

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON SECRETOMAS DERIVADOS DE CÉLULAS
MADRE MESENQUIMALES EN EL DÉFICIT COGNITIVO INDUCIDO POR
ASFIXIA PERINATAL**

NORTON DANIEL CONTRERAS PAREDES

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE

MAGISTER EN NEUROCIENCIAS

Directores de Tesis: Prof. Dr. José Luis Valdés Guerrero – Prof. Dra. Paola Morales Retamales

2021

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la(el) candidata(o)

NORTON DANIEL CONTRERAS PAREDES

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Neurociencias en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 17 de junio de 2021.

Prof. Dr. José Luis Valdés G.

Prof. Dra. Paola Morales R.

Directores de Tesis

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dra. Jenny Fiedler T.

Prof. Dr. Pedro Maldonado A.

Prof. Dra. Andrea Paula - Lima

**Prof. Dra. Jimena Sierralta J.
Presidenta Comisión**

A Dios Todopoderoso, a mis padres y a mi hermana Isabel...

AGRADECIMIENTOS

A Dios Todopoderoso, por permitirme llegar a esta instancia, por fortalecerme y bendecirme en los momentos más duros y porque gracias a la ciencia pude continuar conociéndole.

Al profesor José Luis Valdés, por aceptarme en su laboratorio y acompañarme en el desarrollo de este trabajo, por siempre haber estado dispuesto a ayudarme y atender mis dudas, por su paciencia y comprensión en los momentos más difíciles y por ser además una excelente persona. A la profesora Paola Morales, por brindarme su ayuda y asesoría durante todo el proceso, por su paciencia, comprensión y por haberme permitido publicar resultados preliminares de mi trabajo. A los profesores Pablo Lois y Verónica Palma, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, por incrementar mi pasión por la Neurociencia y por motivarme a continuar mi perfeccionamiento científico en el área. Y a todos los académicos de la Universidad de Chile que participaron en mi formación de postgrado.

A Andrea Birkner y Jaime Carril por toda su ayuda en la mantención y manipulación de los animales con los que trabajé junto con el apoyo para el desarrollo de los diferentes experimentos.

A mis compañeros de laboratorio Luis Antilao, Héctor Espinoza, Benjamín Carrasco y Tamara Bustamante por todo su apoyo y compañerismo cuando necesité su ayuda.

A la Directora de la Escuela de Educación Parvularia de la Universidad Católica Silva Henríquez, Sra. Patricia Lamig, por haberme otorgado todas las facilidades laborales para desarrollar mi tesis.

Y muy especialmente a mi familia, a mis padres y mi hermana Isabel, por todo su amor y cariño, por siempre confiar en mí y alentarme a seguir adelante pese a la adversidad.

De corazón, muchas gracias a todos.

1. ÍNDICE

ÍNDICE	7
Resumen	8
Abreviaturas	10
INTRODUCCIÓN	11
Aspectos Cognitivos involucrados en el cuadro de Asfixia Perinatal	12
Las células madre como soporte de una nueva estrategia terapéutica	14
El secretoma de células mesenquimales como nueva estrategia terapéutica	15
Hipótesis	17
Objetivo General	17
Objetivos Específicos	17
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Sujetos	17
Modelo de Asfixia Perinatal	19
Precondicionamiento de Células Madre Mesenquimales	19
Administración de secretomas	20
Aplicación de pruebas conductuales.....	20
Prueba de Ansiedad	21
Prueba de Reconocimiento de Objetos	22
Prueba Oasis Maze	23
Análisis Estadístico	24
RESULTADOS	26
Efecto en Ansiedad y Actividad Locomotora (Test de Ansiedad)	26
Efectos en Memoria No Espacial (Test de Reconocimiento de Objetos).....	32
Efectos en Memoria Espacial (Test Oasis Maze).....	36
DISCUSIÓN	51
ANEXOS	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

2. RESUMEN

En la presente tesis se estudió el efecto del tratamiento de secretomas derivados de células madre mesenquimales MSCs precondicionadas, administrados intranasalmente en neonatos expuestos a asfixia perinatal, evaluando sus efectos en aprendizaje y memoria.

Los antecedentes en la literatura indican que los secretomas derivados de MSCs pueden reducir el estrés oxidativo y la neuroinflamación en condiciones de hipoxia –isquemia. Dado este antecedente se planteó en esta tesis, como hipótesis, que los déficits cognitivos inducidos por asfixia perinatal, en un modelo animal, pueden ser prevenidos por la administración de secretomas derivados de células madre administrados en dos dosis (2 horas y 7 días postnatal cada una).

El objetivo general de esta investigación fue determinar si la administración intranasal de secretomas derivados de células madre previene el déficit cognitivo inducido por asfixia perinatal en ratas. Para este fin, se realizaron diferentes pruebas conductuales, que incluyeron un Open Field, el Test de Reconocimiento de Objetos y el Test Oasis Maze, los cuales midieron niveles de ansiedad/locomoción, memoria y aprendizaje respectivamente. Estos análisis se realizaron en 4 grupos de animales, un grupo control sin asfixia y un grupo expuesto a asfixia perinatal a los que se les administró intranasalmente la solución vehículo o secretomas derivados de MSCs precondicionadas con DFX o con las proteínas proinflamatorias $TNF\alpha+INF\gamma$ a 2 horas y 7 días postnatal.

Se observó que la administración intranasal de secretomas mejoró en los sujetos asfícticos los niveles de ansiedad, actividad locomotora, memoria de reconocimiento y, en menor medida, los niveles de aprendizaje y memoria espacial dependiente de hipocampo. Se concluye que el tratamiento con secretomas derivados de células madre precondicionadas con DFX y $TNF\alpha+INF\gamma$ se constituye como una herramienta efectiva en el objetivo de prevenir los déficits cognitivos inducidos por un episodio de Asfixia Perinatal.

ABSTRACT:

In the present thesis, the effect of the treatment of preconditioned MSCs mesenchymal stem cell-derived secretomes, administered intranasally in neonates exposed to perinatal asphyxia, was studied, evaluating its effects on learning and memory.

Background in the literature indicates that MSC-derived secretomes can reduce oxidative stress and neuroinflammation in hypoxic-ischemic conditions. Given this background, it was hypothesized in this thesis that cognitive deficits induced by perinatal asphyxia, in an animal model, can be prevented by the administration of stem cell-derived secretomes administered in two doses (2 hours and 7 days postnatal each).

The overall objective of this research was to determine whether intranasal administration of stem cell-derived secretomes prevents perinatal asphyxia-induced cognitive deficit in rats. For this purpose, different behavioral tests were carried out, which included an Open Field, the Object Recognition Test and the Oasis Maze Test, which measured levels of anxiety / locomotion, memory and learning respectively. These analyzes were carried out in 4 groups of animals, a control group without asphyxia and a group exposed to perinatal asphyxia to which the vehicle solution or secretomas derived from MSCs preconditioned with DFX or with the pro-inflammatory proteins DFX y $TNF\alpha+INF\gamma$ were administered intranasally. at 2 hours and 7 days postnatal.

It was observed that the intranasal administration of secretomes improved the levels of anxiety, locomotor activity, recognition memory and, to a lesser extent, the levels of learning and spatial memory dependent on the hippocampus in asphyctic subjects. It is concluded that treatment with secretomes derived from preconditioned stem cells with DFX y $TNF\alpha+INF\gamma$ is an effective tool in the objective of preventing cognitive deficits induced by an episode of Perinatal Asphyxia.

ABREVIATURAS:

AP: Asfixia Perinatal

AV: Asfixia Vehículo

ARNm: Ácido Ribonucleico Mensajero

Arc: proteína del citoesqueleto regulada por actividad (Activity Regulated Cytoskeleton Protein)

BCA: Ensayo de Ácido Bicinconínico

CV: Control Vehículo

CA1: *cornu ammonis 1*

CA3: *cornu ammonis 3*

CA4: *cornu ammonis 4*

DFX: Deferoxamina

GD: Giro Dentado del Hipocampo

GSSG: Glutación Oxidado

GSH: Glutación Reducido

hAD-MSC: Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano

ICV: Intracerebroventricular

IL-10: Interleuquina-10

IR: Índice de Reconocimiento

MEM: Medio Esencial Mínimo

MSCs: Células madres mesenquimales

PBS: Buffer Fosfato Salino

SNC: Sistema Nervioso Central

TMN: Núcleo Tuberomamilar del Hipotálamo

TGF-B1: Factor de Crecimiento Transformante Beta 1

TNF α +INF γ : Factor de Necrosis Tumoral Alfa + Interferón Gamma.

INTRODUCCIÓN

La Asfixia Perinatal (AP) constituye una importante complicación de tipo obstétrica que se produce durante el parto, generando la tercera causa principal de muerte neonatal. Los individuos que logran sobrevivir a este evento pueden desarrollar discapacidades a nivel motor, cognitivo y neuropsiquiátrico (Volpe, 2008 y Van Handel et al., 2007).

En la actualidad, no existe ningún tratamiento eficaz que sea capaz de atenuar o prevenir las secuelas de la AP (Campbell et al. 2018), el único tratamiento que se aplica es la hipotermia con resultados de prevención del daño relativo y que dependen del inicio de la terapia (González et al., 2005). En Chile, se ha descrito una incidencia de 5-6 por 1.000 nacidos vivos a término (Novoa et al. 2012). Por lo tanto, proteger el cerebro del recién nacido de un insulto metabólico en el momento del nacimiento constituye una prioridad nacional y mundial en salud. La AP reviste importantes alteraciones a largo y corto plazo a distinto nivel y la gravedad de los déficits neurológicos observados, depende de: i) el tiempo de exposición del feto a la hipoxia, ii) del período que transcurre antes que se reestablezca la respiración normal (de resucitación / maniobras de reoxigenación), iii) de la maduración del neonato, y iv) de la integridad de las funciones fisiológicas cardiovasculares y respiratorias, entre otros (Morales et al. 2011). Dentro de las secuelas de mayor gravedad se encuentran la parálisis cerebral, discapacidad intelectual, epilepsia, ceguera y discapacidad auditiva (Volpe 2012), mientras aquellas secuelas de perfil leve a moderado se asocian a déficits cognitivos y trastornos conductuales (Van Handel et al., 2007) como el déficit atencional e hiperactividad, trastornos del ánimo, trastornos adictivos (Galeano et al. 2013) trastornos del espectro autista y psicosis.

La AP involucra una crisis energética primaria resultante del déficit de oxígeno, seguida del daño resultante del requerimiento de reoxigenación, lo cual conduce a estrés oxidativo afectando la actividad mitocondrial, incrementando la producción de radicales libres, neuroinflamación y la muerte celular en regiones más vulnerables del cerebro como los ganglios basales y el hipocampo, así como también en la sustancia blanca (Núñez et al, 2018, Morales et al. 2011, Tapia-Bustos et al. 2019, en preparación).

En base a lo anterior es necesario señalar que el cerebro es una estructura particularmente sensible a un episodio de AP. Las neuronas son células extremadamente sensibles a la falta

de oxígeno, lo cual es explicado por la acción de una enzima llamada NOX4 que es producida por varios órganos y músculos, pero cuando es liberada en el cerebro su acción es muy nociva. Desencadena la descomposición de las células de la barrera hematoencefálica y además un mecanismo de autodestrucción de las neuronas (apoptosis neuronal) (Casas et al., 2017).

