.....	114
Tabla suplementaria 3. Días de aplicación de los estresores a los grupos de ratas tratadas con vehículo y tratadas con secretoma.....	114
Tabla suplementaria 4. Resultados de las pruebas basales del primer grupo de animales del experimento de evaluación del Secretoma.....	115
Tabla suplementaria 5. Resultados de las pruebas basales del segundo grupo de animales del experimento de evaluación del Secretoma.....	116

LISTA DE ABREVIACIONES

ATC	Antidepresivo tricíclicos.
BBB	Barrera hematoencefálica.
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro.
bFGF	Factor de crecimiento básico para fibroblastos.
BH4	Tetrahidrobiopterina.
BSA	Albúmina de suero bovino.
CUMS	Estrés crónico moderado impredecible.
D.A.P.I	4', 6-diamino-2-fenilindol.
DCX	Doblecortina.
D.S	Desviación estándar.
DSM-V	Manual de diagnóstico estadístico de desórdenes mentales.
F.D.A	Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos.
FUST	Prueba de olfateo de orina de hembra receptiva.
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa.
GBD	Carga mundial de enfermedades.
GD	Giro dentado.
GFAP	Proteína fibrilar glial.
hAD-MSC	Células madre mesenquimáticas derivadas de tejido adiposo humano.
HAM-D	Escala de clasificación de depresión de Hamilton.
HP	Hipocampo.
Iba-1	Molécula adaptadora de unión al calcio ionizado.
IDO	Indolamina 2-3 dioxigenasa.
IFN- γ	Interferón gama.
IL-1b	Interleuquina 1b.

IL-6	Interleuquina 6.
IL-10	Interleuquina 10.
IMAO	Inhibidores de la enzima monoamino oxidasa.
ISCT	Sociedad Internacional de Terapia Celular.
Ki67	Marcador de proliferación celular.
LPFC	Corteza prefrontal lateral
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos.
mCPF	Corteza prefrontal medial.
MSC	Células madre mesenquimáticas.
sgACC	Corteza cingulada anterior subgenua.
NeuN	Antígeno nuclear neuronal, marcador de diferenciación de neurona.
NGF	Factor de crecimiento nervioso.
NGS	Suero de cabra.
NMDA	N-metil D aspartato (receptor).
NSC	Células madre neuronales.
OF	Prueba de campo abierto.
PCR	Proteína de respuesta de la fase aguda.
PFC	Corteza prefrontal.
RGFL	Célula precursora radial similar a la glía.
SC	Prueba de evaluación del estado del pelaje.
SERT	Transportador de serotonina.
SGZ	Zona subgranular del giro dentado.
SNC	Sistema nervioso central.
SNRI	Inhibidores de la recaptación de noradrenalina.
SPT	Prueba de preferencia a la sacarosa.
SSRI	Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina.

SST	Prueba de rociado de sacarosa en el pelaje.
TDM	Trastorno Depresivo Mayor.
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa.
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular.

RESUMEN

El trastorno depresivo mayor es un desorden heterogéneo y multifactorial caracterizado por episodios de al menos dos semanas de duración, en los cuales se presente al menos uno de los dos síntomas centrales. Estos son: 1.- Estado de ánimo depresivo con pérdida de interés por las actividades cotidianas y 2.- Ausencia de la capacidad de sentir placer (anhedonia). Estos síntomas traen consigo trastornos anímicos, cognitivos y fisiológicos y en los casos más severos, pueden asociarse a conductas suicidas. Si bien en la actualidad la etiología del trastorno depresivo mayor es poco conocida, se ha reportado que tanto la presencia de neuroinflamación como la reducción de la neurogénesis hipocampal adulta son eventos claves en el desarrollo de esta patología. Las terapias actuales para el trastorno depresivo mayor no están enfocadas en estas alteraciones, lo que podría explicar el alto porcentaje de refractariedad al tratamiento de pacientes con trastorno depresivo mayor frente a la terapia convencional. Por este motivo, se ha propuesto como una opción de tratamiento el uso de células madre mesenquimáticas (MSC), las cuales son capaces de producir de manera paracrina, una gran variedad de moléculas terapéuticas entre las que se encuentran moléculas anti-inflamatorias y factores neuroprotectores inductores de la neurogénesis. Estas moléculas secretadas por las MSC se pueden recuperar desde el medio de cultivo celular y en conjunto reciben el nombre de secretoma. Este trabajo se basó en la evaluación del potencial

antidepresivo de la administración intranasal repetida de secretoma derivado de MSC en un modelo animal de trastorno depresivo mayor instaurado en el bioterio de la Universidad del Desarrollo. En conjunto, los datos obtenidos muestran que el tratamiento intranasal con secretoma derivado de MSC fue capaz de revertir algunas de las conductas asociadas a estados depresivos en animales, disminuyendo significativamente el puntaje global de depresión en comparación a los animales tratados con vehículo. A nivel estructural el modelo animal de depresión utilizado no mostró presencia de alteraciones del proceso de neurogenesis hipocampal adulta pero sí mostró neuroinflamación, evidenciada en un aumento de la densidad de astrocitos a nivel del hipocampo en comparación a los animales control. Este aumento no se observó en los animales tratados con secretoma intranasal, sugiriendo un efecto anti-inflamatorio del biofármaco. Adicionalmente, se observó que el secretoma derivado de MSC ejerció un efecto protector sobre los astrocitos inhibiendo el proceso de atrofia de sus prolongaciones.

Los datos pre-clínicos obtenidos sugieren que la administración intranasal de secretoma derivado de células madre mesenquimáticas representa un tratamiento potencialmente eficaz para reducir los síntomas de depresión en humanos y una posible alternativa terapéutica a los tratamientos actuales para esta devastadora patología.

ABSTRACT

Major depressive disorder is a heterogeneous, multifactorial disorder characterized by episodes of at least two weeks of duration, in which at least one of the two central symptoms occurs. These are: 1. Depressive mood with loss of interest in everyday activities and 2. Absence of the ability to feel pleasure (anhedonia). These symptoms bring with them mood, cognitive and physiological disorders and in the most severe cases, they can be associated with suicidal behaviors. Although at present the etiology of major depressive disorder is poorly understood, it has been reported that both the presence of neuroinflammation and the reduction of adult hippocampal neurogenesis are key events in the development of this pathology. Current therapies for major depressive disorder are not focused on these alterations, which could explain the high percentage of refractoriness to the treatment of patients with this pathology. For this reason, the use of mesenchymal stem cells (MSCs) has been proposed as a treatment option. These cells can produce paracrinely a wide variety of therapeutic molecules including anti-inflammatory molecules and neuroprotective factors, which can induce neurogenesis. These molecules secreted by MSCs can be recovered from the cell culture medium and together are called secretome. This work was based on the evaluation of the antidepressant potential of repeated intranasal administration of secretome derived from MSC in an animal model of major depressive disorder established in the bioterium of the Universidad del Desarrollo.

Overall, data obtained showed that intranasal treatment with secretome derived from MSC was able to reverse some of the behaviors associated with depressive states in animals, significantly decreasing the overall score of depression compared to animals treated with vehicle. At the structural level, the animal model of depression used did not show alterations in the process of adult hippocampal neurogenesis but it did show neuroinflammation, evidenced as an increase in astrocyte density at the level of the hippocampus compared to control animals. This increase was not observed in animals intranasally treated with secretome, suggesting an anti-inflammatory effect of the bio-drug. Additionally, it was observed that the secretome derived from MSC exerted a protective effect on astrocytes by inhibiting the process of atrophy of their prolongations.

The pre-clinical data obtained suggest that the intranasal administration of secretome derived from mesenchymal stem cells represents a potentially effective treatment for reducing depression symptoms in humans and a possible therapeutic alternative to current treatments for this devastating pathology.

1. INTRODUCCION

El trastorno depresivo mayor (TDM) es uno de los trastornos mentales más comunes e inhabilitantes¹. El estudio de carga global de enfermedades, lesiones y factores de riesgo (GBD) del 2019 muestra que los dos trastornos mentales más incapacitantes son el TDM y la ansiedad, ambos clasificados entre las 25 principales causas de carga en salud en todo el mundo². Después del 2019 y con el cambio de estilo de vida asociado a la pandemia de COVID-19, el TDM junto con la ansiedad aumentaron su prevalencia. Este aumento está asociado con el confinamiento impuesto para contrarrestar la propagación del virus, los cierres del comercio y zonas de recreación, disminución del transporte público y cierre de escuelas entre otras causas².

1.1 Definiendo depresión y su nivel de gravedad.

Las causas y los mecanismos fisiopatológicos subyacentes a la depresión no se comprenden completamente¹, pero es generalmente aceptado que esta patología es el resultado de la compleja interacción entre factores de riesgo genéticos, cognitivos, conductuales y ambientales que operan concertadamente^{1,3}. Los síntomas clínicos utilizados como criterio diagnóstico para el TDM, establecidos en el manual diagnóstico estadístico de desórdenes mentales DSM-5, son de carácter heterogéneo formando tres grandes grupos de

síntomas, estos son: afectivos, cognitivos y neurovegetativos^{1,4}. Dentro de esta gran variedad de síntomas y signos utilizados para el diagnóstico de este trastorno hay síntomas considerados centrales, como son el “estado de ánimo deprimido persistente” y la anhedonia que se define como la “pérdida de interés o placer en casi todas las actividades”. Mientras que la fatiga, los trastornos del sueño, la ansiedad, agitación y culpa, así como cambios en el apetito, peso corporal, actividad psicomotora y en la cognición se consideran síntomas asociados. Cuando no se tratan adecuadamente, estos síntomas pueden conducir a ideas suicidas y finalmente al suicidio^{5,6}.

El TDM se diagnostica clínicamente cuando el paciente presenta al menos dos semanas con uno o los dos síntomas centrales y/o con uno o varios de los síntomas asociados descritos anteriormente⁷ y se caracteriza por episodios depresivos recurrentes⁴. De manera práctica, se utiliza la caracterización de cada episodio depresivo y se hace mediante el uso de especificadores que definen las características clínicas de cada episodio de TDM⁴. Por ejemplo, un episodio de TDM puede tener características de angustia con ansiedad, características melancólicas, características psicóticas o características mixtas (síntomas maniacos e hipomaniacos). Esta clasificación por especificadores genera subtipos de depresión que en la práctica clínica ayudan a generar un mejor tratamiento de la patología⁴. A su vez, la gravedad del TDM se determina mediante una escala de clasificación de depresión denominada escala de Hamilton o HAM-D que permite generar un puntaje de depresión que engloba

todas las conductas depresivas. La reducción del puntaje en esta escala también se ocupa como criterio de remisión. Esta escala es la más ampliamente utilizada y el método de medición aceptado para evaluar efectos en los ensayos clínicos diseñados para probar la eficacia de fármacos antidepresivos⁸.

1.2 Etiología y fisiopatología de la depresión.

A pesar de que la etiología precisa de este desorden permanece poco comprendida^{9,10} y que el conocimiento preciso del mecanismo celular y molecular por el cual la depresión se desarrolla es incompleto^{11,12}, se ha ido progresando en su comprensión, siendo detectados como factores desencadenantes de la enfermedad el estrés y los eventos traumáticos de la vida¹¹.

En base a la información acumulada obtenida con el estudio de pacientes con la patología, se ha llegado a aceptar que un único mecanismo no puede explicar satisfactoriamente todos los aspectos de la fisiopatología de la enfermedad⁴, razón por la cual coexisten varias hipótesis sobre la fisiopatología de la depresión y se utilizan en el marco teórico de la investigación para el desarrollo de nuevas alternativas de tratamiento para el TDM¹³. A continuación, se detallan las hipótesis que actualmente se manejan.

1.2.1 Hipótesis del déficit de monoaminas.

Esta hipótesis postula que el TDM se origina por un déficit en la neurotransmisión de las monoaminas (serotonina, noradrenalina y dopamina) en regiones específicas del cerebro y es avalada por el hallazgo de que los antidepresivos tricíclicos como los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRI), inhibidores de la recaptación de la noradrenalina (SNRI) y los inhibidores de la monoamino oxidasa (MAOIs) (involucrada en la eliminación de estos neurotransmisores), incrementan los niveles de las monoaminas en el espacio extrasináptico, seguido con un retardo de semanas por la reducción de los síntomas de la depresión^{4,11}. Sin embargo, esta hipótesis falla en explicar por qué hay un retardo en el efecto de los fármacos sobre los síntomas depresivos mientras que la elevación de la concentración extracelular de los neurotransmisores ocurre en forma más rápida¹⁰.

1.2.2 Hipótesis de la reducción en la neurogénesis.

Esta hipótesis plantea que el estado depresivo depende de la reducción en la neurogénesis adulta. Se ha observado en modelos en roedores que esta reducción puede producirse por el estrés crónico y puede restablecerse, al menos en forma parcial con los fármacos antidepresivos, reduciendo así los síntomas conductuales¹⁴. La neurogénesis adulta en condiciones fisiológicas mantiene la estructura y función hipocampal y es promovida por algunos factores de crecimiento, entre ellos el factor neurotrópico derivado del cerebro (BDNF) que

promueve la neuroplasticidad¹⁵. La disminución de BDNF también está asociada al desarrollo de los síntomas de tipo depresivo en roedores, ya que estudios preclínicos muestran que varias formas de estrés reducen BDNF en el hipocampo, mientras que el tratamiento crónico con algunos tipos de antidepresivos incrementa su señalización revirtiendo el efecto del estrés^{15,16}. En suma, los hallazgos antes descritos llevan a plantear la hipótesis de que la depresión involucra la disminución de neurotrofinas y por ende la neuroplasticidad del cerebro adulto¹⁶. La disminución del volumen hipocampal y de otras regiones del cerebro anterior en un subconjunto de pacientes con TDM¹⁷ también apoya esta hipótesis.

1.2.3 Hipótesis de la neuroinflamación.

El vínculo entre neuroinflamación y TDM se evidencia por el hecho de que algunas patologías que crean una significativa inflamación del sistema nervioso central (SNC), como por ejemplo esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico e injuria cerebral están asociadas con alta prevalencia de depresión¹¹. Asimismo, los episodios de depresión en pacientes con TDM se caracterizan por un aumento de las citoquinas pro-inflamatorias tanto de forma central como periférica⁶. De hecho, los pacientes con TDM exhiben todas las características cardinales de una respuesta inflamatoria, incluido el aumento de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α e IL-1 β) y sus receptores, y el aumento de los niveles de las

proteínas de fase aguda (proteína C reactiva), quimioquinas y moléculas de adhesión solubles en sangre periférica⁶, iniciando una combinación de respuestas que incluyen hipertermia, náuseas, pérdida del apetito, alteraciones en el sueño, anhedonia, fatigabilidad y pérdida del interés en el entorno social y físico^{11,16}.

Estas citoquinas pro-inflamatorias en el SNC actúan sobre las neuronas, astrocitos y microglia¹⁸, pudiendo alterar la plasticidad sináptica¹⁹ y son responsables de algunos de los síntomas de comportamiento de tipo depresivo como son anorexia, aislamiento social y anhedonia²⁰. La microglia regula la producción de citoquinas y el proceso inflamatorio en el cerebro²¹. En condiciones fisiológicas estas células están involucradas en actividades neurotróficas como la sinaptogénesis, neurogénesis y la producción de factores neurotróficos²¹, pero si hay un estrés sostenido y un persistente estímulo pro-inflamatorio en el cerebro, las microglías responden cambiando a un fenotipo activo y secretando citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas y sustancias oxidantes que producen daño neuronal²¹. Así, estudios sugieren que estas citoquinas pro-inflamatorias aumentan la expresión del transportador de serotonina (SERT), reduciendo la disponibilidad de serotonina en el espacio sináptico²². Este hecho también afecta al hipocampo ya que se sabe que éste está altamente innervado con terminales nerviosas serotoninérgicas y por otro lado, la densidad de receptores para las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-2 es más alta en esta región cerebral²³. Por lo tanto, el aumento de citoquinas pro-inflamatorias en el

hipocampo tiene como resultado una importante reducción en los niveles de serotonina extracelular en esta área debido al aumento de la actividad de SERT, lo que provoca una atenuación de la señalización a través de los receptores serotoninérgicos pre y postsinápticos, junto con una disminución de la expresión del gen que codifica para BDNF, impactando en varios procesos de neuroplasticidad, que conducen a las alteraciones asociadas a la depresión²³. Estos fenómenos podrían dar cuenta del comportamiento depresivo y de los trastornos del estado de ánimo^{24,25}, en conjunto con la atrofia del hipocampo y de la corteza prefrontal comúnmente observada en pacientes con TDM²⁶.

Diferentes reportes han indicado que citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , TNF- α , IL-6 y PCR (proteína de respuesta de fase aguda) están significativamente aumentadas en el plasma de pacientes con TDM²⁷ en comparación a los niveles observados en controles sanos^{28,29} y que niveles periféricos de estos marcadores inflamatorios están directamente asociados con la severidad de la depresión¹⁸. Lo anterior se condice con los análisis post-mortem de tejido cerebral de pacientes con TDM que cometieron suicidio, en donde se observa un aumento de la activación de la microglia (marca positiva para marcador Iba-1)²⁹ en contacto con las paredes de los vasos sanguíneos en la sustancia blanca prefrontal dorsal³⁰ y una reducción de la densidad glial en áreas del cerebro asociadas con TDM, como son la corteza prefrontal y cingulada, amígdala e hipocampo³⁰.

1.3 Tratamiento actual para el TDM.

El tratamiento estándar del TDM es en la mayoría de los casos exclusivamente farmacológico¹⁰. Sin embargo, se ha reportado que luego de la monoterapia con un antidepresivo de primera línea la remisión ocurre aproximadamente en el 50% de los pacientes deprimidos que no recibieron tratamiento previo y sólo en un 28% de los casos cuando se analiza una combinación más heterogénea de pacientes⁶.

Los antidepresivos de primera línea son los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS, ejemplo fluoxetina). Los ISRS se utilizan actualmente como tratamientos de primera línea para la depresión debido a sus perfiles superiores de seguridad y tolerabilidad en comparación con los antidepresivos tricíclicos (ATC) e inhibidores de la enzima monoamina oxidasa (IMAO). Se ha postulado que los ISRS podrían también reducir los niveles de citoquinas pro-inflamatorias de manera indirecta en pacientes deprimidos, ya que al inhibir la recaptación de serotonina aumenta su concentración en el espacio extracelular y estos niveles relativamente altos pueden inhibir la secreción de dichas citoquinas³¹. Sin embargo, estos fármacos presentan algunos problemas como tener una baja efectividad, y la generación de efectos secundarios que son pobremente tolerados por algunos pacientes^{32,33} como ganancia de peso¹⁸, náuseas, insomnio o disfunción sexual que pueden comprometer la adherencia al tratamiento³³. Sumado a lo anterior, se requiere semanas de tratamiento antes

de que los síntomas centrales de la depresión (anhedonia, bajo estado de ánimo) muestren mejorías¹⁰.

Adicionalmente, se estima que entre el 30-50% de los pacientes con TDM son refractarios al tratamiento con antidepresivos de primera línea¹⁸, conllevando a un alto riesgo de suicidio, haciendo urgente que se incremente la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos¹⁸. Así, desde el descubrimiento de los ISRS y ISRN se han desarrollado varias estrategias para mejorar la eficacia y/o reducir el tiempo de inicio de su efecto terapéutico¹¹, que incluyen el aumento de la dosis, el cambio a otros medicamentos de la misma familia, la introducción de terapias combinadas, o el desarrollo de antidepresivos multiblancos³³. Desafortunadamente, la mayoría de estas estrategias no están bien establecidas y las terapias deben probarse en cada paciente en base a prueba y error³², esto es en parte debido al hecho de que el diagnóstico de depresión se basa únicamente en síntomas de comportamiento y no existen indicadores biológicos que ayuden a seleccionar medicamentos dirigidos a tratar las alteraciones patológicas subyacentes de la enfermedad que caracterizan a los subgrupos de pacientes²⁴.

Lo anterior avala la importancia y urgencia de generar investigación en busca de nuevos blancos terapéuticos y fármacos para el tratamiento del TDM. En esta dirección, recientemente se han desarrollado compuestos con blanco farmacológico en otros sistemas de transmisión como el sistema glutamatérgico, con el fin de encontrar agentes antidepresivos de acción rápida, representando

una nueva tendencia en el tratamiento de la depresión³³. Así, se ha descrito la esketamina, que corresponde al S-enantiómero de ketamina, un compuesto con alta afinidad por el receptor N-metil-D-Aspartato (NMDA), que puede ser administrado en forma de spray nasal, lo que optimiza el paso del fármaco al cerebro y permite administrarlo en dosis bajas³⁴. En un estudio clínico fase III realizado en pacientes con TDM resistente al tratamiento convencional y con alto riesgo de suicidio, la esketamina demostró una eficacia de inicio rápido (entre 24 a 48 horas) y persistente durante 28 días, administrando el fármaco dos veces por semana³⁴. El resultado de este ensayo permitió la aprobación del uso de esketamina por parte de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) para el tratamiento de la depresión refractaria³⁴. Sin embargo, este fármaco tiene efectos secundarios no menores que incluyen el abuso debido a su potencial adictivo, disociación, sedación y desarrollo de daños cognitivos^{35,36} junto con un aumento del riesgo de recaída en la ideación suicida³⁶. Sumado a lo anterior, su suspensión provoca una rápida recaída en el cuadro depresivo³⁴. Por este motivo aún sigue la urgencia por seguir pesquisando potenciales fármacos para el tratamiento del TDM.

1.4 Citoquinas y TDM.

Las citoquinas son un grupo de proteínas producidas a nivel periférico por células del sistema inmune como monocitos, macrófagos y linfocitos y en el SNC por

microglia y astrocitos²¹. Estas moléculas regulan la respuesta inmunitaria e inflamatoria y pueden tener tanto efectos pro-inflamatorios como anti-inflamatorios^{6,37}. Las citoquinas más estudiadas en el contexto de la psiconeuroinmunología son IL-6, TNF- α , IL-1 β y los interferones (IFN), las cuales tienen un efecto pro-inflamatorio y IL-10 que tiene un efecto anti-inflamatorio⁶.

Las citoquinas pro-inflamatorias inducen la liberación de factores inmunes humorales y la activación celular. Estos factores inician una comunicación bidireccional entre el sistema inmune periférico y el sistema inmune central²³, así, una inflamación que ocurra a nivel periférico puede inducir estados inflamatorios y aumento de las citoquinas pro-inflamatorias en el SNC³⁷, generando neuroinflamación¹¹. La relación entre inflamación periférica y la inflamación central se da además porque las citoquinas pro-inflamatorias periféricas pueden viajar a través de la barrera hematoencefálica (BBB),(como el plexo coroideo y los órganos circunventriculares)³⁸ o a través de vías de señalización aferentes como el nervio vago y una vez que llegan al SNC estimulan las neuronas, astrocitos y microglia⁴. Al estimular la microglía, estas producen la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), que posteriormente recluta monocitos hacia las meninges y el parénquima cerebral³⁸. Cuando el ambiente pro-inflamatorio supera la capacidad de las citoquinas anti-inflamatorias (por ejemplo IL-10) de contrarrestar esta señalización se establece un ambiente que favorece el desarrollo de las alteraciones fisiopatológicas que se han asociado con la depresión¹¹.

Se ha reportado que el impacto de las citoquinas pro-inflamatorias a nivel del SNC ocurre en varios niveles:

- Promueven el estrés oxidativo y daño en las células gliales en corteza prefrontal y amígdala (regiones relacionadas con las emociones)³⁹.
- Actúan a nivel de síntesis de neurotransmisores como la serotonina, ya que activan la enzima indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO) que degrada el triptófano, aminoácido precursor de la serotonina, agotando este neurotransmisor^{16,38}.
- Reducen la disponibilidad del cofactor tetrahidrobiopterina (BH4), esencial para la síntesis de todas las monoaminas^{16,38}.
- Aumentan la expresión y función de los transportadores de monoaminas, lo que potencia la recaptación de la serotonina que está disponible en el espacio sináptico, reduciendo sus niveles en este espacio y por lo tanto la señalización mediada por este neurotransmisor^{16,38}.
- Afecta la liberación de neurotransmisores. Los astrocitos no recaptan el glutamato, provocando excitotoxicidad^{16,38}. Este fenómeno se correlaciona con la anhedonia y la disminución de la velocidad psicomotora⁴⁰.
- Reducen los niveles de factores neurotróficos, en particular BDNF^{37,39}. Esto puede afectar la neurogénesis hipocampal adulta y reducir la

arborización del árbol dendrítico, lo que incide negativamente en el aprendizaje y la memoria⁴¹.

- Participan en la autoinmunidad contra receptores de la serotonina y acetilcolina^{16,38}.

1.5 Neurogénesis hipocampal adulta y TDM.

Neurogénesis hipocampal adulta se refiere al proceso de generación de nuevas neuronas y conexiones neuronales en el giro dentado (GD) del hipocampo (HP)¹¹ a partir de las células madre neuronales presentes en el cerebro adulto^{21,42}. Este fenómeno se ha demostrado en el hipocampo de humanos adultos, pero también en más de 30 especies de mamíferos⁴², siendo este un proceso esencial para la restauración de la estructura y función hipocampal¹¹.

En la neurogénesis, las nuevas neuronas derivan de las células madre neuronales (NSC) que residen en la zona subgranular (SGZ) del GD del HP⁴³. Normalmente las NSCs mantienen su actividad basal; se activan, proliferan y generan neuronas que migran a la zona granular produciendo las nuevas neuronas granulares⁴³, así nuevas neuronas son generadas continuamente en el HP⁴⁴. De manera general, la neurogénesis ocurre en tres eventos principales: i) salida de la quiescencia o activación de las NSCs: ii) proliferación de las NSCs,

diferenciación a linaje neuronal y sobrevivencia de las nuevas células generadas y iii) migración a la capa granular del GD⁴⁵.

Las NSCs son células multipotentes que se autorenewan y son denominadas células precursoras radiales similares a la glía (Radial glia-like (RGL)), clasificadas como células tipo 1^{44,45,46}. La neurogénesis se inicia con el primer evento que es la salida de la quiescencia, en el que las NSCs se activan, se dividen y expanden rápidamente generando un pool de células progenitoras intermedias denominadas células tipo 2a, que luego dan origen a las células tipo 2b⁴⁴. En este período que tiene una duración corta de entre 1 a 3 días, la mayoría de las células originadas son eliminadas⁴⁴. Las células que sobreviven pasan al segundo evento en el cual se diferencian a neuroblastos (células tipo 3) y prosiguen su crecimiento celular para pasar a ser neuronas inmaduras. Finalmente, el tercer evento ocurre simultáneamente con el segundo ya que a medida que van creciendo las neuronas inmaduras van migrando a la zona granular del GD, para convertirse por último en neuronas granulares maduras⁴⁴ **(Figura 1A)**. El proceso completo de neurogénesis toma de 6 a 8 semanas y las células durante sus fases de desarrollo son identificables por su morfología y por marcaje de proteínas específicas que expresan⁴⁴. Las células RGL expresan el factor de transcripción SOX2 y proteína fibrilar glial (GFAP). Las células tipo 2a mantienen la expresión de GFAP. Las células tipo 2b carecen de GFAP y expresan factores de transcripción Prox1 y NeuroD. Los neuroblastos expresan marcadores de linaje neuronal como doblecortina (DCX)⁴⁵. Cabe destacar que la

DCX se empieza a expresar en las células tipo 2b/3 hasta la fase postmitótica de formación de dendritas⁴⁶, para finalmente dejar de expresarse en la neurona madura^{44,46}. Finalmente, una vez que la neurona está madura expresa NeuN⁴⁷ (**Figura 1B**). Esta fase postmitótica dura aproximadamente tres semanas. La proteína DCX está asociada con la diferenciación neuronal y funcionalmente ayuda a la maduración, migración y sinaptogénesis⁴⁶.

