



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

**CARACTERIZACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNAS DE LOS
EXOSOMAS DE LAS CÉLULAS PROGENITORAS DEL EPITELIO
OLFATORIO DE PARTICIPANTES CON DIAGNÓSTICO DE
TRASTORNO LÍMITE DE LA PERSONALIDAD.**

TESIS

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

PRESENTA:

BIÓL. PERLA VANESSA ROMERO LUEVANO

TUTOR:

DR. GERARDO BERNABÉ RAMÍREZ RODRÍGUEZ
INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. DANIEL REYES HARO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM
DRA. MÓNICA FLORES RAMOS
INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ

CIUDAD DE MÉXICO

MARZO, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

No dejes de intentar hacer algo que realmente quieres hacer, donde hay amor e inspiración, no creo que te puedas equivocar.

Ella Fitzgerald.

Dedicada a mis padres, quienes siempre me dan su amor y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer principalmente a los que hicieron este proyecto posible, con sus asesorías, motivación, paciencia y dedicación, a mi asesor de tesis el Dr. Gerardo B. Ramírez, al Q.F.B Leonardo Ortiz, así como a el M. en C. Jorge Vásquez, que me estuvieron encaminando en el proyecto. También a los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Reyes y la Dra. Flores por su disposición, y retroalimentación constante.

También agradezco a los miembros del laboratorio de Neurogénesis. A la Dra. Edith por sus consejos y a mis compañeros, donde encontré buenos amigos, como lo son David, Andrea, Natalia, Eunice, Lupita, Enrique y mis nuevas compañeras Dana y Gabriela, que siempre me brindaron una sonrisa y su amistad, así como a aquellos con los que conviví poco, pero tuve el gusto de conocer.

Así como a mis roomates, principalmente a Martin y Diana que estuvieron durante todo este trayecto, dispuestos a escucharme y alentarme, encontrando grandes amigos.

A mis amigos de la maestría, que siempre estuvieron conmigo, en apoyo académico como emocional, que sin ellos nada hubiera sido lo mismo, a Karla, Adriana, Carlos, Vicente, Viry, Diane, Danaé y David.

Y finalmente agradezco a Omar por su apoyo incondicional, a mi familia, que son mis padres, mi tío Tito y tía Mary, tía Laura, así como a mis primos hermanos Alejandro, Alberto, Lizeth, Fernandito y Lupito a quien extrañaremos. También agradezco a mis amigos de vida, que son mi segunda familia, por siempre estar al pendiente de mi, Lucero, Enrique, Héctor, Paola, Marina, Angie, Karen, Dani, Denisse y Carolyn.

ÍNDICE

RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN.....	9
ANTECEDENTES	10
TRASTORNO LÍMITE DE LA PERSONALIDAD	10
Generalidades	10
Comorbilidad en el diagnóstico.....	11
Escala clinimétrica	12
Influencia ambiental	13
Alteraciones genéticas y hormonales	14
Alteraciones proinflamatorias.....	16
Alteraciones morfológicas.....	17
Sistema olfatorio en el TLP	18
Neurogénesis y biomarcadores.....	18
EPITELIO OLFATORIO	19
Estructura y conexiones.....	19
Células progenitoras del epitelio olfatorio y la neurogénesis.....	21
EO en la regeneración.....	24
EXOSOMAS	25
Vesículas extracelulares	25
Generalidades de los exosomas	25
Ejemplos de exosomas en algunas enfermedades	26
JUSTIFICACIÓN.....	27
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS.....	27
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
MÉTODO	28
POBLACIÓN	28
OBTENCIÓN DE LA MUESTRA	29
AISLAMIENTO DE EXOSOMAS	30
CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	32
ARREGLOS DE ANTICUERPOS	32
.....	34

CARACTERIZACIÓN DE LOS MARCADORES POR WESTERN BLOT.....	34
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
RESULTADOS	37
CARACTERÍSTICAS DE LOS PARTICIPANTES	37
ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DE EXOSOMAS A PARTIR DE CÉLULAS PROGENITORAS DEL EPITELIO OLFATORIO	39
Cultivo de las células progenitoras del epitelio olfatorio	39
Escalamiento del cultivo para una mayor obtención de proteína	41
Determinación del concentración de proteína necesaria para los arreglos de anticuerpos.....	42
Optimización del método para concentrar la muestra y obtención de proteínas de exosomas .	43
MARCADORES DE EXOSOMAS	45
Expresión de marcadores de exosomas en participantes control y con diagnóstico de tlp por western blot	45
ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	48
DISCUSIÓN.....	52
CONCLUSIONES.....	55
LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS	56
RECOMENDACIONES	57
REFERENCIAS	58
ANEXOS	71
ANEXO 1- DATOS DE QUÍMICA SANGUÍNEA DE LOS PACIENTES.....	71

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Ítems utilizados en el diagnóstico de TLP de acuerdo con el DSM-V.....</i>	11
<i>Tabla 2. Características de los grupos y subgrupos.</i>	28
<i>Tabla 3. Criterios de inclusión y eliminación de los pacientes.</i>	29
<i>Tabla 4. Listado de anticuerpos primarios incubados en la membrana utilizados en el Western Blot para la caracterización de las proteínas transmembranales de superficie de los exosomas.</i>	35
<i>Tabla 5. Tiempos de exposición utilizados para el revelado por quimioluminiscencia.</i>	35
<i>Tabla 6. Sexo, edades y comorbilidades psiquiátricas de los participantes.</i>	37
<i>Tabla 9. Células generadas en una o dos botellas de cultivo de 75 cm² y su densidad por mL y μL del control masculino de estandarización.</i>	40
<i>Tabla 10. Microgramos por microlitro obtenidos en el aislamiento de exosomas a partir del medio condicionado.....</i>	42
<i>Tabla 11. Proyección de los μg por botella obtenidos en el aislamiento de exosomas a partir del medio condicionado.....</i>	43
<i>Tabla 12. Proteína obtenida (μg/μL) en el aislamiento de exosomas a partir del medio condicionado concentrado y sin concentrar en un participante del grupo TLP y en un participante control.</i>	43
<i>Tabla 13. Proteína obtenida (μg/μL) obtenidos en el aislamiento de exosomas a partir del medio condicionado concentrado en participantes TLP y controles.....</i>	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación del epitelio olfatorio.....	19
Figura 2. Composición del epitelio olfatorio.....	20
Figura 3. Representaciones esquemáticas de los componentes de la vía olfatoria.....	21
Figura 4. Esquema de los factores de crecimiento que regulan la neurogénesis del epitelio olfatorio con sus tipos celulares correspondientes.....	23
Figura 5. Esquema del procedimiento para cultivar las células progenitoras del EO.....	30
Figura 6. Esquema del procedimiento para concentrar y asilar exosomas.....	31
Figura 7. Membrana C6 de microarreglo C1000 human cytokines.....	33
Figura 8. Membrana C7 de microarreglo C1000 human cytokines.....	34
Figura 9. Cultivo de células del epitelio olfatorio humano del control masculino de estandarización.....	41
Figura 10. Western Blot y Dot Blot para ALIX.....	45
Figura 11. Inmunodetección de CD9 por Western Blot de controles y participantes diagnosticados con TLP.....	46
Figura 12. Inmunodetección de CD63 por Western Blot de controles y participantes con diagnóstico de TLP.....	46
Figura 13. Inmunodetección de ALIX por Western Blot de controles y participantes diagnosticados con TLP.....	46
Figura 14. Inmunodetección de actina por Western Blot de controles y participantes diagnosticados con TLP.....	46
Figura 15. Análisis de interacción de proteínas significativas.....	51

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Microgramos por microlitro de proteína total de exosomas aislados.....	42
Gráfico 2. Proteína obtenida ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) obtenidos en el aislamiento de exosomas a partir del medio condicionado concentrado en participantes TLP y controles.....	44
Gráfico 3. Valores de intensidad relativa (IR) en Western Blot del marcador CD63 en participantes con diagnóstico de TLP y controles.....	47
Gráfico 4. Valores de intensidad relativa (IR) en Western Blot del marcador CD9 en participantes con diagnóstico de TLP y controles.....	47
Gráfico 5. Valores de intensidad relativa (IR) en Western Blot del marcador actina en participantes con diagnóstico de TLP y controles.....	47
Gráfico 6. Valores de intensidad relativa (IR) en Western Blot del marcador ALIX en participantes con diagnóstico de TLP y controles.....	47
Gráfico 7. Valores de IR de las proteínas de la membrana CYT6 en los pacientes diagnosticados con TLP respecto a los controles.....	48
Gráfico 8. Valores de IR de las proteínas de la membrana CYT7 en los pacientes diagnosticados con TLP respecto a los controles.....	49
Gráfico 9. Valores de IR de las proteínas significativas en los pacientes diagnosticados con TLP respecto a los controles.....	50

ABREVIATURAS FRECUENTES

ALIX: La proteína X que interactúa con ALG-2 (gen 2 ligado a la apoptosis).

BEST: Evaluación del trastorno límite de severidad a lo largo del tiempo (The Borderline Evaluation of Severity Over Time).

BO: Bulbo olfatorio

CD9, CD63: tetraspaninas específicas de exosomas.

EGF: Factor de crecimiento epidérmico.

EO: Epitelio olfatorio

FS: Factores solubles

kDa: kilo daltons

MCP-1: La proteína quimioatrayente de monocitos 1

MC: Medio condicionado.

SCIDII: entrevista clínica semiestructurada para el eje II del DSM-IV

RANTES/CCL5: el ligando 5 de la quimiocina CC.

TLP: trastorno límite de la personalidad.

RESUMEN

El TLP es un desorden psiquiátrico caracterizado por un patrón de inestabilidad en las relaciones interpersonales, la autoimagen, los afectos, y una notable impulsividad. Se estima que tiene una prevalencia del 1 al 2% de la población mexicana, donde el 75% de los casos son mujeres. Sin embargo, los elementos para la evaluación del estado o diagnóstico, además de escalas clinimétricas es escasa. Siendo las células progenitoras del EO una fuente de acceso a muestras biológicas que permitan estudiar aspectos relacionados con la neurogénesis. Las células progenitoras del EO liberan exosomas, que participan en la comunicación intercelular y presentan cambios en su contenido en enfermedades neuropsiquiátricas (Saeedi et al., 2019). Por lo que analizamos 120 proteínas exosomales provenientes de las células progenitoras del EO de pacientes diagnosticados con TLP, respecto a controles, esperando un perfil pro-inflamatorio diferencial. En el estudio participaron seis pacientes femeninas entre 18 y 28 años que fueron diagnosticadas mediante SCIDII con TLP y se evaluó su severidad con BEST, y cuatro controles femeninos. Se tomaron las muestras de las células de la mucosa olfatoria, para el cultivo de las células progenitoras del EO y la obtención el medio condicionado; se concentró la muestra por peso molecular de 3kDa. Después se aislaron los exosomas por inmuno-precipitación, se lisaron y se cuantificó la proteína por Bradford. Luego se confirmó la obtención de exosomas mediante sus marcadores ALIX, CD9 y CD63 por Western Blot, y se compararon sus niveles de expresión. Posteriormente se determinó el contenido exosomal mediante microarreglos de anticuerpos, por densitometría con ImageLab, y se realizó una prueba de comparación múltiple de medias, con la corrección Holm Sidak de 0.05 en Prisma 8.

La proteína cuantificada por Bradford de exosomas aislados de células progenitoras del EO de pacientes diagnosticados con TLP y participantes control no presentó diferencias significativas, ni en los niveles de expresión de los marcadores de exosomas ALIX, CD9 y CD63, por lo que no se ven afectados estos marcadores, ni la proteína total por el TLP. También reportamos que la proteína obtenida aumentó al concentrar botellas de cultivo celular, así como al aumentar la confluencia de las células, y mediante el uso de concentradores de peso molecular de 3 kDa, generando un método para el enriquecimiento de la muestra. La proteína EGF involucrada en la proliferación celular, crecimiento y recambio del EO y las proteínas proinflamatorias de tipo quimiocinas proinflamatorias RANTES y MCP-1 presentaron diferencias significativamente menores $p < 0.01$ entre pacientes diagnosticados con TLP, respecto a sujetos control en la intensidad relativa (IR) de los microarreglos. Por lo que el perfil proteico de los exosomas procedentes de las células progenitoras del EO de pacientes diagnosticados con TLP cambia respecto a sujetos control.

INTRODUCCIÓN

El TLP es un desorden psiquiátrico común y crónico que se caracteriza por severas alteraciones funcionales: inestabilidad en las relaciones interpersonales, la autoimagen y los afectos (impulsividad marcada), alto riesgo de suicidio, alta tasa de comorbilidades de desórdenes mentales, polifarmacia y altos costos para la sociedad. Se estima que el TLP tiene una prevalencia del 1 al 2% de la población mexicana, donde el 75% de los casos son mujeres. Además de que se encuentran altamente presentes dentro de los servicios de salud, ya que en pacientes psiquiátricos aumenta al 20% (Espinosa et al., 2009; Asociación Americana de Psiquiatría, 2014). Para aportar datos en la búsqueda de un biomarcador que contribuya al diagnóstico, progreso y respuesta a intervenciones, se ha propuesto la necesidad de tener acceso a muestras biológicas que también permitan estudiar aspectos relacionados con la neuroplasticidad. En este sentido, las células progenitoras aisladas del epitelio olfatorio, que pueden diferenciarse en neuronas, son un candidato promisorio para la búsqueda de posibles biomarcadores del TLP. La neurogénesis ocurre en microambientes especiales en los que coexisten diferentes estirpes celulares que tienen la capacidad de liberar FS. Además de ser secretados, los factores solubles pueden ser almacenados en vesículas extracelulares, entre las que se encuentran los exosomas que son nanovesículas formadas como vesículas intraluminales dentro de los cuerpos multivesiculares, que se fusionan con la membrana plasmática y son liberados al espacio extracelular. Los exosomas se involucran en la comunicación intercelular y pueden modificar la función de proteínas receptoras, además de que se han encontrado cambios en su contenido en enfermedades neuropsiquiátricas. El conjunto de estas características favorece las posibilidades de encontrar un contenido diferencial de algunas citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento. En este estudio se investiga el contenido de los exosomas de células progenitoras del EO de participantes diagnosticados con TLP, así como su comparación con individuos sanos.

ANTECEDENTES

TRASTORNO LÍMITE DE LA PERSONALIDAD

GENERALIDADES

Los trastornos de la personalidad son diagnosticados en una de cada diez personas. Inician en la adolescencia o durante la edad adulta, manteniéndose estables en el tiempo, dando lugar a un malestar o deterioro (Lenzenweger, 2008). De acuerdo con el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales de la Asociación Americana de Psiquiatría (DSM-V), los trastornos de la personalidad se encuentran agrupados en tres grupos, donde el TLP se encuentra en el grupo B junto a los trastornos antisocial, histriónico y narcisista de la personalidad. Estos sujetos son considerados dramáticos, emotivos o inestables.

El TLP se define como un patrón de inestabilidad en las relaciones interpersonales, la autoimagen y los afectos, así como de una notable impulsividad. Se estima que este trastorno tiene una prevalencia del 1.6%, pero podría ser tan elevada como un 5.9%, la cual suele disminuir en grupos de mayor edad. La prevalencia en la atención primaria es de alrededor del 6%, del 10% entre los individuos que acuden a los centros de salud mental, y del 20% entre los pacientes psiquiátricos hospitalizados. Siendo mayoritariamente mujeres (aproximadamente 75% de los casos), y es cinco veces más frecuente entre los familiares biológicos de primer grado de las personas con TLP (Asociación Americana de Psiquiatría, 2014; Krabbendam et al., 2015).

Las características que se presentan en un paciente con TLP son las bases para su diagnóstico. Estos criterios/elementos (ítems), deben evaluarse considerando su presencia desde el inicio de la edad adulta y de su estabilidad a lo largo del tiempo, así como su presencia en diversos contextos. Se establecen nueve ítems, de los cuales el paciente debe presentar al menos cinco para ser diagnosticado con TLP (**tabla 1**).

<i>Elemento/ Criterio (ítem)</i>	<i>Características</i>
1	Esfuerzos frenéticos para evitar un abandono real o imaginado.
2	Un patrón de relaciones interpersonales inestables e intensas caracterizado por la alternancia entre los extremos de idealización y devaluación.

3	Alteración de la identidad: autoimagen o sentido de sí mismo acusada y persistentemente inestable.
4	Impulsividad en al menos dos aspectos, potencialmente dañinos para sí mismo.
5	Comportamientos, intentos o amenazas suicidas recurrentes, o comportamiento de automutilación.
6	Inestabilidad afectiva debida a una notable reactividad del estado de ánimo.
7	Sentimientos crónicos de vacío.
8	Ira inapropiada e intensa o dificultades para controlar la ira.
9	Ideación paranoide transitoria relacionada con el estrés o síntomas disociativos graves.

Tabla 1. Ítems utilizados en el diagnóstico de TLP de acuerdo con el DSM-V.

COMORBILIDAD EN EL DIAGNÓSTICO

Los pacientes diagnosticados con TLP tienen una alta comorbilidad con otros trastornos, lo que hace desafiante su tratamiento e investigación al respecto. Además de que es común que se diagnostique a un paciente con TLP de manera errónea, categorizándolo en otro trastorno, por lo cual se siguen buscando complementos que mejoren y faciliten el diagnóstico correcto.

El trastorno de depresión mayor (TDM) es común en pacientes con TLP, hasta un 85% de los pacientes con TLP cumplen los criterios para TDM. Además de que la mayoría de ellos cumplen con los criterios de depresión en algún momento, pero sin TDM. Los rasgos del TLP se encuentran presentes mucho tiempo antes de presentar episodios depresivos, mientras que los cambios de humor asociados al TLP no se encuentran en muchos casos de depresión mayor severa, presentando diferentes patrones. En la depresión mayor los síntomas son crónicos y el ánimo es bajo independientemente de la situación ambiental, mientras que en el TLP la sintomatología es episódica y fluctuante, dependiente de los eventos de la vida interpersonal, es decir, reactiva e inestable, cambiante con el entorno. Por ello los cambios de humor en pacientes con TLP suelen durar solo horas (Yoshimatsu et al., 2014; Gunderson & Phillips, 1991; Paris, 2018).

Otra comorbilidad menos común es la de pacientes diagnosticados con TLP y trastorno bipolar (TB), la cual es de solo el 3.6% de los casos, no obstante, causa discrepancias en su diagnóstico, ya que varios síntomas se superponen, tales como la inestabilidad emocional e

impulsividad. Aunque tienen connotaciones distintas, la confusión se da principalmente en pacientes que tienen sus primeros síntomas o en episodios agudos. No obstante, se pueden diferenciar ya que en la Escala de Depresión de Hamilton (HAM-D) y la Escala de Clasificación de Ansiedad de Hamilton (HAM-A) tienen valores muy bajos para TB y en TLP son muy altos. Otra diferencia es que el TB presenta una baja tasa de impulsividad y control de la ira, contrario al TLP, pero hay una tasa más alta de irritabilidad y comportamiento disruptivo-agresivo. El paciente con TLP muestra impulsividad e ira en reacción a problemas y a largo plazo, mientras que el comportamiento irritable y agresivo del TB solo se presenta en fases maníacas agudas que suelen durar poco. También los pacientes con TLP muestran una tasa de conductas suicidas significativamente más alta, mientras que en TB rara vez se presenta (di Giacomo et al., 2017). Un problema común es que se diagnostica en exceso el TB, llevando al uso de medicamentos no efectivos para el paciente. El problema de un diagnóstico erróneo aumenta, debido a que el TLP incluye síntomas que se superponen con otras categorías de diagnóstico, causando confusión con otros padecimientos, como TDM, esquizofrenia (SZ), trastorno por déficit de atención e hiperactividad y trastorno por estrés postraumático (TEPT) (Paris, 2018). El TEPT tiene la tendencia de ser sobrediagnosticado, ya que muchas veces solo se toma en cuenta el historial del trauma, y no el conjunto de síntomas específicos del TEPT, los cuales no se parecen a los efectos del trauma que se ven en el TLP. Otro trastorno que suele diagnosticarse en exceso es el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH). No obstante, podría tener relación con el TLP, debido a que se ha reportado que trastornos de conducta infantil como TDAH y el trastorno de oposición desafiante pueden ser precursores de TLP en algunos casos (Paris, 2005, 2018).

Debido a que uno de los ítems del TLP incluye síntomas micropsicóticos o episodios psicóticos breves, puede surgir confusión en el diagnóstico con la SZ. No obstante, las alucinaciones auditivas son más frecuentes en pacientes con TLP, aunque suelen darse cuenta de que no son reales, por lo que se pueden denominar pseudoalucinaciones (Paris, 2018).

ESCALAS CLINIMÉTRICAS

En las últimas décadas del siglo XX, se desarrollaron herramientas para el diagnóstico y evaluación del TLP, una de ellas es la SCID-II. Ésta es administrada por médicos capacitados

y fue diseñada para producir diagnósticos psiquiátricos consistentes con el DSM-IV, consistiendo en preguntas abiertas para cada área del contenido y al final de cada módulo, permite que los entrevistadores agreguen las preguntas adicionales necesarias para asegurar la validez de sus calificaciones, en una duración que oscila entre 15 minutos y 2 horas (Azizi et al., 2019; Gorgens, 2011). No obstante, desde el principio del siglo XXI se han desarrollado dos tipos de escalas de evaluación de la gravedad. Aquellas del primer tipo se basan en entrevistas que requieren la presencia de un terapeuta o entrevistador. Mientras que el segundo tipo de escalas son los autoinformes, en estos se dedica menos tiempo para completarlos y no es necesaria la presencia de un terapeuta o una persona capacitada para completarlos. Sin embargo, tiene la limitación de la falta del rol activo del terapeuta y por lo tanto puede ser menos preciso el paciente al contestarla. Un ejemplo de éstas es la BEST (Azizi et al., 2019). Esta escala es una manera rápida de obtener instantáneamente en cada sesión el estado actual del paciente. La escala incluye 15 elementos/criterios (ítems) y tres subescalas, calificados en una escala tipo Likert. Las subescalas A y B se toman de los criterios del DSM-IV. Los primeros ocho elementos comprenden la subescala A (Pensamientos y sentimientos) e involucran evaluaciones de reactividad del estado de ánimo, alteración de la identidad, relaciones inestables, paranoia, vacío y pensamiento suicida. Los siguientes cuatro ítems comprenden la subescala B (Conductas negativas), como lastimarse a uno mismo. Los elementos de estas subescalas se califican de 1 (Ninguno/ Leve) a 5 (Alta). Los últimos tres elementos comprenden la subescala C (Comportamientos positivos), que califica acciones como el seguimiento de los planes de terapia. Estos se califican de 5 (casi siempre) a 1 (casi nunca). En cuanto al puntaje total del BEST, se suman las puntuaciones de las subescalas A y B y se resta el total de la subescala C. Se agrega un factor de corrección de 15 para obtener la puntuación final, que puede oscilar entre 12 (mejor) y 72 (peor). El BEST fue diseñado para medir la gravedad en una población diagnosticada con TLP y no como un instrumento de diagnóstico (Pfohl et al., 2009).