Específicamente, dentro del cerebro, el hipocampo representa una de las zonas más sensibles al fenómeno hipóxico. Se sabe que las células de la zona CA1 son las más sensibles dentro del hipocampo en conjunto con las células de Purkinje. La zona CA1 se ubica continua al subículum y se ha observado que la hipoxia genera cambios agudos y crónicos en la excitabilidad de la red neuronal de la misma (Crain et al., 1988; Petito et al., 1987 y Jensen et al., 1998). Por otro lado, las zonas 2 y 3 (de Spielmeyer) se consideran como lugares resistentes y la zona CA4, que se ubica de modo adyacente al Giro Dentado se cataloga como zona de vulnerabilidad media (Lugo, 2017).

Aspectos Cognitivos afectados en el cuadro de Asfixia Perinatal

Las principales secuelas a nivel neuropsicológico en los seres humanos inducido por AP, se asocian a variables cognitivas como la atención y la memoria. Respecto a la memoria se han observado alteraciones tanto en la modalidad visual como verbal. Estas secuelas pueden persistir hasta la edad adulta y que se han relacionado a atrofia hipocampal bilateral (Mañeru & Junqué, 2002).

Estudios realizados por Marlow et al., (2005) reportaron en un grupo de 65 niños de la edad de siete años que habían presentado AP, con encefalopatía severa y encefalopatía moderada, diferencias importantes en ambos grupos con respecto a su control en variables como cálculo matemático, lecto-escritura, lenguaje receptivo y expresivo. Además, se encontró una relación directa entre la AP y problemas de conducta, hiperactividad e inatención. Puntualmente, Marlow et al. (2005) reportan que en casos más severos existen dificultades considerables en memoria episódica y en memoria semántica. Análisis neuropsicológicos en niños de 6 años con antecedentes de AP, evidencian déficits significativos en la motricidad manual (75%), regulación verbal del acto motor (66.6%), disartria, memoria verbal (75%), memoria no verbal (58.3%) y orientación derecha-izquierda (11%) sugiriendo que el hipocampo y los lobos frontales serían estructuras altamente susceptibles a la falta de oxígeno

(Ramírez & Novoa, 2008, Martínez-Biarge et al., 2010; Rennie et al., 2007). Si bien es cierto, la mayoría de las dificultades que se observan en estos sujetos son en el funcionamiento ejecutivo, en específico su regulación e inhibición; en la atención sostenida y en la memoria declarativa, es decir regiones frontales y temporales, se han observado también compromisos en otras funciones y regiones distintas que sugieren lo difuso del daño en este tipo de cuadros y el impacto del mismo en todas las esferas de la vida del individuo (Flores-Compadre et. al, 2013).

Existen diversos modelos animales para AP. Dentro de ellos el Modelo Sueco ha sido validado ampliamente por la comunidad científica considerando diversos factores como i) la similitud con el parto en humanos; ii) lo no invasivo del método; iii) que permite estudiar diversas consecuencias a corto y largo plazo de la injuria en un mismo individuo y, iv) que permite estudiar las fases tempranas de la AP (Marriot et al., 2017), permitiendo con ello estudiar diversas alteraciones motoras y conductuales en los individuos afectados. En modelos animales se ha evidenciado que la AP induce un rendimiento deficiente en la tarea de reconocimiento de objetos, lo que sugiere un déficit en memoria no espacial (Simola et al, 2008). Estos cambios han sido asociados a una disminución en la densidad de neuronas histaminérgicas del núcleo tuberomamilar del hipotálamo (TMN)(Flores-Balter et al., 2018) sugiriendo que el sistema histaminérgico es sensible a AP y que explica, en parte, los déficits en los procesos de aprendizaje y la memoria observados en sujetos afectados por AP (Flores-Balter et al., 2016). Estudios más recientes, muestran que la AP también induce un rendimiento deficiente en memoria espacial que se encuentra acompañado por astrogliosis hipocampal sin pérdida neuronal (Blanco et al., 2015). Se ha descrito que la AP induce en ratas un incremento en los niveles de estrés, ansiedad e hiperactividad (Hershkowitz et al., 1983). Estos cambios inducidos por la AP reflejan cambios plásticos en el SNC relacionados a la actividad neuronal (Flores-Balter et al, 2016), conectividad sináptica (Marriot et al, 2017) arborización dendrítica (Morales et al 2003, Klawitter et al 2005) y neurogénesis (Morales et al 2008) entre otros.

Un marcador comúnmente usado en plasticidad neuronal es el gen Arc que codifica una proteína asociada al citoesqueleto que participa en la plasticidad neuronal del Giro Dentado (GD) del hipocampo (Link et al. 1995) siendo crucial para la consolidación de la memoria

espacial (Guzowski et al. 2000; Nakayama et al. 2015; Plath et al. 2006; Ramírez-Amaya et al. 2013). Estudios previos del laboratorio muestran una disminución de la inmunoreactividad para Arc en el hipocampo de ratas expuestas a AP que podría dar cuenta de los déficits cognitivos de las ratas con AP (Sánchez, 2017).

Se han propuesto diversas formas de tratamiento destinadas a revertir los déficits generados por un episodio de AP conforme al uso de modelos animales. El uso de células madre es uno de ellos.

Las células madre como soporte de una nueva estrategia terapéutica

Las células madre mesenquimales (MSCs) se definen como células indiferenciadas que poseen la capacidad de proliferar, manteniendo su pluripotencialidad (Nombela-Arrieta et al. 2011). Estas células han sido propuestas como una herramienta terapéutica para diversas enfermedades del SNC debido a sus amplias cualidades como agentes antiinflamatorios, antioxidantes, y liberadores de factores tróficos y de crecimiento, facilitando mecanismos de reparación celular (Van Velthoven et al 2012, Castillo-Melendez et al. 2013).

Los efectos antiinflamatorios y antioxidantes de largo plazo de las MSC han sido bien documentados en modelos animales adultos de accidente cerebrovascular, isquemia y lesión cerebral traumática (Tang et al. 2015). Estudios recientes demostraron que una única administración intra-cerebroventricular (ICV) de MSC en ratas que consumen alcohol crónicamente (3 meses) revirtió el estrés oxidativo y la neuroinflamación inducido por el consumo de alcohol (Ezquer- Quintanilla et al. 2017).

Sobre la base de estos antecedentes, estudios recientes demostraron que la administración ICV de MSCs derivadas de tejido adiposo de ratas, 2 horas post-AP indujo una clara reversión de la hipomielinización inducida por la AP en regiones normalmente mielinizadas como cápsula externa y el cuerpo calloso (Tapia-Bustos et al., 2021). Estos resultados se complementan con los obtenidos por Van Velthoven et al. (2010), quienes demostraron que una administración aguda de células madre incrementa el número de oligodendrocitos, y la mielinización.

El secretoma de células mesenquimales como nueva estrategia terapéutica.

El secretoma se define como un conjunto de factores biológicos o moléculas secretadas al espacio extracelular. En el caso de células mesenquimales humanas, el secretoma tiene diferentes tipos de proteínas, citoquinas, factores de crecimiento, además de lípidos mensajeros y ARNm de regulación (Iranzo Martínez, 2018).

Algunas de las principales ventajas que ofrece la terapia con secretomas, en especial en el contexto anteriormente descrito son:

- a) El secretoma resuelve varias consideraciones potencialmente asociadas con el trasplante de las poblaciones de células proliferativas y que puede afectar el cerebro neonato, incluida la compatibilidad inmunológica y la tumorigenicidad.
- b) El secretoma puede constituirse como una nueva alternativa a las terapias farmacológicas convencionales, al regularse su dosis y potencia en su administración.
- c) El secretoma derivado de MSCs es un elemento de fácil disponibilidad, dado que pueden ser liofilizados, lo que favorece su almacenamiento.
- d) El secretoma derivado de MSCs tiene un bajo costo de producción, dado que puede ser generado en grandes cantidades, favoreciendo además la reutilización de las células que lo producen (Vizoso et al. 2017).

Se ha descrito que el preconditionamiento in vitro de las MSC con las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IFN- γ mejora en gran medida la secreción de una amplia gama de factores terapéuticos (Ezquer-Quintanilla et al. 2017). Estudios recientes demostraron que las MSC derivadas de tejido adiposo humano (hAD-MSC), condicionadas previamente con citoquinas proinflamatorias, mejoraron su potencial antiinflamatorio, pro-regenerativo y antioxidante, lo que lo convierte en una herramienta atractiva para una terapia eficaz de recursos humanos neonatales. En este contexto el secretoma adquiere interesantes características moleculares, como por ejemplo altos niveles de IL-10 y TGF- β 1, ambos marcadores de actividad antiinflamatoria (Quintanilla et al., 2019). De hecho, estudios preliminares de laboratorio muestran que una única administración intranasal de secretomas derivados de hAD-MSC pre-condicionadas, 2 horas después de la AP neonatal, redujo el

estrés oxidativo del hipocampo evaluado en P7, al determinar la razón de glutatión oxidado/ glutatión reducido (GSSH/GSH).

Por otro lado, MSCs pretratadas en un ambiente hipóxico o con deferoxamina (DFX) incrementan la neuroprotección y disminuyen la muerte neuronal en ratas expuestas a hipoxia isquemia (Oses et al., 2017) enfatizando con esto la función paracrina que poseen las MSCs (Jeong Lee, M. et al., 2010).

Hasta la fecha no hay estudios disponibles que muestren la efectividad de la administración intranasal de MSCs en AP. Se ha reportado que la vía intranasal es una forma altamente eficiente, selectiva y rápida para entregar diferentes tipos de fármacos al cerebro tanto en modelos animales como en el humano. La vía intranasal evita la barrera hematoencefálica, por lo que es muy útil cuando se quiere administrar fármacos que no son capaces de cruzar esta barrera (Hanson & Frey, 2008). Los fármacos administrados por vía intranasal llegan al cerebro mediante los nervios olfatorio y trigémino (Thorne et al, 2004). El nervio olfatorio, puntualmente, inerva el bulbo olfatorio, donde hace sinapsis con neuronas de segundo orden, las que se proyectan centralmente hacia el área olfatoria primaria homolateral, en el lóbulo temporal del cerebro, sin enlazar en el tálamo (Wilson – Pauwels, 2013).

De este modo, en esta tesis se ha evaluado si la administración de estos tratamientos previene los déficits cognitivos inducidos por un cuadro de Asfixia Perinatal y si, específicamente, genera mejoría en ansiedad, actividad locomotora y memoria, con dos dosis de aplicación y por vía intranasal. Todo aquello evaluado a través de la prueba de Campo Abierto, Reconocimiento de Objetos y Oasis Maze. Del mismo modo se busca determinar cuál de los preconditionamientos de MSCs es más efectivo para el tratamiento de la AP en cuanto a revertir las alteraciones cognitivas y conductuales que experimentan los sujetos afectados por el cuadro.

