



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

Título del proyecto:

“Análisis y caracterización de exosomas de suero sanguíneo obtenido de mujeres diagnosticadas con Trastorno Depresivo Mayor (TDM)”

T E S I S

Que para optar por el grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Q.F.B. JORGE MANUEL VÁSQUEZ PÉREZ

Comité tutor:

Dr. Gerardo Bernabé Ramírez Rodríguez - INPRFM, Tutor Principal

Dra. Mónica Flores Ramos - INPRFM, Comité Tutor

Dr. Daniel Reyes Haro - INB-UNAM, Comité Tutor

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. Noviembre de 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

	INDICE	Página
AGRADECIMIENTOS		I
DEDICATORIAS		V
INDICE DE FIGURAS		VII
ABREVIATURAS		VIII
RESUMEN		XI
ABSTRACT		XII
1. INTRODUCCIÓN		1
2. ANTECEDENTES		3
2.1. Historia de la depresión		3
2.1.1. Trastorno depresivo mayor (TDM)		4
2.1.2. Neurobiología de la depresión		5
2.1.3. Tratamiento de los trastornos depresivos		10
2.2. Trastorno depresivo mayor (TDM) en mujeres		12
2.2.1. Trastornos depresivos en México		13
2.3. Alteraciones metabólicas y trastornos depresivos		15
2.4. Vesículas Extracelulares (VE)		17
2.4.1. Exosomas		19
2.4.2. Relevancia clínica de los exosomas en el SNC		22
2.4.3. Exosomas y trastornos depresivos		25
3. JUSTIFICACIÓN		31
4. HIPOTESIS		32
5. OBJETIVO GENERAL		32
5.1. Objetivos particulares		32
6. MATERIAL Y MÉTODOS		33
6.1. Descripción del estudio		33
6.1.1. Descripción de la población		33
6.1.2. Descripción de los grupos experimentales		33
6.2. Obtención, manejo y procesamiento de muestras		34
6.3. Diagrama general del estudio		36
6.4. Aislamiento de exosomas de suero sanguíneo humano		37
6.5. Determinación del contenido de proteína total en exosomas		39
6.6. Caracterización de exosomas por electroforesis en gel y western blot (WB)		41
6.7. Análisis del contenido de proteínas de suero sanguíneo por matriz de microarreglos		45
6.7.1. Protocolo de la técnica de microarreglos para proteínas		47
6.8. Análisis bioinformático de interacción proteína-proteína (PPI)		50
7. ANALISIS ESTADISTICO		51
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LAS DETERMINACIONES EXPERIMENTALES		52
8.1. Estandarización de los métodos y técnicas empleadas		52
8.2. Análisis de los parámetros clínico-demográficos y bioquímicos		52
8.3. Análisis del contenido total de proteína en exosomas entre los grupos		

experimentales	54
8.4. Análisis de proteínas exosomales por electroforesis en gel y western blot (WB)	56
8.5. Análisis de proteínas por matriz de microarreglos para proteínas	57
8.6. Análisis bioinformático de interacción proteína-proteína (PPI)	63
9. DISCUSIÓN	66
9.1. Diferencias en algunos parámetros clínico-demográficos y bioquímicos	67
9.2. Contenido total de proteína en exosomas	69
9.3. Análisis por western blot (WB)	70
9.4. Caracterización y análisis de las proteínas contenidas en exosomas por microarreglos	70
9.5. Análisis de la interacción proteína-proteína (PPI)	72
10. CONCLUSIONES	74
10.1. Limitaciones del estudio	74
11. PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO	75
12. ANEXO I. ESTANDARIZACION DE LOS MÉTODOS Y TÉCNICAS EMPLEADAS	78
13. ANEXO II. RESULTADOS COMPLEMENTARIOS	84
14. BIBLIOGRAFÍA	90

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Al Programa de Posgrado Maestría en Ciencias (Neurobiología), por permitirme continuar con mi formación profesional en el área de las neurociencias;

Al Instituto de Neurobiología de la UNAM, por el apoyo y facilidades otorgadas a lo largo de mis estudios de maestría;

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme ser parte de su comunidad universitaria y brindarme las herramientas académicas y profesionales necesarias en mi formación, y para contribuir al desarrollo de la ciencia y tecnología en nuestro país;

Al Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, por ser una institución del más alto nivel, que ha contribuido en mi formación y desarrollo profesional en investigación a lo largo de mi estadía en el Laboratorio de Neurogénesis, de la Subdirección de Investigaciones Clínicas, durante mis estudios de maestría;

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México, por el apoyo otorgado a través del Programa de Becas Nacionales (Tradicional 2018), bajo el CVU número 921188;

Al Dr. Gerardo Bernabé Ramírez Rodríguez, por fungir como mi tutor académico de maestría, por todo el apoyo, tiempo y dedicación que compartió conmigo, el cual, ha contribuido enormemente en mi desarrollo y crecimiento profesional en investigación;

A los miembros del Comité Tutor:

- Dra. Mónica Flores Ramos, Dirección de Enseñanza, INPRFM
- Dr. Daniel Reyes Haro, Laboratorio D-15, INB-UNAM
- Dr. Gerardo Bernabé Ramírez Rodríguez, Laboratorio de Neurogénesis, Subdirección de Investigaciones Clínicas, INPRFM

Por su tiempo, dedicación, apoyo, guía y comentarios a lo largo de estos dos años en los estudios de maestría de un servidor, sin los cuales el enriquecimiento y soporte académico del presente proyecto de investigación, no sería el mismo;

A la Dra. Maricela Luna Muñoz, Coordinadora de la Maestría en Ciencias (Neurobiología), por el apoyo y facilidades brindadas durante mis estudios de maestría;

A la Dra. Nuri Aranda López, Unidad de Enseñanza de la Maestría en Ciencias (Neurobiología), por todo el apoyo, facilidades y acompañamiento académico e institucional a lo largo de los dos años de mis estudios de maestría y actividades académicas;

A la Dra. Irma Yolanda del Río Portilla, Enlace de la Maestría en Ciencias (Neurobiología), Facultad de Psicología, UNAM, por su compromiso entusiasta y todo el apoyo otorgados en la facultad, durante nuestros estudios de maestría y actividades académicas;

Al Dr. Rodrigo Erick Escartín Pérez, Enlace de la Maestría en Ciencias (Neurobiología), FES Iztacala, UNAM, por su compromiso entusiasta y todo el apoyo otorgados en la FES, durante nuestros estudios de maestría y actividades académicas;

A la Lic. María de Lourdes Lara Ayala, Responsable de la Unidad de Videoconferencia INB-UNAM, por toda su ayuda y buena disposición durante nuestras clases y sesiones académicas por videoconferencia;

Al Lic. Juan José García Ruíz, Responsable de UDEMAT-Sala de Videoconferencia, Facultad de Psicología, UNAM, por toda su ayuda y buena disposición durante nuestras clases y sesiones académicas por videoconferencia;

Al Lic. Daniel Villareal Hernández, Responsable de Enlaces, Videoconferencia y Proyectos, Unidad de Sistemas, Telecomunicaciones y Cómputo, FES Iztacala, UNAM, por toda su ayuda y buena disposición durante nuestras clases y sesiones académicas por videoconferencia;

Y muy especialmente a los miembros de mi Jurado:

- Dra. Graciela Agar Cárdenas Hernández, Servicio de Neuroinfectología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez,
- Dra. Lucía Alba Martínez Mota, Laboratorio de Farmacología Conductual, INPRFM,
- Dra. Mónica Flores Ramos, Departamento de Enseñanza, INPRFM,
- Dr. Vijaykumar Muley, Laboratorio de Diferenciación Neural y Axogénesis, INB-UNAM,
- Dr. Gerardo Bernabé Ramírez Rodríguez, Laboratorio de Neurogénesis, INPRFM,

Por su compromiso, dedicación y apoyo, así como por sus comentarios, sugerencias y observaciones en la revisión del presente proyecto de investigación, las cuales, fueron muy importantes para su enriquecimiento y culminación.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

A mi Tutor Académico Dr. Gerardo Bernabé Ramírez Rodríguez, un reconocimiento especial por su amistad, guía, dedicación, consejo y apoyo en el diseño y realización del presente proyecto de maestría, así como el impacto en mi formación profesional en investigación, profesional y humana a lo largo de estos dos años en mis estudios de maestría.

Al Q.F.B. Leonardo Ortiz López, por su amistad, el valioso apoyo, guía y retroalimentación en la realización del presente proyecto de maestría, porque ello contribuyó en una creciente autocrítica profesional y mejora continua.

A la Dra. Mónica Flores Ramos, por su importante contribución en la facilitación y obtención de las muestras biológicas, así como su participación en la realización del presente proyecto de investigación, su opinión y comentarios fueron valiosas perspectivas que enriquecieron enormemente mi trabajo.

Al Médico Cirujano de servicio social Rodrigo Guiza Zayas, por todo su tiempo y apoyo en el seguimiento y selección de las muestras biológicas para la realización del presente proyecto de investigación.

A todos mis compañeros estudiantes, amigos y miembros del Laboratorio de Neurogénesis: Dra. Edith Cabrera Muñoz, M.V.Z. Arturo Castillo Tovar, M.C. Natalia Hernández Velasco, M.C. Eunice Raziel Rocha Martínez, M.C. David Meneses San Juan, Lic. Psico. Andrea Granados Juárez, Q.F.B. María Guadalupe Reyes Alba, Biol. Perla Vanessa Romero Luevano, Q.F.Bt. Enrique Adrián Lugo Hernández, Diana, María Elisa, Stephanie Alejandre, Alan, Valeria, Ana, Ki y todos aquellos que tuve el placer de conocer. Porque su amistad y compañerismo fue una razón más para disfrutar de mi estancia en el laboratorio.

A mis compañeros de generación y amigos: Eunice, Julieta, Natalia, Daniel, Elías, Omar Oscar, y Ricardo, por las experiencias y tiempo que compartimos juntos, su

amistad y apoyo, porque una palabra y/o acto de aliento lo podemos encontrar en un gesto amistoso o plática amena, gracias.

A la Dra. Margarita Virginia Saavedra Vélez, investigadora del Instituto de Neuroetología de la Universidad Veracruzana, por su valiosa amistad y apoyo constante durante mi formación de licenciatura. Su ejemplo, tenacidad, bondad y pasión por la ciencia han sido pilares importantes en mis metas profesionales y personales.

Al la c.Dra. Mónica Carolina Olguín Guerrero, Q.F.B. Ester Reyes López, Q.F.B. Gloria Imelda Del Moral Hernández, M.C. Carlos Alberto López Rosas, por su amistad, cariño y aprecio durante el tiempo que pasamos en la licenciatura, porque los grandes amigos son hermanos que encontramos por la vida.

A la Lic. en A. de N. I. Melani Vera Vera, por su amistad, cariño y apoyo mutuo en la licenciatura, por ser mi mejor amiga en todo momento y circunstancia, porque los grandes amigos son hermanos que encontramos por la vida.

A la Q.F.B. Gabriela Mota Salazar y al Q.F.B. Omar Hernández Galván, porque desde nuestra formación de licenciatura han sido grandes personas y excelentes amigos en todo momento, por su buena voluntad y cariño constante.

A la M.C. Julieta Hernández Acosta, y al M.C. Omar Martínez Alarcón, por su gran amistad, cariño, aprecio y apoyo constante a lo largo de nuestro paso por los estudios de posgrado. Porque los grandes amigos son hermanos que encontramos por la vida.

A la M.C. María del Refugio López Cruz e Isabel Ronzón López, porque encontré en ustedes un gran apoyo, cariño y amistad sinceras siempre.

A todos mis amigos, maestros y profesores que han marcado mi formación personal, humana y profesional a lo largo de toda mi vida, por su cariño y aprecio mutuos.

DEDICATORIAS

A Dios, el Universo y la Vida, porque cada vez que me pregunté e intenté explicar la razón y el porqué de los fenómenos y sucesos cotidianos, no pude más que encontrar en ellos lo divino, lo complejo y la sencillez humilde y benigna de lo que observaba en todo su delicado equilibrio.

Esta tesis está dedicada especialmente a Don Manuel Vásquez Eugenio, 'mí abuelito': porque has sido la figura más importante en mi vida, tu ejemplo es una luz que ha guiado mi vida y andar por este mundo, intentando en todo momento llegar a ser un poco como tú. Siempre te recordaré con todo el cariño y amor que nos diste a toda tu familia. Te amo y extraño mucho, un día estaremos juntos.

A toda mi familia, padres, abuelas, abuelos, tías, tíos, primas, primos, sobrinos -ceranos y lejanos-, y todos los que ya no están, por su cariño, aprecio fraterno y ejemplo constante.

A mis 'abuelitas' María Antonia Rodríguez Domínguez ('Toñita') y María Felicitas Cortés Ortíz ('Fab'), por todo su amor, cariño, apoyo y consejo a lo largo de toda mi vida, porque su gran ejemplo y dedicación a su familia fueron pilares en la mía.

A mi madre Mónica Pérez Cortés, por darme la vida, por todo su amor, cariño, apoyo y comprensión en todos estos años, y porque todos mis logros no son del todo míos, tú compartes y has inspirado muchos de ellos.

A mis hermanas Mariana Vásquez Pérez y Sayam Vásquez Pérez, porque hemos pasado tantas cosas juntos, porque las quiero y aprecio mucho y a través de los años me

he dado cuenta, que el cariño y amor de hermanos siempre permanecerá constante en nuestras vidas.

A mis sobrinos, José Manuel, Angiie Giselle, Verónica Kislev, y Esmeralda, porque me han enseñado la aventura de ser tío, de volver a jugar y disfrutar la alegría de la vida.

A mi tía Lilia Yazmín Vásquez Rodríguez, mis primas Sayde Martínez Vásquez e Itzel Martínez Vásquez, a mi tío Eusebio Martínez Martínez, por todo su cariño y apoyo a lo largo de todo el tiempo de mis estudios de maestría, porque han sido una guía y fuente de consejos. Los quiero y aprecio mucho.

A mi padre Francisco Vásquez Rodríguez, por darme la vida, por su cariño y aprecio, y por todos los momentos que hemos pasado juntos.

A mi tío abuelo, Froylán Cortés González, por todo su amor, cariño, aprecio y su consejo, por esas largas, diversas e interesantes platicas, que desde mi niñez disfrutamos en la mesa del pórtico de su casa, y por los 'remedios caseros que él, aún se toma por mí'.

A mi tía Juana Vásquez Eugenio, tío Santos Edubey Pérez Vásquez y tía María A. González Villanueva, por su cariño y aprecio a lo largo de toda mi vida.

A la I.M. y c.Lic. Física Goretti Torres Pérez, por su valiosa amistad, cariño, aprecio y admiración mutua a lo largo de los últimos 7 años, por lo que hemos compartido juntos y por todo el apoyo que nos hemos tenido a la distancia.

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura</i>	<i>Página</i>
Figura 1. Contribución de los sistemas dopaminérgicos, serotoninérgicos y del eje HHA, en la neurobiología de los trastorno depresivos.	7
Figura 2. Impacto de algunos factores neuroinflamatorios e inmunológicos en la fisiopatología, tratamiento y neurogénesis durante la respuesta al estrés y patologías como la depresión	9
Figura 3. Comparación de los principales procesos inflamatorios en alteraciones metabólicas y trastorno depresivo mayor (TDM)	16
Figura 4. Esquema general de la biogénesis de exosomas	18
Figura 5. Esquema general de la estructura molecular de los exosomas	20
Figura 6. El papel de los exosomas en el SNC	24
Figura 7. Evidencia de la participación de algunos miRNA a nivel central y periférico en trastornos depresivos	26
Figura 8. Mecanismo propuesto sobre el papel crítico del miRNA-135-5p de exosomas en conductas tipo depresivas mediadas por estrés	29
Figura 9. Esquema de la toma de muestra y obtención de suero sanguíneo de los pacientes participantes para cada grupo experimental	35
Figura 10. Esquema de la técnica estandarizada para el acondicionamiento de la muestra de suero sanguíneo y aislamiento de exosomas	38
Figura 11. Esquema de la técnica de micro Bradford	40
Figura 12. Esquema de la técnica de western blot (WB)	43
Figura 13. Esquema del funcionamiento de la técnica de microarreglos de proteínas	45
Figura 14. Esquema del mapa de determinación de proteínas (citoquinas) para las membranas C6 y C7 de los microarreglos	46
Figura 15. Ejemplo de resultado típico obtenido al revelar membranas <i>RayBio-C-Series Antibody-Arrays</i>	49
Figura 16. Determinación de CD63 por western blot (WB)	57
Figura 17. Análisis de la interacción proteína-proteína (PPI)	64
Figura 18. Participación conjunta de la red de interacción proteína-proteína (PPI) en diversos procesos biológicos	65

ABREVIATURAS

5-BrdU	<i>Bromodesoxiuridina (5-bromo-2-desoxiuridina)</i>	CTRL	<i>Grupo experimental control</i>
5-HT	<i>Serotonina (5-hidroxitriptamina)</i>	DA	<i>Dopamina</i>
Ab	<i>Anticuerpo</i>	DCX	<i>Doblecortina, proteína de migración neuronal</i>
ABS	<i>Absorbancia</i>	DE	<i>Desviación estándar</i>
ADN	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>	DLS	<i>Dispersión dinámica de la luz</i>
AFM/MFA	<i>Microscopía de fuerza atómica</i>	DSM-V	<i>Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales</i>
ALIX	<i>Proteína X de interacción con ALG-2/Proteína 6 de interacción con muerte celular programada</i>	E'C	<i>Exosomas de cultivo celular</i>
APA	<i>American Psychiatric Association</i>	EA	<i>Enfermedad de Alzheimer</i>
APC	<i>Alofococianinas</i>	ECl	<i>Protocolo de Estrés Crónico Impredecible</i>
Arg	<i>Arginina</i>	ECP	<i>Estimulación cerebral profunda</i>
ARN	<i>Ácido Ribonucleico</i>	EE	<i>Error Estándar</i>
ATC	<i>Antidepresivos tricíclicos</i>	EMT	<i>Estimulación magnética transcraneal</i>
BDNF	<i>Factor neurotrófico derivado del cerebro</i>	EP	<i>Enfermedad de Parkinson</i>
BHE	<i>Barrera hematoencefálica</i>	FDA	<i>Food and Drug Administration, EUA</i>
CCL2	<i>Quimiocina-2 de interacción C-C</i>	FSH	<i>Hormona folículo estimulante</i>
CD81	<i>Testraspanina 81, proteína transmembranal de exosomas</i>	GFAP	<i>Proteína fibrilar ácida de la glía</i>
CD9	<i>Testraspanina 9, proteína transmembranal de exosomas</i>	GSH-PX	<i>Actividad de la glutatión peroxidasa</i>
CNTF	<i>Factor neurotrófico ciliar</i>	HAMD-17	<i>Escala Hamilton de depresión, 17 ítems</i>
CRF/CRH	<i>Factor/hormona liberadora de corticotropina</i>	HDL/LDL	<i>Colesterol de alta/baja densidad</i>
CRP	<i>Proteína C reactiva</i>	HHA/ HPA	<i>Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal</i>
		His	<i>Histamina</i>
		hsc	<i>Proteínas de choque térmico</i>
		ICAM1	<i>Molécula de adhesión intercelular-1</i>

ICD-10/CIE-10	<i>Clasificación internacional de enfermedades</i>
IDO	<i>Indolamina 2,3-dioxigenasa</i>
IL-1β	<i>Interleucina 1-beta</i>
IL-2	<i>Interleucina 2</i>
IL-6	<i>Interleucina 6</i>
IMC	<i>Índice de masa corporal</i>
INEGI	<i>Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, de México</i>
INFγ	<i>Interferón gama</i>
INMUJERES	<i>Instituto Nacional para las Mujeres, de México</i>
INPRFM	<i>Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz</i>
IR	<i>Intensidad Relativa (densitometría óptica)</i>
IRSN	<i>Inhibidores selectivos de norepinefrina (antidepresivos)</i>
ISRS	<i>Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (antidepresivos)</i>
LC	<i>Lisado celular</i>
LCR	<i>Líquido cefalorraquídeo</i>
LH	<i>Hormona luteinizante</i>
MAO	<i>Monoamino oxidasa (enzima)</i>
MAP 2/1	<i>Proteína quinasa 2 activada por mitógenos</i>
MDA	<i>Malondialdehído</i>
MET	<i>Microscopía electrónica de transmisión</i>
MHC	<i>Complejo principal de histocompatibilidad</i>
mL	<i>Mililitros</i>
mPFC	<i>Corteza prefrontal medial</i>
MVB	<i>Cuerpo multivesicular (inglés)</i>

NAcc	<i>Núcleo Accumbens</i>
NE	<i>Norepinefrina</i>
NeuN	<i>Proteína nuclear o perinuclear citoplasmática específica de neuronas</i>
ng	<i>Nanogramos</i>
NGF	<i>Factor de crecimiento nervioso</i>
nm	<i>Nanómetros</i>
NT3/NT4	<i>Neurotrofinas 3/4</i>
OMS	<i>Organización Mundial de la Salud</i>
PBS	<i>Solución buffer de fosfatos</i>
pg	<i>Picogramos</i>
PGE2	<i>Prostaglandina 2</i>
Phe	<i>Fenilalanina</i>
PPI	<i>Interacciones proteína-proteína (análisis)</i>
PVN	<i>Núcleo paraventricular (del hipotálamo)</i>
R²	<i>Coefficiente de correlación</i>
SDS	<i>Dodecilsulfato de sodio</i>
SM	<i>Síndrome metabólico</i>
SNC	<i>Sistema nervioso central</i>
Sox-2	<i>Factor de transcripción para gen Sox-2</i>
T3	<i>Triyodotironina</i>
T4	<i>Tiroxina</i>
T-AOC	<i>Capacidad antioxidante total</i>
TBE	<i>Tribromo etanol (solución)</i>
TBS	<i>Solución buffer tris-tricina</i>
TDM	<i>Trastorno depresivo mayor; depresión mayor: también como grupo experimental</i>
TDM+TX	<i>Grupo experimental trastorno depresivo mayor mas tratamiento antidepresivo</i>

TEC	<i>Terapia electroconvulsiva</i>
TGFBR	<i>Receptor transmembranal de serina/treonina quinasa</i>
TNFα	<i>Factor de necrosis tumoral alfa</i>
TrKβ	<i>Receptor de neurotrofinas tirosina quinasa</i>
Trp	<i>Triptófano</i>
TSG101	<i>Gen de susceptibilidad tumoral 101</i>

TSH	<i>Hormona estimulante de la tiroides</i>
Tyr	<i>Tirosina</i>
VE	<i>Vesículas extracelulares</i>
WB	<i>Western blot (biología molecular)</i>

RESUMEN

Actualmente diversos estudios sugieren que vesículas extracelulares -de tamaño nanométrico- como los exosomas, son una importante herramienta para avanzar en la elucidación de los mecanismos de señalización y comunicación intercelular, que subyacen a algunos trastornos neuropsiquiátricos como la depresión. Esto, a través de la expresión intrínseca de un posible síndrome multisistémico que influye tanto a nivel central como periférico en vías comunes inflamatorias para los sistemas nervioso, endócrino, inmunológico o metabólico. Este estudio abordó y trató de determinar el contenido proteico de los exosomas periféricos obtenidos de suero sanguíneo de sujetos femeninos diagnosticados con TDM y comparados con aquellos exosomas provenientes de sujetos sanos y de sujetos que además recibieron tratamiento farmacológico antidepresivo. Los resultados mostraron que existen cambios significativos en tres proteínas que son Eotaxina-1, RANTES y BDNF entre el grupo control y el grupo TDM. Resultados similares fueron observados en el grupo que recibió tratamiento antidepresivo. Además, se identificó la existencia de una compleja red de interacción con otras 14 proteínas en los exosomas que tienen implicaciones en vías moleculares y de señalización con procesos biológicos relacionados a inflamación, estrés, metabolismo, entre otros. Estas, quizá actúen de manera conjunta como agentes reguladores de los signos y síntomas en los trastornos depresivos. Sin embargo, esto es una especulación y deberá ser explorada en estudios futuros. No obstante, los exosomas de suero sanguíneo de sujetos con diagnóstico TDM presentan un perfil proteico con cambios en la expresión de proteínas implicadas en la inflamación.

ABSTRACT

Currently, several studies suggest that - nano-sized - extracellular vesicles, such as exosomes, are an essential tool to advance in the elucidation of the mechanism underlying some neuropsychiatric disorders such as depression, through the intrinsic expression of a possible multisystemic syndrome that influences centrally and peripherally common inflammatory pathways for the nervous, endocrine, immune or metabolic systems. This study addressed the protein content in female subjects diagnosed with MDD compared with those exosomes from healthy subjects and subjects who received antidepressant drug treatment. Significant changes were found only for Eotaxin-1, RANTES, and BDNF between the control group and the group diagnosed with MDD. Similar results were found in the group of participants that received antidepressant drugs. Also, the existence of a complex network of interaction with 14 other exosomal proteins was identified, which have implications in molecular pathways and signaling with biological processes related to inflammation, stress, metabolism., among others. These proteins may act together as regulatory agents for signs and symptoms in depressive disorders. However, this is a speculation that deserves a particular study. Nevertheless, exosomes from participants diagnosed with MDD exhibit a specific protein profile with relevant changes in proteins implicated in inflammation.

1. INTRODUCCION

Uno de los problemas más importantes de salud pública en México y el mundo, son los trastornos neuropsiquiátricos, donde la depresión mayor o trastorno depresivo mayor (TDM) es reconocido como el más frecuente e incapacitante entre la población. Clasificado como uno de los trastornos del afecto, se caracteriza por emociones y pensamientos negativos coexistentes con déficit cognitivo, fatiga excesiva, alteraciones en el apetito, la libido y el sueño, principalmente, todo ello de acuerdo con lo descrito en el *Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales* en su quinta edición, DSM-V (American Psychiatric Association, 1995). Afecta mayoritariamente a mujeres, con una prevalencia de 2:1, respecto a los hombres y variando entre la población general de un 10 a 25% y 5 a 12%, respectivamente (Gutiérrez-Lobos *et al.*, 2002; OMS, 2020; INEGI & INMUJERES, 2018). En la actualidad, se ha reportado que hasta un 30% de los pacientes con esta afección no responden a tratamiento farmacológico antidepresivo, evidenciando la necesidad de estudios más completos e integrales que contribuyan y ahonden al entendimiento de la fisiopatología y neurobiología de estos trastornos, así como de los mecanismos de acción de los tratamientos farmacológicos disponibles (González-Pinto, 2020; Leonard & Aricioglo, 2020; Xia *et al.*, 2020).

De acuerdo con la información epidemiológica actual, se prevé que para este año 2020 la enfermedad afecte hasta un 20% de la población mundial (OMS, 2020), además, se ha observado que durante el transcurso o aparición de los estados depresivos, existe un aumento recurrente y considerable en la prevalencia de anormalidades o afecciones físicas severas, con una alta comorbilidad con otras patologías mentales (ansiedad y consumo de sustancias adictivas, etc.), alteraciones y trastornos en el metabolismo (síndrome metabólico, apetito, diabetes, obesidad, etc.), y diversas afecciones cardíacas (hipertensión, infarto, etc.), entre otras (McIntyre *et al.*, 2010; Evrensel & Ceylan, 2015; Van Loo *et al.*, 2015; Dean & Keshavan, 2017; Pérez-Padilla *et al.*, 2017; Inta *et al.*, 2020).

Derivado de estas observaciones, diversos estudios han propuesto que las manifestaciones del estado de ánimo -en este trastorno-, podría entenderse como una expresión intrínseca de un síndrome multisistémico que influye tanto en el SNC, como en el endócrino e inmunológico (Evrensel & Ceylan, 2015; Chan *et al.*, 2019; Inta *et al.*,

2020), impactando en la señalización de diferentes vías neuroquímicas y de respuesta inflamatoria (Kupfer *et al.*, 2016; Alzoubi *et al.*, 2018), haciendo evidente la comunicación bidireccional a través de vías y mecanismos comunes, en donde pueden participar diferentes moléculas, metabolitos, factores solubles u otro tipo de interacción celular, como las vesículas extracelulares (Chan *et al.*, 2019; Saeedi *et al.*, 2019).

En este sentido, se ha propuesto que los exosomas, vesículas extracelulares de tamaño nanométrico liberadas después de un proceso intracelular de fusión entre cuerpos multivesiculares y la membrana plasmática, y secretadas por una gran cantidad de células del cuerpo (Théry *et al.*, 2002; Hessvik & Llorente, 2018), pueden actuar como moduladores de la comunicación intercelular a diferentes niveles gracias al transporte de su contenido diferencial, promoviendo cambios estructurales, bioquímicos y funcionales en diferentes tipos de células, bajo estadios patológicos o normales (Samanta *et al.*, 2018). Su contribución en la progresión y desarrollo de enfermedades severas como diferentes tipos de cáncer (Wang *et al.*, 2017; Im *et al.*, 2018), infecciones virales y parasitarias (Kaur *et al.*, 2014), en diversas afecciones de hígado y riñón (Fang *et al.*, 2013; Sato *et al.*, 2016), además de su reciente descripción en la agregación de las proteínas β -amiloide y α -sinucleína, en enfermedades neurológicas como Alzheimer y Parkinson, respectivamente (Rajendram *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2014; Gui *et al.*, 2015), han hecho de estas nanovesículas, una potencial e importante herramienta biomédica a considerar en el estudio de diversas enfermedades y en particular de las neuropsiquiátricas, como los trastornos depresivos.

El presente estudio, abordó y trató de determinar la posible relación o contribución que tienen los exosomas periféricos aislados y caracterizados de suero sanguíneo humano, así como su contenido, en pacientes femeninos diagnosticados con TDM y comparados con aquellos exosomas provenientes de sujetos sanos y de pacientes que además recibieron tratamiento farmacológico antidepresivo. Todo ello como una estrategia para identificar su papel en el desarrollo de este trastorno neuropsiquiátrico, e incluso, como una fuente de información clínica importante para el diagnóstico y/o monitoreo de los pacientes, con miras a la descripción de posibles biomarcadores para este trastorno.

2. ANTECEDENTES

2.1. Historia de la depresión

Históricamente los trastornos depresivos han sido descritos desde hace varios siglos, recibiendo diferentes nombres o términos, entre ellos: *Melancolía*, *acedia* o *depresión*; identificando en ellos la concepción actual del término “Depresión”, siendo descritos desde diferentes perspectivas culturales de la filosofía occidental (Aguirre-Baztán, 2008; Mori & Caballero, 2010).

De acuerdo con la ideología hipocrática (siglos IV y V a.C.), la *Melaina chole* o *Melancolía*, provenía de la alteración del equilibrio humoral (bilis negra), produciendo el característico estado patológico actualmente descrito (Quevedo, 2004; Góngora-Biachi, 2005). El término *Acedia* (del griego *a kédos*, “sin cuidado”), fue acuñado siglos después de la escuela médica hipocrática, entre los monasterios y catedrales del cristianismo, donde se le asoció como un síndrome de tristeza y dejadez, de inhibición y apatía, así como de angustia y pereza, dónde además se podían presentar dos tipos: uno “melancólico”, relacionado a la tristeza y tratado como una enfermedad corporal, y otro “diabólico”, considerado incluso como un pecado (Aguirre, 1996).

Cualquier descripción médica o religiosa sobre estos trastornos depresivos fueron abordados bajo alguno de estos dos términos y sus tratamientos, pero no fue hasta el *Renacimiento* que se realizaron avances significativos en la descripción de esta enfermedad mental. Por ejemplo, Paracelso (1567), describió cuatro “clases de melancólicos”, ahondando en la descripción de diversos grados o tipos de estados depresivos; posteriormente, T. Bright (1586), publicó su *Tratado sobre la melancolía*, constituyéndose este libro, como la primera monografía sobre depresión. Sin embargo, es en el año de 1621, que R. Burton publicó *La anatomía de la melancolía*, donde se dio un gran adelanto y se dejó de lado la Teoría humoral de las enfermedades, donde se incluyeron algunos factores psicológicos, y una previa distinción entre los estados de hipertimia y distimia. Es así como junto a los avances en la descripción médica, anatómica y fisiológica del cuerpo humano, que se logró avanzar, hacia finales de este siglo, a una nueva concepción nerviosa o mental de la depresión (Bright, 1586; Burton, 1621; Aguirre-Baztán, 2008; Bartra, 2015).

Las explicaciones antiguas y sobrenaturales de esta y otras enfermedades mentales permanecieron hasta entrado el Siglo XIX, donde gracias al desarrollo de las diversas teorías psicológicas y psicodinámicas, se realizaron ciertos avances en la descripción y etiología de este padecimiento. Por ejemplo, a la luz del psicoanálisis, Sigmund Freud (1915) propuso que la depresión provenía del efecto primario de un trauma vital temprano sobre la “pérdida de objeto”, hipótesis que consistió en la separación temprana y traumática de un objeto de apego significativo por parte del individuo -que lo predispondría a la depresión-, y que posteriormente, este recuerdo y sensación de trauma podía ser evocado y/o revivido en la edad adulta, por situaciones de pérdida similar, provocando este padecimiento en sus estados más severos (Freud, 1895, 1915; Sadek & Nemeroff, 2000). Sin embargo, no es hasta el desarrollo de la psicobiología en los años 50’s del siglo pasado, que se reconoció la importancia de los factores genéticos y los eventos vitales en la etiología de esta enfermedad, dando paso al desarrollo de las teorías biológicas de estos trastornos del afecto (Sadek & Nemeroff, 2000; Vázquez *et al.*, 2000; Luque & Berrios, 2011).

Actualmente se reconocen diversas teorías o aproximaciones que intentan explicar -a la luz de la evidencia disponible- la neurobiología de los estados depresivos, sin embargo, ya sea que se aborde su estudio desde la deficiencia de aminas biógenas, la participación de otros sistemas neuroquímicos y hormonales, una exacerbada respuesta al estrés biológico-psicológico o incluso, la reciente implicación de componentes del sistema inmune y de comunicación intercelular, los trastornos depresivos aún no pueden ser descritos totalmente, siendo necesarias nuevas perspectivas que complementen o mejoren el entendimiento de estos padecimientos neuropsiquiátricos.

2.1.1. Trastorno depresivo mayor (TDM)

La depresión mayor o trastorno depresivo mayor (TDM), es reconocido como un importante problema de salud pública y uno de los trastornos neuropsiquiátricos más frecuentes e incapacitantes a nivel mundial. Es clasificado como uno de los trastornos del afecto, de acuerdo con lo descrito en el *Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales* en su quinta edición, DSM-V (American Psychiatric Association, 1995). Se caracteriza por emociones y pensamientos negativos coexistentes con déficit

cognitivo, fatiga excesiva, alteraciones en el apetito, la libido y el sueño (aumento o decremento), principalmente; aunque de manera específica se pueden manifestar sentimientos de tristeza, desesperanza, inutilidad y culpa; baja autoestima; pensamientos suicidas; afectaciones a la motivación, la atención selectiva, memoria episódica, de trabajo y una menor capacidad de pensamientos reflexivos, así como, irritabilidad, disforia y anhedonia (*Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales*). Se puede establecer el diagnóstico de TDM cuando existen al menos cinco de estos síntomas y se encuentran presentes de manera recurrente o casi constante durante un periodo igual o mayor a dos semanas (American Psychiatric Association, 1995). Este trastorno afecta mayoritariamente a mujeres, con una prevalencia de 2:1, respecto a los hombres y variando entre la población general de un 10 a 25% y 5 a 12%, respectivamente (Gutiérrez-Lobos *et al.*, 2002; OMS, 2020; INEGI & INMUJERES, 2018).

Existe, además, una estrecha relación entre la depresión y la posibilidad de presentar una enfermedad física severa, así como una alta comorbilidad con otras patologías mentales, como los trastornos de ansiedad y el consumo de sustancias adictivas, entre otros (Dean & Keshavan, 2017; Pérez-Padilla *et al.*, 2017). La combinación de todos estos factores directos y secundarios derivados, hacen del TDM uno de los más costosos padecimientos en el mundo. Es por ello, que en la actualidad adquiere importancia el desarrollo de nuevos enfoques en la investigación de los mecanismos específicos implicados en la presencia, desarrollo y prevalencia de dicha enfermedad (Sharma *et al.*, 2013; Jan *et al.*, 2017; Price *et al.*, 2018). Esta información será de gran utilidad para el desarrollo de más y mejores tratamientos farmacológicos, con características específicas, eficaces (Andaloussi *et al.*, 2013; Gerhard *et al.*, 2016) y complementarios con los tratamientos psiquiátricos establecidos, resultando en el mejoramiento de la calidad de vida de los pacientes (Berenzon *et al.*, 2013; Pérez-Padilla *et al.*, 2017).

2.1.2. Neurobiología de la depresión

Pese al gran avance en el campo de las neurociencias en las décadas pasadas, la fisiopatología del TDM no ha sido descrita por completo. Diversos investigadores han elucidado complejos mecanismos neurobiológicos, como: la alteración en los sistemas

neuroquímicos serotoninérgicos, noradrenérgicos, dopaminérgicos, glutaminérgicos y colinérgicos, procesos de inflamación (neuroinflamación), anormalidades del funcionamiento del Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA/HPA), estrés crónico, cambios en la vascularización cerebral, así como una disminución en la neurogénesis y la neuroplasticidad (Dean & Keshavan, 2017). Sin embargo, dichas aproximaciones por separado no parecen explicar completamente las características de este trastorno, es por lo que se considera la posibilidad de que los desórdenes depresivos puedan representar varios subsíndromes o incluso trastornos discretos de esta neuro-psicopatología.

Neurotransmisión de las monoaminas. Es la hipótesis más aceptada para explicar la fisiopatología de la depresión. Describe que este trastorno es causado por una alteración en los niveles de una o más monoaminas, entre ellas: serotonina (5-HT), norepinefrina (NE) y dopamina (DA). Las evidencias que respaldan esta teoría incluyen la disminución de los niveles de metabolitos de serotonina en pacientes diagnosticados con TDM, y también se ha demostrado que algunos fármacos antidepresivos, como los antidepresivos tricíclicos (ATC's), los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS's), así como los inhibidores de la recaptura de serotonina-norepinefrina (IRSN's), aumentan los niveles de serotonina en el cerebro (Richelson, 2001; Dean & Keshavan, 2017; ver Figura 1, incisos A y C). Los neurotransmisores serotonina, norepinefrina y dopamina, están interrelacionados, afectando las concentraciones de cada uno de ellos en el cerebro, por lo que un cambio en el delicado equilibrio entre estos sistemas puede generar estados alterados (desórdenes, trastornos, etc.) de la neuroquímica cerebral normal y/o del comportamiento.