INFLUENCIA AMBIENTAL

Se ha sugerido una correlación causal al desarrollo del TLP, a la falta de una crianza óptima por parte de los cuidadores de ambos sexos y a las experiencias traumáticas en la infancia, como abuso, negligencia, y la separación materna. Los pacientes diagnosticados con TLP en contraste con otros trastornos de personalidad, son más propensos a reportar experiencias

patológicas o traumáticas en la infancia principalmente de algún tipo de abuso o negligencia infantil. El 91% reporta algún tipo de abuso (68% sexual, 71% físico, 75% emocional y verbal); y el 92% reporta algún tipo de negligencia infantil (el 70% por el retiro del cuidador, 50% emocional; el 60% tenían responsabilidades no adecuadas a su edad, como es la necesidad de cuidar a un miembro familiar; y el 25% por descuido físico); y el 62% reporta presenciar violencia doméstica grave (Herman et al., 1989; Zanarini et al., 1997). Entre otros traumas de la infancia relevantes para el desarrollo del TLP se ha correlacionado significativamente un vínculo entre el comportamiento suicida con una infancia traumática por acoso escolar (Alberdi-Paramo et al., 2020), un factor que se considera relevante en estos pacientes, ya que entre el 75 y 80% de pacientes diagnosticados con TLP realizan intentos de suicidio (Jopling et al., 2016). Otro factor que correlaciona significativamente con los síntomas del TLP son las separaciones maternas extendidas que ocurren antes de los 5 años (Crawford et al., 2009).

ALTERACIONES GENÉTICAS Y HORMONALES

El estrés en la vida temprana se considera un factor que contribuye al inicio del TLP, ya que aproximadamente el 90% presenta antecedentes de experiencias estresantes o traumáticas, no obstante, se sugiere una compleja interacción epigenética para el desarrollo de los trastornos mentales (Battle et al., 2004; Heim & Binder, 2012). Para conocer la reactividad del estrés en el TLP algunos investigadores han evaluado la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (HHS) y su producto final, el cortisol (Thomas et al., 2019). La alteración del HHS puede contribuir a la fisiopatología del TLP, ya que se ha demostrado durante la exposición a la Prueba de Estrés Social de Trier, en los pacientes femeninos disminuye significativamente el cortisol salival y en pacientes masculinos aumenta en comparación con los controles. La respuesta del HSS al estrés en mujeres es más grande y sostenida. La posible explicación a esta respuesta es que el estradiol favorece la actividad del HSS, mientras que la testosterona tiene un efecto inhibitorio. Por lo que estos niveles diferenciales en la actividad del HHS entre los pacientes diagnosticados con TLP pone de manifiesto la importancia del sexo (Inoue et al., 2015; Toufexis et al., 2014). En cuanto a los pacientes con síntomas comórbidos también se han reportado diferencias en los niveles de cortisol basal. Por ejemplo, pacientes con trastorno por estrés postraumático (TEPT) sin comorbilidad no presentaron diferencias respecto a los controles, pero pacientes con TLP con

síntomas de TEPT presentan una disminución de cortisol salival. En cambio, en pacientes con TDM en comorbilidad con TLP se ha reportado que aumentan los niveles de cortisol respecto a los controles. Lo anterior es importante porque se ha sugerido que existen grupos de pacientes con TLP con cambios notorios en su perfil endocrino (Jogems-Kosterman et al., 2007; Thomas et al., 2019; Wingefeld et al., 2007). También, se ha encontrado una correlación positiva entre la historia de abuso sexual y los niveles de cortisol en pacientes con TLP, donde niveles más altos de cortisol se correlacionan positivamente con la gravedad de abuso sexual y niveles más bajos se encuentran en pacientes con TLP que presentan antecedentes emocionales y de negligencia, mientras que en pacientes con trastorno bipolar (TB) se ha reportado una correlación negativa, lo que sugiere que hay una respuesta distinta para cada trastorno (Mazer et al., 2019; Thomas et al., 2019). Por otra parte, a nivel genético se han encontrado variantes en el funcionamiento del eje HHS en asociación con el diagnóstico del TLP, los autores reportaron dos polimorfismos de nucleótido único (SNP) FKBP5 (rs4713902 y rs9470079) que mostraron una asociación significativa a pacientes con TLP (Martín-Blanco et al., 2016).

Otro gen estudiado es el de la oxitocina que es responsable de la transcripción de la hormona oxitocina (importante en el funcionamiento socioemocional) y su relación con el TLP. Se ha demostrado que en el SNP rs53576, los heterocigotos tenían síntomas elevados de TLP en condiciones familiares negativas y sintomatologías menores en condiciones positivas, mientras que homocigotos tenían niveles promedio de TLP independientemente de su entorno familiar, por lo que se ha sugerido que podría ser predictor de la calidad del funcionamiento familiar para predecir la sintomatología de TLP en el futuro (Hammen et al., 2015).

Otras alteraciones consistentes son los déficits de serotonina, lo cual sugiere que está relacionado con los comportamientos suicidas e impulsivos, presentes en el TLP. En ese sentido, se han sugerido varios genes candidatos involucrados como el de la monoamino oxidasa A (MAOA) (Dammann et al., 2011) y el gen del transportador de serotonina (5-HTT) (Ni et al., 2006). En cuanto a las interacciones genéticas que podrían involucrarse con la ira y la agresión se sugieren variantes genéticas en el receptor de dopamina 4 (DRD4) y el polimorfismo 5-HTTLPR del gen del transportador de serotonina (Simons et al., 2011).

También se ha estudiado la reactividad de la amígdala a los estímulos emocionales y cómo está modulada genéticamente por variantes del factor neurotrófico derivado del cerebro (BNDF siglas en Inglés), donde se ha reportado una asociación del alelo Val66Met del BNDF con un déficit en la habituación de la amígdala a los estímulos emocionales repetidos, lo cual puede ser un endofenotipo de trastornos que implican una desregulación emocional, como el trastorno límite de la personalidad (TLP). La asociación del alelo 66Met con un déficit de habituación a imágenes emocionales desagradables se ha reportado significativa en pacientes con TLP (Kuo & Linehan, 2009; Pérez-Rodríguez et al., 2017).

ALTERACIONES PROINFLAMATORIAS

El estrés en la vida temprana se ha asociado con una inflamación que se presenta antes del desarrollo de trastornos neuropsiquiátricos al favorecer la producción de citocinas proinflamatorias, entre las cuales se encuentran las quimiocinas, proteínas involucradas en las respuestas inflamatorias, las cuales se presentan en trastornos neuropsiquiátricos, ya que se observa un escenario de inflamación crónica impulsada por factores de estrés psicosocial, aumentando la generación de moléculas de patrones moleculares asociados a daños (DAMP), activando así respuestas inflamatorias periféricas y neuroinflamatorias. Estos aumentos de DAMP circulantes se han reportado en trastornos neuropsiquiátricos, principalmente en TDM y TB (Fleshner et al., 2017). También se ha descrito en trastornos de la personalidad, incluido el TLP, aumentos en los niveles plasmáticos de MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos-1) y SDF-1 (factor derivado del estroma) (Ogłodek et al., 2014). Así como un aumento significativo en la quimiocina CCL-5/RANTES en el TLP. Sin embargo, el TLP fue menor que los grupos de trastornos de personalidad (obsesivo compulsivo, personalidad evasiva con desorden de pánico) y desorden del pánico (Ogłodek et al., 2016). Adicionalmente el estrés crónico también aumenta la producción de citocinas proinflamatorias, las cuales pueden acceder al cerebro activando la microglía y los astrocitos, generando neuroinflamación, lo cual a su vez modifica negativamente la actividad de áreas cerebrales relacionadas con algunos trastornos como la depresión (Wieck, et al. 2016). La depresión es una de las comorbilidades presentes en los pacientes con TLP y con la cual RANTES mostró una asociación significativa. Mientras que en el caso de la otra comorbilidad con la que RANTES presentó asociación significativa es la ansiedad, la cual presenta una comorbilidad con el TLP del 89%, siendo la más alta entre trastornos de la

personalidad (Saccaro et al., 2021). Por lo que esta producción de citocinas modula el estado de ánimo y la cognición al reducir los niveles de monoaminas y alterar la neuroplasticidad, contribuyendo al desarrollo del TLP.

En pacientes diagnosticados con TLP sin comorbilidad se han reportado cambios significativos en las vías proinflamatorias de óxido nítrico sintetasa (iNOS) y ciclo-oxigenasa (COX-2). Además, se presenta el aumento en los niveles plasmáticos de IL1 β (Díaz-Marsá et al., 2012). Mientras que los pacientes con TLP comórbidos con depresión mayor presentan un perfil sérico con aumento significativo en las concentraciones de cortisol, TNF-alpha, e IL-6, respecto a los controles (Kahl et al., 2006). Estos aumentos significativos de marcadores inflamatorios periféricos también se han reportado en respuesta a estrés y a la ansiedad (Marsland et al., 2017; Saccaro et al., 2021).

ALTERACIONES MORFOLÓGICAS

La infancia es un periodo sensible en el desarrollo neurológico presentándose un rápido desarrollo mediante la mielinización y la poda sináptica. Estos procesos son sensibles ante la presencia de eventos traumáticos (Ismail et al., 2017). En los pacientes diagnosticados con TLP se presentan alteraciones consistentes en algunas regiones cerebrales. A nivel morfológico se reportan disminuciones volumétricas en el hipocampo en un 12% y de la amígdala en un 17% en promedio como candidatos a endofenotipos del TLP (Ruocco et al., 2012), al igual que en la circunvolución cingulada en la materia gris de las áreas 24 y 31 de Browmann, tanto en adultos como adolescentes. Algunas de estas alteraciones se relacionan con el procesamiento afectivo, el control de los impulsos y la cognición (Goodman et al., 2011; Hazlett et al., 2005). Aproximadamente el 75% de las personas diagnosticadas con trastorno límite de la personalidad presentan conductas autolesivas impulsivas, lo que sugiere que pueden estar asociadas con la disfunción del lóbulo frontal y puede surgir de una conectividad deteriorada entre el lóbulo frontal y otras regiones (Grant et al., 2007). También, se han reportado alteraciones prefrontales de la sustancia blanca en pacientes con TLP con afecciones en el fascículo uncinado, que es un tracto que une a la amígdala y corteza orbitofrontal, y que comunica el lóbulo temporal. Este tracto es importante en la red de regulación de emociones (Marino et al., 2015; Nenadić et al., 2020).

En la materia gris también se han observado alteraciones, particularmente en las regiones fronto-límbicas como en la corteza orbitofrontal (COF), la cual está implicada en la desregulación emocional e impulsividad del TLP, los autores reportaron una asimetría con pérdidas del volumen del lado derecho de la materia gris de la COF en comparación con los controles (Chanen et al., 2008; Takahashi et al., 2019).

SISTEMA OLFATORIO EN EL TLP

Recientemente, se reportaron cambios en la morfología del surco olfativo en adolescentes diagnosticados con TLP, estos pacientes tenían un surco olfativo derecho menos profundo que los controles, esta profundidad esta correlacionada negativamente con la gravedad de la impulsividad e inestabilidad afectiva, y con el historial de exposición al trauma de los pacientes con TLP (Takahashi et al., 2019). La profundidad del surco olfativo también se encuentra alterada en otros trastornos neuropsiquiátricos como la SZ (Nishikawa et al., 2016), mientras que en individuos sanos la profundidad del surco olfativo se relaciona con la función olfativa siendo más profunda en el hemisferio derecho debido a la lateralización funcional del sistema olfativo (Hummel et al., 2003).

NEUROGÉNESIS Y BIOMARCADORES

A pesar de las evidencias que muestran cambios morfológicos a nivel central o periférico en pacientes con diagnóstico de TLP se han buscado marcadores adicionales que contribuyan al diagnóstico, progreso y respuesta a intervenciones en el TLP que estén asociados con la neuroplasticidad, sobre todo porque se presenta la disminución del volumen de la amígdala y del hipocampo (Ruocco et al., 2012). En la última región se ha descrito la presencia de neuronas de nueva generación en roedores y recientemente en humanos (Kempermann et al. 1997; Boldrini et al 2019). Además, se ha reportado que la generación de nuevas neuronas es un proceso de la plasticidad que se encuentra alterado en algunos trastornos neuropsiquiátricos (Kempermann et al., 2008). De tal modo que el estudio de este proceso en el contexto de los trastornos neuropsiquiátricos es relevante, ya que puede permitir el análisis de cambios en la capacidad de las células troncales o progenitoras para generar neuronas, así como para producir y secretar proteínas con utilidad como posibles biomarcadores. Sin embargo, una de las limitaciones es que a nivel central la neurogénesis ocurre de manera constitutiva en el hipocampo y en el sistema formado por los ventrículos laterales-bulbo olfatorio (BO), hecho que hace inaccesible la obtención de células troncales/progenitoras.

Sin embargo, estudios recientes han propuesto que una fuente de células troncales/progenitoras con capacidad para formar neuronas y de fácil acceso es el EO.

EPITELIO OLFATORIO

ESTRUCTURA Y CONEXIONES

En la región superior-posterior de la cavidad nasal se encuentra la mucosa olfatoria, la cual está formada por la lámina propia y el EO en su capa superficial, separadas por la membrana basal (**Figura 1**).

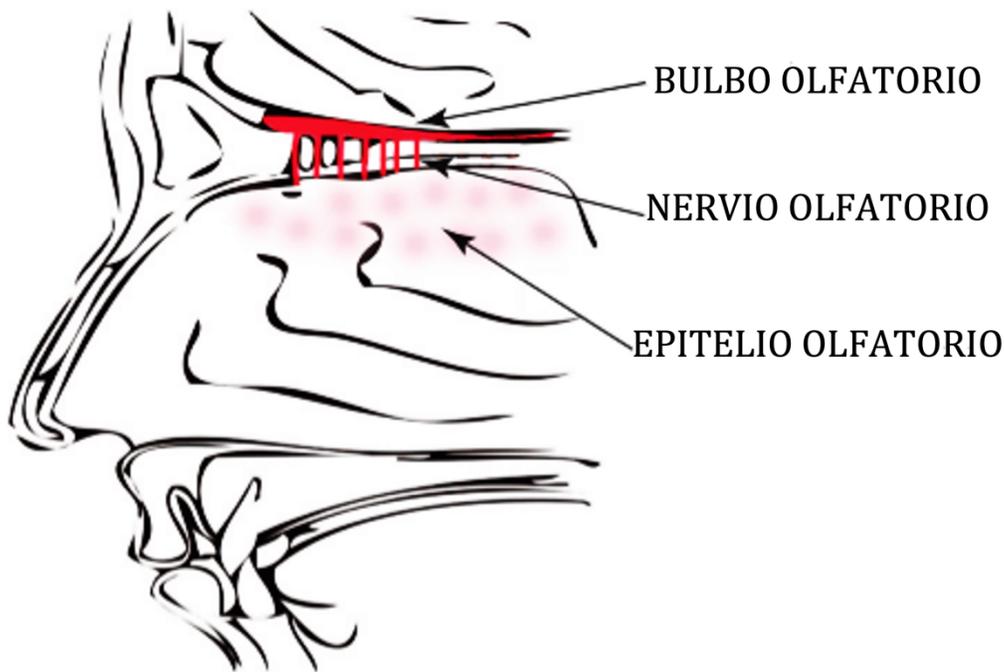


Figura 1. Ubicación del epitelio olfatorio.

El epitelio olfatorio se encuentra en la región superior-posterior de la cavidad nasal, donde se encuentra interconectado con el bulbo olfatorio. Traducido de Mackay-Sim, a. (2010). *Stem cells and their niche in the adult olfactory mucosa*. Recuperado de <http://www.architalbiol.org/index.php/aib/article/view/1143/1068>.

El EO es un tejido altamente heterogéneo, pseudoestratificado formado de tres capas primarias: una capa basal, compuesta de células basales horizontales (HBC) y globosas (GBC); una región intermedia, que contiene neuronas sensoriales olfativas maduras e

inmaduras; y una capa apical, que se encuentra expuesta a la cavidad nasal y que contiene a las células sustentaculares (células de soporte) (**Figura 2**).

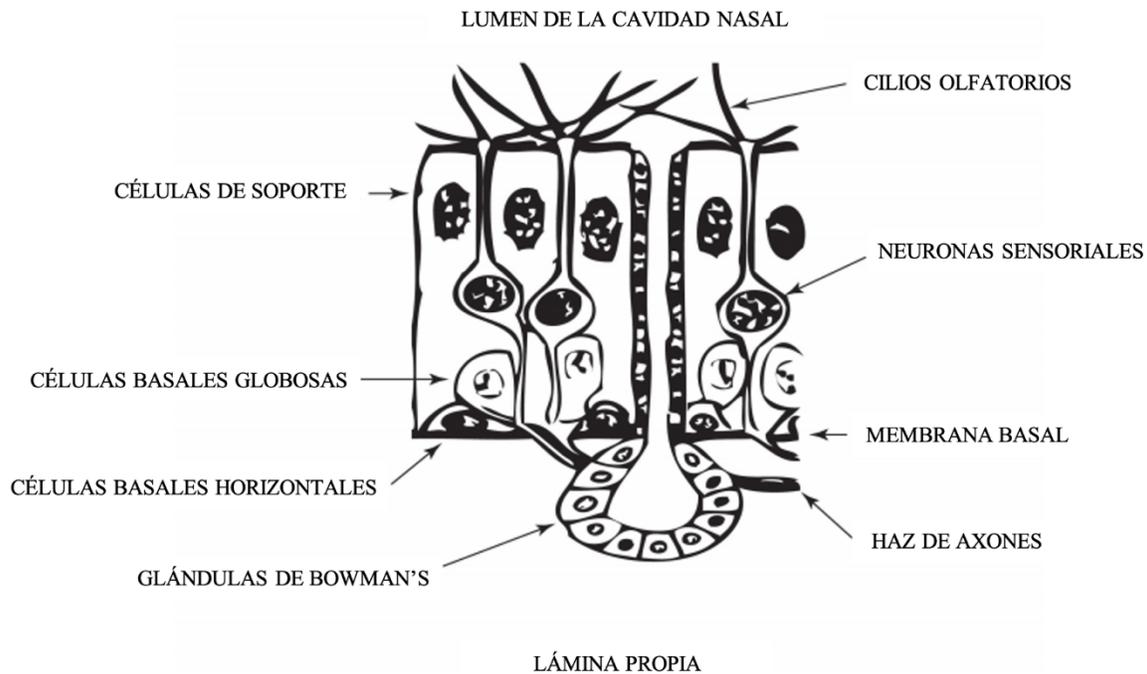


Figura 2. Composición del epitelio olfatorio.

Después de la lámina propia separada por la membrana basal se encuentra el epitelio olfatorio, que se compone de células basales horizontales (HBC) y globosas (GBC); neuronas sensoriales; y las células sustentaculares (células de soporte). Traducido de Mackay-Sim, A. (2010). *Stem cells and their niche in the adult olfactory mucosa*. Recuperado de <http://www.architalbiol.org/index.php/aib/article/view/1143/1068>

El EO está conectado con el sistema nervioso central (SNC), los axones de las neuronas sensoriales olfativas (OSNs) de la región intermedia del EO son células bipolares que se extienden a la lámina propia, formando haces rodeados por células gliales de la envoltura olfatoria (OEC) que penetran en el cráneo a través de la lámina cribosa para hacer sinapsis con otras neuronas del BO, estas neuronas proyectan a las cortezas olfatorias primarias, la piriforme y entorrinal (Hernández-Ramírez, 2011; Mackay-Sim, 2010; Saive et al., 2014). Tanto el BO como la corteza entorrinal envían conexiones a la amígdala corticomedia, que a su vez envía densas proyecciones a los núcleos basolaterales de la misma amígdala, estos últimos no reciben proyecciones del BO, pero sí de la corteza piriforme y entorrinal lateral.

El BO y la corteza piriforme también envían proyecciones directas a la corteza entorrinal lateral y ésta a su vez, proyecta al hipocampo (Krettek & Price, 1978; Price, 1973; Swanson & Köhler, 1986). La corteza entorrinal lateral además de llevar la información de las áreas corticales olfativas a la amígdala e hipocampo tiene conexiones recíprocas que llevan de regreso información a las áreas corticales olfativas (Insausti et al., 1997). Posteriormente desde estas áreas, la información se transmite a las cortezas olfativas secundarias compuestas de la corteza orbitofrontal (COF) y la corteza insular (Saive et al., 2014) (**Figura 3**).

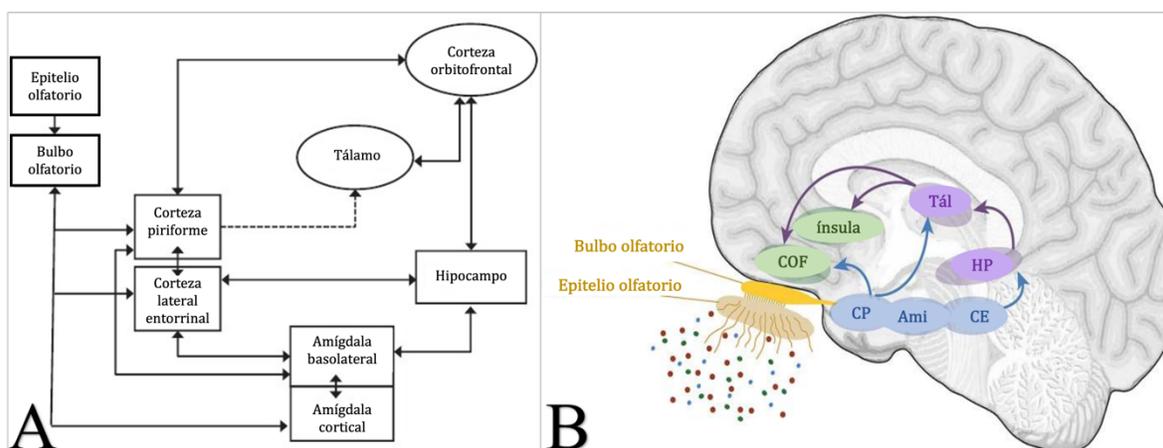


Figura 3. Representaciones esquemáticas de los componentes de la vía olfatoria.