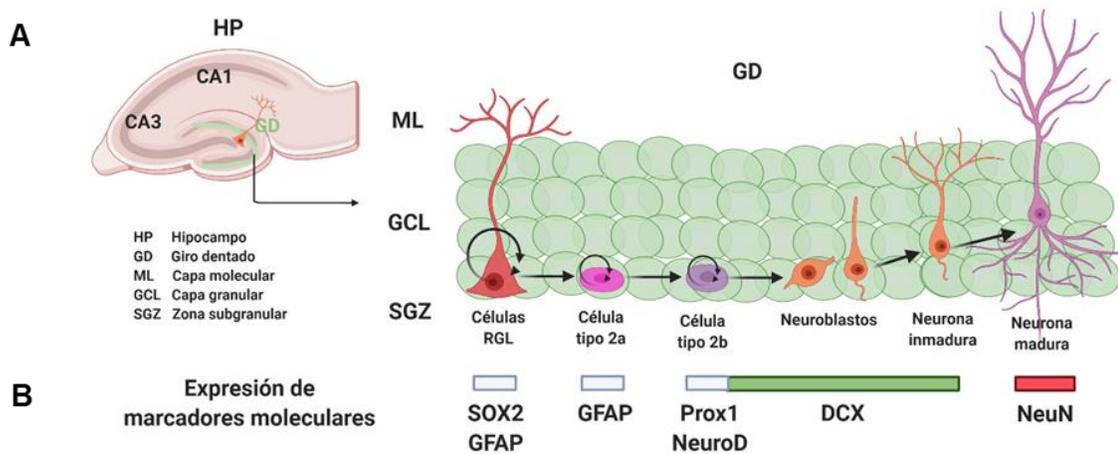


Figura 1. Esquema del proceso de neurogénesis hipocámpica adulta. A) Fases de la maduración neuronal. **B)** Esquema cronológico de la expresión de algunos marcadores moleculares de las células neuronales según su estado de diferenciación.

La supervivencia y el desarrollo de las neuronas en el SNC depende de una variedad de señales extracelulares entre las que se encuentran las neurotrofinas como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor de crecimiento nervioso (NGF). Estas neurotrofinas son importantes ya que participan en la proliferación celular, migración y diferenciación fenotípica,

plasticidad sináptica, integridad estructural de la neurona y en la neurogénesis^{48,49}. Son tan importantes que una reducción en los niveles de BDNF, como sucede en los pacientes con depresión, puede llevar a defectos en el mantenimiento y la regeneración neural, conllevando a las anomalías estructurales observadas en el cerebro como son la disminución de los volúmenes del HP y corteza prefrontal (PFC)^{48,49}.

Aunque los niveles de BDNF se encuentran bajos en pacientes con TDM, aún no está claro si la reducción de BDNF es suficiente para producir síntomas depresivos⁵⁰, pero se ha observado que una reducción de su expresión produce atrofia y apoptosis de las neuronas del HP y de la PFC y se asocia a la cronicidad del TDM y a la ausencia de respuesta a la terapia antidepresiva⁵¹.

1.6 Células madre mesenquimáticas (MSCs) y TDM.

Recientemente se ha propuesto que la inflamación periférica que conlleva al desarrollo de neuroinflamación podría explicar el alto porcentaje (30-50%) de falta de respuesta al tratamiento antidepresivo convencional^{24,6}, sugiriendo que las alteraciones asociadas a la neuroinflamación en el TDM podrían ser un buen blanco terapéutico. Una estrategia terapéutica interesante en este contexto involucra el uso de células madre. Dentro de los distintos tipos de células madre adultas, las células madre mesenquimáticas (MSC) se conocen como “guardianes de la inflamación”. Estas células madre pueden ser obtenidas de

diferentes tejidos incluyendo médula ósea, tejido adiposo y cordón umbilical y al ser preconditionadas con señales pro-inflamatorias, producen una gran variedad de moléculas anti-inflamatorias, por lo que han sido propuestas como una nueva alternativa terapéutica para el tratamiento de patologías asociadas a neuroinflamación, entre ellas la depresión^{52,53}.

Las MSC tienen una potente actividad inmunomoduladora y secretan altos niveles de factores neurotróficos, que incluyen BDNF y NGF. Teniendo en cuenta este aspecto, Tfilin M. y cols aislaron MSC procedentes de médula ósea, las marcaron y las trasplantaron directamente por inyección intracerebroventricular derecha en un modelo genético de depresión (ratas Flinders). Esta administración mejoró el desempeño conductual de los animales en pruebas conductuales comúnmente usadas para evaluar fenotipo depresivo. Los investigadores observaron migración de las MSC hacia el GD de los animales con TDM, fenómeno que se asoció a un aumento de la neurogénesis en estos animales⁵⁴, generando resultados auspiciosos en relación al potencial uso de las MSC en el tratamiento del TDM.

Posteriormente, con el objetivo de aumentar la sobrevivencia de la célula madre, Kin K y cols encapsularon las MSC y las trasplantaron directamente en el GD. Estos investigadores corroboraron el aumento de la neurogénesis reportado por Tfilin y además demostraron la secreción de factores de crecimiento neuronal como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y BDNF entre otros⁵⁵. Si bien, estos estudios han permitido generar la prueba de concepto de que las

MSC podrían revertir el desarrollo de síntomas depresivos en modelos preclínicos, la vía de administración utilizada es muy invasiva y potencialmente riesgosa, lo que limita fuertemente su traslación a la práctica clínica.

Una alternativa para superar esta limitante sería no administrar las células directamente, sino en su lugar administrar las moléculas que ellas secretan de forma paracrina, ya que se ha reportado que el efecto terapéutico de estas células se debe principalmente al amplio repertorio de factores tróficos y citoquinas secretadas, las que exhiben diversas funciones como actividad anti-inflamatoria, proangiogénica, antiapoptótica y neuroprotectora entre otras⁵⁶. Estas moléculas secretadas por las MSC pueden obtenerse cuando las células son cultivadas *in vitro* y en su conjunto reciben el nombre de secretoma. Dado el pequeño tamaño de las moléculas en comparación a las células vivas, el secretoma puede ser administrado no invasivamente de forma intranasal para llegar eficientemente al cerebro⁵², haciendo más sencilla y segura una posible terapia antidepresiva.

Por lo anterior, en esta tesis propusimos evaluar si el secretoma derivado de MSC preconditionadas *in vitro* en condiciones pro-inflamatorias, al ser administrado de manera intranasal en un modelo preclínico de depresión en ratas, revierte las características similares a la depresión instauradas en estos animales. Dado el potente efecto anti-inflamatorio y neuroprotector del secretoma⁵², esperamos observar un potente efecto terapéutico luego de su administración, revirtiendo el déficit de estas moléculas en el cerebro de los

animales deprimidos y previniendo el daño neuronal en regiones específicas del cerebro asociadas a depresión²⁷.

1.7 Modelos animales utilizados para el estudio del TDM.

Parte importante del avance en la comprensión de la fisiopatología de esta enfermedad se debe al desarrollo de un número creciente de modelos animales en los cuales se inducen cambios de comportamiento calificados como “síntomas depresivos”³⁰, alteraciones morfológicas y alteraciones moleculares características de la enfermedad en respuesta a la exposición de los animales a estresores físicos y/o psicológicos de manera aguda o crónica. Por ejemplo, en algunos modelos animales se ha mostrado que situaciones estresantes por un largo periodo de tiempo reducen el tamaño del hipocampo, un área del cerebro con un papel central en la formación de memorias e involucrada en la regulación del estado de ánimo⁵⁷. Existe una fuerte relación entre estrés y el desarrollo de síntomas depresivos ampliamente documentada en humanos que ha sido la piedra angular para el desarrollo de estos modelos animales de depresión, los cuales son vitales para estudiar esta patología como también para investigar el potencial antidepressivo de nuevos fármacos⁵⁷. Existe un gran número de modelos animales, varios de estos se basan en el estrés crónico que puede ser pre-natal, peri-natal o inducirse en adultos. Además hay modelos basados en otros factores asociados a la depresión como son la infección e inflamación, dieta alta en

grasas, administración de drogas de abuso como alcohol o nicotina y eliminación quirúrgica del bulbo olfatorio entre otras⁵⁷. A continuación, se describen algunos de los modelos animales de TDM más utilizados:

1.7.1 Desesperanza o impotencia aprendida (LH).

En este paradigma, los animales están expuestos de forma subcrónica a eventos estresantes incontrolables para el animal, como aplicación de corriente eléctrica en la cola o patas. Posteriormente, se reintroducen a los animales en el mismo entorno, pero ahora con la posibilidad de escapar del evento estresante. La falla para escapar de este evento negativo se califica como conducta de "impotencia" e indica un fenotipo depresivo. En este modelo, los animales susceptibles muestran un aumento en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α ³⁰. Sin embargo, este modelo tiene la desventaja de tener una baja validez predictiva ya que se ha reportado que tanto la administración de fármacos con potencial antidepresivo como fármacos sin potencial antidepresivo pueden revertir el comportamiento (modelo sensible pero no específico), adicionalmente solo el 10-50% de los animales muestran este comportamiento⁵⁸ y las hembras aprenden a escapar del estresor con mayor facilidad que los machos, por lo que muchas de ellas no desarrollan el comportamiento esperado^{30,24}.

1.7.2 Estrés de restricción o inmovilización repetida.

En este paradigma el libre movimiento del animal es restringido colocándolo en un tubo de acrílico o impedido completamente usando una bolsa plástica inmovilizadora. Esta situación reduce la percepción de control conductual induciendo estrés psicológico. Los animales son sometidos a este estrés durante 1-6 horas al día durante 21 días consecutivos, por lo que constituye un modelo de estrés crónico²⁴. Utilizando este paradigma, los animales desarrollan un comportamiento tipo depresivo; sin embargo, tiene la desventaja del acostumbamiento del animal al estresor y posterior desarrollo de insensibilidad del animal al estrés²⁴.

1.7.3 Comportamiento depresivo inducido por administración de lipopolisacárido (LPS).

En este modelo los animales no son sometidos a estrés, sino que el modelo se basa en imitar la conducta de malestar o enfermedad en la cual se reducen las conductas motivadas y capacidad hedónica de los animales durante un proceso infeccioso. Este modelo es interesante para estudiar la relación entre el sistema inmune y los trastornos del ánimo, pero al no involucrar estrés crónico la validez del mecanismo inductor es menor que en otros modelos ya que es menos comparable con lo que ocurre en pacientes deprimidos. Además el

modelo presenta otras limitantes como la resolución rápida de los síntomas (24 horas), sumado al hecho de que la administración sistémica de LPS ocasionalmente produce tolerancia e induce hiperalgesia global, lo que disminuye la sensibilidad de este paradigma³⁰.

1.7.4 Estrés crónico moderado impredecible (chronic unpredictable mild stress, CUMS).

En este paradigma, los roedores reciben un grupo de diferentes estresores aplicados en una secuencia aleatoria con el objetivo de prevenir que el animal anticipe el estresor que va a recibir, evitando así el acostumbramiento y haciendo más efectivo el estrés. El protocolo induce un estado depresivo comparable a las características del TDM como son la disminución en la sensibilidad a la recompensa y el desarrollo de anhedonia^{59,60}.

Dentro de los modelos animales de TDM inducidos por estrés y anteriormente expuestos, la literatura sugiere que el modelo CUMS es un modelo que tiene alta sensibilidad (capaz de predecir fármacos con potencial antidepresivo) y especificidad (si el fármaco no tiene efecto antidepresivo la conducta similar a la depresión no se revierte)⁵⁸. Sin embargo, este modelo también tiene algunas desventajas como son: i) baja reproducibilidad entre laboratorios para evaluar anhedonia (síntoma central del TDM) con un solo test, desventaja que se puede superar incluyendo más de un test que evalúe el estado

hedónico⁵⁸ y ii) hay heterogeneidad entre la misma cepa de ratas en cuanto a la susceptibilidad y respuesta al estrés⁶¹, ya que se estima que hay un 30% de ratas que son resilientes⁶¹, lo que puede resolverse aumentando el número de animales a utilizar. Aun así, este modelo es el más aceptado y ampliamente usado debido a que la combinación de estresores físicos y psicológicos a los que se exponen los roedores imitan el estrés multifactorial que enfrentan los seres humanos, lo que hace a este modelo un modelo más natural que los otros modelos disponibles²² y ampliamente validado para identificar nuevos blancos terapéuticos⁵⁹, ya que: i) se desarrolla bajo situaciones de estrés constante, situación que se parece al desarrollo de la depresión en el humano (validez etiológica), ii) posee similitud en el fenotipo conductual y síntomas clínicos (validez facial), iii) presenta atenuación de los síntomas en el caso de testeo de un fármaco con potencial antidepresivo, y no se ve afectado si el fármaco es ineficaz (validez predictiva) y iv) posee bases neurobiológicas similares (validez de constructo)^{57,61}. Razón por la cual en esta investigación seleccionamos este modelo para evaluar el potencial antidepresivo del secretoma derivado de MSC precondicionadas.

2. HIPÓTESIS

La administración intranasal de secretoma derivado de células madre mesenquimáticas precondicionadas revierte las características similares a la depresión inducidas por estrés moderado crónico impredecible en ratas asociado a la reducción de la neuroinflamación y aumento de la neurogénesis.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la administración intranasal de secretoma derivado de células madre mesenquimáticas precondicionadas, en la reversión de la sintomatología depresiva y su asociación con la reducción de neuroinflamación y aumento de la neurogénesis hipocampal adulta en ratas sometidas a estrés moderado crónico impredecible (CUMS), en comparación al grupo control sin estrés.

3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Establecer un modelo de depresión inducido por estrés moderado crónico impredecible (CUMS) en ratas.
2. Evaluar y comparar conductas y fenotipo depresivo en ratas sometidas a CUMS con y sin administración intranasal de secretoma derivado de MSC precondicionadas.
3. Evaluar y comparar inflamación local (corteza prefrontal e hipocampo) en ratas sometidas a CUMS con y sin administración intranasal de secretoma derivado de MSC precondicionadas.
4. Evaluar y comparar neurogénesis hipocampal adulta en ratas sometidas a CUMS con y sin administración intranasal de secretoma derivado de MSC precondicionadas.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Establecimiento del modelo de depresión inducido por estrés moderado crónico e impredecible (CUMS) en ratas.

4.1.1 Animales.

Las ratas albinas Sprague-Dawley (SD) son animales tranquilos, fáciles de manipular y de entrenar, por lo que han sido ampliamente utilizadas en el contexto de paradigmas conductuales, incluyendo modelos de estrés crónico por restricción y de estrés crónico impredecible⁶².

Para el desarrollo del modelo de depresión inducido por estrés moderado crónico impredecible se utilizaron 20 ratas macho Sprague-Dawley de 4 a 5 semanas de edad, con peso promedio de 90 ± 5 gr, adquiridas del Bioterio de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Se realizó un periodo de adaptación de 14 días antes de iniciar el protocolo CUMS establecido. Durante este periodo se manipularon los animales diariamente, para disminuir el estrés por manipulación, acostumbrándolas al olor y la presencia de los investigadores y al contacto con ellos.

Todos los procedimientos animales y su uso fueron evaluados, aprobados y supervisados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de

Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina de la Universidad del Desarrollo, número de acta de aprobación 04-2019, código del proyecto DCIM-2019-01.

4.1.2 Alojamiento de los animales.

A la llegada de los animales al bioterio de la Facultad de Medicina-Universidad del Desarrollo, estos se alojaron en jaulas conforme a la guía para cuidado y uso de animales de Laboratorio NRC 2010. Los animales se mantuvieron en condiciones estándar ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60% humedad relativa), ciclo luz/oscuridad 12h/12h, con dieta estándar para ratas de laboratorio y agua potable autoclavada a libre disposición. Al inicio del experimento, sólo los animales que conformaron el grupo control (sin estrés) se alojaron en grupos de dos, con enriquecimiento ambiental compuesto de conos de cartón, papel picado y cilindros rojos de plexiglás. Las ratas que conformaron el grupo CUMS, se alojaron de forma individual y sin enriquecimiento ambiental.

4.1.3 Batería de estresores aplicados para inducir depresión.

En esta investigación preferimos el desarrollo del modelo preclínico basado en aplicación de estresores, por tener una mayor validez patogénica, que corresponde a las interacciones que determinan la vulnerabilidad y las que

gatillan un trastorno⁶³. Esto dado a que, para el caso de los pacientes, el estrés continuo y crónico se describe como un factor clave que contribuye a gatillar la enfermedad, así como a agravar o prolongar sus síntomas¹¹. El modelo de CUMS utilizado consistió en aplicar un estresor o una combinación de dos estresores, de manera aleatoria, continua, ininterrumpida, crónica e impredecible por varias semanas, logrando que las ratas desarrollen síntomas similares a la depresión en humanos. Para escoger un set de estresores dentro del panel de los estresores descritos en la literatura, nuestros criterios fueron: (i) que sean de fácil ejecución; (ii) que hayan sido ampliamente reportados en la literatura y (iii) que se adecuaran a la infraestructura del bioterio de la Facultad de Medicina-Universidad del Desarrollo. Los estresores escogidos fueron: (a) restricción de agua y comida durante 22 horas; (b) jaula inclinada en un ángulo de 30° con viruta mojada por 22 horas; (c) restricción de movimiento por 2.5 horas; (d) restricción de movimiento por 2.5 h combinado con luz estroboscópica por 2 horas; (e) amontonamiento social (8 ratas dentro de una sola jaula) por 22 horas y (f) amontonamiento social combinado con luz estroboscópica por 7 horas (**Figura 2**).



Figura 2. Panel de estresores utilizados en el procedimiento piloto CUMS para inducir un estado similar a la depresión en humanos.

4.1.4 Pruebas para evaluar conducta tipo depresiva.

Dentro de las pruebas conductuales más utilizadas para el testeo de fármacos con potencial antidepresivo, seleccionamos la prueba de preferencia a la sacarosa por ser considerada la prueba de referencia para evaluar conducta tipo depresiva en roedores, junto con pruebas complementarias que permitieran evaluar otros aspectos conductuales asociados a la depresión y que pudiésemos realizar y adaptar a la infraestructura del bioterio. Para asegurarnos de la inducción de conductas similares a la depresión en las ratas, realizamos la batería de pruebas conductuales antes del inicio de los estresores (semana cero,

conducta basal) y al terminar el protocolo CUMS de ocho semanas. Las pruebas de comportamiento se grabaron para su posterior análisis.

4.1.4.1 Pruebas para evaluar cambios en el comportamiento hedónico

El hedonismo o la capacidad de experimentar placer en respuesta a estímulos que son refuerzos naturales o condicionados, es un elemento clave en guiar la conducta hacia la obtención de tales estímulos. La reducción en la intensidad relativa de la experiencia de placer frente a estos estímulos o la incapacidad de experimentarlo se denomina anhedonia, y puede ser evaluado en animales por la reducción en conductas determinadas de forma puramente hedónica. La capacidad hedónica de los animales se evaluó mediante la prueba de preferencia a la sacarosa (SPT) y prueba de olfateo de orina de hembra receptiva (female urine sniffing test, FUST).

4.1.4.1.1 Prueba de preferencia a la sacarosa (sucrose preference test SPT).

Esta prueba evalúa el estado hedónico del animal, en este caso la capacidad de experimentar placer ante el consumo de sustancias azucaradas ya que las ratas las prefieren por sobre el agua. La prueba se realizó semanalmente, el mismo día de la semana (lunes) y a la misma hora (8:15 am). Para ello se alojaron las ratas individualmente en la jaula. Una hora antes del inicio de la prueba se les retiró el agua. Se les colocó dos botellas de vidrio previamente

pesadas: una conteniendo agua autoclavada y la otra conteniendo una solución de sacarosa al 1% (Merck) disuelta en agua autoclavada. Media hora después de colocadas las dos botellas, se intercambiaron de lugar para evitar sesgos en la preferencia de lugar. Se registró el peso de las dos botellas una hora después de haber sido colocadas. La preferencia a la sacarosa se calculó como el porcentaje del líquido total consumido atribuido a la solución de 1% de sacarosa, de acuerdo con la siguiente ecuación⁶⁴:

$$\text{SPT\%} = \frac{\text{solución de sacarosa (g)}}{\text{solución de sacarosa [g] + agua [g]}} \times 100.$$

4.1.4.1.2 Test de olfateo de orina de hembra receptiva (female urine sniffing test, FUST).

Esta prueba evalúa la conducta hedónica relacionada con la motivación sexual o el comportamiento de búsqueda de recompensa sexual o anticipación del placer sexual (hedonismo) en roedores⁶⁵. La conducta se ve reflejada por la exploración del olor de la orina de una hembra sexualmente receptiva. Una hora antes de la prueba, a las ratas se les colocó un aplicador de algodón estéril en la tapa de su jaula, doblado en un extremo y sostenido con una cinta adhesiva transparente para habituar al animal a este objeto extraño. Pasado una hora se inició el procedimiento que constó de tres fases: i) exposición de la rata al aplicador de algodón impregnado con agua destilada estéril durante 3 minutos;

ii) 45 minutos sin exposición al aplicador de algodón; iii) exposición de la rata al aplicador de algodón impregnado con una mezcla de orina fresca de ratas hembra en la fase estro del ciclo estral, durante 3 minutos. Se contabilizó el tiempo total en segundos que duró la interacción con el aplicador de algodón, es decir, el tiempo que el animal pasa oliendo o mordiendo el algodón impregnado con la orina como se ha descrito previamente⁶⁵. Adicionalmente se evaluó el tiempo transcurrido entre la exposición al aplicador de algodón y el inicio de la interacción (tiempo de latencia).

4.1.4.2 Cambios en el comportamiento asociados con alteraciones en la regulación emocional

La ansiedad es un estado de alerta inducido sin la presencia de un estímulo externo, el cual puede manifestarse con conductas de miedo o escape exageradas. La ansiedad puede evaluarse en roedores en pruebas de campo abierto, esta induce en los roedores un aumento en las conductas de miedo (freezing) y de escape como evitar estar expuestos en el centro de la arena y desplazarse por ella cerca de las paredes (thigmotaxis).

4.1.4.2.1 Prueba de campo abierto (Open field test OF).

La prueba de OF se realizó de manera individual en un campo de madera de color negro, de 100x100x35 cm, bajo una luz directa tenue de 60-70 lux sobre el campo. La rata se colocó en el centro del aparato y se dejó deambular libremente durante 5 minutos⁶⁶. Se calcularon los parámetros de distancia total recorrida (en metros), tiempo en el centro (cuanto tiempo estuvo en centro del aparato) y thigmotaxis (cuantos metros recorrió cercano a las paredes del aparato). usando el software Any-maze 6.35 video tracking system Stoelting Co.

4.1.4.3 Cambios en el comportamiento relacionados con la función ejecutiva

Una de las posibles alteraciones en los pacientes deprimidos es la apatía, que consiste en la disminución o pérdida de interés por las actividades cotidianas como el autocuidado y el aseo personal⁶⁶. De manera comparable el acicalamiento en roedores es sensible al estrés, la microestructura del acicalamiento es un comportamiento complejo y etológicamente rico⁶⁷, lo que permite observar cambios en la calidad de esta conducta cuando se analiza en detalle. Este análisis observacional de la actividad y patrón de acicalamiento es muy útil para medir ansiedad y los efectos del estrés. Así por ejemplo, en situaciones de bajo estrés el acicalamiento ocurre espontáneamente de manera ininterrumpida siguiendo un patrón cefalocaudal. Sin embargo, bajo situaciones de estrés este se caracteriza por frecuentes episodios interrumpidos, caóticos y sin completar su patrón de secuencia⁶⁷. También puede aumentar la latencia del

animal para limpiarse cuando se ensucia el pelaje y haber una disminución del tiempo que emplea la rata en limpiar su pelaje⁶⁷. Todo lo anterior conlleva a que con el tiempo haya una reducción en la calidad del pelaje viéndose desordenado y/o sucio.

4.1.4.3.1 Prueba de rociado de solución azucarada (Sucrose Splash Test SST).

Esta prueba evalúa la reducción en la conducta de limpieza o grooming en los animales sometidos a CUMS. Este es un test conductual farmacológicamente validado y mínimamente invasivo que consiste en rociar sobre el pelaje dorsal del animal sacarosa al 10%⁶⁶. La sacarosa ensucia el pelaje e induce el comportamiento de aseo en el animal. La prueba se realizó bajo luz roja de 15W. Se calculó el porcentaje de tiempo empleado en la limpieza y el número de intentos para realizar la limpieza de su pelaje.

4.1.4.3.2 Evaluación del estado del pelaje (Status of coat SC).

Esta prueba se relaciona con la calidad de la conducta de acicalamiento del animal. De manera cuantitativa se evaluaron 8 partes corporales de la rata que incluyen cabeza, cuello, capa dorsal, cola, extremidades anteriores, extremidades posteriores, capa ventral y región genital. La puntuación se obtuvo

al dar un valor de cero a una capa limpia y ordenada o de uno a una capa sucia y/o desordenada en cada una de las 8 partes evaluadas⁶⁶. La evaluación del pelaje se hizo bajo una lámpara de luz blanca, por una persona diferente al manipulador, en ciego y en cada parte corporal se observó si en esa área el pelaje tenía manchas rojizas, suciedad y/o con restos de materia fecal, evaluando la ausencia de estas características en la zona con un 0 y su presencia con un 1. Para obtener el puntaje del estado del pelaje a cada rata, se sumaron los puntajes de cada área evaluada y este único resultado es el puntaje que se registró. El puntaje total mínimo de cero es obtenido por ratas en perfecto estado de acicalamiento y limpieza, mientras que un puntaje de 8 indica que la rata tiene el peor estado de acicalamiento y limpieza posible.

4.1.5 Cálculo del tamaño muestral.

Para el experimento donde se estableció el modelo de depresión (objetivo 1), el cálculo del tamaño muestral se basó en la prueba de preferencia a la sacarosa (SPT), ya que esta prueba se toma como indicador de anhedonia, síntoma central de la depresión en humanos y en modelos preclínicos. La preferencia por la sacarosa del grupo control fue estimada en un rango de 85%-95% y la de los animales sometidos a CUMS en un rango de 65%-75% con una desviación estándar de 10%, valores basados en los descritos en la literatura⁶⁸.

³¹. Utilizando el programa G*power 3.1.92 se calculó que el tamaño de la muestra

por grupo es de 7 ratas con un poder de 95% y un α de 0.05. Dado que se ha reportado heterogeneidad entre la misma cepa de ratas en la susceptibilidad al estrés, se consideró que hay un 30% de ratas que son resilientes⁶¹. Con este antecedente, se recalculó el tamaño de la muestra, obteniéndose un $n= 10$ ratas por grupo experimental. Dado que desconocíamos el porcentaje de resiliencia a la depresión en los animales, ya que este porcentaje es variable y dependiente de las condiciones específicas en las que se establece el protocolo quisimos asegurar un n muestral suficiente para hacer los cálculos estadísticos, por lo cual, decidimos aumentar a 12 el n muestral del grupo CUMS.

El cálculo del tamaño muestral para la determinación de la posible acción antidepresiva del secretoma (objetivo 2), también se hizo con el programa G*power 3.1.92., no usando una estimación sino los valores del rango de los resultados obtenidos en la prueba de preferencia por la sacarosa en los grupos control y CUMS obtenidos en nuestro estudio piloto. Así, el rango de los resultados obtenidos en el estudio piloto para la preferencia a la sacarosa en el grupo control fue de 83%- 93% y en el grupo CUMS de 66%-76%, colocamos una desviación estándar del 10%, para una prueba estadística de Anova de una vía, seleccionamos la familia F test, con el tipo de cálculo a priori, con la probabilidad de error tipo uno de 0.05, y una potencia (error tipo B) de 80% o 0.8, número de grupos 3 (control, vehículo y secretoma) y un tamaño del efecto grande. Este efecto también fue tomado de las diferencias previamente vistas en la prueba de preferencia a la sacarosa, en el estudio piloto. Con estas variables, el tamaño de

la muestra por grupo fue de 15 ratas y considerando un 30% de resiliencia el número de ratas por grupo subió a 20, para un total de 60 ratas. El número de ratas en total para este experimento sobrepasaba la capacidad de jaulas en las salas de mantenimiento de los animales, como también del manejo de un solo manipulador, por lo que se decidió dividir el experimento en 2 grupos de 30 animales.