HIPÓTESIS

Déficits cognitivos inducidos por la Asfixia Perinatal son prevenidos por la administración de secretomas derivados de células madre precondicionadas con TNF- α + IFN- γ o con DFX *in vitro*.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la administración intranasal repetida de secretomas derivados de células madre precondicionadas con TNF- α + IFN- γ o con DFX *in vitro* produce mejoría en el aprendizaje, memoria y actividad locomotora de ratas asfícticas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar cambios en los niveles de ansiedad y actividad locomotora mediante la prueba de Campo Abierto en ratas controles, expuestas a AP, tratadas con vehículo o secretomas derivados de células madre precondicionadas con TNF- α + IFN- γ o con DFX *in vitro*.
- b) Determinar el rendimiento en memoria mediante la prueba de reconocimiento de objetos y memoria espacial (Oasis Maze) en ratas jóvenes controles, expuestas a AP, tratadas con vehículo o secretomas derivados de células madre precondicionadas con TNF- α + IFN- γ o con DFX *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. **Sujetos:** Se utilizaron 34 ratas albinas de la cepa Wistar pertenecientes a la estación experimental de animales del Programa de Farmacología Molecular & Clínica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Se consideraron para el estudio los siguientes grupos experimentales (ver Tabla 1) a los cuales se les administró vehículo o secretomas de MSC 2 horas y 7 días postnatal. Todos los individuos fueron evaluados a partir de los 30 días postnatal (P30).

Grupos	N
Control Vehículo (<i>16μL de solución salina NaCl 0,9%</i>)	7-9
Asfixia Vehículo	7-9
Asfixia tratados con secretomas derivados de MSCs precondicionadas con DFX (<i>IN</i>) (<i>2 dosis a 2h y P7 aplicando 16 μL (incluye 6μg de secretoma derivadas de 2 $\times 10^5$ MSC)</i>)	7-9
Asfixia tratados con secretomas derivados de MSCs precondicionadas con TNF- α e IFN- γ (<i>IN</i>) (<i>2 dosis a 2h y P7 aplicando 16μL (incluye 6μg de secretoma derivadas de 2 $\times 10^5$ MSC)</i>)	7-9

Tabla 1: Total de individuos considerados en las condiciones control y experimental

Todos los individuos fueron mantenidos en cajas individuales con ciclos luz/oscuridad 12/12 (ZT: 07:00 AM) con agua y alimentación *ad libitum* en una pieza temperada a 23° C. Todos los experimentos fueron desarrollados en conformidad al protocolo de guía y manejo de animales de laboratorio del NIH y la aprobación del comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (# CBA1058 FMUCH).

2. Modelo de Asfixia Perinatal:

Se utilizó el modelo que se esquematiza a continuación:

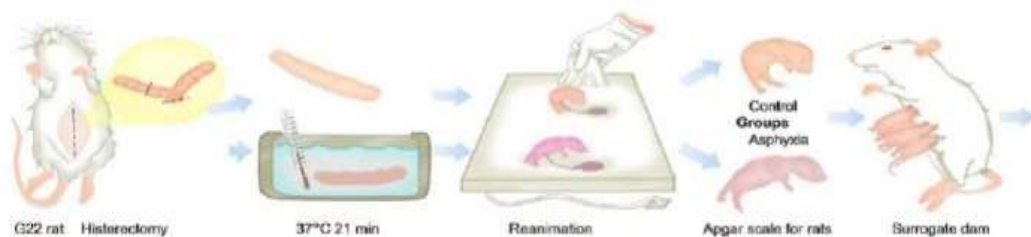


Figura 1: Modelo de Asfixia Perinatal (Marriot et al., 2015)

Las ratas, en su último día de gestación (día 22) y posterior al nacimiento de una o dos crías por vía vaginal, fueron eutanizadas e histerectomizadas. Dos a tres crías fueron extraídas posteriormente de los cuernos uterinos (ratas Control Vehículo), mientras que el resto de los cuernos que contenían los otros fetos fueron sumergidos en un baño de agua termo-regulado a 37°C por 21 minutos. Posterior a este período de asfixia se liberaron las crías desde los cuernos uterinos y se les estimuló a respirar, se les ligó el cordón umbilical y se les dejó recuperar en un cojín temperado (**Figura 1**).

Entre 40 y 60 minutos posterior al nacimiento las ratas fueron sometidas a la aplicación de la escala APGAR adaptada para ellas donde se evaluaron parámetros como peso corporal, sexo, color de la piel, frecuencia respiratoria y movilidad. La severidad de la asfixia se determinó por la tasa de sobrevivencia y la recuperación (Morales, 2010; Bustamante, 2007). Luego de aquello cada cría fue dejada con madres sustitutas para posteriormente ser utilizadas en las pruebas conductuales.

3. Precondicionamiento de células madre mesenquimales:

Las células madre humanas fueron extraídas de tejido adiposo subcutáneo, en conformidad con los protocolos éticos establecidos por el Comité de Ética Médico-Docente de la Clínica Alemana (Universidad del Desarrollo). Posterior a aquello las células fueron precondicionadas a través de la incubación en medio esencial (MEM, Gibco, Grand Island, NY, USA) suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS; HyClone, South Logan, UT, USA) junto con 0,16 mg / ml de gentamicina (Laboratorio Sanderson, Chile) a 37 C y 5% de

CO₂ más 400 µM deferoxamina (DFX, Sigma-Aldrich, EE. UU.) en medio esencial sin FBS durante 48 horas para mejorar la producción de antioxidantes, antiinflamatorios y factores angiogénicos.

Después del acondicionamiento, las células se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se incubó durante 48 h con medio esencial. Posteriormente, se recogió el medio de cultivo (secretoma) siendo centrifugado a 400 g durante 10 min para eliminar las células completas. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 5000 g durante 10 minutos para eliminar los restos celulares. Este proceso reduce la contaminación del secretoma con proteínas liberadas por la ruptura de las células. Finalmente, el secretoma se filtró en filtros de 0,22 µm y concentrado 50 veces (v / v) mediante filtros de corte de 3 kDa (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda). La concentración de proteínas se determinó mediante el kit de ensayo de proteínas BCA (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y finalmente el secretoma se congeló a 80 °C hasta su uso.

4. Administración de secretomas:

Se administró un volumen total de 16 µL, que contenía 6 g de proteínas secretoma (derivadas de 2 x 10⁵ MSC acondicionadas). Se efectuó la administración por vía intranasal en dos dosis (con el fin de asegurar la efectividad), 2 horas y 7 días después de la asfixia cada 5 minutos, se administró 1 µL de solución con una cánula pequeña en lados alternativos de la cavidad nasal (ocho veces en cada fosa nasal). Como control se administraron 16 µL de solución salina (0,9% NaCl) de la misma manera anteriormente mencionada (Farfán et al., 2020).

5. Aplicación de Pruebas Conductuales:

Se aplicaron una serie de pruebas conductuales destinadas a evaluar Memoria No Espacial, Memoria Espacial y Ansiedad junto con Actividad Locomotora:

1. Prueba de Ansiedad y Locomoción (Campo abierto) (realizada a P30)
2. Prueba de Reconocimiento de Objetos (realizada a P30)
3. Prueba Oasis Maze (realizada a P60)

En la Figura 2 se puede apreciar un flujograma explicativo con los procedimientos experimentales realizados:

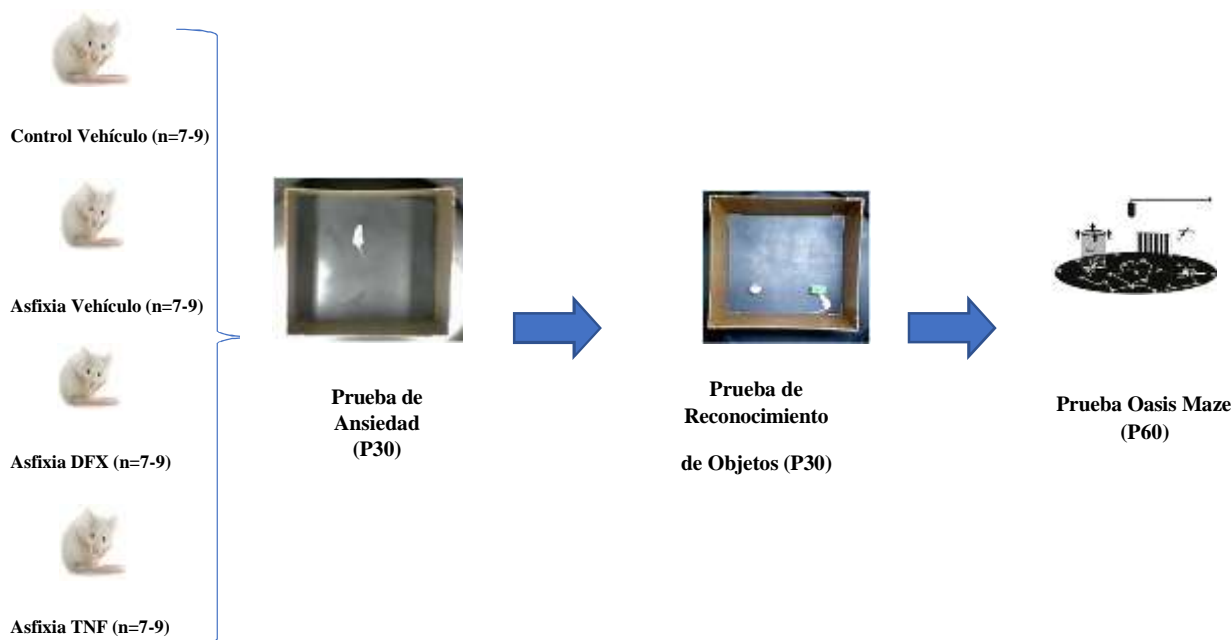


Figura 2: Diagrama de flujo con los procedimientos experimentales aplicados en las diferentes condiciones.

5.1 Prueba de Ansiedad y locomoción (campo abierto):

Se utilizó una arena cuadrada de 80x80 centímetros dentro de la cual se colocó a cada animal en el centro de ella. Previo a la colocación de cada animal se limpió la superficie de trabajo con una solución del alcohol al 70% para evitar claves olfatorias (Griffin, 2009). Cada animal fue filmado a través de una cámara digital en posición cenital por un tiempo de 5 minutos. Posteriormente cada registro de video fue analizado con una rutina de script de MATLAB, donde se reconstruyó el recorrido navegado por el animal y se estimaron las siguientes variables:

- Tiempo en el centro** (establecido como indicador de ansiedad y consistente en el tiempo en que el animal permanece en el centro de la arena. Se mide en segundos).
- Tiempo en la periferia** (establecido como indicador de ansiedad y consistente en el tiempo en que el animal permanece en la periferia de la arena. Se mide en segundos).
- Tiempo quieto** (establecido como indicador de ansiedad y consistente en el tiempo en que el animal permanece inmóvil dentro de la arena. Se mide en segundos).

- d) *Distancia recorrida* (establecida como indicador de actividad locomotora y consistente en la distancia que el animal recorre dentro de la arena en un tiempo de cinco minutos. Se mide en centímetros).
- e) *Velocidad de Desplazamiento* (establecida como indicador de actividad locomotora y consistente en la velocidad que el animal emplea mientras recorre la arena en un tiempo de 5 minutos. Se mide en centímetros por segundo).

5.2 Prueba de Reconocimiento de Objetos:

Se utilizó una arena cuadrada de 80x80 centímetros en cuyo interior los individuos realizaron la prueba.