Sin embargo, en las últimas décadas se ha reconocido que otros sistemas neuroquímicos, como el colinérgico, pueden tener implicaciones mayores en la fisiopatología de este trastorno. Por ejemplo, el característico deterioro cognitivo observado durante el curso de la depresión puede ser explicado por las disfunciones de la neuroquímica colinérgica, pues se ha observado que algunos de los cambios en la neurogénesis del hipocampo, a menudo asociados con el estrés crónico en modelos animales, pueden estar mediados en parte por la disfunción colinérgica, lo que a su vez

podría subrayar las alteraciones cognitivas observadas en la conducta de los animales experimentales (Dagyté *et al.*, 2011; Riley & Renshaw, 2018).

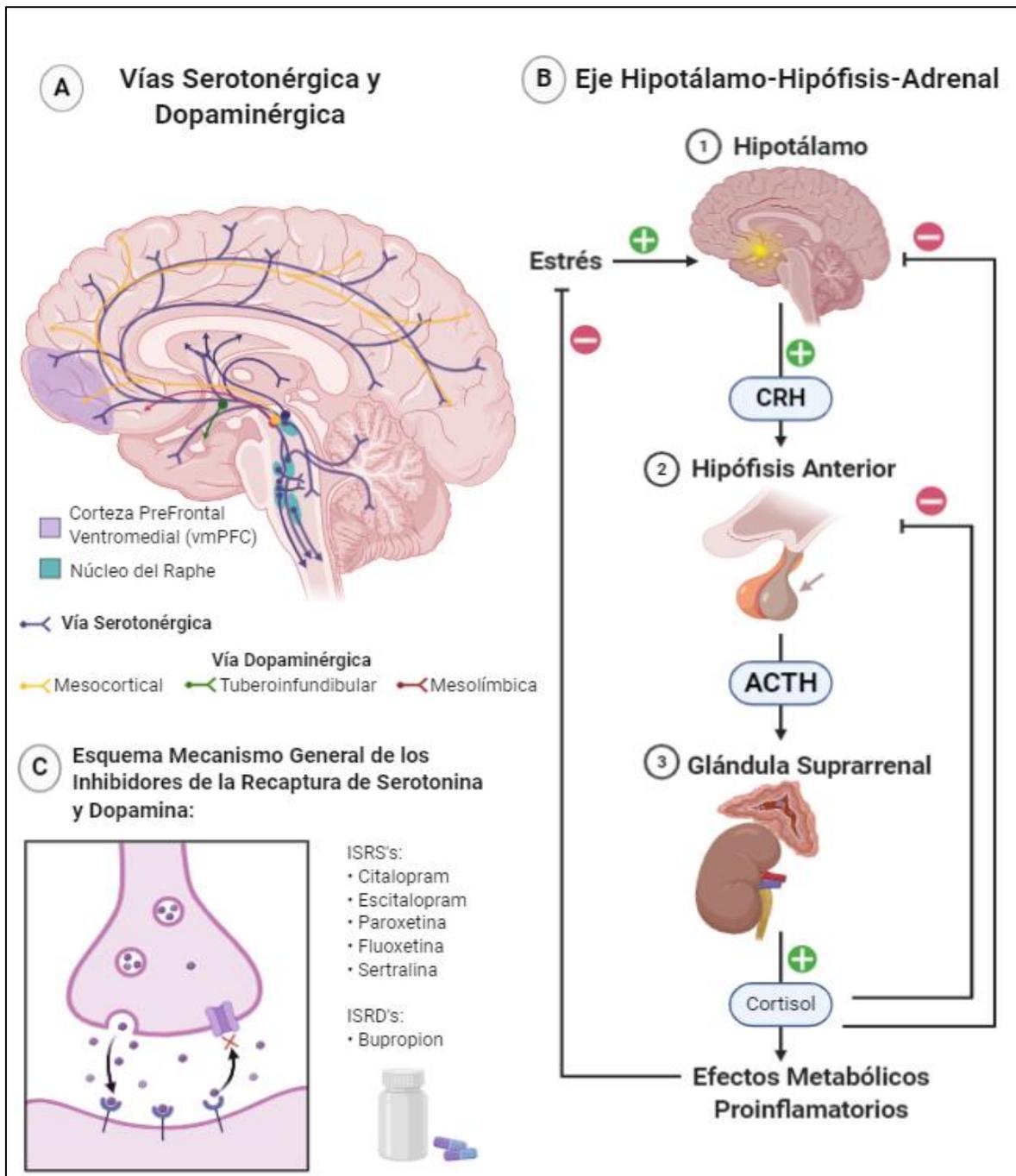


Figura 1. Contribución de los sistemas dopaminérgicos, serotoninérgicos y del eje HHA, en la neurobiología de los trastornos depresivos. Funcional y anatómicamente la 5-HT y la DA, se encuentran íntimamente relacionadas, estimulando áreas y estructuras cerebrales importantes en los estados de ánimo, así como en procesos de memoria, aprendizaje, etc. **(A)**. Una desregulación del Eje HHA, en los niveles de CRH, en la retroalimentación negativa, o en los niveles de cortisol, puede promover procesos metabólicos inflamatorios severos, con un impacto directo en el desarrollo de TDM **(B)**. Los fármacos antidepresivos pueden revertir las alteraciones en la transmisión neuroquímica normal, mediante la

inhibición de la recaptura de serotonina o dopamina (C) (Diseño y autoría bajo el presente estudio; BioRender, suscripción gratuita).

Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA) y respuesta al estrés. En estudios recientes, se ha reportado severas anormalidades en el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal de pacientes con depresión, asociadas a una hiper respuesta al estrés. Algunas de esas alteraciones incluyen la hipersecreción de la hormona o factor liberador de corticotropina (CRF o CRH, por sus siglas en inglés) del núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo, la alteración en la retroalimentación negativa del eje HPA/HHA, así como hipercortisolemia severa de las glándulas suprarrenales y disminución de la supresión de cortisol en respuesta a la dexametasona (Pruessner *et al.*, 2003; ver Figura 1, inciso B). Estudios realizados sobre los efectos de los glucocorticoides en depresión, han descrito que ciertas áreas del cerebro como la corteza prefrontal medial (mPFC), el hipocampo y la amígdala, se encuentran alteradas principalmente. La importancia de estos hallazgos radica en que tanto la mPFC, el hipocampo y la amígdala, están involucrados en funciones ejecutivas, procesamiento de emociones, así como en el desarrollo de memoria y aprendizaje (procesos cognitivos), los cuales se ven afectados y/o alterados durante la depresión. La interrelación entre diversas áreas del cerebro, así como su respuesta conjunta al estrés, puede ayudarnos a describir nuevos modelos biológicos y psicológicos para el trastorno de la depresión (Dean & Keshavan, 2017).

Inflamación. Uno de los principales hallazgos que soportan esta teoría, radica en las descripciones de los niveles de marcadores inflamatorios como IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α , CRP y PGE2 en pacientes con depresión (Felger & Lotrich, 2013; ver Figura 2, inciso A). Estos estudios muestran que inducir procesos inflamatorios en modelos experimentales *in vivo*, provoca el desarrollo de estados depresivos. Por ejemplo, Wright y colaboradores (2005), mostraron una relación directa entre los niveles de IL-6 y el desarrollo de un estado de ánimo depresivo; de manera similar, se ha descrito que el aumento de IL-2, IL-6 y TNF- α , provoca alteraciones en procesos cognitivos, similares a los ocurridos durante la depresión. Además, se ha demostrado también que el estrés psicológico aumenta la producción de citoquinas como IL-1 β , IL-6 y TNF- α , probando la existencia de una retroalimentación positiva entre la depresión y los procesos inflamatorios, en la que la

inflamación causa depresión y el estrés psicológico, a su vez es un factor proinflamatorio (Steptoe *et al.*, 2007).

La marcada relación bidireccional entre la depresión y la inflamación es paralela a la relación clínica entre la depresión y los trastornos inflamatorios. Los pacientes deprimidos parecen tener una mayor incidencia de trastornos autoinmunes, y existen mayores tasas de depresión entre los pacientes que padecen alguna enfermedad inflamatoria (Pasco *et al.*, 2010). Además, se ha reportado que fármacos antiinflamatorios se han utilizado con éxito como complementos de los antidepresivos, resultando en un tratamiento más eficaz para este complejo trastorno.

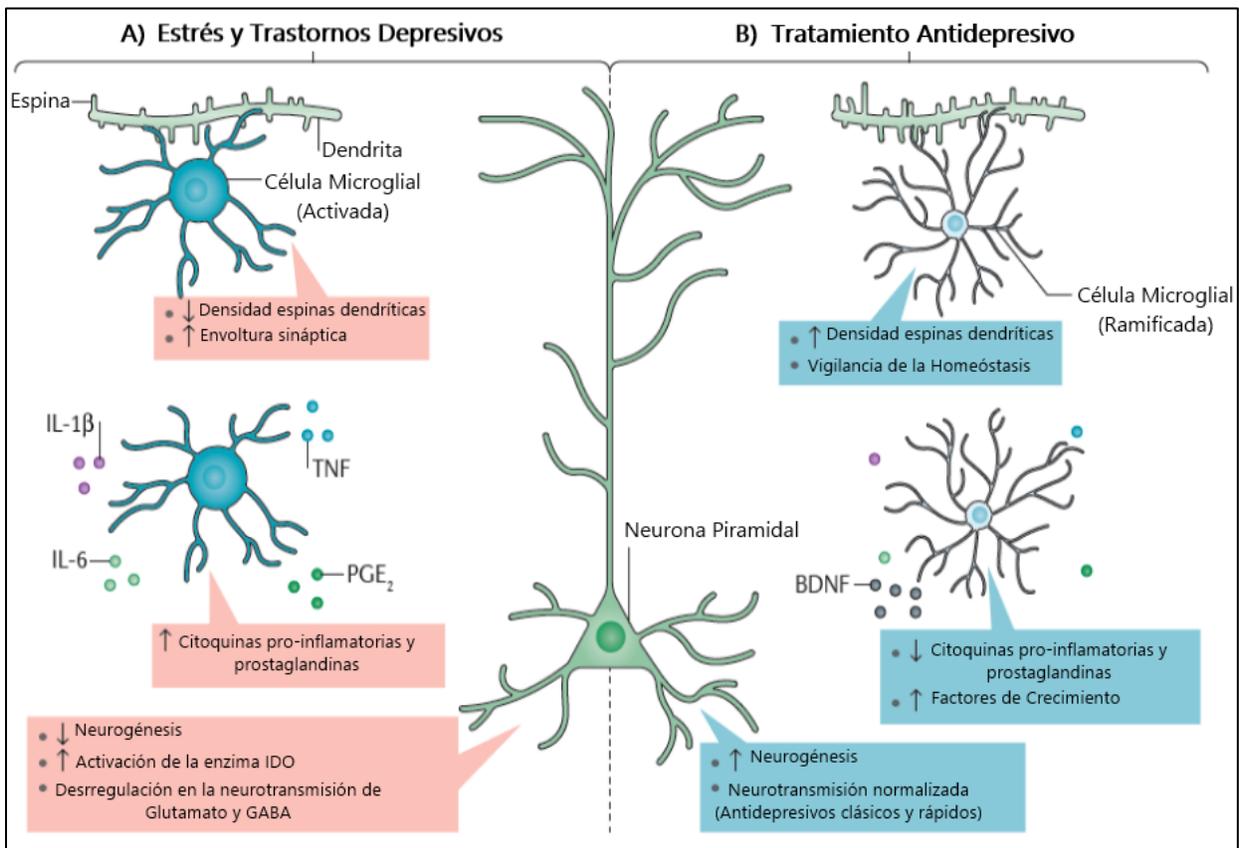


Figura 2. Impacto de algunos factores neuroinflamatorios e inmunológicos en la fisiopatología, tratamiento y neurogénesis durante la respuesta al estrés y patologías como la depresión. (A) Actualmente, existe evidencia clínica y preclínica suficiente para sugerir que las citocinas proinflamatorias y algunos otros factores, afectan directamente la neuroplasticidad al disminuir la neurogénesis y alterar los niveles de neurotransmisores en regiones cerebrales clave. **(B)** Además, otros estudios han sugerido que las terapias antidepresivas pueden revertir las vías relacionadas con la inflamación asociada al estrés y la depresión, promoviendo respuestas neurotróficas y normalizando los niveles de neurotransmisores, lo que conduce a neuroplasticidad adaptativa y una neurogénesis mejorada, o incluso aumentada. *BDNF*, factor neurotrófico derivado del cerebro; *IDO*, Indolamina 2,3-dioxigenasa; *IL*, interleucinas; *PGE₂*, prostaglandina E₂; *TNF*, factor de necrosis tumoral. (Tomado y modificado de Wohleb *et al.*, 2016).

Reducción de la neurogénesis y neuroplasticidad. Nuestro cerebro posee una notable capacidad plástica, crea y elimina sinapsis rápidamente, modificando así, circuitos funcionales de adaptación y aprendizaje, frente a cualquier proceso y/o actividad. Uno de los mecanismos implicados en esta regulación plástica involucra diferentes factores neurotróficos, que pueden llegar a tener papeles clave durante el desarrollo del sistema nervioso, así como en la supervivencia, función y la plasticidad adaptativa de las neuronas en el cerebro adulto (Greenberg *et al.*, 2009). Se ha demostrado que entre muchos factores neurotróficos o de crecimiento que se expresan en el cerebro, la familia del Factor de Crecimiento Nervioso (NGF, por sus siglas en inglés), y en particular, el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés), y las Neurotrofinas 3 y 4 (NT3 y NT4), tienen papeles críticos en patogénesis de la depresión (Tavakolizadeh *et al.*, 2017). El más importante de ellos es el BDNF, el cual promueve la supervivencia de las neuronas existentes, el crecimiento y diferenciación de nuevas neuronas y la formación de sinapsis (Acheson *et al.*, 1995; ver Figura 2). Las observaciones sobre el decremento en niveles séricos de BDNF en pacientes diagnosticados con depresión, sugiere un posible papel de este factor neurotrófico en la fisiopatología de la depresión (Monteleone *et al.*, 2008), además, se han asociado que los antidepresivos producen un incremento en la neurogénesis hipocampal, a través de una posible estimulación de las vías de esta neurotrofina (Santarelli *et al.*, 2003; ver Figura 2, inciso B).

2.1.3. Tratamiento de los trastornos depresivos

Actualmente, existen diversos enfoques disponibles para el tratamiento de los trastornos depresivos, los cuales incluyen diversas estrategias terapéuticas como: la psicoterapia, la terapia cognitiva y somática, así como el uso de fármacos antidepresivos, principalmente (Fava & Kendler, 2000; OMS, 2020). Otras estrategias terapéuticas empleadas, son las denominadas 'terapias neuromoduladoras', que incluyen a la terapia electroconvulsiva (TEC), la estimulación magnética transcraneal (EMT) -bajo diversas modalidades-, la estimulación del nervio Vago (invasiva o no invasiva), y la estimulación cerebral profunda (ECP), las cuales han mostrado un impacto significativo en cuadros clínicos de alta severidad o incluso, en la ausencia de respuesta al tratamiento farmacológico (Pérez-Padilla *et al.*, 2017). Aunado a ello, se ha reconocido la importancia

del estilo de vida del paciente en el curso de la enfermedad, ya que los hábitos saludables, una dieta balanceada y ejercicio físico frecuente, son parte integral de la terapéutica actual (Kupfer *et al.*, 2016; Álvarez-Mon *et al.*, 2017).

Tabla 1. Tipos de fármacos antidepresivos y su mecanismo de acción*

<i>Tipo/Clasificación</i>	<i>Fármacos</i>	<i>Mecanismo de acción</i>
<i>Inhibidores Selectivos de la Recaptura de Serotonina (ISRS)</i>	Citalopram, escitalopram, fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina, sertralina	Inhibe/Bloquea selectivamente los mecanismos de recaptura de 5-HT.
<i>Antidepresivos Tricíclicos (ATC)</i>	Amitriptilina, desipramina, doxepina, imipramina, maprotilina, nortriptilina, protriptilina, trimipramina	Inhibe/Bloquea selectivamente la recaptura de monoaminas: 5-HT, dopamina y noradrenalina.
<i>Inhibidores de la Recaptura de Norepinefrina-Dopamina (IRND)</i>	Bupropion	Inhibe/Bloquea la recaptura de norepinefrina y dopamina.
<i>Moduladores de Serotonina</i>	Nefazodona, trazodona	Antagoniza principalmente receptores 5-HT ₂ .
<i>Inhibidores de la Recaptura de Serotonina-Norepinefrina (IRSN)</i>	Desvenlafaxina, duloxetina, venlafaxina	Inhibe/Bloquea la recaptura de 5-HT y norepinefrina.
<i>Moduladores serotoninérgico-noradrenérgico específicos</i>	Mirtazapina	Antagoniza principalmente los receptores α -2 y 5-HT _{2C} .
<i>Inhibidor de la recaptura de serotonina y agonista parcial del receptor 5-HT_{1A}</i>	Vilazodona	Inhibe potencial y selectivamente la recaptura de 5-HT y actúa como un agonista parcial del receptor 5-HT _{1A} .
<i>Inhibidores de la Mono Amino Oxidasa (MAO)</i>	Isocarboxazida, fenilzina, tranilcipromina; Selegilina	Inhibe de manera selectiva las enzimas (MAO-A y MAO-B) involucradas en la descomposición de 5-HT, dopamina y noradrenalina. Inhibidor selectivo de la MAO-B.

Antidepresivos ampliamente usados y aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration* de EUA) y la Guía de Atención para Pacientes con TDM de la APA (*American Psychiatric Association* de EUA). (Tomado y modificado de Kupfer *et al.*, 2016).

Particularmente los fármacos antidepresivos son ampliamente usados como la primera línea de tratamiento en pacientes con TDM (Álvarez-Mon *et al.*, 2017). Su uso, ya sea solos, en combinación con otros fármacos o diferentes tipos de terapias complementarias, se dirige a las posibles causas fisiológicas del trastorno, como la alteración en los sistemas neuroquímicos serotoninérgicos, noradrenérgicos, dopaminérgicos y glutaminérgicos, entre otros (López-Muñoz & Alamo, 2009; APA, 2010; OMS, 2020; ver Tabla 1).

La importancia de brindar una estrategia farmacológica adecuada a cada paciente depende en gran medida del diagnóstico y evaluación constante a lo largo del periodo bajo tratamiento, así como del apego y respuesta al mismo (Kupfer *et al.*, 2016); sin embargo, en la actualidad se ha reportado en diversos estudios epidemiológicos, un aumento en la prevalencia de pacientes que no responden a tratamiento farmacológico antidepresivo, oscilando entre un 30% y 40%, evidenciando la necesidad de estudios más completos e integrales que contribuyan al entendimiento de la fisiopatología y neurobiología de estos trastornos, así como de los mecanismos de acción de los tratamientos farmacológicos disponibles (González-Pinto, 2020; Leonard & Aricioglo, 2020; Xia *et al.*, 2020).

2.2. Trastorno depresivo mayor (TDM) en mujeres

La depresión es el problema de salud mental más común, y por lo tanto el más importante entre la población femenina (Stegenga *et al.*, 2012). Sin embargo, la atención médica disponible para los trastornos mentales es muy limitada, contándose con escasas opciones de atención, siendo la población de escasos recursos económicos la más afectada por esta situación generalizada (Lara *et al.*, 2004).

Además, sí a ello se adiciona que la mayoría de los pacientes que cursan con TDM difieren considerablemente en el curso de este trastorno, ya sea con episodios recurrentes o solo uno a lo largo de toda su vida, ello hace mucho más complicado tomar las medidas clínicas necesarias para el monitoreo, seguimiento y virtual tratamiento a largo plazo, resultando en un tratamiento inadecuado, excesivo o insuficiente para este trastorno, reflejo de las estadísticas epidemiológicas actuales (van Loo *et al.*, 2015; INEGI & INMUJERES, 2018; OMS, 2020).

Las causas de las diferencias en la prevalencia del TDM o estados depresivos en población femenina y masculina, es aún desconocida. Sin embargo, existen algunas teorías que consideran factores biológicos como vulnerabilidad genética asociada a grupos étnicos o raza, edad, variaciones, fluctuaciones y sensibilidad hormonal a nivel de SNC (Van Loo *et al.*, 2015). También se consideran algunos factores o aspectos psicosociales, como eventos estresantes, victimización, socialización sexual específica, respuesta frente a situaciones diversas, así como situación social vulnerable (Stegenga

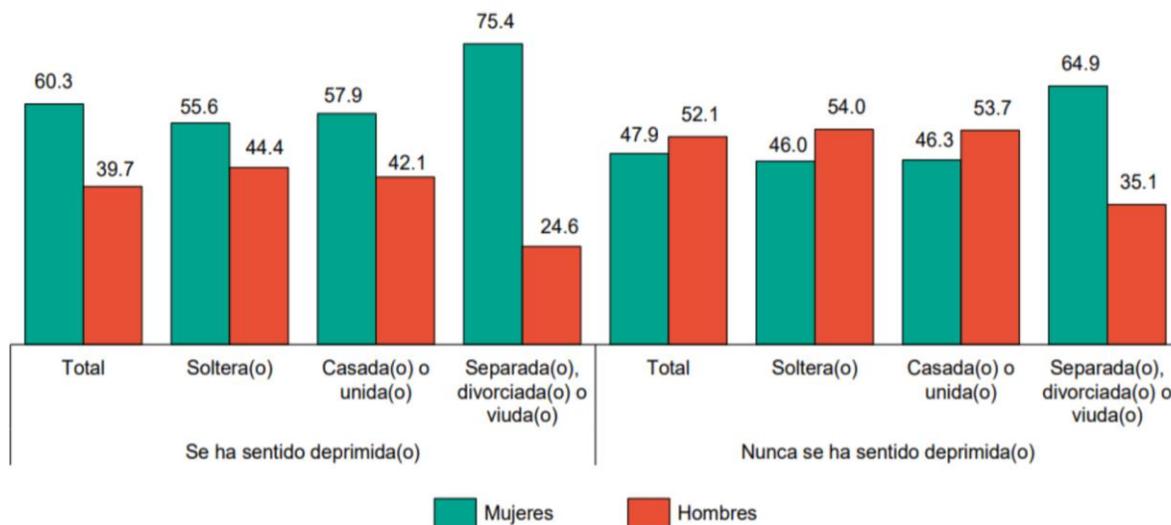
et al., 2012). Además, se ha descrito que, en el caso del género femenino, los trastornos depresivos pueden aparecer y/o desarrollarse a lo largo de los diferentes periodos del ciclo reproductivo normales (premenstrual, perinatal, menopausia), bajo algunas afecciones (infertilidad, aborto espontáneo) o estados hormonales inducidos (tratamiento con anticonceptivos orales o remplazo hormonal). Algunos de estos trastornos durante el ciclo reproductivo femenino son: síndrome premenstrual, desorden disfórico premenstrual, depresión durante el embarazo, tristeza postparto, depresión y psicosis postparto, principalmente (Noble, 2005; Van Loo *et al.*, 2015).

2.2.1. Trastornos depresivos en México

Análisis epidemiológicos recientes realizados en México, muestran que la depresión produce un índice mayor de discapacidad que otras condiciones crónicas como la diabetes, los trastornos respiratorios, las enfermedades cardíacas o la artritis, aunque se pueden presentar comorbilidades entre éstas. Ocupa además, el primer lugar en discapacidad para las mujeres y el noveno para los hombres siendo los adolescentes (7.8%), los adultos mayores de 65 años (20%) y las mujeres en etapa perinatal (5-25%), los grupos de mayor vulnerabilidad en este trastorno, y se estima, que un 9.2% de la población ha sufrido un episodio depresivo en algún momento de su vida (Sloan & Kornstein, 2003; Ceballos-Martínez *et al.*, 2010; Berenzon *et al.*, 2013; Dean & Keshavan, 2017; INEGI & INMUJERES, 2018). Además, al considerar la información más actual del *Boletín Epidemiológico* del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud de México, en su apartado para '*Enfermedades Neurológicas y de Salud*', se puede observar que hasta el reporte de la semana número 52 de 2019, existió una incidencia de hasta el 77.13% de casos sospechosos y confirmados de este padecimiento en mujeres, y que para el caso de los hombres, ésta se encontró alrededor del 27% de la población bajo escrutinio para el análisis epidemiológico, todo esto en relación a los datos generales del año anterior (Secretaría de Salud, 2019).

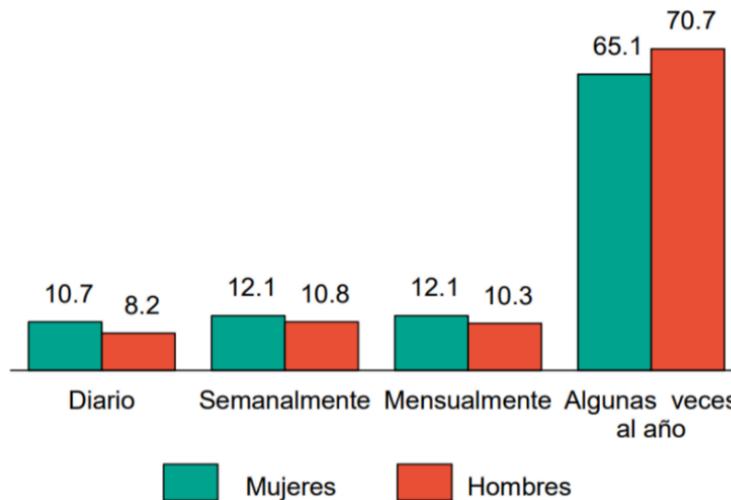
De acuerdo con la encuesta *Mujeres y Hombres de México 2018*, se estimó que, en 2017 un aproximado de 32 millones de personas, de un rango de edad mayor a 12 años y equivalente al 32.5% de la población, reportaron haber experimentado sentimientos de

depresión. En ese sentido, la proporción de mujeres que expresó haber tenido sentimientos de depresión (38.0%) es mayor que la de los hombres (27.0%); además, también se observó que algunos factores socio-familiares como la situación conyugal, aumentaron la prevalencia de padecer estos sentimientos, siendo las mujeres separadas, divorciadas y viudas, la proporción más alta de mujeres deprimidas (75.4%); mientras que entre los hombres, el mayor porcentaje de deprimidos (44.4%), se ubica entre los hombres solteros (Ceballos-Martínez *et al.*, 2010; INEGI & INMUJERES, 2018; ver Gráfica 1).



Gráfica 1. Distribución porcentual de mujeres y de hombres de 12 y más años según sentimientos de depresión y situación conyugal 2017. (excluye a las personas que contestaron que no saben si han sufrido sentimientos de depresión). Fuente: INEGI. *Encuesta Nacional de los Hogares, 2017*. Base de datos. (Tomado y modificado de INEGI & INMUJERES, 2018).

Aunado a ello, en la *Encuesta Nacional de los Hogares 2017* se determinó, que la frecuencia y proporción con la que las mujeres se deprimen a lo largo de un periodo de tiempo determinado como “diaria, semanal o mensual”, respecto a la de los hombres es mucho mayor. Por el contrario, es mayor el porcentaje de hombres (70.7%) que mujeres (65.1%) que declaran sentirse deprimidos algunas veces al año, (INEGI & INMUJERES, 2018; ver Gráfica 2).



Grafica 2. Distribución porcentual de las mujeres y de los hombres de 7 y más años según frecuencia en experimentar sentimientos de depresión 2017. Fuente: INEGI. Encuesta Nacional de los Hogares, 2017, Tabulados básicos (Tomado y modificado de INEGI & INMUJERES, 2018).

Todo lo anterior hace que la información obtenida en las recientes encuestas en nuestro país, sea correspondiente con los datos reportados a escala global (Van Loo *et al.*, 2015; OMS, 2020), además, al correlacionar la información clínica y epidemiológica de otras patologías crónicas o severas entre la población mexicana como hipertensión, diabetes, obesidad, etc., se puede apreciar también, una alta incidencia de comorbilidad entre éstas y posibles trastornos depresivos, impactando significativamente en la calidad de vida de la población mexicana.

2.3. Alteraciones metabólicas y trastornos depresivos

Derivado de la información epidemiológica actual, se ha observado que durante el transcurso o aparición de los estados depresivos, existe un aumento recurrente y considerable en la prevalencia de anomalías o afecciones metabólicas, principalmente; donde alteraciones en el apetito -presente también en estos trastornos-, padecimientos crónicos severos como diabetes (Evrensel & Ceylan, 2015), síndrome metabólico (Viinamäki *et al.*, 2009; Foley *et al.*, 2010), obesidad (Inta *et al.*, 2020), hipertensión arterial (Van Loo *et al.*, 2015), así como otras afecciones cardíacas, pueden llegar a coexistir con una alta frecuencia, y afectar hasta a un tercio de los individuos que padecen TDM (McIntyre *et al.*, 2010; Inta *et al.*, 2020).

Ejemplo de ello se puede observar en la tasa de TDM en individuos que padecen diabetes tipo 1 o 2, donde se ha reportado un aumento aproximado de 2 a 4 veces la incidencia de este trastorno (Sartorius, 2018). Asimismo, la prevalencia de síndrome metabólico en individuos con TDM es alta, observándose hasta un 48% (Inta *et al.*, 2020). En este sentido, algunos estudios recientes sugieren que las manifestaciones del estado de ánimo -en estos trastornos-, podrían entenderse como una expresión intrínseca de un síndrome multisistémico que influye tanto en el SNC, como en el endócrino e inmunológico (Evrensel & Ceylan, 2015; Chan *et al.*, 2019; Inta *et al.*, 2020; Ver Figura 3). Parte de la evidencia que apoya la posible relación entre los desórdenes metabólicos y los trastornos depresivos, puede hallarse en los efectos e impacto que pueden tener los fármacos antidepresivos convencionales en posibles vías neuroinmunoendócrinas comunes para estas enfermedades (Olguner-Eker *et al.*, 2017).

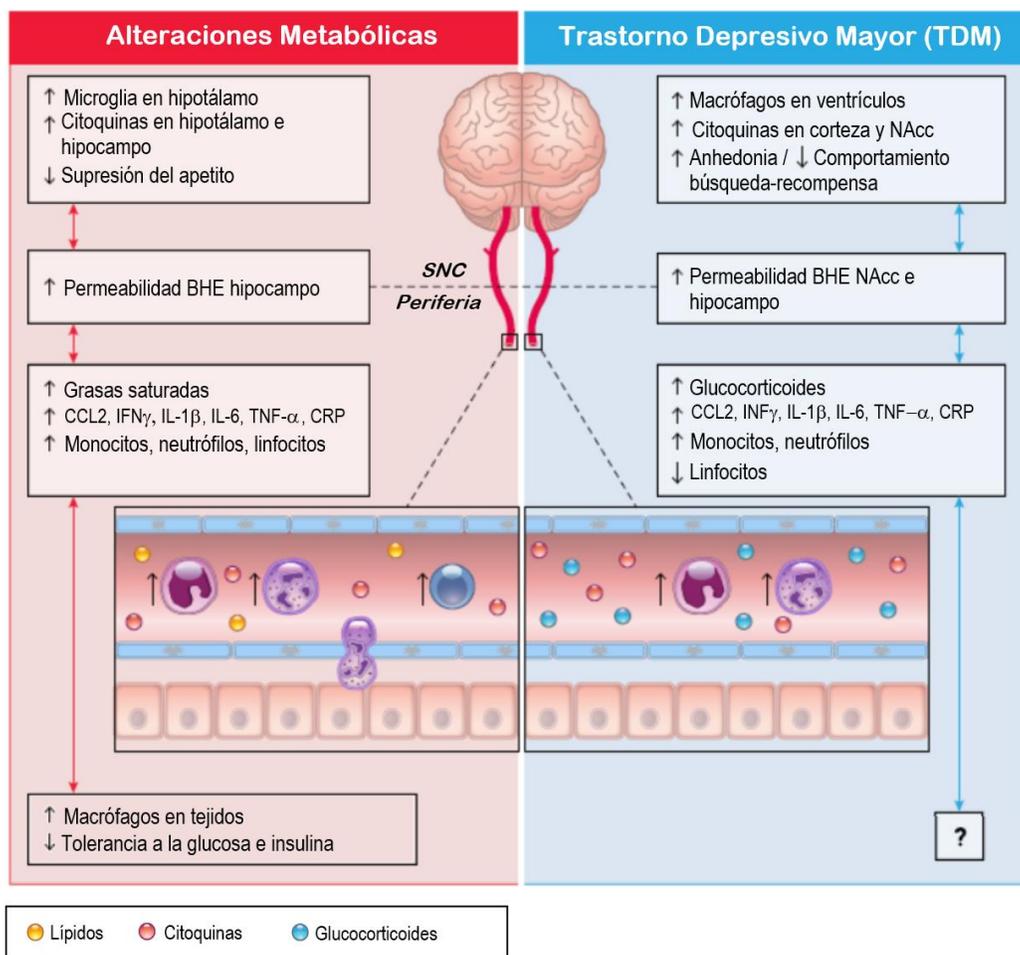


Figura 3. Comparación de los principales procesos inflamatorios en alteraciones metabólicas y trastorno depresivo mayor (TDM). En el sistema nervioso central (SNC), los principales indicadores de

procesos inflamatorios incluyen, la acumulación y activación de microglía, la expresión de citoquinas, y variación en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE), procesos alterados tanto en síndrome metabólico (SM) como en depresión (TDM). En obesidad y SM, esto puede observarse principalmente en el hipotálamo e hipocampo, mientras que en estrés crónico o TDM, el núcleo Accumbens (NAcc) e hipocampo, son los más afectados. En la periferia, tanto las citoquinas proinflamatorias como monocitos y neutrófilos circulantes se encuentran aumentados en ambos trastornos, sin embargo, se ha reportado una disminución de linfocitos sanguíneos durante estadios depresivos. Los procesos de infiltración de tejido periférico por células inmunológicas ocurren principalmente en el SM, mientras que en estados depresivos se conoce muy poco sobre ello. Estos cambios inflamatorios se han asociado con un aumento en el apetito e intolerancia a la glucosa durante el SM, mientras que, la anhedonia y la marcada reducción del comportamiento búsqueda-recompensa, con los trastornos depresivos. (Tomado y modificado de Chan *et al.*, 2019).

Algunos de los efectos que los fármacos antidepresivos pueden tener en las alteraciones metabólicas comprenden: variación en el metabolismo de glucosa y dislipidemia, hipertensión, así como cambios en el peso y apetito, principalmente (McIntyre *et al.*, 2010; Chan *et al.*, 2019). En este sentido, se ha observado de manera general, que la mayoría de los inhibidores selectivos de recaptura de las diferentes monoaminas no tienen un impacto directo en los niveles de glucosa, lípidos, hipertensión u obesidad; por el contrario algunos antidepresivos tricíclicos, tienden a incrementar los niveles de glucosa, lípidos (triglicéridos y colesterol HDL), así como el peso corporal, aunque parecen disminuir la presión sanguínea; sin embargo, se ha reportado también, que algunos inhibidores de la MAO, pueden facilitar la eliminación de glucosa y aumentar ligeramente los niveles de lípidos, así como disminuir la presión sanguínea y aumentar -aparentemente- el peso corporal (McIntyre *et al.*, 2010; Wysokiński *et al.*, 2015; Olguner-Eker *et al.*, 2017; Gui *et al.*, 2018; Chan *et al.*, 2019). Derivado de estas observaciones, se ha propuesto que el efecto diferencial de los antidepresivos -en mencionadas variaciones metabólicas-, puede estar mediado a través de su impacto en la señalización de diferentes vías neuroquímicas y de respuesta inflamatoria, tanto en la periferia como a nivel central (Evrensel & Ceylan, 2015; Kupfer *et al.*, 2016; Alzoubi *et al.*, 2018), haciendo evidente la comunicación bidireccional a través de vías y mecanismos comunes, en donde pueden participar diferentes moléculas, metabolitos, factores solubles u otro tipo de interacción celular, como las vesículas extracelulares (Chan *et al.*, 2019; Saeedi *et al.*, 2019).

2.4. Vesículas extracelulares (VE)

Las vesículas extracelulares (VE) son partículas esféricas secretadas por las células eucariotas, estructuralmente están compuestas por una bicapa de fosfolípidos característica, poseen un diámetro aproximado de entre 30 nm a 5 µm (Harrison *et al.*,

2014). En su interior, pueden contener diversos tipos de lípidos, proteínas citosólicas y de membrana, así como diversos tipos de ácidos nucleicos (microRNA, ARN, ADN, etc.), teniendo una relevancia importante en los mecanismos de comunicación intercelular (Kuo & Jia, 2017).

Las primeras descripciones de VE se remontan a los años 70's, donde originalmente se creía que estas vesículas eran secretadas directamente por la membrana plasmática de las células, sin embargo, para la década siguiente se pudo describir parte del complejo mecanismo de secreción de estas vesículas (Harding & Stahl, 1983; Johnstone *et al.*, 1987). Las VE se pueden clasificar hasta el momento, en tres principales subgrupos: a) microvesículas, micropartículas o *ectosomas*, producidas por la excreción y fisión de la membrana plasmática de las células; b) *exosomas*, que son formados por mecanismos endosómicos y liberados tras la fusión de cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática; y c) *cuerpos apoptóticos*, liberados como “ampollas” de células en apoptosis (Harrison *et al.*, 2014).