A) Indica la relación entre el epitelio y bulbo olfatorio con las áreas límbicas (amígdala e hipocampo). Mouly, A.-M., & Sullivan, R. (2010). *Memory and Plasticity in the Olfactory System: From Infancy to Adulthood*. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK55967/>. **B)** Señala las cortezas olfatorias primarias y secundarias que reciben información de la vía olfatoria. Ami, amígdala; CE, corteza entorrinal; HP, hipocampo; COF, corteza orbitofrontal; CP, corteza piriforme; Tál, tálamo. Saive, A, et al., (2014). *A review on the neural bases of episodic odor memory: from laboratory-based to autobiographical approaches*. Recuperado de <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00240>.

Debido a estas interacciones directas entre el BO y cortezas olfativas primarias con las regiones del sistema límbico (amígdala e hipocampo) involucradas en la emoción y memoria, los humanos pueden evocar experiencias emocionales como las autobiográficas (Mouly & Sullivan, 2010).

CÉLULAS PROGENITORAS DEL EPITELIO OLFATORIO Y LA NEUROGÉNESIS

El EO alberga las neuronas sensoriales olfativas (OSNs), las cuales se reemplazan continuamente dentro del EO a lo largo de la vida del individuo. La neurogénesis en el epitelio olfatorio continúa durante toda la vida, lo que lo hace un modelo neurogénico y de plasticidad neuronal (Nibu, 2002). El EO permite el acceso a las células madre, progenitores

neuronales y neuronas en humanos adultos, lo que permite trabajar con genes reguladores, factores de crecimiento y citocinas que controlan la neurogénesis (Mackay-Sim, 2010). Los axones de las OSNs abandonan el EO formando haces y fascículos en la lámina propia antes de llegar al BO donde hacen sinapsis con células mitrales e interneuronas, las cuales son generadas por neurogénesis en la zona subventricular (SVZ) de los ventrículos laterales, ya que las células progenitoras neurales formadas en la SVZ migran uniéndose como interneuronas en los circuitos neuronales en el BO (Curtis et al., 2009).

El BO recibe la información del EO a través de los axones de las OSNs. Las OSNs se reemplazan continuamente en adultos a partir de un nicho neurogénico del EO, cuyas células madre son las HBC, éstas pueden regenerar todos los tipos celulares del EO (Mackay-Sim, 2010). El EO está compuesto de células madre progenitoras que pueden diferenciarse en varios linajes celulares y liberar factores tróficos que pueden influir en la diferenciación (Zhang et al., 2005). Se ha reportado que los factores del crecimiento regulan la proliferación de células madre y progenitoras, por lo tanto, la neurogénesis en el EO. Se ha sugerido que primeramente la proliferación de las HBC se estimula por EGF (factor de crecimiento epidérmico) y TGF α (factor de crecimiento transformador α) (Farbman & Buchholz, 1996), posteriormente las HBC pueden diferenciarse en células basales globosas (GBC) cuyos factores involucrados no han sido descritos, mientras que FGF $_2$ (factor de crecimiento de fibroblastos-2) estimula la proliferación de las GBC. Luego el TGF β_2 (factor de crecimiento transformador β_2) induce la diferenciación de GBC en neuronas inmaduras; y PDGF-AB (factor de crecimiento derivado de plaquetas AB) promueve la supervivencia de las neuronas inmaduras, por lo que se sugiere que las HBC pueden generar todas las células del OE y probablemente las GBC sean las células madre multipotentes y las precursoras neuronales inmediatas (**Figura 4**) (Mackay-Sim, 2010; Newman et al., 2000).

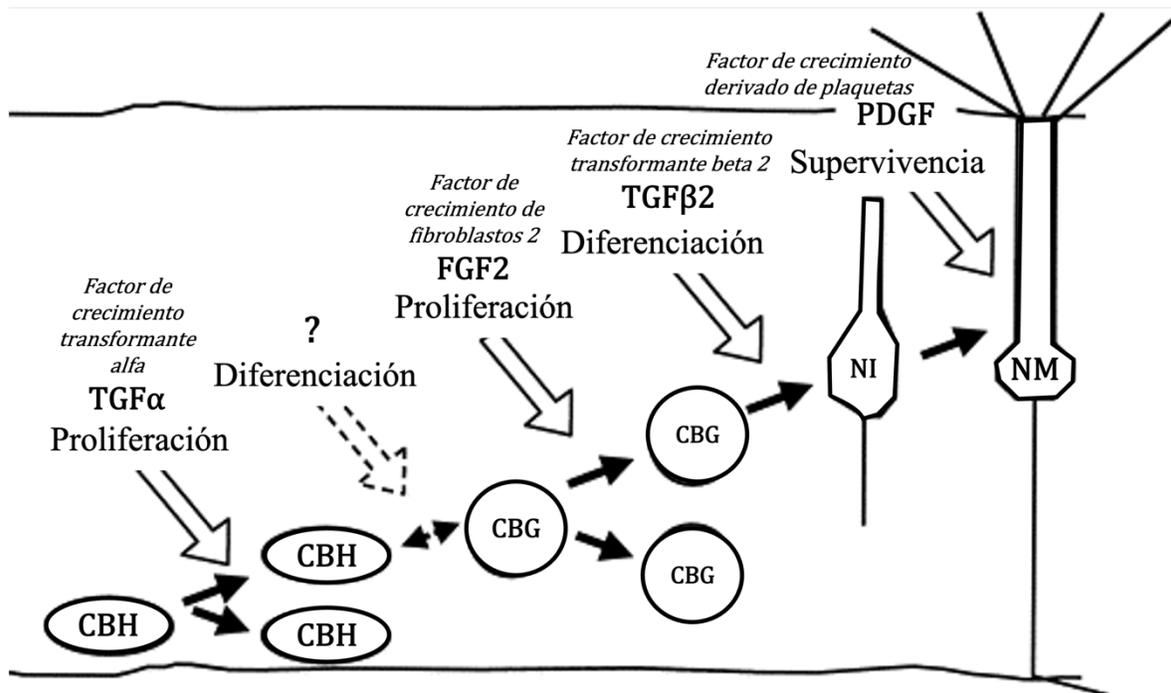


Figura 4. Esquema de los factores de crecimiento que regulan la neurogénesis del epitelio olfatorio con sus tipos celulares correspondientes.

La relación entre las células basales horizontales y las células basales globosas no está probada (flecha punteada). CBG, célula basal globosa; CBH, célula basal horizontal; NI, neurona inmadura; NM, neurona madura. Traducido de Newman, M. P. et al. (2000) Growth factor regulation of neurogenesis in adult olfactory epithelium. Recuperado de [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00194-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00194-9)

Una característica de las células madre es la liberación de factores angiogénicos y de crecimiento, hormonas, citosinas, quimiocinas, proteínas de la matriz extracelular, microvesículas y exosomas, los cuales se han detectado en el medio condicionado (CM) de cultivo de células madre progenitoras del EO humano (hNs/PCs-OE), así como la producción y liberación de factores solubles (FS) en CM, los cuales son secretados también de otras células madre mesenquimales demostrando tener efectos neuroprotectores en algunas patologías. Particularmente los FS de las hNs/PCs-OE impactan a las células precursoras del hipocampo de murino adulto, experimentando la diferenciación de astrocitos con la IL-6 como mediador. Por lo que estos FS interfieren en el fenotipo y en el destino de las células precursoras neuronales del hipocampo en el murino adulto *in vitro*, por lo que sugiere que los FS de hNs/PCs-OE se encuentran involucrados en la neurogénesis adulta (Gómez-Virgilio et al., 2018). También se ha encontrado en las hNs/PCs-OE el factor neurotrófico

derivado del cerebro (BDNF), así como su receptor TrkB. El BDNF participa en procesos como la migración celular y se encuentra en microambientes pro-neurogénicos (Ortiz-López et al., 2017). Las hNs/PCs-OE se encuentran indiferenciadas y tienen la capacidad de autorrenovación, así como de generar neuronas y glía (Jiménez-Vaca et al., 2018). Por lo que estas características de las hNs/PCs-OE, hace al EO una región altamente plástica, además de su fácil acceso a ella, ya que es externa al SNC, sin embargo, se sugiere como una región indirecta, que puede verse afectada por algunas enfermedades neuropsiquiátricas debido a su relación con el BO y regiones del sistema límbico.

La neurogénesis requiere de señales, tales como la secreción de moléculas como las citocinas, factores de crecimiento, los neurotransmisores y las hormonas, sin embargo, además de estas señales bien reconocidas, las vesículas extracelulares también actúan como mensajeros intercelulares, particularmente los exosomas, están implicados en la transferencia de ARNm, microARN (miARN), proteínas y lípidos entre las células, por lo que pueden modificar la función de las células receptoras. Se ha sugerido que los exosomas desempeñan un papel importante en diferentes nichos de células madre, como las células madre mesenquimales; células madre cancerosas y el nicho premetastásico. Por lo que es probable que los exosomas tengan un papel potencial en la fisiología y patología de la neurogénesis adulta (Bátiz et al., 2016).

EO EN LA REGENERACIÓN

Gracias a su accesibilidad, el EO en humanos adultos representa una fuente accesible para comprender la neurogénesis adulta bajo condiciones fisiológicas y patológicas (Mackay-Sim, 2010). Se ha reportado su uso en terapias de reemplazo celular (neuronas), por ejemplo, en ratas se ha demostrado que el trasplante de células madre mesenquimales (MSC) mejora la recuperación de la lesión de la médula espinal (Urdzíkova et al., 2014). En ratones con células madre ecto-mesenquimales olfativas humanas (OE-MSC), se reportó que éstas migran hacia sitios de daño neural diferenciándose en neuronas, estimulan la neurogénesis endógena, restablecen la transmisión sináptica y mejoran la potenciación a largo plazo en lesiones del hipocampo, además mostraron una restauración del aprendizaje y la memoria en las pruebas de comportamiento (Nivet et al., 2011). También las alteraciones neurobiológicas en el sistema límbico de los pacientes con enfermedades neuropsiquiátricas pueden afectar o reflejarse en el circuito olfativo, incluidas las células neurales en la mucosa olfatoria, tal

como en el Alzheimer (Conti et al., 2013) y la SZ, esta última tiene alteraciones similares al TLP (Chen et al., 2018). También en pacientes con SZ se han reportado densidades y proporciones de las neuronas del EO que son anormales en diferentes etapas del desarrollo (Arnold et al., 2001).

EXOSOMAS

VESÍCULAS EXTRACELULARES

Las vesículas extracelulares (EVs por sus siglas en inglés), son un grupo de vesículas secretadas por la mayoría de las células; éstas llevan diversas cargas, como proteínas; especies de RNA (mRNA, miRNA, lncRNA, etc), DNAs (DNAm, ssDNA); y lípidos, los cuales pueden transportarse e intercambiarse entre células, por lo que se ha sugerido que estas vesículas tienen un impacto en los procesos fisiológicos como la comunicación intercelular tanto a nivel paracrino como sistémico.

De acuerdo con sus propiedades, mecanismo de liberación y biogénesis, se clasifican en:

- Cuerpos apoptóticos (500–2000 nm), éstas brotan de la membrana de las células que sufren apoptosis, y son típicamente engullidas por macrófagos.
- Microvesículas (50–1000 nm), se forman directamente de la membrana plasmática y contienen cargas que son llevadas a células vecinas.
- Exosomas (40–200 nm), son la clase más pequeña de vesículas extracelulares. Tienen origen endocítico, son formados como vesículas intraluminales (ILVs) dentro de la membrana limitante de endosomas tardíos o cuerpos multivesiculares (MVBs), donde hay dos posibles vías: se pueden fusionar con el lisosoma, degradando su contenido, o fusionarse con la membrana plasmática y liberar las ILV que contienen los exosomas al espacio extracelular (Gheinani et al., 2018; Saeedi et al., 2019; Yang et al., 2016).

GENERALIDADES DE LOS EXOSOMAS

Los exosomas son nanovesículas liberadas por una gran variedad de fluidos corporales como la sangre, semen, saliva, plasma, fluido cerebrospinal, fluido epididimal, fluido amniótico, fluido sinovial y leche materna (Gurunathan et al., 2019).

A diferencia de otras EVs, los exosomas presentan en su bicapa lipídica proteínas altamente expresadas, como TSG101, Alix y CD63, que son utilizadas como marcadores específicos para este tipo de estructuras, además de contener en su interior diferentes clases de RNA

(mRNA, lncRNA, miRNA). Los exosomas se encuentran implicados en la transferencia de RNAm, miRNA, proteínas y lípidos, por lo que pueden modificar la función de las células receptoras (Kowal et al., 2014; Yang et al., 2016).

Se ha reportado que la liberación de los exosomas se encuentra modulada por la actividad sináptica glutamatérgica, lo que sugiere que es parte de la fisiología sináptica normal, además de que se ha reportado que los cuerpos multivesiculares que liberan los exosomas son aproximadamente 50 veces menos frecuentes en axones que en somas o dendritas, lo que respalda el papel de los exosomas en la sinapsis. Estos hallazgos sugieren que los exosomas participan en la fisiología del sistema nervioso normal y patológico (Altick et al., 2009; Lachenal et al., 2011). Además de que la modulación de la liberación de los exosomas también se ve alterada por la expresión de los receptores de serotonina en la microglía, mostrando la posible correlación de los exosomas con los trastornos neuropsiquiátricos debido a que tanto como la comunicación celular como la liberación de neurotransmisores son factores importantes en la psicopatología (Glebov et al., 2015).

EJEMPLOS DE EXOSOMAS EN ALGUNAS ENFERMEDADES

Estas nanovesículas tienen un uso terapéutico principalmente en diversos tipos de cáncer, favoreciendo el nicho-premetastático (Morse et al., 2005; Nawaz et al., 2014), además de reportarse que la biogénesis de los exosomas se ve alterada en estados de enfermedad, en cáncer a menudo la cantidad de exosomas es más elevada, ya que las células tumorales los secretan en niveles más altos (Whiteside, 2016). Sin embargo, el campo de los exosomas en los trastornos mentales se encuentra en sus inicios y los cambios de la biogénesis de los exosomas no se han estudiado a fondo. No obstante, el potencial del contenido de los exosomas como biomarcador en enfermedades neuropsiquiátricas se ha demostrado con cerebros de pacientes que fueron diagnosticados con SZ y TB, donde en las cortezas prefrontales postmortem se confirmó la presencia de dos miRNAs que aumentaron significativamente su expresión, el miR-497 en muestras de SZ y miR-29c en muestras de TB (Banigan et al., 2013). También se ha demostrado el papel de las proteínas en exosomas en los trastornos mentales, como es el caso de la Claudina-5 (Cldn5), que es una proteína de unión estrecha presente en la barrera hematoencefálica. Cuando la Cldn5 se elimina en ratones, induce comportamientos depresivos en estos ratones, y el tratamiento antidepresivo vuelve a aumentar los niveles de Cldn5 (Menard et al., 2017; Saeedi et al., 2019).

JUSTIFICACIÓN

A pesar de que el TLP tiene una prevalencia estimada del 1.6%, se calcula que en pacientes psiquiátricos ambulatorios aumenta al 10% y en pacientes hospitalizados a un 20% (Asociación Americana de Psiquiatría, 2014; Sverak et al., 2019). Lo anterior apunta a que dentro de los servicios de salud se atiende a un porcentaje mayor de pacientes con TLP. No obstante, fuera de las escalas clinimétricas, son escasos los elementos diagnósticos y posibles marcadores que apoyen al clínico en la evaluación del progreso de la enfermedad. De tal modo que el contenido proteico de los exosomas obtenidos de células progenitoras del EO de pacientes con diagnóstico de TLP podría permitir encontrar proteínas candidato a marcadores del trastorno que estén relacionadas con cambios plásticos reflejados por la generación de neuronas. En ese sentido, es posible que el contenido proteico de los exosomas pueda reflejar cambios fisiológicos y del desarrollo de la enfermedad.

HIPÓTESIS

- Los exosomas de células progenitoras del EO de participantes diagnosticados con TLP presentan un perfil proteico pro-inflamatorio en comparación con el contenido proteico de los exosomas de sujetos sanos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Identificar el contenido proteico de los exosomas de los participantes diagnosticados con TLP y de sujetos control.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar el procedimiento para aislar los exosomas de las células progenitoras del EO de pacientes diagnosticados con TLP, y de sujetos control.
2. Caracterizar los exosomas obtenidos de las células progenitoras del EO de participantes diagnosticados con TLP y controles, mediante la expresión de sus marcadores transmembranales de superficie.

3. Comparar el contenido proteico de los exosomas procedentes de células progenitoras del EO de participantes diagnosticados con TLP y de sujetos control, utilizando arreglos de anticuerpos que identifican 120 proteínas de las familias de las citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento.
4. Correlacionar los valores de intensidad relativa de las proteínas proinflamatorias diferenciales con los valores de clinimetría BEST y SCIDII de los participantes.

MÉTODO

POBLACIÓN

La muestra de estudio fueron pacientes con diagnóstico de TLP atendidos en el Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INPRFM), que previamente aceptaron y firmaron un consentimiento informado. Se realizó un estudio comparativo del contenido de los exosomas entre dos grupos, que cumplieron con los criterios de inclusión (**tabla 3**). El grupo A correspondiente a los controles y el grupo B incluyó a los participantes diagnosticados con TLP antes de recibir un tratamiento (**tabla 2**). Los participantes fueron captados previamente por el Dr. Francisco Javier Vegas Rodríguez, con la aprobación del Comité de Ética en Investigación del INPRFM (CEI/C/012/2016, #folio 00818). Los pacientes fueron diagnosticados con la entrevista clínica estructurada para el DSM-IV–eje II (SCID-II). Para la valoración de la gravedad o cambio en el TLP se utilizó la prueba diagnóstica “*Borderline evaluation of severity over time (BEST)*.”

<i>Grupo</i>	<i>A</i>	<i>B</i>
<i>Características</i>	Controles (sanos)	Pacientes diagnosticados con TLP antes del tratamiento
<i>Individuos</i>	4	6

Tabla 2. Características de los grupos y subgrupos.

<i>Criterios de inclusión</i>	<i>Criterios de eliminación</i>
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sexo femenino. ▪ Edad entre 18 y 28 años. ▪ Pacientes con diagnóstico de TLP con base en los criterios del DSM-V utilizando SCIDII. ▪ Pacientes sin diagnóstico clínico de discapacidad intelectual. ▪ Pacientes que acepten participar en el estudio y firmar el consentimiento informado. ▪ Pacientes que no presentaran un proceso de tipo inflamatorio. ▪ Pacientes sin comorbilidades psiquiátricas, excepto de tipo ansiosas y depresivas 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pacientes en los que la toma de muestra de las células de mucosa olfatoria no sea satisfactoria para los análisis moleculares definidos. ▪ Pacientes que decidan suspender su participación en el estudio.

Tabla 3. Criterios de inclusión y eliminación de los pacientes.

OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Antes de tomar la muestra a los participantes, se realizó lavado nasal con solución salina dos veces (Afrin Pure Sea, Schering-Plough S.A. de C.V., Ciudad de México, México), posteriormente se limpió con papel higiénico y se realizó una exfoliación nasal del cornete medial-lateral y la región inicial del cornete superior al cepillar la pared lateral de la cavidad nasal y el tabique con un movimiento circular (Franco et al., 2017). Las células de la mucosa olfatoria fueron tomadas por raspado con un hisopo por el Q.F.B. Leonardo Ortiz López. Después de la exfoliación, las células que estaban contenidas en el cepillo se separaron lavando con DMEM/F12 (medio Eagle modificado de Gibco Dulbecco: mezcla de nutrientes F-12) y se colocaron en placas de 35 mm (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, EE. UU.) Estas células se propagaron para generar un reservorio, a partir del cual se generaron viales, que contenían aproximadamente 1,500,000.00 de células cada uno. Los viales se utilizaron para propagar en botellas de 75cm². Las cuales se cultivaron en DMEM/F12 con 10% SFB (suero de bovino fetal), hasta que alcanzaron una confluencia del 80% (porcentaje del área de la placa de cultivo que aparece cubierta por células). Después se cultivaron en DMEM/F12 que contenía 1% de los suplementos B27 y la combinación de EGF (Factor de

crecimiento epidermal) + FGFb (Factor de crecimiento fibroblastos básico) a 20 ng/mL por 48 horas (**Figura 5**).

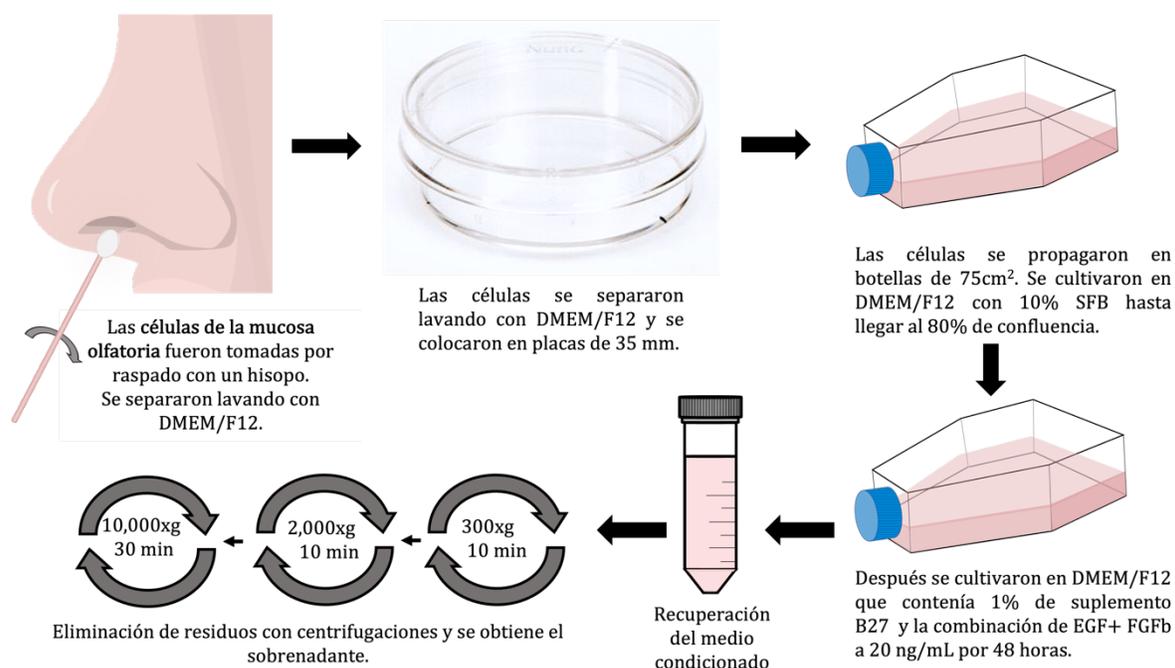


Figura 5. Esquema del procedimiento para cultivar las células progenitoras del EO.