Este test constó de tres fases de implementación:

- a) *Fase de Habitación*: Se colocó a cada animal a recorrer la arena en un tiempo de 10 minutos por dos días, sin filmarlo y sin objetos presentes, con el objetivo de reducir la ansiedad de los animales por neofobia.
- b) *Fase de Familiarización*: Se colocó a cada animal en la arena en presencia de dos objetos idénticos que se colocan en dos de las esquinas de la arena, dejando espacio suficiente entre el objeto y las esquinas para dejar que el animal se desplazara libremente. Cada objeto fue fijado con una cinta adhesiva a la superficie de la arena. El animal fue filmado por un tiempo de 5 minutos mientras recorría la arena.
- c) *Fase de Prueba*: Esta fase se efectuó a las 24 horas después de realizada la fase de familiarización. Se colocó al animal en la arena en presencia de dos objetos. Uno de ellos fue el mismo que en la fase de familiarización y el otro fue reemplazado por uno nuevo, dejando espacio suficiente entre el objeto y las esquinas para dejar que el animal se desplazara libremente. Cada objeto fue fijado con una cinta adhesiva a la superficie de la arena). El animal fue filmado por un tiempo de 5 minutos mientras recorría la arena. Posteriormente los videos fueron analizados con una rutina de MATLAB reconstruyendo el recorrido del animal y estimando el tiempo de exploración que realiza el animal en cada objeto. Se determinó un **Índice de Reconocimiento (IR)** que se define como el tiempo dedicado a explorar el nuevo objeto dividido por el tiempo total dedicado a explorar el objeto antiguo y el nuevo y

también el **Número de Aproximaciones al Objeto Nuevo**, que se define como el número de aproximaciones que el individuo genera al objeto nuevo dentro de la arena durante cinco minutos de registro. Este test utiliza la tendencia natural de las ratas de explorar objetos novedosos de tal manera que un índice mayor a 0.5 indica que el animal explora más el objeto nuevo que el antiguo dado que recuerda más el antiguo (Grinspun et al., 2019)

Entre cada animal se realizó una limpieza de la superficie de trabajo con una solución del alcohol al 70% para evitar claves olfatorias (Griffin, 2009).

5.3 Prueba Oasis Maze:

Corresponde a una versión seca del Morris Water Maze (equivalente en sus propiedades de detectar memoria dependiente de hipocampo) (Clark et al 2005, Martínez et al 2016). El aparato consiste en una arena circular de 1.4 metros de diámetro de color negro. La superficie de arena posee 21 pocillos distribuidos equidistantemente, de unos 2.5 cms. de diámetro y 1.3 cms. de profundidad en los que se depositó una gota de agua la cual actuó como recompensa y que debió ser encontrada por los sujetos.

La prueba constó de las siguientes etapas:

- 1) ***Pre-entrenamiento:*** Donde los animales fueron privados de agua durante 23h. Posteriormente la recompensa (gota de agua) se colocó en el 100% de los pocillos luego en el 50% y finalmente 25 % de los pocillos durante 3 días consecutivos. Posterior a cada sesión la rata tuvo acceso a agua durante 1 h y fue privada nuevamente durante 23 horas de agua.
- 2) ***Entrenamiento o Tarea de Adquisición:*** Esta etapa consistió en 15 ensayos de un minuto cada uno en que solo un pocillo fue recompensado. Para esto la rata se encontró al interior de un cilindro oscuro, luego el animal fue liberado y el ensayo terminaba cuando el animal encontrase la recompensa o hasta que un minuto de tiempo hubiese transcurrido. Luego de un intervalo de 25 a 30 segundo el animal fue puesto nuevamente en el cilindro y gentilmente movido a una nueva posición en el Oasis Maze y liberado para un segundo ensayo. La posición del pocillo recompensado

fue siempre la misma y el punto de salida del animal fue diferente ensayo a ensayo de manera de prevenir conductas estereotipadas y el aprendizaje procedimental.

- 3) **Tarea de Retención:** Después de un máximo de 24 horas luego de efectuado el entrenamiento se sometió a los animales a esta fase de prueba, donde el individuo debió realizar nuevamente la tarea del Oasis Maze como se describió anteriormente con el mismo pocillo recompensado del día anterior y se evaluó un aumento en el rendimiento del animal como prueba de memoria espacial.

Entre cada animal se realizó una limpieza de la superficie de trabajo con una solución del alcohol al 70% para evitar claves olfatorias (Griffin, 2009).

Todos los recorridos realizados por el animal tanto para la etapa de entrenamiento como para la de retención fueron grabados con una cámara en posición cenital y los videos fueron procesados *offline* mediante una rutina de Matlab que reconstruyó la posición del animal en cada ensayo y se estimaron los siguientes parámetros de aprendizaje espacial:

- a) **Latencia:** Que se define como el tiempo en segundos transcurrido entre el comienzo del ensayo o trial y el fin de éste o hasta que el individuo encuentra el pocillo que contiene la recompensa.
- b) **Razón de Distancia:** Definida como la razón entre el recorrido óptimo estimado desde el punto de partida y hacia la recompensa, versus el recorrido observado por el individuo.
- c) **Tasa de Éxito:** Definida como la cantidad de veces que el individuo logra encontrar el pocillo que contiene la recompensa dentro de un total de 15 ensayos y empleando para ello menos de un minuto.
- d) **Número de Errores:** Definido como el número de veces que el individuo visita un pocillo no recompensado en cada ensayo para cada sesión.

6. Análisis Estadístico:

Para el análisis estadístico de las pruebas de Ansiedad y Reconocimiento de Objetos se utilizó la prueba Shapiro Wilk para evaluar normalización de datos, seguida de una prueba ANOVA de Rangos (Kruskal-Wallis) a fin de identificar si los valores obtenidos en los diferentes grupos fueron similares. Posterior a ello se aplicó un *post hoc* con el test de Benjamini-Hochberg y Yekutieli.

En el test Oasis Maze se aplicó un modelo de Regresión Lineal Simple para evaluar la progresión de las diferentes variables en los distintos grupos de estudio. También, como análisis complementario se aplicó un análisis de ANOVA de una vía en conjunto con ANOVA de dos vías. En relación con esto último se aplicó un *post hoc* con el test de Holm-Sidak.

RESULTADOS

A continuación, se exponen los resultados de las diferentes pruebas aplicadas, que pretendieron evaluar el rendimiento en ansiedad, actividad locomotora y memoria en los diferentes grupos estudiados posterior a la aplicación de los tratamientos y, de este modo, evaluar su efectividad.

Para ello se sigue el orden cronológico de aplicación de estas pruebas:

- a) Prueba de Ansiedad (Prueba de Campo Abierto).
- b) Memoria de Reconocimiento de Objetos (Test de Reconocimiento de Objetos).
- c) Memoria Espacial (Prueba Oasis Maze).

TEST DE ANSIEDAD (PRUEBA DE CAMPO ABIERTO)

Se analizó el efecto que la AP y ambos tratamientos con MSCs generaron en los individuos afectados por AP en los parámetros de ansiedad y actividad locomotora. También se comparó este rendimiento con el grupo Control y con el grupo asfíctico que no fue tratado.

En la **Figura 3** se muestra un mapa de calor que representa el recorrido desplegado por un individuo de las distintas condiciones en 5 minutos de registro, donde se aprecia que la asfixia induce una condición de tigmotactismo (tendencia natural del animal a permanecer en la periferia de la arena, en su búsqueda de protección ante un entorno expuesto), efecto que es prevenido por la administración de secretomas derivados de MSC precondicionadas con DFX o $TNF\alpha+INF\gamma$, evidenciándose un mayor tiempo en el centro de la arena.

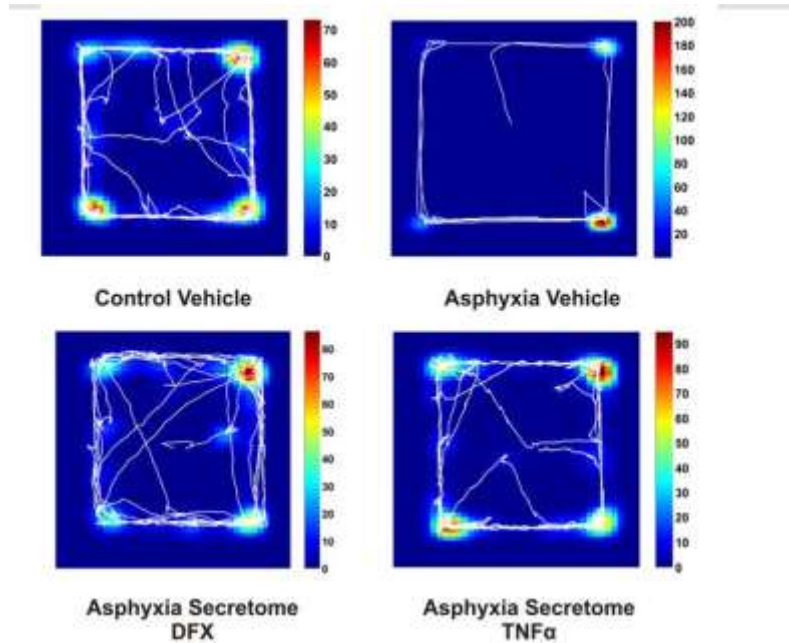


Figura 3: Mapa de calor del test de Ansiedad que muestra los recorridos de individuos de las diferentes condiciones. La barra lateral indica los tiempos que el animal emplea en permanecer en diferentes lugares de la arena. (Farfán et al., 2020)

Al analizar la variable **Tiempo en el Centro (Figura 4)** es posible apreciar que el grupo Asfíxia Vehículo presentó una disminución en el Tiempo en el Centro de la arena respecto al grupo Control, evidenciando con ello una condición de ansiedad. Este efecto fue prevenido con la administración de secretomas TNF α + IFN γ , no así con la administración de secretomas DFX respecto al grupo Asfixia o Control Vehículo.