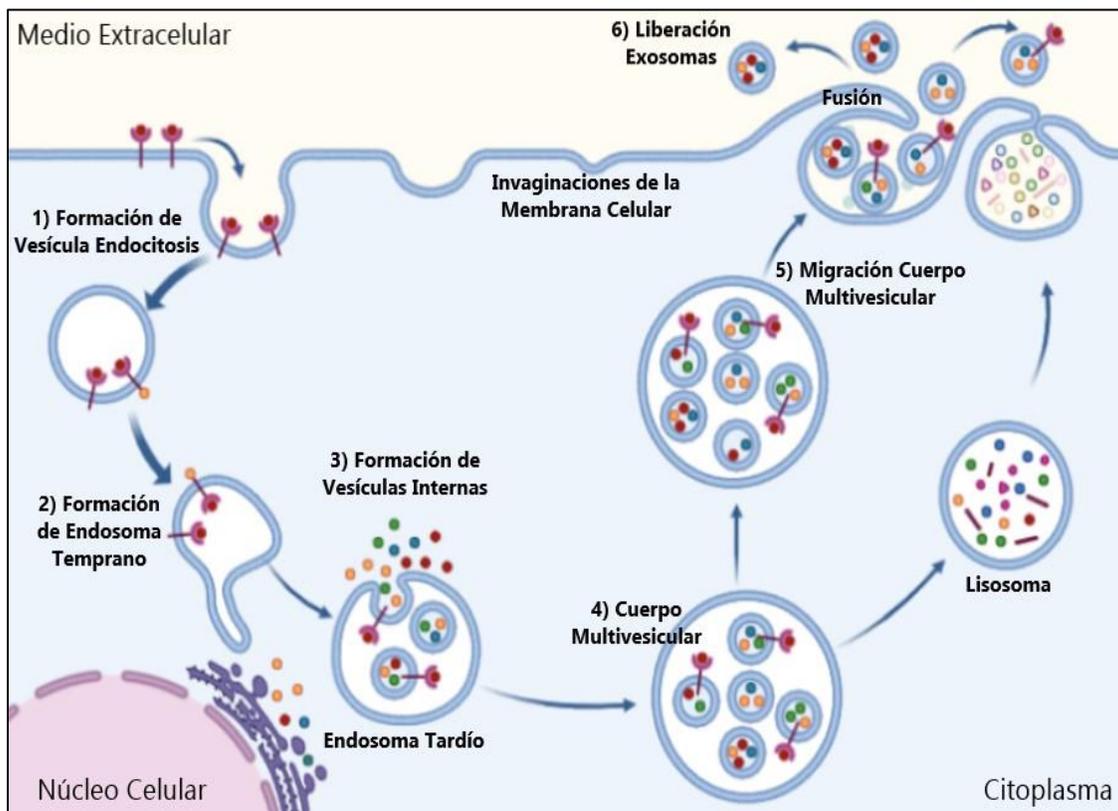


Figura 4. Esquema general de la biogénesis de exosomas. El proceso inicia con la generación de invaginaciones en la membrana de la célula para la formación de vesículas por endocitosis (1), estas vesículas propician la formación de endosomas tempranos (2), los cuales mediante procesos de

maduración de la vía endocítica, generan vesículas internas de diferentes tamaños que son empaquetadas con diversas moléculas y factores solubles del microambiente citosólico (3), posteriormente los endosomas tardíos dan origen a los cuerpos multivesiculares (4), quienes pueden seguir procesos metabólicos de degradación hacia los lisosomas, o migrar hasta la membrana celular (5), donde se fusionan con ella y liberan las vesículas internas (exosomas) al medio extracelular (6). (Diseño y autoría bajo el presente estudio; *BioRender*, suscripción gratuita).

2.4.1. Exosomas

Los exosomas son un tipo de vesículas extracelulares de tamaño nanométrico, con un diámetro aproximado de entre 30 a 200 nm, son liberados después de un proceso intracelular de invaginación entre membranas de endosomas tardíos para la formación de cuerpos multivesiculares que se fusionarán con la membrana plasmática de las células (Ver Figura 4; Théry *et al.*, 2002; Stoorvogel *et al.*, 2002; Hessvik & Llorente, 2018). Anteriormente fueron considerados como vesículas producidas únicamente por los reticulocitos sanguíneos maduros, secretadas en el medio extracelular, y que poseían receptores de transferrina expresados en su superficie, y que tenían funciones específicas de transporte de desechos celulares (Harding & Stahl, 1983; Johnstone *et al.*, 1987).

Poseen una composición lipídica y proteica distintiva de su membrana exosomal (bicapa), además de contener en su interior diferentes clases de ARN (mARN, lncARN, miARN), ADN, proteínas, factores solubles y otras moléculas características de la célula que les dio origen (Ver Figura 5; Carvallo & Astudillo, 2016; Aguilera-Rojas *et al.*, 2018). Dado que los exosomas tienen un origen endosomal, contienen un conjunto distintivo de proteínas involucradas en el transporte y fusión de la membrana, por ejemplo: Rab GTPasas, anexinas, flotilina; en la biogénesis de los cuerpos multivesiculares (MVB, en inglés); Alix, TSG101; en la actividad del complejo principal de histocompatibilidad de clase I y II (MHC); así como en procesos que requieren proteínas de choque térmico como, hsc70 y 90; integrinas y tetraspaninas, por ejemplo: CD9, CD63, CD81 y CD82. Estas últimas proteínas, altamente expresadas en la membrana de los exosomas, y que han servido como marcadores específicos para identificar a este tipo de nanovesículas (Tkach & Théry, 2016; Maravillas-Montero & Martínez-Cortés, 2017; Aguilera-Rojas *et al.*, 2018). Los exosomas son secretados por múltiples tipos celulares, como: reticulocitos, células mesenquimales, neuronas, fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales,

plaquetas, alofococianinas (APC), células tumorales, entre otros (Bobrie *et al.*, 2011; Colombo *et al.*, 2014); también se pueden encontrar en diversos líquidos corporales, como: lavado bronco-alveolar, líquido sinovial, orina, bilis, leche materna y suero sanguíneo, principalmente (Théry *et al.*, 2009; Vlassov *et al.*, 2012).

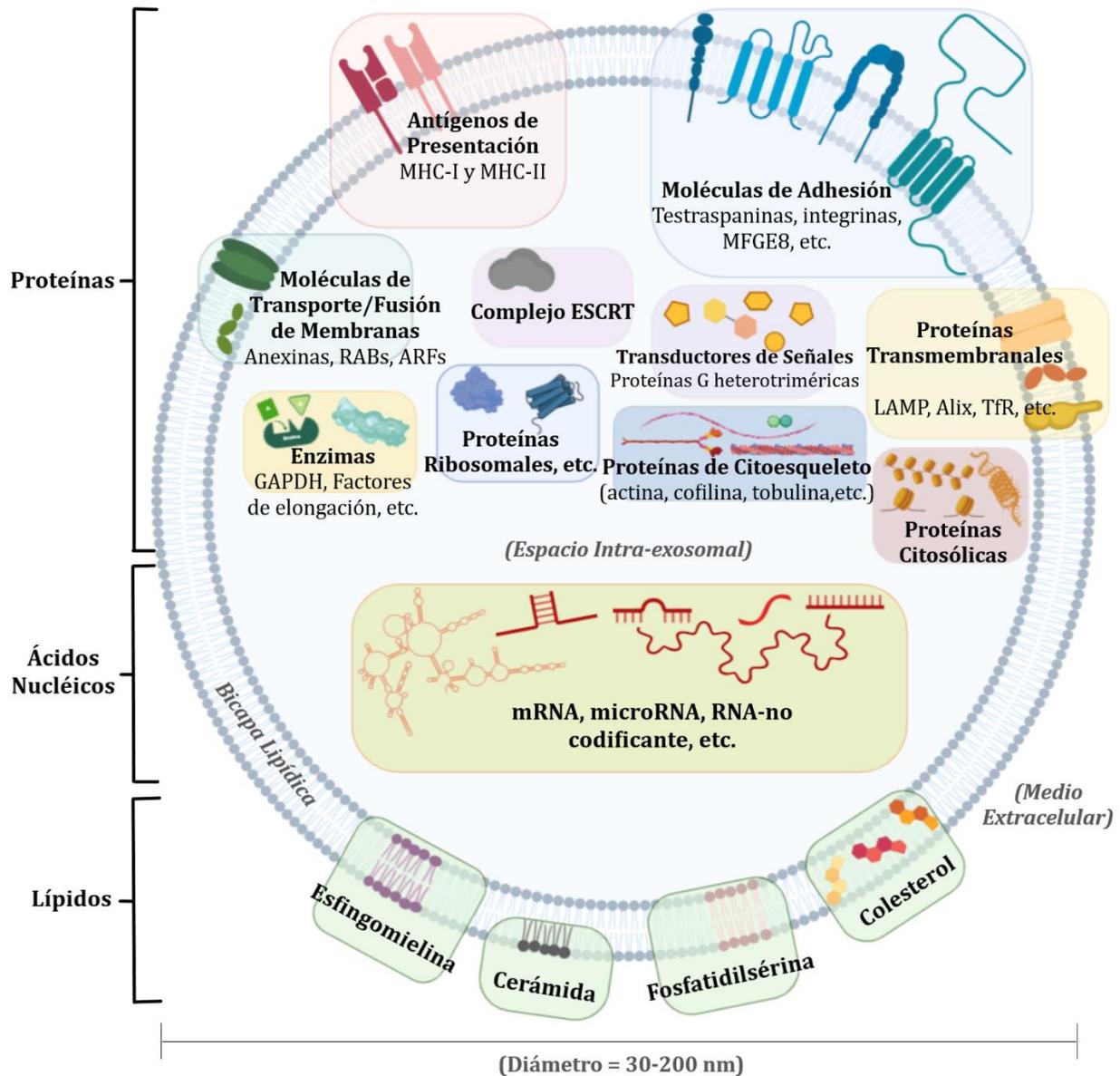


Figura 5. Esquema general de la estructura molecular de los exosomas. Los exosomas son vesículas de entre 30 a 200 nm de diámetro, se conforman de una bicapa lipídica compuesta de diferentes lípidos y proteínas transmembranales, así como de un contenido *intra exosomal* rico en diversos tipos de proteínas, enzimas y ácidos nucleicos, que pueden servir como un medio de comunicación eficiente entre las células. (Tomado, modificado y adecuado bajo el presente estudio, de Théry *et al.*, 2002, Kowal *et al.*, 2014, Liu *et al.*, 2019 y Saeedi *et al.*, 2019; BioRender, suscripción gratuita).

Los estudios han descrito que las células emplean a estas nanovesículas en diversas funciones como, comunicación intercelular (Tkach & Théry, 2016), el intercambio genético (Shtam *et al.*, 2013) y la presentación de antígenos (Maravillas-Montero & Martínez-Cortés, 2017), esto, al ser captados por las células circundantes o transportados en el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Grapp *et al.*, 2013; Gui *et al.*, 2015), en la leche materna (Zonneveld *et al.*, 2014), en la sangre (Baranyai *et al.*, 2015), la orina (Royo *et al.*, 2016) y en otros fluidos biológicos. Además, gracias a las moléculas presentes en su superficie, permiten a las células transportar su carga molecular a corta y larga distancia, induciendo procesos de señalización a través de interacciones ligando-receptor, internalizándose por endofagocitosis o por fusión con la membrana de las células blanco, y liberando así, su contenido en el citoplasma de las mismas y transmitiendo el mensaje, traducido en un efecto significativo a nivel celular y biológico (Camussi *et al.*, 2010; Aguilera-Rojas *et al.*, 2018), dicha liberación de mensajes vía exosomas ocurre en forma de ADN, ARN y/o proteínas, así como diversas moléculas (Orozco-Romero *et al.*, 2016).

En relación con la presencia de exosomas con una posible participación o contribución a nivel de SNC, estos pueden encontrarse principalmente en dos fluidos corporales: el LCR y la sangre (Liu *et al.*, 2020). Como tal, el LCR es un fluido biológico producido por ultrafiltración de plasma sanguíneo por células endoteliales en los plexos coroideos de los ventrículos cerebrales, que al estar en contacto directo y rodear el cerebro y la médula espinal, proporciona soporte mecánico y protección al SNC (Skalnikova *et al.*, 2019). Varios estudios reportan la presencia de vesículas extracelulares en el LCR, además, posee de 100 a 300 veces menos contenido de proteína que el plasma sanguíneo y solo un 20% de las proteínas presentes en él tienen un origen neural, convirtiéndolo en una fuente ideal de exosomas específicos del SNC (Al-Shweiki *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2020). Sin embargo, ya que la recolección de LCR requiere un procedimiento especializado, invasivo y riesgoso, con algunas complicaciones (hemorragias, infecciones, etc.), y, además, diversas investigaciones han sugerido que VE como los exosomas pueden cruzar la BHE, y ser detectados en plasma sanguíneo -siendo incluso correspondientes los hallazgos a nivel central-, hacen del LCR una fuente de exosomas con factores limitantes a considerar, al menos en comparación con la sangre.

Por otro lado, la sangre es el principal líquido corporal para identificar y monitorear la homeostasis del organismo, pues gracias al constante intercambio de nutrientes y desechos bioquímicos que realiza con los tejidos y células que conforman el cuerpo, se puede identificar en él la evidencia química o biológica de cualquier trastorno fisiopatológico que pueda desarrollarse (López-Correa & Casasbuenas-Ayala, 2015). La gran facilidad con la que se puede obtener el suero sanguíneo, su almacenamiento y disposición, así como la relativa facilidad que se ha descrito en diversos estudios para aislar exosomas provenientes de diversos tipos celulares en el suero sanguíneo (Baranyai *et al.*, 2015; Aguilera-Rojas *et al.*, 2018), y en particular, la estrecha comunicación que guarda con la barrera hematoencefálica (BHE) y su ya característica comunicación bidireccional entre la periferia y el SNC (Wood *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2015), hacen de este sistema, una fuente adecuada, práctica y reproducible para la obtención de exosomas representativos de diferentes orígenes y con posibles implicaciones en diversas patologías, particularmente a nivel central.

2.4.2. Relevancia clínica de los exosomas en el SNC

Gracias a estudios recientes, se ha podido determinar la contribución que pueden llegar a tener las diferentes vesículas extracelulares en la comunicación celular (Rothman & Schekman, 2011; Südhof & Rizo, 2011), así como en procesos fisiológicos y patológicos en las diversas afecciones del organismo (Samanta *et al.*, 2018). Estos hallazgos sugieren que la participación de los exosomas en la transmisión, desarrollo, progresión y/o contribución de la patogenia de enfermedades como cáncer (Wang *et al.*, 2017; Im *et al.*, 2018), infecciones virales y parasitarias (Kaur *et al.*, 2014), en diversas afecciones del hígado y riñón (Fang *et al.*, 2013; Sato *et al.*, 2016), así como en la agregación de proteínas β -amiloide o α -sinucleína, en enfermedades neurológicas como Alzheimer y Parkinson, respectivamente (Rajendram *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2014; Gui *et al.*, 2015); así como mediadores de los diversos procesos de respuesta inflamatoria e inmunológica (Li *et al.*, 2018), los hacen, una importante herramienta y estrategia metodológica para el estudio y desarrollo terapéutico en años futuros (Saeedi *et al.*, 2019).

En la actualidad, diversos grupos de investigación han sumado esfuerzos para el entendimiento y caracterización de los procesos de liberación, transporte, absorción y variación del contenido de exosomas, y su posible impacto en procesos fisiológicos funcionalmente importantes en el SNC (Janas *et al.*, 2016; Pascual *et al.*, 2020; Ver Figura 6); particularmente, en la propagación de enfermedades neurodegenerativas, como agentes que promueven la protección frente a eventos tisulares severos en órganos o sistemas -como en infarto o isquemia cerebral-, en la regeneración de las vainas de mielina, o su participación en las sinapsis del SNC (Goetzl *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2019; Saeedi *et al.*, 2019); ello ha propiciado aún más el estudio de estas vesículas, logrando entender y demostrar -en parte- que los exosomas, así como su contenido, tienen un papel fundamental en la regeneración nerviosa (Batiz *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2019), la función y plasticidad sináptica (Lachenal *et al.*, 2011; Bahrini *et al.*, 2015; Lafourcade *et al.*, 2016), en procesos de neurogénesis (Luarte *et al.*, 2017) y neuroinflamación (Dalvi *et al.*, 2017), en la respuesta inmunológica neuronal (Li *et al.*, 2018) y al parecer, con un impacto significativo en la regulación epigenética (Álvarez-Erviti *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012). Además, aunado a ello, la habilidad que tienen para cruzar la BHE fácilmente (Samanta *et al.*, 2017; Gómez-Molina *et al.*, 2018), sugiere que los exosomas provenientes del LCR y sangre, pueden ser reflejo de un proceso neuronal bidireccional que de manera continua y a través de la BHE, podría regular, censar y ejercer cierta influencia en la periferia o viceversa, ya sea bajo condiciones fisiológicas normales (Mustapic *et al.*, 2017;), o en diversos desórdenes patológicos (Goetzl *et al.*, 2016) como las enfermedades neuropsiquiátricas y en particular la depresión, aunque este proceso en particular sigue siendo desconocido con exactitud (Kaur *et al.*, 2014; Orozco-Romero *et al.*, 2016; Saeedi *et al.*, 2019).

Por lo tanto, la información, características e importancia biológica que se conoce de los exosomas hasta ahora en el SNC, hace de ellos, una “ventana directa” hacia la información bioquímica y fisiológica nerviosa, disponible incluso a nivel periférico en algunos líquidos corporales como la sangre, proporcionando información convincente sobre los procesos patológicos, y complementando -en parte- las teorías neurobiológicas de los trastornos mentales, todo ello gracias a su potencial utilidad como vesículas que

contienen candidatos a biomarcadores clínicamente accesibles en las diversas psicopatologías y salud mental de los pacientes.

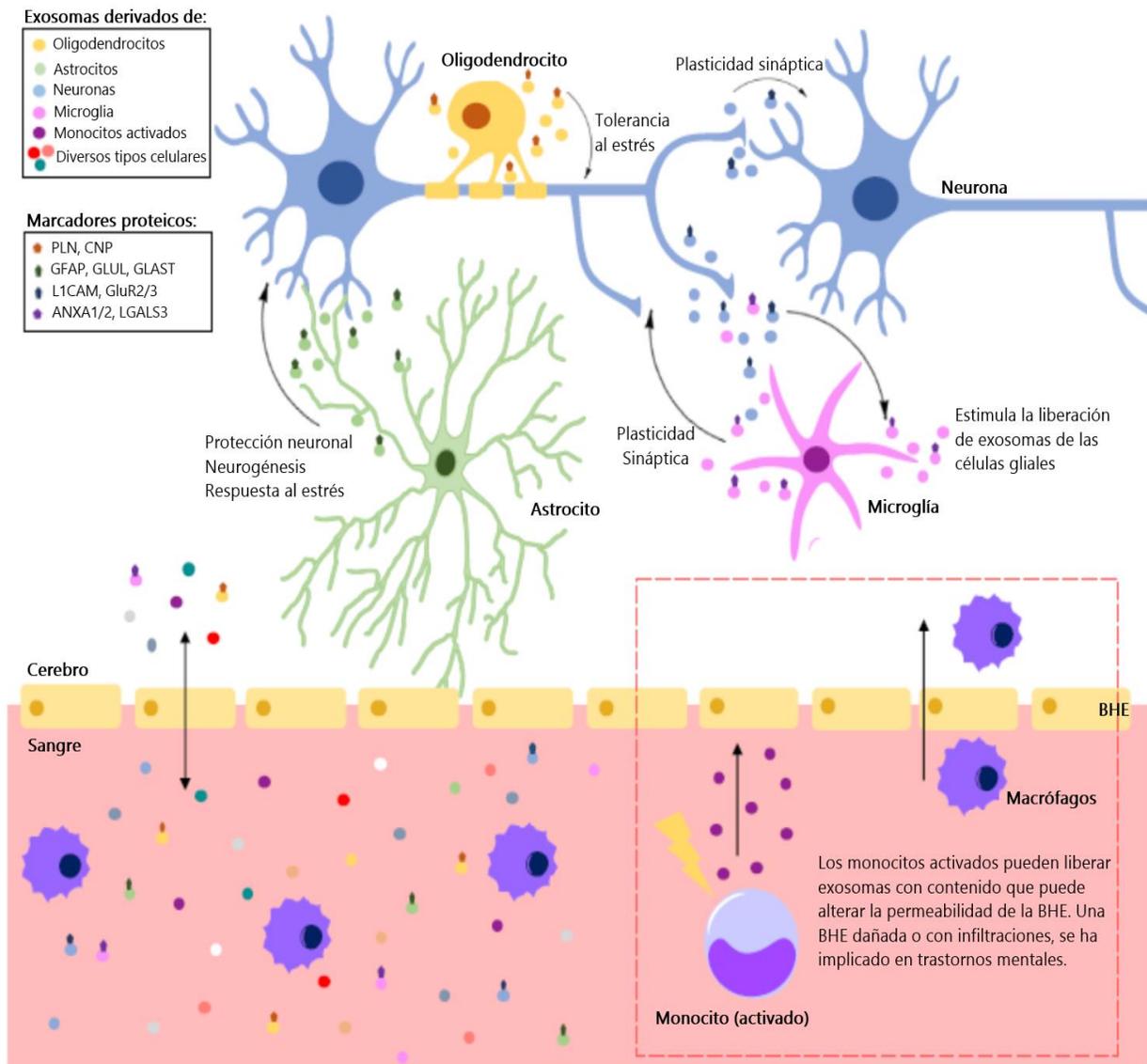


Figura 6. El papel de los exosomas en el SNC. La señalización vía exosomas está involucrada aparentemente en diversos procesos fisiológicos de las células del cerebro, algunos de ellos se han asociado con algunos trastornos y enfermedades mentales (esquizofrenia, trastorno bipolar, etc.). Por ejemplo, los monocitos activados de la periferia liberan exosomas que pueden influir en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) y facilitar la infiltración exacerbada de sustancias y células dañinas, de manera bidireccional. Se ha observado que una alteración en la permeabilidad de la BHE se asocia con procesos de neuroinflamación, y enfermedades neurodegenerativas o psiquiátricas como el TDM (aunque los mecanismos exosomales implicados, aún no son del todo claros). (Tomado y modificado de Saedi *et al.*, 2019).

2.4.3. Exosomas y trastornos depresivos

Una de las principales dificultades para el monitoreo, evaluación, y posible diagnóstico de enfermedades neuropsiquiátricas -como los trastornos depresivos-, se debe principalmente al limitado entendimiento de la relación entre los hallazgos o evidencia fisiopatológica en la periferia y los eventos que pueden tener lugar en el SNC (Samanta *et al.*, 2018; Pascual *et al.*, 2020). En ese sentido, las diferentes funciones asociadas a las VE y en particular a los exosomas dentro y fuera de las células, así como su descripción en la comunicación celular, los hacen la más importante y relevante estrategia para la investigación biomédica actual de diversas patologías en el SNC (Liu *et al.*, 2019; Saeedi *et al.*, 2019). Sin embargo, en el caso de los trastornos depresivos, existen aún muy pocos estudios que permitan entender la implicación de manera directa de estas vesículas, aunque, por la evidencia disponible y sus características biomoleculares es muy probable que guarden una relación estrecha con estos trastornos neuropsiquiátricos (Samanta *et al.*, 2018).

Aproximaciones recientes han reportado la gran importancia que tienen diversos tipos de miARN en los trastornos psiquiátricos, y en particular los depresivos (Narahari *et al.*, 2015). Los miARN, son ARN no-codificantes (de entre 18 a 24 nucleótidos) conocidos por ser reguladores importantes de hasta el 60% de la expresión génica postranscripcional en mamíferos, todo ello mediante mecanismos 'up-regulation' o 'down-regulation' en los procesos de traducción del ARN mensajero (ARNm) (Friedman *et al.*, 2009). Estas moléculas pueden ejercer sus efectos en una variedad de vías celulares y moleculares involucradas en diferentes procesos fisiológicos, lo que conduce a la idea de que una desregulación de estas moléculas podría estar relacionada con el inicio y la progresión de varias enfermedades (Miller & Wahlestedt, 2010; Tavakolizadeh *et al.*, 2017). Se ha demostrado, por ejemplo, que la desregulación de un gran número de miRNA tanto a nivel central como periférico, podría estar asociada con trastornos depresivos y que esta información podría emplearse como posible biomarcador de diagnóstico y tratamiento en pacientes con depresión en un futuro cercano (Ver Figura 7; Wang *et al.*, 2015; López *et al.*, 2017; Gruzdev *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020).

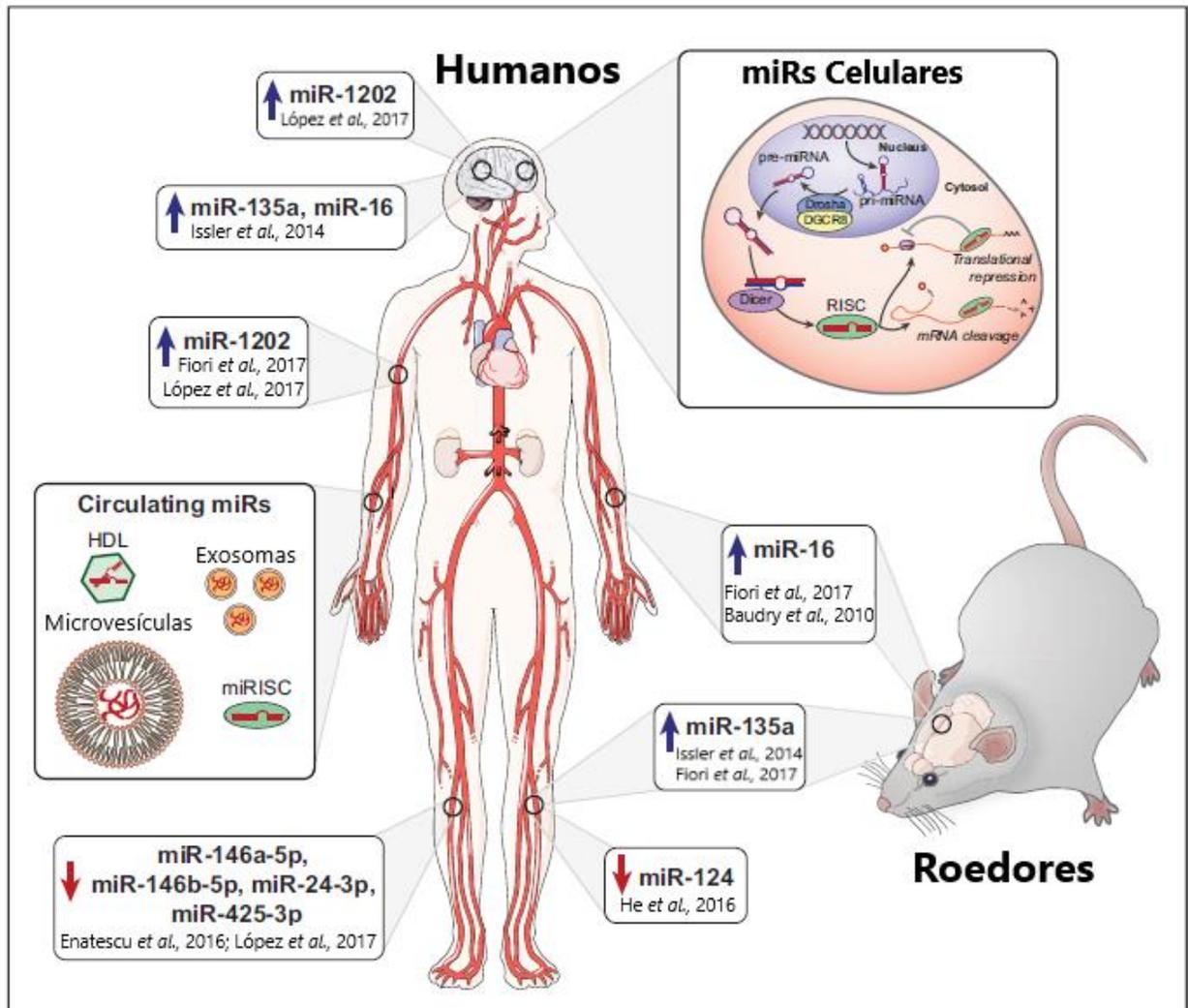


Figura 7. Evidencia de la participación de algunos miARN a nivel central y periférico en trastornos depresivos. Se han descrito una serie muy amplia de miARN identificados en tejidos centrales y periféricos tanto en humanos como en roedores, con una posible implicación en depresión. Diversos procesos transcripcionales dentro de las células (complejos silenciadores, *Drosha-DGCR8*, *Dicer*, etc.), regulan su expresión, escisión o represión traduccional. Los miARN son secretados por diversas poblaciones celulares a través de diferentes vías: lipoproteínas de alta densidad (HDL), exosomas, microvesículas o dentro de miRISC. Las flechas azul y roja denotan un aumento y disminución en la expresión de miRNA respectivamente (Tomado y modificado de López et al., 2017).

Sin embargo, la relevancia en el predominante transporte de información molecular a través de los exosomas (Cheng et al., 2014), es la que apoya aún más el impacto de diferentes factores moleculares -como proteínas, citocinas, factores solubles y miRNA- en la transcripción de señales en vías importantes para esta enfermedad a través de dos posibles mecanismos: 1) regulación negativa de la expresión génica, y 2) la interacción con receptores celulares como ligandos; un ejemplo de vía de señalización con altas

implicaciones e influencia en trastornos depresivos es la de BDNF-TrkB (Tavakolizadeh *et al.*, 2017; Gruzdev *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020).

Actualmente se han reportado algunas investigaciones relacionadas con la contribución directa de los exosomas en los trastornos depresivos; particularmente, el primero en abordar esta posibilidad fue el trabajo de Zhang y colaboradores (2018), quienes realizaron un estudio comparativo entre el perfil de miRNA contenido en exosomas aislados del suero sanguíneo de un solo paciente diagnosticado con depresión, sin tratamiento (Escala de Montgomery-Asberg, con 13 puntos, indicativo de depresión leve-moderada), y un voluntario sano como control; mediante la secuenciación de los miARN exosomales y un análisis predictivo ontogénico con apoyo de la base de datos *miRTarbase*, encontraron una diferencia clara entre la expresión de al menos 12 miARN regulados a la alta (*up-regulation*) y 20 miARN regulados a la baja (*down-regulation*) en el paciente deprimido, que al parecer están dirigidos a genes involucrados en el control de la depresión, como miARN mediadores de vías de señalización en la inflamación y función del sistema inmunológico (FASN, APP, GSK3 A/B, ICAM1, MAPK1 y TGFBR3). Sin embargo y a pesar de que los resultados indican una diferencia significativa en el contenido de miARN exosomal -con una aparente dependencia del estado fisiopatológico del suero sanguíneo proveniente del paciente deprimido vs el sano-, son las limitaciones en cuanto al número de participantes por grupo (n=1), y la comparación en una sola base de datos para el análisis predictivo (aunado al enfoque exclusivo en miARNs), los que hacen concluir a los autores sobre la necesidad de más estudios que exploren por completo el posible potencial diagnóstico del miARN de exosomas, el papel de los genes asociados y por ende la contribución de su contenido en la patología de los trastornos psiquiátricos y depresión (Zhang *et al.*, 2018).

Posteriormente, el grupo de Yakolev y colaboradores (2019), realizó un análisis piloto comparativo entre diferentes parámetros físicos y bioquímicos asociados a los exosomas presentes en suero sanguíneo humano (número, tamaño, dispersión de luz, cantidad de proteína, lípidos, etc.), para un total de 26 muestras, provenientes de dos grupos experimentales, uno conformado por 14 pacientes diagnosticados con TDM (de acuerdo con los criterios del ICD-10 y HAMD) y otro, como grupo control con 12 participantes

sanos. El análisis mostro un aumento significativo en la concentración de exosomas y del factor neuro-protector CNTF -factor neurotrófico ciliar-(*ExoTest*, *ELISA* $P=0.023$ y $P=0.02$, respectivamente), así como en la cantidad de proteína total ($P=0.034$) del suero sanguíneo de pacientes con TDM en comparación con el grupo control; por otro lado, en cuanto al análisis del tamaño de partícula (exosomas) y proporción proteína/lípidos, no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, y solo se observó una variación de tamaño de aproximadamente 100 nm para el análisis de dispersión dinámica de luz (*DLS*) y el análisis para *nanoparticle tracking*, pero sin diferencias entre los grupos. Todo esto les permitió proponer, que la concentración de exosomas en el suero sanguíneo, es dependiente -al menos de manera aparente- del estado depresivo, y en particular de la duración y gravedad del episodio depresivo, concluyendo que estos resultados son preliminares y requieren de un mayor análisis, con estudios más rigurosos y complementarios. Además, no consideran las posibles variaciones debidas al tratamiento farmacológico que pueden recibir los pacientes con TDM. Sin embargo, la importancia metodológica de este estudio radica en el enfoque e integración de diversos factores y parámetros demográficos (edad, sexo, IMC, etc.), clínicos (escalas, duración y severidad del episodio, etc.) y bioquímicos (química sanguínea, factores de crecimiento, citoquinas, etc.), que se pudieron correlacionar con los resultados y contribuir a la descripción, caracterización y análisis de los exosomas en el TDM, para su uso como una fuente de información diagnóstica y clínica en este padecimiento (Yakolev *et al.*, 2019).

En este sentido, el estudio más reciente que pone en discusión la participación directa de los exosomas en la generación y/o propagación de conductas tipo depresivas -al menos en un modelo murino-, es el realizado por Wei y colaboradores (2020), quienes a través de un primer análisis bioinformático predictivo, de caracterización y cuantificación de ARN exosomal (en particular de *miRNA-139-5p*), así como por la administración exógena de exosomas aislados de suero sanguíneo humano provenientes de 33 pacientes diagnosticados con TDM (sin tratamiento farmacológico previo), y de 46 voluntarios sanos como grupo control. Los autores observaron notablemente que los exosomas provenientes de pacientes con TDM generaron conductas tipo depresivas en roedores sanos, y, por el contrario, la administración de exosomas de participantes sanos en

roedores sometidos a un modelo de estrés crónico impredecible (ECI), revirtieron o atenuaron las conductas tipo depresivas, de acuerdo con el análisis de diferentes pruebas conductuales (campo abierto, nado forzado, suspensión de la cola y supresión de alimento). Los resultados de un análisis complementario para diversos factores de estrés oxidativo (capacidad antioxidante total, T-AOC; actividad de la glutatión peroxidasa, GSH-PX; niveles de malondialdehído, MDA), inmunohistoquímica (DCX, 5-BrdU, NeuN), proteómicos, inmunocitoquímica en cultivo celular (Sox-2, GFAP, MAP2, Nestina) y Western Blot, permitieron asociar aparentemente el efecto que tiene el aumento en los niveles de *miRNA-139-5p*, como mediador del comportamiento tipo depresivo inducido por el estrés en ratones. Además, los autores sugieren que dicho miRNA impacta de manera significativa en la neurogénesis, a través de una posible regulación negativa de la proliferación y diferenciación de células progenitoras y neurales en el hipocampo (Wei *et al.*, 2020) (Ver Figura 8).

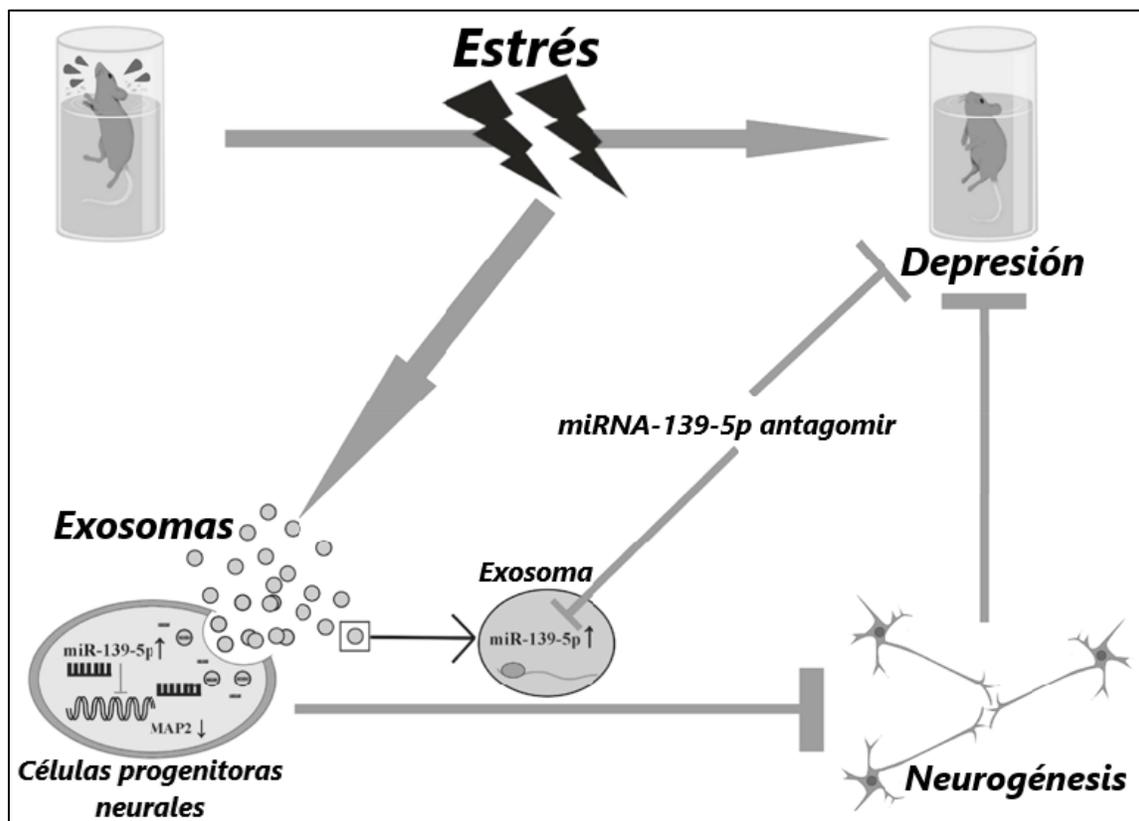


Figura 8. Mecanismos propuestos sobre el papel crítico del miRNA-139-5p de exosomas en conductas tipo depresivas mediadas por estrés. El estrés crónico puede afectar significativamente la regulación normal de miRNAs en células neuronales y los exosomas que liberan, estos a su vez pueden impactar tanto a nivel central, como periférico y producir cambios en la neurogénesis y en conductas tipo depresivas, todo ello, a través de una posible regulación negativa de la proliferación y diferenciación celular en el hipocampo. (Tomado y modificado de Wei *et al.*, 2020, figura 5, inciso E).

Una de las principales limitaciones admitidas por los autores, es la posibilidad de no poder excluir que los exosomas o su contenido administrado, se dirijan a moléculas presentes en la sangre periférica y que regulen indirectamente la expresión génica en el SNC, para luego modular la conducta tipo depresiva en los ratones, pues la administración de exosomas provenientes de pacientes sanos -aparentemente- disminuyó los parámetros de estrés oxidativo en los ratones sometidos a un modelo de ECI. Además, los autores dejan de lado la variabilidad de la fuente de exosomas derivado de algunos parámetros demográficos y clínicos omitidos (principalmente: sexo, edad, condición, etc.), así como la posibilidad de que otro tipo de contenido presente en los exosomas, como proteínas, citocinas, quimiocinas o diversos factores solubles, puedan contribuir en los efectos conductuales observados. Sin embargo, los hallazgos de este grupo de investigación son muy importantes y significativos para el estudio de las vesículas extracelulares en los trastornos neuropsiquiátricos, pues han demostrado en parte, que los exosomas periféricos pueden tener un contenido diferencial asociado a respuestas y cambios sistémicos, que, -como proponemos- pueden ser estudiados para determinar la fisiopatología en la neurobiología de los trastornos depresivos.