Las células de la mucosa olfatoria se tomaron por raspado con un hisopo y se separaron con DMEM (F12) y se colocaron en placas de 35mm. Posteriormente las células se propagaron en botellas de 75cm², las cuales se cultivaron con DMEM/F12 con 10% de SFB hasta que alcanzarán una confluencia del 80%, posteriormente se cultivaron en DMEM/F12 con 1% B27 + EGF + FGFb a 20 ng/mL por 48 horas. Se obtuvo el MC y se realizaron tres centrifugaciones para eliminar residuos, de 300xg y 2,000xg durante 10 minutos cada una, y una última de 10,000xg durante 30 minutos y se obtuvo el sobrenadante.

AISLAMIENTO DE EXOSOMAS

Se cultivaron alrededor de 7,000,000 de células por botella de 75cm², generando cuatro botellas en total para obtener suficiente medio de cultivo condicionado para aislar la proteína necesaria para realizar los arreglos de anticuerpos. Se homogenizaron las muestras de medio condicionado y se eliminaron los residuos con tres centrifugaciones, la primera de 300xg, otra de 2,000xg por 10 minutos cada una, y una última de 10,000xg por 30 min, obteniendo el sobrenadante.

Posteriormente se enriqueció y redujo la muestra de medio condicionado, utilizando concentradores Amicon® Ultra (Merck Millipore) Molecular Weight CutOff, MWCO de 3

kDa. Estos concentradores primeramente se lavaron con 15mL de PBS 1X y centrifugando a 4,000xg a 4°C durante 20 minutos, para eliminar posibles restos de glicerina y de azida sódica. Una vez desechado el PBS, se le añadieron 15mL de la muestra de medio condicionado, equivalente a una botella de 75cm² y se centrifugó a 4,000xg durante 70 minutos a 4°C, para obtener el concentrado, al cual se le agregó el reactivo Total Exosome Isolation Reagent (from cell culture) de Invitrogen (número de catálogo 4478359), y se dejó incubando toda la noche a 8°C.

Finalmente, los exosomas se aislaron del concentrado mediante centrifugación a 10,000xg durante una hora a 4°C. Se obtuvo la pastilla, la cual se resuspendió con RIPA (PathScan® Sandwich ELISA Lysis Buffer (1X) Número de catálogo #7018 de Cell Signal) que contenía: Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 al 1%, pirofosfato de sodio 20 mM, fluoruro de sodio 25 mM, β-glicerofosfato 1mM, ortovanadato de sodio 1mM, y leupeptina 1 µg/ml. Los exosomas obtenidos se lisaron por sonicación (Figura 6).

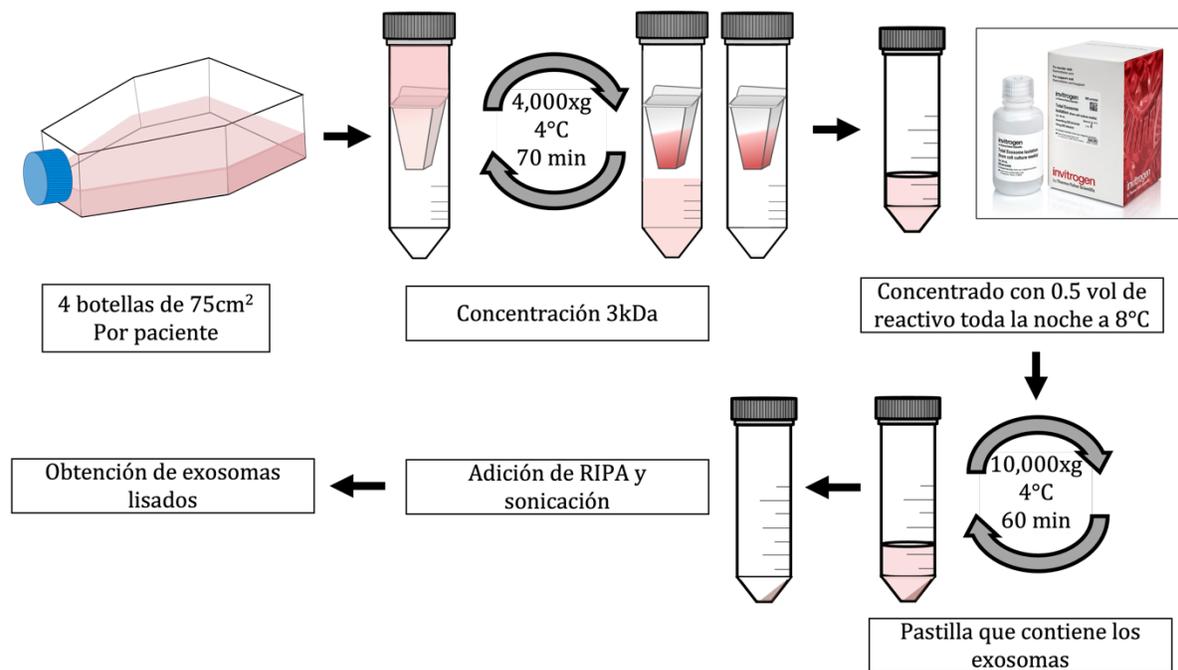


Figura 6. Esquema del procedimiento para concentrar y aislar exosomas.

Los exosomas se obtuvieron del medio condicionado en cuatro botellas de 75cm² por paciente las cuales se concentraron con unidades de filtración de Amicon® Ultra (Merck Millipore) Molecular Weight CutOff, MWCO de 3 kDa, una vez que el medio condicionado se concentró entonces se adicionó el reactivo Total Exosome Isolation Reagent (from cell culture) de Invitrogen, posteriormente se centrifugó para obtener la pastilla que se resuspendió con RIPA y se lisó con un sonicador.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Las proteínas de los exosomas aislados y lisados se cuantificaron con el método de Bradford en una placa de 96 pozos, se midió la absorbancia con una longitud de onda de 600nm en un multidetector lector de placas GloMax[®] Explorer. Para la curva estándar se utilizó albúmina sérica de bovino a una concentración de 1mg/mL, a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas a partir de una dilución 1/10. También se colocaron las muestras en una dilución 1/100. Posteriormente con base en los datos obtenidos de la curva estándar con un valor de la recta mínimo de 0.95, se calcularon los microgramos proteína por microlitro y los microgramos totales en el volumen obtenido de las muestras. A partir de este resultado se determinó la proteína total procedente de exosomas que se cargaría por arreglo de anticuerpos.

ARREGLOS DE ANTICUERPOS

Una vez cuantificada la proteína total, se procedió a identificar su contenido proteico mediante el uso de arreglos de anticuerpos (C1000 Ray Biotech Human Cytokines) utilizando 400 µg de proteína por membrana. Este arreglo nos permite identificar 120 proteínas de las familias quimiocinas, ribonucleasas, neurotrofinas, factores de crecimiento, e interleucinas.

Las membranas de microarreglos de anticuerpos se bloquearon durante 30 minutos, se colocaron 400 µg de la muestra y se dejó incubando a 4°C durante dos días. Una vez finalizada la incubación se realizaron lavados y se agregó el cóctel de anticuerpos biotinilados y se dejó incubando la preparación toda la noche a 4°C. Se volvieron a realizar lavados y se agregó 1X HRP-estreptavidina durante dos horas a temperatura ambiente. Después se le colocó el buffer de detección y la imagen se capturó con un sistema de imágenes ChemiDoc. Finalmente, las densidades ópticas de las proteínas identificadas se calcularon con el programa ImageLab de Bio-Rad.

Posteriormente se realizó la identificación de proteínas con los arreglos de anticuerpos (C1000 Ray Biotech Human Cytokines) en ambas membranas, C6 y C7, las cuales en conjunto identifican un total de 120 proteínas de las familias quimiocinas, ribonucleasas, neurotrofinas, entre otras, así como factores de crecimiento, e interleucinas (**Figuras 7a y**

8a). Los marcadores positivos, negativos y blancos fueron los mismos que en el mapa del microarreglo. Posteriormente, se realizó una imagen tridimensional para observar las variaciones de intensidad entre los puntos correspondientes a las proteínas (Figuras 7b y 8b).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	POS	POS	NEG	NEG	BLANK	Angiogenin	BDNF	BLC (CXCL13)	BMP-4	BMP-6	Ck beta 8-1 (CCL23)	CNTF	EGF	Eotaxin-1 (CCL11)
2	Eotaxin-2 (CCL24)	Eotaxin-2 (CCL26)	FGF-6	FGF-7 (KGF)	Flt-3 Ligand	Fractalkine (CX3CL1)	GCP-2 (CXCL6)	GDNF	GM-CSF	I-309 (CCL1)	IFN-gamma	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-4
3	IGF-1	IL-10	IL-13	IL-15	IL-16	IL-1 alpha (IL-1 F1)	IL-1 beta (IL-1 F2)	IL-1 ra (IL-1 F3)	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7
4	Leptin	LIGHT (TNFSF14)	MCP-1 (CCL2)	MCP-2 (CCL8)	MCP-3 (MARC/CCL7)	MCP-4 (CCL13)	M-CSF	MDC (CCL22)	MIG (CXCL9)	MIP-1 delta (CCL15)	MIP-3 alpha (CCL20)	NAP-2 (CXCL7)	NT-3	PARC (CCL18)
5	PDGF-BB	RANTES (CCL5)	SCF	SDF-1 alpha	TARC (CCL17)	TGF beta 1	TGF beta 3	TNF alpha	TNF beta	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	POS

Each antibody is spotted in duplicate vertically

AAH-CYT-6

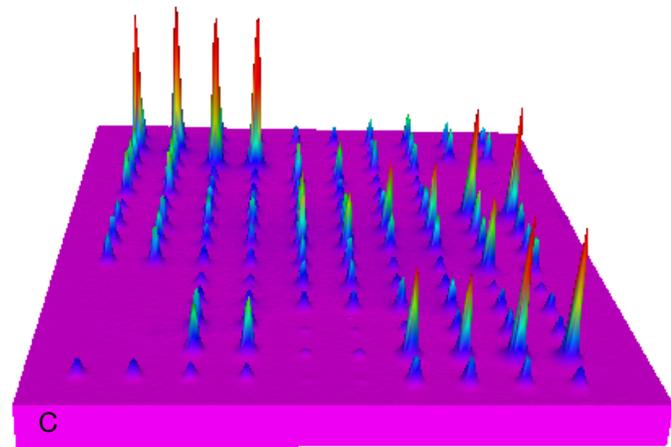
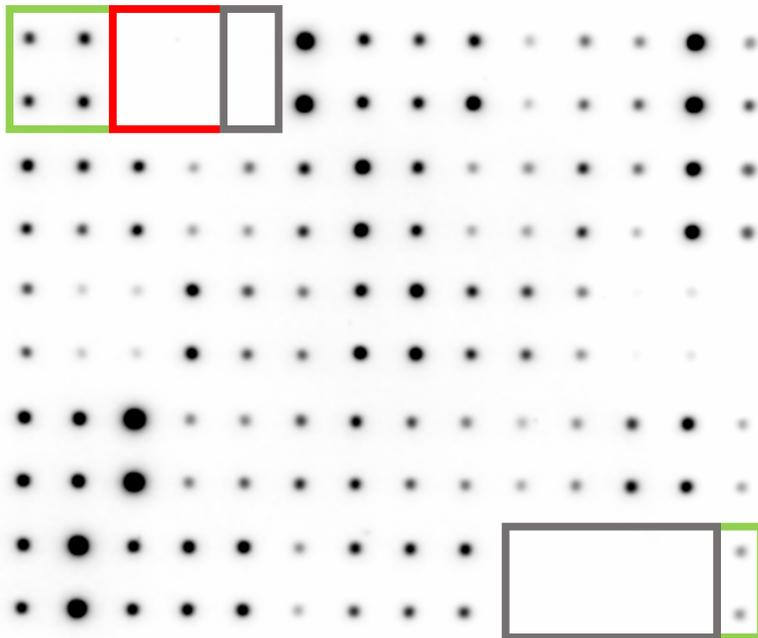


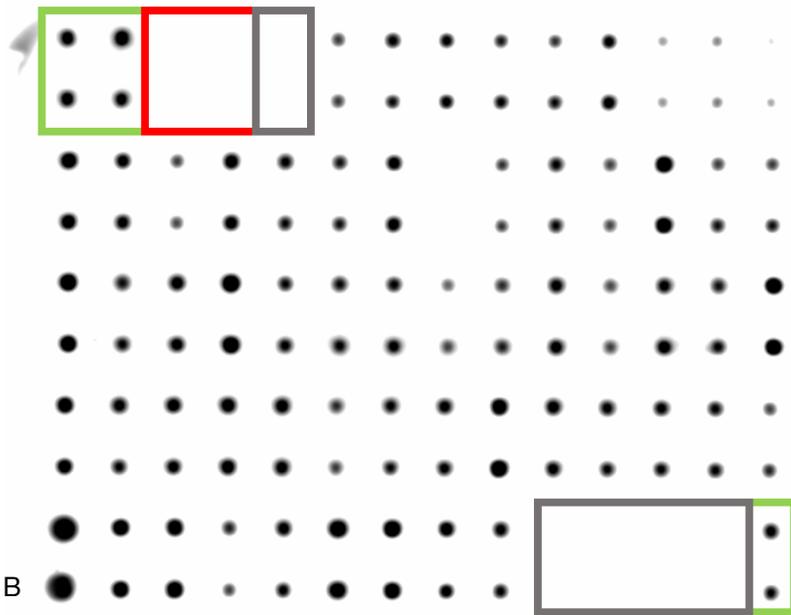
Figura 7. Membrana C6 de microarreglo C1000 human cytokines.

Se señalan en verde los controles positivos, en rojo los negativos y en gris los blancos. A) Mapa de proteínas marcadas de la membrana C6. B) Membrana C6 del microarreglo del control para estandarización (el control de estandarización fue un voluntario de sexo masculino, que cumplió los criterios de no presentar psicopatologías). C) Imagen tridimensional, se pueden observar las variaciones entre las intensidades de los spots.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	POS	POS	NEG	NEG	BLANK	Adiponectin (ACRP30)	AgRP	ANGPT2	AR	Axl	bFGF	beta-NGF	BTC	CCL28 (MEC)
2														
3	CTACK (CCL27)	Dtk	EGFR	ENA-78 (CXCL5)	Fas (Apo-1)	FGF-4	FGF-9	G-CSF	GTR Ligand (TNFSF18)	GTR (TNFSF18)	GRO a/b/g	GRO alpha (CXCL1)	HCC-4 (CCL16)	HGF
4														
5	ICAM-1 (CD54)	ICAM-3 (CD50)	IGFBP-3	IGFBP-6	IGF-1R	IL-1 R4 (ST2)	IL-1 R1	IL-11	IL-12 p40	IL-12 p70	IL-17A	IL-2 R alpha	IL-6 R	IL-8 (CXCL8)
6														
7	I-TAC (CXCL11)	Lympho-tactin	MIF	MIP-1 alpha (CCL3)	MIP-1 beta (CCL4)	MIP-3 beta (CCL19)	MSP alpha/beta	NT-4	OPG (TNFRSF11B)	OSM	PLGF	gp130	TNFR II (TNFRSF1B)	TNFR I (TNFRSF1A)
8														
9	TECK (CCL25)	TIMP-1	TIMP-2	TPO	TRAIL R3 (TNFRSF10C)	TRAIL R4 (TNFRSF10D)	uPAR	VEGF-A	VEGF-D	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	POS
10														

Each antibody is spotted in duplicate vertically

AAH-CT-7



C

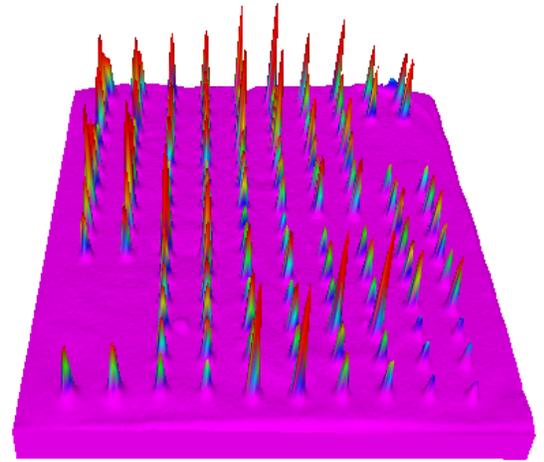


Figura 8. Membrana C7 de microarreglo C1000 human cytokines.

Se señalan en verde los controles positivos, en rojo los negativos y en gris los blancos. A) mapa de proteínas marcadas de la membrana C7. B) Membrana C7 del microarreglo del control para estandarización (el control de estandarización fue un voluntario de sexo masculino, que cumplió los criterios de no presentar psicopatologías). C) Imagen tridimensional, se pueden observar las variaciones entre las intensidades de los spots.

CARACTERIZACIÓN DE LOS MARCADORES POR WESTERN BLOT

La caracterización de las proteínas transmembranales de superficie de los exosomas se realizó mediante Western Blot, con ayuda del M. en C. Vásquez se fabricaron geles de acrilamida (discontinuos) con protocolo TBE (tris-borate-EDTA) 1% siguiendo las indicaciones de fabricante: Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Instruction Manual, BIO RAD, número de catálogo 165-8000 – 165-8007. Las proteínas de los exosomas se separaron en geles discontinuos de poli-acrilamida 4 y 12%, de un 1mm de espesor. Las condiciones de la electroforesis fueron las siguientes, 51 minutos a 100V y posteriormente a 250V por 35 minutos. Una vez que las

proteínas se separaron, estas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa con un poro de 0.22 μm (Trans-Blot® Turbo™ Mini-size Nitrocellulose BIO-RAD). Terminada la transferencia, la presencia de proteínas en la membrana se verificó utilizando el reactivo rojo de Ponceau. Las membranas se bloquearon con leche descremada al 3% durante 30 minutos, después del bloqueo inespecífico, se incubaron las membranas con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo, se emplearon los anticuerpos indicados en la **tabla 4**. Posteriormente se realizaron tres lavados de diez minutos con TBS-Tween 20 al 0.05%. Una vez retirado cualquier residuo, se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario HRP correspondiente a la especie y diluido en solución TBS-Tween 20 al 0.05% de 60 a 120 minutos a temperatura ambiente y con agitación constante; las diluciones fueron de 1:1000 y 1:10000. Después se lavaron nuevamente tres veces con solución TBS-Tween 20 al 0.05%. Se revelaron las membranas con Solución de Sustrato HRP (Immobilon™ Western, Chemiluminescent HRP Substrate) usando volúmenes iguales de las soluciones del Kit, durante 5 minutos, la presencia de bandas correspondiente a estas proteínas se visualizó en un sistema de imágenes ChemiDoc™ Touch Imaging System de BIO-RAD, y se detectaron por quimioluminiscencia (Aplicación: Quimioluminiscencia, Blots) bajo diferentes tiempos de exposición (**tabla 5**). Las imágenes se almacenaron y se analizaron por densitometría con el programa ImageLab de Bio-Rad.

<i>Anticuerpo</i>	<i>No. catálogo/casa comercial</i>	<i>Dilución</i>
CD63	10628D (Invitrogen)	1:300
Alix	AB88388 (ABCAM)	1:1000
Actina	AB5694 (ABCAM)	1:2000
CD9	10626D (Invitrogen)	1:1000
CD13	AB108310 (ABCAM)	1:1000
*Todas las diluciones de los Ab primarios se realizaron en TBS-T.		

Tabla 4. Listado de anticuerpos primarios incubados en la membrana utilizados en el Western Blot para la caracterización de las proteínas transmembranales de superficie de los exosomas.

Tiempo de exposición (Aplicación: Quimioluminiscencia, Blots)	5 a 25 segundos – 5 imágenes 10 a 120 segundos – 8 imágenes 10 a 240 segundos – 10 imágenes 10 a 300 segundos – 8 imágenes
---	---

Tabla 5. Tiempos de exposición utilizados para el revelado por quimioluminiscencia.

Antes de realizar la identificación de las proteínas por Western blot, se realizaron curvas de proteínas con 10, 20 y 30 µg de proteína correspondiente a un control y un paciente diagnosticado con TLP para identificar a las proteínas ALIX, CD13 y Actina. Esto permitió la determinación de la cantidad de proteína total de los exosomas que permitiera identificar a las proteínas marcadoras de exosomas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizaron las plantillas de Excel de Biotech para los microarreglos C1000 Ray Biotech Human Cytokines donde se añadieron los valores obtenidos del programa ImageLab de Bio-Rad para obtener la intensidad relativa. Posteriormente con los valores obtenidos se normalizaron con la formula: $IR = (\text{Señal spot muestra} - \text{Señal spot blanco}) / (\text{Señal spot positivo})$. Los datos normalizados se procesaron en el programa estadístico Prisma 8. El análisis estadístico consistió en pruebas de comparación múltiple de medias, utilizando el método de corrección Holm Sidak con un alfa de 0.05, posteriormente se seleccionaron las proteínas con valores de $p < 0.05$ significativas y se realizó una correlación de Pearson en Prisma 8 con los valores de BEST y SCIDII.

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS DE LOS PARTICIPANTES

Las muestras de las células progenitoras del epitelio olfatorio de los pacientes fueron pareadas por edad y sexo, resultando en cuatro controles y seis participantes diagnosticados con TLP por primera vez. Se incluyeron aquellas comorbilidades que son altamente frecuentes en pacientes diagnosticados con TLP. Estos indicaron la presencia de comorbilidades psiquiátricas de ansiedad (Trastorno de Ansiedad Generalizada (TAG) y Trastorno de Angustia (TA)) y depresión (Trastorno de Depresión Mayor (TDM) y distimia), lo cual es normal en pacientes diagnosticados con TLP. También uno de los pacientes presentó Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad (TDAH), lo cual es un antecedente frecuente en el TLP (**tabla 6**). A los participantes se les realizaron pruebas de química sanguínea, citometría hemática completa, examen general de orina, perfil ginecológico, perfil tiroideo parcial y coproparasitoscópico (**anexo 1**). Con lo cual se descartó que presentaran un proceso inflamatorio adicional.