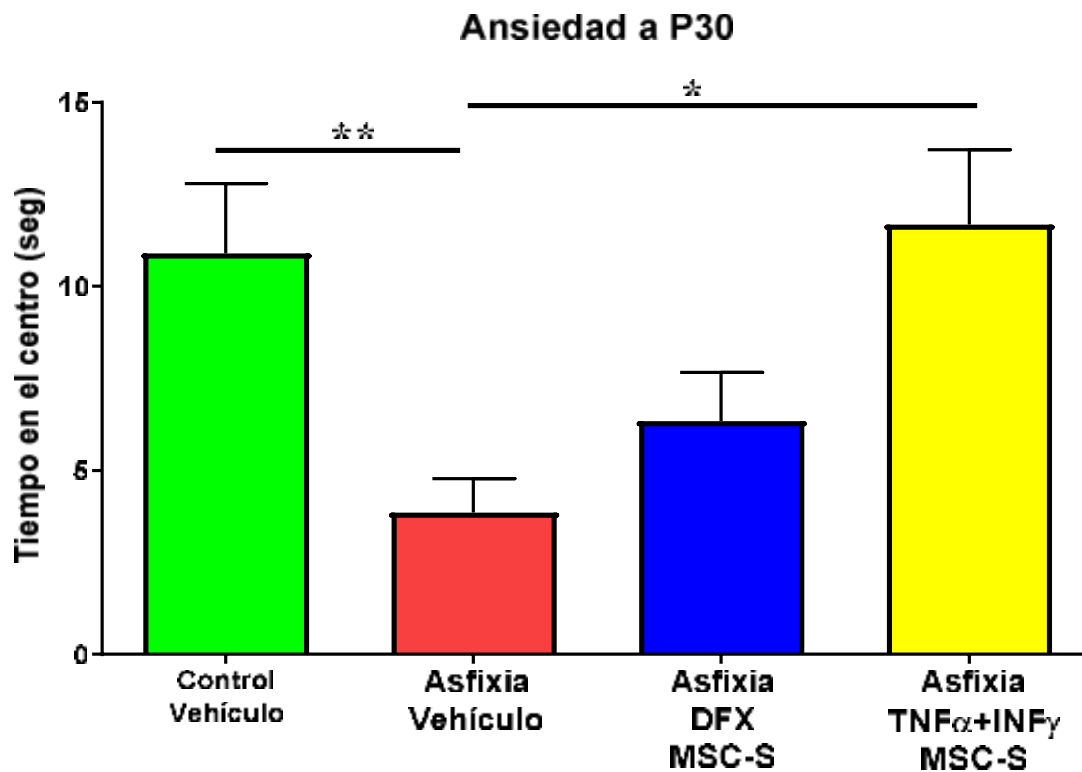


Figura 4: Tiempo de Permanencia en el Centro de la arena como indicador de ansiedad para sujetos controles y asfícticos con administración intranasal de secretomas derivados de MSC precondicionadas (DFX o TNF α +INF γ) o vehículo 2h a 7 días postnatal y evaluados a P30. El comportamiento ansioso fue prevenido por el secretoma TNF α . A nivel estadístico se determinó la normalidad de los datos a través de la prueba Shapiro Wilk, seguido por la prueba ANOVA de Rango (Kruskal-Wallis) (* $p < 0,005$) y la prueba Benjamini, Hochberg y Yekutieli como post hoc (** $p < 0,005$; CV v/s AV, * $p < 0,05$; AV v/s Asfixia-TNF + INF γ) ($n=7$ individuos por grupo).

Al realizar el análisis de la variable **Tiempo en la Periferia** (Figura 5) no se encontraron diferencias significativas entre los grupos controles o asfícticos tratados con vehículo o secretomas.

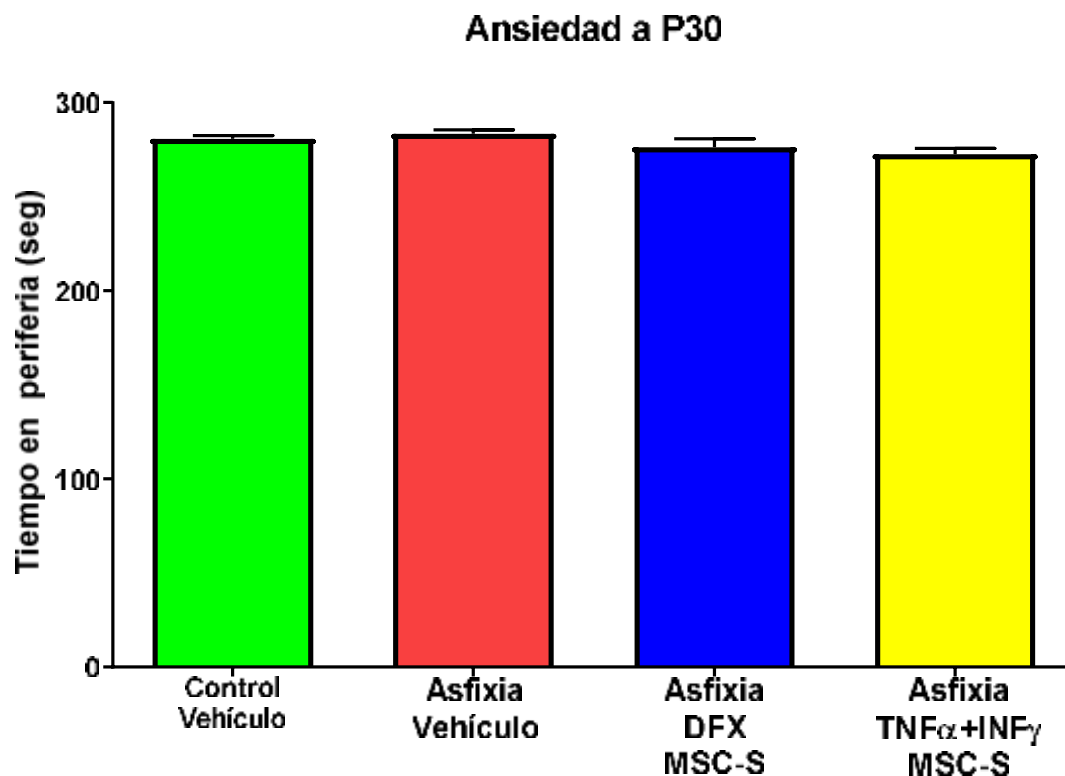


Figura 5: Tiempo de permanencia en la periferia para sujetos controles y asfícticos con administración intranasal de secretomas derivados de MSC precondicionadas (DFX o TNF α +INF γ) o vehículo 2h a 7 días postnatal y evaluados a P30. A nivel estadístico se determinó la normalidad de los datos a través de la prueba Shapiro Wilk, seguido por una prueba ANOVA de Rango (Kruskal-Wallis) ($p=0,145$) y finalmente un post hoc a través de la prueba Benjamini, Hochberg y Yekutieli. ($n=7-9$ individuos por grupo).

Similares resultados se obtuvieron al analizar la variable **Tiempo Quieto (Figura 6)** donde no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos controles o asfícticos tratados con vehículo o secretomas.

Ansiedad a P30

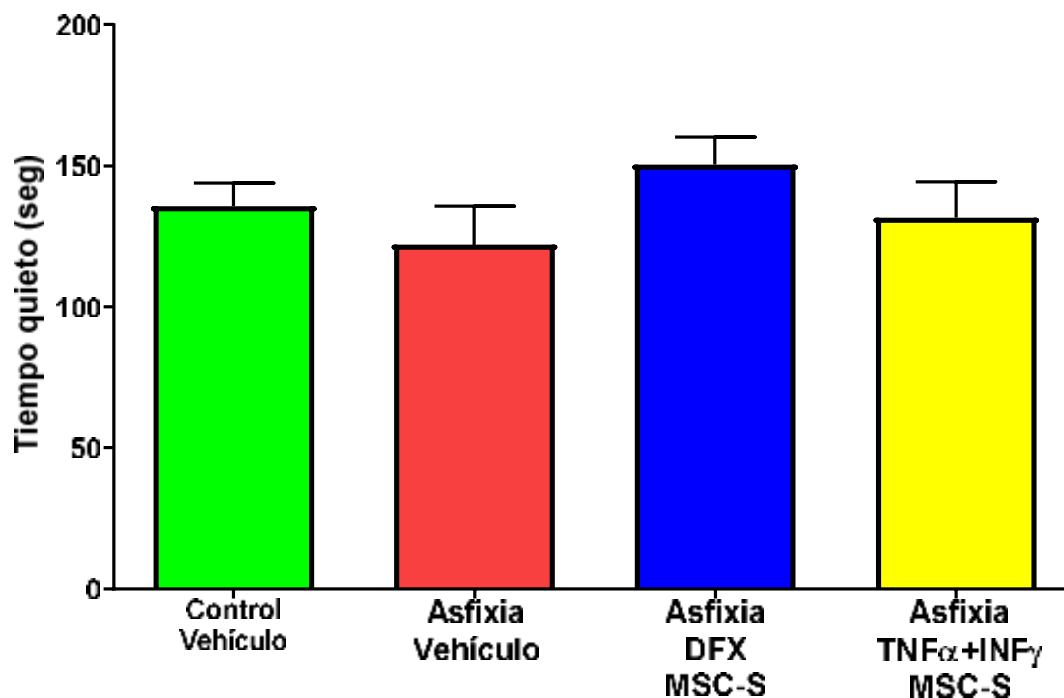


Figura 6: Tiempo Quieto (segundos) para sujetos controles y asfícticos con administración intranasal de secretomas derivados de MSC precondicionadas (DFX o TNF α +INF γ) o vehículo 2h a 7 días postnatal y evaluados a P30. A nivel estadístico se determinó la normalidad de los datos a través de la prueba Shapiro Wilk. Posteriormente se aplicó una prueba ANOVA de Rango (Kruskal-Wallis) ($p=0,3711$) y finalmente un post hoc a través de la prueba Benjamini, Hochberg y Yekutieli ($n=7-9$ individuos por grupo).

Al analizar la **Velocidad de Desplazamiento** entre los grupos (**Figura 7**), como indicador de actividad locomotora, se observó una disminución de la velocidad de desplazamiento del grupo Asfixia Vehículo en comparación con el grupo Control. Asimismo, el tratamiento con secretomas pretratados con DFX o TNF α +INF γ . previno la disminución de la velocidad de desplazamiento a nivel del grupo control.

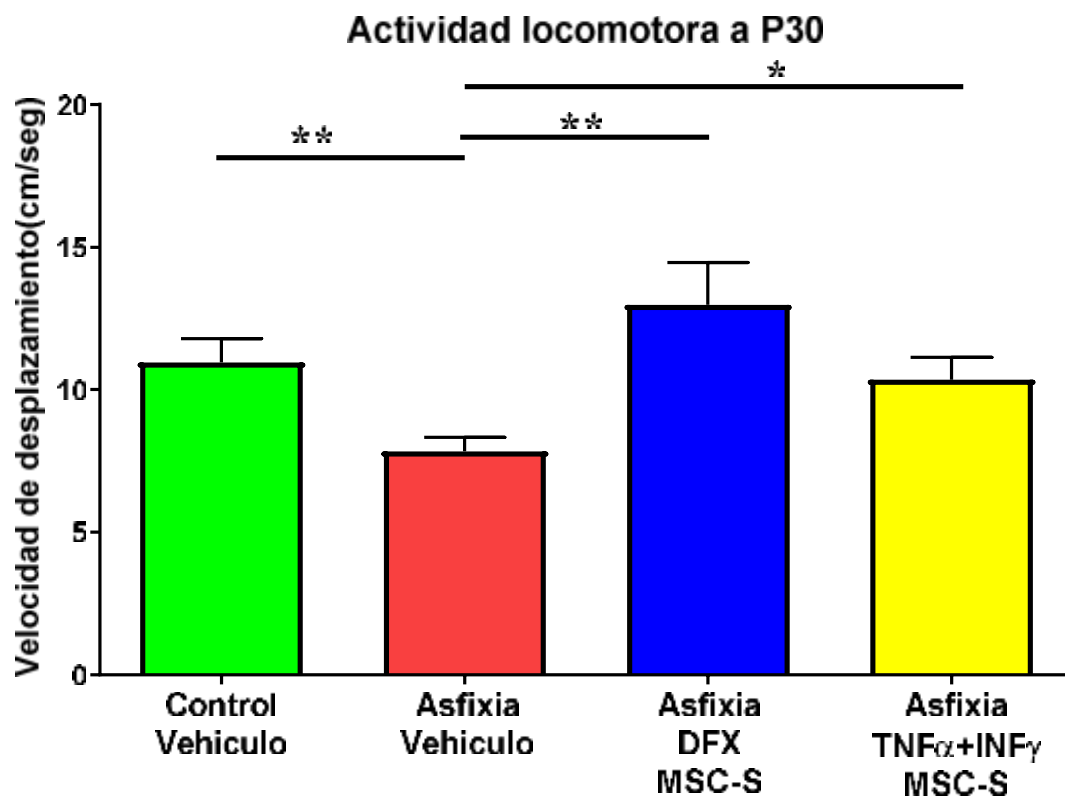


Figura 7: Velocidad de Desplazamiento (centímetros/segundo) para sujetos controles y asfícticos con administración intranasal de secretomas derivados de MSC precondicionadas (DFX o TNF α +INF γ) o vehículo 2h a 7 días postnatal y evaluados a P30. A nivel estadístico se determinó la normalidad de los datos a través de la prueba Shapiro Wilk seguido de una prueba ANOVA de Rango (Kruskal-Wallis) (* p <0,005) y finalmente un post hoc a través de la prueba Benjamini, Hochberg y Yekutieli (** p <0,005; CV v/s AV; ** p <0,005 AV v/s Asfixia DFX; * p <0,05 AV v/s Asfixia-TNF + INF γ) (n=7-9 individuos por grupo).