4.1.6 Puntaje diseñado para evaluar conducta depresiva (score).

El TDM es una enfermedad compleja caracterizada por la presencia de varias alteraciones conductuales que incluyen síntomas emocionales, neurocognitivos y neurovegetativos⁴. En humanos la evaluación de la severidad del estado depresivo considera la desviación de la normalidad en una serie de parámetros, de acuerdo al manual DSM-5. De forma homóloga, propusimos la generación de una puntuación global para evaluar el efecto del protocolo CUMS en cada animal. Esta puntuación permitió identificar las ratas afectadas de las no afectadas o resilientes y también permitió, al igual que pasa en los humanos, observar que la magnitud y características de la respuesta al estrés en cada animal, bajo una misma situación, es heterogénea^{69,70}. Por esto, elaboramos un puntaje o score al cual pondera cada prueba de comportamiento. Para la generación de esta puntuación seleccionamos aquellas pruebas conductuales mayormente utilizadas en la evaluación del potencial terapéutico de los fármacos

antidepresivos que representan síntomas similares a la depresión como anhedonia (SPT%), apatía (SC y SST), ansiedad (tiempo en el centro y thigmotaxis), locomoción (distancia total recorrida) con la prueba de campo abierto (OF). Luego de estandarizar los resultados por prueba se sumaron los puntajes, generando una escala de valoración, que corresponde a una apreciación general de cuan desplazado del perfil normal se encuentra el espectro de conductas evaluadas.

Para su elaboración tomamos el criterio de comportamiento descrito por Ziv Ardi y cols⁷¹, en el cual se determinó un punto de corte o CUT-OFF a partir del grupo control para distinguir individuos afectados y no afectados. Los resultados de la media ± 1 desviación estándar de los comportamientos evaluados, indican la distribución de los valores en el contexto de los que tendría la “población normal”. La escala de valoración se hizo de 0 a 4, donde cero representa los valores que están dentro del promedio \pm una desviación estándar, (población normal) o animales sin cambio de conducta y cuatro el máximo cambio de conducta en respuesta al estrés. De esta forma, un score de 0 corresponde a promedio ± 1 D.S; 1 corresponde a promedio ± 2 D.S, 2 corresponde a promedio ± 3 D.S, 3 corresponde a promedio ± 4 D.S y 4 corresponde a promedio $+ > 4$ D.S. Se analizaron las conductas del grupo control para realizar el puntaje de %SPT, OF distancia total recorrida, OF índice de thigmotaxis (%), SC y SST. Este mismo procedimiento de generación de score, se replicó para determinar los nuevos intervalos de desviaciones estándar (uno a cuatro) y así generar el

puntaje por prueba y a partir de la suma de estos se obtuvo el puntaje global de depresión por rata. El cual nos permitió comparar los tres grupos experimentales: ratas sin estrés, ratas con estrés tratadas con vehiculo y ratas con estrés tratadas con secretoma.

4.1.7 Diseño experimental

Para el desarrollo del modelo de depresión inducido por estrés moderado crónico impredecible se conformaron dos grupos de ratas: control y CUMS con n=20. Los animales fueron sometidos a 14 días de adaptación y acostumbamiento a la manipulación, al pesaje y exposición a la solución azucarada de sacarosa al 1%, esto para evitar el sesgo de la neofobia al inicio del protocolo de estrés. Los días 9, 10 y 11 de estos 14 días de adaptación se les hizo las pruebas conductuales, para poder tener una línea base inicial de comportamiento individual. En adelante el día 15 desde su llegada será denominado el día cero, de la semana cero, este día marca el día de inicio del protocolo CUMS. En este día los animales fueron pesados y se les hizo prueba de preferencia a la sacarosa. El promedio de peso de todas las ratas en el día cero fue de 290g \pm 10. Se calculó la preferencia a la sacarosa. Con estos dos datos, se separaron los animales de manera balanceada en dos grupos conformados por ocho ratas para el grupo control y 12 ratas para el grupo CUMS (Tabla Suplementaria 1). Los animales de este último grupo se sometieron

durante 8 semanas, sin interrupción y de manera aleatoria e impredecible a uno de los seis estresores descritos anteriormente (Tabla Suplementaria 2). Semanalmente se hizo pesaje corporal y prueba de preferencia a la sacarosa. Cumplidas las ocho semanas de CUMS se hicieron nuevamente la batería de pruebas conductuales y luego se procedió a la eutanasia de los animales (**Figura 3**).

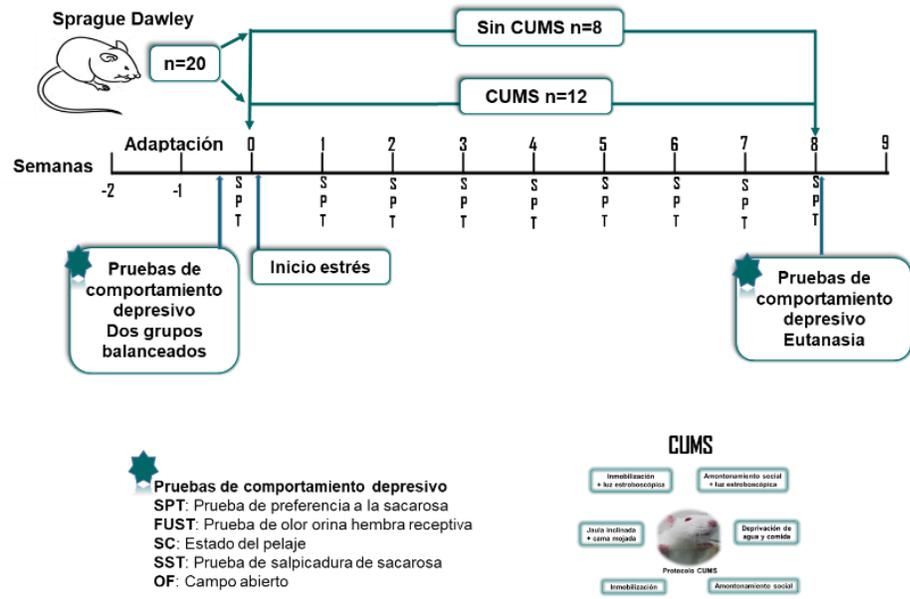


Figura 3. Diseño experimental del estudio piloto CUMS

4.2 Evaluar y comparar conductas y fenotipo depresivo en ratas sometidas a CUMS con y sin administración intranasal de secretoma.

4.2.1 Producción y administración intranasal de secretoma derivado de células madre mesenquimáticas precondicionadas.

4.2.1.1 Aislamiento y expansión de células madre mesenquimáticas derivadas de tejido adiposo humano (hAD-MSCs).

Las hAD-MSCs fueron aisladas de muestras de tejido adiposo subcutáneo fresco, de la región abdominal, obtenido mediante liposucción cosmética en la Clínica Alemana de Santiago, previa firma de consentimiento informado. Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina Clínica Alemana-Universidad del Desarrollo.

Obtenida la muestra, se procesaron alícuotas de 200 ml de grasa. Para ello el tejido adiposo se cortó en trozos pequeños con tijera y se lavó dos veces con un volumen equivalente de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se incubó la muestra con 3 mg/ml de colagenasa tipo II (Gibco, Grand Island, NY) en PBS, durante 30 minutos a 37°C y agitación constante para permitir la degradación de la matriz extracelular del tejido. Se agregó un volumen de suero fetal bovino (FBS) al 10% (Gibco, Auckland, NZ) para neutralizar la colagenasa. La mezcla se centrifugó a 400 g durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. El sedimento celular se resuspendió en medio esencial mínimo (α -MEM) (Gibco, Auckland, NZ) suplementado con FBS al 10% y 0,16 mg/ml de gentamicina (Laboratorio Sanderson, Santiago, Chile). Se contaron las células, se sembraron

en placas T-175 (Falcon) a una densidad de 7000 células/cm² y se cultivaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. Cuando las células alcanzaron el 90% de confluencia, se despegaron con tripsina al 0,25%, EDTA 2,65 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), se centrifugaron a 400g durante 10 minutos y se subcultivaron dos veces sembrando en cada oportunidad una densidad de 7000 células/cm².

4.2.1.2 Caracterización de las hAD-MSCs.

Después de dos subcultivos, las células se caracterizaron en base a los criterios mínimos establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT)⁷² que incluye: (a) adherencia al plástico; (b) potencial de diferenciación adipogénico y osteogénico y (c) presencia de marcadores de superficie putativos de MSC y ausencia de marcadores de superficie característicos de otros linajes celulares. Para evaluar el potencial de diferenciación de las MSC las células se incubaron con medios de diferenciación adipogénico compuesto por α -MEM suplementado con FBS al 10%, dexametasona 1 μ M (Sigma-Aldrich) y rosiglitazona 10 μ M (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI) durante 15 días o medios de diferenciación osteogénico compuestos por α -MEM suplementado con FBS al 10%, dexametasona 0,1 μ M (Sigma-Aldrich), ascorbato-2-fosfato 50 μ g/ml (Sigma-Aldrich) y beta-glicerol fosfato 10 mM (Sigma-Aldrich) durante 21 días. En ambos casos, el medio conteniendo los estímulos de diferenciación se reemplazó

cada tres días. Para evaluar diferenciación adipogénica, los cultivos se tiñeron con Oil Red-O (Sigma-Aldrich). Para evaluar diferenciación osteogénica, los cultivos fueron fijados con 10% de etanol y teñido con Rojo-S Alizarin (Sigma-Aldrich) como se describió previamente⁷³. Un grupo de células cultivadas durante los mismos tiempos, pero en ausencia de estímulos de diferenciación fue utilizado como grupo control.

La inmunofenotipificación se realizó mediante análisis por citometría de flujo después de la inmunotinción de 50.000 MSC con anticuerpos monoclonales contra los marcadores putativos de MSC humano que incluyen CD29 (conjugado con FITC, clon TS2/16), CD13 (conjugado con FITC, clon WM-15), CD105 (conjugado con PE, clon SN6), CD73 (conjugado con PE, clon AD2) y CD90 (conjugado con PE, clon 5E10), o marcadores característicos de otros linajes celulares: CD235a (conjugado con APC, clon HIR2), CD31 (conjugado con APC, clon WM-59), y CD45 (APC-conjugado, clon 2D1) como se describió anteriormente⁷³. Todos los anticuerpos se adquirieron de eBioscience (San Diego, CA). Como control se utilizaron anticuerpos isotipos conjugados con los mismos fluoróforos. Las células fueron adquiridas en un citómetro de flujo Cyan ADP (Dako).

4.2.1.3 Precondicionamiento de AD-MSC y obtención de secretoma.

Las hAD-MSCs derivadas de tejido adiposo humano (pasaje 3) con un 70% de confluencia fueron preconditionadas incubándolas en medio esencial mínimo (α -MEM Gibco, Gran Island, NY) suplementado con SFB al 10% (HyClone, South Logan, UT) más 10 ng/ml de TNF- α y 15 ng/ml de IFN- γ (R&D System, Minneapolis, MN) durante 40 horas. Después del preconditionamiento las células se lavaron tres veces con PBS y se incubaron durante 48 horas con α -MEM sin rojo fenol y sin FBS. Se ha descrito previamente, que esta estrategia de preconditionamiento aumenta fuertemente la producción de factores anti-inflamatorios comparados con las hAD-MSC no preconditionadas⁵³. Cumplido el tiempo, el medio de cultivo condicionado (secretoma) se recolectó y se centrifugó a 400g durante 10 minutos para eliminar células enteras. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 5000g durante 10 minutos para eliminar restos celulares. Se ha descrito previamente que este proceso de centrifugación diferencial reduce la contaminación del secretoma con proteínas liberadas por la ruptura de las células⁵². Finalmente, el secretoma fue filtrado en filtros de pirinola de 0.22 μ m. El secretoma se concentró 30 veces (v/v) utilizando filtros de 3 KDa (Millipore, Carrigtwohill CO). La concentración de proteínas fue determinada con el kit de BCA (Thermo Scientific, Waltham, MA). El secretoma fue alicuotado y congelado a -80°C hasta su uso.

Para evitar variaciones relacionadas a los diferentes procesos de producción de secretoma entre los diferentes lotes, la producción del secretoma para nuestro experimento, se hizo en un solo lote, en cantidad suficiente, con

células provenientes de un único donante. Con respecto a la elección del donante, se revisó su historia clínica para corroborar que de no tuviese alguna patología relacionada con la depresión u otra condición psiquiátrica.

Una vez obtenido el secretoma, el ARN total de las hAD-MSC preconditionadas se purificó usando Trizol (Invitrogen, Grand Island, NY). Como control, se aisló el ARN de hAD-MSC sin preconditionamiento. Se usó un microgramo de ARN total para realizar la transcripción reversa con transcriptasa reversa MMLV (Invitrogen) y partidores oligo-dT. Se realizaron reacciones de PCR en tiempo real para amplificar los factores neuroprotectores BDNF, NGF, bFGF y VEGF-a y los factores anti-inflamatorios IL-10, IL-5, TSG-6 e indolamina 2-3 dioxigenasa (IDO) usando el kit SYBERGreen (Roche, Indianapolis, IN) en un termociclador Light-Cycler 1.5 (Roche). Las cuantificaciones relativas se realizaron por el método $\Delta\Delta CT$. El nivel de ARNm de cada gen blanco se normalizó en comparación al nivel de ARNm del gen GAPDH de la misma muestra.

El Centro de Medicina Regenerativa cuenta con la descripción protéica completa del secretoma obtenido de MSC derivadas de tejido adiposo de 4 donantes con y sin preconditionamiento determinado por espectrometría de masa en el Centro de Proteómica de la Universidad de Queensland, Australia.

4.2.1.4 Administración intranasal de secretoma derivado de MSC o vehículo.

La administración intranasal de secretoma o vehículo se hizo bajo anestesia inducida por hidrato de cloral (280mg/kg, i.p.). Luego de la administración del hidrato de cloral se colocó al animal en su jaula hasta que estuviera completamente sedado, para posteriormente colocarlo en posición supina, en una superficie plana y sobre una plantilla térmica. Se administró a los animales 160ul de secretoma derivado de 1×10^6 hAD-MSCs preconditionadas, conteniendo 25ug de proteínas totales (Grupo CUMS+secretoma) o 160ul de solución salina (Grupo CUMS+vehículo). Con una pipeta de 20ul y a 1-2 milímetros de la fosa nasal se administró 20ul de secretoma (**Figura 4**). Esta gota fue absorbida por la rata. Cinco minutos después, en la otra fosa nasal, se administró esta misma cantidad y se siguió el mismo procedimiento hasta terminar la dosis de secretoma. Cada fosa nasal recibió 80ul de secretoma o vehículo.



Figura 4. Procedimiento de administración intranasal de secretoma o vehículo. En la foto se muestra la posición supina y el ligero levantamiento de la cabeza de la rata

para administrar en la fosa nasal el secretoma o suero fisiológico (vehículo), según corresponda.

4.2.1.5 Diseño experimental para la evaluación de conductas y fenotipo depresivo en ratas sometidas a CUMS y tratadas con secretoma o vehículo.

Todos los procedimientos animales y su uso, para esta fase del experimento, también fueron evaluados, aprobados y supervisados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (**CICUAL**) de la Facultad de Medicina de la Universidad del Desarrollo, número de acta de aprobación 08-2019, código del proyecto DCIM-2019-01.

Luego de dos semanas de adaptación, los animales fueron sometidos a un protocolo experimental de 11 semanas de CUMS sin interrupción (Tabla Suplementaria 3). Durante las últimas 3 semanas de CUMS se administró cuatro dosis intranasales de secretoma o vehículo a espacios regulares de 5 días. Como se mencionó anteriormente, el número de ratas se dividió en dos grupos de 30 ratas. En cada línea de tiempo se replicó el experimento de manera similar. Se conformaron tres grupos experimentales: 1) Grupo Control: ratas no sometidas al protocolo de CUMS; 2) Grupo CUMS + V: ratas sometidas a 11 semanas de protocolo CUMS con administraciones intranasales de 4 dosis de NaCl 0.9% como vehículo y 3) Grupo CUMS + S: ratas sometidas a 11 semanas de protocolo CUMS con administraciones intranasales de 4 dosis de secretoma.

En este nuevo diseño experimental se repitió el procedimiento que se siguió en el establecimiento del modelo, incluyendo 14 días de habituación, manipulación y set inicial de pruebas conductuales, separación balanceada de dos grupos iniciales: Grupo control (n=10) y grupo CUMS (n=20), según peso corporal y prueba de preferencia a la sacarosa. (Tablas Suplementarias 4 para el primer grupo y 5 para el segundo grupo). Semanalmente se realizó la prueba de preferencia a la sacarosa y pesaje corporal. En la semana 8 (día 57 del protocolo CUMS), se hicieron las pruebas conductuales y las ratas sometidas a CUMS se separaron de forma balanceada, según peso y preferencia a la sacarosa, en dos grupos: CUMS + V y CUMS + S. Este mismo día se administró la primera dosis de NaCl al 0.9% o secretoma respectivamente. Los días 64, 71 y 74 de CUMS se administraron las 3 dosis restantes. Los días 76 y 77 se realizaron las pruebas conductuales y el día 78 se hizo la eutanasia de los animales **(Figura 5)**.

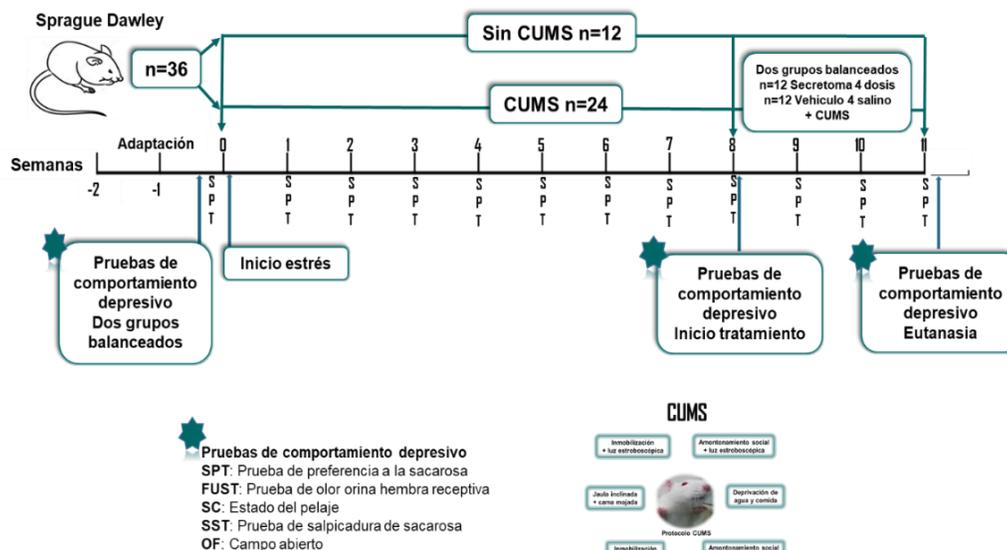


Figura 5. Diseño experimental para la evaluación del potencial antidepresivo del secretoma derivado de hAD-MSC preconicionadas.

4.3. Determinación de inflamación local (corteza prefrontal e hipocampo) en ratas sometidas a CUMS tratadas con administración intranasal de secretoma o vehículo.

Una vez finalizado todos los experimentos conductuales, las ratas fueron anestesiadas por inhalación de vapores de sevoflurano (Baxter, Chile) y perfundidas con 100 ml de una solución de perfusión compuesta de dextrosa 0.4% (Merck), cloruro de sodio 0.8% (Merck) y sacarosa 0.8% (Merck) durante 20 minutos. Se extrajo el cerebro y rápidamente se separaron los dos hemisferios, uno de ellos se fijó en paraformaldehído al 4% (Merck), mientras que el otro hemisferio se diseccionó sobre hielo, y se obtuvo la corteza prefrontal (PFC) e

hipocampo (HP), las que fueron rápidamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta su procesamiento para medición de niveles de expresión de citoquinas inflamatorias.

La selección de las 9 muestras para cuantificar los niveles de expresión con citoquinas se hizo de manera aleatoria, colocando las 12 muestras del grupo control y las 11 muestras de los animales tratados con vehiculo o secretoma en un programa llamado generador aleatorio de listas. Los primeros 9 números identificadores de animales cada grupo experimental que aparecieron en esta lista fueron los seleccionados. Las muestras congeladas de HP y CPF, se utilizaron para cuantificar niveles de expresión de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6, IL-1 β y TNF- α . Brevemente, 50ug de CPF o de HP fueron recibidos en un tubo con 500ul de Trizol (Invitrogen, Grand Island, NY), se homogenizó y se aisló el ARN total siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la retrotranscripción, se usó 1ug de ARN total, transcriptasa inversa MMLV (Invitrogen) y partidores oligo-dT. Las reacciones de qPCR se realizaron en un volumen final de 10 μl que contenía: 50ng de mezcla ADNc, Light Cyler-DNA Master SYBER Green (Roche, Indianapolis, IN), MgCl₂ 3mM y 0,5 μM de los partidores para amplificar los factores pro-inflamatorios TNF- α , IL-1 β e IL-6, utilizando un termociclador Light-Cycler 1.5 (Roche). Para garantizar que los amplicones se generaran a partir de ARNm y no de ADN genómico, se incluyeron controles sin transcriptasa reversa durante la reacción de transcripción reversa. Se usó el análisis de la curva de fusión para asegurar que solo se amplificaba un producto durante la reacción.

Las cuantificaciones relativas se realizaron por el método $\Delta\Delta CT$. El nivel de ARNm de cada gen blanco se normalizó referido a los niveles de ARNm del gen GAPDH de la misma muestra.

La selección de las 6 muestras para cuantificar los astrocitos y las microglías se hizo de manera aleatoria, colocando las 12 muestras del grupo control y las 11 muestras de los animales tratados con vehículo o secretoma en un programa llamado generador aleatorio de listas. Los primeros 6 números identificadores de animales de cada grupo experimental que aparecían en esta lista fueron los seleccionados. Las muestras fijadas en paraformaldehído al 4% se utilizaron para evaluar inflamación local en el hipocampo observando la activación de astrocitos y microglía por medio del doble marcaje con anticuerpos anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein) y anti-Iba-1 (ionized calcium binding adaptor molecule 1) respectivamente. Para esto, el hemisferio cerebral fijado se cortó en un criostato haciendo cortes coronales de 30 μm de espesor entre el Bregma -2.8 y 3.8. Se analizaron seis cortes de hipocampo (HP) por cada grupo de ratas. Los cortes se mantuvieron a $-20^{\circ}C$ hasta el momento de la inmunotinción. Antes de realizar los marcajes, los cortes de cerebro se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Para el doble marcaje de GFAP e Iba-1, los cortes de hipocampo primero fueron bloqueados a temperatura ambiente por una hora con suero normal de cabra (NGS) al 10% suplementado con albúmina de suero bovino (BSA) y tritón al 0,3% preparado en PBS, y luego se incubó con el anticuerpo policlonal de conejo anti-Iba-1 (1:400, Wako Pure Chem.

Ind., Japón) y anticuerpo monoclonal de ratón anti-GFAP (1:500, Sigma-Aldrich) durante la noche a 4°C. Después de enjuagar tres veces con PBS-Triton al 0,1%, los cortes se incubaron con un anticuerpo anti-ratón de burro Alexa Fluor-488 (1:500, ThermoFisher) y un anticuerpo anti-conejo de burro Alexa Fluor-594 (1:400, ThermoFisher) a temperatura ambiente durante dos horas. Después de enjuagar tres veces con TBS-Tween al 0,1%, las muestras se incubaron con DAPI (1:300, Sigma-Aldrich) y las imágenes se adquirieron utilizando un microscopio confocal de barrido láser Spectral C2+. Se escanearon tres sitios del estrato radiatum de la región CA1 del HP. Se determinó la longitud de los procesos primarios de los astrocitos junto con densidad de astrocitos y de microglia.

4.4 Evaluación de neurogénesis hipocampal adulta en ratas sometidas a CUMS con administración intranasal de secretoma o vehículo.

Se evaluó neurogénesis hipocampal adulta determinando los niveles de expresión de los factores inductores de neurogénesis BDNF y NGF en muestras de hipocampo y mediante cuantificación de precursores neuronales en el giro dentado del hipocampo con tinción de inmunohistofluorescencia de doblecortina (DCX) y Ki67 (doble marcaje) y marcaje único para neuronas maduras (NeuN) mediante microscopía confocal.

Los niveles de expresión de BDNF y NGF se determinaron siguiendo el mismo protocolo de RT-qPCR que se utilizó para medir los niveles de expresión de las citoquinas pro-inflamatorias descrito anteriormente.

La evaluación de la neurogénesis hipocampal adulta también se realizó a partir del hemisferio cerebral fijado en paraformaldehído al 4% y se trataron las muestras de la misma manera que el doble marcaje de GFAP e Iba-1 hasta el paso de la solución de bloqueo. Para el marcaje único de NeuN, las secciones del hipocampo se bloquearon con suero fetal bovino al 5% en buffer TBS Tween al 0,1% a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se incubaron con anticuerpo anti-NeuN de ratón (1:100, Sigma-Aldrich, clon A60) durante toda la noche a 4°C. Después de enjuagar tres veces con TBS-Tween al 0,1%, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con Alexa Fluor-555 (1:300, Cell Signaling) a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de enjuagar tres veces con TBS-Tween 0,1%, las muestras se incubaron con DAPI (1:100, Sigma-Aldrich) para tinción nuclear y las imágenes se adquirieron utilizando un microscopio confocal de barrido láser Spectral C2+. Las células NeuN-positivas y DAPI-total se contaron por separado usando el software Image J (National Institutes of Health). El número de células NeuN+ en el giro dentado se determinó mediante la proporción de células positivas para NeuN con respecto al total de células.

Para el marcaje doble con doblecortina (DCX) y Ki-67 las secciones de HP se bloquearon con suero bovino fetal al 5% en buffer TBS-Tween al 0,1% a

temperatura ambiente durante 1 hora y luego se incubaron con anticuerpo anti-DCX de ratón (1:50, Santa Cruz) y anticuerpo anti-Ki67 de conejo (1:100, Abcam) durante toda la noche a 4°C. Después de enjuagar tres veces con TBS-Tween al 0,1%, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario de burro anti-ratón conjugado con Alexa Fluor-488 (1:300, Thermo Fisher) y un anticuerpo secundario de burro anti-conejo conjugado con Alexa Fluor-594 (1:300, Thermo Fisher) a temperatura ambiente por 2 horas. Después de enjuagar tres veces con TBS-Tween al 0,1%, las muestras se incubaron con DAPI (1:100, Sigma-Aldrich). Las imágenes se adquirieron utilizando un microscopio confocal de barrido láser Spectral C2+. Las células positivas para DCX y DCX/Ki-67 doblemente marcadas se contaron por separado utilizando el software Image J. La expresión de DCX en el giro dentado se determinó mediante la proporción de células positivas para DCX con respecto al total de células positivas para NeuN. La expresión de Ki67 (marcador de proliferación) en el giro dentado del hipocampo se determinó mediante la proporción de células positivas DCX/Ki-67 doblemente marcadas con respecto al total de células positivas para DCX. Se escaneó completamente el giro dentado del hipocampo para contar el número de células DCX y células positivas DCX/Ki67 doblemente teñidas.

5. RESULTADOS

En esta sección, primero se presentan los resultados del modelo piloto de trastorno depresivo mayor realizado con el fin de establecer en nuestro bioterio un modelo CUMS caracterizado. En segunda instancia se presentan los resultados de la evaluación del potencial antidepressivo del secretoma derivado de hAD-MSD preconicionadas.

5.1. Resultados del experimento piloto de trastorno depresivo mayor inducido por CUMS en ratas.

5.1.1 Características conductuales.

5.1.1.1 Cambios en el peso corporal de los animales.

Los animales de los grupos control y CUMS comenzaron el experimento con la misma edad y peso. Sin embargo, a partir de la segunda semana del protocolo de estrés, los animales del grupo CUMS mostraron una reducción significativa en la ganancia acumulada de peso corporal comparado con el grupo control, esta diferencia se mantuvo durante las 8 semanas de exposición al protocolo CUMS (**Figura 6**).