ID	Edad	Sexo	Comorbilidades psiquiátricas		
C1	22	F	No	No	No
C5	25	F	No	No	No
C6	24	F	No	No	No
C7	22	F	No	No	No
F1T	28	F	TAG	No	No
E12T	19	F	TDM	No	No
E4T	24	F	TDM	Distimia	TAG
F7T	21	F	Distimia	Trastorno de angustia	No
E9T	28	F	No	No	No
E13T	18	F	TDM	TDAH	No

Tabla 6. Sexo, edades y comorbilidades psiquiátricas de los participantes.

Participantes en gris pertenecen al grupo control y en blanco diagnosticados con TLP.

La prueba diagnóstica SCID-II (Entrevista Clínica Estructurada para los trastornos de Personalidad del Eje II del DSM-V), reveló la puntuación necesaria para diagnosticar a los participantes con TLP (**tabla 7**). Además, se evaluó la severidad del trastorno antes de recibir alguna intervención terapéutica con la escala “*Borderline evaluation of severity over time*” (BEST). Cuyos criterios se evalúan del 1 (Ninguno/ Leve) a 5 (Alta). Lo que incluye a los pensamientos y sentimientos, los cuales involucran evaluaciones de reactividad del estado de ánimo, alteración de la identidad, relaciones inestables, paranoia, vacío y pensamiento suicida. Mientras que las conductas negativas comprenden aquellas que provocan lastimarse a sí mismo. Estas puntuaciones se suman y se le restan las conductas positivas, que califican acciones como el seguimiento de los planes de terapia. Finalmente se agrega un factor de corrección de 15 para obtener la puntuación final, que puede oscilar entre 12 (mejor) y 72 (peor). Los participantes presentaron un puntaje total promedio de 48.17 antes de recibir tratamiento. Este puntaje los ubicó en la parte media de la escala (**tabla 8**).

TP/ Paciente	C1	C5	C6	C7	F1T	F7T	E4T	E9T	E12T	E13T
Evitación	4	4	1	4	4	5	6	7	5	7
Dependencia	0	0	1	0	3	3	4	3	4	4
Obsesivo Compulsivo	4	3	5	4	5	7	5	8	2	7
Pasivo Agresivo	2	1	2	2	3	8	4	3	6	6
Depresivo	2	2	4	1	4	7	5	7	8	7
Paranoide	4	5	2	1	5	6	4	7	6	6
Esquizotípico	1	1	4	1	1	8	7	2	4	7
Esquizoide	4	4	6	2	0	2	2	2	2	1
Histriónico	3	2	2	1	1	4	5	0	4	5
Narcisista	6	6	4	3	7	8	10	3	10	9
Límite	4	3	8	3	11	11	14	13	13	13
Antisocial	0	0	0	2	1	5	1	0	1	1

Tabla 7. Resultados del puntaje en la prueba SCID-II.

Se observan los valores obtenidos para trastornos de personalidad, donde en el límite, posee los valores más elevados. En gris se ilustran los participantes que pertenecen al grupo control y en blanco los diagnosticados con TLP.

ID	BEST
-----------	-------------

	TOTAL	PENSAMIENTOS Y SENTIMIENTOS	CONDUCTAS POSITIVAS	CONDUCTAS NEGATIVAS
C1	29	22	14	6
C5	17	10	9	1
C6	26	11	4	4
C7	35	19	9	10
F1T	39	22	9	7
F7T	43	30	9	11
E4T	55	34	13	7
E9T	45	32	10	12
E12T	52	28	18	9
E13T	55	35	13	8

Tabla 8. Resultados del puntaje en la prueba BEST antes de recibir tratamiento.

Participantes en gris pertenecen al grupo control y en blanco diagnosticados con TLP. Donde se evalúa la severidad del trastorno con la suma de los criterios de los pensamientos y sentimientos, y de las conductas negativas. A estos valores se les resta las conductas negativas y se le suma un factor de corrección de 15. Resultando en el valor total, que oscila entre 12 (mejor) y 72 (peor).

ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DE EXOSOMAS A PARTIR DE CÉLULAS PROGENITORAS DEL EPITELIO OLFATORIO

CULTIVO DE LAS CÉLULAS PROGENITORAS DEL EPITELIO OLFATORIO

Se estandarizó el método utilizando un control masculino, ya que la cantidad de muestra de pacientes femeninos era limitada. Se cultivaron las células progenitoras del EO en botellas de 75 cm², obteniendo 10 mL de medio condicionado por botella en promedio. Las células del EO se cultivaron en DMEM/F12 con 10% de SFB (suero fetal de bovino), hasta que llegaran a una confluencia del 80% (**Figura 9A**), y posteriormente se cambió al medio DMEM/F12 con B27 y EGF + FGFb a 20ng/ml (factores de crecimiento) (**Figura 9B**). La densidad final de células presentes en las botellas de cultivo fue de 454 células por microlitro (454,000 por mL) (**tabla 9**). Respecto a la apariencia de las células progenitoras del EO que fueron cultivadas con suero o con factores de crecimiento, las imágenes indican que estas células son bipolares en ambas condiciones de cultivo (**Figura 9B**).

Número de botellas de 75 cm ²	Número de células	Densidad por mL	Densidad por µL

1	9,260,000	926,000	926
1	5,100,000	510,000	510
2	7,680,000	384,000	384
2	6,480,000	324,000	324
2	7,410,000	370,500	371
2	9,950,000	497,500	498
2	8,210,000	410,500	411
2	6,690,000	334,500	335
2	6,580,000	329,000	329
	Promedio	454,000	454

Tabla 7. Células generadas en una o dos botellas de cultivo de 75 cm² y su densidad por mL y μ L del control masculino de estandarización.

Posteriormente, siguiendo el mismo protocolo se obtuvieron los medios condicionados de las células progenitoras del EO de los 4 controles y de 6 pacientes diagnosticados con TLP antes de recibir alguna intervención terapéutica (tabla 4), en dichas muestras se obtuvo un volumen ligeramente mayor, aproximadamente 15mL por botella de 75 cm².

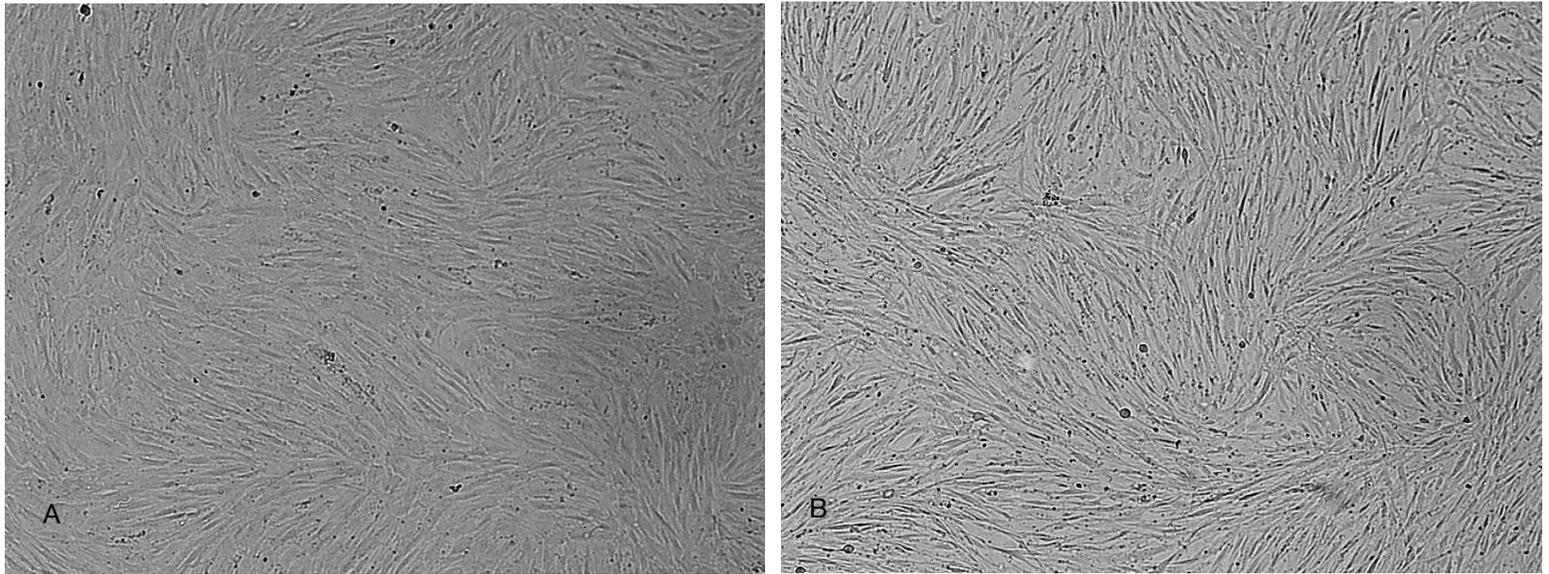


Figura 9. Cultivo de células del epitelio olfatorio humano del control masculino de estandarización
A) DMEM/F12 con 10% de SFB con una confluencia del 80%. B) DMEM/F12 con B27 y EGF + FGFb a 20ng/ml. Imagen capturada en campo claro a 6X, en Nikon-eclipse con un objetivo. Barra de calibración igual a 100 micrómetros.

ESCALAMIENTO DEL CULTIVO PARA UNA MAYOR OBTENCIÓN DE PROTEÍNA

Para establecer el número necesario de células o botellas que nos permitieran obtener una mayor cantidad de exosomas se realizó una curva para analizar los microgramos de proteína total obtenidos de una, dos, tres, cuatro, cinco y seis botellas con 10 mL de medio condicionado cada uno. A partir de estos concentrados se procedió a aislar los exosomas y una vez obtenidos se cuantificó el contenido de proteína total (**tabla 10**). Como era de esperar, la cuantificación reflejó un aumento exponencial de los μg de proteína por μL , es decir una mayor cantidad de exosomas obtenidos con un mayor número de botellas (**Gráfico 1**).

Número de botellas	µg/µL	µL obtenidos	µg de proteína totales
1	0.33582788	34	11.4181478
2	0.84097287	45	37.84377923
3	1.28063611	71	90.9251637
4	1.84658559	82	151.4200187
6	3.0860617	105	324.0364827

Tabla 8. Microgramos por microlitro obtenidos en el aislamiento de exosomas a partir del medio condicionado.

Se indican los µg por µL según el número de botellas, así como los µL y µg de proteína totales.

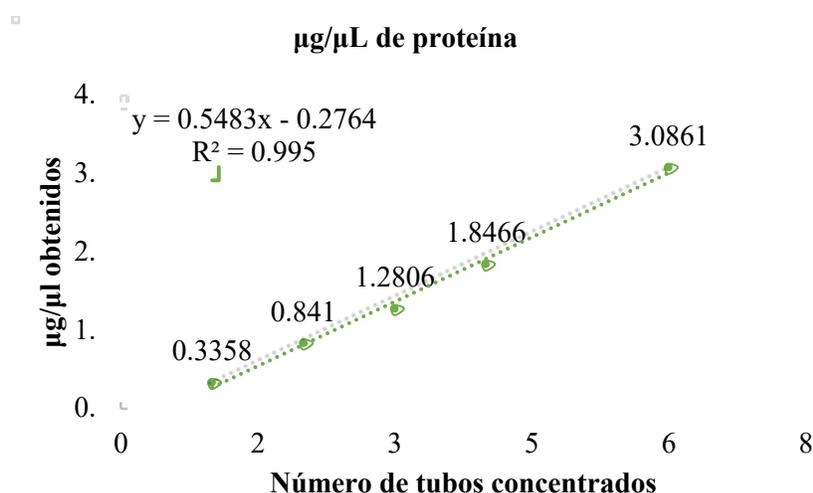


Gráfico 1. Microgramos por microlitro de proteína total de exosomas aislados.

Proteína cuantificada mediante Bradford, donde se refleja un crecimiento exponencial con muestras de 10mL por botella o tubo.

DETERMINACIÓN DEL CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA NECESARIA PARA LOS ARREGLOS DE ANTICUERPOS

A partir de estos resultados se determinó que a partir de cuatro botellas de 75cm² se obtiene la proteína necesaria para las dos membranas de los microarreglos C1000. Para poder realizar la identificación de las 120 proteínas se requirieron 800 µg para ambas membranas. Además de la proteína requerida para hacer las identificaciones de proteínas de exosomas por Dot blot o Western Blot (**tabla 11**).

	MUESTRA 1	MUESTRA 2
Botellas de 75cm ²	16	6.33
µg/µL	3.33531746	7.23412698
µL obtenidos	1100	200
µg totales	3668.8492	1446.8254
µg por botella	229.303075	228.566414
µg en 4 botellas de 75cm ²	917.2123	914.265656
µg necesarios para microarreglos	800	800
µg restantes para WB o DB	117.2123	114.265656

Tabla 9. Proyección de los µg por botella obtenidos en el aislamiento de exosomas a partir del medio condicionado.

Se indica que se obtiene suficientes µg de proteína con cuatro botellas de 75cm².

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO PARA CONCENTRAR LA MUESTRA Y OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS DE EXOSOMAS

Una vez que se determinó que se requieren cuatro botellas de medio condicionado para obtener suficiente proteína para las determinaciones subsecuentes se realizó la estrategia de concentrar el volumen inicial del medio condicionado (60mL de muestra) utilizando concentradores Amicon® Ultra (Merck Millipore) Molecular Weight CutOff, MWCO de 3 kDa, con la intención de optimizar el volumen requerido del reactivo para el aislamiento de los exosomas (Total exosome isolation reagent for cell culture de Invitrogen). Para determinar lo anterior se realizó la comparación del contenido de proteínas totales de exosomas obtenidos a partir de una muestra concentrada y otra muestra sin concentrar de uno de los participantes control y de un participante diagnosticado con TLP. La cuantificación de proteínas reveló que las muestras concentradas permiten obtener mayor cantidad que en las muestras no concentradas (**tabla 12**). Esta estrategia se aplicó a las muestras de medio condicionado de las células progenitoras del epitelio olfatorio de los cuatro controles y de los seis participantes con TLP. La proteína total en ambos grupos no mostró diferencia estadísticamente significativa ($t=1.080$; $g.l.=8$; Valor de $P= 0.3118$) (**tabla 13** y **gráfico 2**).

MUESTRA	TLP concentrado	TLP sin concentrar	Control concentrado	Control sin concentrar
ug/uL	4.210401891	3.052009456	1.3735225	0.6288416

Tabla 10. Proteína obtenida (µg/µL) en el aislamiento de exosomas a partir del medio condicionado concentrado y sin concentrar en un participante del grupo TLP y en un participante control.

ID original	ID muestras	Código de identificación	Proteína (µg/µL)
C1	C11	DLAM	1.8
C5	C5	CLSR	1.941
C6	C9	BDF	2.2
C7	C7	AGJ	1.98
F1T	TLP 13	CSGC	2.03
E12T	TLP 14	RVLL	2.54
E4T	TLP 8	MLIM	4.2
F7T	TLP 21	MACH	2.06
E9T	TLP 20	MJGV	1.945
E13T	TLP 22	BMPB	2.03

Tabla 11. Proteína obtenida (µg/µL) obtenidos en el aislamiento de exosomas a partir del medio condicionado concentrado en participantes TLP y controles.

La comparación entre los grupos no reveló diferencia en la concentración de proteína total de exosomas, no se encontraron diferencias significativas. Por lo que la cantidad de proteína exosomal no se ve alterada por la presencia del TLP.

Proteína obtenida en exosomas

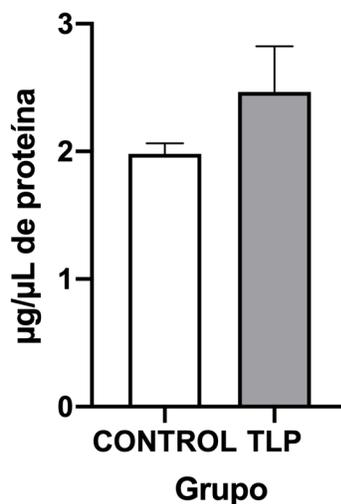
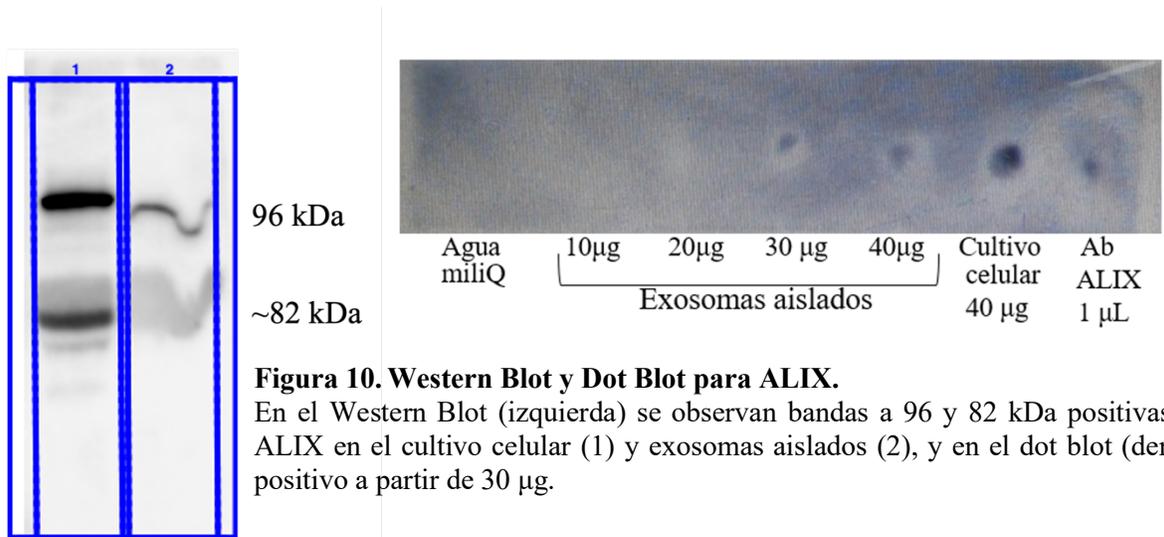


Gráfico 2. Proteína obtenida (µg/µL) obtenidos en el aislamiento de exosomas a partir del medio condicionado concentrado en participantes TLP y controles.

La comparación entre los grupos no reveló diferencia en la concentración de proteína total de exosomas. No se encontraron diferencias significativas entre grupos (P=0.3118).

MARCADORES DE EXOSOMAS

Una vez que se obtuvieron las proteínas de los exosomas se procedió a realizar la identificación de marcadores proteicos característicos de estas vesículas. En primer lugar, se realizó una curva de concentraciones de proteínas (10, 20, 30 y 40 μg) de exosomas para identificar a la proteína ALIX (**Figura 10**). A partir de 30 μg de proteína de exosomas se pudo observar la inmunoreactividad de la proteína ALIX. Resultados similares fueron observados con 40 μg de proteína total de células progenitoras del EO. De la misma manera, en el Western Blot fue posible visualizar la inmunodetección de la proteína ALIX, utilizada como marcador exosomal.



EXPRESIÓN DE MARCADORES DE EXOSOMAS EN PARTICIPANTES CONTROL Y CON DIAGNÓSTICO DE TLP POR WESTERN BLOT

Posteriormente, se realizó la inmunodetección de las proteínas CD9, CD63, ALIX y actina por Western Blot en los exosomas de participantes control y de participantes con diagnóstico de TLP (**Figura 11-14**). El análisis densitométrico realizado en los cuatro controles y en los seis participantes con diagnóstico TLP reveló que no existieron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de los marcadores de exosomas como leemos las gráficas de izquierda a derecha (CD9 $t=1.342$, $g.l.=8$, $p=0.2165$; CD63 $t=1.428$, $g.l.=8$, $p=0.1910$; ALIX $t=1.400$, $g.l.=8$, $p=0.1990$; Actina $t=1.085$, $g.l.=8$, $p=0.3096$, con un alfa de 0.05) (**Gráficos 3-6**).

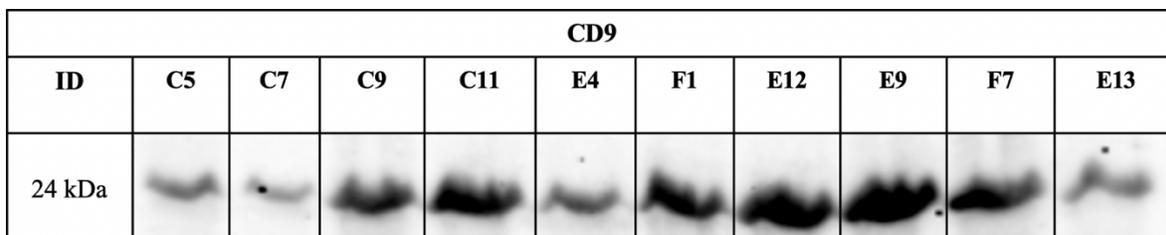


Figura 11. Inmunodetección de CD9 por Western Blot de controles y participantes diagnosticados con TLP.

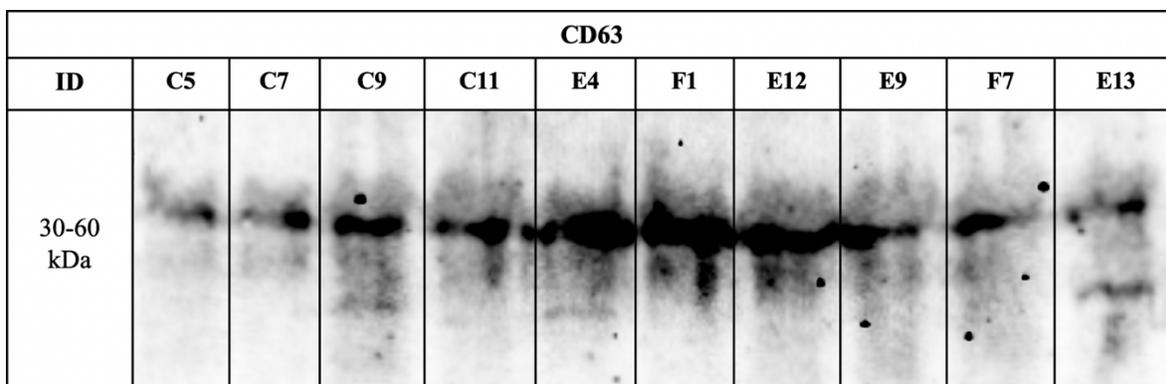


Figura 12. Inmunodetección de CD63 por Western Blot de controles y participantes con diagnóstico de TLP.