Al analizar la actividad locomotora en cuanto a la **Distancia Recorrida (Figura 8)** se observó una disminución de la distancia recorrida del grupo Asfixia Vehículo en comparación con el grupo Control. Asimismo, el tratamiento con secretomas pretratados con DFX o TNF α +INF γ previno la disminución de la distancia recorrida.

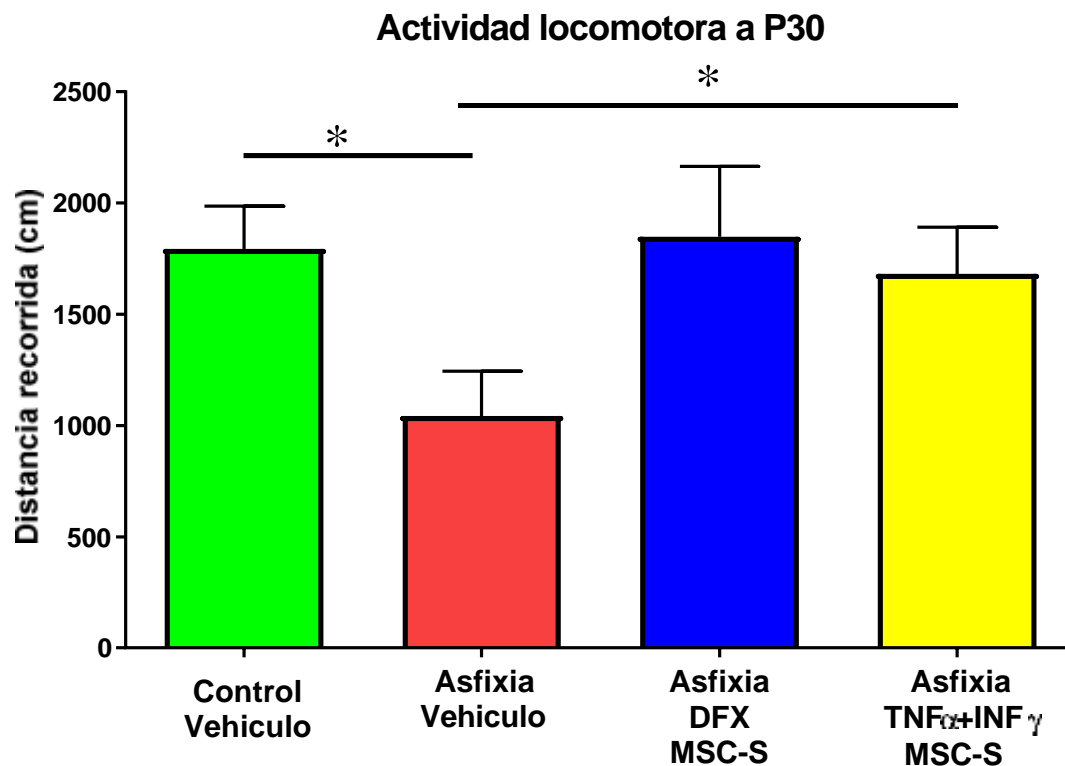


Figura 8: Distancia Recorrida (centímetros) para sujetos controles y asfícticos con administración intranasal de secretomas derivados de MSC precondicionadas (DFX o TNF α +INF γ) o vehículo 2h a 7 días postnatal y evaluados a P30. A nivel estadístico se determinó la normalidad de los datos a través de la prueba Shapiro Wilk seguido de una prueba ANOVA de Rango (Kruskal-Wallis) ($p= 0,05$) y finalmente un post hoc a través de la prueba Benjamini, Hochberg y Yekutieli ($n =7-9$ individuos por grupo).

MEMORIA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS (TEST DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS):

Con el fin de evaluar Memoria No Espacial se aplicó la Prueba de Reconocimiento de Objetos que consiste en la exploración de 2 objetos idénticos durante 5 minutos por el animal. 24 horas después el animal se re-expone a los objetos, pero en esta ocasión uno se mantiene igual que en la condición original y el otro se cambia. La conducta del animal fue videograbada. Se analizó el **Índice de Reconocimiento (IR)**, definido como el tiempo dedicado por la rata a explorar el nuevo objeto dividido por el tiempo total dedicado a explorar el objeto antiguo y el nuevo (Figura 9 y 10). También se analizó el **Número de**

Aproximaciones al Objeto Nuevo, que se define como el número de aproximaciones del individuo al objeto nuevo dentro de la arena durante cinco minutos de registro (Figura 12).

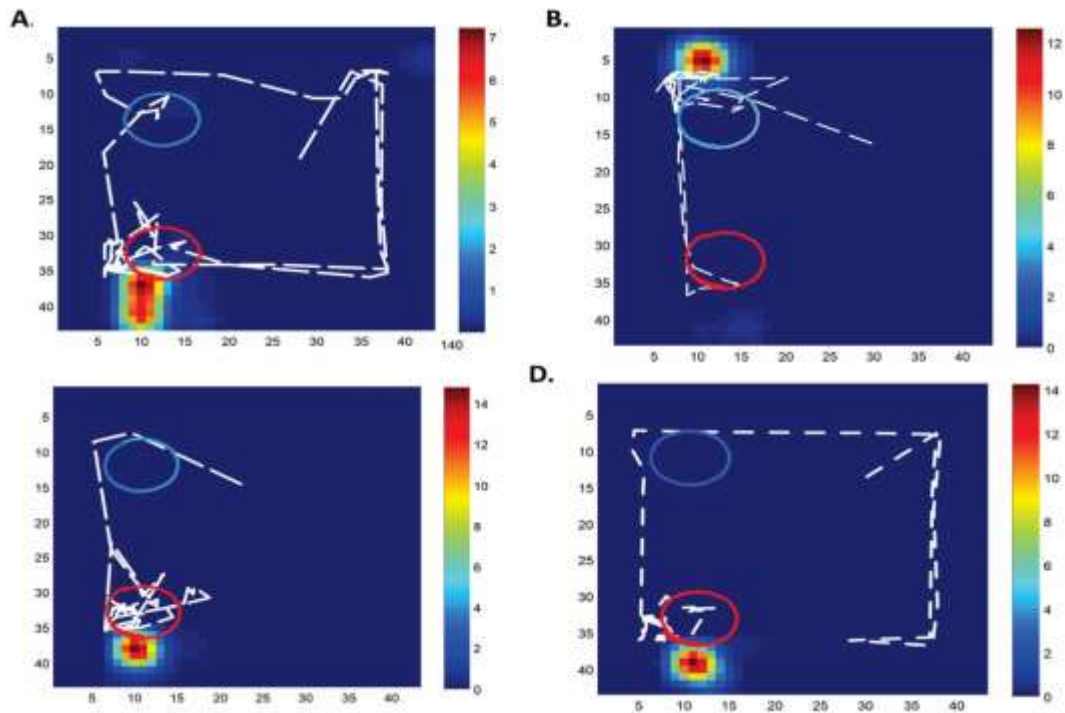


Figura 9: Recorrido representativo desplegado por un individuo de los grupos control y experimentales en el test de Reconocimiento de Objetos en un registro de 5 minutos indicando el Índice de Reconocimiento (IR). El objeto nuevo se muestra encerrado en un círculo rojo mientras que el objeto antiguo se encuentra encerrado en un círculo azul en las condiciones (A) Control Vehículo (B) Asfixia Vehículo (C) Asfixia tratado con secretomas derivados de MSC preconditionadas con DFX (D) Asfixia tratado con secretomas derivados de MSC preconditionadas con $TNF\alpha+INF\gamma$.

En la Figura 10 se observa que el grupo Asfíxia Vehículo presentó una disminución en su Índice de Reconocimiento durante la prueba respecto al grupo Control, evidenciando con ello una merma en la Memoria de Reconocimiento. Este efecto fue prevenido con la administración de secretomas derivados de MSC preconditionadas con **DFX** o **$TNF\alpha+INF\gamma$** , sin embargo, no se detectaron diferencias en el Número de Aproximaciones al Objeto Nuevo (ver Figura 11).

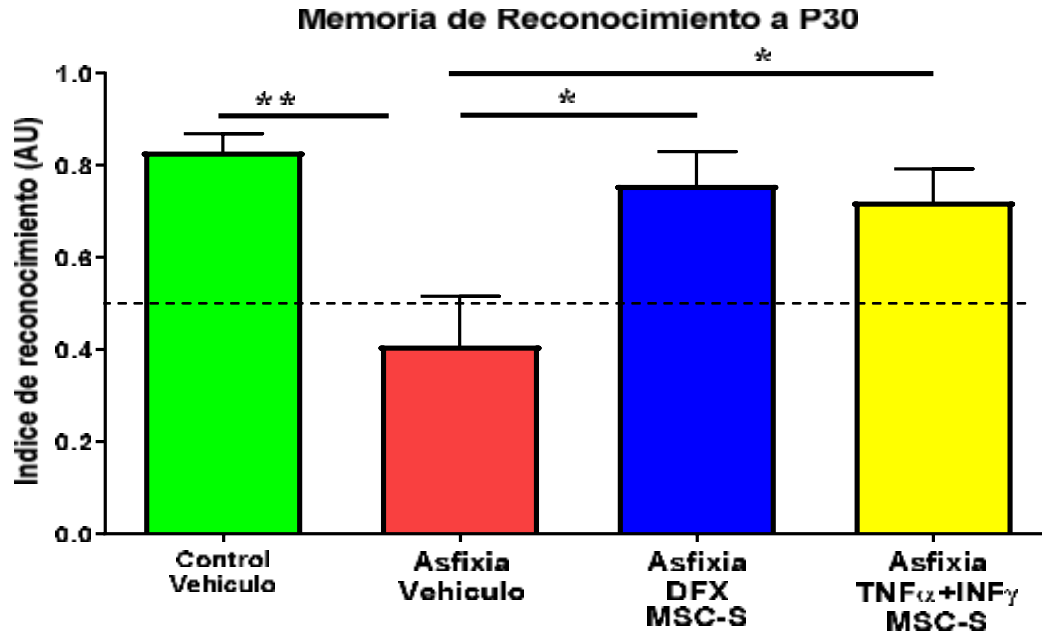


Figura 10: Cuantificación del Índice de Reconocimiento para sujetos controles y asfícticos con administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas (DFX o TNF α +INF γ) o vehículo 2h y 7 días postnatal y evaluados a P30. Los valores del Índice de Reconocimiento iguales o inferiores a 0,5 (línea punteada) indican un déficit de Memoria de Reconocimiento. Se observa una disminución del índice de reconocimiento producto de la asfixia (asfixia vehículo) que se recupera a valores normales con el tratamiento con ambos secretomas. Se determinó la normalidad de los datos a través de la prueba Shapiro Wilk seguido de una prueba ANOVA de Rango (Kruskal Wallis) (* $p < 0,05$), para finalmente aplicar un post hoc a través de la prueba de Benjamini, Hochberg y Yekutieli (** $p < 0,005$, CV v / s AV, * $p < 0,05$; AV v / s Asfixia-DFX-MSC-S; * $p < 0,05$, AV v / s Asfixia-TNF + INF γ)($N = 7-9$ individuos por grupo).