3. JUSTIFICACION

La depresión es un trastorno psiquiátrico con una alta incidencia entre la población en general. En la actualidad aún no se conoce totalmente los mecanismos neurobiológicos implicados en el origen, desarrollo y propagación de la depresión, siendo necesarios el análisis y estudio de dicho trastorno, desde nuevas perspectivas. Recientemente, algunos estudios sugieren que las manifestaciones del estado de ánimo en los trastornos depresivos podrían entenderse como una expresión intrínseca de un síndrome multisistémico que influye tanto en el SNC como en la periferia, a través de posibles vías comunes. En ese sentido, los exosomas -vesículas de tamaño nanométrico-, apuntan a ser una herramienta importante en los avances en la elucidación de los mecanismos de señalización y comunicación intercelular que subyacen a la depresión a nivel de SNC, siendo parte importante del desarrollo y propagación de esta y otras enfermedades, tal y como ha sido propuesto para enfermedades como cáncer, EA y EP. Sin embargo, la información existente en la literatura científica actual sobre la incorporación de los exosomas como un mecanismo neurobiológico adicional en el desarrollo del trastorno depresivo mayor (TDM) y la posible relevancia de la información obtenida del análisis de sus características biomoleculares, es muy escasa. De tal modo que resulta importante establecer las diferencias en el contenido proteico de exosomas entre sujetos diagnosticados con TDM, comparados con aquellos diagnosticados con TDM y bajo tratamiento con fármacos antidepresivos, y con sujeto sanos, como un parámetro importante en el monitoreo clínico y terapéutico de esta enfermedad. Hipótesis que el presente estudio abordó.

4. HIPOTESIS

Por sus características biomoleculares, los exosomas de suero sanguíneo provenientes de pacientes diagnosticados con TDM, mostrarán un contenido proteico diferente a los exosomas de pacientes con diagnóstico de TDM que hayan recibido tratamiento farmacológico antidepresivo y a los sujetos sanos.

5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar y analizar las diferencias del contenido de proteínas de los exosomas provenientes del suero sanguíneo en pacientes diagnosticados con TDM, TDM más tratamiento farmacológico antidepresivo y de sujetos sanos.

5.1. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar exosomas provenientes del suero sanguíneo de pacientes diagnosticados con TDM, pacientes bajo tratamiento farmacológico antidepresivo y sujetos control (sanos).
2. Caracterizar los exosomas obtenidos bajo las diferentes condiciones de los pacientes, de acuerdo con la expresión de marcadores transmembranales de superficie como CD63, mediante la técnica de WB.
3. Determinar el contenido de algunas citocinas, quimiocinas y factores solubles usando matrices de microarreglos para proteínas.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Descripción del estudio

El presente proyecto de tesis de maestría es un estudio transversal y descriptivo, que deriva del estudio original titulado: “*Evaluación de factores relacionados a la respuesta al tratamiento antidepressivo*”, idea original de la doctora Mónica Flores Ramos, investigadora principal, y cuenta con la aprobación del Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”, INPRFM (CEI-010-20170316).

6.1.1. Descripción de la población

Los participantes del estudio fueron mujeres mayores de edad (de 19 a 43 años), reclutadas previo consentimiento informado en el área clínica del INPRFM, y que acudieron a los servicios de preconsulta, atención psiquiátrica continua o servicio de hospital, cumpliendo, además, los criterios de inclusión, exclusión y eliminación descritos para este estudio (Ver Tabla 2.).

Tabla 2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación de los participantes

<i>Criterios de Inclusión</i>	<i>Criterios de Exclusión</i>	<i>Criterios de Eliminación</i>
-Mujeres de 18 a 45 años	-Síntomas psicóticos al momento de la evaluación	-No acudir a cita final
-Diagnóstico de Trastorno Depresivo Mayor	-Antecedente de episodios maníacos e hipomaniacos	-No llenen adecuadamente los cuestionarios de evaluación
-Puntuación en escala de Hamilton-17 de depresión mayor a 13	-Reporte de uso de sustancias adictivas moderado-severo de acuerdo con criterios de DSM-V	-Suspender el fármaco antidepressivo por cualquier motivo
-Aceptar participar mediante consentimiento informado	-Depresión secundaria a causa médica	-Iniciar con otro tratamiento adicional al otorgado por su médico tratante
	-Tabaquismo	-Pacientes que no deseen continuar en el estudio
	-Reporte de padecimiento de infecciones al momento de la evaluación	
	-Uso de suplementos hormonales	

6.1.2. Descripción de los grupos experimentales

El presente proyecto de investigación se diseñó con tres grupos experimentales: 1) *Grupo Control*, que fueron sujetos sanos (*CTRL*); 2) *Grupo Sujetos Deprimidos (TDM)*, fueron sujetos diagnosticados con trastorno de Depresión Mayor; y 3) *Grupo Sujetos Deprimidos*

más Tratamiento Farmacológico (TDM + TX), sujetos que además de ser diagnosticados con TDM contaron con tratamiento farmacológico antidepresivo acorde (combinación de fármacos ISRS y moduladores del estado de ánimo: fluoxetina, escitalopram, citalopram, así como, clonazepam, topiramato, amisulpiride y quetiapina; Ver Tabla 5, ANEXO II).

De la muestra poblacional original de sujetos femeninos, sólo se seleccionaron cinco integrantes para cada grupo experimental, de acuerdo con los criterios antes descritos y, además, fueron pareados entre ellos por los factores: edad (de 19 a 43 años; edad reproductiva fértil), tratamiento farmacológico (a base de ISRS) y fase de ciclo menstrual (folicular temprana, lútea), siendo un complemento importante y necesario para la correcta interpretación del análisis que correlaciona los posibles cambios en los exosomas debido a la patología de TDM.

6.2. Obtención, manejo y procesamiento de muestras biológicas

Las muestras biológicas de suero sanguíneo de los sujetos para cada uno de los grupos experimentales fueron obtenidas mediante venopunción en el Laboratorio Clínico del INPRFM a conveniencia de los pacientes (generalmente se obtuvieron a primeras horas de la mañana, con un ayuno y horario de sueño, mínimo de 6 horas). La técnica de venopunción consistió en limpiar previamente el sitio de punción con antiséptico y luego se colocó una banda elástica o un brazalete de presión alrededor del antebrazo con el fin de ejercer presión y restringir el flujo sanguíneo a través de la vena, lo cual permite que las venas bajo la banda se dilaten, y facilitó que la aguja alcanzara alguno de los vasos sanguíneos del antebrazo (basílica, cefálica o mediana). Inmediatamente después, se introdujo una aguja en la vena, se retiró la banda para restablecer la circulación, y posteriormente se recolectó la sangre mediante los tubos para muestra del sistema Vacutainer™. Una vez que se recolectó la sangre, se retiró la aguja y se cubrió el sitio de punción para detener cualquier sangrado.

Para la obtención del suero sanguíneo, se procedió a someter las muestras colectadas de sangre venosa a un tratamiento de centrifugación para precipitar y separar mecánicamente los elementos formes sanguíneos (Figura 9). El tratamiento consistió en dos series de centrifugación a 6,000 RPM por 30 minutos y a una temperatura de 21°C. Una vez obtenido el plasma, se recolectó y se almacenó en tubos limpios para posterior

análisis. Posterior a la obtención del suero sanguíneo, se realizaron algunas determinaciones bioquímicas como parte del protocolo original, entre ellas: biometría hemática, perfil de lípidos, perfil tiroideo, urea, creatinina, ácido úrico y perfil hormonal ginecológico.

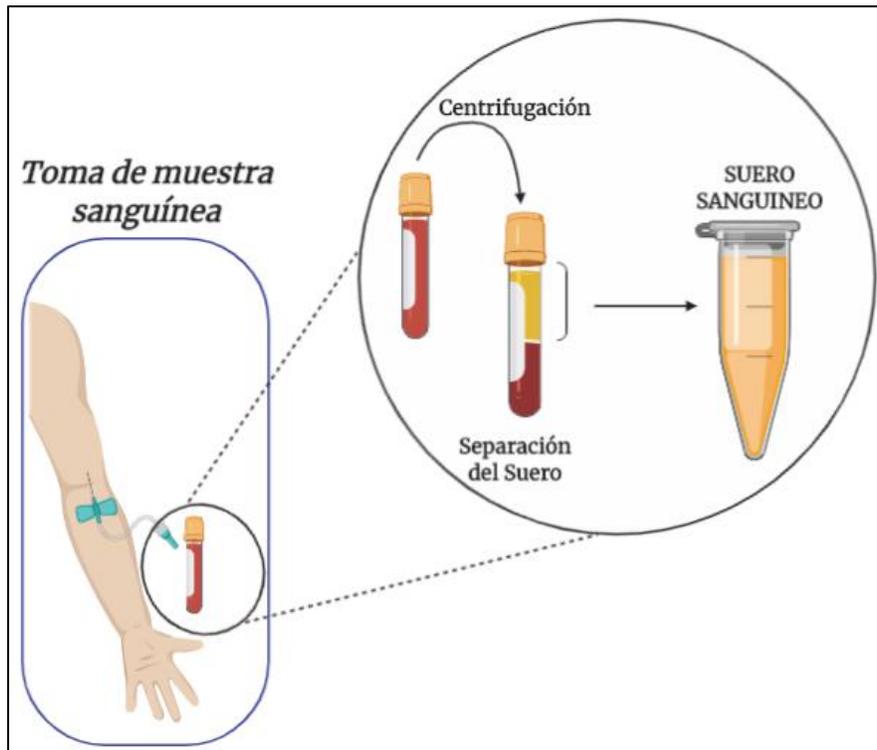
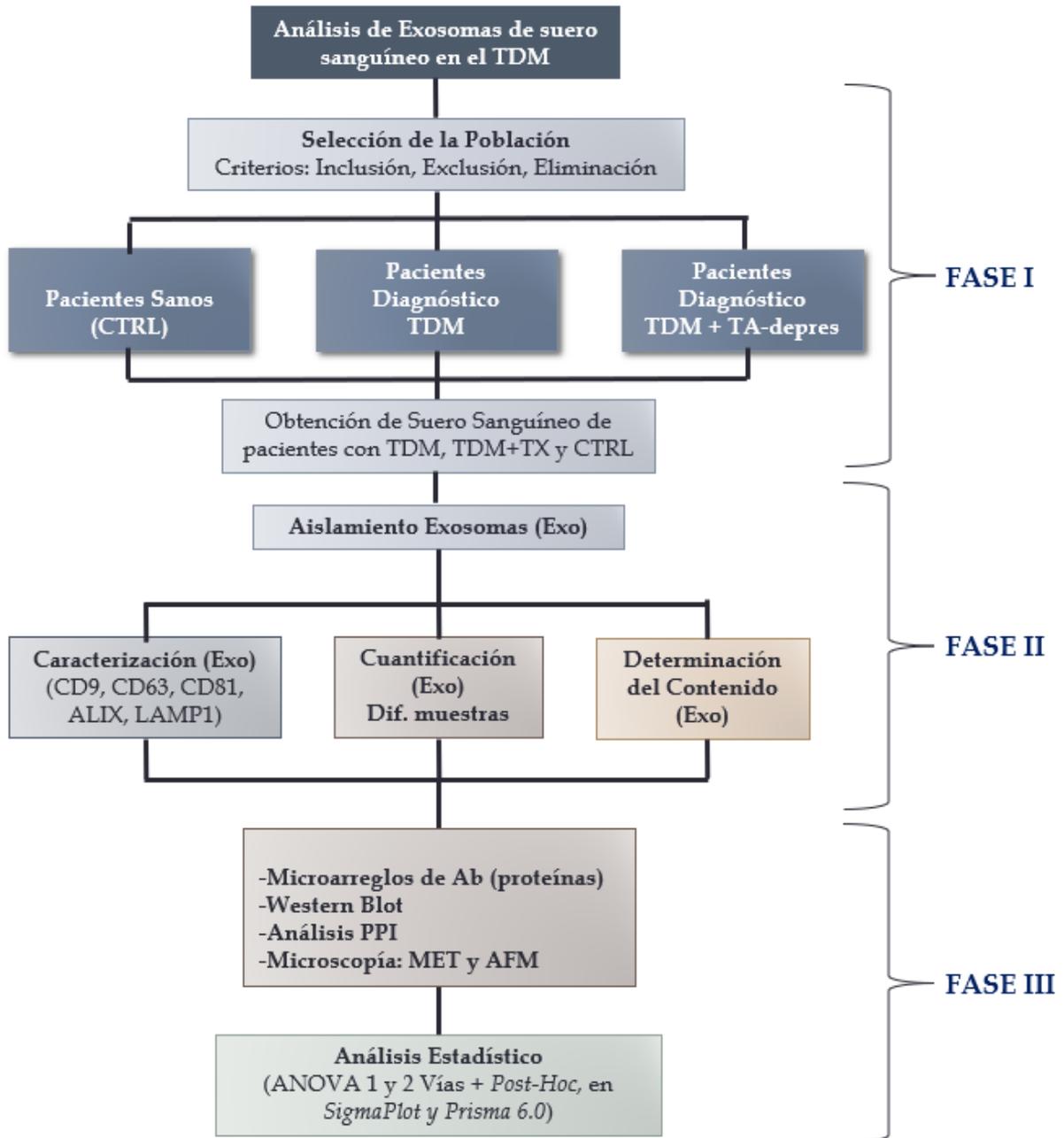


Figura 9. Esquema de la toma de muestra y obtención de suero sanguíneo de los pacientes participantes para cada grupo experimental.

El manejo de las muestras en todo momento, desde su obtención hasta el uso en las posteriores determinaciones realizadas en el Laboratorio de Neurogénesis, de la Subdirección de Investigaciones Clínicas del INPRFM, se realizaron con estricto apego a las directrices de Control de Calidad del Laboratorio Clínico del INPRFM, las descritas en la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 sobre la "Protección ambiental, salud ambiental, residuos peligrosos biológico-infecciosos (RPBI)", así como a la NOM-166-SSA1-1997, "Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos".

Las muestras de suero sanguíneo colectadas se almacenaron en congelación en equipo REVCO a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que fueron requeridas para las siguientes determinaciones experimentales.

6.3. Diagrama General del Estudio



6.4. Aislamiento de exosomas de suero sanguíneo humano

El aislamiento de exosomas de suero sanguíneo se realizó mediante el uso del reactivo Total Exosome Isolation (from serum) by Life Technologies™ de ThermoFisher Scientific™ (No. Catálogo 4478360), siguiendo estrictamente las instrucciones del proveedor, previamente estandarizadas dentro del Laboratorio de Neurogénesis del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”.

Acondicionamiento de la muestra. Cada una de las muestras se retiró de congelación y se colocó en baño de hielo hasta alcanzar la temperatura ambiente y/o recuperara su estado líquido. Posterior a ello se tomó un volumen de 600 µL de la muestra, se colocaron en un tubo Eppendorf™ de 1.5 mL y se procedió a realizar una primera centrifugación en equipo Smart R17 (Hanil Science Industrial™) a 2000 x g por 30 minutos a 8 °C, todo ello con la finalidad de remover y retirar cualquier desecho celular y/o cuerpos formes aún contenidos en el plasma. Realizada esta centrifugación, se transfirió el sobrenadante cuidadosamente en un tubo Eppendorf™ nuevo para realizar el siguiente paso en la metodología estandarizada para el aislamiento de exosomas. La muestra debe mantenerse en baño de hielo de manera constante a lo largo la determinación.

Aislamiento de Exosomas. (ver Figura 10) A cada volumen de sobrenadante usado (600 µL) para cada una de las muestras se le adicionó el reactivo Total Exosome Isolation (from serum) de acuerdo con la metodología estandarizada (20 µL de reactivo por cada 100 µL de sobrenadante muestra) y se mezcló por 1 minuto en equipo Vortex Mixer™ (Labnet International Inc.) hasta observar una solución homogénea; posterior a ello, la solución “muestra + reactivo” se dejó incubar en baño de hielo por 30 minutos. Después de la incubación con el reactivo, la muestra se centrifugó por segunda ocasión en equipo Smart R17 (Hanil Science Industrial™) a 10,000 x g por 10 minutos a 8 °C, generando así la correspondiente precipitación de la pastilla. Una vez formada la pastilla de exosomas en el fondo del tubo, se retiró el sobrenadante formado -teniendo sumo cuidado de no disgregar la pastilla-, y se almacenó en un tubo nuevo y fue preservado para futuras determinaciones; la pastilla de exosomas libre de sobrenadante, se resuspendió en 300 µL de solución RIPA de lisado (50 µL de RIPA, por cada 100 µL de muestra) y se sometió a tres series de 30 segundos en equipo VibraCell™ SONICS para

asegurar así el completo lisado de las membranas de los exosomas, accediendo de esta manera a su contenido.

El contenido de los exosomas (lisados) y los exosomas resuspendidos (en TBS, o buffer similar), pueden almacenarse en congelación entre -20 a -80 °C para su uso en determinaciones posteriores.

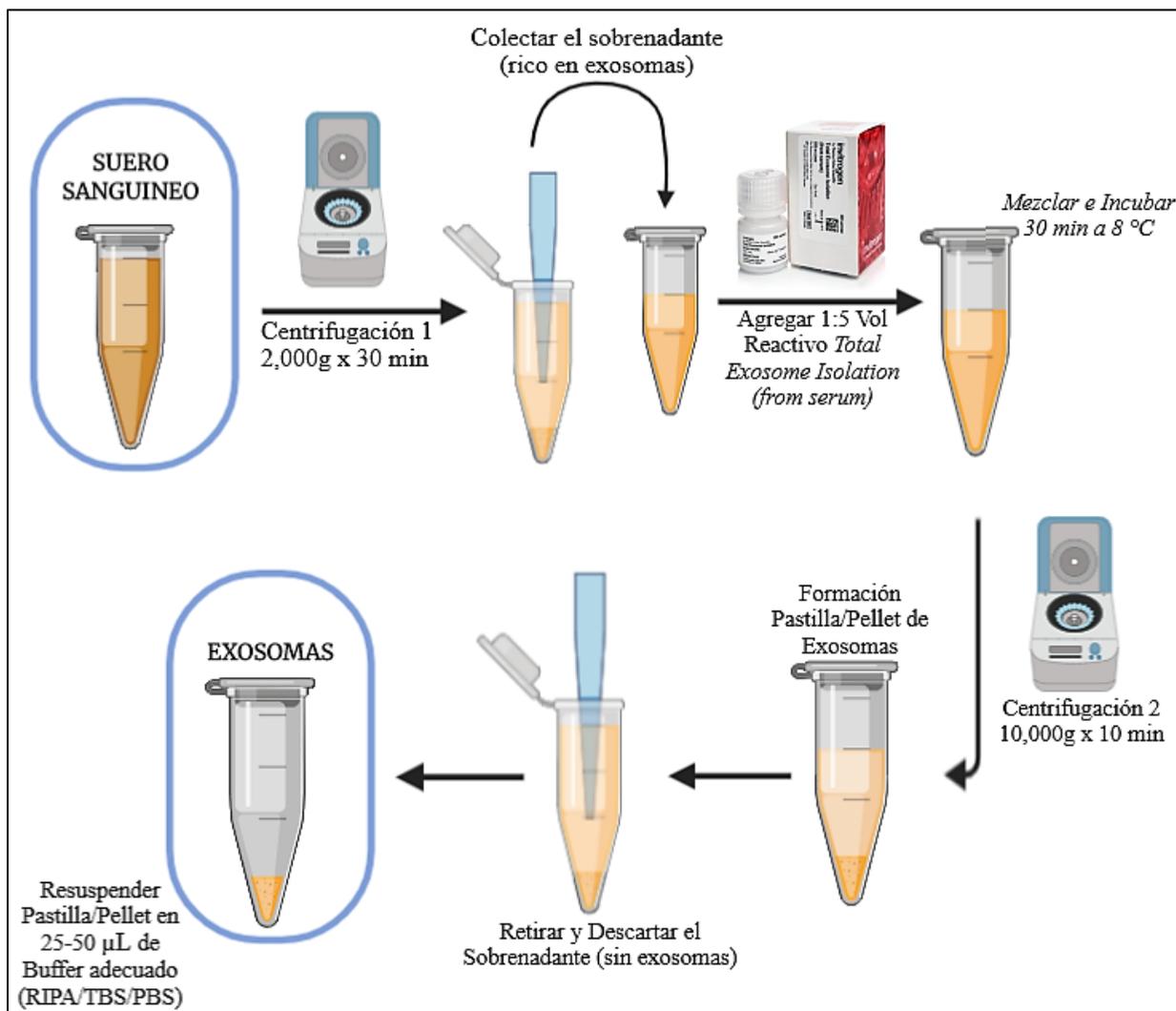


Figura 10. Esquema de la técnica estandarizada para el acondicionamiento de la muestra de suero sanguíneo y aislamiento de exosomas.

6.5. Determinación del contenido de proteína total en exosomas

La determinación del contenido total de proteína de exosomas se realizó para cada una de las muestras de exosomas aislados mediante la técnica de Bradford, la cual se basa en una reacción colorimétrica específica del colorante Azul de Coomassie brillante G250 (CBBG250) con los residuos de los aminoácidos Arg, Trp, Tyr, His y Phe, de las proteínas bajo análisis (Bradford, 1976; Noble & Bailey, 2009). El CBBG250 unido a los residuos de las proteínas produce una absorbancia máxima a partir de 595 nm y mediante la construcción de la gráfica para la curva de calibración estándar y el correspondiente cálculo de regresión lineal en la correlación Absorbancia-Concentración de la curva, podemos determinar la ecuación de la recta que describe mejor la linealidad de la curva y estimar así la concentración de proteína para cada muestra (Kruger, 2009).

Procedimiento Micro Bradford. (Ver Figura 11) Para la determinación empleando el Método de Bradford a microescala, se realizó el siguiente procedimiento:

1) Previamente se preparó la Solución Estándar de Albúmina Sérica Bovina (BSA, Sigma Aldrich™); en un tubo Eppendorf™ de 2.0 mL. Se peso 1 mg de BSA y se añadió el correspondiente volumen de agua desionizada para mantener la concentración de 1 mg/mL y se disolvió usando un Vortex Mixer™ (Labnet International Inc.).

2) Se preparó el Reactivo de Bradford (BioRad) en tubo Falcon® de 15 mL, diluyendo la solución “stock” del mismo con agua desionizada o MilliQ en una relación 1:5 (ejemplo: 1 mL de reactivo de Bradford + 4 mL de Agua desionizada). En algunas determinaciones puede usarse una relación mayor (1:3.5), dependiendo de la cantidad de proteína en las muestras.

3) En una placa de 96 micro pozos se construyó por duplicado la correspondiente Curva Estándar de Proteína (concentración conocida): se colocaron 100 µL de agua desionizada en cada pozo, en el último de ellos se llevó a un volumen de 180 µL; posterior a ello se adicionó a este último pozo 20 µL de la Solución de Albúmina previamente preparada, obteniéndose un volumen final de 200 µL. A partir de este pozo “stock” (20 µg albúmina/200 µL agua desionizada), se tomaron 100 µL y se adicionaron al micro pozo siguiente, mezclando con micropipeta de 200 µL (Proline® Plus pipette, SARTORIUS™),

de esta forma se realizaron las diluciones seriadas en los micro pozos restantes. Se obtuvo así una curva estándar de concentración conocida (10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625, 0.078125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); para los micro pozos que contuvieron las muestras, se agregó 99 μL de agua desionizada al correspondiente número de micro pozos y solo se agregó 1 μL de cada una de las muestras (rotulado e identificado perfectamente cada micro pozo-muestra), y por último, se colocó por duplicado los micro pozos correspondientes para el Blanco de Reactivo de Bradford (100 μL de agua desionizada).

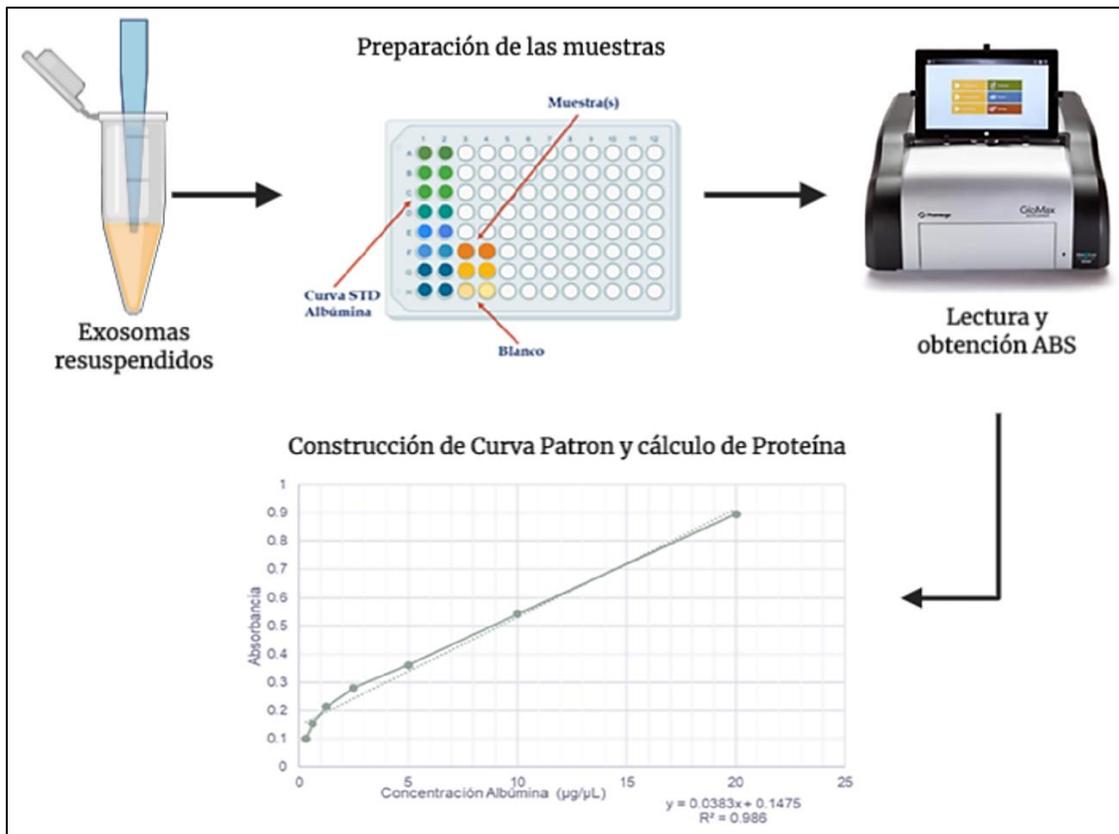


Figura 11. Esquema de la técnica de micro Bradford. Se construye una Curva Estándar de concentración conocida (Albúmina) + muestras bajo determinación; Lectura y obtención de ABS en equipo GloMax Discover™ PROMEGA®, a $\lambda=600$ nm; Construcción de gráfica de la curva y cálculo de la correlación lineal, ecuación de la recta.

4) Finalmente se adicionó un volumen de 100 μL de la Solución de Reactivo de Bradford (1:5) a cada uno de los micro pozos (curva estándar, muestras, blanco), se dejó reposar por cinco minutos e inmediatamente después se realizó la lectura en equipo GloMax Discover™ PROMEGA®, a $\lambda=600$ nm (Ver Figura 11).

Con las Absorbancias obtenidas de la curva y las concentraciones conocidas, se construyó la correspondiente gráfica de calibración estándar en Software EXCEL (Microsoft Inc.™) y SigmaPlot® (la ABS promedio del Blanco se restó de todas las absorbancias: curva y muestras); de la gráfica construida, se calculó su correspondiente Coeficiente de Correlación Lineal (r^2), el cual se debe considerar por lo menos mayor o igual a 0.95 y con la ayuda de los software se determinó la ecuación de la recta de la forma: $y = mx + b$, el valor de la pendiente m y b (Ver Figura 11). Al despejar de la ecuación de la recta x , y sustituyendo los valores de y (valor de ABS de las muestras), m (pendiente de la recta), y b (valor de la ordenada al origen), se puede determinar la concentración de proteína en microgramos (μg), por microlitro (μL) de muestra.

6.6. Caracterización de exosomas por electroforesis en gel y western blot (WB)

La caracterización de los exosomas provenientes de suero sanguíneo de pacientes diagnosticados con TDM, TDM más tratamiento farmacológico y sujetos sanos, se realizó mediante las técnicas de Electroforesis en Gel, transferencia en membrana de celulosa y Western Blot para CD63, proteína de membrana característica de exosomas.

Procedimiento Electroforesis en gel. (Ver Figura 12, inciso A) Una vez determinado el contenido de proteínas para cada muestra, se realizaron los cálculos necesarios para llevar a cabo la corrida de proteínas en gel. De manera general, la electroforesis permite separar las proteínas gracias a sus características de masa y carga, cuando éstas son sometidas a una corriente eléctrica de intensidad y tiempo determinados (Towbin *et al.*, 1979). La metodología comprende cuatro pasos:

- 1) Cálculo de proteína para cargar. Se calculó dividiendo los μg de proteína que se van a cargar en cada pozo del gel Mini-PROTEAN® TGX Precast Gels 10% (entre 20 y 30 μg de proteína), entre los μg de proteína presentes en un μL de cada una de las muestras. El resultado obtenido fue el volumen de muestra que se cargó en cada pozo.
- 2) Cálculo de Solución Laemmli- β -Mercaptoetanol que se agregó a la proteína de la muestra. Previamente se preparó la solución Laemmli- β -Mercaptoetanol, tomando los volúmenes correspondientes de estos dos reactivos dependiendo de la dilución que se

requiera (4X o 1X, para nuestras condiciones). Posteriormente el cálculo de la solución se realizó dividiendo el volumen de muestra que debe cargarse en cada pozo (resultado paso 1), entre el factor de la dilución usada de la Solución de Laemmli- β -Mercaptoetanol (4 o 1), el resultado obtenido de cada muestra se adicionó al volumen correspondiente para cargar en cada pozo.

3) Ebullición de las Muestra + Laemmli- β -Mercaptoetanol y volumen que agregar a cada pozo en el gel. Después de agregar la solución de Laemmli- β -Mercaptoetanol, las muestras se sometieron a baño de agua en ebullición por cinco minutos, todo ello con la finalidad de desnaturalizar las proteínas. Inmediatamente después las muestras se cargaron con una micropipeta en cada pozo (volumen de muestra + volumen de solución desnaturalizante = volumen de carga en pozo), identificando un pozo para el Marcador de Peso Molecular (Prestained SDT Standards, Low Range BIO-RAD) y los pozos de las muestras.

4) Corrida en equipo para electroforesis. El sistema para electroforesis comprende la placa de gel montado en la cámara para electroforesis, la cual se sumergió en el tanque del sistema lleno del correspondiente buffer de corrida, cuando este sistema estuvo completamente montado se procedió a cargar las muestras en cada pozo. Una vez que las muestras fueron cargadas, se cerró el sistema verificando que se encontrará en el lado correcto del cátodo/ánodo y posteriormente se conectó a la fuente de poder para comenzar con el tratamiento de corriente e intensidad adecuados en equipo PowerPac® HC BIO-RAD, dichas condiciones se configuraron previamente para la correcta separación de las muestras (Ver Figura 12, inciso A).

Transferencia en membrana. Terminado el protocolo de corrida se retiró el gel con las muestras de la cámara de electroforesis con precaución de no maltratarlo, el gel se colocó en un recipiente con buffer de transferencia (Trans-Blot® Turbo™ 5X Transfer Buffer BIO-RAD) preparado previamente, en el mismo recipiente se colocaron dos paquetes de filtros (Trans-Blot® Turbo™ Mini-size Transfer Stacks BIO-RAD) previamente impregnados del mismo buffer; sobre uno de estos paquetes de filtros húmedos se colocó la membrana de celulosa (Trans-Blot® Turbo™ Mini-size Nitrocellulose BIO-RAD) y sobre ella se colocó el gel, sobre este se colocó el segundo paquete de filtros, el gel, empaquetado a

manera de “sándwich” entre los paquetes de filtros y la membrana de celulosa, se llevó a la charola del equipo Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, y se seleccionó el Protocolo Estándar Medio, predeterminado en el equipo (Ver Figura 12, inciso B). Posterior al protocolo, se corroboró que las proteínas se transfirieron adecuadamente con ayuda de Solución de Rojo de Ponceau, en una transferencia correcta, se puede observar las bandas de proteínas coloreadas de color rojo/rosa en la membrana.

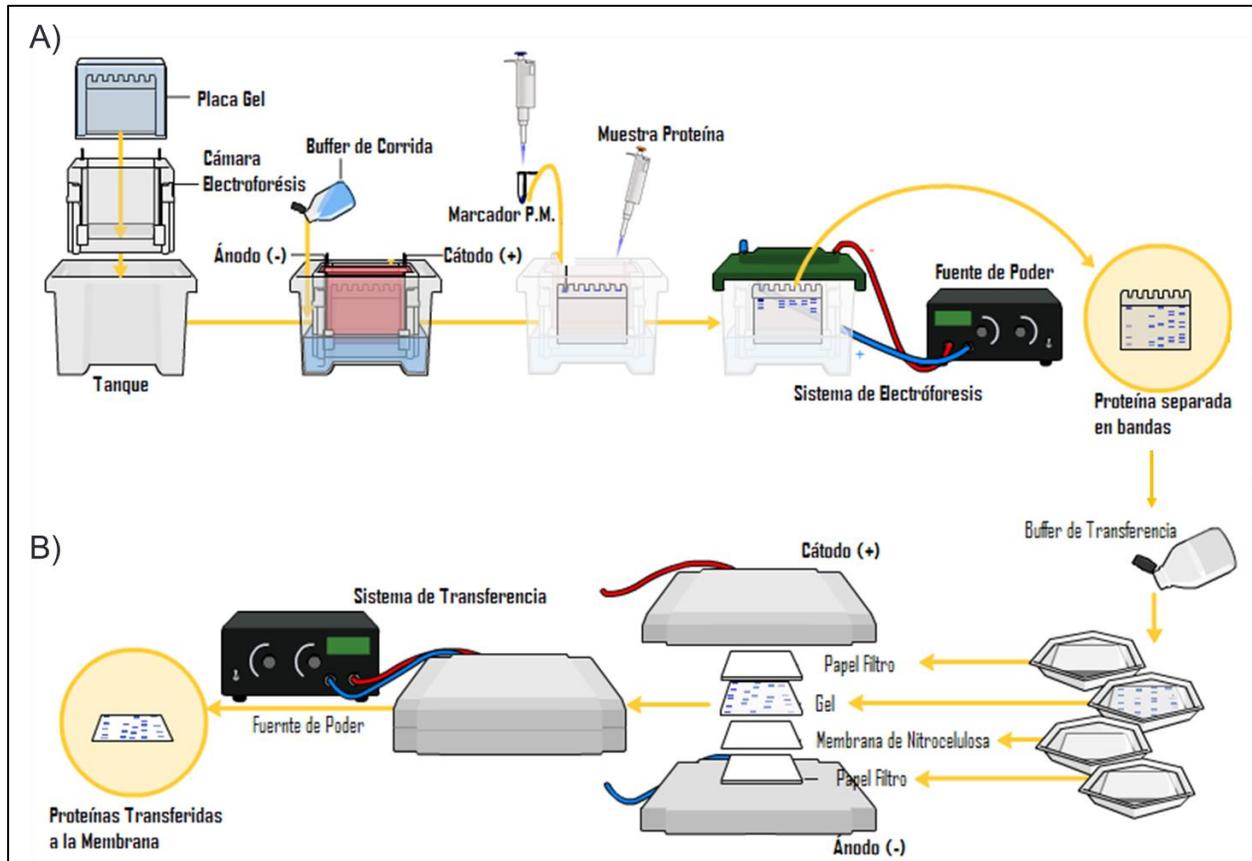


Figura 12. Esquema de la técnica de WB. A) Electroforesis en Gel, y B) Transferencia a membrana de celulosa.

Protocolo para Western Blot (WB). Después de corroborar la transferencia en la membrana con la Solución de Rojo de Ponceau, se realizó una serie de lavados de diez minutos cada uno a temperatura ambiente y en agitación constante, con Solución TBS-Tween 20 al 0.05% hasta retirar por completo la coloración roja/rosada.

Bloqueo de membrana. Posterior a ello, la membrana se colocó en baño con solución de bloqueo (leche descremada al 3%) por treinta minutos a temperatura ambiente y en agitación constante, todo ello para bloquear la unión inespecífica del Ab-Primario.

Incubación Ab-Primario. Después del bloqueo inespecífico, se incubaron las membranas con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo, las diluciones pueden variar dependiendo del anticuerpo (1:500, 1:1000, 1:1500, 1:2000, etc.); las membranas se incubaron de 48 a 72 horas en agitación constante a 4 °C. Se emplearon los Ab para la proteína transmembranal: CD63.

Incubación Ab-Secundario HRP. Después de la incubación de las membranas con Ab-primario, se realizaron 3 series de lavados por diez minutos a temperatura ambiente con solución TBS-Tween 20 al 0.05%. Una vez retirado cualquier residuo del Ab-primario, se incubaron las membranas con el Ab-secundario diluido en solución TBS-Tween 20 al 0.05% de 30 a 60 minutos a temperatura ambiente y con agitación constante; las diluciones pueden variar dependiendo del anticuerpo. Después de la incubación con el Ab-secundario, se lavaron nuevamente tres veces (10 minutos en agitación constante, a temperatura ambiente) con solución TBS-Tween 20 al 0.05%.

Revelado de Membranas con HRP Quimioluminiscente. Las membranas lavadas, se colocaron en incubación con Solución de Sustrato HRP (Immobilon™ Western, Chemiluminescent HRP Substrate) usando volúmenes iguales de las soluciones del Kit, durante 5 a 10 minutos en agitación constante, y a temperatura ambiente.

Lectura y detección por Quimioluminiscencia. Después de ser incubadas en solución de sustrato HRP, las membranas se colocaron entre dos placas de acetato plástico limpio, procurando retirar el exceso de sustrato, así como cualquier burbuja. Posterior a ello se montaron en configuración de “sándwich” los acetatos y la membrana en la charola de equipo ChemiDoc™ Touch Imaging System de BIO-RAD, y se detectaron por quimioluminiscencia (Aplicación: Quimioluminiscencia, Blots) bajo diferentes tiempos de exposición. Las imágenes se identificaron y almacenaron para su posterior análisis.

6.7. Análisis del contenido de proteínas de suero sanguíneo por matriz de microarreglos

El análisis del contenido proteico de citoquinas provenientes de exosomas se realizó mediante microarreglos para proteínas: RayBio® C-Series, Human Cytokine Antibody Array C1000 (AAH-CYT-1000-4). Este es un método semicuantitativo para la detección de 120 proteínas humanas presentes en suero y plasma sanguíneo, medio de cultivo celular, y otros tipos de muestras líquidas (Ver Figura 13 y 14). El estuche comercial de microarreglos se conforma un soporte sólido (membranas C6 y C7) al cual están fijados una serie de anticuerpos (Ab) específicos para diversas proteínas de suero humano, donde se incuban las diferentes muestras y mediante la unión específica con anticuerpos biotinilados, así como marcados con solución concentrada de peroxidasa de rábano (HRP)-estreptavidina 1000X, se produce una detección de las proteínas presentes y/o ausentes en la muestra bajo análisis, y gracias a la saturación de las señales, se hace una estimación de la proporción/concentración de estas proteínas por densitometría óptica.