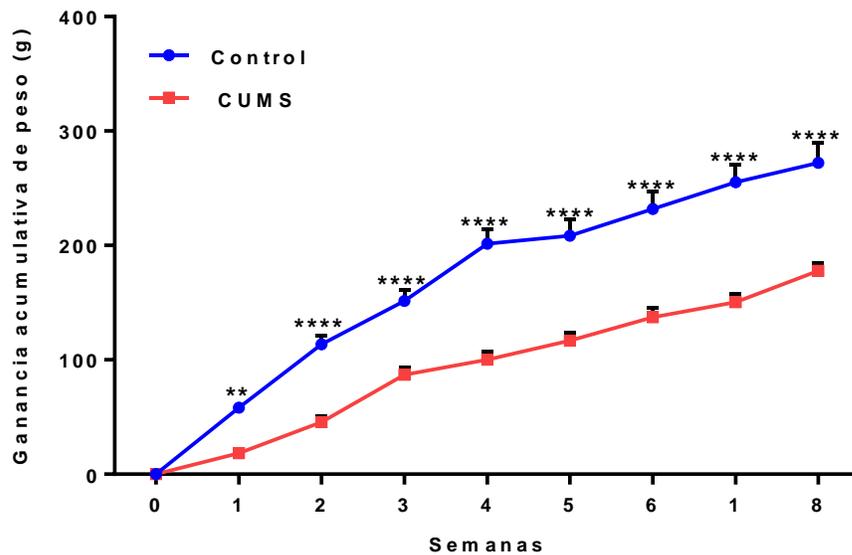


Figura 6. Ganancia acumulativa de peso. Las ratas sometidas al protocolo CUMS durante ocho semanas ganaron menos peso a lo largo del tiempo en comparación a los animales control sin estrés. Este efecto fue significativo desde la segunda semana. Control n=7, CUMS n=10. Los resultados son expresados como media \pm SEM. ANOVA de dos vías. Fisher's LSD post-hoc ****p<0.0001 vs control.

5.1.1.2. Cambios en el comportamiento hedónico, prueba de preferencia a la sacarosa al 1% (PS)

Se observó que los animales expuestos a 8 semanas de CUMS presentaron una reducción significativa en el porcentaje de consumo de la solución de sacarosa comparado con el grupo de control (**Figura 7**), indicando que el protocolo de estrés aplicado durante 8 semanas fue eficiente en inducir un estado anhedónico en los animales.

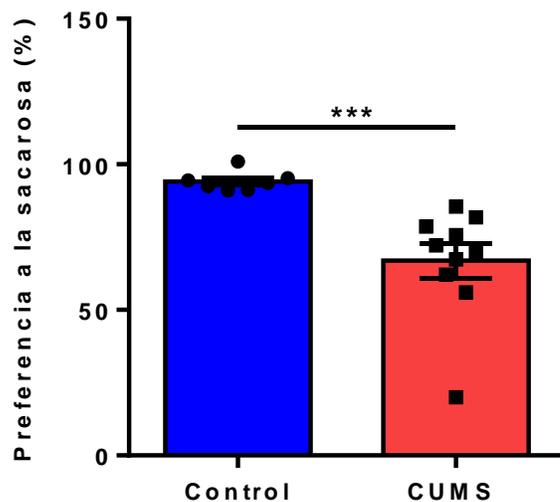


Figura 7. Porcentaje de preferencia a la sacarosa a las ocho semanas de CUMS.

Las ratas sometidas a CUMS durante ocho semanas disminuyeron significativamente el consumo de sacarosa al 1% en comparación al consumo de sacarosa de los animales control sin estrés. Control n=7, CUMS n=10. Los resultados son expresados como media \pm SEM. t-test con corrección de Welch ***p<0.0001 vs control.

5.1.1.3 Cambios en el comportamiento relacionados con la función ejecutiva, estado del pelaje y rociado de sacarosa al 10%.

Luego de ocho semanas de CUMS las ratas mostraron un estado de pelaje significativamente deteriorado (sucio y/o desordenado), evidenciado por una puntuación más alta en la evaluación de la prueba de estado de pelaje (SC) en comparación a los animales control (**Figura 8A**). Por otro lado, con respecto a la respuesta de inducción de acicalamiento por rociar sobre la capa dorsal de su pelaje sacarosa al 10%, esta conducta no se vio afectada en los animales sometidos a CUMS en comparación a los animales control (**Figura 8B**).

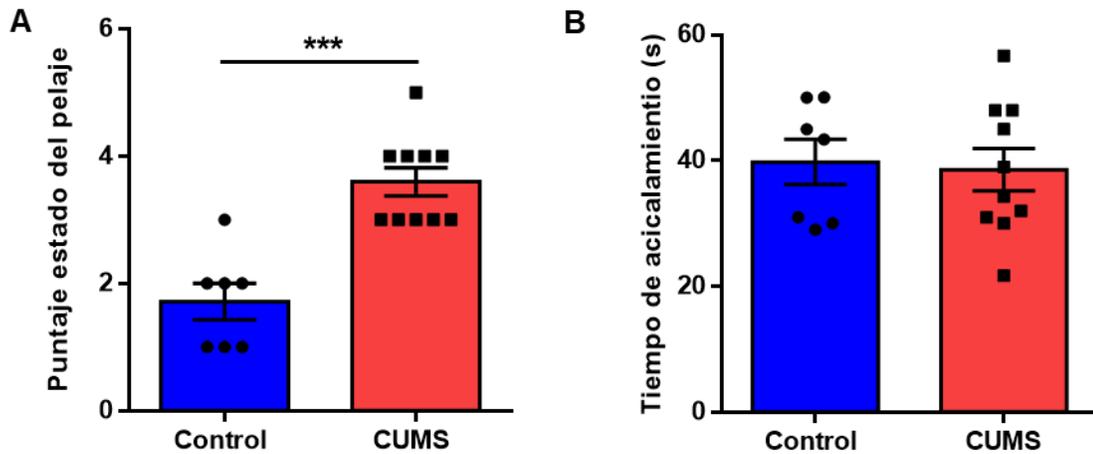


Figura 8. Cambios en el comportamiento relacionado con las funciones ejecutivas a las ocho semanas de CUMS. A) En la evaluación del estado del pelaje en ratas sometidas a CUMS se observó un deterioro significativo en su autocuidado diario en comparación a la conducta de los animales control sin estrés. *** $p < 0.0003$ vs control Mann-Whitney test. **B)** El porcentaje de tiempo empleado por las ratas sometidas a CUMS para limpiar su pelaje cuando se indujo la conducta de limpieza mediante el rocío del pelaje con una solución de sacarosa al 10% no se observó alterado en comparación a ratas control sin estrés. Mann-Whitney test. Los resultados son expresados como media \pm SEM. Control $n=7$, CUMS, $n=10$.

5.1.1.4 Cambios en el comportamiento asociados con alteraciones en la regulación emocional, prueba de campo abierto (Open Field OF)

Cuando se colocaron las ratas CUMS en el campo abierto, los animales que habían estado recibiendo estresores diarios durante 8 semanas no mostraron diferencia en la distancia total recorrida (**Figura 9A**), ni tampoco mostraron

diferencia en el índice de thigmotaxis (**Figura 9B**) en comparación a los animales control sin estrés.

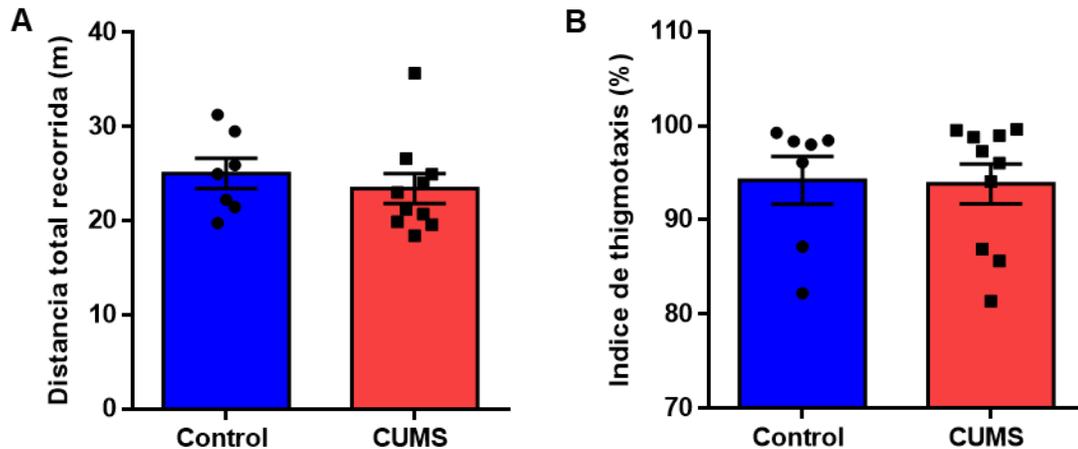


Figura 9. Evaluación de alteraciones en la regulación emocional en ratas sometidas a las 8 semanas de CUMS. A) En la medición de la distancia total recorrida en la prueba de campo abierto no hubo diferencia entre los animales sometidos a CUMS y los animales control sin estrés. **B)** No se observaron diferencias en la evaluación de thigmotaxis (distancia recorrida cerca de las paredes del campo abierto) entre los animales sometidos a CUMS y los animales control sin estrés. Los resultados son expresados como media \pm SEM. Control n=7, CUMS, n=10. Mann-Whitney test.

5.1.1.5 Elaboración del puntaje o score y puntuación global del comportamiento similar a la depresión.

Para la generación de esta puntuación seleccionamos aquellas pruebas conductuales mayormente utilizadas en la evaluación del potencial terapéutico de los fármacos antidepresivos que representan síntomas similares a la depresión como anhedonia (SPT%), apatía (SC y SST), ansiedad; (tiempo en el centro y

thigmotaxis), locomoción (distancia total recorrida) con la prueba de campo abierto (OF). (**Tabla 1**).

Rata	Grupo	SPT%	OF Dist total	OF Thigmotaxis	SC	SST
R1	1	90	15	14	1	35
R2	2	20	24	24	3	30
R3	2	86	20	20	3	22
R4	2	56	36	31	4	57
R5	2	62	20	19	4	39
R6	1	91	22	22	2	43
R7	2	67	27	26	5	48
R8	1	91	25	22	1	29
R9	2	72	25	22	3	34
R10	2	82	21	17	4	31
R11	2	70	21	21	3	48
R12	1	95	30	29	2	50
R13	2	76	18	17	4	45
R14	1	94	21	21	2	50
R15	2	88	23	22	3	29
R16	2	85	27	23	4	39
R17	1	101	31	26	1	30
R18	1	92	26	26	1	31
R19	2	79	23	22	3	32
R20	1	94	20	20	3	45

Tabla 1. Resultados de los análisis de pruebas conductuales de todas las ratas del experimento piloto. R= rata, 1= grupo control, 2= grupo CUMS.

A partir de los resultados obtenidos de las pruebas conductuales (**Tabla 1**), obtuvimos la media y la desviación estándar, y calculamos los puntos de corte y asignamos los puntajes (**Tabla 2**).

	PST (%)	OF Distancia total (m)	OF Thigmotaxis (m)	SC	SST (s)
Media	93.5	23.88	22.5	2.13	41.25
DS	3.5	5.4	4.6	1	8.7
Score	Puntos de corte				
0	90 - 97	23.88 - 18.48	22.5 - 27.1	0 - 1	41.25 - 32.55
1	89.9 - 86.5	18.47 - 13.08	27.2 - 31.7	2 - 3	32.54 - 23.85
2	86.4 - 83	13.07 - 7.68	31.8 - 36.3	4 - 5	23.84 - 18.15
3	82.9 - 79.5	7.67 - 2.28	36.4 - 40.9	6 - 7	18.14 - 6.45
4	< 79.5	< 2.27	> 40.9	> 7	< 6.45

Tabla 2. Valores de media, desviación estándar (DS) y puntos de corte de las pruebas conductuales y asignación del puntaje del experimento piloto.

Basándonos en los puntos de corte de la tabla 2, se asignaron los puntajes a cada prueba conductual por rata, y se hizo la suma total de estos puntajes, tanto para el grupo control como para el grupo CUMS (**Tabla 3A y 3B**, ver columna designada como puntaje total). En las ratas sometidas a CUMS por ocho semanas, observamos una respuesta heterogénea, como también observamos que las pruebas que aportaron mayor puntaje discriminatorio entre los dos grupos fueron la SPT % y SC, (**Tabla 3B**, fila designada como total). Con este puntaje eliminamos del análisis a las ratas CUMS resilientes (puntaje total similar al obtenido por una rata del grupo control) y ratas del grupo control que presentaban rasgos similares a la depresión (puntaje similar o cercano al puntaje total más bajo de una rata sometida a CUMS). En el grupo control (**Tabla 3A**) retiramos a la rata 1 ; puntaje 3) y en el grupo CUMS (**Tabla 3B**) retiramos a la rata 15 y rata16 puntaje 2 y 4 respectivamente. Calculamos en porcentaje el equivalente

del retiro de estas ratas lo que corresponde al 13% para las ratas del grupo control que presentan signos depresivos y a 17% de las ratas del grupo CUMS que son resilientes al estado depresivo.

A

Rata	Grupo	SPT %	SC	OF Dist. Total	Thigmotaxis	SST	Score total
1	1	1	0	1	1	0	3
6	1	0	1	0	0	0	1
8	1	0	0	0	0	1	1
12	1	0	1	0	0	0	1
14	1	0	1	0	0	0	1
17	1	0	0	0	0	1	1
18	1	0	0	0	0	1	1
20	1	0	1	0	0	0	1
Media		0.125	0.125	0.125	0.125	0.375	1.25

B

Rata	Grupo	SPT %	SC	OF Dist. Total	Thigmotaxis	SST	Score total
2	2	4	1	0	0	1	6
3	2	2	1	0	0	2	6
4	2	4	2	0	0	0	6
5	2	4	2	0	0	0	6
7	2	4	2	0	0	0	6
9	2	4	1	0	0	0	5
10	2	3	2	0	1	0	6
11	2	4	1	0	0	0	5
13	2	4	4	1	1	0	10
15	2	1	1	0	0	0	2
16	2	2	2	0	0	0	4
19	2	4	1	0	0	1	6
Media		3.33	1.66	0.166	0.166	0.33	5.66

Tabla 3. Puntaje parcial y total por prueba conductual de todas las ratas del experimento piloto a las ocho semanas. A) Grupo control sin estrés. B) Grupo CUMS.

1= grupo control, 2= grupo CUMS.

Aplicado el puntaje a los dos grupos de ratas control y CUMS, observamos un aumento significativo en el puntaje del comportamiento similar a la depresión

en los animales sometidos a CUMS comparado con los animales control sin CUMS (**Figura 10**), esto nos indicó que el panel de estresores utilizados durante ocho semanas indujo un estado depresivo en el modelo piloto propuesto.

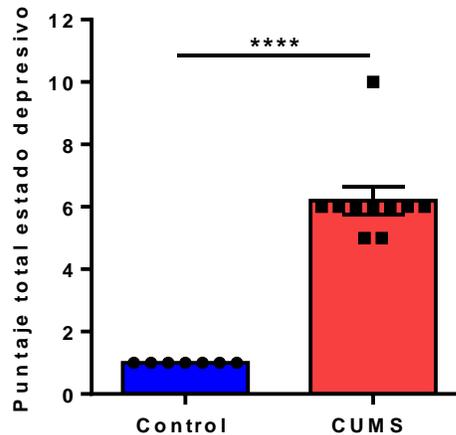


Figura 10. Comparación del puntaje total entre el grupo control sin estrés y el grupo de ratas sometidas a CUMS a las ocho semanas. En la comparación de los puntajes obtenidos entre el grupo control con el grupo CUMS a las ocho semanas observamos un aumento significativo en el puntaje obtenido por las ratas sometidas a CUMS con respecto al grupo control. Los resultados son expresados como media \pm SEM. Control n=7, CUMS, n=10. ****p<0.0001 Mann Whitney test.

5.1.2 Efecto del protocolo CUMS en los parámetros neuromoleculares.

5.1.2.1 Neurogénesis hipocampal adulta.

Se evaluó la neurogenesis hipocampal adulta en el giro dentado del hipocampo de los animales del modelo piloto. Para esto, utilizamos marcadores

neuronales que son proteínas expresadas por las neuronas durante su desarrollo hasta convertirse en neuronas adultas. Se realizaron inmunohistofluorescencia con anticuerpos anti NeuN (marcador de neurona madura) y doble marcaje anti DCX (marcador de neurona inmadura) y anti Ki67 (marcador de célula en proliferación). Bajo microscopio laser confocal, con lente de 60x, se escaneó todo el giro dentado del hipocampo y se contaron las células con marcaje positivo: color rojo NeuN, corresponde a neuronas maduras, color verde DCX corresponde a neuronas inmaduras y células con doble marcaje verde DCX y color rojo Ki67 corresponden a neuroblastos que se van a diferenciar al linaje neuronal (**Figura 11A**). Se observó una disminución significativa en el número de neuronas inmaduras DCX positivas, (**Figura 11C**) en los animales sometidos a ocho semanas de CUMS en comparación a los animales control sin estrés, por el contrario, no se observaron diferencias significativas en el número total de neuronas maduras (Neu+) (**Figura 11B**), ni en el número de células en proliferación en el giro dentado (**Figura 11D**) (muy cercano a significancia estadística) en los animales sometidos a CUMS en comparación a los animales control.

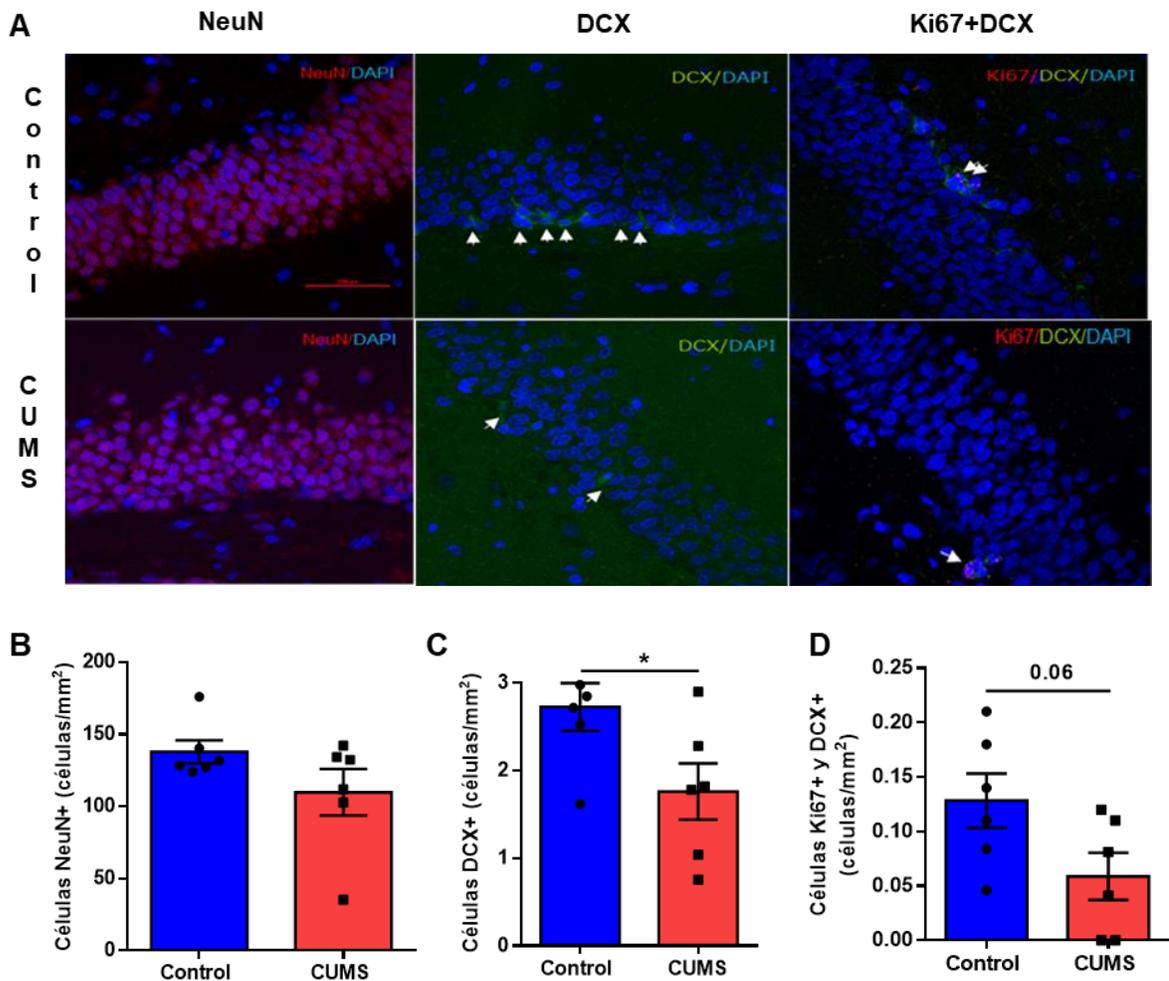


Figura 11. Evaluación de neurogenesis hipocampal adulta mediante inmunofluorescencia luego de ocho semanas de CUMS. **A)** Microfotografías representativas del giro dentado de ratas del grupo control sin estrés y ratas sometidas a CUMS durante 8 semanas. Imágenes obtenidas con microscopía láser confocal . Azul: DAPI tinción de núcleos. Rojo: NeuN tinción de neuronas maduras. Verde: DCX tinción de neuronas inmaduras. Flechas blancas indican neuronas DCX +. Doble marcaje: Rojo: Ki67+ / Verde: DCX+ tinción de neuronas en proliferación. Flechas blancas indican neuronas con doble tinción: DCX+ Ki67+. Escala de la barra 250 μ m (magnificación

60X). **B)** No se observó diferencia significativa en el número de neuronas maduras entre las ratas de grupo control sin estrés y las ratas sometidas a CUMS durante ocho semanas. $p=0.146$ vs control, t-test con corrección de Welch. **C)** Se observó una reducción significativa en el número de neuronas inmaduras DCX positivas en el giro dentado del hipocampo de las ratas sometidas a CUMS durante 8 semanas en comparación a las ratas del grupo control sin estrés $*p<0.05$ vs control, t-test con corrección de Welch. **D)** No se observó diferencia significativa en el número de neuronas en proliferación entre las ratas del grupo control sin estrés y las ratas sometidas a CUMS durante 8 semanas. $p=0.06$ vs control, t-test con corrección de Welch. Los resultados son expresados como media \pm SEM. Grupo control $n=6$, grupo CUMS $n=6$. NeuN: proteína neurona específica. DCX: doblecortina. Ki67: marcador de proliferación. DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole.

Adicionalmente se midió el nivel de expresión de BDNF por RT-qPCR en corteza prefrontal y en hipocampo, ya que este factor neurotrófico es clave en la inducción del proceso de diferenciación neuronal al favorecer la generación y elongación de las dendritas⁷⁴. Al medir los niveles de expresión de BDNF en corteza prefrontal e hipocampo no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales en las dos regiones cerebrales seleccionadas (**Figura 12**).

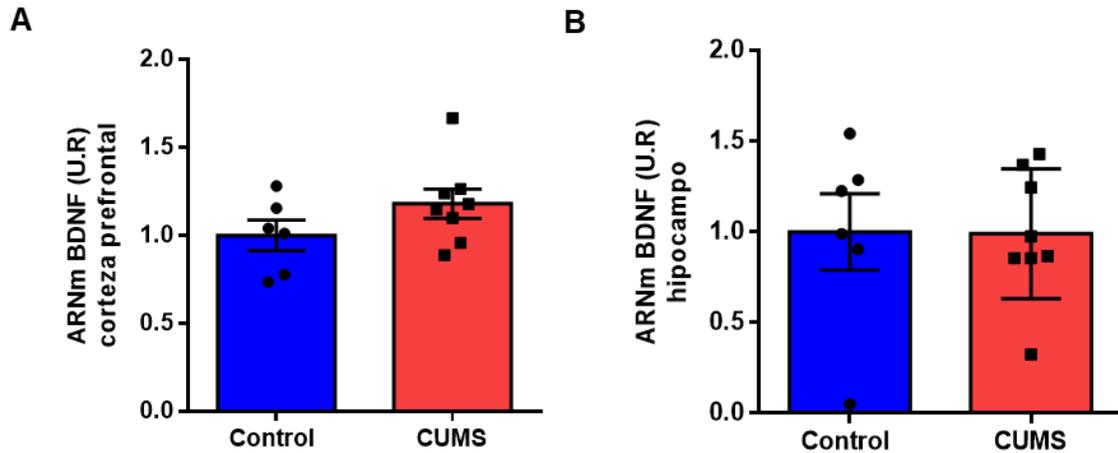


Figura 12. Niveles de expresión de BDNF en ratas sometidas a CUMS durante ocho semanas. No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión relativa de BDNF en **A)** corteza prefrontal y **B)** hipocampo de ratas sometidas a 8 semanas de CUMS en comparación a ratas control sin estrés. Las mediciones fueron realizadas mediante RT-qPCR y normalizadas a la expresión del gen GAPDH. Resultados son expresados como media \pm SEM. Grupo control n=6, Grupo CUMS n=8. Mann-Whitney test. U.R= Unidades relativas.

5.1.2.2 Neuroinflamación en corteza prefrontal e hipocampo.

Evaluamos los niveles de expresión de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α , IL1 β e IL-6 en corteza prefrontal e hipocampo de animales sometidos a 8 semanas de CUMS y animales control. No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de estas moléculas entre los dos grupos experimentales, tanto en corteza prefrontal como en hipocampo (**Figura 13**).

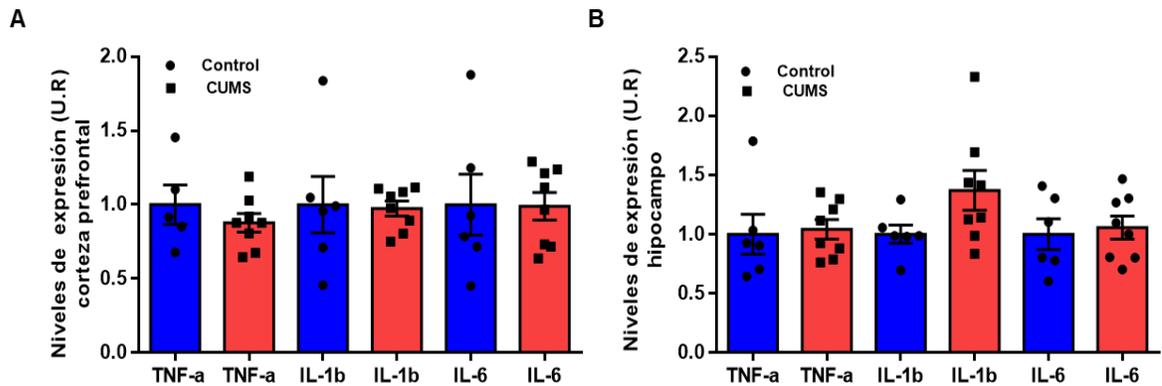


Figura 13. Niveles de expresión de citoquinas pro-inflamatorias en corteza prefrontal e hipocampo en ratas sometidas a CUMS durante ocho semanas. A) No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α , IL1 β e IL6 en la corteza prefrontal de ratas sometidas a 8 semanas de CUMS en comparación a los niveles de estas moléculas en ratas control sin estrés. **B)** No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de citoquinas pro-inflamatorias TNF- α , IL1 β e IL6 en el hipocampo de ratas sometidas a 8 semanas de CUMS en comparación a los niveles de estas moléculas en ratas control sin estrés. Las mediciones fueron realizadas mediante RT-qPCR y normalizadas a la expresión del gen GAPDH. Resultados son expresados como media \pm SEM. Grupo control n=6, Grupo CUMS n=8. Mann-Whitney test. (U.R) Unidades relativas

5.2. Evaluación del potencial antidepresivo del secretoma derivado de hAD-MSC preconditionadas.

Una vez instaurado y validado en nuestro bioterio el modelo de trastorno depresivo mayor en ratas, procedimos a evaluar el potencial terapéutico del secretoma derivado de hAD-MSC preconditionadas, iniciando su aplicación intranasal a las 8 semanas de CUMS. Previamente evaluamos su potencial antidepressivo midiendo los niveles de expresión en las MSC de las moléculas anti-inflamatorias y factores neuroprotectores relevantes para el tratamiento de esta patología.

5.2.1 Niveles de expresión de citoquinas anti-inflamatorias y factores neuroprotectores en hAD-MSC preconditionadas.

Se ha reportado que las hAD-MSC producen de manera paracrina una amplia gama de moléculas terapéuticas y la concentración de estas moléculas puede aumentarse preconditionando *in vitro* las MSC mediante incubación con citoquinas proinflamatorias⁵². Observamos que al preconditionar las MSC con TNF- α e IFN- γ durante 48 horas estas aumentaron significativamente los niveles de ARNm de los factores neuroprotectores BDNF, NGF, bFGF y VEGF- α en comparación con las hAD-MSC no preconditionadas (naïve) (**Figura 14A**). En el mismo sentido, se observó que los niveles de ARNm de moléculas anti-inflamatorias como IL-10, IL-5, TSG-6 eIDO también aumentaron

significativamente en las hAD-MSC preconditionadas en comparación con las hAD-MSC no preconditionadas (naïve) (**Figura 14B**).