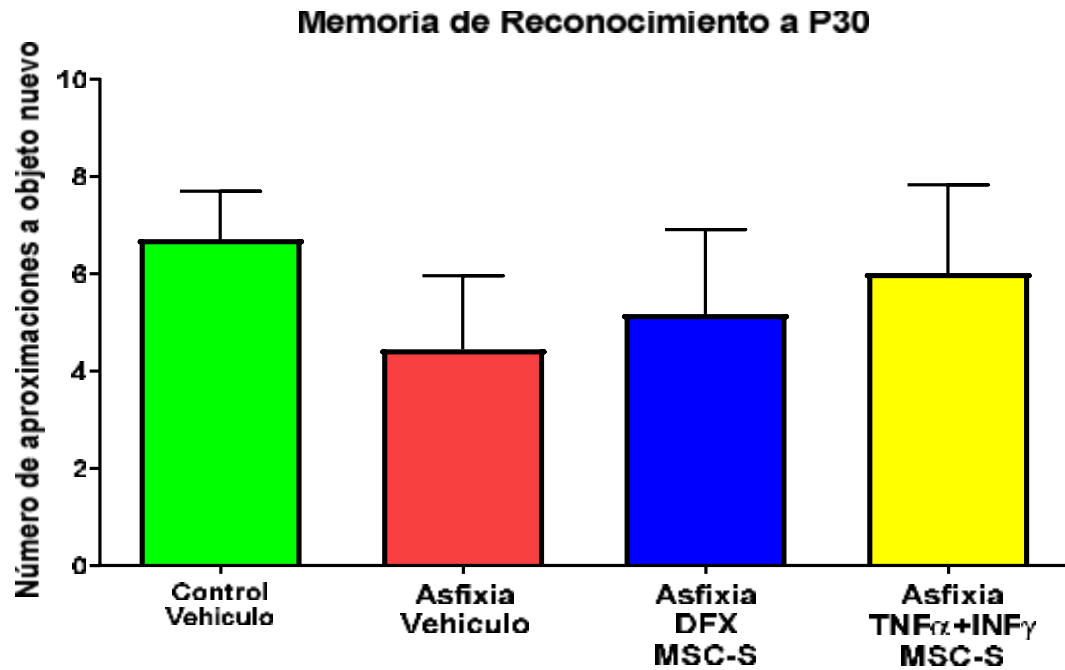


Figura 11: Cuantificación del Número de Aproximaciones al Objeto Nuevo para sujetos controles y asfícticos con administración intranasal de secretomas derivados de MSC precondicionadas (DFX o TNF α +INF γ) o vehículo 2h a 7 días postnatal y evaluados a P30. A nivel estadístico se determinó la normalidad de los datos a través de la prueba Shapiro Wilk, seguido de una prueba ANOVA de Rango (Kruskal-Wallis) ($p=0,5255$) y finalmente un post hoc a través de la prueba Benjamini, Krieger y Yekutieli ($n=7-9$ individuos por grupo).

MEMORIA ESPACIAL (TEST OASIS MAZE):

Se analizaron los efectos que los tratamientos generaron en individuos afectados por AP en los parámetros de Memoria Espacial y que fueron tratados con ambos tratamientos. También se comparó este rendimiento con el grupo Control y con el grupo asfíctico que no fue tratado. Se realizó además para ello un análisis intragrupal, para evaluar la progresión de las diferentes variables a lo largo de los ensayos en cada grupo y también un análisis intergrupar para evaluar qué tratamiento tuvo el mejor efecto. Este mecanismo de análisis se utilizó tanto para las fases de Adquisición como de Retención.

En la **Figura 12** se ilustran recorridos representativos de ratas en las diferentes condiciones experimentales:

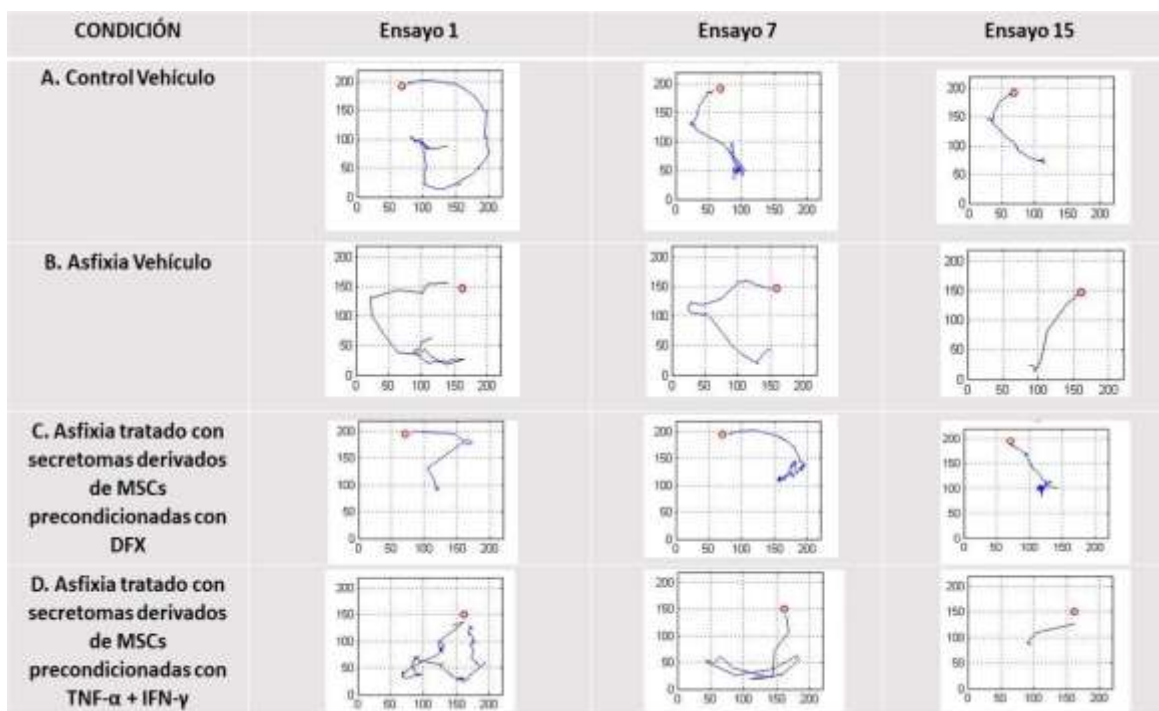


Figura 12: Recorrido representativo desplegado por un individuo de los grupos control y experimentales en el test Oasis Maze en los ensayos 1, 7 y 15. El pocillo recompensado se encuentra marcado en rojo y el recorrido que despliega el individuo se encuentra marcado en azul en las condiciones (A) Control Vehículo (B) Asfixia Vehículo (C) Asfixia tratado con secretomas derivados de MSC precondicionadas con DFX (D) Asfixia tratado con secretomas derivados de MSC precondicionadas con TNF α +IFN γ .

A continuación, se presentan los resultados correspondientes en las etapas de Aprendizaje y Memoria para las variables analizadas. Para el análisis estadístico de cada una de las

variables, en ambas fases, se aplicó un modelo de Regresión Lineal Simple (r) a fin de determinar si existía correlación positiva o negativa y una relación directa o inversa entre el número de ensayos (15 para cada sesión) y las variables Latencia, Razón de Distancia, Tasa de Éxito y Número de Errores a nivel intragrupal y posteriormente se comparó el rendimiento intergrupalo para cada una de las variables estudiadas para determinar qué grupo tuvo el mejor rendimiento en dichas variables en cada fase. Se optó por no aplicar un análisis por animal individual en las distintas variables a fin de apreciar el rendimiento de cada grupo por completo y así tener una mayor muestra que permita establecer conclusiones contundentes.

*a) **Fase de Aprendizaje:***

En esta etapa se evaluó el recorrido que el animal realizó en un minuto en búsqueda del pocillo recompensado con una gota de agua y 24 horas posterior a la fase de Pre-Entrenamiento, con un total de 15 ensayos.

En las siguientes figuras se presenta el análisis **intragrupal** en la Fase de Aprendizaje.

En la Figura 14 se presenta el análisis de la Latencia evaluada en las 15 sesiones para el grupo Control Vehículo (Figura 5A), Asfixia Vehículo (Figura 5B), Asfixia tratado con secretomas derivados de MSC preconditionadas con DFX (Figura 5C) y Asfixia tratado con secretomas derivados de MSC preconditionadas con $TNF\alpha+INF\gamma$ (Figura 5D).

Se observa que todos los grupos muestran un r superior a cero. Se aprecia que hay una correlación negativa entre las variables, existiendo una relación inversa entre niveles de latencia y número de ensayos para los grupos Control Vehículo y Asfixia Vehículo. Los grupos asfícticos tratados con secretomas exhiben una relación directa entre las variables, pero no significativa. Se aprecia que la Latencia disminuye con la progresión de los ensayos en el grupo Control Vehículo existiendo mejoría en el aprendizaje del mismo, siendo la única relación significativa encontrada, no existiendo aprendizaje en los otros grupos.