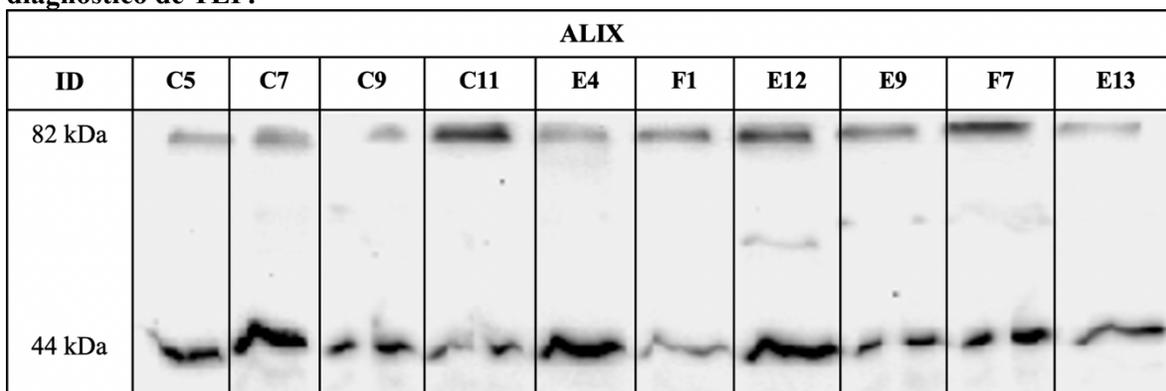


Figura 13. Inmunodetección de ALIX por Western Blot de controles y participantes diagnosticados con TLP.

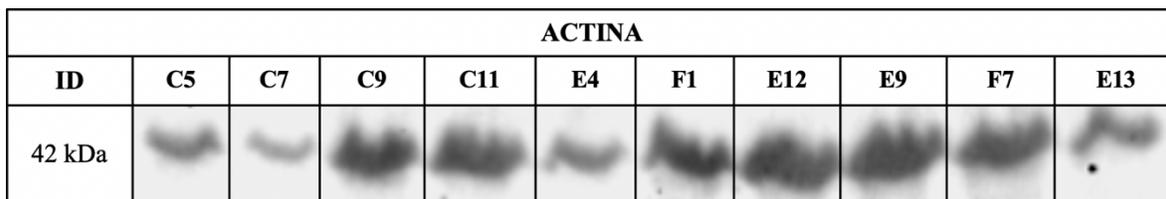


Figura 14. Inmunodetección de actina por Western Blot de controles y participantes diagnosticados con TLP.

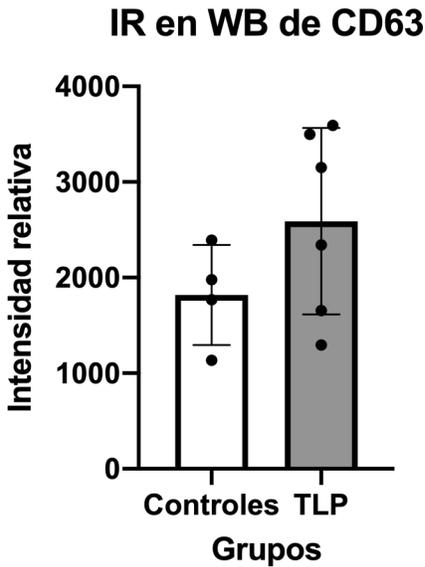


Gráfico 3. Valores de intensidad relativa (IR) en Western Blot del marcador CD63 en participantes con diagnóstico de TLP y controles.

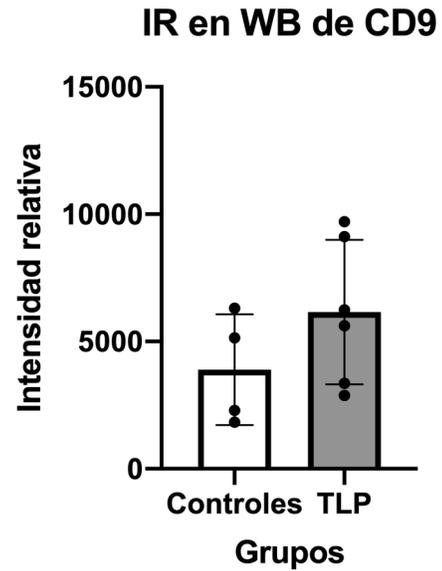


Gráfico 4. Valores de intensidad relativa (IR) en Western Blot del marcador CD9 en participantes con diagnóstico de TLP y controles.

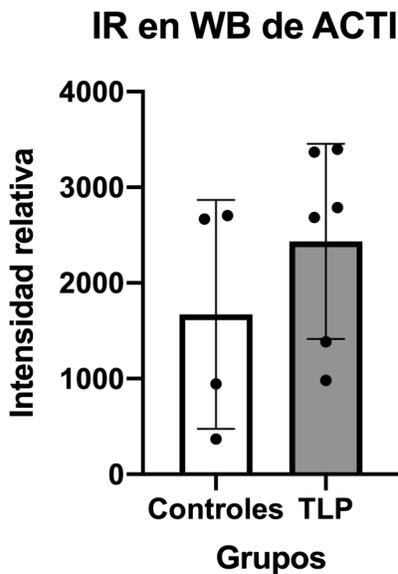


Gráfico 5. Valores de intensidad relativa (IR) en Western Blot del marcador actina en participantes con diagnóstico de TLP y controles.

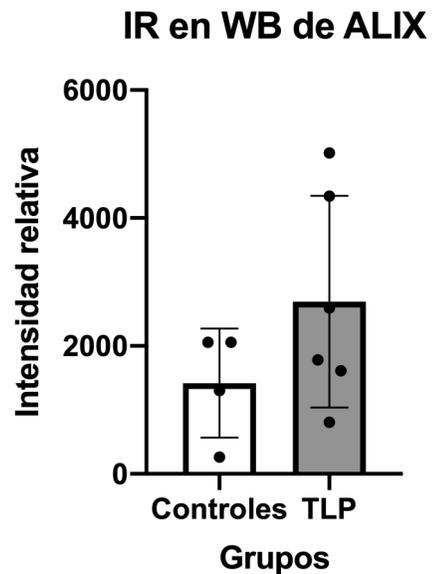


Gráfico 6. Valores de intensidad relativa (IR) en Western Blot del marcador ALIX en participantes con diagnóstico de TLP y controles.

ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

Los valores de intensidad relativa obtenidos con el programa ImageLab se analizaron con una prueba de comparación múltiple de medias, utilizando el método de corrección Holm Sidak con un alfa de 0.05, comparando los participantes diagnosticados con TLP con los controles, en ambas membranas (**Gráficos 7 y 8**), donde se observa la dispersión entre individuos, no obstante en los participantes con TLP, el Factor de Crecimiento Epitelial (EGF), ligando 5 de quimiocina (CCL5) o RANTES, y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) presentaron diferencias significativamente menores en los pacientes respecto a los controles: EGF $t=7.714$, $g.l=480$, $P= <0.00000001$; RANTES $t=7.708$, $g.l=480$, $P= <0.00000001$; MCP-1 $t=4.486$, $g.l=480$, $P= 0.00000910$ (**Gráfico 9**).

Posteriormente, estas proteínas se pasaron a la base de datos Uniprot para obtener el código de la proteína para posteriormente analizarlas en String. En dicha base de datos las proteínas se procesaron con un nivel de confianza de interacción media de 0.400, donde RANTES (CCL5) y MCP-1 (CCL2) mostraron interacciones de co-expresión, homología de proteínas y redes de interacción, ya que ambas son quimiocinas. Mientras que EGF se encontraba en el medio condicionado (**Figura 15**).

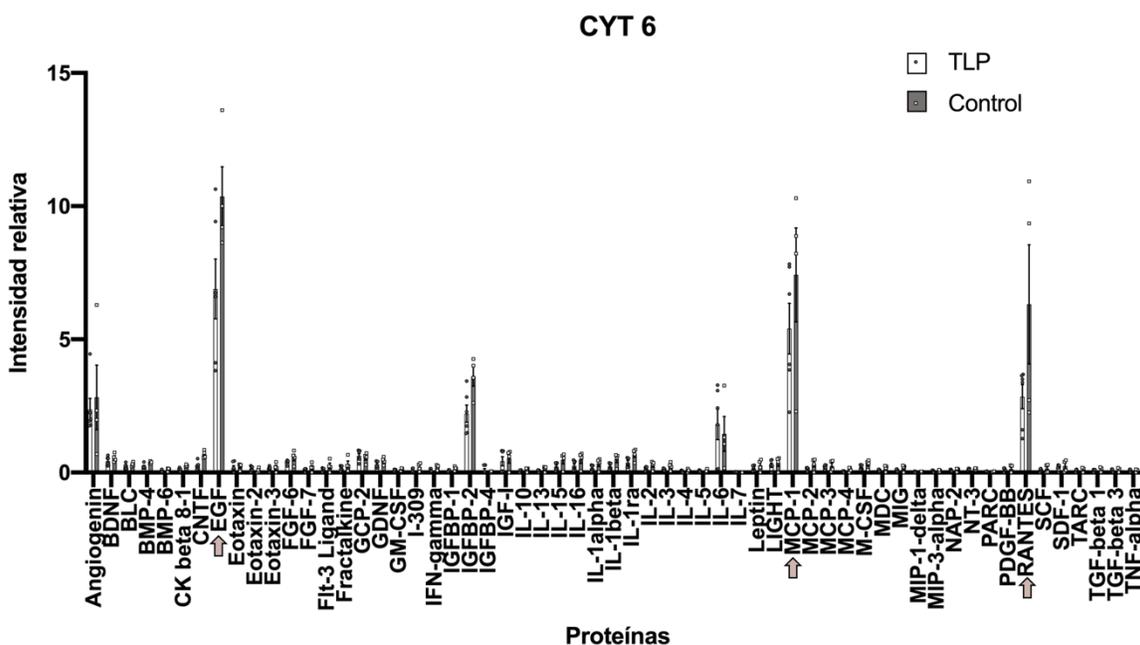


Gráfico 7. Valores de IR de las proteínas de la membrana CYT6 en los pacientes diagnosticados con TLP respecto a los controles.

Se muestran las proteínas identificadas en la membrana CYT6, así como la dispersión entre

pacientes. Las proteínas EGF, RANTES y MCP-1 indicadas con flechas, fueron las que tuvieron diferencias significativas, siendo significativamente menores en pacientes respecto a los controles.

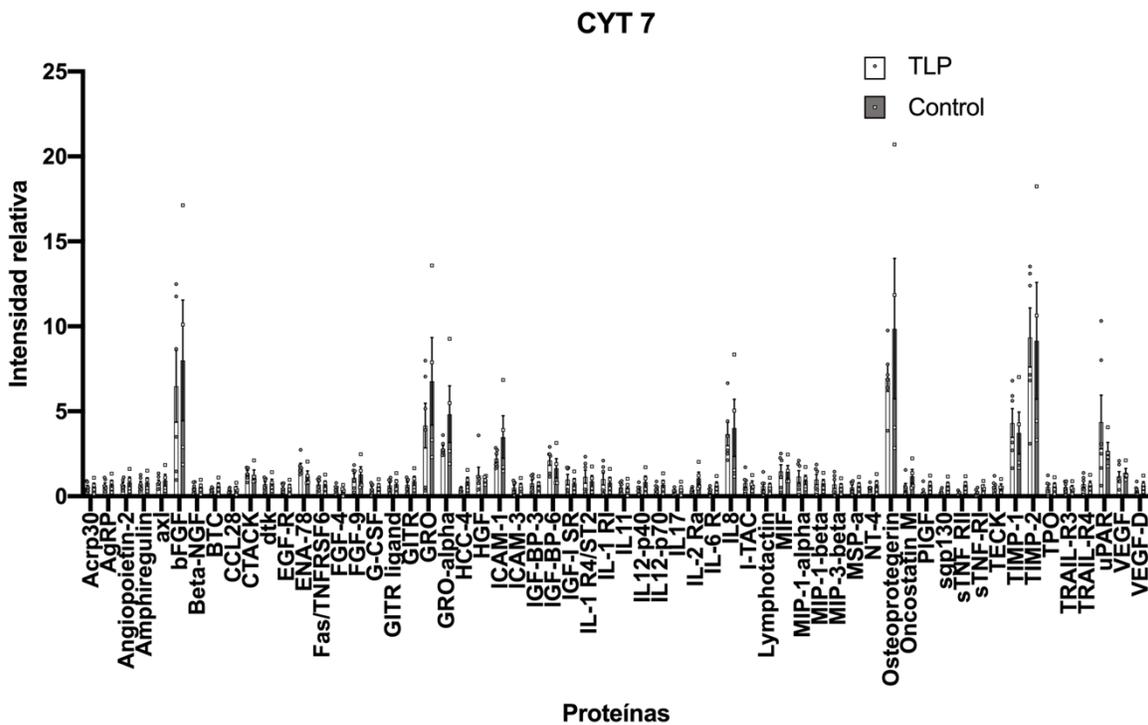


Gráfico 8. Valores de IR de las proteínas de la membrana CYT7 en los pacientes diagnosticados con TLP respecto a los controles.

No se encontraron proteínas con diferencia significativa en las proteínas de esta membrana, también se observa la dispersión de datos entre pacientes.

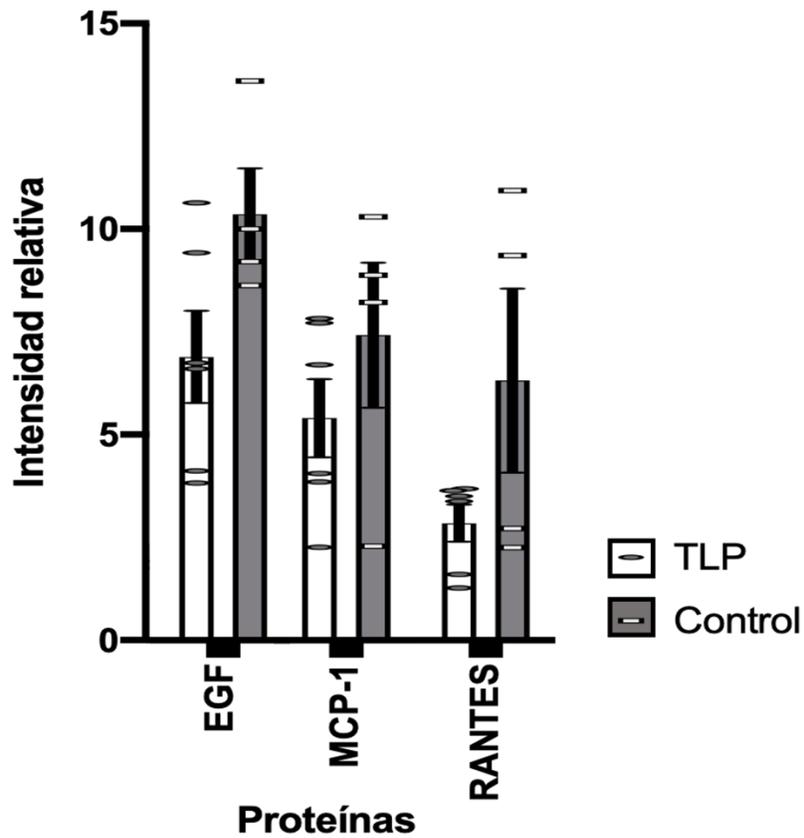


Gráfico 9. Valores de IR de las proteínas significativas en los pacientes diagnosticados con TLP respecto a los controles.

Se muestra una amplificación de las proteínas con diferencias significativas, perteneciente a la membrana CYT6. Las proteínas con valores significativos fueron EGF, MCP-1 y RANTES, con bandas que indican los valores individuales.

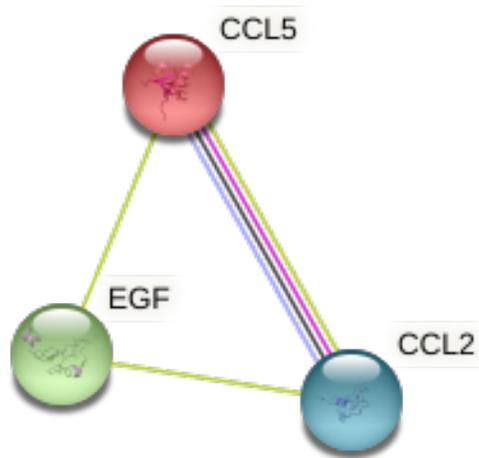


Figura 15. Análisis de interacción de proteínas significativas.

Dado que las proteínas EGF, RANTES (CCL5) Y MCP-1 (CCL2) tuvieron diferencias significativas entre grupos, se muestra las interacciones generadas en String con un nivel de confianza de interacción media de 0.400, principalmente entre CCL5 y CCL2, ya que ambas son quimiocinas.

DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis se estandarizó el método para aislar exosomas contenidos en el medio condicionado de las células progenitoras de participantes control y con diagnóstico de TLP. El método de aislamiento se complementó con el uso de unidades concentradoras que permitió la optimización del reactivo para realizar el aislamiento.

El presente estudio muestra que los exosomas aislados tienen un contenido similar de proteína exosomal total, por lo que entre grupos no se reportan cambios en el contenido de proteína. Posteriormente se comprobó la obtención de exosomas mediante el hallazgo de las tetraspaninas CD9 y CD63, las cuales tienen una distribución amplia en las membranas de los exosomas, por lo que se utilizan como marcadores exosomales. Así como la proteína ALIX, ya que la formación de los exosomas dentro de los cuerpos multivesiculares (MVBs) dependen de vías independientes y dependientes de ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport). Dentro de las proteínas específicas asociadas con el complejo ESCRT de los exosomas, se encuentran ALIX (ALG-2 que interactúa con la proteína X) (Raiborg, y Stenmark, 2009), por lo que es comúnmente utilizada como proteína de marcaje para exosomas. La inmunodetección reveló la presencia y niveles de expresión similares de las proteínas ALIX, CD9 y CD63 en los grupos control y pacientes diagnosticados con TLP, lo que sugiere que esta proteína está presente en los exosomas de las células progenitoras del epitelio olfatorio.

Los exosomas han sido propuestos como una potencial fuente de biomarcadores en los trastornos neuropsiquiátricos; sin embargo, en la investigación sobre marcadores diagnósticos del TLP no existen trabajos que hayan explorado y analizado los exosomas como una posible fuente de marcadores de este trastorno neuropsiquiátrico. Los exosomas participan en la comunicación celular y en la fisiología sináptica, lo que los vuelve un recurso para complementar los datos de diagnóstico y de la intervención terapéutica, ya que estos pacientes suelen tener características heterogéneas, haciendo que las respuestas a los tratamientos sean difíciles de predecir (Saeedi et al., 2019).

Los exosomas son generados como vesículas intraluminales (ILV), que se liberan a partir de la fusión de los cuerpos multivesiculares (MVB) con la membrana plásmatica. Los exosomas están presentes en casi todos los fluidos biológicos como el plasma sanguíneo, células

estromales mesenquimales de la mucosa olfativa y células progenitoras neurales (Andreu et al., 2014; Xun et al., 2020; Ma et al., 2019).

Sin embargo, algunos estudios han reportado que en muestras sanguíneas existe expresión diferencial de proteínas relacionadas con la inflamación en trastornos neuropsiquiátricos respecto a los controles, como el trastorno de depresión mayor (TDM) y en células mononucleares aisladas en el trastorno bipolar (TB). El aumento de la producción de citocinas proinflamatorias, las cuales pueden acceder al cerebro activando la microglía y los astrocitos, generan neuroinflamación, lo cual a su vez modula áreas cerebrales relacionadas con algunos trastornos como la depresión (Wieck, et al. 2016; Fleshner et al., 2017).

Dentro de los participantes estudiados en el presente estudio, se reportan comorbilidades de tipo ansioso y depresivo. La depresión es una de las comorbilidades normalmente presentes en los pacientes con TLP, de igual forma se reporta la presencia de algún trastorno ansioso en el 89% de los pacientes con TLP, siendo más frecuente que en otros trastornos de personalidad (Saccaro et al., 2021).

Adicionalmente, los exosomas participan en la comunicación intercelular en condiciones fisiológicas y patológicas; en este último caso, al ser liberados por células gliales, contribuyen a la neuroinflamación al transportar proteínas mal plegadas o contener moléculas proinflamatorias como IL-1 β . Estas proteínas pueden cruzar la barrera hematoencefálica generando un canal de comunicación con la inflamación sistémica (Pascual et al., 2020).

El análisis con los microarreglos permitió encontrar que los exosomas de las células progenitoras del epitelio olfatorio contienen las 120 proteínas que permiten identificar los arreglos de anticuerpos. Sin embargo, existe expresión diferencial de las quimiocinas MCP-1, CCL-2 y CCL-5, así como EGF entre los participantes control y los participantes con diagnóstico de TLP.

Reportamos a dos quimiocinas, RANTES (CCL5) y MCP-1 (CCL2), que disminuyen significativamente respecto a los controles (RANTES $t=7.708$, $g.l=480$, $P= <0.00000001$; MCP-1 $t=4.486$, $g.l=480$, $P= 0.00000910$) en exosomas provenientes de células progenitoras del epitelio olfatorio en pacientes diagnosticados con TLP respecto a los controles sin esta patología. Sin embargo, la bibliografía reporta que a nivel periférico en el plasma sanguíneo, se encuentran valores significativamente mayores de MCP-1 y de RANTES en trastornos de personalidad comórbido con Trastorno de Ansiedad Generalizada, incluido el TLP. Estos

valores aumentados en plasma sanguíneo se han reportado significativamente mayores en mujeres que hombres, por lo que la diferencia entre sexos, es un aspecto que debe considerarse (Ogłodek et al., 2015).

Por lo que los datos de suero sanguíneo son inversos a los obtenidos en el medio condicionado (MC) de las células progenitoras del EO, no obstante, el MC proveniente de las células progenitoras del EO, es un medio selectivo a diferencia del suero sanguíneo donde se encuentran más tipos celulares y regiones de donde pueden provenir estas proteínas.