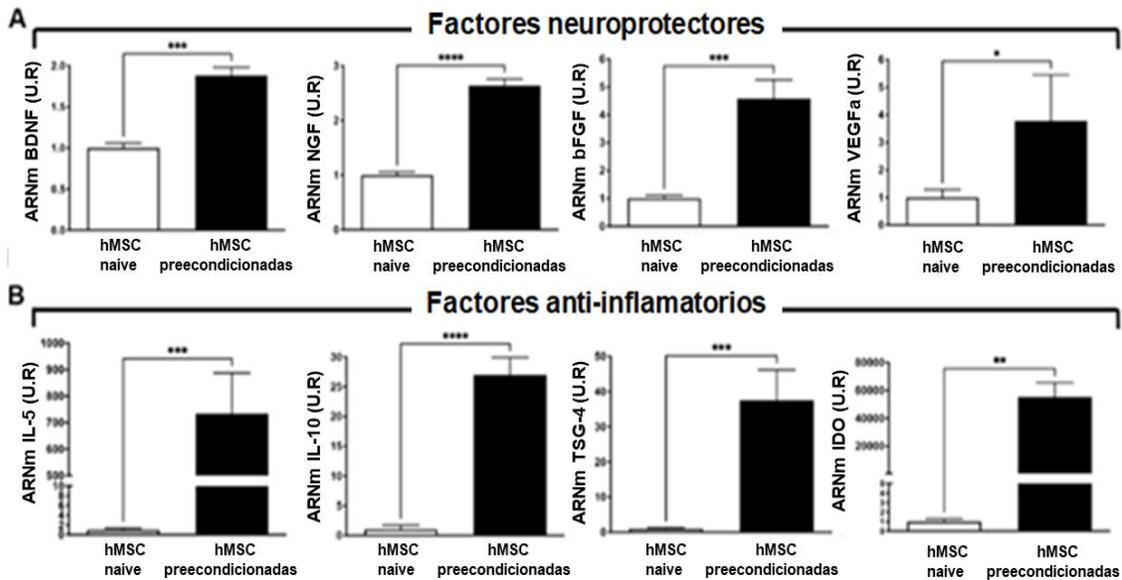


Figura 14. El preconditionamiento de hAD-MSC por incubación con citoquinas pro-inflamatorias aumenta la expresión de moléculas con potencial terapéutico.

A) Niveles de ARNm de factores neuroprotectores BDNF, NGF, bFGF y VEGF evaluados mediante RT-qPCR en muestras de MSC obtenidas después de 48 horas de preconditionamiento con las moléculas pro-inflamatorias TNF- α e IFN- γ (AD-MSC preconditionadas) o vehículo (hAD-MSCs sin preconditionar). **B)** Niveles de ARNm de factores anti-inflamatorios IL-5, IL-10, TSG-6 e IDO evaluados de la misma muestra de A. Los datos de cada gen blanco fueron normalizados con los niveles de ARNm de el gen β -actina de la misma muestra. Datos son mostrados como media \pm SEM. n=3 por condición experimental. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001 vs hAD-MSC sin preconditionar (control). Student-T test. U.R= Unidades relativas

5.2.2 Línea de tiempo del experimento CUMS para la evaluación del potencial antidepresivo del secretoma derivado de hAD-MSC preconditionadas.

Una vez obtenido el secretoma iniciamos el experimento con el modelo animal, replicando las condiciones experimentales utilizadas en la prueba piloto (Figura 15).

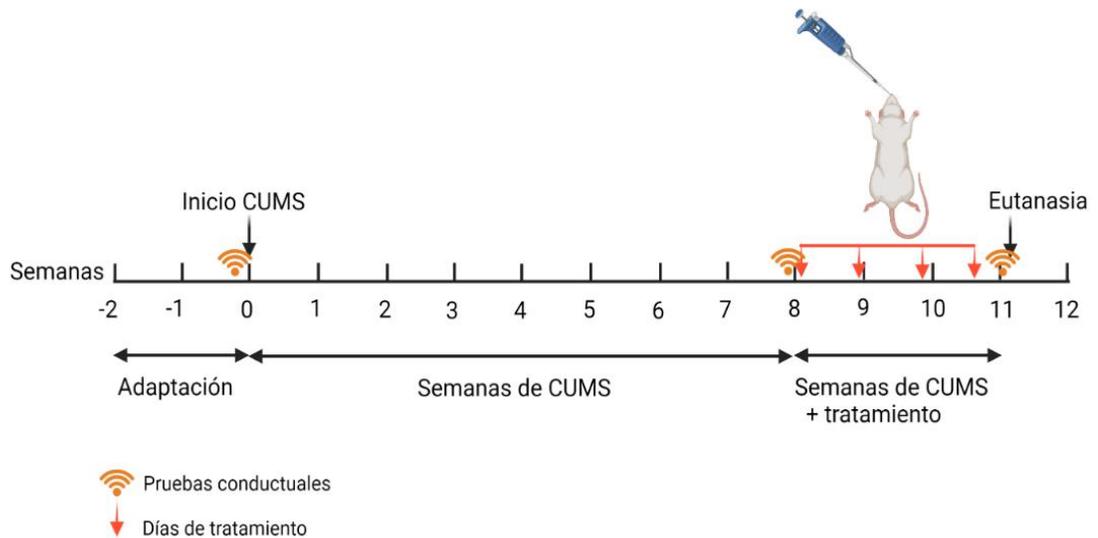


Figura 15. Línea de tiempo del experimento CUMS para evaluar el potencial antidepresivo del secretoma derivado de hAD-MSC preconditionadas. Los animales se adaptaron a las condiciones ambientales del bioterio dos semanas antes del inicio del protocolo CUMS. Durante 11 semanas los animales se sometieron a CUMS y entre la semana 8 y 11 se aplicaron 4 dosis de tratamiento de secretoma o vehículo. En la semana 0, 8 y 11 se realizaron las pruebas conductuales. 24 horas después de las pruebas conductuales de la semana 11 se procedió a la eutanasia.

5.2.3 Características conductuales.

5.2.3.1 Cambios en el peso corporal de los animales.

Como se mencionó anteriormente, el experimento constaría de 2 grupos de 30 animales. Debido a dificultades de adquisición de los animales el primer grupo de ratas fue de 22 distribuyéndose en este grupo en particular 8 ratas para el grupo control y 14 ratas para ser sometidas a CUMS, las cuales en la semana 8 de CUMS se dividieron en dos grupos de 7 ratas, un grupo para ser tratado con vehículo (CUMS + V) y el otro grupo para ser tratado con secretoma (CUMS+S). El segundo grupo de animales fue de 30 y este grupo se distribuyó en tres grupos de 10 animales. El total de animales usados para este experimento fue de 52. Luego de la eliminación de las ratas resilientes al estrés en los grupos CUMS, se hicieron los cálculos estadísticos.

Al inicio del experimento, 34 animales (excluyendo los animales resilientes) de la misma edad se pesaron y se separaron de manera balanceada en dos grupos: n=12 grupo control y n=22 grupo CUMS. Se evaluó la ganancia acumulativa de peso durante las 11 semanas del experimento, observándose que a partir de la semana cuatro las ratas sometidas a CUMS tuvieron una ganancia de peso significativamente menor con respecto a las ratas del grupo control. Este fenómeno se mantuvo durante las semanas restantes del protocolo CUMS **(Figura 16)**.

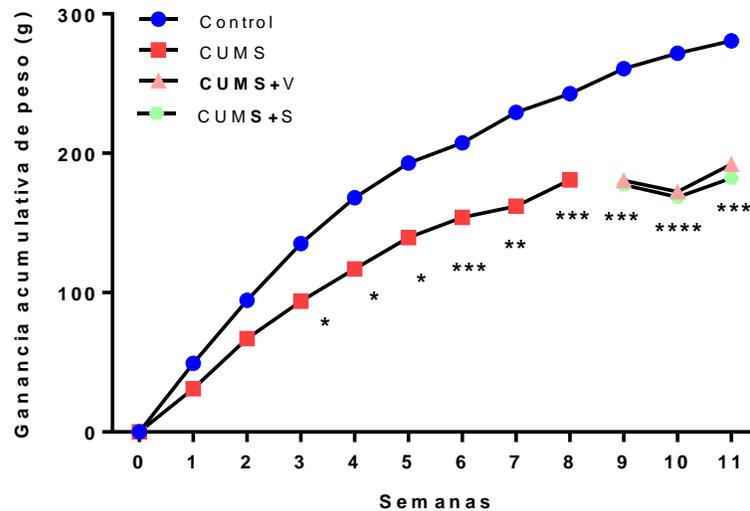


Figura 16. Ganancia acumulativa de peso. Las ratas sometidas a CUMS ganaron menos peso que las ratas del grupo control. Este efecto fue significativo a partir de la semana cuatro y se mantuvo hasta la semana once. Grupo control n=12, Grupo CUMS n=22. Los resultados son expresados como media \pm SEM. ANOVA con Sidak's post-hoc ****p<0.0001 vs control.

5.2.3.2 Evaluación del comportamiento hedónico.

Al finalizar la semana 8 del protocolo CUMS se evaluó la preferencia a la sacarosa. A diferencia de lo observado en el grupo piloto, los animales del grupo CUMS no disminuyeron significativamente su preferencia por la sacarosa en comparación a los animales control sin estrés (**Figura 17A**). La administración intranasal de cuatro dosis de secretoma derivado de hAD-MSC preconicionadas

no indujo ningún cambio en la preferencia a la sacarosa evaluado en la semana 11 del protocolo CUMS en comparación a los animales control **(Figura 17B)**.

La otra conducta hedónica evaluada, es la prueba de FUST. Esta prueba, debido a dificultades en el suministro del pool de orinas de ratas hembra en fase estral, debido a las restricciones sanitarias dadas por motivo de la pandemia COVID-19, no se pudo realizar a los dos grupos de ratas. Razón por la cual el cálculo estadístico para esta prueba está realizado con un n menor. Cumplida la semana 8 de protocolo CUMS se observó que las ratas del grupo CUMS no mostraron una reducción significativa en el tiempo de exploración e interacción del algodón impregnado con orina en comparación a las ratas control sin estrés **(Figura 17C)**. Este efecto en la motivación sexual tampoco fue significativo en el grupo CUMS+V y el grupo CUMS+S después de 11 semanas de protocolo de estrés comparada con el grupo de control. Sin embargo, se observó que el tiempo de exploración del algodón humedecido con orina en los animales CUMS tratados con secretoma fue mayor en comparación con los animales CUMS tratados con vehiculo, aunque este aumento no fué significativo. **(Figura 17D)**.

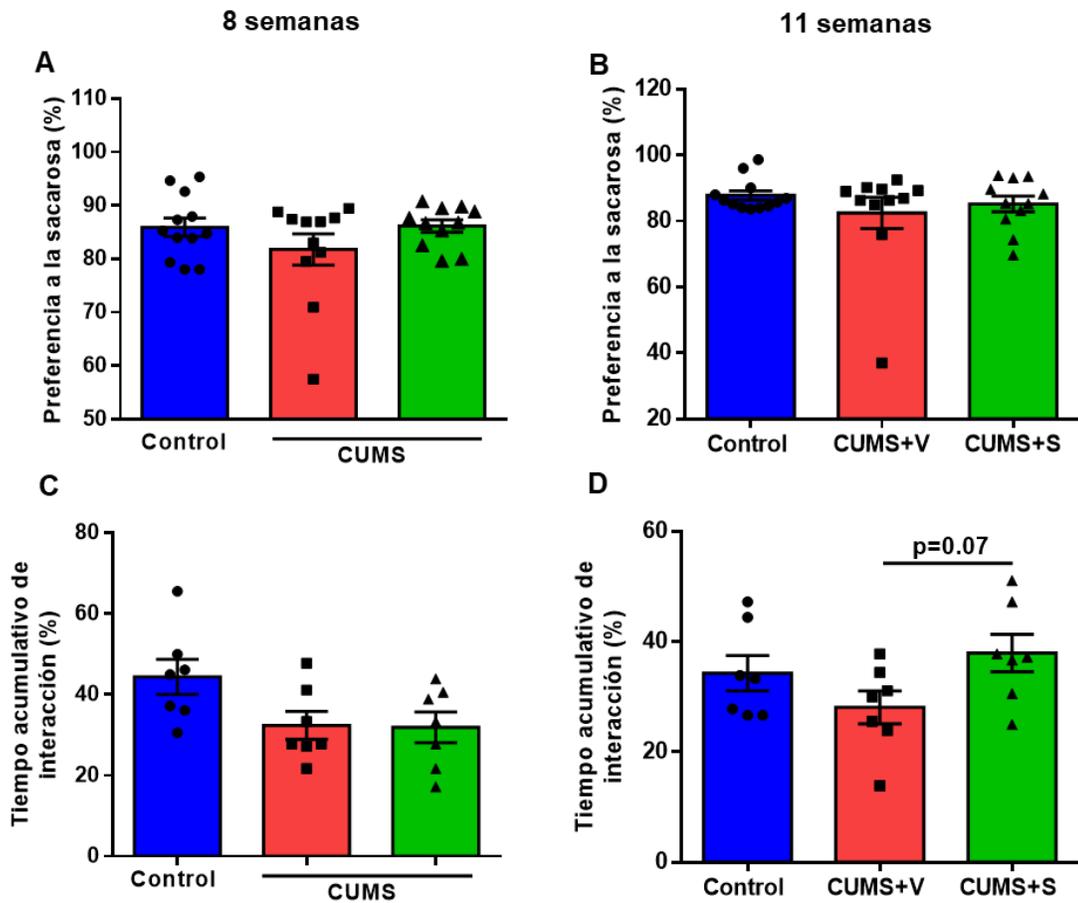


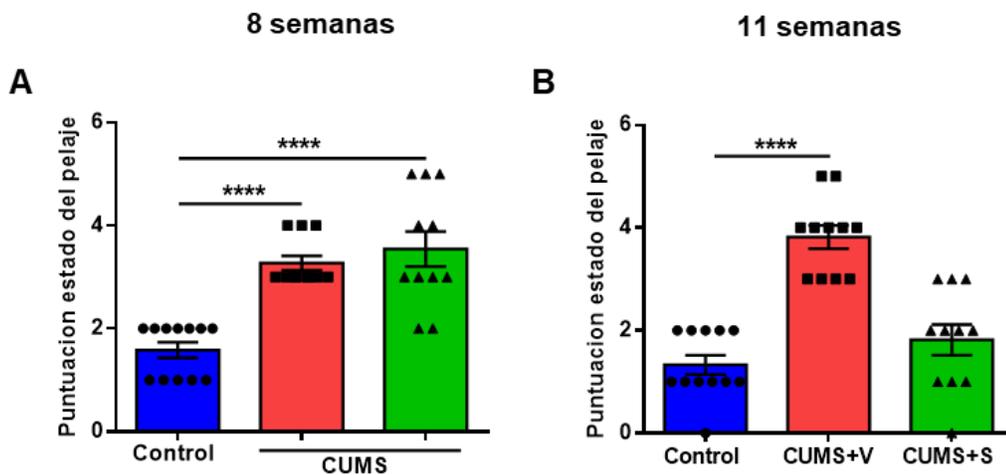
Figura 17. Pruebas evaluativas de comportamiento hedónico. **A)** Al evaluar el porcentaje de preferencia a la sacarosa de ratas sometidas a CUMS durante 8 semanas y ratas control sin estrés no se observaron diferencias significativas. Grupo control n=12, grupo CUMS n=22. Mann-Whitney test. **B)** Al evaluar el porcentaje de preferencia a la sacarosa de ratas sometidas a CUMS durante 11 semanas y tratadas con cuatro dosis intranasales de secretoma derivado de hAD-MSC precondicionadas o vehículo y ratas control sin estrés no se observaron diferencias significativas. Grupo control n=12; Grupo CUMS+Vehículo n=11 (CUMS+V); Grupo CUMS+secretoma n=11 (CUMS+S). **C)** Al evaluar el porcentaje de tiempo acumulado de interacción con la orina de ratas hembra en fase estral (FUST) de ratas sometidas a CUMS durante 8 semanas y ratas control sin

estrés no hubo diferencia entre las ratas sometidas a CUMS con respecto al grupo control. Grupo control n=7, grupo CUMS n=14. p=0.1566 Mann-Whitney test. **D)** Al evaluar el porcentaje de tiempo acumulado de interacción con la orina de ratas hembra en fase estral (FUST) de ratas sometidas a CUMS por 11 semanas y tratadas con cuatro dosis intranasales de secretoma derivado de hAD-MSD preconditionadas o vehículo y ratas control sin estrés no se observaron diferencias significativas. Grupo control n=7, Grupo CUMS+Vehículo n=7, Grupo CUMS+Secretoma n=7. Los resultados son expresados como media \pm SEM. Anova una vía. Prueba de Tukey comparaciones múltiples.

5.2.3.3 Cambios en el comportamiento relacionado con la función ejecutiva.

Después de 8 semanas de protocolo de estrés, los animales del grupo CUMS mostraron un estado de pelaje deteriorado, evidenciado por una puntuación más alta en la evaluación del estado del pelaje en comparación al grupo control sin estrés (**Figura 18A**). Sin embargo, la administración intranasal de cuatro dosis de secretoma derivado de hAD-MSD preconditionadas redujo significativamente la puntuación del pelaje de los animales estresados cuando se evaluaron a las 11 semanas, mientras que los animales sometidos a estrés crónico tratados con vehículo mantuvieron su puntuación alta en este mismo periodo de tiempo (**Figura 18B**), lo que demuestra que el tratamiento con el biofármaco fue eficaz para suprimir las alteraciones en el estado del pelaje relacionadas con el comportamiento de acicalamiento y otros efectos perjudiciales del estrés sobre el pelaje.

La inducción del acicalamiento como respuesta al estímulo de rociado de solución de sacarosa en la región dorsal del pelaje, a las 8 semanas de CUMS, no se vio afectada en su tiempo acumulativo de limpieza durante los primeros cinco minutos, en comparación a los animales del grupo control no estresados (**Figura 18C**). Explorando la microestructura del acicalamiento, analizamos el número de episodios de acicalamiento, los animales estresados no mostraron una diferencia significativa en el número de estos eventos de limpieza durante estos 5 primeros minutos en comparación a los animales del grupo control sin estrés (**Figura 18E**). A las 11 semanas de CUMS no se observaron diferencias en el tiempo acumulativo de limpieza ni en la frecuencia de limpieza, independientemente de si los animales habían recibido 4 dosis de secretoma o vehículo (**Figura 18D y 18F**, respectivamente).



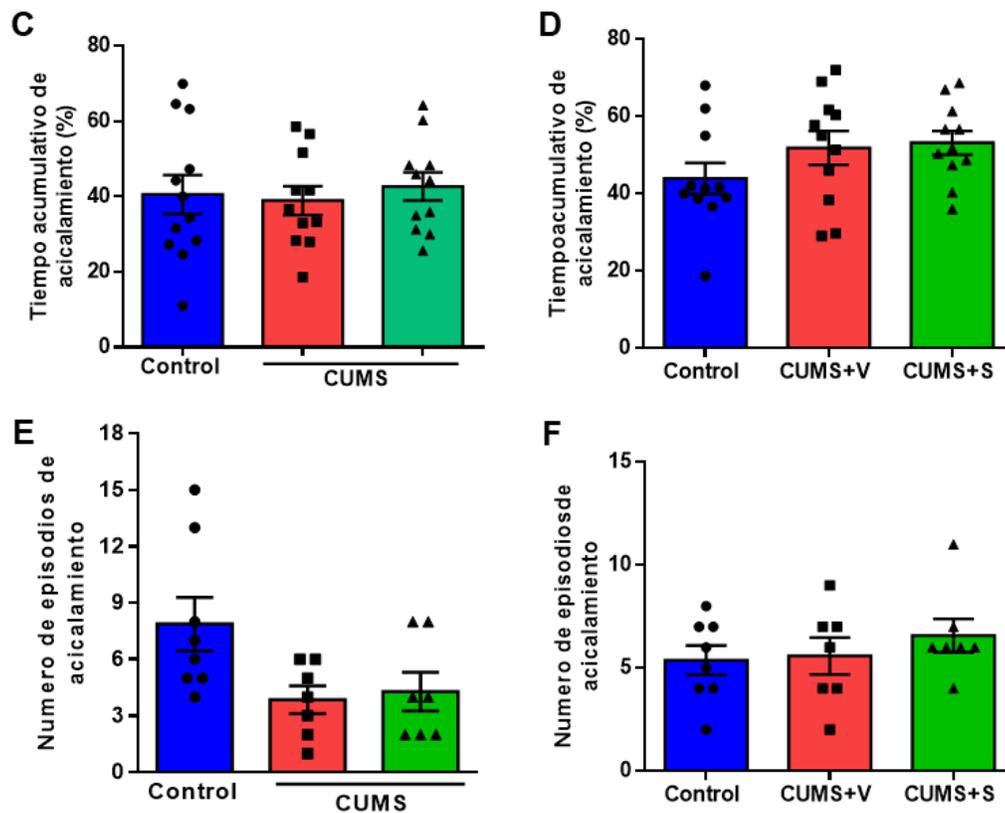


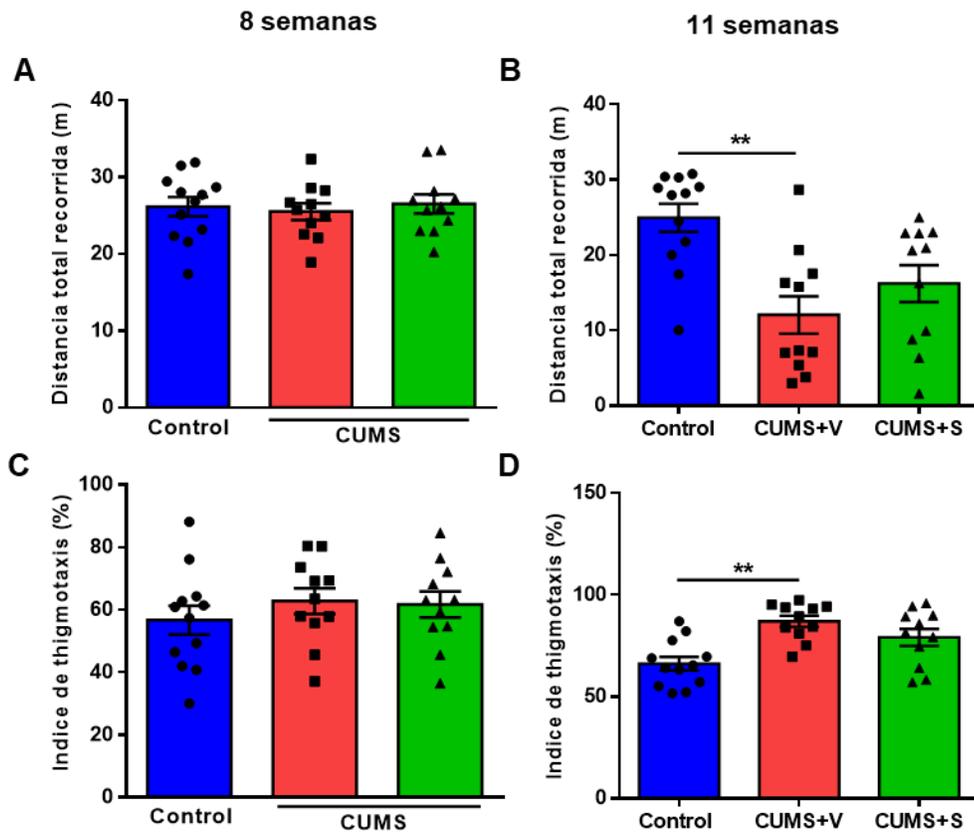
Figura 18. Pruebas de comportamiento relacionadas con la función ejecutiva. A) Al evaluar el puntaje general del estado del pelaje de ratas sometidas a CUMS durante ocho semanas en comparación a las ratas control sin estrés se observó una diferencia significativa de puntaje siendo más alto en las ratas sometidas a estrés. Grupo control n=12, Grupo CUMS = 22. Mann-Whitney test. ****p<0.0001 vs control. **B)** Al evaluar el puntaje general del estado del pelaje de ratas sometidas a CUMS durante once semanas y tratadas con cuatro dosis intranasales de secretoma derivado de hAD-MSC precondicionadas o vehículo en comparación a ratas control sin estrés se observó un aumento significativo en las ratas del grupo CUMS+V y no hubo diferencia significativa con las ratas del grupo CUMS+S. Grupo control n=12; Grupo CUMS+Vehículo n=11 (CUMS+V) Grupo CUMS+Secretoma n=11 (CUMS+S). Kruskal-Wallis test.

**** $p < 0.0001$ vs control. **C)** Al evaluar el tiempo acumulativo de acicalamiento de ratas sometidas a CUMS durante ocho semanas en comparación a las ratas control sin estrés no se observó una diferencia significativa. Mann-Whitney test. Grupo control $n=8$, grupo CUMS $n=14$. **E)** Al evaluar el número de episodios de acicalamiento de ratas sometidas a CUMS durante ocho semanas en comparación a las ratas control sin estrés no se observó una disminución significativa. Mann-Whitney test. $p=0,09$. Grupo control $n=8$, grupo CUMS $n=7$ cada uno. Al evaluar **D)** tiempo acumulativo de acicalamiento y **F)** número de episodios de acicalamiento de ratas sometidas a CUMS durante 11 semanas y tratadas con cuatro dosis intranasales de secretoma derivado de hAD-MSc precondicionadas o vehículo en comparación a ratas control sin estrés no se observaron diferencias significativas. Grupo control $n=12$; Grupo CUMS+Vehículo $n=11$ (CUMS+V); Grupo CUMS+secretoma $n=11$ (CUMS+S). ANOVA una vía. Prueba de Tukey comparaciones múltiples. En todos los casos los resultados son expresados como media \pm SEM.

5.2.3.4 Cambios en el comportamiento asociados con alteraciones en la regulación emocional.

Cuando se evaluaron en la prueba de campo abierto, los animales que habían estado recibiendo estresores diarios durante 8 semanas no mostraron diferencias significativas en la distancia total recorrida (**Figura 19A**), ni el tiempo que pasaron en el centro (**Figura 19E**) ni en el índice de thigmotaxis (**Figura 19C**), en comparación a los animales control sin estrés. Después de 11 semanas

de protocolo CUMS, el tiempo total que los animales tratados con vehículo y secretoma pasaron en el centro, se redujo significativamente en comparación con los animales control no estresados (**Figura 19F**). En los animales CUMS tratados con vehículo, la distancia total recorrida disminuyó (**Figura 19B**) y el índice de thigmotaxis (**Figura 19D**) aumentó, en forma significativa en comparación con el grupo control, mientras que los animales a los que se les administró el secretoma intranasal mostraron una mejora en ambas conductas, es decir, reduciendo el comportamiento de thigmotaxis y aumentando la distancia total recorrida.