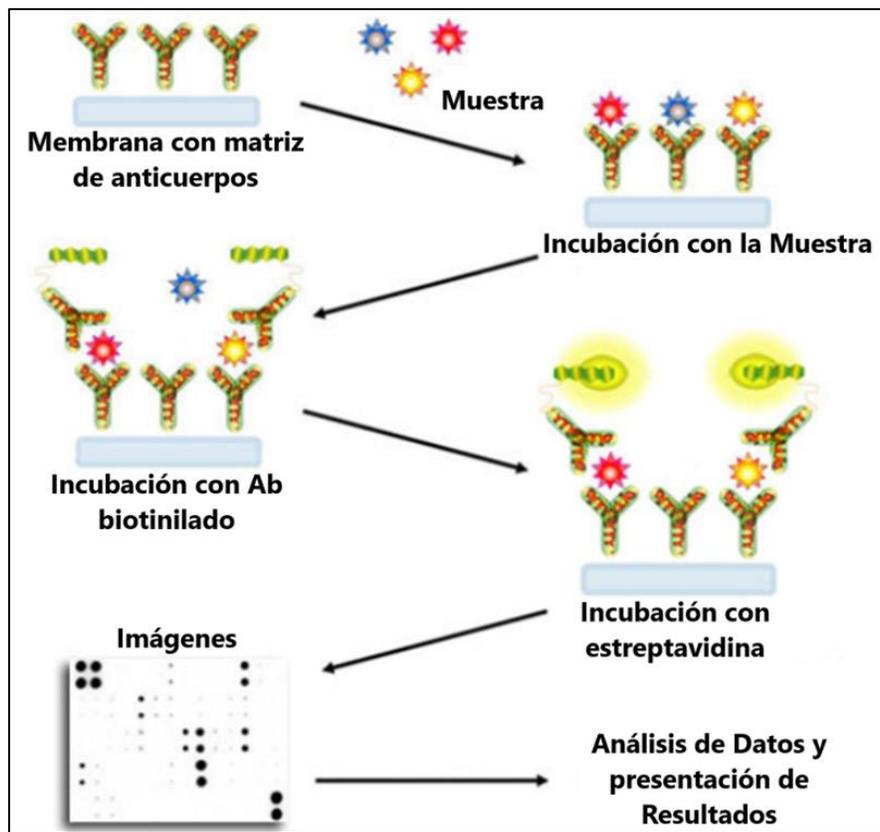


Figura 13. Esquema del funcionamiento de la técnica de microarreglos de proteínas. Tomado y modificado de Manual de Usuario RayBio® C-Series, Human Cytokine Antibody Array C1000.

		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
Each antibody is spotted in duplicate vertically	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														
	3	Eotaxin-2 (CCL24)	Eotxin-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
	4														
	5	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
	6														
	7	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)
	8														
	9	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
	10														

AAH-CYT-6

		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
Each antibody is spotted in duplicate vertically	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	GITR Ligand (TNFSF18)	GITR (TNFRSF18)	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														

AAH-CYT-7

Figura 14. Esquema del mapa de determinación de proteínas (citoquinas) para las membranas C6 y C7 de los microarreglos.

6.7.1. Protocolo de la técnica de microarreglos para proteínas

Bloqueo Membranas con Arreglos de Ab. Se colocaron cuidadosamente las membranas C6 y C7 en los pozos de la placa donde se corrió el ensayo (procurando identificar fácilmente las dos membranas para cada muestra), y se adicionó 2 mL de Solución Buffer de Bloqueo en cada uno de los pozos con las membranas, posteriormente se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación constante. Posterior al tiempo de bloqueo, la solución se retiró de cada uno de los pozos con ayuda de micropipeta o sistema de aspirado.

Incubación de la Muestra. Previamente se realizó el cálculo para adicionar el correspondiente volumen que contiene 800 µg de proteína de cada una de las muestras, dicho volumen se diluyó hasta alcanzar un mililitro, aforando con Solución Buffer de Bloqueo para cada pozo (800 µg/mL). La muestra diluida se dejó incubar por 72 horas a 4 °C y en agitación constante. Posterior al tiempo de incubación, la solución diluida con la muestra se retiró de cada uno de los pozos con ayuda de micropipeta o sistema de aspirado.

Primera serie de Lavados. Previamente se prepararon las Soluciones Buffer de Lavado I y II, de acuerdo con las indicaciones del Manual de Usuario. Se colocaron 2 mL de Solución Buffer de Lavado I (1X) en cada pozo para cada membrana ensayada por muestra y se dejaron incubar/enjuagar en agitación durante 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se retiró la solución; este procedimiento se repitió en dos ocasiones más (tres lavados con Solución Buffer de Lavado I (1X) en total). Después de lavar con la primera solución, se adicionaron otros 2 mL de Solución Buffer de Lavado II (1X) y se lavaron por agitación (5 minutos) a temperatura ambiente y posteriormente se retiró la solución; este procedimiento se repitió en una ocasión más (dos lavados con Solución Buffer de Lavado II (1X) en total).

A partir de este punto en la metodología, se debe tener la debida precaución y usar sólo la solución correspondiente para cada membrana C6 y C7.

Incubación con Coctel de Ab Biotinilado para cada membrana. El correspondiente Coctel de Ab Biotinilado para las membranas C6 y C7 se preparó previamente de acuerdo con

las especificaciones del Manual de Usuario. Se adicionó sólo 1 mL del coctel C6 y/o C7 a cada pozo de la membrana correspondiente para cada muestra (se debe tener cuidado de usar el coctel de Ab biotinilado C6 y C7 con sus correspondientes membranas C6 y C7). El coctel de Ab biotinilado (preparado) se incubó por 12 horas en cuarto frío del INPRFM y en agitación constante. Posterior al tiempo de incubación, se retiró el coctel de Ab biotinilado de cada una de las membranas en los pozos con ayuda de micropipeta o sistema de aspirado.

Segunda Serie de Lavados. Se realizaron las correspondientes series de lavados con las soluciones buffer de lavado I y II (1X), justo como se describió anteriormente (Ver Primera Serie de Lavados).

Incubación con HRP-Estreptavidina. La Solución Concentrada 1000X HRP-estreptavidina, debe ser diluida previamente. Se colocaron 2 mL de la solución 1X HRP-estreptavidina en cada uno de los pozos que contienen a las membranas y se dejó incubar por 2 horas a temperatura ambiente. Posterior al tiempo de incubación, se retiró la solución 1X HRP-estreptavidina de cada una de las membranas en los pozos con ayuda de micropipeta o sistema de aspirado.

Tercera Serie de Lavados. Se realizaron las correspondientes series de lavados con las soluciones buffer de lavado I y II (1X), justo como se describió anteriormente (Ver Primera Serie de Lavados).

Detección por Quimioluminiscencia. Las membranas lavadas y húmedas se colocaron en una hoja de papel seda para retirar el exceso de la última solución de lavado, pero procurando que las membranas no se secan por completo. Posteriormente se colocaron sobre una placa de plástico u acetato limpio (provisto en el kit), asegurando su identificación para cada membrana de muestra y se adicionó 500 µL de la solución preparada con los buffer de detección C y D a cada membrana, se incubaron sin agitación y a temperatura ambiente por dos minutos, e inmediatamente después, se colocó otra placa de acetato plástico sobre las membranas (configuración tipo sándwich) y se llevó al sistema foto documentador ChemiDoc™ Touch Imaging System de BIO-RAD; las membranas fueron expuestas a quimioluminiscencia bajo diversas condiciones (Ver

Tabla 4). Bajo estas condiciones fue posible observar las señales (*spots*) para cada proteína en cada una de las membranas (Figura 15).

Tabla 4. Condiciones de exposición para la adquisición de imágenes de las membranas de microarreglos*

<i>Exposición</i>	<i>Tiempo de Exposición (segundos)</i>		<i># Imágenes</i>
	<i>Inicio</i>	<i>Termino</i>	
1°	2	30	6
2°	4	40	7
3°	1	15	6
4°	5	300	10
5°	5	60	6
6°	10	120	10

*Tamaño medio (15.5x12.4 cm), Aplicación: Blots: Quimioluminiscencia.

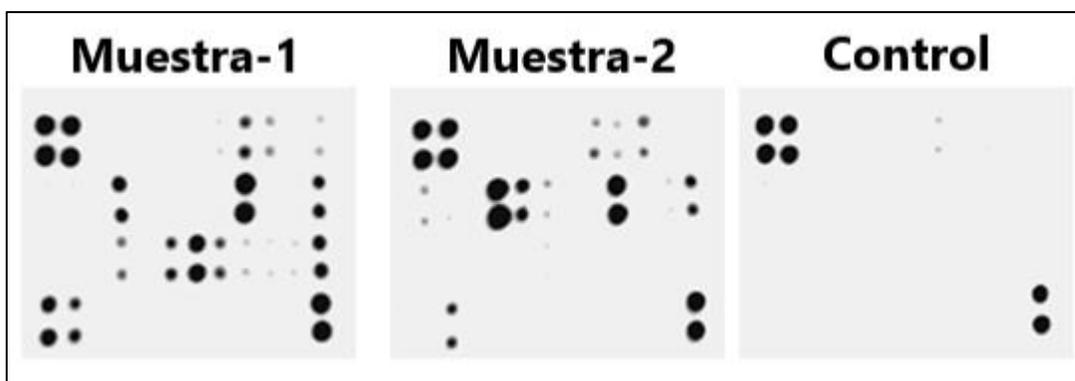


Figura 15. Ejemplo de resultados típicos obtenidos al revelar membranas RayBio C-Series Antibody Arrays. Tomado y modificado de RayBio® C-Series, Manual del Usuario, Human Cytokine Antibody Array C1000.

Almacenamiento. Las membranas se colocaron en cada uno de los pozos de las placas provistas por el estuche comercial, con solución TBS 1X (pH=7.5) y se rotularon debidamente para mantenerse en refrigeración a 4°C.

Interpretación y análisis de resultados. Las imágenes obtenidas de las membranas C6 y C7 en el foto-documentador (ChemiDoc™ Touch Imaging System) se analizaron para confirmar la presencia y cantidad/proporción de las 120 proteínas de suero humano en software Image Lab 6.0.1. de Bio-Rad.

Para obtener los valores correspondientes a la expresión de cada una de las 120 proteínas que conforman la matriz de proteínas en la membrana, se calculó el promedio de la densidad óptica -registrada por duplicado- de cada proteína. Para ello se emplearon los valores de *Volume (Int)*, de la tabla de volúmenes obtenida y posteriormente, los datos se exportaron al software EXCEL® Microsoft Inc, donde se realizaron los cálculos correspondientes al promedio para cada valor de las proteínas. Con este valor, se realizaron los procedimientos de normalización de los valores de expresión, que consistió en quitar el posible *background* o ruido de fondo de cada una de las membranas usando los valores correspondientes a los spots NEGATIVO, BLANCO y POSITIVO de cada membrana, obteniendo así la intensidad relativa (IR) de expresión correspondiente a cada proteína de cada membrana, en cada muestra proveniente de los participantes en cada grupo experimental.

Posterior a la obtención de la IR, los datos fueron presentados en un gráfico descriptivo de barras mediante el software estadístico GraphPad Prism® Version 6.01 (San Diego, California, E.U.A.), usando el promedio de la IR de las cinco muestras de proteína de exosomas de cada muestra, obteniendo así un Perfil de Expresión de proteínas característico de los grupos experimentales (ver Gráfica 15). Una vez identificada la expresión característica de cada grupo, se realizó un análisis preliminar por rangos de expresión en IR: alta >1 , media $0.5 - 1$ y baja $0.0-0.49$; esto permitió tener una aproximación directa sobre el comportamiento de los datos obtenidos.

6.8. Análisis bioinformático de interacción proteína-proteína (PPI)

Se empleó la base de datos UniProt™: Universal Protein Resource (UniProt Consortium, 2020) y los algoritmos bioinformáticos disponibles en la página STRING™: Functional protein association networks versión 11.0 (STRING Consortium, 2020), y se realizó un estudio comparativo de la interacción proteína-proteína (PPI), de las citocinas, quimiocinas y neurotrofina estadísticamente significativas, así como de aquellas proteínas con una expresión de IR media-alta.

Se determinó el grado de interacción que posee cada proteína significativa entre sí y las posibles interacciones con otras proteínas relacionadas, así como su posible relación con

algunas vías de señalización comunes o asociadas. Para cada proteína, se estableció el valor parámetro de 0.700 como el puntaje mínimo de interacción requerido, así como un análisis de la evidencia sobre el tipo de interacción proteína-proteína, mostrando sólo aquellas interacciones proteína-proteína significativas. Las determinaciones se realizaron mediante el análisis de la información actualmente disponible de la genómica y proteómica para la especie *Homo sapiens*.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los resultados obtenidos se realizó mediante los programas estadísticos SigmaPlot 12 y GraphPad Prism 6. En los diferentes análisis realizados, se aplicaron las comparaciones estadísticas correspondientes de ANOVA de una y dos vías -para uno o dos factores, entre los tres grupos experimentales- y la correspondiente comparación múltiple mediante la prueba de *Tukey* como *Post-Hoc*; además, se utilizó la prueba '*t de Student*' para realizar comparaciones entre dos grupos. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con una $P < 0.05$. Los resultados en algunas tablas y gráficas, se muestra \pm la desviación y el error estándar, respectivamente.

8. RESULTADOS DE LAS DETERMINACIONES EXPERIMENTALES

8.1. Estandarización de los métodos y técnicas empleadas

Previo al uso de las muestras de los grupos bajo estudio, se realizó un proceso minucioso de estandarización de las técnicas y métodos empleados para el presente estudio: determinación de proteína total por Método de Bradford, Electroforesis, Western Blot, Técnica de Microarreglos, ELISA y MET, además de los correspondientes análisis. Para más detalle consulte el ANEXO I y de este trabajo.

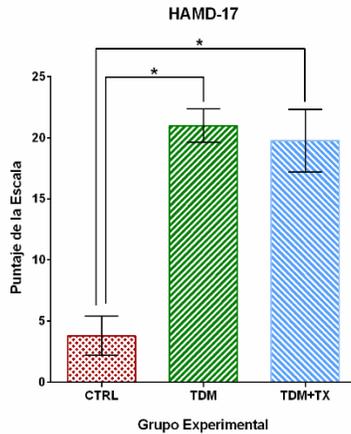
8.2. Análisis de los parámetros clínicos-demográficos y bioquímicos

Derivado del registro, así como del análisis descriptivo e inferencial para la expresión de los diferentes parámetros clínico-demográficos y bioquímicos de cada una de las muestras, se presentan en la Tabla 5 y en las Gráficas 3 a 8, un resumen comparativo de los resultados obtenidos entre los grupos experimentales.

Tabla 5. Parámetros analizados para cada muestra en los grupos experimentales

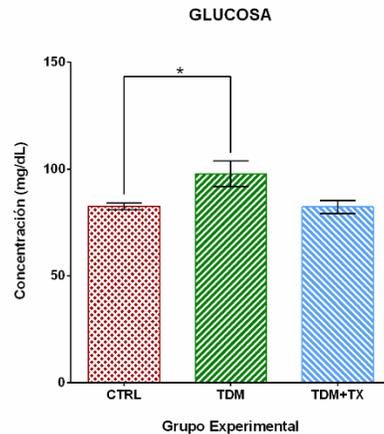
Parámetro (Media ± DE)	CTRL (n=5)	TDM (n=5)	TDM+TX (n=5)	Valor p
<u>Clínico-demográficos</u>				
Edad	28.60 ± 6.731	29.80 ± 8.758	29.40 ± 9.072	0.973
Peso	59.60 ± 7.925	68.80 ± 23.30	68.83 ± 7.974	0.6141
Talla	1.612 ± 0.038	1.566 ± 0.048	1.537 ± 0.055	0.1170
Índice de masa corporal (I.M.C.)	23.31 ± 3.028	27.99 ± 8.930	29.16 ± 1.176	0.3523
HAMD-17	3.800 ± 3.564	21.00 ± 3.000	19.75 ± 5.123	<0.0001
<u>Bioquímica sanguínea</u>				
Glucosa	82.60 ± 3.435	97.78 ± 13.29	82.25 ± 6.131	0.0317
Colesterol Total	152.4 ± 11.91	160.8 ± 8.535	129.0 ± 20.90	0.0176
HDL	55.60 ± 7.956	46.20 ± 16.05	35.00 ± 4.359	0.0929
LDL	78.36 ± 21.93	88.72 ± 17.27	72.67 ± 15.01	0.4934
Triglicéridos	92.80 ± 43.93	145.4 ± 97.48	106.8 ± 41.99	0.4772
Creatinina	0.760 ± 0.167	0.692 ± 0.091	0.675 ± 0.050	0.5250
Ácido úrico	4.100 ± 0.916	5.404 ± 0.568	-	0.0269*
<u>Hormonales</u>				
Hormona estimulante de la tiroides (TSH)	2.446 ± 1.865	5.568 ± 3.144	1.396 ± 0.460	0.0382
Triyodotironina (T3)	109.9 ± 13.11	146.6 ± 23.13	88.08 ± 15.43	0.0015
Tiroxina (T4)	7.588 ± 0.628	8.954 ± 1.762	8.408 ± 1.879	0.3808
Hormona folículo estimulante (FSH)	4.932 ± 1.173	5.088 ± 1.642	4.728 ± 1.676	0.9318
Hormona Luteinizante (LH)	5.598 ± 3.085	8.612 ± 5.373	2.567 ± 2.042	0.0760
Progesterona	2.688 ± 2.937	2.356 ± 1.298	1.448 ± 2.390	0.6879
Estradiol	46.54 ± 26.19	67.20 ± 67.73	43.20 ± 15.13	0.6416
Testosterona total	0.378 ± 0.075	0.426 ± 0.158	0.338 ± 0.178	0.6388
Testosterona libre	2.592 ± 1.542	1.154 ± 0.500	2.206 ± 1.513	0.2255

*Las comparaciones entre los grupos se realizaron usando ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Tukey como *Post-Hoc*; además se usó la prueba 't de Student' para las comparaciones entre dos grupos.



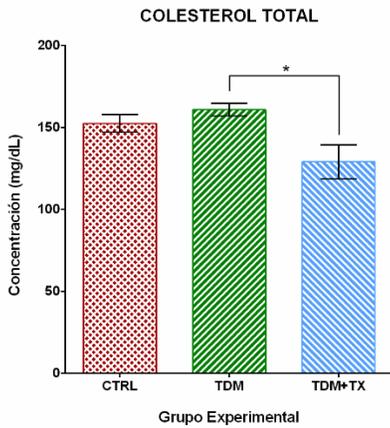
ANOVA 1 Vía y Prueba de Tukey como *Post Hoc*
($F_{(2,11)} = 29.70$; $p < 0.0001$; $\alpha = 0.05$)

Gráfica 3. Análisis del puntaje Escala Hamilton-Depresión. Aumento significativo del puntaje en los grupos TDM y TDM+TX, en relación al grupo CTRL.



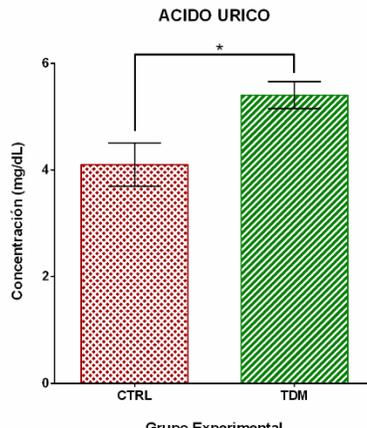
ANOVA 1 Vía y Prueba de Tukey como *Post Hoc*
($F_{(2,11)} = 4.799$; $p = 0.0317$; $\alpha = 0.05$)

Gráfica 4. Análisis concentración de glucosa. Aumento significativo de la concentración en el grupo TDM vs CTRL.



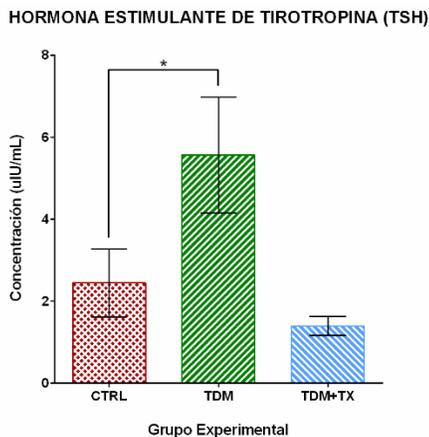
ANOVA 1 Vía y Prueba de Tukey como *Post Hoc*
($F_{(2,11)} = 5.961$; $p = 0.0176$; $\alpha = 0.05$)

Gráfica 5. Análisis de la concentración de colesterol total. Se observa una disminución significativa en la concentración del grupo TDM+TX vs TDM.



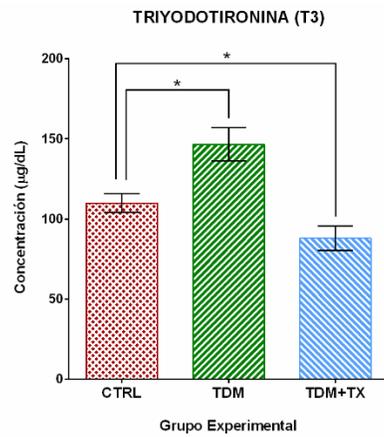
Prueba *t-Student*
($t = 2.704$; $p = 0.0269$)

Gráfica 6. Análisis de la concentración de ácido úrico. Se observa un aumento de la concentración del grupo TDM vs CTRL.



ANOVA 1 Vía y Prueba de Tukey como *Post Hoc*
($F_{(2,11)} = 4.460$; $p = 0.0382$; $\alpha = 0.05$)

Gráfica 7. Análisis de la concentración de TSH. Se observa un aumento significativo en la concentración del grupo TDM vs CTRL.



ANOVA 1 Vía y Prueba de Tukey como *Post Hoc*
($F_{(2,11)} = 12.39$; $p = 0.0015$; $\alpha = 0.05$)

Gráfica 8. Análisis de la concentración de T3. Aumento en la concentración del grupo TDM y disminución en el grupo TDM+TX, en relación al grupo CTRL.

La comparación de cada variable entre los grupos mostró diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) en solo seis variables, las cuales fueron: puntaje de la Escala Hamilton (HAMD-17, $P < 0.0001$; ver Gráfica 3), con un aumento en el puntaje de las comparaciones entre el grupo TDM vs CTRL y TDM+TX vs CTRL; en la concentración de glucosa en sangre ($P = 0.0317$; ver Gráfica 4), al comparar el grupo CTRL vs. TDM, con un aumento en los niveles de glucosa en éste último; en la concentración de colesterol total ($P = 0.0176$; ver Gráfica 5), con una disminución para el grupo TDM+TX vs TDM; en la concentración de ácido úrico ($t = 2.704$; $P = 0.0269$; ver Gráfica 6), para la comparación de CTRL vs. TDM, aumentando su concentración en mujeres deprimidas; en la concentración de la hormona estimulante de tirotrona (TSH, $P = 0.0382$; ver Gráfica 7), disminuyendo en el grupo TDM+TX vs TDM; y, en la concentración de hormona triyodotironina (T3, $P = 0.0015$; ver Gráfica 8), aumentando y disminuyendo en las comparaciones de los grupos CTRL vs. TDM y TDM vs. TDM+TX, respectivamente, para los sujetos deprimidos y deprimidos más tratamiento.

La expresión diferencial de los niveles y concentración en estos parámetros se encuentra generalmente aumentada en el grupo de las mujeres deprimidas respecto al grupo control, sin embargo, parece existir también una disminución de manera paralela en la concentración de algunos parámetros como colesterol total, TSH y T3, pero en los sujetos bajo tratamiento farmacológico, aunque esto puede deberse a las características y condiciones de los sujetos en el presente estudio.

8.3. Análisis del contenido total de proteína en exosomas entre los grupos experimentales

En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos del contenido total de proteína para las diferentes muestras analizadas, así como de las diferentes determinaciones para la fuente de proteína (exosomas, suero sanguíneo 'sin exosomas' y suero sanguíneo 'original'). Derivado de un primer análisis de varianza de la proteína total de exosomas, para el factor '*condición experimental*', se observó que no existieron diferencias significativas ($P = 0.3760$) entre el contenido proteico de estas nanovesículas en los grupos, y aunque en las primeras determinaciones se observó un comportamiento particular de dispersión entre las determinaciones de un grupo y otro (CTRL con

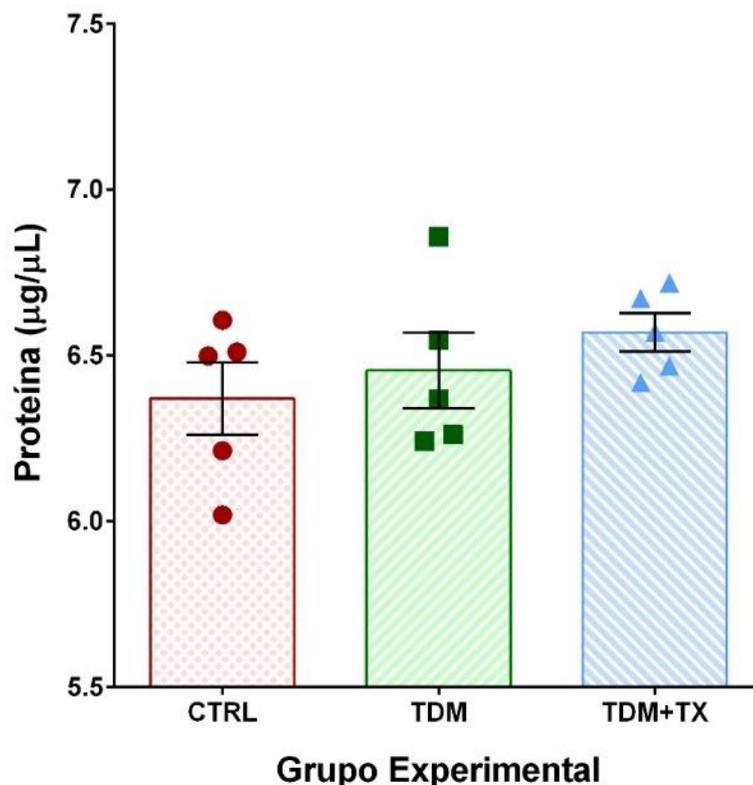
dispersión pronunciada en sus datos, TDM con dispersión casi compacta y TDM + TX con una aparente tendencia a la dispersión; ver Gráfica 1, ANEXO II), fue gracias al análisis final con una correlación más rigurosa ($r^2= 0.9960$) -usado en la determinación del contenido de proteína-, que este comportamiento desapareció, observándose sólo un ligero aumento consecutivo entre las medias de los grupos experimentales (ver Gráfica 9).

Tabla 6. Contenido de proteínas muestras exosomas de suero sanguíneo

<i>Grupo Experimental</i>	<i>Muestra</i>	<i>Contenido proteína (µg/µL)</i>		
		<i>Exosomas</i>	<i>Suero sin exosomas</i>	<i>Suero original</i>
Sujetos Control	C-1	6.0196	6.2397	6.2658
	C-2	6.2133	6.7209	7.0828
	C-3	6.4991	6.5350	6.7758
	C-4	6.5108	6.5024	6.8172
	C-5	6.6060	6.5897	6.7354
Pacientes con TDM	D-1	6.3680	6.5611	6.8804
	D-2	6.5462	6.2767	6.6690
	D-3	6.2415	6.2397	6.4538
	D-4	6.2612	6.7234	6.5659
	D-5	6.8584	6.6523	6.7758
Pacientes con TDM más antidepresivo	T-1	6.4180	6.5352	6.7917
	T-2	6.7188	6.6547	6.8172
	T-3	6.4687	6.3945	7.0966
	T-4	6.5700	6.3340	7.0226
	T-5	6.6718	6.2332	6.9983

Posteriormente se exploró un factor adicional: “fuente de proteína” para el análisis de la concentración de proteína, sin embargo, la comparación estadística puede considerarse despreciable y no relevante para los objetivos de nuestro estudio, debido a que solo existió un efecto principal provocado por este último factor, observándose la presencia de mayor concentración de proteína en el suero original que en los sueros sin exosomas y en los exosomas. Estos resultados quizá reflejen en parte, tanto la compleja constitución proteica de las muestras, dependientes de la fuente u origen, así como del posible impacto del contenido de los exosomas, pese a que no existan diferencias entre los grupos TDM y TDM+TX respecto al CTRL, sin embargo, estas posibilidades deben tomarse en consideración para inferir futuras aproximaciones experimentales.

Contenido de Proteína Total de Exosomas



ANOVA 1 Vía y Prueba de Tukey como *Post Hoc*
($F_{(2,12)} = 1.062$; $p = 0.3760$; $\alpha = 0.05$)

Grafica 9. Análisis del contenido total de proteína en exosomas. No existieron diferencias significativas entre los grupos para el factor condición experimental.

8.4. Análisis de proteínas exosomales por electroforesis en gel y western blot (WB)

Derivado de las adecuaciones realizadas a la metodología para la determinación de exosomas por WB, así como de las observaciones realizadas por la correspondiente metodología de Dot Blot, como una alternativa para determinar la caracterización de las proteínas transmembranales de los exosomas, se lograron establecer las condiciones experimentales necesarias para identificar la presencia de la tetraspanina CD63 (ver Figura 16).

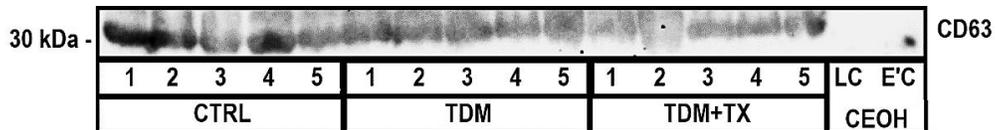


Figura 16. Determinación de CD63 por WB. Se puede observar las bandas de CD63 (para todas las muestras de los grupos). Se adicionó lisado celular (LC) y exosomas de cultivo celular (E´C) como posibles controles.

CD63, por sus características y participación en la biogénesis de estas vesículas, permitió asegurar la obtención de VE clasificadas como exosomas en las muestras obtenidas de suero sanguíneo humano. Esta proteína puede observarse en todas las muestras de exosomas entre los grupos experimentales e incluso puede observarse un ligero cambio en la IR para las bandas por grupo. Sin embargo, aunque estos resultados presentan evidencia convincente -hasta cierto grado- de la presencia de vesículas extracelulares correspondientes a los exosomas, debemos considerar que estos resultados deben complementarse con determinaciones más exhaustivas para estos y otros marcadores aún no reportados, todo ello debido a que el trabajo de análisis y determinación que se realizaba al momento de estas determinaciones, tuvo que ser aplazado por la contingencia sanitaria, que afectó las actividades de investigación en el INPRFM, lugar donde se desarrolla actualmente este proyecto.

8.5. Análisis de proteínas por matriz de microarreglos para proteínas

Una aproximación sobre el comportamiento de los datos obtenidos en la expresión de cada proteína se realizó mediante un primer análisis por rangos de expresión en la IR, definiéndolos como: alta >1, media 0.5 - 1 y baja 0.0-0.49. Derivado de esto, se observó que al menos 16 proteínas se expresaron un 50% más que el promedio del spot positivo de las membranas (ver Tabla 7; Adicionalmente ver Graficas 2 y 3, ANEXO II).

Tabla 7. Proteínas con expresión de IR media-alta detectados en microarreglos para proteínas.

Nombre	UniProt	CTRL	TDM	TDM+TX
		Media ±DE ±EE	Media ±DE ±EE	Media ±DE ±EE
<i>Adiponectina</i>	Q15848	7.731 ±3.493 ±1.562	5.85 ±2.646 ±1.183	3.81 ±1.063 ±0.4752
<i>Angiogenina</i>	P03950	3.453 ±0.7793 ±0.3485	4.638 ±1.728 ±0.7728	3.81 ±1.491 ±0.6669
<i>BDNF</i>	P23560	0.368 ±0.1059 ±0.04736	0.7058 ±0.1867 ±0.08351	0.506 ±0.229 ±0.1024
<i>EGF</i>	P01133	1.588 ±1.662 ±0.7431	1.532 ±0.821 ±0.3672	0.8409 ±0.4235 ±0.1894

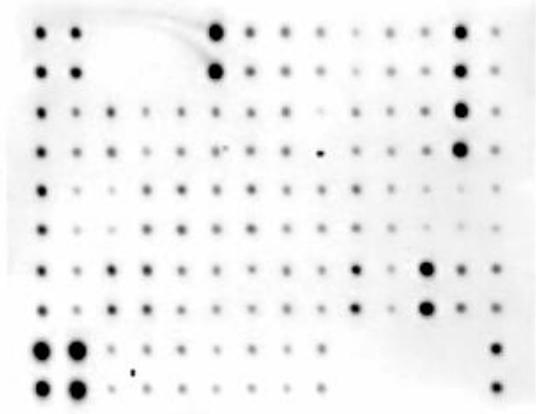
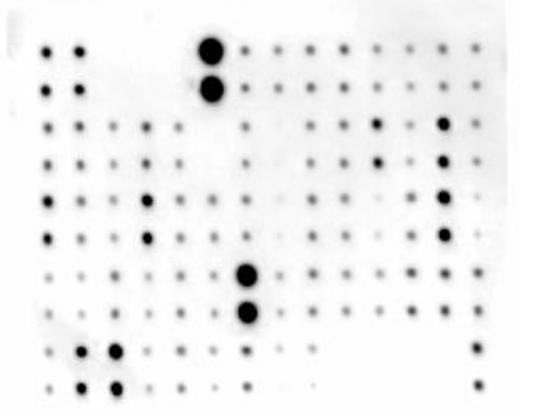
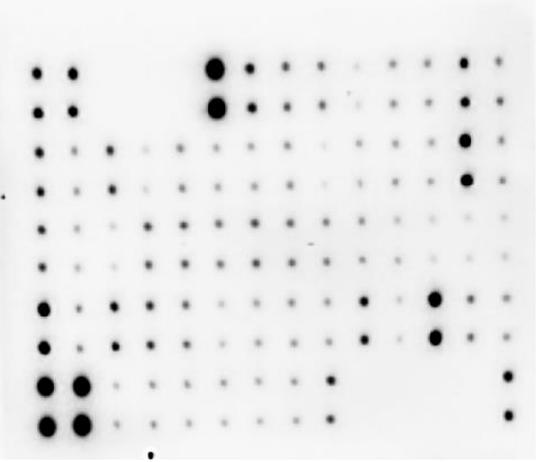
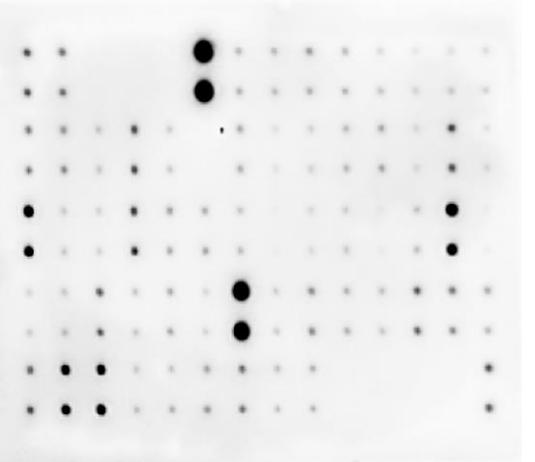
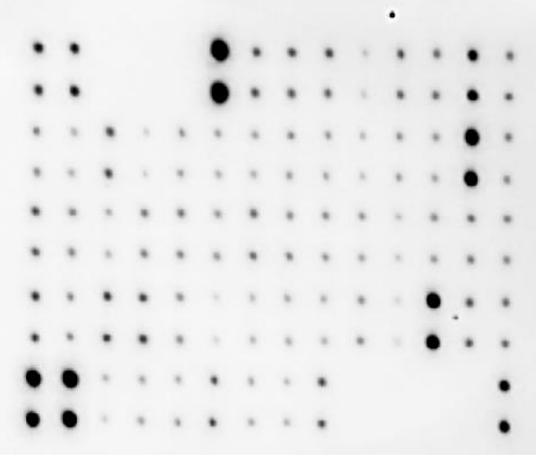
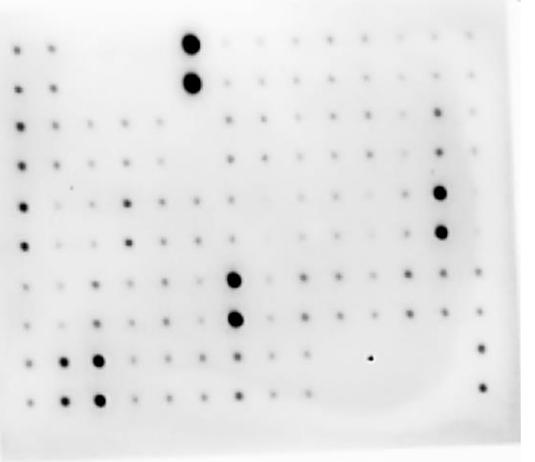
<i>HCC-4</i>	O15467	1.193 ±0.5819 ±0.2602	0.5882 ±0.374 ±0.1673	0.5848 ±0.2503 ±0.1119
<i>ICAM-1</i>	P05362	0.6454 ±0.4377 ±0.1958	0.8878 ±0.5379 ±0.2405	0.6194 ±0.1842 ±0.08239
<i>IGFBP-2</i>	P18065	1.916 ±0.3301 ±0.1476	1.55 ±0.7566 ±0.3384	1.812 ±0.7257 ±0.3246
<i>IGFBP-6</i>	P24592	0.7336 ±0.485 ±0.2169	0.4815 ±0.1874 ±0.08381	0.5799 ±0.1944 ±0.08692
<i>IL-6 R</i>	P08887	0.8938 ±0.6929 ±0.3099	1.778 ±0.9606 ±0.4296	1.465 ±0.503 ±0.2249
<i>Leptina</i>	P41159	0.9925 ±1.025 ±0.4586	0.8152 ±0.8344 ±0.3731	0.7588 ±0.7533 ±0.3369
<i>MSP a/b</i>	Q04912	5.241 ±2.935 ±1.312	3.669 ±1.343 ±0.6006	2.285 ±1.083 ±0.4842
<i>NAP-2</i>	P02775	2.266 ±0.6081 ±0.272	2.112 ±0.4469 ±0.1999	1.909 ±0.37 ±0.1655
<i>PDGF-BB</i>	P01127	4.19 ±1.005 ±0.4494	2.726 ±0.9781 ±0.4374	2.456 ±1.27 ±0.568
<i>Rantes</i>	P13501	5.359 ±1.215 ±0.5434	2.947 ±1.053 ±0.471	2.675 ±1.437 ±0.6424
<i>TIMP-1</i>	P01033	1.481 ±1.216 ±0.5438	0.9422 ±0.5492 ±0.2456	0.7483 ±0.236 ±0.1056
<i>TIMP-2</i>	P16035	1.573 ±0.9343 ± 0.4178	1.234 ±0.5947 ±0.2659	1.12 ±0.4481 ±0.2004

*Se muestran los valores de la media para cada proteína por grupo experimental, más la desviación estándar (DE), y el error estándar (EE).