En cuanto a los valores en la proteína EGF (factor de crecimiento epidermal) en exosomas provenientes de células progenitoras del epitelio olfatorio, fueron significativamente menores en pacientes diagnosticados con TLP respecto a los controles ($t=7.714$, $g.l=480$, $p=<0.00000001$), EGF favorece la proliferación y mantenimiento del linaje precursor de células neurales (Gómez-Virgilio, 2018), siendo necesario para la proliferación selectiva de células progenitoras del epitelio olfatorio. En el caso de EGF encontramos una correlación significativa con la escala SCIDII, que nos indica el diagnóstico del trastorno. Sin embargo, estos resultados requieren ser corroborados con una mayor población de estudio. No obstante, en EO de ratones se ha reportado que EGF disminuye en cambios fisiológicos como el envejecimiento. Ohta y colaboradores en 1999, reportaron que hay una disminución de EGF con el envejecimiento no asociada a la disminución olfativa, si no que depende de otros factores de crecimiento, por lo que cambios fisiológicos independientes de la disminución olfativa, se relacionan con la disminución de EGF al igual que en los exosomas provenientes del MC de células progenitoras del EO presentan una disminución.

De manera interesante, no se encontró reporte alguno que indique el uso de las células progenitoras del epitelio olfatorio en el estudio del TLP. Sin embargo, se ha reportado el uso de células del epitelio olfatorio en otros trastornos neuropsiquiátricos como la SZ y en el TB (McLean et al., 2018; Horiuchi et al., 2016). Mientras que en el TLP únicamente se han analizado los cambios en la profundidad del surco olfativo, y su relación con la gravedad de la sintomatología (Takahashi et al., 2019).

Sin embargo, el aislamiento proveniente de las células progenitoras del EO, conlleva varias ventajas, ya que se encuentra en una región periférica de la que se puede obtener la muestra con una técnica no invasiva mediante una exfoliación de la cavidad nasal, accediendo a las células neurales y sus precursores del epitelio olfatorio, el cual tiene conexiones con sistema

nervioso central y mantiene la capacidad de proliferar y diferenciarse en neuronas sensoriales olfativas especializadas en la edad adulta, siendo un sistema que nos permite estudiar los cambios neurogénicos en un tejido de fácil acceso. A partir de esta región se pueden recolectar y cultivar las células progenitoras del EO utilizando medios selectivos para su proliferación (Calof et al., 2002; Benítez-King et al., 2011).

Otra ventaja es respecto a método de aislamiento, Álvarez et al., en el 2015 realizaron una comparación mediante proteómica de algunos métodos de aislamiento, donde se lograron identificar más proteínas utilizando el concentrador de 3kDa MWCO que fue el que nosotros utilizamos, con un total de 345 proteínas; mientras que en el de 50kDa MWCO reportan 307; y con la ultracentrifugación solamente 172. Por lo que además de optimizar el reactivo con las unidades concentradoras nos permitió recuperar mayor cantidad de proteínas. Posteriormente a este concentrado se le agregó el reactivo que permite obtener los componentes menos solubles como las vesículas mediante una centrifugación de baja velocidad concentrando la muestra, obteniendo más proteína, por lo tanto, de exosomas.

CONCLUSIONES

- La proteína cuantificada por Bradford de exosomas aislados de células progenitoras del epitelio olfatorio de pacientes diagnosticados con TLP y participantes control, obtenida aumenta al concentrar botellas de cultivo celular, así como aumentando la confluencia de células, y utilizando concentradores de peso molecular de 3 kDa.
- La proteína EGF involucrada en la proliferación celular, crecimiento y recambio del EO y las proteínas proinflamatorias de tipo quimiocinas RANTES y MCP-1 presentaron diferencias significativamente menores $p < 0.01$ entre pacientes diagnosticados con TLP, respecto a sujetos control en la intensidad relativa (IR) de los microarreglos.
- La proteína EGF obtuvo una correlación significativa $p < 0.05$, con las escalas SCIDII en pacientes diagnosticados con TLP, indicando una relación de EGF con la clinimetría de los pacientes.

- La obtención de exosomas fue confirmada por la expresión del marcador ALIX, Tetraspaninas (CD9 y CD63) y Actina en Western Blot, sin diferencias significativas en la IR entre controles y pacientes.
- Los exosomas provenientes de células progenitoras del EO de pacientes diagnosticados con TLP presentan una disminución en proteínas de tipo quimiocinas proinflamatorias RANTES Y MCP-1.

LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS

Primeramente, es recomendable aumentar el número de participantes de la muestra, ya que se observó una alta dispersión entre individuos de ambos grupos. Esto puede deberse a las características de cada paciente. Los pacientes diagnosticados con TLP tienden a presentar una alta comorbilidad con otros trastornos, lo que hace desafiante su tratamiento e investigación al respecto, por la naturaleza heterogénea de estos, por lo que se deben considerar las comorbilidades que presentan estos y así poder discernir si surgen diferencias dependientes de ello. Además de que los diagnósticos erróneos son frecuentes en pacientes con TLP, categorizándolos en otro trastorno, por lo cual se siguen buscando complementos que mejoren y faciliten el diagnóstico correcto. El problema de un diagnóstico erróneo aumenta, debido a que el TLP incluye síntomas que se superponen con otras categorías de diagnóstico, causando confusión con otros padecimientos, como depresión mayor, ya que la mayoría de estos pacientes cumplen con los criterios de depresión en algún momento; esquizofrenia, trastorno por déficit de atención e hiperactividad y TEPT (Paris, 2018), y otra comorbilidad menos común es el TB, la cual es de solo el 3.6% de los casos, no obstante, causa discrepancias en su diagnóstico, ya que varios síntomas se superponen como la inestabilidad emocional e impulsividad, aunque tienen connotaciones distintas, la confusión se da principalmente en pacientes que tienen sus primeros síntomas o en episodios agudos. No obstante, se pueden diferenciar ya que en la Escala de Depresión de Hamilton (HAM-D) y Escala de Clasificación de Ansiedad de Hamilton (HAM-A) tienen valores muy bajos para TB y en TLP son muy altos (di Giacomo et al., 2017). Por lo que es necesario identificar las comorbilidades de los pacientes, así como conocer los valores de las Escalas HAM-A y HAM-D, ya que es una variable que podría afectar los resultados.

El presente proyecto adicionalmente a los objetivos planteados arroja información que nos permite delinear una dirección para obtener más datos respecto al TLP. Así como una serie de factores para considerar. Entre muestras vemos una alta dispersión entre pacientes, lo cual puede deberse a que en el TLP existe un alto índice de comorbilidad o por características individuales, por ende, los pacientes probablemente pertenecen una muestra heterogénea. Debido a que sería pertinente conocer los valores de ansiedad y depresión deben tomarse estos valores en los controles también y seleccionar aquellos con valores bajos, ya que pueden presentar valores elevados en las escalas HAM-A y HAM-D por un estrés cercano y no por padecer algún trastorno ansioso o depresivo, pero podría ser una variable que afecte los resultados. Otro parámetro para considerar es que debido a que parece haber una relación con proteínas de tipo inflamatorio, primero debemos asegurarnos de que los controles y TLP no estén pasando por un proceso inflamatorio o un estado hormonal del ciclo menstrual, que pueda alterar dichos valores.

Sin embargo, podemos destacar la importancia del trabajo, ya que es un primer acercamiento con varios aspectos novedosos, ya que no hay antecedentes respecto a los exosomas procedentes de las células progenitoras del epitelio olfatorio, sobre el TLP en el EO, así como de los exosomas en TLP. Además de que a nivel proteína en el trastorno se ha trabajado en suero, donde es muy rico en tipos celulares, mientras que con el medio condicionado de las células progenitoras del EO, es un medio selectivo a diferencia del suero, además de que los resultados contrastan de forma inversa con los reportados en suero sanguíneo.

RECOMENDACIONES

- Aumentar el número de participantes, para poder realizar una subclasificación, ya que, con este estudio preliminar, se puede observar una alta dispersión entre pacientes, que parece ser independiente de la gravedad del trastorno según la escala BEST, pero dependiente de los valores HAM-A y HAM-D. Donde la bibliografía sugiere una interacción causal con la ansiedad, por lo que se sugiere una subclasificación con los valores de HAM-A.

- La caracterización por tamaño de los exosomas a través de microscopía electrónica de barrido y de fuerza atómica, así como por dispersión de luz dinámica o cuantificar el número de exosomas por ELISA, ya que se han reportado cambios en el número de exosomas en procesos inflamatorios.
- Cuantificar las proteínas significativas en el medio condicionado.

REFERENCIAS

- Alberdi-Paramo, I.; Saiz-Gonzalez, M. D.; Diaz-Marsa, M.; & Carrasco-Perera, J. L. (2020). Bullying and childhood trauma events as predictive factors of suicidal behavior in borderline personality disorder: Preliminary findings. *Psychiatry Research*, 285(December 2019), 112730. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2019.112730>
- Altick, A. L.; Baryshnikova, L. M.; Vu, T. Q.; & von Bartheld, C. S. (2009). Quantitative analysis of multivesicular bodies (MVBs) in the hypoglossal nerve: evidence that neurotrophic factors do not use MVBs for retrograde axonal transport. *The Journal of Comparative Neurology*, 514(6), 641–657. <https://doi.org/10.1002/cne.22047>
- Alvarez, Verónica; Blazquez, Rebeca; Sanchez-Margallo, Francisco Miguel; DelaRosa, Olga; Jorge, Inmaculada; Tapia, Angelo; & García Casado, Javier. (2015). Estudio comparativo del aislamiento de exosomas derivados de células madre mesenquimales humanas para uso clínico. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 49(3), 311-320. Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires Buenos Aires, Argentina.
- Andreu, Z; & Yáñez-Mó, M. (2014). Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol.*, 16(5),442. doi: 10.3389/fimmu.2014.00442. PMID: 25278937; PMCID: PMC4165315.
- Arnold, S. E.; Han, L. Y.; Moberg, P. J.; Turetsky, B. I.; Gur, R. E.; Trojanowski, J. Q.; & Hahn, C. G. (2001). Dysregulation of olfactory receptor neuron lineage in schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, 58(9), 829–835. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.58.9.829>
- Azizi, M. R.; Mohammadsadeghi, H.; Alavi, K.; Rasouljan, M.; Karimzad, N.; & Eftekhari Ardebili, M. (2019). Validity and reliability of Persian translation of the Borderline Evaluation of Severity over Time (BEST) questionnaire. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*, 33(133). <https://doi.org/10.34171/mjiri.33.133>

- Banigan, M. G.; Kao, P. F.; Kozubek, J. A.; Winslow, A. R.; Medina, J.; Costa, J.; Schmitt, A.; Schneider, A.; Cabral, H.; Cagsal-Getkin, O.; Vanderburg, C. R.; & Delalle, I. (2013). Differential Expression of Exosomal microRNAs in Prefrontal Cortices of Schizophrenia and Bipolar Disorder Patients. *PLOS ONE*, 8(1), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048814>
- Bátiz, L. F.; Castro, M. A.; Burgos, P. V.; Velásquez, Z. D.; Muñoz, R. I.; Lafourcade, C. A.; Troncoso-Escudero, P.; & Wyneken, U. (2016). Exosomes as Novel Regulators of Adult Neurogenic Niches. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(501). <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00501>
- Battle, C. L.; Shea, M. T.; Johnson, D. M.; Yen, S.; Zlotnick, C.; Zanarini, M. C.; Sanislow, C. A.; Skodol, A. E.; Gunderson, J. G.; Grilo, C. M.; McGlashan, T. H.; & Morey, L. C. (2004). Childhood maltreatment associated with adult personality disorders: findings from the Collaborative Longitudinal Personality Disorders Study. *Journal of Personality Disorders*, 18(2), 193–211. <https://doi.org/10.1521/pedi.18.2.193.32777>
- Benítez-King, G.; Riquelme, A.; Ortíz-López, L.; Berlanga, C.; Rodríguez-Verdugo, M. S.; Romo, F.; Calixto, E.; Solís-Chagoyán, H.; Jiménez, M.; Montaña, L. M.; Ramírez-Rodríguez, G.; Morales-Mulia, S.; & Domínguez-Alonso, A. (2011). A non-invasive method to isolate the neuronal lineage from the nasal epithelium from schizophrenic and bipolar diseases. *J Neurosci Methods*, 201(1), 35–45. doi: 10.1016/j.jneumeth.2011.07.009. Epub 2011 Jul 19. PMID: 21787803.
- Cailhol, L.; Roussignol, B.; Klein, R.; Bousquet, B.; Simonetta-Moreau, M.; Schmitt, L.; Thalamas, C.; Tap, G.; & Birmes, P. (2014). Borderline personality disorder and rTMS: A pilot trial. *Psychiatry Research*, 216(1), 155–157.
- Calof, A. L.; Bonnin, A.; Crocker, C.; Kawauchi, S.; Murray R. C.; Shou, J. et al. (2002). Progenitor cells of the olfactory receptor neuron lineage. *Microsc Res Tech*, 58,176-188.
- Chanen, A. M.; Velakoulis, D.; Carison, K.; Gaunson, K.; Wood, S. J.; Yuen, H. P.; Yücel, M.; Jackson, H. J.; McGorry, P. D.; & Pantelis, C. (2008). Orbitofrontal, amygdala and hippocampal volumes in teenagers with first-presentation borderline personality disorder. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 163(2), 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2007.08.007>
- Chen, X.; Xu, J.; Li, B.; Guo, W.; Zhang, J.; & Hu, J. (2018). Olfactory impairment in first-episode

- schizophrenia: a case-control study, and sex dimorphism in the relationship between olfactory impairment and psychotic symptoms. *BMC Psychiatry*, 18(1), 199. <https://doi.org/10.1186/s12888-018-1786-8>
- Conti, M. Z.; Vicini-Chilovi, B.; Riva, M.; Zanetti, M.; Liberini, P.; Padovani, A.; & Rozzini, L. (2013). Odor Identification Deficit Predicts Clinical Conversion from Mild Cognitive Impairment to Dementia Due to Alzheimer's Disease. *Archives of Clinical Neuropsychology*, 28(5), 391–399. <https://doi.org/10.1093/arclin/act032>
- Crawford, T. N.; Cohen, P. R.; Chen, H.; Anglin, D. M.; & Ehrensaft, M. (2009). Early maternal separation and the trajectory of borderline personality disorder symptoms. *Development and Psychopathology*, 21(3), 1013–1030. <https://doi.org/10.1017/S0954579409000546>
- Curtis, M. A.; Monzo, H. J.; & Faull, R. L. M. (2009). The rostral migratory stream and olfactory system: smell, disease and slippery cells. *Progress in Brain Research*, 175, 33–42. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(09\)17503-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(09)17503-9)
- Daviu, Nuria & Bruchas, Michael & Moghaddam, Bitá & Sandi, Carmen & Beyeler, Anna. (2019). Neurobiological links between stress and anxiety. *Neurobiology of Stress*. 11. 100191. [10.1016/j.ynstr.2019.100191](https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2019.100191).
- Dammann, G.; Teschler, S.; Haag, T.; Altmüller, F.; Tuczec, F.; & Dammann, R. H. (2011). Increased DNA methylation of neuropsychiatric genes occurs in borderline personality disorder. *Epigenetics*, 6(12), 1454–1462. <https://doi.org/10.4161/epi.6.12.18363>
- di Giacomo, E.; Aspesi, F.; Fotiadou, M.; Arntz, A.; Aguglia, E.; Barone, L.; Bellino, S.; Carpiniello, B.; Colmegna, F.; Lazzari, M.; Loretto, L.; Pinna, F.; Sicaro, A.; Signorelli, M. S.; di Giacomo, E.; Clerici, M.; Aspesi, F.; Aguglia, E.; Barone, L.; & Clerici, M. (2017). Unblending Borderline Personality and Bipolar Disorders. *Journal of Psychiatric Research*, 91, 90–97. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2017.03.006>
- Díaz-Marsá, M.; Macdowell, K. S.; Guemes, I.; Rubio, V.; Carrasco, J. L.; & Leza, J. C. (2012). Activation of the cholinergic anti-inflammatory system in peripheral blood mononuclear cells from patients with borderline personality disorder. *Journal of Psychiatric Research*, 46(12), 1610–1617. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2012.09.009>
- Espinosa, Javier Jaime, Blum Grynberg, Bertha, & Romero Mendoza, Martha Patricia. (2009). Riesgo y letalidad suicida en pacientes con trastorno límite de la personalidad (TLP), en un hospital de psiquiatría. *Salud mental*, 32(4), 317-325. Recuperado en 01 de marzo de 2022, de

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33252009000400007&lng=es&tlng=es.

- Farbman, A. I.; & Buchholz, J. A. (1996). Transforming growth factor-alpha and other growth factors stimulate cell division in olfactory epithelium in vitro. *Journal of Neurobiology*, 30(2), 267-280. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4695\(199606\)30:2%3c267::AID-NEU8%3e3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4695(199606)30:2%3c267::AID-NEU8%3e3.0.CO;2-3)
- Fleshner, M.; Frank, M.; & Maier, S.F. (2017). Danger Signals and Inflammasomes: Stress-Evoked Sterile Inflammation in Mood Disorders. *Neuropsychopharmacology*. 42(1):36-45. doi: 10.1038/npp.2016.125. Epub 2016 Jul 14. PMID: 27412959; PMCID: PMC5143484.
- Garcia-Anaya, M.; Gonzalez-Olvera, J.; Ricardo-Garcell, J.; Armas-Castañeda, G.; Miranda, E.; Reyes Zamorano, E.; & Otero, G. (2011). Clinical and electrophysiological effect of right and left repetitive transcranial magnetic stimulation in patients with major depressive disorder. *Salud Mental*, 34, 291–299.
- George, M. S.; Padberg, F.; Schlaepfer, T. E.; O'Reardon, J. P.; Fitzgerald, P. B.; Nahas, Z. H.; & Marcolin, M. A. (2009). Controversy: Repetitive transcranial magnetic stimulation or transcranial direct current stimulation shows efficacy in treating psychiatric diseases (depression, mania, schizophrenia, obsessive-compulsive disorder, panic, posttraumatic stress disorder). *Brain Stimulation*, 2(1), 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2008.06.001>
- Gheinani, A. H.; Vögeli, M.; Baumgartner, U.; Vassella, E.; Draeger, A.; Burkhard, F. C.; & Monastyrskaya, K. (2018). Improved isolation strategies to increase the yield and purity of human urinary exosomes for biomarker discovery. *Scientific Reports*, 8(1), 3945. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22142-x>
- Glebov, K.; Löchner, M.; Jabs, R.; Lau, T.; Merkel, O.; Schloss, P.; Steinhäuser, C.; & Walter, J. (2015). Serotonin stimulates secretion of exosomes from microglia cells. *Glia*, 63(4), 626–634. <https://doi.org/10.1002/glia.22772>
- Gómez-Virgilio, L.; Ramírez-Rodríguez, G. B.; Sánchez-Torres, C.; Ortiz-López, L.; & Meraz-Ríos, M. A. (2018). Soluble Factors from Human Olfactory Neural Stem/Progenitor Cells Influence the Fate Decisions of Hippocampal Neural Precursor Cells. *Molecular Neurobiology*, 55(10), 8014–8037. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0906-2>
- Goodman, M.; Hazlett, E. A.; Avedon, J. B.; Siever, D. R.; Chu, K.-W.; & New, A. S. (2011). Anterior cingulate volume reduction in adolescents with borderline personality disorder and co-morbid major depression. *Journal of Psychiatric Research*, 45(6), 803–807.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2010.11.011>

- Gorgens, K. A. (2011). Structured Clinical Interview For DSM-IV (SCID-I/SCID-II). In J. S. Kreutzer, J. DeLuca, & B. Caplan (Eds.), *Encyclopedia of Clinical Neuropsychology*, 2410-2417. Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-79948-3_2011
- Grant, J. E.; Correia, S.; Brennan-Krohn, T.; Malloy, P. F.; Laidlaw, D. H.; & Schulz, S. C. (2007). Frontal White Matter Integrity in Borderline Personality Disorder With Self-Injurious Behavior. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 19(4), 383–390. <https://doi.org/10.1176/jnp.2007.19.4.383>
- Gunderson, J.; & Phillips, K. A. (1991). A current view of the interface between borderline personality disorder and depression. *American Journal of Psychiatry*, 148(8), 967–975. <https://doi.org/10.1176/ajp.148.8.967>
- Gurunathan, S.; Kang, M.-H.; Jeyaraj, M.; Qasim, M.; & Kim, J.-H. (2019). Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/cells8040307>
- Hammen, C.; Bower, J. E.; & Cole, S. W. (2015). Oxytocin receptor gene variation and differential susceptibility to family environment in predicting youth borderline symptoms. *Journal of Personality Disorders*, 29(2), 177–192. https://doi.org/10.1521/pedi_2014_28_152
- Hazlett, E. A.; New, A. S.; Newmark, R.; Haznedar, M. M.; Lo, J. N.; Speiser, L. J.; Chen, A. D.; Mitropoulou, V.; Minzenberg, M.; Siever, L. J.; & Buchsbaum, M. S. (2005). Reduced anterior and posterior cingulate gray matter in borderline personality disorder. *Biological Psychiatry*, 58(8), 614–623. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.04.029>
- Heim, C.; & Binder, E. B. (2012). Current research trends in early life stress and depression: Review of human studies on sensitive periods, gene–environment interactions, and epigenetics. *Experimental Neurology*, 233(1), 102–111. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.10.032>
- Herman, J. L.; Perry, J. C.; & van der Kolk, B. A. (1989). Childhood trauma in borderline personality disorder. *The American Journal of Psychiatry*, 146(4), 490–495. <https://doi.org/10.1176/ajp.146.4.490>
- Hernández-Ramírez, P. (2011). La mucosa nasal como vía y fuente para la medicina regenerativa. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 27(3), 297–308.