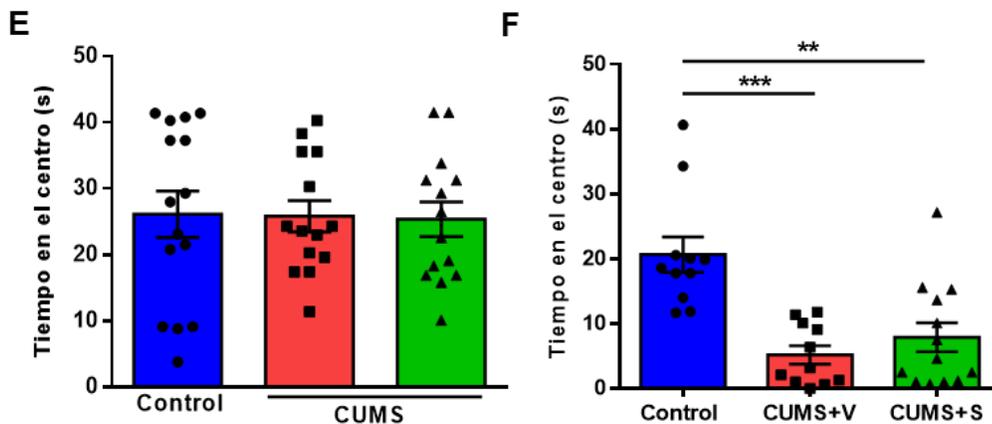


Figura 19. Evaluación del comportamiento asociado a la regulación emocional. A)

En la evaluación de la distancia total recorrida en el campo abierto de ratas sometidas a CUMS durante 8 semanas en comparación a ratas control sin estrés no se observaron diferencias significativas, Mann Whitney test. **B)** En la evaluación de la distancia total recorrida de las ratas sometidas a CUMS durante 11 semanas y tratadas con cuatro dosis intranasales de vehículo (CUMS+V) en comparación a las ratas del grupo control sin estrés, se observó una reducción significativa en el recorrido total en el campo abierto. Kruskal-Wallis $**p= 0.016$ vs control y al comparar el grupo de animales tratados con cuatro dosis intranasales de secretoma derivado de hAD-MSC preconditionadas (CUMS+S) no se observó diferencia. Kruskal-Wallis $p=0.06$. **C)** Al evaluar el índice de thigmotaxis de ratas sometidas a CUMS durante ocho semanas no se observó diferencia con respecto al grupo control. Kruskal-Wallis $p= 0.8227$. **D)** Al evaluar la thigmotaxis a las 11 semanas de CUMS a los animales tratados con cuatro dosis intranasales vehículo vs el grupo control sin estrés aumentaron significativamente la distancia recorrida cercana a la pared en el campo abierto. Kruskal-Wallis $**p=0.002$, mientras que el grupo de animales CUMS tratados con secretoma derivado de hAD-MSC preconditionadas no se observó diferencia comparado con el grupo control. **E)** Al evaluar el tiempo

acumulativo en el centro de ratas sometidas a CUMS por ocho semanas en comparación a las ratas control sin estrés no se observaron diferencias significativas. Mann Whitney test. $p > 0.999$. **F)** Al evaluar el tiempo acumulativo en el centro de ratas sometidas a CUMS por once semanas y tratadas con cuatro dosis intranasales de secretoma derivado de hAD-MSD preconicionadas o vehículo en comparación al grupo control sin estrés se observó una disminución significativa en la permanencia en el centro de los dos grupos de ratas que recibieron estrés y tratamiento. Kruskal-Wallis $**p = 0.004$ vs control, $***p = 0.0003$ vs control. Grupo control $n = 12$, Grupo CUMS $n = 22$, Grupo CUMS+Vehículo $n = 11$, CUMS+Secretoma $n = 11$. Los resultados son expresados como media \pm SEM.

5.2.3.5 Puntuación global del comportamiento similar a la depresión.

Al igual que en el estudio piloto, a partir de los datos obtenidos (**Tabla 4**) tomamos los datos del grupo control, calculamos la media y las desviaciones estándar tanto para la semana 8 como para la semana 11 de CUMS (**Tabla 5**). Se determinaron los rangos y se ponderó el score en las mismas pruebas de comportamiento que se usaron en la instauración del modelo de CUMS: % preferencia a la sacarosa, evaluación del pelaje, tiempo de limpieza del pelaje (SST), OF con sus tres evaluaciones que incluyen la distancia total, índice thigmotaxis y tiempo en el centro. Una vez realizado el puntaje se procedió a eliminar las ratas resilientes. Así de las 17 ratas del grupo CUMS+V y 17 del grupo CUMS+S (34 en total) se eliminaron 6 de cada grupo, dando un porcentaje de resiliencia del 35.3%. De las ratas del grupo control, 18 en total se eliminaron 6, dando un porcentaje de eliminación del 33%.

Rata	Grupo	% Sacarosa 8 sem	EP 8 sem	SST % limpi 8 sem	OF dist total 8 sem	OF thigno 8 sem	OF item centro 8 sem	SCORE TOTAL 8 sem	% Sacarosa 11 sem	EP 11 sem	SST % limpi 11 sem	OF dist total 11 sem	OF thigno 11 sem	OF item centro	SCORE TOTAL 11 sem	
6	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	3
7	1	0	1	2	0	0	0	0	3	0	2	1	0	0	0	3
8	1	0	0	1	0	0	2	0	3	0	1	0	0	0	4	
12	1	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	2	0	1	4	
16	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
18	1	0	0	2	0	1	1	4	0	0	0	2	0	0	2	
31	1	1	1	0	0	0	0	2	0	0	1	1	0	0	2	
36	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
21	1	0	1	1	1	1	1	4	0	0	0	2	0	0	9	
23	1	0	4	2	0	0	0	6	1	1	1	4	0	1	10	
24	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	3	
25	1	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	
26	1	0	1	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	
27	1	0	1	0	0	0	2	4	0	0	0	0	0	2	3	
28	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	
29	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	6	
31	1	3	1	0	0	0	0	4	1	1	1	4	0	0	1	
32	1	0	1	0	1	0	1	3	1	0	0	1	0	0	3	
9	2	0	1	3	0	0	0	5	0	3	1	0	0	0	11	
10	2	0	1	0	0	0	0	3	0	3	0	2	0	3	9	
11	2	0	3	0	0	0	0	3	0	3	0	1	0	0	4	
11	2	2	3	7	0	1	1	7	0	3	1	7	0	2	8	
23	2	4	2	0	1	0	0	8	4	2	0	4	1	1	12	
32	2	0	2	2	0	2	0	6	0	2	0	0	0	0	3	
34	2	2	2	9	0	2	2	5	0	2	0	4	0	3	13	
3	2	0	2	3	0	0	0	10	0	4	0	0	0	0	4	
4	2	4	3	3	0	0	0	10	0	3	0	0	0	0	8	
5	2	0	2	3	0	1	0	2	0	3	0	1	2	2	9	
6	2	0	2	0	0	0	0	2	0	4	0	3	0	3	14	
7	2	0	2	1	0	0	0	3	1	2	0	0	1	3	7	
8	2	0	2	3	0	0	0	5	0	3	0	1	0	2	14	
12	2	0	2	0	0	0	0	2	0	2	0	1	0	2	6	
15	2	0	1	1	0	0	0	2	0	2	0	0	0	2	6	
17	2	0	4	4	1	0	0	9	0	3	0	3	0	1	13	
18	2	0	2	0	0	1	0	3	0	1	0	2	0	3	10	
3	3	0	2	2	0	0	0	4	4	3	0	1	0	0	8	
15	3	0	0	0	1	1	2	4	0	2	1	1	2	3	10	
17	3	0	0	3	0	0	0	3	0	2	1	1	0	0	2	
19	3	1	1	0	0	0	0	3	0	1	1	0	0	0	2	
25	3	0	0	0	0	0	1	1	4	2	0	0	0	1	7	
29	3	2	2	0	0	0	1	5	0	0	1	0	0	0	2	
1	3	0	2	4	0	1	0	7	0	1	0	4	0	4	9	
2	3	0	3	4	0	0	0	7	0	2	0	3	0	3	12	
9	3	0	1	2	0	0	0	3	0	1	2	0	0	4	12	
10	3	1	1	2	0	0	0	4	0	1	2	0	1	4	8	
11	3	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	3	6	
13	3	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	4	
14	3	0	2	3	0	0	1	6	0	0	2	0	2	3	9	
16	3	0	1	1	0	0	0	2	2	0	0	0	0	1	4	
19	3	0	2	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0	1	8	
20	3	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	
7	3	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0	1	1	2	7	

Tabla 5. Puntaje global obtenido, a las 8 semanas y 11 semanas, por los animales sometidos a CUMS en la evaluación del potencial antidepressivo del secretoma. Grupo: 1=control, 2= vehiculo, 3=secretoma

Finalmente, al hacer las comparaciones del puntaje total de depresión entre grupos, observamos un aumento significativo en el puntaje global de comportamiento similar a la depresión en animales sometidos a CUMS durante 8 semanas comparados con los animales no estresados (**Figura 20A**), indicándonos que se indujo el estado depresivo esperado y que se podía dar inicio al tratamiento. Once semanas después del inicio del protocolo CUMS y con tratamiento en las últimas tres semanas, los animales tratados con vehículo (CUMS+V) mostraron un aumento significativo en la puntuación de comportamiento, el que se observó significativamente reducido, aunque no de manera total, en los animales a los que se les administró intranasalmente secretoma (CUMS+S) (**Figura 20B**), lo que sugiere un posible efecto antidepresivo del biofármaco.

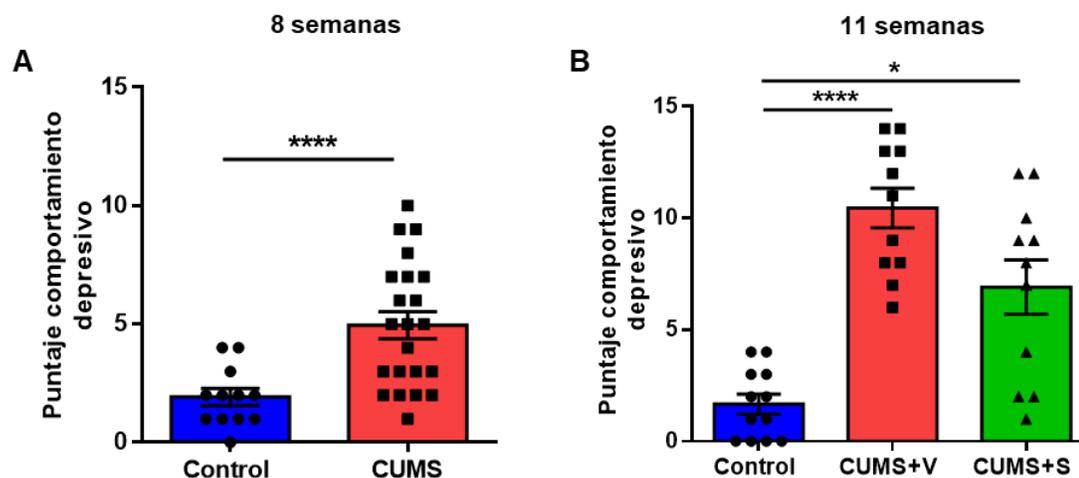


Figura 20. Puntaje global de comportamiento similar a la depresión. Se incluyó los puntajes de %SPT, distancia total recorrida, tiempo acumulativo en el centro, índice de thigmotaxis en OF, y SC de ratas sometidas a CUMS y de animales control no

estresados. **A)** Al evaluar de manera global el puntaje de depresión de ratas sometidas a CUMS durante 8 semanas antes de inicio de tratamiento y comparándola con el grupo control se observó una puntuación significativamente mayor en el comportamiento similar a la depresión en los animales sometidos a estrés. Grupo control n=12, grupo CUMS n=22. Mann Whitney test ****p<0.001. **B)** Al evaluar el puntaje global de depresión de ratas sometidas CUMS durante 11 semanas y tratadas con cuatro dosis intranasales de secretoma derivado de hAD-MSC precondicionadas o vehículo en comparación al grupo control sin estrés, se observó una puntuación significativamente mayor en las ratas tratadas con vehículo (CUMS+V), siendo menos significativa la diferencia en puntuación de las ratas tratadas con secretoma (CUMS+S) en comparación a los animales control no estresados. Al comparar el grupo de ratas CUMS+V con el grupo de ratas CUMS+S se observa que hay una disminución del puntaje depresivo de las ratas tratadas con secretoma. Grupo control n=12, Grupo CUMS+V n=11; Grupo CUMS+S n=11. Kruskal-Wallis test ****p<0.0001 vs control, * p= 0.02 vs CUMS+V. Los datos son expresados como media \pm SEM.

5.2.3.6 Evaluación de los niveles de factores pro-inflamatorios en la corteza frontal y el hipocampo.

Como una aproximación para evaluar la presencia de neuroinflamación, medimos los niveles de ARNm de tres de las principales citoquinas pro-inflamatorias en la corteza prefrontal y el hipocampo de los animales, once semanas después del inicio del protocolo CUMS. Los niveles de expresión de IL-1 β , IL-6 y TNF- α no mostraron diferencias significativas entre los animales control

y sometidos a CUMS en ambas regiones analizadas independientemente de si habían recibido secretoma o vehículo (**Figura 21A, B, C, D, E y F**).

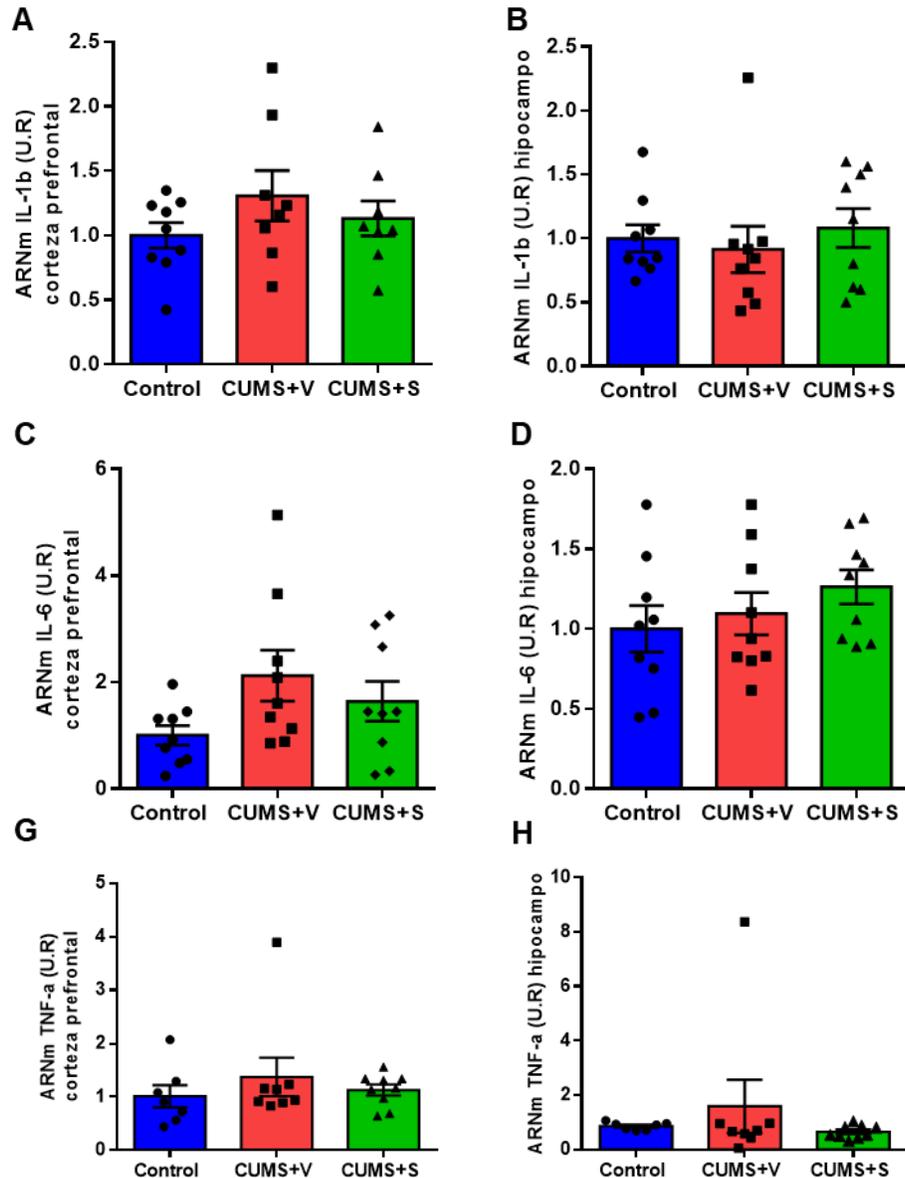


Figura 21 . Evaluación de niveles de citoquinas pro-inflamatorias. A, B, C, D, E y F)

Al evaluar los niveles de expresión de citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α determinada por RT-qPCR en corteza prefrontal e hipocampo en ratas sometidas a

CUMS por once semanas y tratadas con cuatro dosis intranasales de secretoma derivado de hAD-MSC precondicionadas o vehículo en comparación al grupo control sin estrés no se observaron diferencias significativas. Los niveles de expresión fueron determinados por el método $\Delta\Delta\text{Ct}$ y normalizado contra la expresión de GAPDH en la misma muestra. Los resultados son expresados como media \pm SEM. Grupo control n=9, Grupo CUMS+V n=9, Grupo CUMS+S n=9. Kruskal-Wallis test.

5.2.3.7 Evaluación de la densidad astrocítica, densidad microglial y de los procesos de los astrocitos en la región CA1 del hipocampo.

Las glías responden activamente a una injuria neuronal⁷⁵ y son responsables de los cambios inflamatorios y degenerativos en el cerebro, jugando un rol significativo en la disrupción de la neuroplasticidad y exacerbación de la depresión⁷⁶. En respuesta al estrés, los astrocitos se activan e incrementan su densidad y la expresión de su proteína del citoesqueleto, GFAP⁷⁵. Si este estrés se vuelve crónico, en los astrocitos se genera una atrofia estructural que se evidencia por la disminución de la longitud de sus procesos y aumento del volumen nuclear^{24,77, 78}.

Para la evaluación de la densidad microglial y astrocítica, tomamos 6 muestras de cortes coronales del giro dentado del hipocampo por cada grupo de ratas sometidas a CUMS durante 11 semanas y se realizó inmunotinción contra

GFAP e Iba-1, las que fueron analizadas mediante microscopía confocal (**Figura 22**).

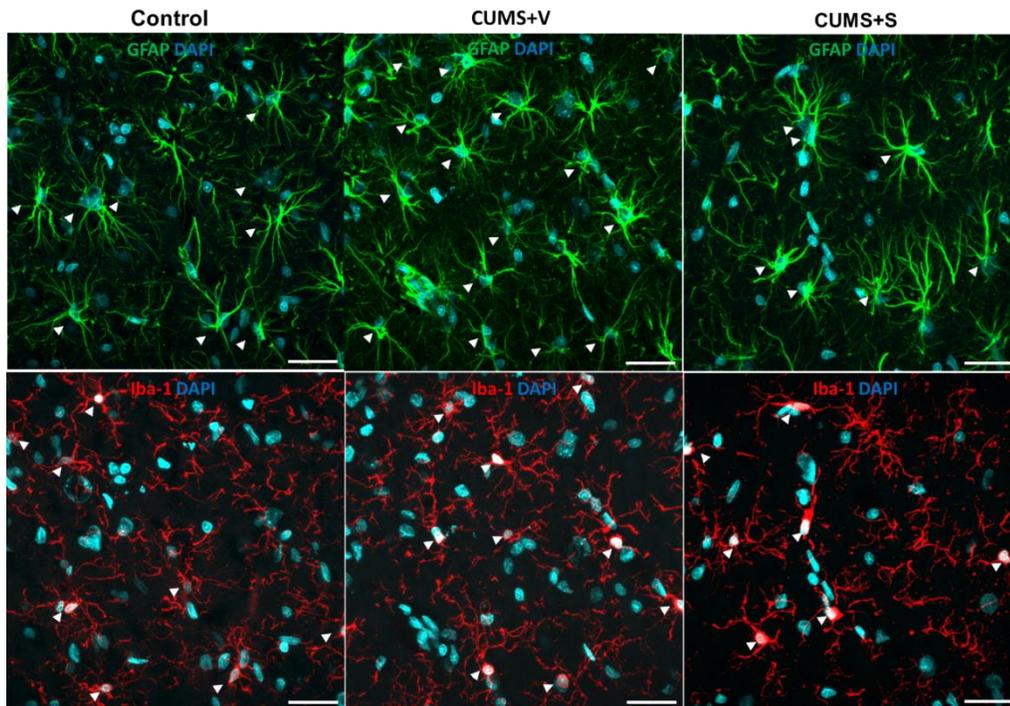


Figura 22. Microfotografías representativas obtenidas con microscopía láser confocal de la región CA1 del hipocampo. Se realizó inmunotinción en cortes de hipocampo de ratas del grupo control sin estrés y ratas sometidas a CUMS durante once semanas y tratadas con cuatro dosis intranasales de secretoma derivado de hAD-MSC precondicionadas o vehículo. Azul DAPI tinción de núcleos. GFAP proteína acidica fibrilar glial (verde). Iba-1 proteína adaptadora de unión a calcio ionizada 1 (rojo). Flechas blancas señalan células positivas para marcaje. Escala de la barra 100um (magnificación 60X).

A partir de las microfotografías obtenidas con microscopía láser confocal de la región CA1 (*stratum radiatum*) del hipocampo se cuantificó el número de astrocitos y microglias para evaluar la densidad de estas glías. En las ratas sometidas a CUMS y tratadas con vehículo o secretoma, no observamos un aumento en la densidad microglial, pero sí se observó un aumento significativo de la densidad astrocítica en el hipocampo del grupo CUMS al que se administró vehículo respecto del grupo control. El tratamiento con cuatro dosis intranasales de secretoma revirtió este aumento en la densidad astrocítica ya que este grupo es significativamente diferente al vehículo y no tiene diferencia con el control (**Figura 23A y B**). El aumento en la densidad de astrocitos inducido por el estrés, podría ser un indicativo de la astrogliosis generada por el estrés continuo⁷⁷. Alteración que de acuerdo a nuestros resultados es normalizada con el tratamiento con secretoma. Posteriormente, se analizó la longitud de los procesos astrocíticos, para esto empleamos el programa ImageJ con el plugins neuroanatomy y la opción SNT (Simple Neurite Tracer). Esta herramienta permite la reconstrucción tridimensional de los procesos primarios astrocíticos. Observamos que el grupo de ratas estresadas que recibieron el vehículo presentaron astrocitos con ramificaciones significativamente más cortas al comparar con el grupo control y con el grupo de ratas tratadas con cuatro dosis de secretoma (**Figura 23C**).

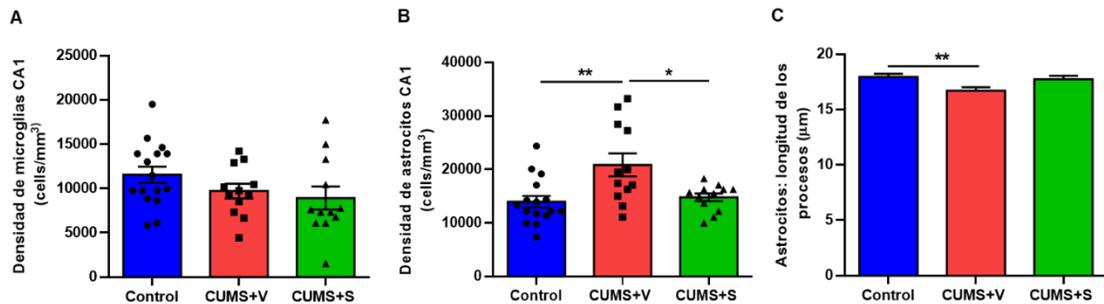


Figura 23. Evaluación estructural de neuroinflamación en CA1 del hipocampo de ratas sometidas a CUMS durante once semanas y tratadas con administración intranasal de secretoma o vehículo. A) Al evaluar la densidad de microglías (Iba-1 positivas) no se observaron diferencias significativas entre los grupos sometidos a estrés con y sin administración intranasal de secretoma respecto a las ratas del grupo control sin estrés. ANOVA una vía. **B)** Al evaluar la densidad de astrocitos (GFAP positivos) observamos que en las ratas sometidas a CUMS y tratadas con vehículo la densidad astrocítica está aumentada significativamente con respecto a las ratas del grupo control y este aumento también es significativo al compararlo con las ratas sometidas a CUMS y tratadas con secretoma. ANOVA una vía, prueba de Tukey comparaciones múltiples, ** $p < 0.005$, * $p = 0.05$. **C)** Al evaluar la longitud de los procesos primarios de los astrocitos en las ratas del grupo CUMS tratadas con vehículo se observó que la longitud de sus ramificaciones eran significativamente más cortas comparadas con las de las ratas del grupo control sin estrés. Mientras que no se observaron diferencias significativas en la longitud de las ramificaciones de los astrocitos de las ratas CUMS tratadas con secretoma en comparación con las de las ratas control sin estrés. ANOVA una vía, prueba de Tukey comparaciones múltiples. ** $p < 0.01$. Los resultados son expresados

como media \pm SEM. n=6 por grupo experimental. GFAP: proteína acidica fibrilar de la glía. Iba-1: proteína adaptadora de unión a calcio ionizada.

5.2.3.8 Evaluación de neurogénesis hipocampal adulta.

Las neuronas del giro dentado del hipocampo generadas en la adultez son necesarias para el control del estado de ánimo y un posible blanco de los efectos neuroconductuales de los antidepresivos⁵¹. En roedores, el estrés no siempre disminuye la neurogénesis y algunos efectos de los antidepresivos son independientes de la neurogénesis⁷⁹.

Para la evaluación de la neurogénesis hipocampal adulta, tomamos 6 muestras de cortes coronales del giro dentado del hipocampo por cada grupo de ratas sometidas a CUMS durante 11 semanas, y se realizó inmunotinción contra NeuN, DCX y Ki67, las que fueron analizadas mediante microscopía confocal (**Figura 24**).

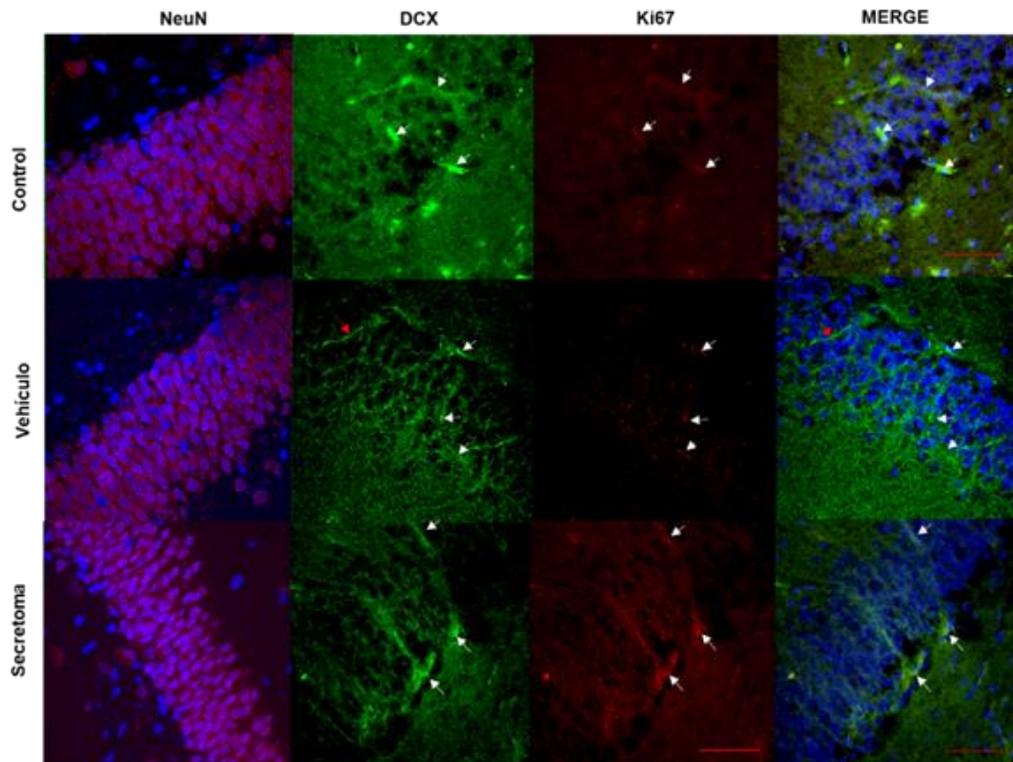


Figura 24. Microfotografías representativas de neurogénesis hipocampal obtenidas por microscopía láser confocal del giro dentado. Se realizó inmunotinción en cortes de hipocampo de ratas del grupo control sin estrés y ratas sometidas a CUMS durante once semanas y tratadas con cuatro dosis intranasales de secretoma derivado de hAD-MSC preconditionadas o vehículo. Azul DAPI tinción de núcleos. NeuN proteína específica de neurona (rojo). DCX neuronas inmaduras (verde). Ki67 marcador de célula en proliferación (rojo) y células con doble marcaje (merge) para neuroblastos neuronales. Flechas blancas señalan células positivas para marcaje. Flecha roja en DCX vehículo indica una célula positiva para DCX y negativa para Ki67. Escala de la barra 250um (magnificación 60X).