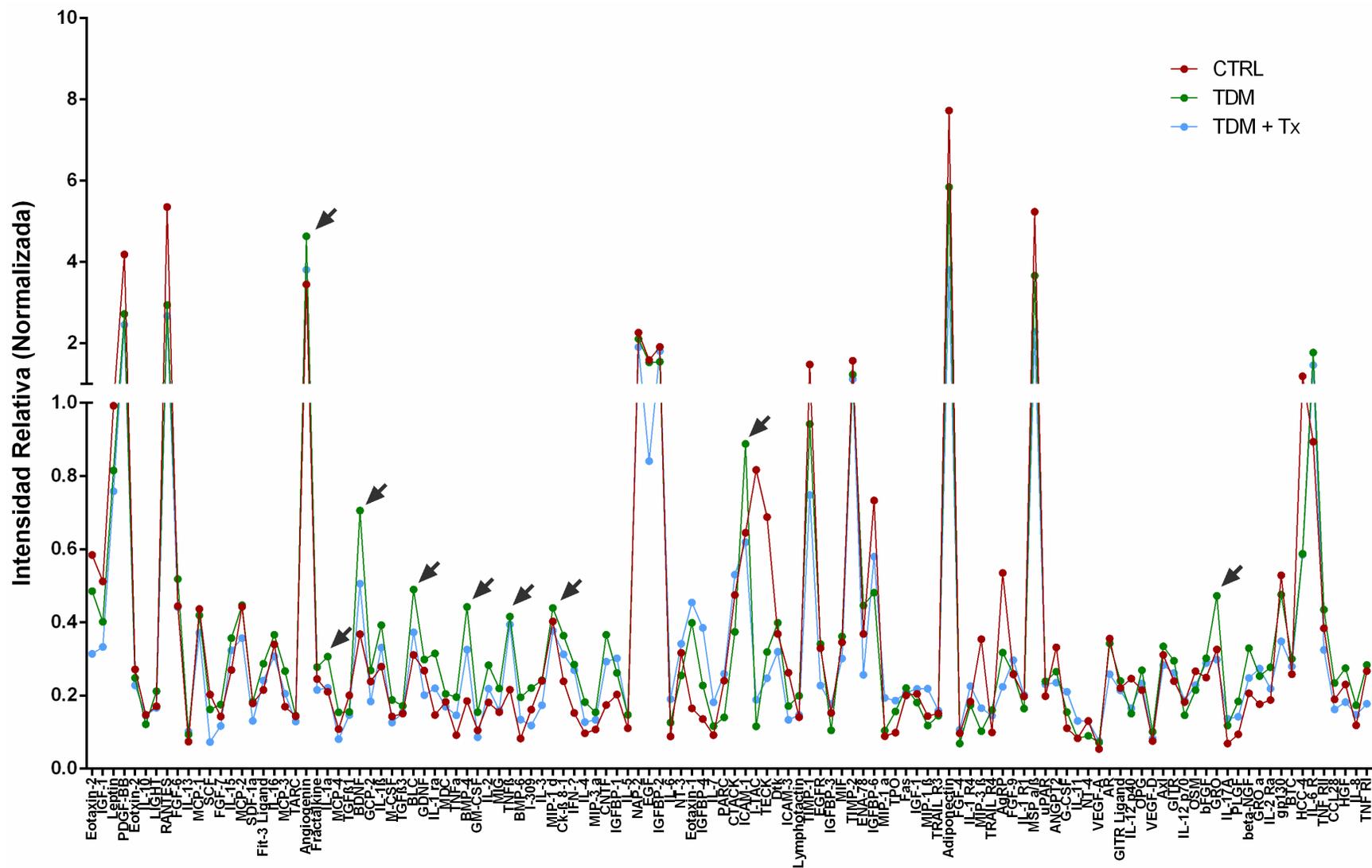
Originalmente se esperaba que algunas citocinas, quimiocinas y otras proteínas asociadas a los trastornos depresivos como IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF α , TNF β y los receptores asociados a estas, estuvieran alterados en su expresión de IR respecto al grupo CTRL, sin embargo, no fue así y una vez realizadas las comparaciones estadísticas se determinó que no existieron diferencias significativas en la expresión de la IR de estas proteínas en particular (adicionalmente ver Gráfica 4, ANEXO II), aunque en algunos casos se observó que la expresión de las proteínas entre los grupos tuvo un comportamiento característico respecto al control, en el que se observó un aumento en el grupo TDM y una posterior disminución para el grupo TDM+TX, ejemplo de ello son las IL-1 α , TNF α , TNF RI, TNF RII, e IL-6 R, donde en esta última proteína -por ejemplo-, se observa una expresión muy elevada de su IR.

Al realizar los análisis de varianza de la IR para las 120 proteínas y graficar en conjunto la media de cada proteína para los tres grupos, se obtuvo un “perfil de expresión” comparativo entre ellos (ver Gráfica 10), en el cual se pudo apreciar un comportamiento similar al previamente descrito para algunas proteínas: un marcado aumento en el nivel de proteína para el grupo TDM, que generalmente no se vio revertida con el tratamiento. Este comportamiento observado, podría ser relevante y complementario en la determinación de una posible red de moléculas que contribuyan a la patología de este trastorno, siendo parte importante en la discusión de este análisis realizado.

Tabla 8. Imágenes de spots de microarreglos para proteínas (citoquinas) de exosomas bajo las diferentes condiciones experimentales.

<i>Grupo Experimental</i>	<i>Membrana C6</i>	<i>Membrana C7</i>
CTRL (#1)		
TDM (#1)		
TDM+TX (#1)		

*En cada fila se muestra un ejemplo de imagen de las membranas C6 y C7 para la determinación de 120 proteínas (citoquinas) diferentes mediante las matrices de microarreglos.



Grafica 10. Perfil de expresión para las 120 proteínas entre los grupos experimentales. Se muestra la comparación de las medias de expresión de IR para cada proteína entre los grupos. Los puntos sobre las líneas roja, verde y azul corresponden al grupo CTRL, TDM y TDM+Tx, respectivamente. Las flechas corresponden a algunas proteínas con una expresión de IR mayor en el grupo TDM, que en el TDM+Tx.

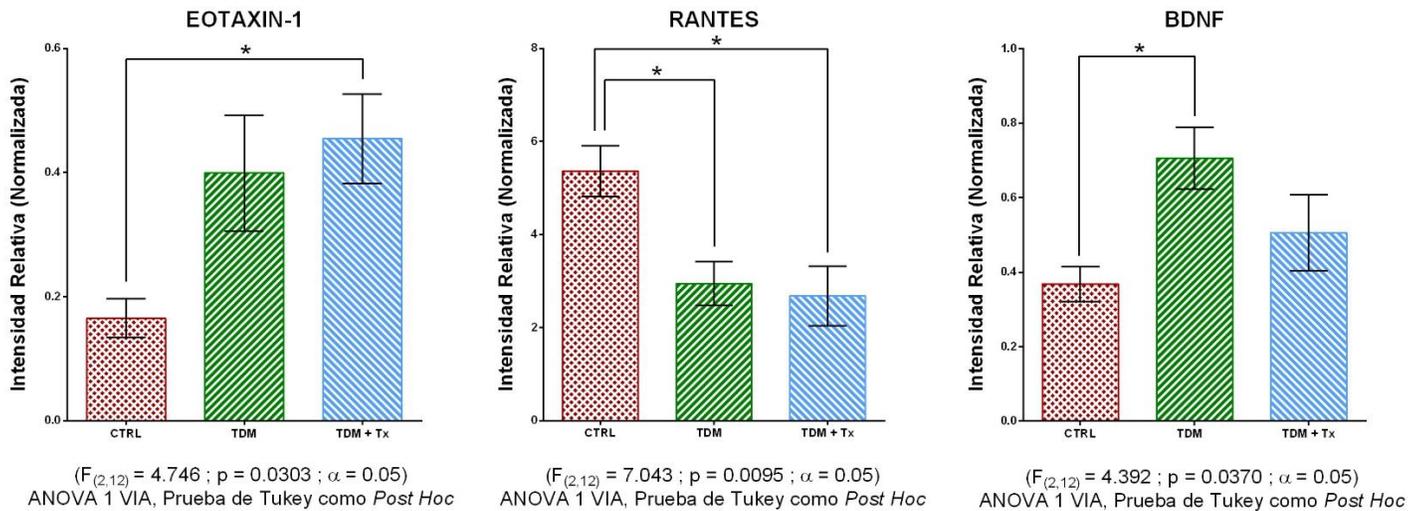
Una vez realizado el análisis estadístico para las 120 proteínas disponibles en las dos membranas que componen la matriz de los microarreglos, se determinó que sólo existen diferencias significativas en tres de ellas, BDNF, RANTES y EOTAXINA-1 (ver Gráfica 11), de las cuales, BDNF y EOTAXINA-1, pueden incluirse entre las proteínas con expresión media de IR, y en el caso de RANTES, esta fue considerada en el rango alto de acuerdo con las primeras aproximaciones para el análisis de los datos.

El análisis de varianza de una vía reveló diferencias significativas para el caso de la proteína Eotaxina-1 ($F_{(2,12)}=4.746$; $P=0.0303$; $\alpha=0.05$). Esta proteína aumentó su expresión en un 141.5% en los participantes con diagnóstico de depresión mayor en comparación con los participantes del grupo control, aunque no alcanzo diferencias estadísticamente significativas ($P=0.0873$). De manera similar, se observó un aumento del 175.01%, estadísticamente significativo en los participantes con diagnóstico de depresión mayor y que recibieron tratamiento farmacológico en comparación con el grupo control ($P=0.0330$). Sin embargo, no observamos diferencias entre los grupos de participantes con depresión mayor que recibieron o no tratamiento farmacológico ($P=0.8453$).

Al igual que para la proteína Eotaxina-1, el análisis de varianza de una vía reveló diferencias significativas para la proteína RANTES ($F_{(2,12)}=7.043$, $P=0.0095$; $\alpha=0.05$). En este caso, la expresión de RANTES disminuyó un 45% significativamente en los grupos de participantes con diagnóstico de depresión ($P=0.0247$) y un 50.08% en aquellos en los que fueron diagnosticados con depresión y recibieron tratamiento farmacológico ($P=0.0133$) en comparación con el grupo control. Al igual que con Eotaxina-1, la expresión de RANTES no reflejó diferencias entre los grupos de participantes con depresión mayor que recibieron o no tratamiento farmacológico ($P=0.9367$).

Interesantemente, el análisis de varianza de una vía del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) reflejó diferencias significativas en los grupos estudiados ($F_{(2,12)}=4.392$; $P=0.0037$; $\alpha=0.05$). El BDNF aumentó de manera significativa su expresión en un 91.79% del grupo de participantes con diagnóstico de depresión en comparación con el grupo de sujetos control ($P=0.0305$). En cambio, en los pacientes con diagnóstico de depresión y

que recibieron tratamiento farmacológico, la expresión de BDNF disminuyó un 28.30% en comparación con los pacientes con diagnóstico de depresión, aunque no reflejó diferencia estadísticamente significativa ($P=0.2297$); ver Gráfica 11.



Gráfica 11. Proteínas con expresión de IR estadísticamente significativa. De izquierda a derecha: EOTAXIN-1, RANTES y BDNF. El “ * ” corresponde a la comparación estadísticamente significativa. Se presentan las medias obtenidas de cada grupo experimental y el correspondiente error estándar (EE), respecto al control de cada membrana analizada.

Derivado de los resultados de la expresión para estas proteínas en particular se puede sugerir que: 1) no existe ningún tipo de relación directa aparente entre ellas, pues las principales actividades biológicas y moleculares asociadas son diferentes para cada una, y 2) las diferencias asociadas entre los grupos para su expresión no son del todo claras, pues en algunas de ellas, llegan a ser datos contradictorios a lo reportado en estudios previos que analizaron suero sanguíneo humano (caso del BDNF). Es por ello, que se aplicaron técnicas de análisis posteriores para el escrutinio de estos datos.

8.6. Análisis bioinformático de interacción proteína-proteína (PPI)

Posterior a los hallazgos estadísticos en la expresión de IR y lo observado en la determinación de la concentración de BDNF, se realizó un análisis comparativo de la interacción proteína-proteína (PPI), mediante el uso de la base de datos UniProt y los algoritmos bioinformáticos de la página *STRING* 11.0, para BDNF, RANTES y EOTAXINA-1, donde, en un primer diseño de análisis para identificar solo las posibles interacciones entre ellas, con un nivel de confianza alto (0.700 - 0.900), no se obtuvieron interacciones significativas entre sí ($P= 1$, valor p de enriquecimiento de las interacciones proteína-proteína asociado; ver Figura 17, inciso A). De acuerdo con la base de datos, este resultado puede deberse a que el conjunto de proteínas analizado es muy pequeño (3 *ítems*), o que es una muestra muy aleatoria de proteínas. Sin embargo, ello no significa necesariamente, que estas proteínas no tengan una significancia biológica importante, pues quizá solo se requieran más estudios para entender la relación de estas proteínas, y refutar lo descrito por los algoritmos bioinformáticos.

Derivado de este primer análisis se optó por realizar uno adicional que incluyera a las proteínas identificadas previamente en el análisis de microarreglos con un rango de expresión media-alta de IR (ver Tabla 7). Este segundo análisis también se realizó con un nivel de confianza alto (0.700 - 0.900), y con un total de 17 *ítems* (proteínas con expresión media-alta de IR, más BDNF, RANTES y EOTAXINA-1); el análisis identificó interacciones significativas entre el conjunto de proteínas ($P= 8.15 \times 10^{-11}$; ver Figura 17, inciso B). Este resultado puede entenderse como una alta incidencia de interacciones entre proteínas, incluso más allá de lo que se esperaría para un conjunto aleatorio de proteínas de un tamaño similar; de acuerdo con lo descrito por la página *STRING* 11.0, tal valor p de enriquecimiento, indica que las proteínas están relacionadas u asociadas biológicamente al menos de manera parcial como un grupo. Esto puede corroborarse con las diversas descripciones adicionales que realizan los algoritmos sobre el nivel de interacción en las diferentes vías de señalización celular, su papel como componente celular, en procesos biológicos, y en funciones moleculares diversas; en este sentido, como parte de un análisis descriptivo adicional, se identificaron las PPI asociadas a la participación común de estas proteínas, en posibles vías, procesos y funciones

biológicas, asociadas a los trastornos depresivos, para mayor detalle puede observarse la Figura 18.

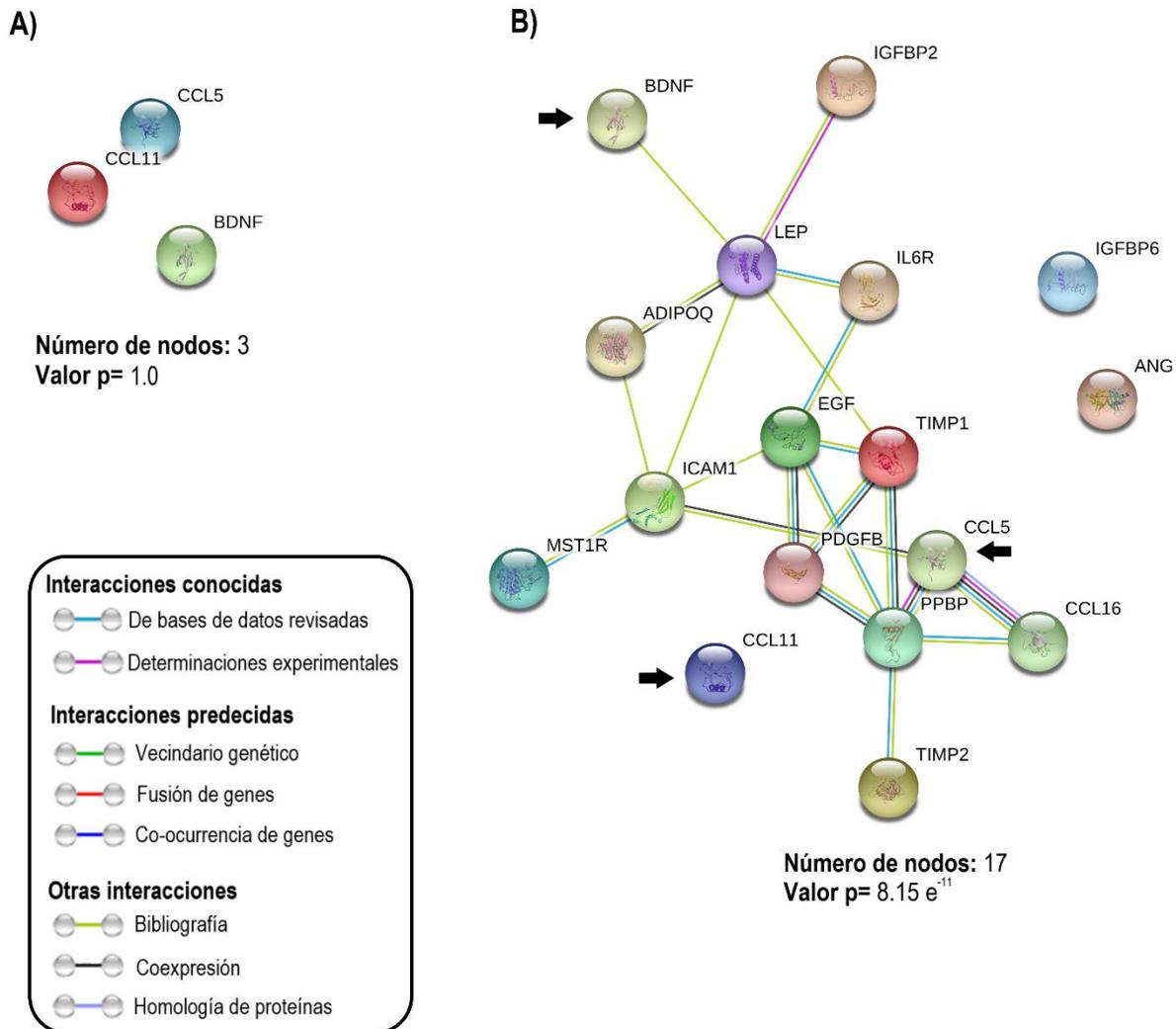
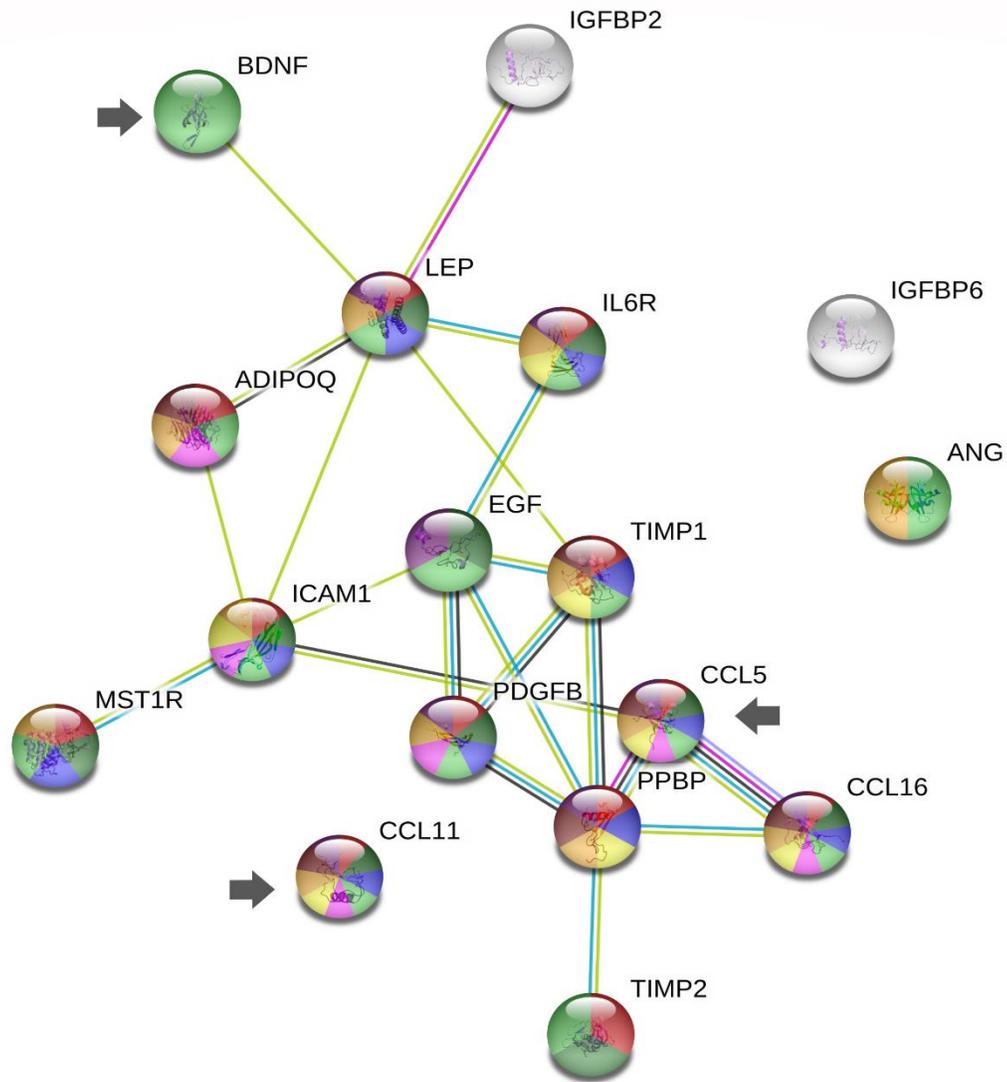


Figura 17. Análisis de la interacción proteína-proteína (PPI). Esquema de resultados para las PPI del primer diseño de análisis **A)** BDNF, RANTES EOTAXINA-1, y **B)** 17 ítems en total, segundo diseño de análisis; realizado y tomado de STRING™: Functional protein association networks versión 11.0.

Los resultados de PPI descritos hasta ahora, pueden sugerir no solo la importancia de cambios significativos en la expresión de ciertas proteínas en particular, sino, en un aparente y complejo comportamiento que, en conjunto, puede llegar a tener un diverso número de asociaciones y funciones biológicas entre sí, derivado quizá de un estado patológico en particular, siendo una nueva aproximación, que podría llegar a contribuir enormemente al entendimiento de los numerosos mecanismos moleculares en diversas patologías, como los trastornos depresivos.



<p>Interacciones conocidas</p> <ul style="list-style-type: none"> De bases de datos revisadas Determinaciones experimentales <p>Interacciones predecidas</p> <ul style="list-style-type: none"> Vecindario genético Fusión de genes Co-ocurrencia de genes <p>Otras interacciones</p> <ul style="list-style-type: none"> Bibliografía Coexpresión Homología de proteínas 	<p>Participación en procesos biológicos importantes en inflamación (posible impacto a nivel de SNC)</p> <ul style="list-style-type: none"> Respuesta a citocinas Regulación positiva de la cascada MAPK Vía de señalización mediada por citocinas Procesos metabólicos de regulación de proteína celular Regulación de la cascada ERK1 y ERK2 Respuesta inflamatoria Respuesta al estrés Actividad de citoquinas Interacción del receptor citocina-citocina
---	---

Figura 18. Participación conjunta de la red de interacción proteína-proteína (PPI) en diversos procesos biológicos. Se muestra la participación común de la red en procesos biológicos importantes en inflamación. Análisis realizado y tomado de STRING™: Functional protein association networks 11.0.

9. DISCUSION

En el presente estudio se abordó y se trató de determinar la posible relación o contribución que tienen los exosomas periféricos de suero sanguíneo humano, así como su contenido, en pacientes diagnosticados con TDM, comparándolos con aquellos exosomas de sujetos control y pacientes con TDM que recibieron tratamiento antidepresivo.

Lo anterior con el interés de contribuir al entendimiento de la neurobiología del TDM, puesto que es conocido desde los orígenes de las primeras descripciones médicas y psiquiátricas de los trastornos depresivos, y hasta los más recientes avances de este trastorno, la gran complejidad de las diversas manifestaciones clínico-psiquiátricas, biológicas y bioquímicas asociadas a este trastorno (Sadek & Nemeroff, 2000; Aguirre-Baztán, 2008; Bartra, 2015). En este sentido, es el escaso y reducido entendimiento de la relación entre los hallazgos y la aparente evidencia fisiológica de la periferia, de los posibles eventos patológicos que pueden tener lugar a nivel de SNC y que promueven o generan mecanismos reguladores de la depresión, la principal limitante en las recientes investigaciones (Pérez-Padilla *et al.*, 2017; Inta *et al.*, 2020).

Aunado a ello, el TDM es uno de los trastornos neuropsiquiátricos del afecto más frecuentes e incapacitantes entre la población, haciéndolo un problema importante de salud a nivel mundial (Dean & Keshavan, 2017; OMS, 2020). En este sentido, no es de extrañarse la gran necesidad de la búsqueda de mayores avances en la comprensión de las vías, mecanismos y agentes moleculares reguladores o detonantes de los trastornos depresivos. Actualmente diversos estudios han propuesto que las manifestaciones del estado de ánimo en los trastornos depresivos, podrían entenderse como una expresión intrínseca de un síndrome multisistémico que influye tanto a nivel de SNC, como en la periferia a través de los sistemas endócrino e inmunológico (Evrensel & Ceylan, 2015; Chan *et al.*, 2019; Inta *et al.*, 2020), impactando en la señalización de diferentes vías neuroquímicas y de respuesta inflamatoria (Kupfer *et al.*, 2016; Alzoubi *et al.*, 2018), haciendo evidente la comunicación bidireccional a través de mecanismos comunes, donde pueden participar diferentes moléculas, metabolitos, factores solubles e incluso, diversos mecanismos de interacción celular, como las vesículas extracelulares (Chan *et al.*, 2019; Saeedi *et al.*, 2019). Sin embargo, la información científica actual que ahonda

en el entendimiento de la contribución de vesículas extracelulares como los exosomas en los trastornos depresivos, sigue siendo muy escasa y limitada.

9.1. Diferencias en algunos parámetros clínico-demográficos y bioquímicos

Los criterios establecidos para la inclusión de los participantes, así como la selección rigurosa entre los pacientes diagnosticados con TDM, aquellos que recibieron tratamiento farmacológico antidepresivo (TDM+TX) y los sujetos sanos (CTRL), permitieron establecer resultados certeros y representativos de la condición patológica; ejemplo de ello se pudo observar dentro de los parámetros clínico-demográficos y bioquímicos estudiados, donde se pudo confirmar mediante la observación del Puntaje de la Escala Hamilton (HAMD-17, $P < 0.0001$; ver Gráfica 3), los cambios significativos entre los grupos TDM y TDM+TX, en comparación al grupo CTRL, reflejo de la clara afección, identificación adecuada y el diagnóstico correcto de los pacientes como población depresiva, con los signos y síntomas asociados a este tipo de trastornos (American Psychiatric Association, 1995; OMS, 2020), sin embargo, en el caso del grupo TDM+TX, en quienes se esperaría una disminución en el puntaje en el HAMD-17 derivado del efecto del tratamiento antidepresivo respecto al grupo TDM ($P=0.5998$), consideramos que este deriva de la alta variabilidad en la respuesta al tratamiento que los pacientes pueden presentar (Hamilton, 1960), o incluso, a que estos muestren un indicio de cierta resistencia o respuesta al tratamiento, aunque, aunado al hecho de que para el presente estudio no se consideró el tiempo bajo tratamiento antidepresivo de los participantes, así como las posibles diferencias en el seguimiento y/o apego al mismo, factores no considerados en los criterios de selección de nuestra población y que también pudieron haber modificado los efectos terapéuticos deseados. Por lo cual, aumentar la muestra poblacional, mejorar la selección y características de la población bajo estudio, así como su tratamiento antidepresivo, podría estimar mejor este tipo de comportamiento observado, e inclusive, considerar la adición de un grupo experimental de participantes con diagnóstico de depresión debidamente clasificado como sujetos que hayan respondido adecuadamente al tratamiento farmacológico antidepresivo empleado.

El análisis bioquímico sanguíneo de siete variables diferentes mostró cambios significativos en al menos tres de ellas, donde se observó un marcado aumento en la

concentración de glucosa en sangre (ver Gráfica 4), y en la *concentración de ácido úrico* (ver Gráfica 6) en el grupo TDM respecto al CTRL, además de mostrar una disminución en la concentración de colesterol total (ver Gráfica 5) del grupo TDM+TX respecto al TDM. En el caso de los niveles de glucosa en sangre, diversos estudios han sugerido que aunque no existen cambios significativos en los niveles entre los pacientes diagnosticados con depresión (McIntyre *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2016), parecen existir algunas variaciones, por ejemplo, un aparente efecto de resistencia o sensibilización a la insulina y un aumento de peso, que se ha asociado principalmente al tratamiento farmacológico con algunos antidepresivos tricíclicos (Steiner *et al.*, 2019), sin embargo, en el caso del grupo de pacientes que recibieron tratamiento farmacológico en nuestro estudio, este fue a base de fármacos inhibidores de la recaptura de serotonina (ISRS; fluoxetina, citalopram, escitalopram), que de acuerdo con lo reportado, no afectan este parámetro sanguíneo (McIntyre *et al.*, 2010), siendo correspondientes nuestros hallazgos al respecto. Por otro lado, el aumento en los niveles de ácido úrico observado en nuestras determinaciones, son contrarios a lo reportado por diversos estudios (Chaudhari *et al.*, 2010; Black *et al.*, 2018), donde existe una disminución en los niveles séricos de este metabolito (incluso más bajos que otras patologías psiquiátricas como demencia, esquizofrenia, etc.) y que bajo tratamiento antidepresivos de ISRS, tienden a normalizarse después de 5 semanas (Wen *et al.*, 2012), aunque no se ha encontrado aún una correlación directa con el trastorno. Por último, la diferencia entre los niveles bajos de colesterol total en los pacientes que recibieron tratamiento antidepresivo, respecto a los pacientes deprimidos no es consistente con lo reportado en la literatura clínica de este trastorno, donde no se encuentran cambios significativos (Olusi & Fido, 1996; Park *et al.*, 2014; Gui *et al.*, 2018), e incluso, en algunos estudios no es considerado un parámetro clínico tan importante, como lo son, los niveles de colesterol LDL o HDL -que en nuestro estudio no fueron significativos- (Bartoli *et al.*, 2017). Es por ello, que podemos suponer -al menos de manera preliminar-, que esta alteración en los parámetros de ácido úrico y colesterol total, puede deberse a alguna otra condición entre los sujetos, no asociada al TDM o los criterios de selección poblacional, situación que debería ser verificada al aumentar y mejorar la selección de la muestra poblacional para estas determinaciones.

En relación al análisis hormonal de los participantes, se determinó que no existieron diferencias significativas en la mayoría de las variables, sin embargo, sólo se observaron diferencias en la concentración de la hormona estimulante de tirotrópina (TSH, ver Gráfica 7), la cual disminuyó en el grupo con tratamiento antidepresivo, respecto al de sujetos deprimidos, y, en la concentración de hormona triyodotironina (T3, ver Gráfica 8), la cual, aumentó en el grupo de sujetos deprimidos y disminuyó en el que recibió tratamiento antidepresivo, ambos hallazgos son consistentes a lo reportado por Mehrdad *et al.*, (2016) y Asadikaram *et al.*, (2019), quienes en diferentes estudios asociaron altos niveles de hormona T3 y TSH -pero no T4- en sujetos con TDM en comparación con voluntarios sanos, además se ha propuesto en diversos estudios, que este comportamiento en las hormonas tiroideas puede deberse a un desajuste en el eje tiroideo provocado por las alteraciones características del eje HHA en este trastorno (Özen *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2019).

La importancia del monitoreo y consideración de diversos parámetros clínicos y variables biológicas en el presente estudio deriva de observaciones en diversas investigaciones al respecto, las cuales sugieren que tanto la formación de VE (exosomas), como su empaquetamiento (contenido), puede ser influenciado o alterado por diversos factores como la edad, el sexo, dieta, estado fisiológico entre otros (Witwer *et al.*, 2013; Yakovlev *et al.*, 2019), siendo relevante para los objetivos de caracterización de exosomas en nuestro estudio.

9.2. Contenido total de proteína en exosomas

La ausencia de diferencias en la concentración de proteína total de exosomas entre los grupos en nuestro estudio ($P= 0.3760$), es correspondiente a lo reportado por Yakovlev y colaboradores (2019), quienes no encuentran diferencias significativas en los niveles de proteína y lípidos totales de exosomas aislados de suero sanguíneo humano (Yakovlev *et al.*, 2019), sin embargo, esto no descarta los cambios que existen en el contenido de proteínas observado en el análisis por microarreglos (ver Gráfica 14), los cuales aunque no son significativos en la mayoría de las 120 proteínas analizadas, si reflejan cambios perceptibles y concuerdan con observaciones de diversos estudios que asocian cambios en el contenido de proteínas y miRNA de exosomas bajo diferentes condiciones patológicas (Tavakolizadeh *et al.*, 2017; Gruzdev *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020), ejemplo de

ello es el trabajo de Goetzl y colaboradores (2016), quienes encontraron diferencias significativas en el contenido de las proteínas BACE-1, sAPP β y GDNF, entre pacientes con EA y sujetos sanos, evidenciando una parte de este complejo fenómeno (Goetzl *et al.*, 2016). Por otro lado, al incluir el factor 'fuente de proteína' en el análisis del contenido total de proteína, se observaron diferencias significativas para algunas comparaciones de los grupos y este factor ($P= 0.0001$), sin embargo, estas diferencias pueden describirse como una contribución de la compleja composición de proteínas entre las muestras de proteína proveniente de cada fuente, y aunque no parecen tener una correspondencia complementaria entre la misma condición experimental para las fuentes, sí existe una tendencia en la expresión del contenido que no puede descartarse del todo, siendo necesario explorar esta posibilidad en futuras aproximaciones.

9.3. Análisis por western blot (WB)

La identificación del marcador CD63 por WB en el lisado de exosomas en nuestras determinaciones experimentales, es correspondiente a la expresión reportada y caracterizada para la identificación de este tipo de VE de acuerdo con diversos estudios (Théry *et al.*, 2002; Iavello *et al.*, 2015; Hikita *et al.*, 2018). Sin embargo, será necesario analizar las posibles variaciones en la expresión de estos marcadores debido a la condición de cada grupo experimental, ofreciendo posible información relevante sobre la composición estructural de los exosomas para el trastorno, pues existen algunos reportes que sugieren la participación de estas proteínas transmembranales, en procesos de empaquetamiento del contenido, expresión en las membranas, entre otros y que además, pudieran estar implicados en los mecanismos moleculares de comunicación celular (Iavello *et al.*, 2015; Larios *et al.*, 2020).

9.4. Caracterización y análisis de las proteínas contenidas en exosomas por microarreglos

Los resultados obtenidos por parte de las matrices de proteínas mostraron que, aunque existe una ligera variación en la expresión de la IR para las 120 proteínas determinadas (Ver Gráfica 10, y adicionalmente graficas 2 y 3, ANEXO II Ver Gráfica 14), sólo 16 de ellas se expresan un 50% más que el promedio del spot positivo en cada membrana, siendo sólo BDNF, RANTES y EOTAXINA-1, las moléculas que presentaron cambios

significativos en su expresión entre los grupos experimentales para las 120 determinaciones (Ver Grafica 11). Sin embargo, cada una de estas moléculas intervienen en procesos biológicos diferentes y aparentemente aislados.

En este sentido, el factor neurotrófico derivado del cerebro o *BDNF*, una neurotrofina con efectos morfogénicos importantes en el SNC (Aydemir *et al.*, 2006), y una de las moléculas con mayor relación en la depresión, estableciéndose que niveles bajos en la concentración y disponibilidad periférica de este factor, es una evidencia clara de los trastornos depresivos (Mandolini *et al.*, 2019), siendo inclusive, estimulado positivamente por el uso de fármacos antidepresivos convencionales (An *et al.*, 2019), motivo por el cual, se propone como un posible marcador de respuesta a tratamiento para este padecimiento (Aydemir *et al.*, 2006; Kishi *et al.*, 2018). Por otro lado, *RANTES* (CCL-5) y *EOTAXINA-1* (CCL-11), son moléculas con actividad proinflamatoria y quimioattractora para monocitos y células T auxiliares, así como para eosinófilos, respectivamente, provocando liberación de histamina por basófilos y activando eosinófilos, frente a procesos inflamatorios focalizados (locales), reacciones alérgicas, y de respuesta inmune (Myung *et al.*, 2016; Yoshio & Okamoto, 2018), cuyo papel en los trastornos depresivos no es del todo claro aún, aunque algunas aproximaciones disponibles han comenzado a indagar en esta posibilidad. Ejemplo de ello es el estudio de Oglodek *et al.*, (2014), quienes describieron un incremento en los niveles séricos de *RANTES*, *SDF-1* y sus receptores asociados, tanto en hombres como en mujeres -niveles mucho más elevados en estas últimas- al compararse con sujetos sanos, siendo consistente con la severidad del trastorno. Estas primeras investigaciones sugieren una relación directa con el estrés crónico o agudo, razón por la cual -proponen los autores- podrían emplearse como un posible predictor o marcador de respuesta a tratamiento (Oglodek *et al.*, 2014; Gadad *et al.*, 2017). En este sentido, también se ha reportado actualmente, que el aumento en los niveles periféricos de *Eotaxina-1* está relacionado con la severidad en las conductas suicidas, envejecimiento acelerado y alteraciones cognitivas en algunos desordenes psiquiátricos como esquizofrenia, desorden bipolar y depresión mayor (Teixeira *et al.*, 2018). Aunque la información disponible aún es insuficiente para sugerir implicaciones directas de esta quimiocina en padecimientos psiquiátricos mayores.

Derivado de esta evidencia, se puede contrastar que tanto los resultados obtenidos para la expresión de BDNF y RANTES contenidos en exosomas, se comportan de manera contraria a lo reportado clásicamente en la literatura para estas citocinas en plasma y suero sanguíneo (disminución y aumento, respectivamente) (Oglodek *et al.*, 2014; Mandolini *et al.*, 2019), donde para en el caso de BDNF, se observó un aumento en la cantidad de esta neurotrofina en el grupo de pacientes con TDM respecto a los sujetos sanos ($P= 0.0370$), y para RANTES, una muy marcada y similar disminución de su expresión entre el grupo de sujetos con TDM y aquellos que recibieron tratamiento antidepresivo, respecto a los sujetos sanos ($P= 0.0095$), siendo EOTAXINA-1, la única molécula -de las tres reportadas en nuestro estudio- que mostró un comportamiento correspondiente con los datos descritos en la bibliografía disponible para el trastorno depresivo (Teixeira *et al.*, 2018).