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892011000300005&nrm=iso

- Horiuchi, Y.; Kondo, M. A.; Okada, K.; Takayanagi, Y.; Tanaka, T.; Ho, T.; Varvaris, M., Tajinda, K., Hiyama, H.; Ni, K.; Colantuoni, C.; Schretlen, D.; Cascella, N. G.; Pevsner, J.; Ishizuka, K.; Sawa, A. (2016). Molecular signatures associated with cognitive deficits in schizophrenia: a study of biopsied olfactory neural epithelium. *Transl Psychiatry*, 6(10), 915. doi: 10.1038/tp.2016.154. PMID: 27727244; PMCID: PMC5315541.
- Hummel, T.; Damm, M.; Vent, J.; Schmidt, M.; Theissen, P.; Larsson, M.; & Klusmann, J. P. (2003). Depth of olfactory sulcus and olfactory function. *Brain Research*, 975(1), 85–89. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)02589-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02589-7)
- Inoue, A.; Oshita, H.; Maruyama, Y.; Tanaka, Y.; Ishitobi, Y.; Kawano, A.; Ikeda, R.; Ando, T.; Aizawa, S.; Masuda, K.; Higuma, H.; Kanehisa, M.; Ninomiya, T.; & Akiyoshi, J. (2015). Gender determines cortisol and alpha-amylase responses to acute physical and psychosocial stress in patients with borderline personality disorder. *Psychiatry Research*, 228(1), 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2015.04.008>
- Insausti, R.; Herrero, M. T.; & Witter, M. P. (1997). Entorhinal cortex of the rat: cytoarchitectonic subdivisions and the origin and distribution of cortical efferents. *Hippocampus*, 7(2), 146–183. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1997\)7:2<146::AID-HIPO4>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1997)7:2<146::AID-HIPO4>3.0.CO;2-L)
- Ismail, F. Y.; Fatemi, A.; & Johnston, M. V. (2017). Cerebral plasticity: Windows of opportunity in the developing brain. *European Journal of Paediatric Neurology*, 21(1), 23–48. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2016.07.007>
- Jogems-Kosterman, B. J. M.; de Knijff, D. W. W.; Kusters, R.; & van Hoof, J. J. M. (2007). Basal cortisol and DHEA levels in women with borderline personality disorder. *Journal of Psychiatric Research*, 41(12), 1019–1026. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2006.07.019>
- Jopling, E. N.; Khalid-Khan, S.; Chandrakumar, S. F.; & Segal, S. C. (2016). A retrospective chart review: adolescents with borderline personality disorder, borderline personality traits, and controls. *International Journal of Adolescent Medicine and Health*, 30(2). <https://doi.org/10.1515/ijamh-2016-0036>
- Kahl, K. G.; Bens, S.; Ziegler, K.; Rudolf, S.; Dibbelt, L.; Kordon, A.; & Schweiger, U. (2006). Cortisol, the cortisol-dehydroepiandrosterone ratio, and pro-inflammatory cytokines in patients with current major depressive disorder comorbid with borderline personality disorder. *Biological Psychiatry*, 59(7), 667–671. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.08.001>

- Kempermann, G.; Krebs, J.; & Fabel, K. (2008). The contribution of failing adult hippocampal neurogenesis to psychiatric disorders. *Current Opinion in Psychiatry*, 21(3), 290–295. <https://doi.org/10.1097/YCO.0b013e3282fad375>
- Kobayashi, M.; & Pascual-Leone, A. (2003). Transcranial magnetic stimulation in neurology. *The Lancet Neurology*, 2(3), 145–156. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(03\)00321-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1474-4422(03)00321-1)
- Kowal, J.; Tkach, M.; & Théry, C. (2014). Biogenesis and secretion of exosomes. *Current Opinion in Cell Biology*, 29, 116–125. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.05.004>
- Krabbendam, A. A.; Colins, O. F.; Doreleijers, T. A. H.; Van der Molen, E.; Beekman, A. T. F., & Vermeiren, R. R. J. M. (2015). Personality disorders in previously detained adolescent females: A prospective study. In *American Journal of Orthopsychiatry* 85(1), 63–71. Educational Publishing Foundation. <https://doi.org/10.1037/ort0000032>
- Krettek, J. E.; & Price, J. L. (1978). Amygdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat. *The Journal of Comparative Neurology*, 178(2), 225–254. <https://doi.org/10.1002/cne.901780204>
- Kuo, J. R.; & Linehan, M. M. (2009). Disentangling emotion processes in borderline personality disorder: physiological and self-reported assessment of biological vulnerability, baseline intensity, and reactivity to emotionally evocative stimuli. *Journal of Abnormal Psychology*, 118(3), 531–544. <https://doi.org/10.1037/a0016392>
- Hamilton, M. (1960). A rating scale for depression. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 23(1), 56–62. <https://doi.org/10.1136/jnnp.23.1.56>
- Lachenal, G.; Pernet-Gallay, K.; Chivet, M.; Hemming, F. J.; Belly, A.; Bodon, G.; Blot, B.; Haase, G.; Goldberg, Y.; & Sadoul, R. (2011). Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 46(2), 409–418. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.11.004>
- Lenzenweger Mouly, A. M.; & Sullivan, R. (2010). *Memory and Plasticity in the Olfactory System: From Infancy to Adulthood*. (A. Menini (ed.)), M. F. (2008). Epidemiology of Personality Disorders. *Psychiatric Clinics of North America*, 31(3), 395–403. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.psc.2008.03.003>
- Lieb, K.; Völlm, B.; Rucker, G.; Timmer, A.; & Stoffers, J. M. (2010). Pharmacotherapy for

- borderline personality disorder: Cochrane systematic review of randomised trials. *British Journal of Psychiatry*, 196(1), 4–12. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.108.062984>
- Ma, Y.; Li, C.; Huang, et al. (2019). Exosomes released from neural progenitor cells and induced neural progenitor cells regulate neurogenesis through miR-21a. *Cell Commun Signal*, 17(96). <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0418-3>
- Mackay-Sim, A. (2010). Stem cells and their niche in the adult olfactory mucosa. *Archives Italiennes de Biologie*, 148(2), 47–58.
- Marino, J.; Luna, F.; Jaldo, R.; Foa Torres, G.; Centurión, D.; & Acosta Mesas, A. (2015). Mediación del fascículo uncinado en el volumen de la amígdala y la corteza orbitofrontal. *Revista Neuropsicología Latinoamericana*, 7(2), 34–41.
- Marsland, A. L.; Walsh, C.; Lockwood, K.; John-Henderson N.A. (2017). The effects of acute psychological stress on circulating and stimulated inflammatory markers: A systematic review and meta-analysis. *Brain Behav Immun*, 64,208-219. doi: 10.1016/j.bbi.2017.01.011.
- Martín-Blanco, A.; Ferrer, M.; Soler, J.; Arranz, M. J.; Vega, D.; Calvo, N.; Elices, M.; Sanchez-Mora, C.; García-Martinez, I.; Salazar, J.; Carmona, C., Bauzá, J., Prat, M.; Pérez, V., & Pascual, J. C. (2016). The role of hypothalamus-pituitary-adrenal genes and childhood trauma in borderline personality disorder. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 266(4), 307–316. <https://doi.org/10.1007/s00406-015-0612-2>
- Mazer, A. K.; Cleare, A. J.; Young, A. H.; & Juruena, M. F. (2019). Bipolar affective disorder and borderline personality disorder: Differentiation based on the history of early life stress and psychoneuroendocrine measures. *Behavioural Brain Research*, 357–358, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.04.015>
- McLean, C. K.; Narayan, S.; Lin, S. Y.; Rai, N.; Chung, Y.; Hipolito, M. S.; Cascella, N. G.; Nurnberger, J. I. Jr.; Ishizuka, K.; Sawa, A. S.; Nwulia, E. A. (2018). Lithium-associated transcriptional regulation of CRMP1 in patient-derived olfactory neurons and symptom changes in bipolar disorder. *Transl Psychiatry*, 8(1), 81. doi: 10.1038/s41398-018-0126-6. PMID: 29666369; PMCID: PMC5904136.
- Menard, C.; Pfau, M. L.; Hodes, G. E.; Kana, V.; Wang, V. X.; Bouchard, S.; Takahashi, A.; Flanigan, M. E.; Aleyasin, H.; LeClair, K. B.; Janssen, W. G.; Labonté, B.; Parise, E. M.; Lorsch, Z. S.; Golden, S. A.; Heshmati, M.; Tamminga, C.; Turecki, G.; Campbell, M.; Russo, S. J. (2017). Social stress induces neurovascular pathology promoting depression. *Nature Neuroscience*,

20(12), 1752–1760. <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0010-3>

- Nenadić, I.; Katzmann, I.; Besteher, B.; Langbein, K.; & Güllmar, D. (2020). Diffusion tensor imaging in borderline personality disorder showing prefrontal white matter alterations. *Comprehensive Psychiatry*, 152172. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.comppsy.2020.152172>
- Newman, M. P.; Féron, F.; & Mackay-Sim, A. (2000). Growth factor regulation of neurogenesis in adult olfactory epithelium. *Neuroscience*, 99(2), 343–350. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00194-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00194-9)
- Ni, X.; Chan, K.; Bulgin, N.; Sicard, T.; Bismil, R.; McMain, S.; & Kennedy, J. L. (2006). Association between serotonin transporter gene and borderline personality disorder. *Journal of Psychiatric Research*, 40(5), 448–453. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2006.03.010>
- Nibu, K. (2002). Introduction to olfactory neuroepithelium. *Microscopy Research and Technique*, 58(3), 133–134. <https://doi.org/10.1002/jemt.10130>
- Nishikawa, Y.; Takahashi, T.; Takayanagi, Y.; Furuichi, A.; Kido, M.; Nakamura, M., Sasabayashi, D.; Noguchi, K.; & Suzuki, M. (2016). Orbitofrontal sulcogyral pattern and olfactory sulcus depth in the schizophrenia spectrum. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 266(1), 15–23. <https://doi.org/10.1007/s00406-015-0587-z>
- Nivet, E.; Vignes, M.; Girard, S. D.; Pierrisnard, C.; Baril, N.; Devèze, A.; Magnan, J.; Lanté, F.; Khrestchatsky, M.; Féron, F.; & Roman, F. S. (2011). Engraftment of human nasal olfactory stem cells restores neuroplasticity in mice with hippocampal lesions. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(7), 2808–2820. <https://doi.org/10.1172/JCI44489>
- Ohta, Y.; Ichimura, K. (1999). Immunohistochemical localization of epidermal growth factors in mouse olfactory epithelium. *Am J Rhinol*. 13(3), 225-8. doi: 10.2500/105065899781389713. PMID: 10392243.
- Ogłodek, E. A.; Szota, A. M.; Just, M. J.; Moś, D. M.; Araszkievicz, A. (2015). The MCP-1, CCL-5 and SDF-1 chemokines as pro-inflammatory markers in generalized anxiety disorder and personality disorders. *Pharmacol Rep*. 67(1), 85-9. doi: 10.1016/j.pharep.2014.08.006. Epub 2014 Aug 21. PMID: 25560580.
- Ogłodek, E. A.; Szota, A. M.; Just, M. J.; Szromek, A. R.; & Araszkievicz, A. (2016). A study of chemokines, chemokine receptors and interleukin-6 in patients with panic disorder, personality

- disorders and their co-morbidity. *Pharmacological Reports: PR*, 68(4), 756–763. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.03.017>
- Ortiz-López, L.; González-Olvera, J. J.; Vega-Rivera, N. M.; García-Anaya, M.; Carapia-Hernández, A. K.; Velázquez-Escobar, J. C.; & Ramírez-Rodríguez, G. B. (2017). Human neural stem/progenitor cells derived from the olfactory epithelium express the TrkB receptor and migrate in response to BDNF. *Neuroscience*, 355, 84–100. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.04.047>
- Paris, J. (2005). The development of impulsivity and suicidality in borderline personality disorder. *Development and Psychopathology*, 17(4), 1091–1104. <https://doi.org/10.1017/s0954579405050510>
- Paris, J. (2018). Differential Diagnosis of Borderline Personality Disorder. *The Psychiatric Clinics of North America*, 41(4), 575–582. <https://doi.org/10.1016/j.psc.2018.07.001>
- Pascual, M.; Ibáñez, F.; & Guerri, C. (2020). Exosomes as mediators of neuron-glia communication in neuroinflammation. *Neural regeneration research*, 15(5), 796–801. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.268893>
- Perez-Rodriguez, M. M.; New, A. S.; Goldstein, K. E.; Rosell, D.; Yuan, Q.; Zhou, Z.; Hodgkinson, C.; Goldman, D.; Siever, L. J.; & Hazlett, E. A. (2017). Brain-derived neurotrophic factor Val66Met genotype modulates amygdala habituation. *Psychiatry Research. Neuroimaging*, 263, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2017.03.008>
- Pfohl, B.; Blum, N.; St John, D.; McCormick, B.; Allen, J.; & Black, D. W. (2009). Reliability and validity of the Borderline Evaluation of Severity Over Time (BEST): a self-rated scale to measure severity and change in persons with borderline personality disorder. *Journal of Personality Disorders*, 23(3), 281–293. <https://doi.org/10.1521/pedi.2009.23.3.281>
- Price, J. L. (1973). An autoradiographic study of complementary laminar patterns of termination of afferent fibers to the olfactory cortex. *The Journal of Comparative Neurology*, 150(1), 87–108. <https://doi.org/10.1002/cne.901500105>
- Raiborg, C.; & Stenmark, H. (2009). The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature*, 458, 445–52.
- Reyes-López, J.; Ricardo-Garcell, J.; Armas-Castañeda, G.; García-Anaya, M.; Arango-De Montis, I.; González-Olvera, J. J.; & Pellicer, F. (2018). Clinical improvement in patients with

- borderline personality disorder after treatment with repetitive transcranial magnetic stimulation: preliminary results. *Revista Brasileira de Psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)*, 40(1), 97–104. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2016-2112>
- Rinne, T.; Van den Brink, W.; Wouters, L.; & van Dyck, R. (2002). SSRI Treatment of Borderline Personality Disorder: A Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial for Female Patients With Borderline Personality Disorder. *American Journal of Psychiatry*, 159(12), 2048–2054. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.159.12.2048>
- Ruocco, A. C.; Amirthavasagam, S.; & Zakzanis, K. K. (2012). Amygdala and hippocampal volume reductions as candidate endophenotypes for borderline personality disorder: A meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 201(3), 245–252. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2012.02.012>
- Saccaro, L. F.; Schilliger, Z.; Dayer, A.; Perroud, N.; & Piguet, C. (2021). Inflammation, anxiety, and stress in bipolar disorder and borderline personality disorder: A narrative review. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 127, 184–192. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.04.017>
- Saeedi, S.; Israel, S.; Nagy, C.; & Turecki, G. (2019). The emerging role of exosomes in mental disorders. *Translational Psychiatry*, 9(1), 122. <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0459-9>
- Saive, A. L.; Royet, J. P.; & Plailly, J. (2014). A review on the neural bases of episodic odor memory: from laboratory-based to autobiographical approaches. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 240. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00240>
- Simons, R. L.; Lei, M. K.; Beach, S. R. H.; Brody, G. H.; Philibert, R. A.; & Gibbons, F. X. (2011). Social Environmental Variation, Plasticity Genes, and Aggression: Evidence for the Differential Susceptibility Hypothesis. *American Sociological Review*, 76(6), 833–912. <https://doi.org/10.1177/0003122411427580>
- Sverak, T.; Linhartova, P.; Kuhn, M.; Latalova, A.; Bednarova, B.; Ustohal, L.; & Kasperek, T. (2019). Transcranial magnetic stimulation in borderline personality disorder - case series. *Ceska a Slovenska Neurologie a Neurochirurgie*, 82(1), 48–52. <https://doi.org/10.14735/amcsnn201948>
- Swanson, L. W.; & Köhler, C. (1986). Anatomical evidence for direct projections from the entorhinal area to the entire cortical mantle in the rat. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 6(10), 3010–3023. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.06-10->

- Takahashi, T.; Nishikawa, Y.; Velakoulis, D.; Suzuki, M.; McGorry, P. D.; Pantelis, C.; & Chanen, A. M. (2019). Olfactory sulcus morphology in teenagers with first-presentation borderline personality disorder. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 292, 1–4. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2019.08.006>
- Thomas, N.; Gurvich, C.; & Kulkarni, J. (2019). Borderline personality disorder, trauma, and the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 15, 2601–2612. <https://doi.org/10.2147/NDT.S198804>
- Toufexis, D.; Rivarola, M. A.; Lara, H.; & Viau, V. (2014). Stress and the reproductive axis. *Journal of Neuroendocrinology*, 26(9), 573–586. <https://doi.org/10.1111/jne.12179>
- Urdzíkóvá, L. M.; Růžička, J.; LaBagnara, M.; Kárová, K.; Kubínová, Š.; Jiráková, K.; Murali, R.; Syková, E.; Jhanwar-Uniyal, M.; & Jendelová, P. (2014). Human mesenchymal stem cells modulate inflammatory cytokines after spinal cord injury in rat. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(7), 11275–11293. <https://doi.org/10.3390/ijms150711275>
- Whiteside, T. L. (2016). Tumor-Derived Exosomes and Their Role in Cancer Progression. *Advances in Clinical Chemistry*, 74, 103–141. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2015.12.005>
- Wieck, A.; et al. (2016). Toll-like receptor expression and function in type I bipolar disorder. *Brain Behav. Immun*, 54, 110–121.
- Wingenfeld, K.; Hill, A.; Adam, B.; & Driessen, M. (2007). Dexamethasone suppression test in borderline personality disorder: impact of PTSD symptoms. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 61(6), 681–683. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1819.2007.01728.x>
- Xun, C.; Ge, L.; Tang, F.; Wang, L.; Zhuo, Y.; Long, L.; Qi, J.; Hu, L.; Duan, D.; Chen, P.; Lu, M. (2020). Insight into the proteomic profiling of exosomes secreted by human OM-MSCs reveals a new potential therapy. *Biomed Pharmacother*, 131, 110584. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110584. Epub 2020 Aug 22. PMID: 32841894.
- Yang, X.; Hu, L.; Zeng, J.; Tan, Y.; & Cheng, B. (2016). Default mode network and frontolimbic gray matter abnormalities in patients with borderline personality disorder: A voxel-based meta-analysis. *Scientific Reports*, 6, 34247. <https://doi.org/10.1038/srep34247>
- Yoshimatsu, Kei MD; Palmer, Brian MD, MPH Depression in Patients with Borderline Personality Disorder. (2014). *Harvard Review of Psychiatry*. 22(5). Pp 266-273. doi:

10.1097/HRP.0000000000000045

- Zanarini, M. C.; Williams, A. A.; Lewis, R. E.; Bradford Reich, R.; Vera, S. C.; Marino, M. F.; Levin, A.; Yong, L.; & Frankenburg, F. R. (1997). Reported pathological childhood experiences associated with the development of borderline personality disorder. *American Journal of Psychiatry*, 154(8), 1101–1106. <https://doi.org/10.1176/ajp.154.8.1101>
- Zhang, X.; Cai, J.; Klueber, K. M.; Guo, Z.; Lu, C.; Qiu, M.; & Roisen, F. J. (2005). Induction of Oligodendrocytes From Adult Human Olfactory Epithelial-Derived Progenitors by Transcription Factors. *STEM CELLS*, 23(3), 442–453. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0274>
- Zimmerman, M.; Martin, J.; Clark, H.; McGonigal, P.; Harris, L.; & Holst, C. G. (2017). Measuring anxiety in depressed patients: A comparison of the Hamilton anxiety rating scale and the DSM-5 Anxious Distress Specifier Interview. *Journal of Psychiatric Research*, 93, 59–63. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2017.05.014>

ANEXOS

ANEXO 1- DATOS DE QUÍMICA SANGUÍNEA DE LOS PACIENTES

Química sanguínea	Valores de referencia	ID					
		F1T	E12T	E4T	F7T	E9T	E13T
Glucosa	74-106 mg/dl	80.0 mg/dl	90 mg/dl	75 mg/dl	100 mg/dl	87.0 mg/dl	88.0 mg/dl
Urea	19-43 mg/dl	27.8 mg/dl	12.8 mg/dl	19.3 mg/dl	21.4 mg/dl	30 mg/dl	30 mg/dl
ácido úrico	M 2.5-6.2 mg/dl	6.2 mg/dl	3.6 mg/dl	2.9 mg/dl	5.8 mg/dl	4.3 mg/dl	5.2 mg/dl
Creatinina	0.66-1.25 mg/dl	0.8 mg/dl	0.6 mg/dl	0.7 mg/dl	0.8 mg/dl	0.9 mg/dl	0.5 mg/dl
Proteínas totales	6.3-8.2 g/dl	7.8 g/dl	8.1 g/dl	7.2 g/dl	8.3 mg/dl	7.2 g/dl	7.5 mg/dl
Albúmina	3.5-5.0 g/dl	4.5 g/dl	4.9 g/dl	4.1 g/dl	4.4 g/dl	4.7 g/dl	4.2 mg/dl
Globulinas	2.5-3.4 g/dl	3.3 g/dl	3.2 g/dl	3.1 g/dl	3.9 g/dl	2.5 g/dl	3.3 g/dl
Relación Albúmina Globulina		1.36	1.53	1.32	1.13	1.88	1.27
Bilirrubina total	0.2-1.3 mg/dl	0.70 mg/dl	0.40 mg/dl	0.60 mg/dl	0.90 mg/dl	0.80 mg/dl	1.00 mg/dl
Bilirrubina Directa	0.0-0.2 mg/dl	0.5 mg/dl	0.4 mg/dl	0.5 mg/dl	0.6 mg/dl	0.5 mg/dl	0.5 mg/dl
Fosfatasa Alcalina ALP	38-126 U/L	124.0 u/l	81.0 u/l	99.0 u/l	78.0 u/l	71.0 u/l	92.0 u/l
Aspartatoaminotransferasa AST	15-46 U/L	55.0 U/L	27.0 U/L	39.0 U/L	27.0 U/L	19.0 U/L	22.0 U/L
Aalaninoaminotransferasa ALT	21-72 U/L	78.0 U/L	30.0 U/L	43.0 U/L	28.0 U/L	25.0 U/L	29.0 U/L
Deshidrogenasa Láctica LDH	313-618 U/L	530.0 U/L	444.0 U/L	389.0 U/L	388.0 U/L	409.0 U/L	359.0 U/L
Calcio	8.4-10.2 mg/dl	9.7 mg/dl	9.7 mg/dl	9.3 mg/dl	10.0 mg/dl	9.6 mg/dl	10.2 mg/dl
Fósforo	2.5-4.5 mg/dl	4.0 mg/dl	5.0 mg/dl	4.1 mg/dl	4.8 mg/dl	4.6 mg/dl	4.9 mg/dl
Sodio	137-145 mEq/l	144.0 mEq/l	142.0 mEq/l	138.0 mEq/l	147.0 mEq/l	141.0 mEq/l	143.0 mEq/l
Potasio	3.5-5.1 mEq/l	4.4 mEq/l	4.1 mEq/l	4.2 mEq/l	4.9 mEq/l	3.5 mEq/l	4.6 mEq/l
VDRL	Negativo	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
Triglicéridos	Hasta 150 mg/dL	250.0 mg/dl	187.0 mg/dl	65.0 mg/dl	60.0 mg/dl	34.0 mg/dl	77.0 MG/DL
Colesterol	MENOR A 200 mg/dL	183.0 mg/dl	164.0 mg/dl	151.0 mg/dl	158.0 mg/dl	122.0 mg/dl	161.0 mg/dl