Al realizar las cuantificaciones no se observó un aumento significativo en el número de neuronas maduras (NeuN positivo) en el grupo de ratas CUMS que recibió cuatro dosis de tratamiento con secretoma con respecto al grupo de control sin estrés (**Figura 25A**). Para el número de neuronas inmaduras (DCX positivas) y neuroblastos neuronales (DCX y Ki67 positivos) tampoco se observaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos experimentales (**Figura 25B y C**).

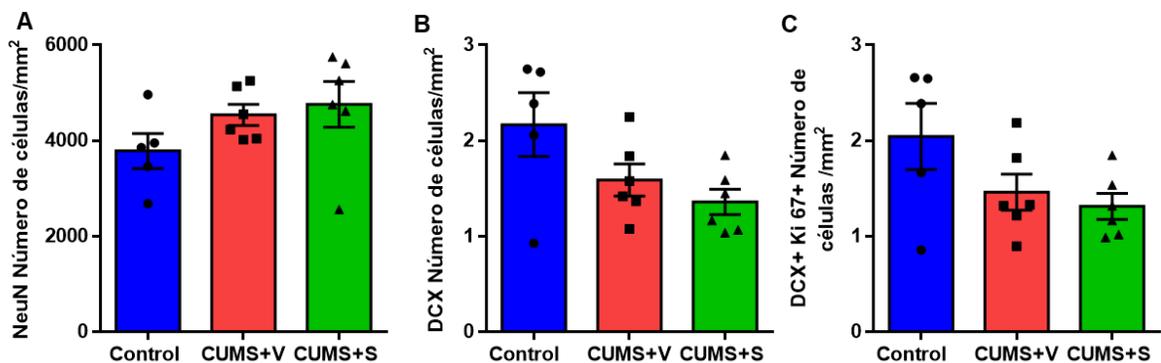


Figura 25. Cuantificación de neuronas en el giro dentado del hipocampo de ratas sometidas a CUMS durante once semanas y tratadas con administración intranasal de secretoma o vehículo. A) Al evaluar el número de neuronas maduras (NeuN positivas) no se observó diferencias significativas de las ratas del grupo CUMS tratadas con secretoma o vehículo con respecto a las ratas de grupo control. Kruskal-Wallis $p > 0.09$. **B)** Al evaluar el número de neuronas inmaduras (DCX positivas) y **C)** el número de neuroblastos neuronales (doble marcaje Ki67 positivas + DCX positivas) no hay diferencias significativas con respecto a las ratas del grupo control sin estrés. Los resultados son expresados como media \pm SEM. $n=6$ por grupo experimental. NeuN:

proteína específica de neurona. DCX: doblecortina. Ki67: marcador de proliferación. DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindole. Kruskal Wallis test.

Adicionalmente evaluamos los niveles de los factores neurotróficos asociados a neurogénesis en el hipocampo. De manera similar a lo antes descrito para las citoquinas proinflamatorias, no observamos cambios inducidos por el estrés o la administración de secretoma en los niveles de ARNm de los factores neuroprotectores BDNF y NGF en el hipocampo después de once semanas de protocolo de estrés (**Figura 26A y B**).

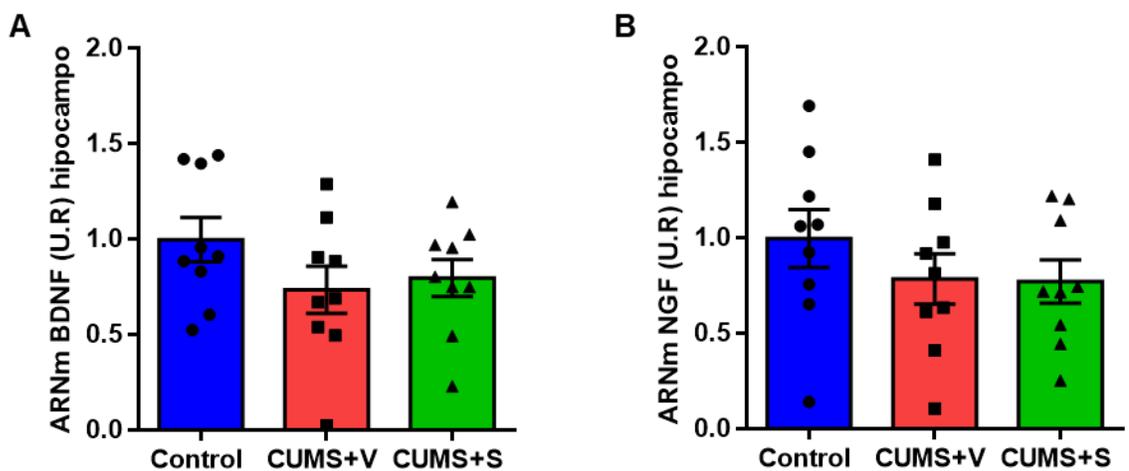


Figura 26. Evaluación de niveles de factores neurotróficos en el hipocampo. A y B)

Al evaluar los niveles de expresión de los factores neurotróficos BDNF y NGF determinado por RT-qPCR en hipocampo de ratas sometidas CUMS por once semanas y tratadas con cuatro dosis intranasales de secretoma o vehículo en comparación a las ratas del grupo control sin estrés no se observaron diferencias significativas. Los niveles de expresión fueron determinados por el método $\Delta\Delta C_t$ y normalizado contra la expresión

de GAPDH en la misma muestra. Los resultados son expresados como media \pm SEM.

Grupo control n=9, Grupo CUMS+V n=9, Grupo CUMS+S n=9. Kruskal Wallis test.

6. DISCUSIÓN

Los modelos animales son fundamentales para ayudar a dilucidar la neurobiología humana de la depresión⁷¹, permitiendo estudiar los efectos fisiológicos del estrés crónico en el comportamiento^{80,81}. Adicionalmente, son una herramienta clave en la investigación preclínica de nuevos fármacos con potencial antidepressivo, permitiendo la identificación de nuevos sitios de acción y respuesta al tratamiento⁶². Por lo tanto, para evaluar el potencial terapéutico del secretoma derivado de hAD-MSC como posible nuevo fármaco en el tratamiento del TDM fue necesario instaurar el modelo CUMS en nuestras dependencias. La anhedonia es un síntoma central en el TDM y un marcador muy importante en los animales sometidos a CUMS⁶². Sin embargo, se ha descrito una alta variabilidad en la capacidad de generar anhedonia en los animales sometidos a CUMS en reportes de diferentes laboratorios⁸². El protocolo de estresores aplicado en nuestro laboratorio fue exitoso en inducir la anhedonia en el ensayo piloto, en el que los animales fueron sometidos a ocho semanas de este protocolo CUMS. En este modelo, la anhedonia se evidenció como una reducción en el porcentaje de consumo de agua con sacarosa en relación al agua pura⁶⁸ en el grupo de animales sometidos a estrés. Junto con este marcador, los animales sometidos a CUMS mostraron una reducción significativa del peso corporal y un marcado deterioro en el estado de su pelaje. Los efectos observados dan cuenta del éxito del protocolo CUMS en inducir cambios fisiológicos y conductuales relacionados con el TDM y coincide con lo informado

por Congli Hu y colaboradores⁶⁶. En nuestros animales no se observaron signos de ansiedad ni alteraciones en la locomoción, las que sí han sido descritas por otros autores⁶⁶. En síntesis, los animales sometidos a CUMS en nuestro ensayo piloto se caracterizaron por mostrar signos neurovegetativos (disminución peso corporal), lo que es comparable a lo observado en algunos pacientes con depresión⁶⁶, además de una disminución en el autocuidado y el aseo,⁸³ lo que podría ser comparado con la disminución del comportamiento motivado que se observa en los pacientes deprimidos⁶⁶.

Coincidente con lo descrito previamente^{70,82}, observamos una gran heterogeneidad en la respuesta conductual a nivel individual a la aplicación del mismo grupo de estresores. Para abordar esta variabilidad individual utilizamos criterios de corte para las diferentes medidas de comportamiento y así separar nuestra muestra de animales en subgrupos (alta, media y baja respuesta al estrés)⁷¹. Este abordaje es cercano a lo que se hace en la práctica clínica, ya que en pacientes humanos también existe gran variabilidad en la expresión de síntomas asociados a la depresión⁷¹. De hecho, la presentación de la depresión en pacientes humanos se considera una condición heterogénea tanto clínica como etiológicamente⁸⁴ y además, es posible identificar subpoblaciones dentro del universo de pacientes deprimidos a partir de una variable observada. La identificación de los subtipos de depresión es relevante para lograr un mejor manejo clínico⁸⁴. Dentro de los subtipos de depresión identificados se encuentran por ejemplo: la depresión atípica, estacional y melancólica⁸⁵. De manera similar

a la heterogeneidad de los síntomas psiquiátricos, también las alteraciones fisiológicas son variables y los pacientes difieren tanto en los parámetros que se ven afectados como en la dirección en que se observa la alteración⁸⁶.

Esta heterogeneidad es difícil de incorporar en un modelo animal. Aunque se han realizado valiosas contribuciones para avanzar en este sentido^{87,88,89}, aún queda mucho trabajo por hacer para validar modelos animales de subtipos específicos de depresión. En lugar de utilizar perfiles de subtipos para modelos de depresión en roedores, el uso de una puntuación general de depresión permite incorporar varios parámetros de comportamiento, para así evaluar el éxito del modelo en su conjunto y el efecto de un posible tratamiento.⁶⁶

En nuestros experimentos, el uso de criterios de corte permitió dar un puntaje individual al animal y así discriminar el grado de afectación por el estrés, mostrando que las puntuaciones más altas corresponden a los animales con mayores signos de depresión. Estos criterios de corte permiten sacar del estudio a aquellos animales sometidos a CUMS que obtuvieron puntaje similar a los animales del grupo control sin estrés, tomando a estos animales como resilientes o no respondedores al estrés. Usando este método de clasificación observamos una diferencia significativa en el comportamiento de los animales sometidos al protocolo CUMS con respecto al grupo de animales utilizados como control, lo que nos permitió validar el uso de este modelo de TDM en nuestro laboratorio.

En estos animales del grupo piloto que fueron sometidos sólo a 8 semanas de CUMS, a nivel del SNC observamos una alteración en la neurogénesis

hipocampal adulta correspondiente a una disminución significativa del número de neuronas inmaduras en el giro dentado del hipocampo y también una disminución de los neuroblastos presentes en esta área cerebral, que no alcanzó significancia estadística ($p= 0.06$). Esta alteración en la neurogénesis, aumenta la validez de nuestro modelo ya que da cuenta de un sustrato de alteraciones biológicas que subyacen a la alteración del comportamiento que observamos. Hay evidencia que asocia esta alteración en el hipocampo con conductas tipo depresiva en animales como la anhedonia y la ansiedad.⁹⁰

El uso de secretoma obtenido a partir de células madre mesenquimáticas para el tratamiento de patologías neuroinflamatorias^{52,53} y neurodegenerativas ha generado gran interés y un importante volumen de investigación ya que estas células secretan de manera paracrina una gran variedad de moléculas con alto potencial terapéutico que incluyen factores neuroprotectores como bFGF, BDNF, NGF, VEGF⁹¹, moléculas anti-inflamatorias como IL5, IL10, IDO y TSG6, moléculas angiogénicas como VEGF y angiopoyetinas y moléculas antiapoptóticas entre otras⁵⁶. Dado que en la mayoría de los casos el efecto terapéutico está generado por las moléculas secretadas por las células y no por las células mismas, se ha sugerido que no es necesario usar la célula completa para el tratamiento. Además, la abundancia de estas moléculas puede aumentarse sometiendo a las células a un estímulo de preconditionamiento *in vitro*⁵². Esto hace que sea más sencillo y seguro una posible terapia para el TDM ya que el secretoma conteniendo las moléculas terapéuticas puede obtenerse

facilmente a partir del medio de cultivo de las células y ser administrado no invasivamente de forma intranasal para llegar eficientemente al cerebro⁵². Adicionalmente, el uso de secretoma permite eliminar ciertos riesgos asociados a la administración de células vivas como son la posibilidad de generación de trombos, la diferenciación de las células a estructuras no deseadas o la proliferación descontrolada de estas células luego de su administración.

Para la evaluación del potencial antidepressivo del secretoma replicamos el protocolo CUMS utilizado en el experimento piloto. A las ocho semanas de CUMS evaluamos la inducción del estado depresivo observando que, junto con el desarrollo de anhedonia evidenciado en este caso por una disminución significativa en el tiempo acumulado de interacción con la orina de ratas hembra en fase estral (prueba FUST), a nivel vegetativo hubo una reducción significativa del peso corporal y etológicamente este estado similar a la depresión estuvo acompañado de signos de ansiedad y deterioro del estado de su pelaje. La replicación de estos signos y síntomas similares a la depresión en este grupo de ratas sometidas a CUMS nos permitió proseguir con la evaluación del potencial antidepressivo del secretoma. A las once semanas de protocolo CUMS los datos mostraron que la administración intranasal de cuatro dosis de secretoma derivado de hAD-MSC precondicionadas produjo un efecto beneficioso en la manifestación conductual del fenotipo depresivo inducido por el estrés en las ratas macho adultas, representado por una reducción significativa en el puntaje global de depresión.

De acuerdo con el razonamiento utilizado para evaluar las ratas en nuestro piloto, evaluamos las conductas relacionadas con el autocuidado, la ansiedad y el hedonismo en este grupo de animales. Cuando estos parámetros se evaluaron por separado, la modificación de los comportamientos por la experiencia de estrés crónico no fue evidente para todos los comportamientos en todos los puntos de tiempo evaluados, y lo mismo se observó con respecto a los efectos del tratamiento con secretoma. Sin embargo, cuando el efecto de cada comportamiento se tomó como contribuyente a un estado general de depresión, lo que permite observar efectos aunque los subperfiles varíen entre diferentes animales como es el caso de los pacientes humanos, se observó un efecto sólido en los animales sometidos a estrés crónico, evidenciado por un aumento significativo del puntaje global de depresión, el que fue revertido por la administración intranasal del secretoma. Más específicamente, el estrés crónico tuvo un efecto deletéreo en los animales a los que se suministró vehículo, mientras que el tratamiento con secretoma redujo de manera general los comportamientos depresivos inducidos por el estrés.

Si bien en general se acepta la existencia de diferentes subtipos de depresión en los pacientes, sigue siendo discutible que los diferentes perfiles puedan estar relacionados con las diferencias en los mecanismos que inducen la depresión. En humanos, por ejemplo, las alteraciones de las hormonas sexuales, las enfermedades crónicas y los traumas infantiles son factores distintos que pueden activar diferentes mecanismos fisiológicos^{4,92}. En el presente estudio

todas las ratas estuvieron expuestas a la misma combinación de factores estresantes desarrollando un estado similar a la depresión. Sin embargo, las diferencias interindividuales en el grado de alteración de los diferentes comportamientos podrían explicarse por diferencias genéticas sutiles⁹³ y diferencias en la experiencia de estrés como por ejemplo, ser el primer o el último animal en ser manipulado en la aplicación de un estresor específico ya que esto podría estar relacionado con la anticipación a la experiencia estresante o al contagio del estrés⁹⁴. Sin embargo, el estrés redujo consistentemente a través del tiempo, la ganancia de peso en todos los animales. Este resultado ha sido indicado como un marcador confiable de efecto del estrés⁶⁸, por lo que los resultados muestran que el protocolo de estrés utilizado fue lo suficientemente fuerte e indujo un estado similar a la depresión según lo previsto.

En el presente estudio, pudimos observar un efecto, aunque no fue significativo, de reversión del comportamiento anhedónico con la administración de secretoma. Los animales con estrés crónico a los que se les administró secretoma intranasal mostraron un aumento en la exploración del algodón del olor de la orina en la prueba FUST o de motivación sexual en comparación a lo observado en la semana 8 de CUMS. No así sucedió con la prueba de preferencia la sacarosa, en la cual no vimos un efecto claro ya que en el grupo tratado con vehículo no se observó reducción a las ocho semanas de estrés, previo al inicio del tratamiento o a las once semanas una vez terminado el tratamiento. La falta de efecto de la administración del secretoma en el consumo de sacarosa

probablemente se explique porque la preferencia por la sacarosa no se redujo en los animales CUMS tratados con vehículo a las ocho semanas (a diferencia de lo observado en el estudio piloto) ni después de once semanas de estrés continuo. Otra explicación posible es que este efecto de disminución del consumo de la sacarosa pudo haberse enmascarado debido a que nuestro grupo control sin estrés en esta ocasión tuvo una menor preferencia por la sacarosa con respecto al grupo control en el estudio piloto. Si bien el porcentaje de preferencia por sacarosa es una buena medida de anhedonia, que da cuenta de la inducción de un estado depresivo, la reducción en la preferencia por sacarosa a veces es complicada de replicar^{82,68}, hecho que fue demostrado por un estudio realizado por Willner en el 2017 en donde reporta que al menos el 25 % de los laboratorios que utilizaron el modelo CUMS para inducir depresión tuvieron problemas para demostrar la anhedonia mediante el consumo de preferencia por la sacarosa⁸². Por lo anterior, podría considerarse que la medida de preferencia por la sacarosa como marcador estándar del comportamiento similar a la depresión no es lo suficientemente robusto⁶⁸ para ser usado como único marcador y descartar el estado depreseivo en ausencia de una reducción en la preferencia por sacarosa. También se podría considerar que, la no reducción en el consumo de sacarosa podría explicarse porque en determinadas circunstancias, el estrés no conlleva a la anhedonia sino que aumenta la motivación de recompensa y la sensibilidad a la recompensa⁹⁵. De hecho, los problemas de consumo de

alcohol/sustancias y la obesidad están relacionados con el estrés y (al menos en teoría) implican una mayor búsqueda de recompensa⁹⁵.

Algo interesante de destacar, es que, en la prueba de motivación sexual, el grupo de animales tratados con secretoma mostró un aumento en la exploración del algodón humedecido con orina. Este aumento sugiere que es poco probable que el tratamiento con secretoma interfiera negativamente con la libido, lo que es prometedor para el uso potencial de este biofármaco como antidepresivo en humanos. La actividad sexual también se ha utilizado para evaluar el comportamiento similar a la anhedonia y se considera una medida de recompensa natural. Esta medida también tiene validez aparente, dado que muchos pacientes deprimidos exhiben disfunción sexual o falta de interés⁸³. Las disfunciones sexuales, incluida la disminución del deseo sexual, son efectos secundarios informados con frecuencia en tratamiento antidepresivo con algunos fármacos en humanos, ya que aproximadamente el 63% de los pacientes deprimidos medicados informan problemas sexuales⁹⁶. Entre los fármacos reportados que acompañan a estas alteraciones sexuales se encuentran los fármacos antidepresivos más utilizados, en particular los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina⁹⁷, presentando los hombres una mayor reducción del deseo sexual que las mujeres⁹⁸, lo que hace que el efecto del secretoma sobre el aumento de la motivación sexual en ratas macho sea clínicamente relevante.

Adicionalmente, es importante destacar que la administración intranasal de secretoma revirtió el deterioro del estado del pelaje, lo cual es un indicador

importante de su potencial para inducir cambios en la conducta de tipo depresiva. El deterioro del pelaje se asocia con el comportamiento apático⁶⁶, cuyo componente ha sido descrito como un índice confiable y bien validado de una inducción de conducta tipo depresiva⁹⁹ y aumenta la validez aparente en nuestro modelo de estrés crónico impredecible⁶⁶. Además de robustecer nuestro modelo, su reversión del estado deteriorado del pelaje luego de la administración de secretoma es prometedor en cuanto a su potencial como psicofármaco ya que tiene un efecto similar a lo reportado con el tratamiento con fluoxetina que luego de tres semanas de tratamiento revirtió significativamente el deterioro del pelaje⁹⁹. En la otra prueba conductual relacionada con la apatía, la prueba de rociado de sacarosa, no se observó la diferencia esperada, esto podría deberse a varios factores como por ejemplo, que el tiempo de observación fue corto. De hecho, los animales del grupo control no había terminado de limpiarse por completo a los 5 minutos y también se apreciaba que la microestructura del acicalamiento no era igual entre los grupos. En un futuro podría disectarse esta microestructura analizando la duración de cada evento de limpieza y determinar si su patrón se limitó a sólo la limpieza facial, por ejemplo. Otro inconveniente que tuvimos y que probablemente influyó en los resultados obtenidos es la cantidad de solución de sacarosa dispersada en el lomo del animal, ya que no encontramos en la literatura un estándar de volumen, por lo que la cantidad de sacarosa administrada podría haber sido excesiva.

En la prueba de campo abierto (OFT), la administración intranasal de secretoma mitigó el comportamiento depresivo de los animales sometidos a CUMS, mostrando un potencial ansiolítico del biofármaco. En estos experimentos se obtuvieron resultados comparables de la administración del secretoma a los que obtuvieron Song y cols al eliminar el inflamasoma NLRP1, un complejo proteico de la familia de receptores similares al dominio de oligomerización de nucleótidos (NOD) (NLR) que está involucrado en la neuroinflamación. En estos animales su bloqueo evitó la inducción de estrés crónico, ansiedad y anhedonia¹⁰⁰. En el mismo estudio, los autores demostraron que el estrés crónico podía activar el inflamasoma NLRP1 en el hipocampo. Curiosamente, la activación de NLRP1 en respuesta al estrés promovió la liberación de citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-18, IL-6 y TNF- α . Como describimos previamente, el secretoma derivado de hAD-MSC precondicionadas con TNF- α e IFN- γ durante 48 horas, contiene factores neuroprotectores y anti-inflamatorios que podrían contrarrestar la activación de NLRP1 inducida por el estrés y por consiguiente contrarrestar la neuroinflamación. Esto podría representar un mecanismo potencial para los efectos antidepresivos del secretoma observados en el modelo CUMS, que merece una mayor exploración.

Como se mencionó anteriormente, la depresión tiene dos síntomas centrales que pueden presentarse juntos o de forma independiente, como son la anhedonia y el estado de ánimo deprimido. En nuestro experimento no se pudo evidenciar la inducción de anhedonia, pero si las otras conductas relacionadas

con un estado de ánimo deprimido, como son un estado apático (estado del pelaje), un estado ansioso, (thigmotaxis) y cambios en el peso corporal, las que fueron atenuadas, excepto en el caso del peso corporal, en mayor o menor grado con el tratamiento con secretoma.

Abundante evidencia obtenida en los últimos años relaciona la inflamación con el desarrollo de trastornos mentales como la depresión y síntomas como la impulsividad, la agresividad y los sentimientos de impotencia, todos ellos relacionados entre sí y asociados positivamente con la inflamación¹⁰¹. Por ello, abordar la respuesta neuroinflamatoria asociada al estrés y a la depresión podría ser clave para prevenir la ideación suicida y reducir la mortalidad asociada a la salud mental de estos pacientes. Además, un estado proinflamatorio elevado (como lo muestran los niveles elevados de proteína C reactiva en pacientes deprimidos) está asociado con la resistencia al tratamiento¹⁰², lo que nuevamente enfatiza que una mayor investigación sobre los tratamientos anti-inflamatorios podría ser una forma novedosa de mejorar los tratamientos para pacientes deprimidos, particularmente pacientes que no responden a las opciones actualmente disponibles.

A nivel molecular, no se observaron alteraciones en los niveles de ARNm de tres de las principales citoquinas proinflamatorias en la corteza prefrontal y el hipocampo de los animales, ni en los niveles de los factores neuroprotectores BDNF o NGF en el hipocampo. Sin embargo, mientras los niveles de estos factores pueden indicar diferentes situaciones ya que es necesario tener en

cuenta el balance entre las moléculas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, un marcador inequívoco del desarrollo de neuroinflamación a nivel del hipocampo es el hallazgo de alteraciones en el número o fenotipo estructural de los astrocitos. Al hacer la evaluación estructural de los astrocitos en la región CA1 del hipocampo vimos que en los hipocampos de las ratas sometidas a estrés y tratadas con vehículo los astrocitos estaban significativamente aumentados y con atrofia en sus procesos primarios, lo que es congruente con la respuesta del proceso de neuroinflamación¹⁰³. Mientras que en el grupo que recibió tratamiento con secretoma no se observaron diferencias significativas en la densidad de astrocitos ni en el largo de las prolongaciones en comparación con los animales del grupo control. Este resultado condice con lo descrito por Campos y cols en su grupo de investigación donde vieron que el secretoma (derivado de médula ósea humana sin condicionar y aplicado directamente en el giro dentado) incrementó significativamente el número y la longitud de los procesos en los astrocitos⁹¹. Considerando este resultado en los astrocitos, podríamos especular que la administración intranasal de secretoma, debido al alto contenido de moléculas antiinflamatorias, contrarresta el proceso neuroinflamatorio originado por el estrés en los astrocitos. Un resultado inesperado y difícil de explicar es la ausencia de cambios en los niveles de expresión de BDNF en nuestros animales, ya que esta neurotrofina ha demostrado ser relevante en la mediación de los efectos antidepresivos de diferentes fármacos⁶⁸. Sin embargo, es posible que durante las tres semanas de tratamiento los niveles de las moléculas neuroprotectoras y

citoquinas pro-inflamatorias se modificaran sólo de forma transitoria, no siendo detectadas con el diseño experimental utilizado. Tampoco se observaron variaciones significativas a nivel del número de neuronas maduras o de los precursores neuronales en el giro dentado del hipocampo en ninguno de los grupos experimentales estudiados.

Con respecto al perfil de bioseguridad del biofármaco no observamos un efecto tóxico en general ya que por ejemplo al comparar el grupo de animales a los que se les aplicó el secretoma con respecto a los animales a los que se les suministró el vehículo el peso corporal no se vió afectado, la cantidad en gramos de consumo de comida y temperatura rectal fueron iguales. En el momento de la eutanasia se hizo una revisión de la estructura macroscópica del cerebro y tampoco se observaron cambios.

Finalmente cabe anotar que nuestro estudio presento ciertas limitaciones entre las cuales destacamos que el número total de animales utilizados para el estudio fue un 13,33% menor al n calculado, lo que puede haber afectado la significancia estadística de alguno de los resultados obtenidos. Además, hubo condiciones ambientales no ideales, como fluctuaciones grandes de temperatura (18°C-26°C) y humedad (hasta un 80%) en el bioterio en los días de ejecución de las pruebas conductuales. Otra limitación muy importante fue el alojamiento de las ratas del grupo control, ya que por cuestiones de espacio tuvo que ser compartido con otras ratas de otros experimentos, evento que conllevó a que estuvieran expuestas a ruido, olores, tránsito de investigadores lo que pudo

sumar un estrés de base e impactar en los resultados de sus pruebas conductuales.

7. CONCLUSIÓN

En conjunto, los datos presentados en esta tesis muestran que el tratamiento intranasal con secretoma derivado de hAD-MSC precondicionadas es capaz de revertir algunas conductas depresivas y alteraciones estructurales, generando una reducción significativa en el puntaje global de depresión y, por lo tanto, representa un tratamiento potencialmente eficaz para reducir los síntomas de depresión en humanos. Dado su buen perfil de seguridad y su facilidad de administración, es necesario generar mayor investigación sobre el potencial terapéutico de este nuevo biofármaco en el tratamiento de pacientes para los que actualmente no se dispone de alternativas de tratamiento farmacológico eficaces.

8. TABLAS SUPLEMENTARIAS

Ratas grupo control					Ratas grupo CUMS				
Rata	% Sacarosa	Peso g	OF Total	OF tiempo centro	Rata	% Sacarosa	Peso g	OF Total	OF tiempo centro
12	62.84	295	32.6	24.3	3	76.74	280	25.4	12.7
17	68.55	274	32.6	24.3	4	62.61	294	32.8	25
18	48.7	280	28.7	20.3	11	58.62	296	22.2	5.6
14	88.19	277	28.3	16.3	16	50.87	283	40.5	19.2
20	86.13	254	30.6	11.1	19	64.57	295	28.7	16.9
1	87.32	301	20.16	6.9	5	92.56	302	23.3	3.5
6	92.56	299	27.3	17.4	10	94.28	309	23	13.9
8	84.44	298	24.1	14.6	2	89.6	295	20.79	16.1
					15	85.05	288	31.8	24.9
					9	82.46	316	28	27.5
					13	87.81	296	28.6	29.5
					7	88.3	297	27.8	6.9
Media	77.4	284.75	28.045	16.9		77.78	295.92	27.74	16.8
D.S	15.54	16.43	4.25	6.1		14.81	10	5.5	8.74

Tabla Suplementaria 1. Resultados de las pruebas basales para la separación de grupos experimentales en el estudio piloto. La separación de ratas en dos grupos balanceados, grupo control y grupo CUMS, se hizo mediante los resultados de preferencia a la sacarosa, la distancia total recorrida (OF) y tiempo en el centro (OF) junto con el peso corporal.