Estos hallazgos, sugieren -por una parte- que el contenido de los exosomas se encuentra aislado totalmente de lo que ocurre en el medio extracelular, y que estos podrían servir como reservorios de proteínas que pueden actuar tanto a nivel periférico como central, aunque esto aún es especulativo, por lo que será necesario realizar estudios adicionales para determinar el origen e independencia de las diferencias halladas, y las interrogantes sobre las variaciones en la concentración de BDNF y otras moléculas dentro de estas nano vesículas, ¿cómo que es que pueden o no, participar de la fisiopatología de este trastorno?, y lo más importante ¿este comportamiento característico, puede ser útil en el diagnóstico, tratamiento o seguimiento de los pacientes con TDM?. Aunque no se puede explicar aún la relación en conjunto que pueden tener estas moléculas, las propuestas e hipótesis al respecto son diversas y muy interesantes, siendo necesario el uso de métodos diversos, precisos, eficaces y sensibles, así como escalados a diferente nivel (*in vitro* vs. *in vivo*, e *in silico*), para identificar la contribución directa y real de esta u otra(s) molécula(s) contenidas en los exosomas, corroborando así estas observaciones.

9.5. Análisis de la interacción proteína-proteína (PPI)

Derivado de los resultados en la expresión de proteínas en los micro arreglos y de las comparaciones entre la interacción de las tres proteínas con diferencias estadísticamente significativas, se corroboró que BDNF, RANTES y EOTAXINA-1, por sí solas están

asociadas en procesos y vías de señalización aparentemente diferentes (ver Gráfica 18, inciso A), sin embargo, al analizar el supuesto de que las proteínas con una expresión media-alta de IR (Ver Tabla 7) tuvieran algún tipo de interacción o señalización asociada, tanto de manera directa o cercana con estas tres proteínas, se identificó que al menos 14 de ellas tuvieron un grado de interacción significativo (ver Gráfica 17, inciso B). Estos hallazgos, podrían tener una relevancia e importancia significativa no solo por los cambios asociados en la expresión de ciertas proteínas en particular, sino, por que ponen en evidencia un aparente y muy complejo comportamiento en un diverso número de proteínas, que de manera conjunta pueden llegar a tener asociaciones y funciones biológicas emparentadas o reguladoras entre sí, y cuya acción principal puede ser el desarrollo, origen o regulación de un estado patológico, como la depresión (ver Figura 18).

Actualmente, diversos estudios fincan sus esfuerzos en la elucidación y entendimiento de la proteómica y genómica de diversas enfermedades, donde, para el caso de los trastornos depresivos y estrés, se comienzan a describir el posible papel de algunas proteínas como agentes reguladores o blancos terapéuticos para estas afecciones (Depeiuch *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017), y aunque en su mayoría, los estudios se conducen en la identificación particular de alguna molécula, no se puede dejar de lado la evidencia y posibilidad de una red de interacción entre diferentes moléculas que pueda estar implicada. De explorar esta nueva aproximación, podría llegar a tener enormes contribuciones al entendimiento de los numerosos mecanismos moleculares involucrados en diversas patologías, como es el caso del TDM.

10. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente proyecto permiten sugerir y concluir que el análisis y caracterización del contenido proteico de los exosomas de participantes con depresión sería relevante para el establecimiento de marcadores de estado, pues se pudo determinar la presencia y expresión de 120 proteínas distintas en los exosomas, mostrando cambios significativos solo para Eotaxina-1, RANTES y BDNF, proteínas que además mostraron la existencia de una compleja red de interacción con otras 14 proteínas también expresadas en los exosomas mediante un análisis bioinformático de interacción entre proteínas (PPI, ver Tabla 7, Figuras 17 y 18), y que tienen implicaciones en vías moleculares y de señalización en procesos biológicos relacionados a inflamación, estrés, metabolismo, entre otros, abriendo la posibilidad de identificar la contribución de proteínas en particular o en conjunto, -que se pueden proponer- como agentes reguladores de los signos y síntomas de los trastornos depresivos. No obstante, el estudio y análisis del contenido proteico de los exosomas merece continuar para conocer en su totalidad el contenido, establecer posibles biomarcadores patológicos relacionados a la depresión mayor, así como determinar cómo y el grado de contribución en el desarrollo del TDM (Ver ANEXO III).

10.1. Limitaciones del estudio

Las principales limitaciones de este estudio son el reducido número de nuestra muestra poblacional, que, para futuros estudios será necesario incrementar para realizar un mejor análisis de los resultados obtenidos. Además, es importante reconocer que, aunque los grupos de muestras utilizados fue seleccionado con criterios rigurosos, es necesario aún, identificar si los exosomas provenientes de pacientes pudieran permitir el establecimiento de marcadores de respuesta a tratamiento comparando con muestras de participantes que reflejen un mejoramiento después de recibir tratamiento farmacológico antidepresivo.

11. PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO

Análisis y caracterización de exosomas por microscopía electrónica de transmisión (MET)

Actualmente la caracterización de exosomas por MET se encuentra en la fase de adquisición y análisis de las imágenes correspondientes a estas nanovesículas. Sin embargo, mencionada determinación se encuentra aplazada, derivado de las medidas tomadas por la UNAM durante la contingencia sanitaria provocada por la pandemia de Covid-19 en nuestro país, en cuanto se restablezcan las actividades de docencia e investigación, los resultados de estas determinaciones serán incluidos en el presente trabajo.

El análisis de los exosomas por microscopía electrónica de transmisión (MET) se realizó de acuerdo con las metodologías estandarizadas para tejidos biológicos del Laboratorio de Nanobiología Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la supervisión del Dr. Luis Felipe Jiménez, así como por la bibliografía consultada en la actualidad sobre la caracterización de exosomas por técnicas de microscopía de alta resolución.

Actualmente el interés en la descripción de diversas características y parámetros estructurales, como el tamaño y forma de las VE, y en particular de los exosomas, provenientes de estados patológicos tiene una gran importancia clínica, por la posible información que puedan aportar al diagnóstico, evaluación y uso como biomarcador en diversas enfermedades (Sharma & Gimzewski, 2012; Jung & Mun, 2018). La metodología empleada frecuentemente para el estudio de exosomas por MET es la tinción negativa, sin embargo, en la actualidad se han reportado el uso de diversas metodologías complementarias de microscopía de alta resolución, como MET, de Barrido, microscopía de fuerza atómica (AFM), microscopía crioelectrónica de transmisión (Cryo-TEM), entre otras (Chernyshev *et al.*, 2015; Choi & Mun, 2017).

Protocolo MET para exosomas. El protocolo inició con el aislamiento de exosomas provenientes de 100 μ L de suero sanguíneo humano de acuerdo con la metodología estandarizada previamente (ver Figura 10, en la sección de Material y Métodos del presente estudio). Para esta determinación, no se empleó el Buffer RIPA de lisado, por

el contrario, solo se adicionó un volumen de 50 μ L de Buffer PBS 1X procurando que el pellet o pastilla con los exosomas íntegros formada en el fondo de un tubo Eppendorf™ de 600 μ L no se disgregara. A partir de este punto se realizaron los siguientes pasos: 1) *Fijación*, se retiró el sobrenadante de PBS 1X y se agregó una solución 1:1 de glutaraldehído 2.5% y paraformaldehído 4%, se dejó fijar por 2 horas a temperatura ambiente; 2) *Lavados*, con 100 μ L de Buffer PBS 1X procurando no disgregar el pellet (3 lavados de 10 minutos); 3) *Tinción con OsO₄*, se empleó una solución al 2% de Tetróxido de Osmio por 3 horas a temperatura ambiente para teñir los lípidos presentes en la membrana de los exosomas; 4) *Lavados*, se realizó una segunda serie de lavados; 5) *Deshidratación*, el pellet de exosomas se sometieron a una serie de deshidratación en soluciones de etanol al 70%, 80%, 90% y 96%, por 5 minutos a temperatura ambiente; 6) *Pre-inclusión*, el pellet teñido (color negro) y deshidratado se sometió a una solución al 50% del polímero de fijación por 24 horas a temperatura ambiente, para la adecuación de la muestra en el proceso de formación del bloque; 7) *Inclusión y Fijación*, se adicionó un volumen suficiente de la solución concentrada del polímero de fijación, y se colocó en una estufa de secado a 56°C entre 24 a 72 horas, para la formación del bloque; 8) *Obtención de ultra secciones y observación de exosomas*, con ayuda de un ultra microtomo, se realizaron secciones de 60 nm de ancho de cada bloque, posteriormente se montaron en el porta muestras del MET y se adquirieron las imágenes correspondientes a 80 kV.

Evaluación de la administración de exosomas de sujetos diagnosticados con TDM en roedores adultos y en cultivo celular

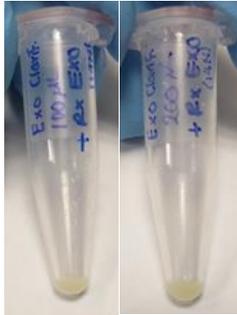
Una de las principales interrogantes a lo largo del desarrollo del presente estudio -e idea original- fue identificar la posible contribución de los exosomas periféricos (suero sanguíneo) en las patologías o conducta tipo depresiva. Una de las principales limitantes de esta primera aproximación fue la posible interacción inmunológica entre la especie receptora (roedor) y la especie emisora de exosomas (humano), aunado al hecho de que sería un estudio muy amplio y con un número significativamente grande de animales de experimentación, esto derivó en la limitación del estudio al análisis y caracterización de los exosomas y su contenido.

Se prevé que este estudio continúe como proyecto de doctorado bajo el objetivo de ahondar en el entendimiento de los mecanismos moleculares y celulares que subyacen al origen, desarrollo y/o propagación de los trastornos depresivos, identificando la posible contribución directa de los exosomas en la neuroplasticidad y en la conducta tipo depresiva. Se prevé que el proyecto incluya dos etapas, la primera se realizará mediante ensayos *in vitro* con células progenitoras de hipocampo humano y con células de la microglía humana; mientras que la segunda etapa del proyecto involucra el uso de animales de laboratorio, para la administración de exosomas con trazadores químicos y posterior evaluación conductual, todo ello como una estrategia para identificar el papel de estas vesículas extracelulares.

12. ANEXO I. ESTANDARIZACION DE LOS MÉTODOS Y TÉCNICAS EMPLEADAS

Estandarización del aislamiento de exosomas de suero sanguíneo

Se realizaron tres pruebas piloto con tres muestras de suero sanguíneo humano diferentes para el Aislamiento de Exosomas con el reactivo *Total Exosome Isolation (from serum) by Life Technologies™ de ThermoFisher Scientific™* (No. Catálogo 4478360), todo ello con la finalidad de establecer, describir y reproducir dicha metodología dentro de las condiciones del Laboratorio de Neurogénesis, del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”.

Tabla 1. Piloto aislamiento de Exosomas de suero sanguíneo*			
<i>Muestra 1 (17 N) → XLH 28/01/2016 -190222-</i>	<i>Muestra 2 (14 N) → PRC 20/04/2016 -182280-</i>	<i>Muestra 3 (10N) → PRC 20/04/2016 -182280-</i>	<i>Grupo Control Muestra → CFNE (Proyecto)</i>
			
<i>*Estandarización de la técnica bajo las condiciones del laboratorio</i>			

Para realizar las pruebas piloto se tomaron en consideración las indicaciones del kit, además se compararon con las descritas en dos artículos originales de investigación que usaron el mismo kit de aislamiento. Las diferencias del contenido de microRNA en exosomas de un paciente con depresión y uno sano fueron previamente reportadas (Zhang *et al.*, 2018); la metodología usada fue exactamente la misma que la sugerida en el kit. Im *et al.*, (2018), investigaron el papel de los exosomas y particularmente el contenido de citoquinas en pacientes con cáncer gástrico; aunque usaron el mismo kit, modificaron la metodología al disminuir los tiempos en la incubación del reactivo con la muestras (>15 horas a -20 °C) y en el de la centrifugación, además, adicionaron un par de lavados con Solución de Buffer de Fosfatos (PBS) a la metodología original del kit.

Diferentes volúmenes de muestras fueron ensayados para las metodologías descritas y observando los resultados entre ellas y al comparar sus resultados, se determinó que la metodología de Zhang y colaboradores (la misma que la del kit) fue la que mostró mejores resultados y con mayor reproducibilidad al obtener la pastilla/pellet de exosomas de suero sanguíneo para las muestras ensayadas (ver Tabla 1).

Estandarización de la determinación del contenido de proteína total de exosomas: método de Bradford

A partir de los exosomas aislados, resuspendidos y lisados de cada una de las muestras ensayadas en las pruebas piloto, se realizó la correspondiente determinación del contenido de proteína mediante un *Micro Bradford* de acuerdo con la metodología previamente descrita (Ver *Material y Métodos* → *Determinación de Proteína Total* → *Procedimiento Micro Bradford*). Las diferentes determinaciones fueron realizadas en tiempos y condiciones distintas una de la otra, clarificado previo por centrifugación, tiempos de incubación, adición de lavados previos de pastilla de exosomas aislados, resuspensión directa de la pastilla en volumen de PBS o RIPA, además se ensayaron varios volúmenes iniciales de muestra.

Los resultados del contenido de proteínas obtenidos para las tres pruebas piloto (cinco ensayos de Micro Bradford diferentes), mostraron una clara diferencia entre sí, viéndose afectadas negativamente (disminución en el contenido de proteínas reportado) para aquellas pruebas que consideraron las dos series de lavados de la pastilla/pellet de exosomas (Prueba Piloto 2, muestra N14, volúmenes 200 μ L y 100 μ L), concluyendo que las condiciones óptimas para el aislamiento de exosomas de suero sanguíneo dentro del Laboratorio de Neurogénesis del INPRFM, son las descritas en el inserto del reactivo *Total Exosome Isolation (from serum) by Life Technologies™ de ThermoFisher Scientific™* (No. Catálogo 4478360), ver Tabla 2.

Tabla 2. Resumen de resultados Pruebas Piloto: Determinación de contenido total de proteínas de exosomas de suero sanguíneo

PRUEBA	MUESTRA	VOLUMEN (μL)	CONTENIDO DE PROTEINA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)		CONDICIONES
Piloto 1	N17	400	4.5018		-Sin clarificado previo -Incubación >72 hrs -Centrifugación en PBS -Resuspensión en RIPA (50 μL)
	N14	400	7.2899		-Sin clarificado previo -Incubación 30 min -Resuspensión en RIPA (50 μL)
Piloto 2	N14	200	EXO 200 μL Lavado = 4.8593	EXO 200 μL Lavado = 0.2934	-Clarificado por centrifugación -Incubación 12-16 hrs -Lavado de pastilla 2 veces (PBS) -Resuspensión (PBS 50 μL)
			Suero s/EXO 200 μL = 6.4439	Suero s/EXO 200 μL = 6.7915	
			Suero original = 5.6271	Suero original = 6.0817	
			EXO 400 Lavado = 0.8080	EXO 400 Lavado = 0.0135	
N14	100	EXO 400 s/Lavado = 6.6072	EXO 400 s/Lavado = 6.9915	-Clarificado por centrifugación -Incubación 12-16 hrs -Lavado de pastilla 2 veces (PBS) Resuspensión (PBS 25 μL)	
		EXO 100 μL Lavado = 5.2513	EXO 100 μL Lavado = 0.4243		
		Suero s/EXO 100 μL = 6.1172	Suero s/EXO 100 μL = 6.1717		
Piloto 3	N10	600	EXOSOMAS = 15.5712 Suero s/EXO = 16.8775 Desecho Clarif = 12.5145 Suero original = 16.4856	-Clarificado por centrifugación -Incubación 30 minutos -Resuspensión RIPA (300 μL) (Condiciones del KIT)	

Estandarización de electroforesis en gel, inmuno transferencia y western blot (WB) para muestras provenientes de exosomas de suero sanguíneo

A lo largo de las Pruebas Piloto realizadas, se observó un comportamiento diferente de la muestra en cada determinación, principalmente en la electroforesis y WB, en el protocolo de Transferencia de proteínas a membrana de celulosa, no se encontraron comportamientos significativos asociados a las muestras, solo se realizaron pequeños ajustes en el tiempo de transferencia. Se logró establecer las características metodológicas a las cuales, las muestras de Suero sanguíneo, Exosomas y derivados, obtuvieron mejores resultados en ellas; en la Tabla 3 se describe la serie de ensayos realizados bajo diferentes condiciones a lo largo de las tres pruebas piloto.

Tabla 3. Estandarización de las determinaciones: Electroforesis y Western Blot, en muestras de exosomas aislados de suero sanguíneo humano.

Fecha	Muestra	Carga de Proteína	Características
09/Nov/2018	N17	N17 = 35 µg	-Se corrieron 2 geles (7 pozos útiles) -Ensayo con 4 Ab (CD63, Lamp1, Alix, CD9)
	N14	N14 = 40 µg	
14/Dic/2018	N17	20 µg	-Se corrieron muestras: Suero original, Exo 400, Sobrenadante 100 µL y 200 µL -Solo se ensayaron Ab para CD63 y Lamp1
	N14		
04/Feb/2019	N10	30 µg	-Corrida 2 geles para 6 membranas con las muestras: Suero original, Suero s/Exo, Exosomas. -Ab ensayados: NACAM, Actina, Lamp1, Alix, CD81, CD63.
08/Feb/2019	N10	30 µg	-Dilución Laemmli-β-Mercaptoetanol 1X -1 gel, dividido en 3 membranas -Ab ensayados: Actina, NCAM, CD63 -Protocolo de bandeado TBE 1% (Actina)
		S.O. S. s/Exo EXO	
19/Feb/2019	N10	S.O.= 15µg	-Dilución Laemmli-β-Mercaptoetanol 1X -Corrida de 2 geles, 2 membranas por c/u, carga de 4 muestras -Ab ensayados: NCAM, CD81, Lamp1, CD63 -Protocolo de Bandeo TBE 1% (todos) - (Fenómeno: membranas quemadas)
		S. s/Exo= 15µg Exo= 40 µg Exo= 30 µg	
04/Mar/2019	N10	S.O.= 10 µg	-Dilución Laemmli-β-Mercaptoetanol 1X -Corrida 1 gel, 3 membranas con 3 muestras c/u -Ab ensayados: NCAM, Lamp1, CD9 -Protocolo de Bandeo TBE 1% (todos) -Aumento en cantidad de proteína Exo fue demasiado → Saturación
		S. s/Exo= 10µg Exo= 50 µg	
12/Mar/2019	N10	S.O.= 10 µg S. s/Exo= 10µg Exo= 40 µg	-Dilución Laemmli-β-Mercaptoetanol 1X -Corrida 2 geles (Tris-Tricine 10-20%, 16.5%), solo sirvió uno (10-20%) -Ab ensayados: NCAM, CD81, CD9

Como se puede apreciar en la Tabla 3, los puntos críticos que requirieron ajustes en las metodologías de electroforesis y western blot, fueron la dilución Laemmli-β-Mercaptoetanol y la cantidad de proteína cargada en los pozos de los geles, respectivamente. Sin embargo, debe considerarse que, para mencionadas pruebas, se emplearon geles precargados (*BIO-RAD*), las muestras que se colocaron variaron entre suero sanguíneo original, suero sin exosomas y exosomas aislados. Los Ab-Primarios que se emplearon principalmente fueron CD9, CD63, CD81 (tetraspaninas características de estas nanovesículas), Alix y Lamp1 (complejos proteicos de membrana) y en las últimas determinaciones se consideró agregar el Ab contra NCAM, como una manera de

rastrear aquellos exosomas provenientes de línea celular neural, sin embargo, se consideró realizar una determinación adicional de los marcadores por la técnica de Dot Blot, con la finalidad de indentificar las condiciones y concentraciones mínimas necesarias para identificar estos marcadores por WB.

También se implementó un *Protocolo de Bando TBE 1%* (Protein gels, Stain Free gel, Faint Bands), el cual consistió en sumergir el gel proveniente de la electroforesis en una solución de Tribromoetanol (TBE) al 1% y detectarla como *Stain Free Gel*, en el foto documentador *ChemiDoc™ Touch Imaging System* de BIO-RAD, todo lo anterior, antes de la correspondiente transferencia para observar un perfil de bando característico entre las proteínas derivadas de una sola muestra (suero sanguíneo original, suero sin exosomas y exosomas aislados), obteniéndose un protocolo más para corroborar las diferencias existentes en el contenido de proteínas en cada muestra de exosomas: pacientes diagnosticados con DM, pacientes con DM más tratamiento antidepresivo y sujetos sanos (Ver Figura 2).

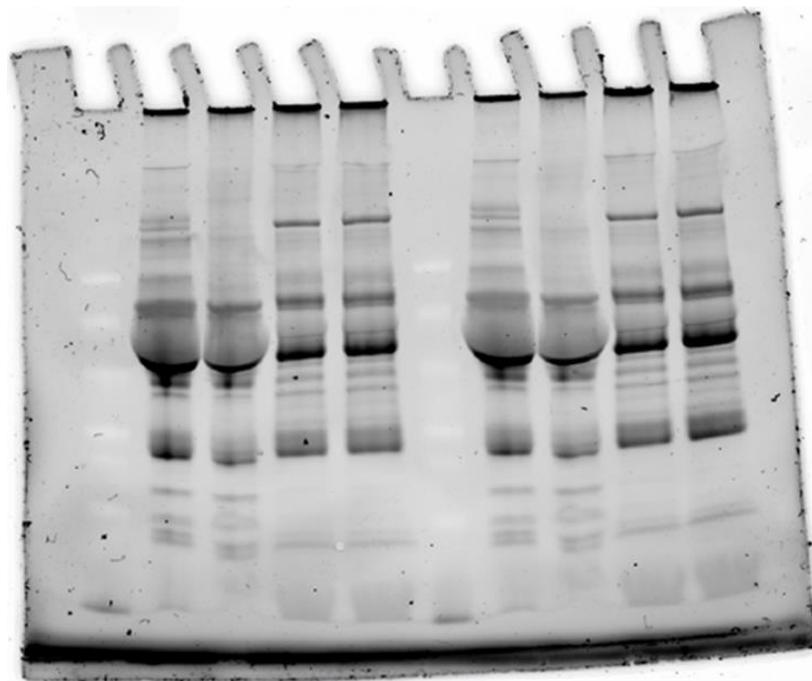
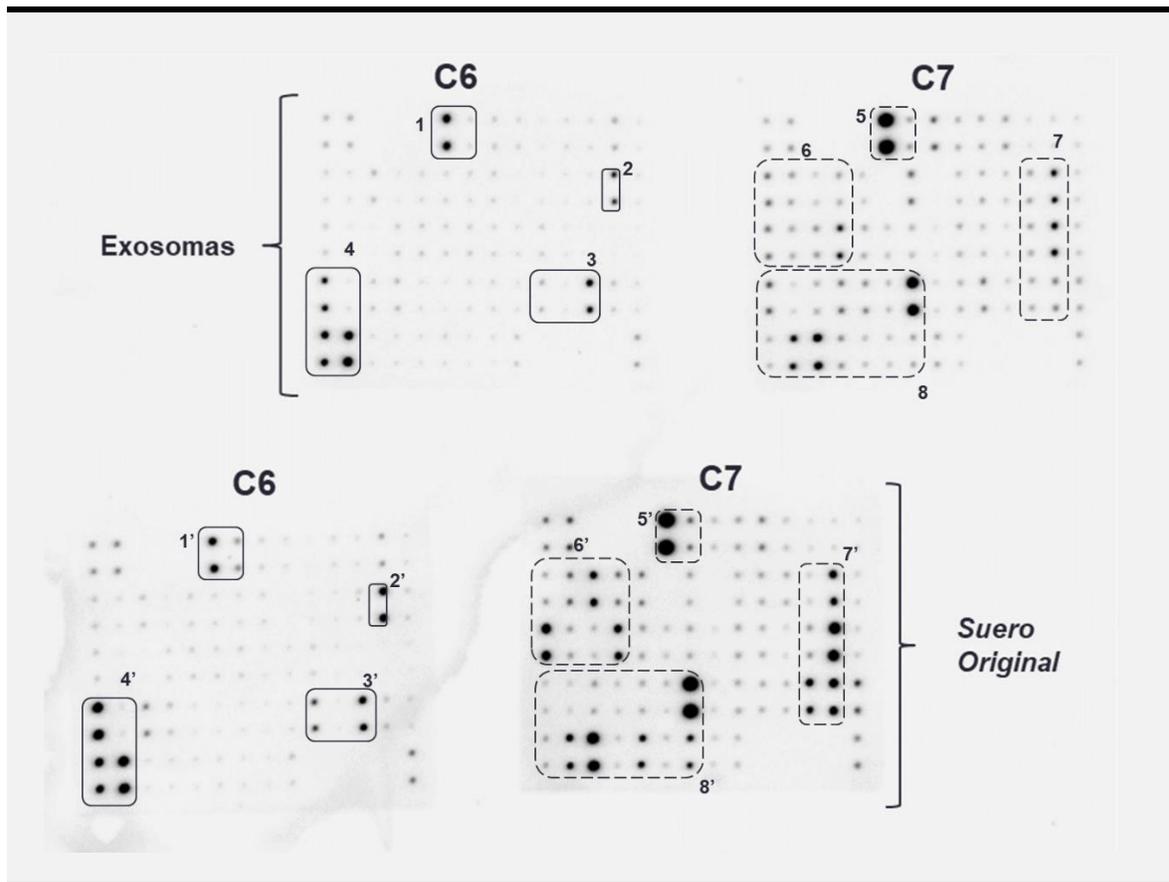


Figura 1. Protocolo Perfil de Bando TBE 1%. Se realizó mediante electroforesis en gel por duplicado para una sola muestra de suero sanguíneo humano; de izquierda a derecha: marcador de peso molecular, suero sanguíneo original, suero sin exosomas, exosomas 40 µg y exosomas 30 µg.

Estandarización del análisis de proteínas contenidas en exosomas usando matrices de micro arreglos

La estandarización de la técnica para el análisis de proteínas por microarreglos, se realizó la muestra CFNE del grupo control; se ensayaron las muestras de proteínas del suero sanguíneo original y de los exosomas, obteniéndose las imágenes de los spots de las membranas C6 y C7 indicadas en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultados prueba piloto de micro arreglo C-1000 para la muestra control CFNE*



*Muestra Grupo Control, población bajo estudio del proyecto

De manera general, sin el análisis adecuado por densitometría, se puede observar algunas diferencias en los spots para ciertas proteínas, identificados entre membranas C6 y C7 del suero original vs exosomas (series 1 a 7 y 1' a 7', mostrados en la Tabla 9). Se requerirá el uso del *Software ImageLab 6.0 de BIO-RAD*.

13. ANEXO II. RESULTADOS COMPLEMENTARIOS

Aislamiento de exosomas de suero sanguíneo

Una vez estandarizada la técnica, se llevó a cabo el correspondiente aislamiento de exosomas provenientes de muestras de suero sanguíneo de los tres grupos experimentales descritos previamente:

- 1) *Grupo Control*, sujetos sanos;
- 2) *Grupo Sujetos Deprimidos*, sujetos diagnosticados con Trastorno Depresivo Mayor;
- 3) *Grupo Sujetos Deprimidos más Tratamiento Farmacológico*, sujetos que además de ser diagnosticados con Trastorno Depresivo Mayor cuentan con tratamiento farmacológico antidepresivo.

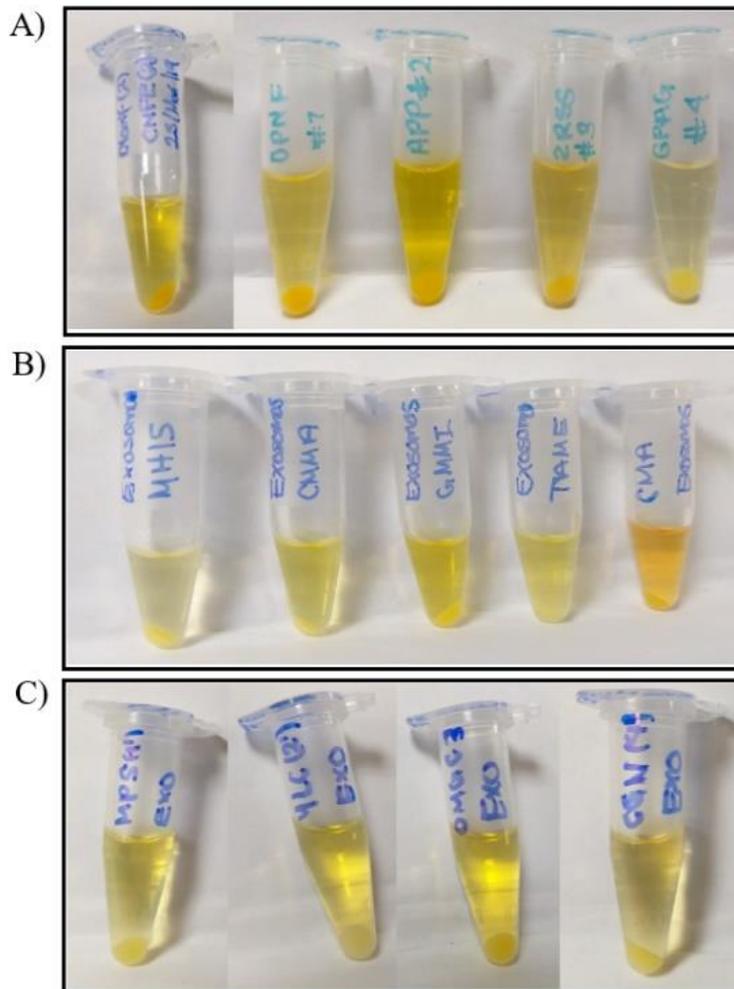
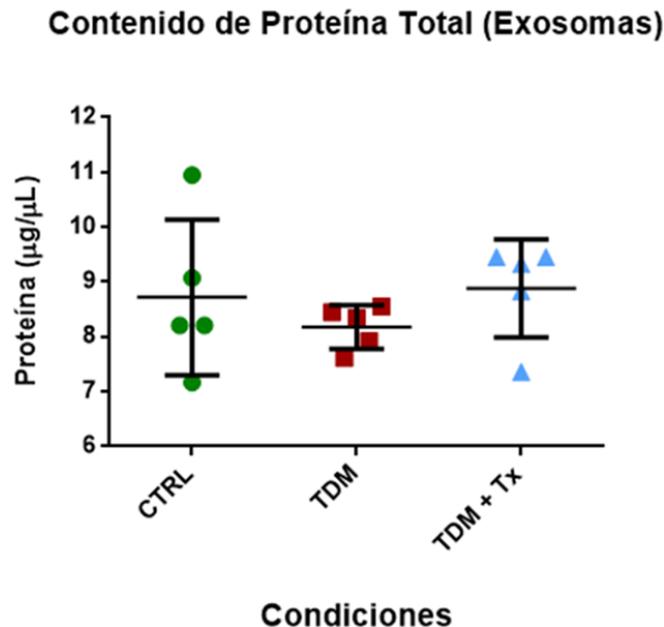


Figura 2. Pastilla de exosomas formada en el fondo de tubo Eppendorf® para las diferentes muestras. A) Grupo Sujetos Control o sanos (CTRL), B) Grupo Pacientes Diagnosticados con TDM (TDM), y C) Grupo Pacientes Diagnosticados con TDM más Tratamiento Farmacológico (TDM + TX).

Se empleó el reactivo *Total Exosome Isolation (from serum) by Life Technologies™* de *ThermoFisher Scientific™* (No. Catálogo 4478360), para el aislamiento de exosomas, lográndose obtener reproducibilidad para obtener la pastilla o pellet de las nano vesículas en cuestión; en cada una de las muestras de los grupos se formó en el fondo del tubo Eppendorf una pastilla de color amarillo opaco (ver Figura 2), acorde a lo reportado en la hoja técnica y manual de usuario del reactivo, además de la bibliografía correspondiente (Zhang *et al.*, 2018; Girijesh *et al.*, 2019).

Análisis del contenido total de proteína de exosomas

La Gráfica 1 muestra el comportamiento de dispersión entre los valores de proteína total contenida en exosomas de un primer análisis: una alta dispersión para los valores del grupo CTRL, y una compresión para los valores del grupo TDM, los cuales se vieron revertidos en un aparente comportamiento que tiende a la dispersión, asociado quizá en primera instancia al tratamiento antidepresivo, pues estos eran en comportamiento de sus respectivas dispersiones, más parecidos a los del grupo CTRL.



ANOVA 1 Vía ($F_{(2, 12)} = 0.6989$; $p = 0.5165$; $\alpha = 0.05$)

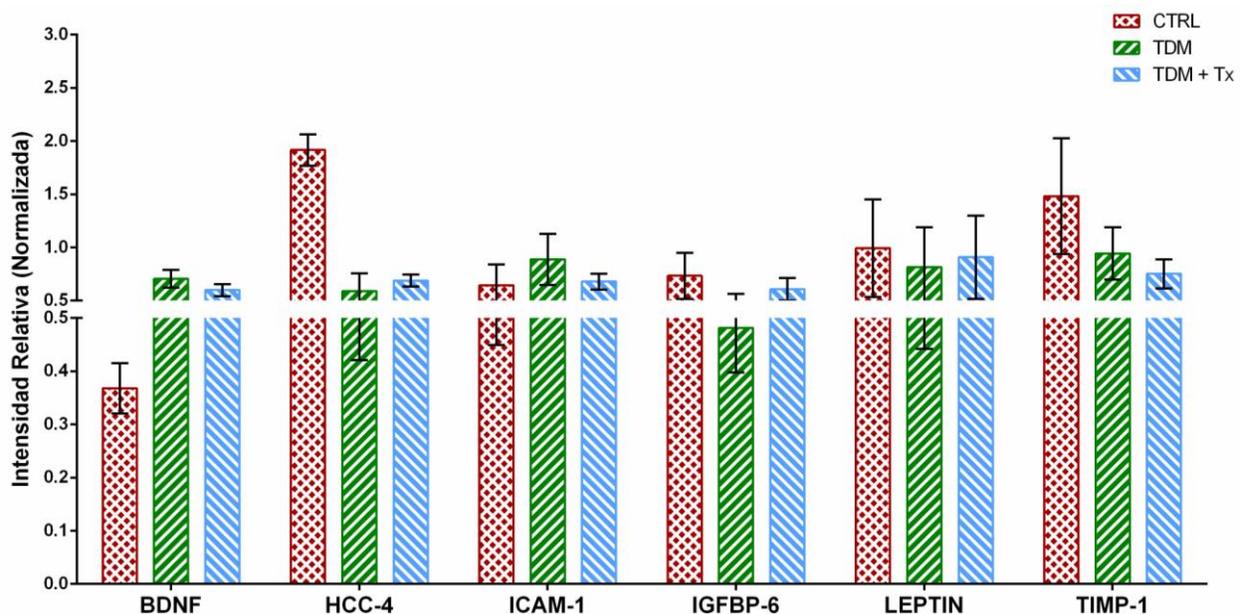
Gráfica 1. Primer análisis de varianza, ANOVA 1 Vía para contenido de proteína total de exosomas de suero sanguíneo.

Tabla 5. Principales datos químico-clínicos y demográficos, obtenidos de los participantes en cada grupo experimental

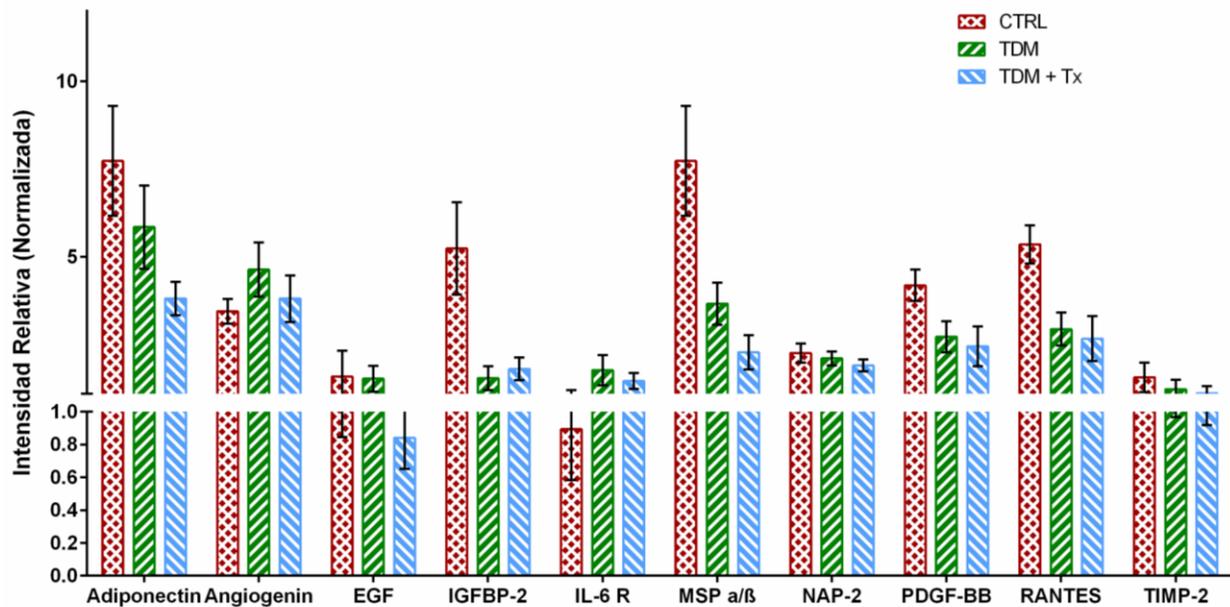
Participantes	Edad	Hamilton	Diagnostico	Tratamiento	Fase de Ciclo	FSH (mIU/mL)	LH (mIU/mL)	Progesterona (ng/mL)	Estradiol (pg/mL)	Testosterona Total (ng/mL)	Testosterona Libre (pg/mL)	
CTRL	1	20	0	CONTROL	NINGUNO	FOLICULAR TARDIA	4.06	10.30	1.50	79.277	0.35	1.30
	2	25	1	CONTROL	NINGUNO	FOLICULAR TEMPRANA	6.47	1.91	0.20	32.4	0.27	2.18
	3	31	3	CONTROL	NINGUNO	FOLICULAR TEMPRANA	4.83	6.33	7.71	69.8	0.37	5.14
	4	38	7	CONTROL	NINGUNO	FOLICULAR TEMPRANA	3.60	5.11	1.39	20.4	0.44	1.53
	5	29	8	CONTROL	NINGUNO	LUTEA TARDIA	5.70	4.34	2.64	30.8	0.46	2.81
TDM	1	20	24	UNIPOLAR	NINGUNO	FOLICULAR TEMPRANA	5.87	5.44	1.66	17.73	0.34	0.78
	2	25	20	UNIPOLAR	NINGUNO	FOLICULAR TARDIA	2.16	5.31	4.47	50.219	0.49	1.43
	3	33	17	UNIPOLAR	NINGUNO	FOLICULAR TARDIA	5.97	4.01	2.70	32.675	0.42	1.82
	4	43	24	UNIPOLAR	NINGUNO	FOLICULAR TEMPRANA	5.84	16.60	1.71	185.96	0.23	0.57
	5	28	20	UNIPOLAR	NINGUNO	FOLICULAR TEMPRANA	5.60	11.70	1.24	49.396	0.65	1.17
TDM + TX	1	19	17	UNIPOLAR	FLUOXETINA, CLONAZEPAN Y TOPIRAMATO	FOLICULAR TEMPRANA	4.23	2.93	0.434	54.40	0.62	2.24
	2	24		UNIPOLAR	ESCITALOPRAM	FOLICULAR TEMPRANA	3.33	2.15	0.31	22.60	0.20	4.39
	3	32	25	UNIPOLAR	CITALOPRAM Y AMISULPIRIDE	FOLICULAR TEMPRANA	5.09	0.466	0.476	38.60	0.41	0.15
	4	43	14	UNIPOLAR	FLUOXEITNA Y QUETIAPINA	LUTEA TEMPRANA	3.53	1.45	5.72	61.30	0.23	2.39
	5	29	23	UNIPOLAR	FLUOXETINA Y CLONAZEPAM	FOLICULAR TEMPRANA	7.46	5.84	0.30	39.10	0.23	1.86

Análisis de proteínas por matrices de microarreglos de proteínas

Las gráficas 2 y 3, muestran el comportamiento entre los grupos experimentales de aquellas proteínas que mostraron tener una expresión de IR media-alta (>0.5), de acuerdo con un primer análisis descriptivo. Se puede observar comportamientos en interesantes en estas proteínas, sin embargo, no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en los análisis estadísticos posteriores, ello puede sugerir que se debe considerar su posible participación en un intrincado equilibrio en las patologías depresivas, aunque esto es especulativo. Serán necesarios mayores estudios que logren elucidar el papel o no de este grupo de moléculas con comportamiento peculiar.

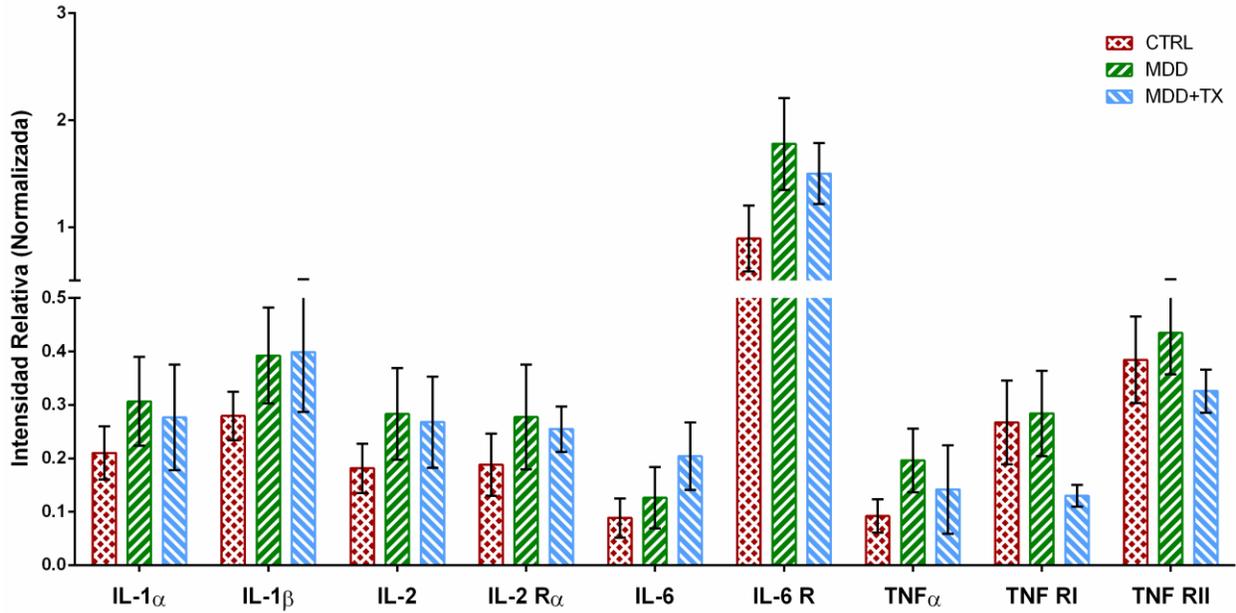


Gráfica 2. Expresión de proteínas con IR Media (0.50-0.99). Se presentan las medias obtenidas de cada grupo experimental y el correspondiente error estándar (EE), respecto al control de cada membrana analizada.



Gráfica 3. Expresión de proteínas con IR Alta (0.50-0.99). Se presentan las medias obtenidas de cada grupo experimental y el correspondiente error estándar (EE), respecto al control de cada membrana analizada.

En la gráfica 4, se muestra el comportamiento de la expresión de IR para las proteínas (citoquinas) asociadas con los trastornos depresivos. Originalmente se esperaba que algunas citocinas, quimiocinas y otras proteínas asociadas a estos trastornos, estuvieran alterados en su expresión de IR respecto al grupo CTRL, sin embargo, no fue así y una vez realizadas las comparaciones estadísticas, estas no mostraron diferencias significativas en la expresión de la, aunque en algunos casos se observó que la expresión de las proteínas entre los grupos tuvo un comportamiento característico respecto al control, en el que se observó un aumento en el grupo TDM y una posterior disminución para el grupo TDM+TX, ejemplo de ello son las IL-1 α , TNF α , TNF RI, TNF RII, e IL-6 R, donde en esta última proteína -por ejemplo-, se observa una expresión muy elevada de su IR.



Gráfica 4. Expresión de IR para proteínas asociadas con trastornos depresivos. No existieron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Se presentan las medias obtenidas de cada grupo experimental y el correspondiente error estándar (EE), respecto al control de cada membrana analizada.

14. BIBLIOGRAFIA

- Acheson A, Conover JC, Fandl JP, DeChiara TM, Russell M, Thadani A, Squinto SP, Yancopoulos GD, Lindsay RM, (1995). A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature*.
- Aguilera-Rojas M, Badewien-Rentzsch B, Plendl J, Khon B, Einspanier R. (2018). Exploration of serum -and cell culture- derived exosomes from dogs. *BMC Veterinary Research*; 14:179.
- Aguirre A. (1996). Depresión y religión: Acedia, luto y nostalgia. In J. A. González Alcántud, & S. Rodríguez Becerra (Eds.), *Creer y curar: La medicina popular* (pp. 361-380). Granada, España.
- Al-Shweiki MHD, Oelk P, Steinacker P, Hengerer B, Schönfeldt-Lecuona C, Otto M. (2017). Major depressive disorder: insight into candidate cerebrospinal fluid protein biomarkers from proteomics studies. *Expert Review Proteomics*; 6(14): 10.1018.
- Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin HF, Betts C, Lakhali S, Wood MJA. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature Biotechnology Letters*; 4(29): 341-345.
- Álvarez-Mon MA, Pereira V, Ortuño F. (2017). Tratamiento de la depresión. *Medicine*; 12(46):2731-2742.
- Alzoubi A, Abunaser R, Khassawneh A, Alfaqih M, Khassawneh A, Abdo N. (2018). The bidirectional relationship between diabetes and depression: A literature review. *Korean J Fam Med*; 39:137-146.
- American Psychiatric Association (APA), Washington, D.C., Pichot P. (1995). *Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales*. Barcelona, España: Masson S.A.
- An JH, Jang EH, Kim AY, Fava M, Mischoulon D, Papakostas GI, Na EJ, Jang J, Yu HY, Hong JP, Jeon HJ. (2019). Ratio of plasma BDNF to leptin levels are associated with treatment response in major depressive disorder but not in panic disorder: A 12-week follow-up study. *Journal of Affective Disorders*; 259: 349-354.
- Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJ. (2013). Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature Rev Drug Discov*; 12(5):347-357.
- Asadikaram G, Khaleghi E, Sayadi A, Foulady S, Ghasemi MS, Abulhassani M, Garrusi B, Nematollahi MH. (2014). Assessment of hormonal alterations in major depressive disorder: clinical study. *PsyCh Journal*; 4(8): 423-430.
- Aydemir C, Yalcin ES, Aksaray S, Kisa C, Yildirim SG, Uzbay T, Goka E. (2006). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) changes in the serum of depressed women. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*; 30:1256-1260.
- Bahrini I, Song Jh, Diez D, Hanayama R. (2015). Neuronal exosomes facilitate synaptic pruning by up-regulating complement factors in microglia. *Scientific Reports*; 5:1-8.

- Banigan MG, Kao PF, Kozubek JA, Winslow AR, Medina J, Costa J, Schmitt A, Schneider A, Cabral H, Cagsal-Getkin O, Vanderburg CR, Delalle I. (2013). Differential expression of exosomal microRNAs in prefrontal cortices of schizophrenia and bipolar disorder patients. *PLoS ONE*; 8(1): e48814.
- Baranyai T, Herczeg K, Onódi Z, Voszka I, Módos K, Marton N. (2015). Isolation of exosomes from blood plasma: qualitative and quantitative comparison of ultracentrifugation and size exclusion chromatography methods. *PLoS One*: 10: e0145686.
- Bartoli F, Crocarno C, Dakanalís A, Riboldi I, Miotto A, Brusich E, Clerici M, Carrà G. (2017). Association between total serum cholesterol and suicide attempts in subjects with major depressive disorder: Exploring the role of clinical and biochemical confounding factors. *Clinical Biochemistry*, 6(50): 274-278.
- Bartra R. (2015). Transgresión y melancolía en el México Colonial. Pp. 159-177. CEIICH-UNAM. Distrito Federal, México.
- Batiz LF, Castro MA, Burgos PV, Velásquez ZD, Muñoz RI, Lafourcade CA, Troncoso-Escudero P, Wyneken U. (2016). Exosomes as novel regulators of adult neurogenic niches. *Frontiers in Cellular Neuroscience*; 9:1-28.
- Berenzon S, Lara MA, Robles R, Medina-Mora ME. (2013). Depresión: estado del conocimiento y necesidad de políticas públicas y planes de acción en México. *Salud Pública de México*; 1(55): 74-80.
- Black CN, Bot M, Scheffer PG, Snider H, Penninx BJW. (2018). Uric acid in major depression and anxiety disorders. *Journal of Affective Disorders*; 1(225): 684-690.
- Bobrie A, Colombo M, Raposo G, Théry C. (2011). Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic*; 12:1659–1668.
- Boccio-Chiavetto L, Bagnardi V, Zanardini R, Molteni R, Nielsen MG, Placentino A, Giovannini C, Rilloso L, Ventriglia M, Riva MH, Gennarelli M. (2011). Serum and plasma BDNF levels in major depression: A replication study and meta-analyses. *The World Journal of Biological Psychiatry*; 11: 763-773.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*; 72:248-254.
- Bright T. (1586). -2004- Un tratado de Melancolía. Ed. *Asociación Española de Neuropsiquiatría*. Pp. 17-42. Marcial Pons. Madrid, España.
- Brites D, Fernandes A. (2015). Neuroinflammation and depression: microglia activation, extracellular microvesicles and microRNA dysregulation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*; 476(9): 1-20.
- Burton R. (1621). -1947- Anatomía de la Melancolía. *Colección Austral*. Pp. 13-67. Ed. ESPASA-CALPE, S.A., Buenos Aires, Argentina.
- Camussi G, Deregibus MC, Bruna S, Cantaluppi V, Biancone L. (2010). Exosomes/Microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney International*; (1): 07-11.

- Carvallo P, Astudillo P. (2016). Efecto terapéutico de los exosomas en el ACV isquémico en animales de experimentación. *Int. J. Morphol.*; 34(4): 1300-1307.
- Ceballos-Martínez I, Sandoval-Jurado L, Jaimes-Mundo E, Medina-Peralta G, Madera-Gamboa J, Fernández-Arias YF. (2010). Depresión durante el embarazo. Epidemiología en mujeres mexicanas. *Revista del Instituto Mexicano del Seguro Social*; 1(48): 71-74.
- Chan KL, Cathomas F, Russo SJ. (2019). Central and peripheral inflammation link metabolic syndrome and major depressive disorder. *Physiology*; 34:123-133.
- Chaudhari K, Khanzode S, Khanzode S, Dakhale G, Saoji A, Sarode S. (2010). Clinical correlation of alteration of endogenous antioxidant-uric acid levels in major depressive disorder. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*; 25: 77-81.
- Cheng L, Sharples RA, Scicluna BJ, Hill AF (2014) Exosomes provide a protective and enriched source of MiRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood. *J Extracell Vesicles*; 3:23743.
- Chernyshev VS, Rachamadugu R, Tseng YH, Belnap DM, Jia Y, Branch KJ, Butterfield AE, PeaseLF, Bernard PS, Skliar M. (2015). Size and shape characterization of hydrated and desiccated exosomes. *Anal Bioanal Chem*; 407: 3285-3301.
- Choi H, Mun JY. (2017). Structural analysis of exosomes using different types of electron microscopy. *Applied Microscopy*; 47(3): 171-175.
- Colombo M, Raposo G, Théry C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*; 30:255–289.
- Cruzblanca-Hernández H, Lupercio-Coronel P, Collas-Aguilar J, Castro-Rodríguez E. (2016). Neurobiología de la depresión y su tratamiento farmacológico. *Salud Mental*; 1(39): 47-58.
- Dalvi P, Sun B, Tang N, Pulliam L. (2017). Immune activated monocyte exosomes alter microRNAs in brain endothelial cells and initiate an inflammatory response through the TLR4/MyD88 pathway. *Scientific Reports*; 9954(7):1-12.
- Dean J, Keshavan M. (2017). The neurobiology of Depression: An integrated view. *Asian Journal of Psychiatry*; 27:101-111.
- Depeiuch J, Sowa-Kucma M, Nowak G, Pappo M, Gruca P, Misztak P, Parlinska-Wojtan M. (2017). Qualitative and quantitative changes in phospholipids and proteins investigated by spectroscopic techniques in animal depression model. *Spectrochemical Acta, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*; 179: 30-37.
- Evrensel A, Ceylan ME. (2015). The gut-brain axis: The missing link in depression. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*; 13(3):239-244.
- Fang DYP, King HW, Li JYZ, Gleadle JM. (2013). Exosomes and the kidney: Blaming the messenger. *Nephrology*; 18:1-10.
- Fava M, Kendler KS. (2000). Major depressive disorder. *Neuron*; 28:335-341.
- Felger JC, Lotrich FE. (2013). Inflammatory cytokines in depression: neurobiological mechanisms and therapeutic implications. *Neuroscience*; 246:199–229.

- Foley DL, Morley KI, Madden PAF, Heath AC, Whitfield JB, Martin NG. (2010). Major depression and the metabolic syndrome. *Twin Research and Human Genetics*; 4(13): 347-358.
- Freud S. (1895). General theory on neuroses. In: Freud A, ed. The Standard Edition of the Complete Psychological Works of Sigmund Freud. London: Hogarth Press. U.K.
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.*; 19:92–105.
- Gadad BS, Jha MK, Czysz A, Furman JL, Mayes TL, Emslie MP, Trivedi MH. (2018). Peripheral biomarkers of major depression and antidepressant treatment response: Current knowledge and future outlooks. *Journal of Affective Disorders*; 233: 3-14.
- Gerhard DM, Wohleb ES, Duman RS. (2016). Emerging treatment mechanism for depression: focus on glutamate and synaptic plasticity. *Drug Discovery Today*; 3(21): 454-464.
- Girijesh KP, Mohammad AK, Haseed Z, Sanjeer KS, Moh'd K, Seema S, Ajay PS. (2019). Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications. *SCIENTIFIC REPORTS*; 9:1-10.
- Goetzl LJ, Mustapic M, Kapogiannis D, Eitan E, Lobach IV, Goetzl L, Schwartz JB, Miller BL. (2016). Cargo proteins of plasma astrocyte-derived exosomes in Alzheimer's disease. *The FASEB Journal*; (30): 3853-3859.
- Gómez-Molina C, Snadoval M, Henzi R, Ramírez JP, Varas-Godoy M, Luarte A, Lafourcade CA, López-Verrilli A, Smalla KH, Kaehne T, Wyneken U. (2019). Small extracellular vesicles in rat serum contain astrocyte-derived protein biomarkers of repetitive stress. *International Journal of Neuropsychopharmacology*; 22(3): 232-246.
- González-Pinto A. (2020). Esketamina intranasal: un nuevo abordaje para el tratamiento de la depresión resistente a tratamiento. *Psiquiatr. Biol.*; 27(1):9-15.
- Grapp M, Wrede A, Schweizer M, Hüwel S, Galla HJ, Snaidero N. (2013). Choroid plexus transcytosis and exosome shuttling deliver folate into brain parenchyma. *Nat. Commun.*; 4:2123.
- Greenberg ME, Xu B, Lu B, Hempstead BL. (2009). New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J Neurosci.*;29:12764–12767.
- Gui SW, Liu YY, Zhong XG, Liu X, Zheng P, Pu JC, Zhou J, Chen JJ, Zhao LB, Liu LX, Xu G, Xie P. (2018). Plasma disturbance of phospholipid metabolism in major depressive disorder by integration of proteomics and metabolomics. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*; 14:1451-1461.
- Gui Y, Liu H, Zhang L, Lv W, Hu X. (2015). Altered microRNA profiles in cerebrospinal fluid exosome in Parkinson disease and Alzheimer disease. *Oncotarget*; 6:37043–37053.

- Gutierrez-Lobos K, Scherer M, Anderer P, Katschnig H. (2002). The influence of age on the female/male ratio of treated incidence rates in depression. *BMC Psychiatry*; 2:3.
- Hamblin C, Barnett ITR, Hedger RS. (1986). A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. I Development and method of ELISA. *Journal of Immunological Methods*; 93:115-121.
- Hamilton M. (1960). A rating scale for depression. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*; 23: 56–62.
- Harding C, Stahl P. (1983). Transferrin recycling in reticulocytes: pH and iron are important determinants of ligand binding and processing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 113: 650–658.
- Harrison P, Gardiner C, Sargent IL. (2014). Extracellular vesicles in health and disease. Boca Raton, FL, USA. Taylor & Francis Group, LLC.
- Hesvevik NP, Llorente A. (2018). Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences*; 75: 193-208.
- Hikita T, Miyata M, Watanabe R, Oneyama C. (2018). Sensitive and rapid quantification of exosomes by fusing luciferase to exosome marker proteins. *SCIENTIFIC REPORTS*; 8(14035): 1-14.
- Huang TL, Lee CT, Liu YL. (2008). Serum brain-derived neurotrophic factor levels in patients with major depression: Effects of antidepressants. *Journal of Psychiatric Research*; 42: 521-525.
- Iavello A, Frech VSL, Gai C, Deregibus MC, Quesenberry PJ, Camussi G. (2015). Role of Alix in miRNA packaging during extracellular vesicle biogenesis. *International Journal of Molecular Medicine*; 37: 958-966.
- Inta D, Wölnerhanssen BK, Meyer-Gerspach AC, Lang E, Schweinfurth N, Mallien AS, Vasilescu A-N, Schmidt A, Rea K, Westendorf AM, Tremblay M-E, Sartorius A, Gass P, Cryan JF, Borgwardt S, Lang UE. (2020). Common pathways in depression and obesity: The role of gut microbiome and diets. *Curr Behav Neurosci Rep*; 7:15-21.
- Jan AT, Malik MA, Rahman S, Yeo HR, Lee EJ, Abdullah TS, Choi I. (2017). Perspective insights of exosomes in neurodegenerative diseases: A critical appraisal. *Frontiers in Aging Neuroscience*; (9):1-8.
- Janas AM, Sapoń K, Janas T, Stowell MHB, Janas T. (2016). Exosomes and other extracellular vesicles in neural cells and neurodegenerative diseases; *Biochimica et Biophysica Acta*; 1858: 1139-1151.
- Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.*; 262:9412–9420.
- JoVE Science Education Database. (2020). The ELISA method. *Basic Methods in Cellular and Molecular Biology*. JoVE, Cambridge, MA, USA.

- Jung MK, Mun JY. (2018). Sample preparation and imaging of exosomes by transmission electron microscopy. *J. Vis. Exp.*; (131): e56482.
- Kaur A, Leishangthem GD, Bhat P, Mahajan V, Singh ND, Banga HS. (2014). Role of exosomes in pathology – A review. *Journal of Pathology and Toxicology*; (1): 07-11.
- Kruger NJ. (2009). Chapter 4, The Bradford method for protein quantitation. *The Protein Protocols Handbook. Third Edition*. Humana Press, a Part of Springer Science + Business Media, LLC.
- Kumar A, Gupta RC, Arura M, Sharma R, Kumar D. (2019). Assessment of serum TSH and prolactin levels among patients with major depressive disorder. *IJRAR*; 1(16): 266-270.
- Kuo WP, Jia S. (2017). Extracellular Vesicles. Methods and Protocols. Halfield, Hertfordshire, U.K. Humana Press.
- Kupfer DJ, Frank E, Phillips ML. (2016). Major depressive disorder: New clinical, neurobiological, and treatment perspectives. *Focus*; 2(14): 266-276.
- Lachenal G, Pernet-Gallay K, Chivet M, Hemming FJ, 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 Neuroscience*; 46:409-418.
- Lafourcade C, Ramírez JP, Luarte A, Fernández A, Wyneken U. (2016). miRNAs in astrocyte-derived exosomes as possible mediators of neural plasticity. *Journal of Experimental Neuroscience*; 10:1-9.
- Lara MA, Acevedo M, Berenzon S. (2004). La depresión femenina vista desde la subjetividad en las mujeres. *Cad. Saúde Pública ARTIGO*; 20(3): 818-828.
- Larios J, Mercier V, Roux A, Gruenberg J. (2020). ALIX-and ESCRT-III-dependent sorting of tetraspanins to exosomes. *J Cell Biol*; 3(219): 1-22.
- Lee Y, EL Andaloussi S, Wood MJA. (2012). Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Human Molecular Genetics*; 1(21): R125-R134.
- Leonard BE, Aricioglu F. (2020). Inflammation, insulin resistance and the pathophysiology of depression: implications for novel antidepressant developments. *Psychiatry and Clinical Psychopharmacology*; 30(1): 71-80.
- Li C, Guo Z, Zhao R, Sun W, Xie M. (2017). Proteomic analysis of liver proteins in a rat model of chronic restraint stress-induced depression. *Hindawi, BioMed Research International*; DOI.10.1155.
- Li JJ, Wang B, Kodali MC, Chen C, Kim E, Patters BJ, Lan L, Kumar S, Wang X, Yue J, Liao FF. (2018). In vivo evidence for the contribution of peripheral circulating inflammatory exosomes to neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation*; 8(15):1-16.

- Liu W, Lin, H, He X, Chen L, Dai Y, Jia W, Xue X, Tao J, Chen L. (2020). Neurogranin as a cognitive biomarker in cerebrospinal fluid and blood exosomes for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Traslational Psychiatry*; 10(125): 1-9.
- López JP, Kos A, Turecki G. (2017). Major depression and its treatment: micro RNAs as peripheral biomarkers of diagnosis and treatment response. *Current Opinion Psychiatry*; 00(30): 1-10.
- López-Correa P, Casasbuenas-Ayala J. (2015). La biopsia y la citología, pilares del diagnóstico médico (I parte). *Revista Médica Sanitas*; 18(1): 29-38.
- López-Muñoz F, Alamo C. (2009). Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today. *Current Pharmaceutical Design*; 15:1563-1586.
- Luarte A, Cisternas P, Caviedes A, Batiz LF, Lafourcade C, Wyneken U, Henzi R. (2017). Astrocytes at the hub of the stress: Potential modulation of neurogenesis by miRNAs in astrocyte-derived exosomes. *Stem Cells International*; 1719050:1-13.
- Luque R, Berrios GE. (2011). Historia de los trastornos afectivos. *Rev. Colomb. Psiquiat. Suplemento* (40):130-146.
- Maravillas-Montero JL, Martínez-Cortés I. (2017). Los exosomas de las células presentadoras de antígeno y su papel en la regulación de las respuestas inmunológicas. *Rev Alerg Mex*; 64(4): 463-476.
- Martinowich K, Manji H, Lu B. (2007). New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nature Neuroscience*; 9(10): 1089-1093.
- McIntyre RS, Park KY, Law CWY, Sultan F, Adams A, Lourenco MT, Lo AKS, Soczynska JK, Woldeyohannes H, Alsuwaidan M, Yoon J, Kennedy SH. (2010). The association between conventional antidepressants and the metabolic syndrome, A review of the evidence and clinical implications. *CNS Drugs*; 24(9): 741-753.
- Medina-Torres EA, Espinosa-Rosales F. (2009). Microarreglos: Tecnología con aplicaciones en el campo de la salud humana. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*; 2(18):52-59.
- Mehrdad KS, Rahim A, Asghar S, Sedigheh M. (2016). Assessment of serum triiodothyronine (T3), thyroxin (T4) and thyroid-stimulating hormone (TSH) levels among patients with major depressive disorders (MDD) in Hamedan northwestern Iran. *Jentashpir Journal of Cellular and Molecular Biology*; 2(7): 1-5.
- Miller BH, Wahlestedt C. (2010). MicroRNA dysregulation in psychiatric disease. *Brain Res.*; 18:89–99.
- Monteleone P, Serritella C, Martiadis V, Maj M, (2008). Decreased levels of serum brain-derived neurotrophic factor in both depressed and euthymic patients with unipolar depression and in euthymic patients with bipolar I and II disorders. *Bipolar Disord*; 10 (1): 95–100.
- Mori N, Caballero J. (2010). Historia natural de la depresión. *Rev Peruana de Epidemiología*; 2(14): 86-90.

- Myung W, Lim SW, Woo HI, Park JH, Shim S, Lee SY, Kim DK. (2016). Serum cytokine levels in major depressive disorder and its role in antidepressant response. *Korean Neuropsychiatric*; 13(6): 644-651.
- Noble JE, Bailey MJA. (2009). Chapter eight, Quantitation of protein. *Methods in Enzymology*; (463): 73-95.
- Noble RE. (2005). Depression in women. *Metabolism Clinical and Experimental*; 54(Suppl): 49-52.
- Oglodek EA, Szota A, Marek JJ, Mos D, Araszkiwicz A. (2014). Comparison of chemokines (CCL-5 and SDF-1), chemokine receptors (CCR-5 and CXCR-4) and IL-6 levels in patients with different severities of depression. *Pharmacological Reports*; 66: 920-926.
- Olguner-Eker Ö, Özsoy S, Eker B, Doğan H. (2017). Metabolic effects of antidepressant treatment. *Arch Neuropsychiatry*; 54:49-56.
- Olusi SO, Fido AA. (1996). Serum lipid concentrations in patients with major depressive disorder. *Biological Psychiatry*; 11(40): 1128-1131.
- Organización Mundial de la Salud, (OMS). (2020, 30 de enero). Depresión, Notas Descriptivas. Centro de Prensa, OMS. Recuperado el 01 marzo de 2020, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/depression>
- Orozco-Romero MJ, Borja-Urby R, Ponce-Castañeda MV, Durán-Figueroa NV. (2016). Aislamiento y caracterización celular de exosomas de plasma para su uso como biomarcadores de diagnóstico. *Acta Bioquím Clín Latinoam*; 50(4): 783-790.
- Özen ME, Örümlü MH, Kalenderoğlu A, Atmaca M. (2018). Relationship between thyroid function disorder and severity of major depressive disorder. *Klinik Psikofarmakoloji Bulteni*; 28(100).
- Park YM, Lee BH, Lee SH. (2014). The association between serum lipids levels, suicide ideation, and central serotonergic activity in patients with major depressive disorder. *Journal of Affective Disorders*; 159: 62-65.
- Pasco JA, Nicholson GC, Williams LJ, Jacka FN, Henry MJ, Kotowicz MA, Schneider HG, Leonard BE, Berk M. (2010). Association of high-sensitivity C reactive protein with de novo major depression. *Br. J. Psychiatry*; 197(5):372–377.
- Peng YF, Xiang Y, Wei YS. (2016). The significance of routine biochemical markers in patients with major depressive disorder. *SCIENTIFIC REPORTS*; 6(34402): DOI.10.1038.
- Pérez-Padilla EA, Cervantes-Ramírez VM, Hijuelos-García NA, Pineda-Cortés JC, Salgado-Burgos H. (2017). Prevalencia, causas y tratamiento de la depresión mayor. *Rev Biomed*; 28:89-115.
- Polacchini A, Metelli G, Francavilla R, Baj G, Florean M, Mascaretti LG, Tongiorgi E. (2015). A method for reproducible measurements of serum BDNF: comparison of the performance of six commercial assays. *SCIENTIFIC REPORTS*; 5(17989): DOI 10.1038.

- Price JB, Bronars C, Erhardt S, Cullen KR, Schwieler L, Berk M, Walderk K, McGee SL, Frye MA, Tye SJ. (2018). Bioenergetics and synaptic plasticity as potential targets for individualizing treatment for depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*; 90:212-220.
- Pruessner M, Hellhammer DH, Pruessner JC, Lupien SJ. (2003). Self-reported depressive symptoms and stress levels in healthy young men: associations with the cortisol response to awakening. *Psychosom. Med.*; 65 (1): 92–99.
- Rajendran L, Honsho M, Zahn TR, Keller P, Geiger KD, Verkade P, Simons K. (2006). Alzheimer's disease β -amyloid peptides are released in association with exosomes. *PNAS*; 30(103): 11172-11177.
- RayBiotech. (2020). Membrane antibody arrays: C-Series. Technical notes. Recuperado 10 de julio de 2020. Disponible en <https://www.raybiotech.com/c-series-membrane-based-antibody-arrays/>
- Richelson E. (2001). Pharmacology of antidepressants, May (5). *Mayo Clinic Proceedings*. 76. Elsevier. pp. 511–527.
- Rothman JE, Schekman R. (2011). Molecular mechanism of protein folding in the cell. *Cell*; 146:851-854.
- Royo F, Zuñiga-Garcia P, Torrano V, Loizaga A, Sanchez-Mosquera P, Ugalde-Olano A. (2016). Transcriptomic profiling of urine extracellular vesicles reveals alterations of CDH3 in prostate cancer. *Oncotarget*; 7:6835–6846.
- Sadek N, Nemeroff C. (2000). Actualización en neurobiología de la depresión. *Revista de Psiquiatría del Uruguay*; 3(64): 462-485.
- Saeedi S, Israel S, Nagy C, Turecki G. (2019). The emerging role of exosomes in mental disorders. *Translational Psychiatry*; 9:122.
- Samanta S, Rajasingh S, Drosos N, Zhou Z, Dawn B, Rajasingh J. (2018). Exosomes: new molecular targets of diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*; 39:501-513.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*; 301(5634):805–809.
- Sartorius N. (2018). Depression and diabetes. Translational research. *Dialogues in Clinical Neuroscience*; 1(20): 47-51.
- Sato K, Meng F, Glaser S, Alpini G. (2016). Exosomes in liver pathology. *Journal of Hepatology*; 65: 213-221.
- Secretaría de Salud. Dirección General de Epidemiología. *Boletín Epidemiológico*, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información. Semana 52, Diciembre de 2019. (Disponible en <https://www.gob.mx/salud/documentos/boletinepidemiologico-sistema-nacional-de-vigilancia-epidemiologica-sistema-unico-de-informacion-231750>)

- Sharma P, Schiapparelli L, Cline HT. (2013). Exosomes function in cell-cell communication during brain circuit development. *Curr. Opin. Neurobiol*; 26(6):997-1004.
- Sharma S, Gimzewski JK. (2012). The quest for characterizing exosomes: circulating nano-sized vesicles. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*; 7(3): 1000e115.
- Shtam TA, Kovalev RA, Varfolomeeva EY, Makarov EM, Kil YV, Filatov M. (2013). Exosomes are natural carriers of exogenous siRNA to cells in vitro. *Cell Communication & Signaling*; 11:88(1-10):
- Skalnikova HK, Bohuslavova B, Turmoveova K, Juhasova J, Juhas S, Rodinova M, Vodicka P. (2019). Isolation and characterization of small extracellular vesicles from porcine blood plasma cerebrospinal fluid and seminal plasma. *Proteomics*; 7(17): 1-14.
- Sloan DM, Kornstein SG. (2003). Gender differences in depression and response to antidepressant treatment. *Psychiatr Clin North Am*; 26:581-594.
- Stegenga BT, King M, Grobbee DE, Torres-Gnozález F, Svab I, Maarros HI, Xavier M, Saldivia S, Bottomley C, Nazareth I, Geerlings M. (2012). Differential impact of risk factors for women and men on the risks of major depressive disorder. *Ann Epidemiol*; 22: 388-396.
- Steiner J, Fernandes BS, Guest PC, Dobrowolny H, Meyer-Lotz G, Westphal S, Buruki K, Schiltz K, Sarnayai Z, Bernstein HG. (2019). Glucose homeostasis in major depression and schizophrenia: a comparison among drug-naïve first-episode patients. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*; 269: 373-377.
- Steptoe A, Hamer M, Chida Y. (2007). The effects of acute psychological stress on circulating inflammatory factors in humans: a review and meta-analysis. *Brain Behav. Immun.*; 21 (7):901–912.
- Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ, Raposo G. (2002). The biogenesis and functions of Exosomes. *Traffic Munksgaard International Publishers*; 3:321-330.
- STRING CONSORTIUM. (2019). *STRING™: Functional protein association networks* versión 11.0. (Disponible en <https://string-db.org/>).
- Südhof T, Rizo J. (2011). Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*; 3:1-14.
- Tavakolizadeh J, Roshanaei K, Salmaninejad A, Yari R, Nahand JS, Sarkarizi HK, Mousavi SM, Salarinia R, Rahmati M, Mousavi SF, Mokhtari R, Mirzaei H. (2017). MicroRNAs and exosomes in depression: Potential diagnostic biomarkers. *J Cell Biochem*; 119: 3783-3797.
- Teixeira AL, Gama CS, Rocha NP, Teixeira MM. (2018). Revisiting the role of Eotaxin-1/CCL11 in psychiatric disorders. *Frontiers in Psychiatry*; 9:37-43.
- Théry C, Ostrowski M, Segura E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.*; 9:581–593.

- Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature Reviews, Immunology*; (2): 569-579.
- Tkach M, Théry C. (2016). Communication by extracellular vesicles: where we are and where need to go. *Cell*; 164: 1226-1232.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocelulosa sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 9(76): 4350-4354.
- Van Loo HM, Aggen SH, Gardner CO, Kendler KS. (2015). Multiple risk factor predicts recurrence of major depressive disorder in women. *Journal of Affective Disorders*; 180:52-61.
- Vázquez FL, Muñoz RF, Becoña E. (2000). Depresión: Diagnóstico, modelos teóricos y tratamiento a finales del Siglo XX. *Psicología Conductual*; 3(8): 417-449.
- Viinamäki H, Heiskanen T, Lehto SM, Niskanen L, Koivumaa-Honkanen H, Tolmunen T, Honkalampi K, Saharinen T, Haatainen K, Hintikka J. (2009). Association of depressive symptoms and metabolic syndrome in men. *Acta Psychiatr Scand*; 120:23-29.
- Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. (2012). Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim. Biophys. Acta*; 1820:940–948.
- Wang J, Sun X, Zhao J, Yang Y, Cai X, Xu J, Cao P. (2017). Exosomes: A novel strategy for treatment and prevention of diseases. *Frontiers in Pharmacology*; 8(300): 1-13.
- Wang X, Sundquist K, Hedelius A, Palmer K, Memon AA, Sundaquist J. (2015). Circulating microRNA-144-5p is associated with depressive disorders. *Clinical Epigenetics*; 7(69): 1-8.
- Wen S, Cheng M, Wang H, Yue J, Wang H, Li G, Zheng L, Zhong Z, Peng F. (2012). Serum uric acid levels at the clinical characteristics of depression. *Clinical Biochemistry*; 1-2(45): 49-53.
- Witwer KW, Buzas EI, Bemis LT, Bora A, Lasser C, Lotvall J, Nolte-t Hoen EN, Piper MG, Sivaraman S, Skog J, Thery C, Wauben MH, Hochberg F. (2013). Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J. Extracell. Vesicles*; 1(2): DOI: 10.3402.
- Wood MJA, O'Loughlin AJ, Lakhai S. (2015). Exosomes and the blood-brain barrier: implications for neurological diseases. *Therapeutic Delivery*; 2(9): 1095-1099.
- Wright CE, Strike PC, Brydon L, Steptoe A. (2005). Acute inflammation and negative mood: mediation by cytokine activation. *Brain Behav. Immun*; 19 (4):345–350.
- Wysokiński A, Strzelecki D, Kłoszewska I. (2015). Levels of triglycerides, cholesterol, LDL, HDL, and glucose in patients with schizophrenia, unipolar depression and bipolar disorder. *Diab Met Syndr: Clin Res Rev*; 10.1016:1-9.
- Xia L, Zhu X, Gillespie A, Feng Y, Zhou J, Chen X, Gao Y, Wang X, Ma X, Gao C, XieY, Pan X, Bai Y, Xu X, Wang G, Chen R. (2020). Effectiveness of mirtazapine as add-on to paroxetine v. paroxetine or mirtazapine monotherapy in patients with major

depressive disorders with early non-response to paroxetine: a two-phase, multicentre, randomized, double-blind clinical trial. *Psychological Medicine*; 10.1017: 1-9.

Yakolev AA, Druzhkova TA, Nikolaev RV, Kuznetsova VE, Gruzdev SK, Guekht AB, Gulyaeva NV. (2019). Elevated levels of serum exosomes in patients with major depressive disorder. *Neurochemical Journal*; 4(13): 385-390.

Yang T, Martin P, Fogarty B, Alison B, Schurman K, Phipps R, Yin VP, Lockman P, Bai S. (2015). Exosome delivery anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in *Danio rerio*. *Pharm Res*; 32: 2003-2014.

Yoshio T, Okamoto H. (2018). Chapter 6. Cytokines and chemokines. S. Hirohata. *Neuropsychiatric Systemic Lupus Erythematosus*. Springer Nature; 77-93.

Zhang Y, Zhao Y, Tian C, Wang J, Li W, Zhong C. (2018). Differential exosomal microRNA profile in the serum of patient with depression. *Eur J Psychiat*; 32(3): 105-112.

Zonneveld MI, Brisson AR, van Herwijnen MJC, Tan S, van de Lest CHA, Redegeld FA, (2014). Recovery of extracellular vesicles from human breast milk is influenced by sample collection and vesicle isolation procedures. *J. Extracell. Vesicles*; 3:24215.