Estresores	Días de protocolo CUMS
Restricción de agua y comida 22 h	1,8,14,19,34,40,51,54
Inmovilización 2.5 h	3,10,13,17,24,25,27,33,39,43,47,53,56
Jaula inclinada y viruta mojada 22 h	2,6,12,20,26,36,44,50,52,
Luz estroboscópica y amontonamiento social: 7 h	4,9,16,18,21,23,28,46
Amontonamiento social 22 h	5,11,22,35,38,42,48
Luz estroboscópica 2 h e inmovilización 2.5 h	7,15,32,37,41,49,55,57

Tabla Suplementaria 2. Días de aplicación de los estresores propuestos al grupos de ratas experimento piloto. Duración 8 semanas.

Estresores	Días de protocolo CUMS
Restricción de agua y comida 22 h	1,9,16,23,29,36,43,52,62,67,77
Inmovilización 2.5 h	2,12,15,19,26,30,37,42,46,63
Jaula inclinada y viruta mojada 22 h	3,7,14,21,27,33,41,47,55,60,69,75,
Luz estroboscópica y amontonamiento social: 7 h	4,10,13,17,22,28,32,35,40,49,51,61,66,73
Amontonamiento social 22 h	5,11,18,25,31,38,45,50,58,65,72
Luz estroboscópica 2 h e inmovilización 2.5 h	6,8,24,34,39,44,48,53,59,70
Restricción de agua 20 h	54
Restricción de agua y jaula inclinada 16 h	76

Tabla Suplementaria 3. Días de aplicación de los estresores a los grupos de ratas tratadas con vehículo y tratadas con secretoma. Duración 11 semanas.

Ratas grupo control					Ratas grupo CUMS				
Rata	% Sacarosa	Peso g	OF Total	OF tiempo centro	Rata	% Sacarosa	Peso g	OF Total	OF tiempo centro
6	50	171	32.15	17.6	1	29.17	216	18.24	16.1
7	49.32	220	27.57	17	3	81.11	192.8	24.68	12.9
8	78.46	177.6	29.52	23.2	9	80.25	215.1	22.40	20.4
12	68.52	191.1	22.43	13.9	10	69.12	183	29.79	15.4
16	79.31	206.4	33.31	25.7	11	66.67	204.8	29.15	14.4
18	82.35	193.8	30.45	21.3	15	75.34	182.5	25.74	13.8
31	83.54	176.5	29.86	18.8	17	29.87	192.1	33.07	17
36	58.49	183.5	31.28	27	19	41.03	169	34.27	18.8
					23	61.9	212.2	30.19	30.1
					25	73.33	181.5	27.27	38.8
					29	47.5	175.8	35.34	18.2
					32	77.78	173.1	31.20	34.3
					34	71.93	165.2	31.33	28.6
Media	68.75	190	29.57	20.56		61.92	189.47	28.67	21.45
D.S	14.36	16.56	3.37	4.54		18.68	17.67	4.89	8.55

Tabla Suplementaria 4. Resultados de las pruebas basales del primer grupo de animales del experimento de evaluación del secretoma. Al igual que en el experimento piloto se tuvieron en cuenta en la separación de ratas del grupo control y del grupo CUMS, en dos grupos balanceados, los resultados de preferencia a la sacarosa, la distancia total recorrida (OF) y tiempo en el centro (OF) junto con el peso corporal.

Ratas grupo control					Ratas grupo CUMS				
Rata	% Sacarosa	Peso g	OF Total	OF tiempo centro	Rata	% Sacarosa	Peso g	OF Total	OF tiempo centro
21	75.88	308.8	23.90	14.8	1	78.49	310.5	26.13	21.9
22	56.96	270.7	34.58	35	2	88.13	331	23.72	12.3
23	61.42	299.1	31.12	44	3	90.56	316.6	30.70	17.8
24	61.26	294.2	39.16	24.5	4	63.63	308	27.63	22.4
25	67.96	281.8	35.87	28.1	5	85.57	292.7	25.25	11.8
26	65.55	306	27.30	14.2	6	22.97	299.1	27.20	15.4
27	48.38	312.6	32.34	33.2	7	78	247.3	29.42	11.8
28	73.68	286.1	26.88	13.2	8	83.22	293.7	27.93	24.3
29	77.95	280.2	32.42	23.9	9	64.51	258.5	27.32	8.4
32	77.1	297.8	30.40	24.8	10	69.36	246.4	35.22	24.7
					11	71.73	221.1	31.83	21.5
					12	71.55	285.8	26.46	14.1
					13	85.9	275.4	26.07	12.5
					14	53.75	259.8	9.57	12.5
					15	58.22	247.7	32.45	20.2
					16	47.25	273.1	30.9	23.2
					17	79.71	242.2	16.33	7.7
					18	75.38	301.4	30.56	14.1
					19	63.4	301.5	32.0	12.9
					20	87.64	316.1	28.97	14.3
Media	66.614	293.7	31.39	25.57		70.94	281.4	27.28	16.19
D.S	9.77	13.71	4.55	9.97		16.58	30.5	5.75	5.34

Tabla Suplementaria 5. Resultados de las pruebas basales del segundo grupo de animales del experimento de evaluación del secretoma. Al igual que en el experimento piloto se tuvieron en cuenta en la separación de ratas del grupo control y del grupo CUMS, en dos grupos balanceados, los resultados de preferencia a la sacarosa, la distancia total recorrida (OF) y tiempo en el centro (OF) junto con el peso corporal.

9. PRODUCTOS GENERADOS DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS.

Presentación a congresos nacionales (Jornadas de Investigación UDD)

- **2018:** Feria de Ciencia e Innovación UDD, 18 de octubre. Título exposición: “Administración intranasal de secretoma derivado de células madre mesenquimáticas normaliza parámetros bioquímicos y fenotípicos en ratas expuestas a estrés crónico”. Expositora: Alba Ávila.
- **2019:** Feria de Ciencia e Innovación UDD, 17 de octubre. Título exposición: “Inducción de conductas depresivas en un modelo animal de estrés crónico impredecible”. Expositora: Alba Ávila.
- **2020:** Feria de Ciencias e Innovación UDD, 9-13 de noviembre. Título de exposición: “Caracterización conductual y molecular de un modelo pre clínico de trastorno depresivo mayor (TDM) en ratas para el testeo de un biofármaco”. Expositora: Alba Ávila.

Presentación Congresos Internacionales

2021. International Conference on Neurology and Brain Disorders, Roma Italia 9 y 10 de septiembre. Título de la exposición: “Intranasal administration of secretome derived from preconditioned human mesenchymal stem cells reduces the depressive behavior in a rat model of chronic unpredictable mild stress”.
Expositora: Alba Ávila.

Publicaciones Científicas Asociadas a la Tesis

Antioxidant Biomolecules and Their Potential for the Treatment of Difficult-to-Treat Depression and Conventional Treatment-Resistant Depression. Riveros ME, **Ávila A**, Schruers K, Ezquer F. Antioxidants. 2022; 11(3):540.
<https://doi.org/10.3390/antiox11030540>.

Publicaciones Científicas en Colaboración

NGF/TRKA Decrease miR-145-5p Levels in Epithelial Ovarian Cancer Cells.
Garrido MP, Torres I, **Avila A**, Chnaiderman J, Valenzuela-Valderrama M, Aramburo J, Oróstica L, Durán-Jara E, Lobos-Gonzalez L, Romero C. International Journal of Molecular Sciences. 2020; 21(20):7657.
<https://doi.org/10.3390/ijms21207657>

A Novel Morphine Drinking Model of Opioid Dependence in Rats Berríos-Cárcamo, P., Quezada, M., Santapau, D., Morales, P., Olivares, B., Ponce, C., **Ávila, A.**, De Gregorio, C., Ezquer, M., Quintanilla, M. E., Herrera-Marschitz, M., Israel, Y., & Ezquer, F. International journal of molecular sciences. 2022 23(7), 3874. <https://doi.org/10.3390/ijms23073874>

10. REFERENCIAS

1. Dean, J. & Keshavan, M. The neurobiology of depression: An integrated view. *Asian Journal of Psychiatry* (2017). doi:10.1016/j.ajp.2017.01.025
2. Collaborators, M. D. Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic. **398**, (2021).
3. Øverland, S. *et al.* Seasonality and symptoms of depression : A systematic review of the literature. (2020).
4. Malhi, G. S. & Mann, J. J. Seminar Depression. *Lancet* **6736**, 1–13 (2018).
5. Umschweif, G. & Greengard, P. The dentate gyrus in depression. 1–26 (2019). doi:10.1111/ejn.14640
6. Eléonore Beurel, Marisa Toups, C. B. N. The Bidirectional Relationship of Depression and Inflammation: Double Trouble. **107**, 234–256 (2021).
7. Hasin, D. S. *et al.* Epidemiology of Adult DSM-5 Major Depressive Disorder and Its Specifiers in the United States. **75**, 336–346 (2018).
8. Faries, D. *et al.* The responsiveness of the Hamilton Depression Rating Scale. **34**, (2000).
9. Villas Boas, G. R. *et al.* Molecular aspects of depression: A review from neurobiology to treatment. *European Journal of Pharmacology* (2019). doi:10.1016/j.ejphar.2019.02.024
10. Rantamäki, T. & Yalcin, I. Antidepressant drug action - From rapid changes on network function to network rewiring. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* (2016). doi:10.1016/j.pnpbp.2015.06.001
11. Jesulola, E., Micalos, P. & Baguley, I. J. Understanding the pathophysiology of depression: From monoamines to the neurogenesis hypothesis model - are we there yet? *Behavioural Brain Research* (2018). doi:10.1016/j.bbr.2017.12.025
12. Liu, L. *et al.* Hippocampal metabolic differences implicate distinctions between physical and psychological stress in four rat models of depression. *translational psychiatry* **8**, 1–11 (2018).
13. Dale, E., Bang-Andersen, B. & Sánchez, C. Emerging mechanisms and treatments for depression beyond SSRIs and SNRIs. *Biochemical Pharmacology* (2015). doi:10.1016/j.bcp.2015.03.011
14. Lino, C., Oliveira, D., Aparecida, J., Surget, A. & Belzung, C. Do

- antidepressants promote neurogenesis in adult hippocampus? A systematic review and meta-analysis on naive rodents. *Pharmacol. Ther.* **210**, 107515 (2020).
15. Vaishnav Krishnan^{1, 2} and Eric J. Nestler¹. The molecular neurobiology of depression. *Nature* **455**, 894–902 (2009).
 16. Miller, A. H. & Raison, C. L. The role of inflammation in depression : from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nature* **16**, 22–34 (2016).
 17. Cobb, J. A. *et al.* Hippocampal volume and total cell numbers in major depressive disorder. *J. Psychiatr. Res.* **47**, 299–306 (2013).
 18. Feltes, P. K. *et al.* Anti-inflammatory treatment for major depressive disorder : implications for patients with an elevated immune profile and non-responders to standard antidepressant therapy. *J. psychopharmacology* **31**, 1149–1165 (2017).
 19. Abelaira, H. M., Silva, R. H. & Carlessi, A. S. Neuro-Immune Interactions in Depression: Mechanisms and Translational Implications. *Neurobiol. Depress.* 75–88 (2019). doi:10.1016/B978-0-12-813333-0.00008-1
 20. Abelaira, H. M., Reus, G. Z. & Quevedo, J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. *Rev. Bras. Psiquiatr.* **35**, S112–S120 (2013).
 21. Kim, Y. K., Na, K. S., Myint, A. M. & Leonard, B. E. The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* (2016). doi:10.1016/j.pnpbp.2015.06.008
 22. Wu, Y. *et al.* Quantitative proteomics analysis of the liver reveals immune regulation and lipid metabolism dysregulation in a mouse model of depression. *Behav. Brain Res.* (2016). doi:10.1016/j.bbr.2016.05.057
 23. Haase, J. & Brown, E. Integrating the monoamine, neurotrophin and cytokine hypotheses of depression - A central role for the serotonin transporter? *Pharmacol. Ther.* **147**, 1–11 (2015).
 24. Ménard, C., Hodes, G. E. & Russo, S. J. Pathogenesis of depression: insights from human and rodent studies. *Neuroscience* **3**, 138–162 (2017).
 25. Salehpour, F. *et al.* Near-infrared photobiomodulation combined with coenzyme Q10 for depression in a mouse model of restraint stress: reduction in oxidative stress, neuroinflammation, and apoptosis. *Brain Res. Bull.* (2019). doi:10.1016/j.brainresbull.2018.10.010

26. Kraus, C., Castrén, E., Kasper, S. & Lanzenberger, R. Serotonin and neuroplasticity – Links between molecular, functional and structural pathophysiology in depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (2017). doi:10.1016/j.neubiorev.2017.03.007
27. Wang, P. *et al.* Interleukin-6: Its role and mechanisms in rescuing depression-like behaviors in rat models of depression. *Brain. Behav. Immun.* (2019). doi:10.1016/j.bbi.2019.08.002
28. Perić, I., Stanisavljević, A., Gass, P. & Filipović, D. Fluoxetine reverses behavior changes in socially isolated rats: role of the hippocampal GSH-dependent defense system and proinflammatory cytokines. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* **267**, 737–749 (2017).
29. Wittenberg, G. M. *et al.* Effects of immunomodulatory drugs on depressive symptoms: A mega-analysis of randomized, placebo-controlled clinical trials in inflammatory disorders. doi:10.1038/s41380-019-0471-8
30. Dudek, K. A. *et al.* *Neurobiology of resilience in depression: immune and vascular insights from human and animal studies.* *European Journal of Neuroscience* (2019). doi:10.1111/ejn.14547
31. Lu, Y. *et al.* Chronic administration of fluoxetine and pro-inflammatory cytokine change in a rat model of depression. *PLoS One* **12**, 1–14 (2017).
32. Rantamäki, T. & Yalcin, I. Depression and antidepressant action—from molecules to networks. *Cell Tissue Res.* 1–4 (2019). doi:10.1007/s00441-019-03042-6
33. Mico, J. A. Monoaminergic system and depression. *Cell Tissue Res.* **377**, 107–113 (2019).
34. Schatzberg, A. F. A Word to the Wise About Intranasal Esketamine. *ajp.psychiatryonline.org* **176**, 6–8 (2019).
35. Morgan, C. J. A., Muetzelfeldt, L. & Curran, H. V. Consequences of chronic ketamine self-administration upon neurocognitive function and psychological wellbeing: A 1-year longitudinal study. *Addiction* **105**, 121–133 (2010).
36. Bozymski, K. M. *et al.* Esketamine: A Novel Option for Treatment-Resistant Depression. *Ann. Pharmacother.* **54**, 567–576 (2020).
37. Haase, J. & Brown, E. Integrating the monoamine, neurotrophin and cytokine hypotheses of depression - A central role for the serotonin transporter? *Pharmacology and Therapeutics* (2015). doi:10.1016/j.pharmthera.2014.10.002
38. Himmerich, H., Patsalos, O., Lichtblau, N., Ibrahim, M. A. A. & Dalton, B.

- Cytokine research in depression: Principles, challenges, and open questions. *Frontiers in Psychiatry* **10**, (2019).
39. Jin, Y., Sun, L. H., Yang, W., Cui, R. J. & Xu, S. B. The Role of BDNF in the Neuroimmune Axis Regulation of Mood Disorders. **10**, (2019).
 40. Haroon, E. *et al.* Conceptual convergence : increased in fl ammation is associated with increased basal ganglia glutamate in patients with major depression. 1351–1357 (2016). doi:10.1038/mp.2015.206
 41. Hodes, G. E. *et al.* Individual differences in the peripheral immune system promote resilience versus susceptibility to social stress. **111**, (2014).
 42. Briones, B. A. & Gould, E. *Chapter 7 - Adult Neurogenesis and Stress. Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology* (Elsevier Inc., 2019). doi:10.1016/B978-0-12-813146-6.00007-2
 43. Wang, X., Michalski, S. & Zhao, S. Traumatic Brain Injury Severity Affects Neurogenesis in Adult Mouse Hippocampus. *neurotrauma* **733**, 721–733 (2016).
 44. Hourigan, B., Balay, S. D., Yee, G., Sharma, S. & Tan, Q. Capicua regulates the development of adult - born neurons in the hippocampus. *Sci. Rep.* 1–14 (2021). doi:10.1038/s41598-021-91168-5
 45. Crowther, A. J., Song, J., Curriculum, N., Carolina, N. & Hill, C. Activity-dependent signaling mechanisms regulating adult hippocampal neural stem cells and their progeny. **30**, 542–556 (2014).
 46. Plümpe, T. *et al.* Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. **14**, 1–14 (2006).
 47. Couillard-despres, S. *et al.* Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. **21**, 1–14 (2005).
 48. Dwivedi, Y. Brain-derived neurotrophic factor : role in depression and suicide. 433–449 (2009).
 49. Miyanishi, H. & Nitta, A. A Role of BDNF in the Depression Pathogenesis and a Potential Target as Antidepressant: The Modulator of Stress Sensitivity “ Shati / Nat8l-BDNF System ” in the Dorsal Striatum. (2021).
 50. Lindholm, J. S. O. & Castrén, E. Mice with altered BDNF signaling as models for mood disorders and antidepressant effects. **8**, 1–10 (2014).
 51. Pilar-cuéllar, F. *et al.* Neural Plasticity and Proliferation in the Generation of Antidepressant Effects : Hippocampal Implication. **2013**, (2013).

52. Quintanilla, M. E. *et al.* Intranasal mesenchymal stem cell secretome administration markedly inhibits alcohol and nicotine self-administration and blocks relapse-intake: mechanism and translational options. *Stem Cell Res. Ther.* **10**, 1–16 (2019).
53. Ezquer, F. *et al.* Activated mesenchymal stem cell administration inhibits chronic alcohol drinking and suppresses relapse-like drinking in high-alcohol drinker rats. *Addict. Biol.* **24**, 17–27 (2017).
54. Tfilin, M. *et al.* Mesenchymal stem cells increase hippocampal neurogenesis and counteract depressive-like behavior. *Mol. Psychiatry* **15**, 1164–1175 (2010).
55. Kin, K. *et al.* Cell encapsulation enhances antidepressant effect of the mesenchymal stem cells and counteracts depressive-like behavior of treatment-resistant depressed rats. *Mol. Psychiatry* doi:10.1038/s41380-018-0208-0
56. Hospital, S. B. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration VIJAY. **18**, 13–24 (2016).
57. Yin, X., Guven, N. & Dietis, N. Stress-based animal models of depression: Do we actually know what we are doing? *Brain Research* (2016). doi:10.1016/j.brainres.2016.09.027
58. Ramaker, M. J. & Dulawa, S. C. Identifying fast-onset antidepressants using rodent models. *Mol. Psychiatry* **22**, 656–665 (2017).
59. Harro, J. Animal models of depression: pros and cons. *Cell Tissue Res.* **377**, 5–20 (2019).
60. Scheggi, S., Montis, M. G. De & Gambarana, C. Making Sense of Rodent Models of Anhedonia. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **21**, 1049–1065 (2018).
61. Wiborg, O. Chronic mild stress for modeling anhedonia. *Cell Tissue Res.* **354**, 155–169 (2013).
62. Wang, Q., Prall, K., Dwivedi, Y., Neurobiology, B. & South, A. The Recent Progress in Animal Models of Depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **77**, 99–109 (2018).
63. Belzung, C. & Lemoine, M. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biol. Mood Anxiety Disord.* **1**, 9 (2011).
64. Castro, J. E. *et al.* Personality traits in rats predict vulnerability and resilience to developing stress-induced depression-like behaviors, HPA axis

- hyper-reactivity and brain changes in pERK1/2 activity. *Psychoneuroendocrinology* **37**, 1209–1223 (2012).
65. Malkesman, O. *et al.* The Female Urine Sniffing Test: A Novel Approach for Assessing Reward-Seeking Behavior in Rodents. *Biol Psychiatry* **67**, 864–871 (2011).
 66. Hu, C. *et al.* Re-evaluation of the interrelationships among the behavioral tests in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *PLoS One* **12**, e0185129 (2017).
 67. Smolinsky, A. N., Bergner, C. L., LaPorte, J. L. & Kalueff, A. V. Analysis of grooming behavior and its utility in studying animal stress, anxiety, and depression. *Neuromethods* **42**, 21–36 (2009).
 68. Sequeira-Cordero, A., Salas-Bastos, A., Fornaguera, J. & Brenes, J. C. Behavioural characterisation of chronic unpredictable stress based on ethologically relevant paradigms in rats. *Sci. Rep.* **9**, (2019).
 69. Ardi, Z., Albrecht, A., Richter-levin, A., Saha, R. & Richter-levin, G. Neurobiology of Disease Behavioral profiling as a translational approach in an animal model of posttraumatic stress disorder. *Neurobiol. Dis.* **88**, 139–147 (2016).
 70. Strekalova, T. *et al.* Update in the methodology of the chronic stress paradigm : internal control matters. *Behav. Brain Funct.* **7**, 9 (2011).
 71. Ardi, Z., Albrecht, A., Richter-Levin, A., Saha, R. & Richter-Levin, G. Behavioral profiling as a translational approach in an animal model of posttraumatic stress disorder. *Neurobiol. Dis.* **88**, 139–147 (2016).
 72. Guadix, J. A., Zugaza, J. L. & Gálvez-Martín, P. Characteristics, applications and prospects of mesenchymal stem cells in cell therapy. *Med. Clínica (English Ed.)* **148**, 408–414 (2017).
 73. Ezquer, M. *et al.* Preconditioning of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with deferoxamine increases the production of pro-angiogenic , neuroprotective and anti-inflammatory factors : Potential application in the treatment of diabetic neuropathy. 1–22 (2017).
 74. Budni, J., Bellettini-santos, T., Mina, F. & Garcez, M. L. The involvement of BDNF , NGF and GDNF in aging and Alzheimer ' s disease. **6**, 331–341 (2016).
 75. G. Rajkowska and J.J. Miguel-Hidalgo. Gliogenesis and Glial Pathology in Depression. *CNS Neurol. Disord Drug Trgets* 219–233 (2007).
 76. Singhal, G. & Baune, B. T. Microglia : An Interface between the Loss of Neuroplasticity and Depression. *Front. Cell. Neurosci.* **11**, 1–16 (2017).

77. Lambert, K. G. *et al.* Activity-Stress Increases Density of GFAP-Immunoreactive Astrocytes in the Rat Hippocampus. *J. Biol. Stress* **3890**, 275–284 (2009).
78. Maclean, Andrew G, Kim M. Lee, Kevin B. Chiu, Nicole A. Renner, Hope A. Sansing, P. J. D. Form Follows Function: Astrocyte Morphology and Immune Dysfunction in SIV neuroAIDS. *J. Neurovirology* **20**, 474–484 (2014).
79. Eisch, A. J. & Petrik, D. Depression and hippocampal neurogenesis: A road to remission? *Science (80-.)*. **338**, 72–75 (2012).
80. Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R. & Heim, C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain , behaviour and cognition t I R. **10**, (2009).
81. Beery, A. K. & Kaufer, D. Stress , social behavior , and resilience : Insights from rodents. *Neurobiol. Stress* **1**, 116–127 (2015).
82. Willner, P. Reliability of the chronic mild stress model of depression : A user survey. *Neurobiol. Stress* **6**, 68–77 (2017).
83. Russo, S. J. & Nestler, E. J. The Brain Reward Circuitry in Mood Disorders Scott. **14**, 1–34 (2014).
84. Carragher, N., Adamson, G., Bunting, B. & Mccann, S. Subtypes of depression in a nationally representative sample. *J. Affect. Disord.* **113**, 88–99 (2009).
85. Juruena, M. F., Bocharova, M., Agustini, B. & Young, A. H. Atypical depression and non-atypical depression : Is HPA axis function a biomarker ? A systematic review. *J. Affect. Disord.* **233**, 45–67 (2018).
86. Rice, F. *et al.* Adolescent and adult differences in major depression symptom profiles. **243**, 175–181 (2019).
87. Heinzmann, J. *et al.* Mice selected for extremes in stress reactivity reveal key endophenotypes of major depression : A translational approach. *Psychoneuroendocrinology* **49**, 229–243 (2014).
88. Payne, J. L., Palmer, J. T. & Joffe, H. A Reproductive Subtype of Depression : Conceptualizing Models and Moving Toward Etiology. (2009). doi:10.1080/10673220902899706
89. Willner, P. *et al.* Validation of chronic mild stress in the Wistar-Kyoto rat as an animal model of treatment-resistant depression. 1–12 (2018). doi:10.1097/FBP.0000000000000431
90. Jason S. Snyder, Amélie Soumier, Michelle Brewer, J. P. & H. A. C. Adult

- hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. 3–7 (2011). doi:10.1038/nature10287
91. Campos, J., Guerra-gomes, S., Serra, S. C. & Baltazar, G. Astrocyte signaling impacts the effects of human bone marrow mesenchymal stem cells secretome application into the hippocampus: A proliferation and morphometrical analysis on astrocytic cell populations. *Brain Res.* **1732**, 146700 (2020).
 92. Mckeever, A., Agius, M. & Mohr, P. A REVIEW OF THE EPIDEMIOLOGY OF MAJOR DEPRESSIVE DISORDER AND OF ITS CONSEQUENCES FOR SOCIETY AND THE INDIVIDUAL. *Psychiatr. Danub.* **29**, 222–231 (2017).
 93. Lacerda-pinheiro, S. F. *et al.* Are there depression and anxiety genetic markers and mutations? A systematic review. *J. Affect. Disord.* **168**, 387–398 (2014).
 94. Carnevali, L., Montano, N., Tobaldini, E., Thayer, J. F. & Sgoifo, A. The contagion of social defeat stress: Insights from rodent studies. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **111**, 12–18 (2020).
 95. Stanton, C. H. & , Avram J Holmes, S. W. C. C. and J. J. From Stress to Anhedonia: Molecular Processes through Functional Circuits. **42**, 23–42 (2020).
 96. J. Angst. Sexual problems in healthy and depressed persons. (1998). doi:https://doi.org/10.1097/00004850-199807006-00001
 97. Disease, N. & Atmaca, M. Selective Serotonin Reuptake Inhibitor-Induced Sexual Dysfunction: Current Management Perspectives. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 1043–1050 (2020).
 98. Serretti, A. & Chiesa, A. Treatment-Emergent Sexual Dysfunction Related to Antidepressants. *J. Clin. Psychopharmacol.* **29**, 259–266 (2009).
 99. David, D. J. *et al.* BEHAVIORAL EFFECTS OF FLUOXETINE IN AN ANIMAL MODEL OF ANXIETY/DEPRESSION ARE MEDIATED BY BOTH NEUROGENESIS-DEPENDENT AND INDEPENDENT MECHANISMS. *Neuron* **62**, 479–493 (2010).
 100. Song, A. *et al.* NLRP1 inflammasome contributes to chronic stress-induced depressive-like behaviors in mice. *J. Neuroinflammation* 1–13 (2020).
 101. Beurel, E. & Joep, R. S. Inflammation and lithium: clues to mechanisms contributing to suicide-linked traits. *translational psychiatry* 1–7 (2014). doi:10.1038/tp.2014.129
 102. Chamberlain, S. R. *et al.* Treatment-resistant depression and peripheral C-

reactive protein. *Br. J. Psychiatry* 11–19 (2019). doi:10.1192/bjp.2018.66

103. Porto, P., Baptista, A., Bagatini, P. B. & Neves, L. T. Experimental Post-traumatic Stress Disorder Decreases Astrocyte Density and Changes Astrocytic Polarity in the CA1 Hippocampus of Male Rats Experimental Post-traumatic Stress Disorder Decreases Astrocyte Density and Changes Astrocytic Polarity in the CA1. *Neurochemical Res.* (2016). doi:10.1007/s11064-015-1770-3