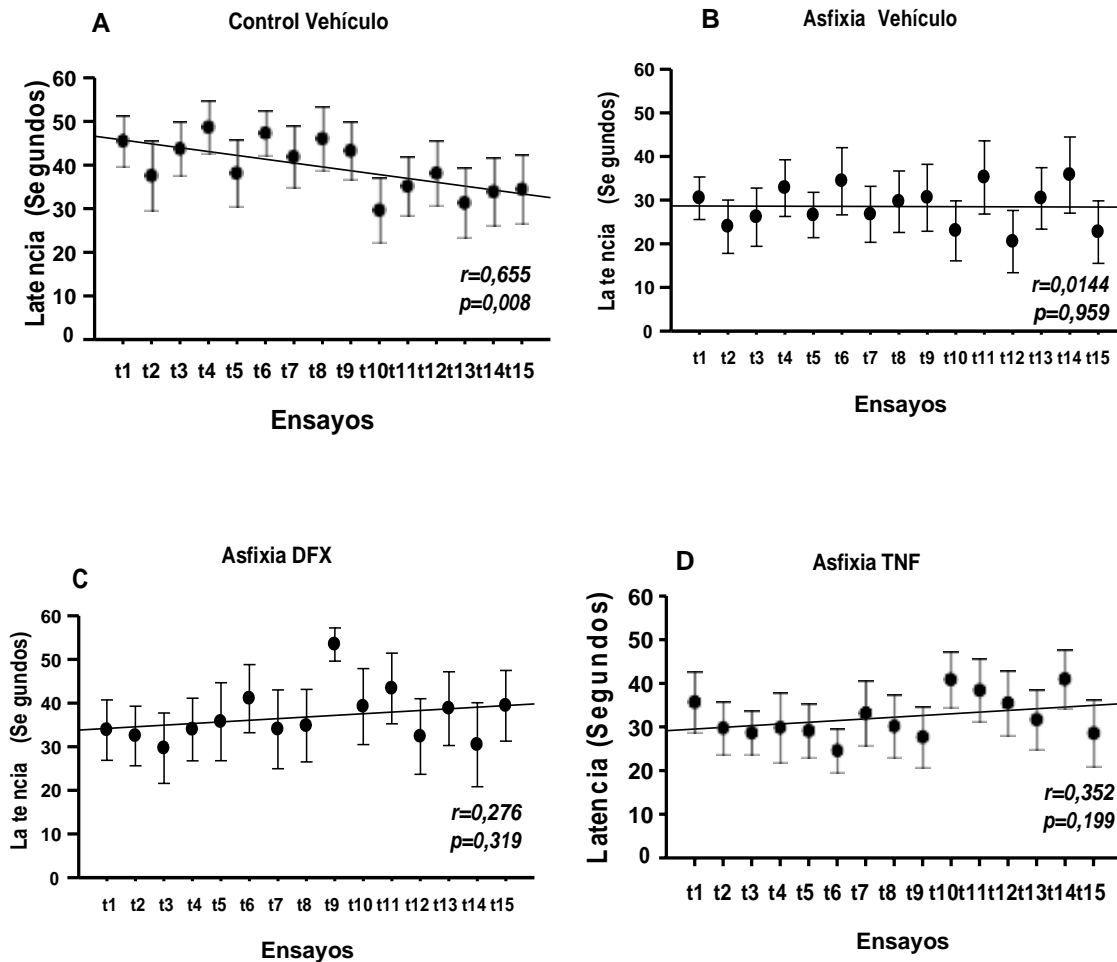


Figura 13: Cuantificación de la Latencia en segundos en la fase de aprendizaje del test Oasis Maze en todos los grupos estudiados. Se realizó un análisis de Regresión Lineal Simple para cada uno de los grupos controles y experimentales ($N=7-9$ individuos por grupo). Análisis de Latencia para los grupos (A) Control Vehículo (B) Asfixia Vehículo (C) Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con DFX (D) Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con $TNF\alpha+INF\gamma$

Al analizar los resultados obtenidos para cada grupo de individuos en la variable **Razón de Distancia (Figura 14)** se observó un r superior a cero. Se aprecia que hay una correlación negativa entre las variables para todos los grupos, existiendo una relación inversa entre niveles de Razón de Distancia y número de ensayos, siendo esta relación estadísticamente significativa para los grupos Control Vehículo, Asfixia Vehículo y Asfixia TNF. Se evidencia mejoría en el aprendizaje en dichos grupos.

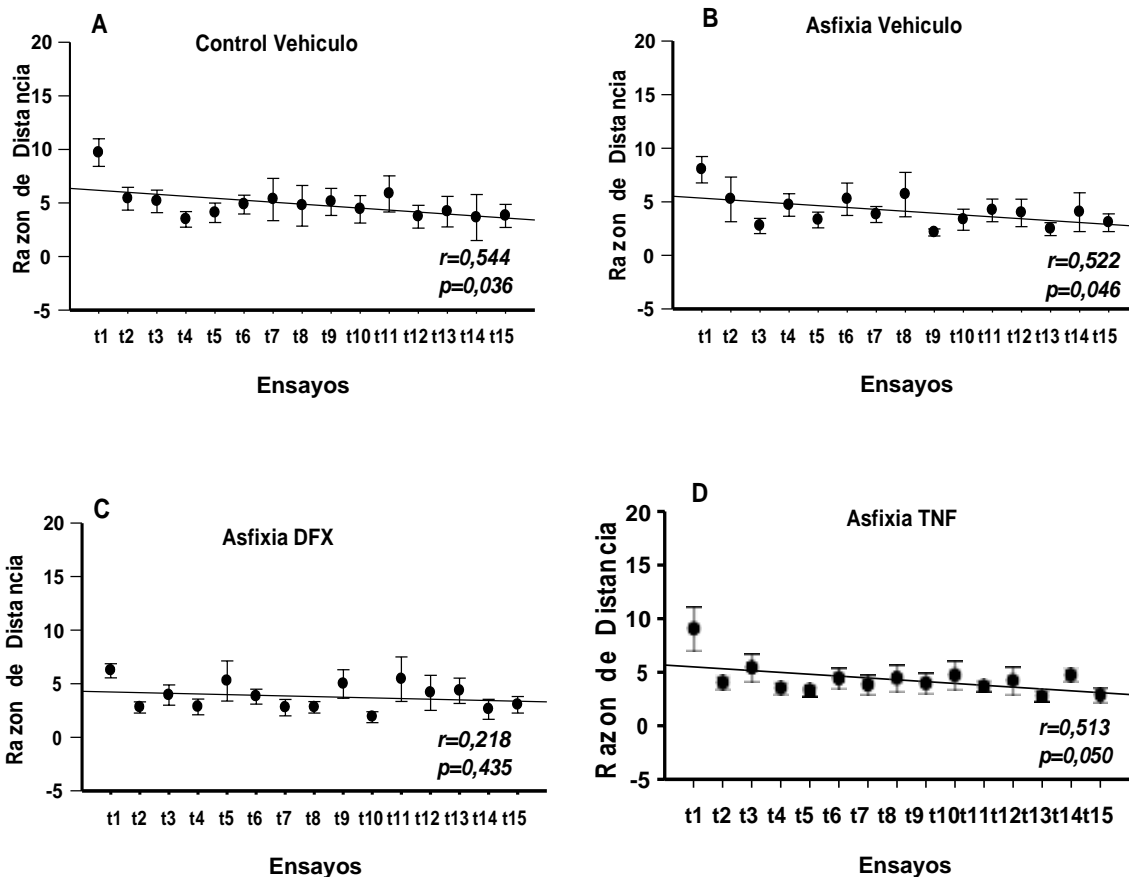


Figura 14: Cuantificación de la Razón de Distancia en la fase de aprendizaje del test Oasis Maze en todos los grupos estudiados. Se realizó un análisis de Regresión Lineal Simple para cada uno de los grupos controles y experimentales (N=7-9 individuos por grupo). Análisis de Razón de Distancia para los grupos (A) Control Vehículo (B) Asfixia Vehículo (C) Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con DFX (D) Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con TNF α +INF γ

Similares resultados se observaron en la variable **Tasa de Éxito (Figura 15)** observándose un *r* superior a cero. Existe una correlación positiva entre las variables, lo que significa una relación directa entre Tasa de Éxito y número de ensayos exclusivamente en el grupo Control, con un aumento en la Tasa de Éxito en dicho grupo, pero sin ser significativa. Por su parte la correlación fue negativa en el resto de los grupos estudiados, siendo estadísticamente significativa para los grupos asfícticos tratados con DFX y TNF α +INF γ . Todo aquello indica que no hubo mejoría en el aprendizaje en ninguno de los grupos estudiados.

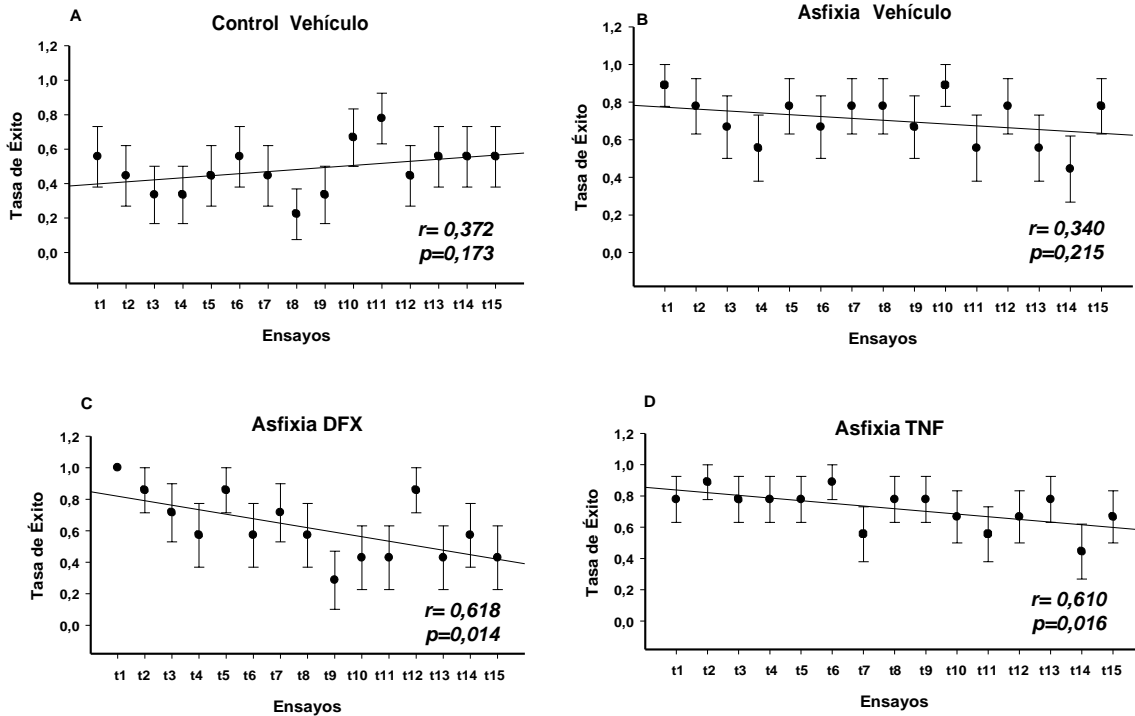


Figura 15: Cuantificación de la Tasa de Éxito en la fase de aprendizaje del test Oasis Maze en todos los grupos estudiados. Se realizó un análisis de Regresión Lineal Simple para cada uno de los grupos controles y experimentales ($N=7-9$ individuos por grupo). Análisis de Tasa de Éxito para los grupos (A) Control Vehículo (B) Asfixia Vehículo (C) Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con DFX (D) Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con $TNF\alpha+INF\gamma$.

Al analizar la variable **Número de Errores** (Figura 16) se encontró un r superior a cero en todos los grupos experimentales. Existió una correlación negativa entre las variables en todos ellos, mostrándose una relación inversa entre el Número de Errores y número de ensayos. y siendo estadísticamente significativa para todos los grupos estudiados, existiendo mejoría en el aprendizaje en todos ellos.

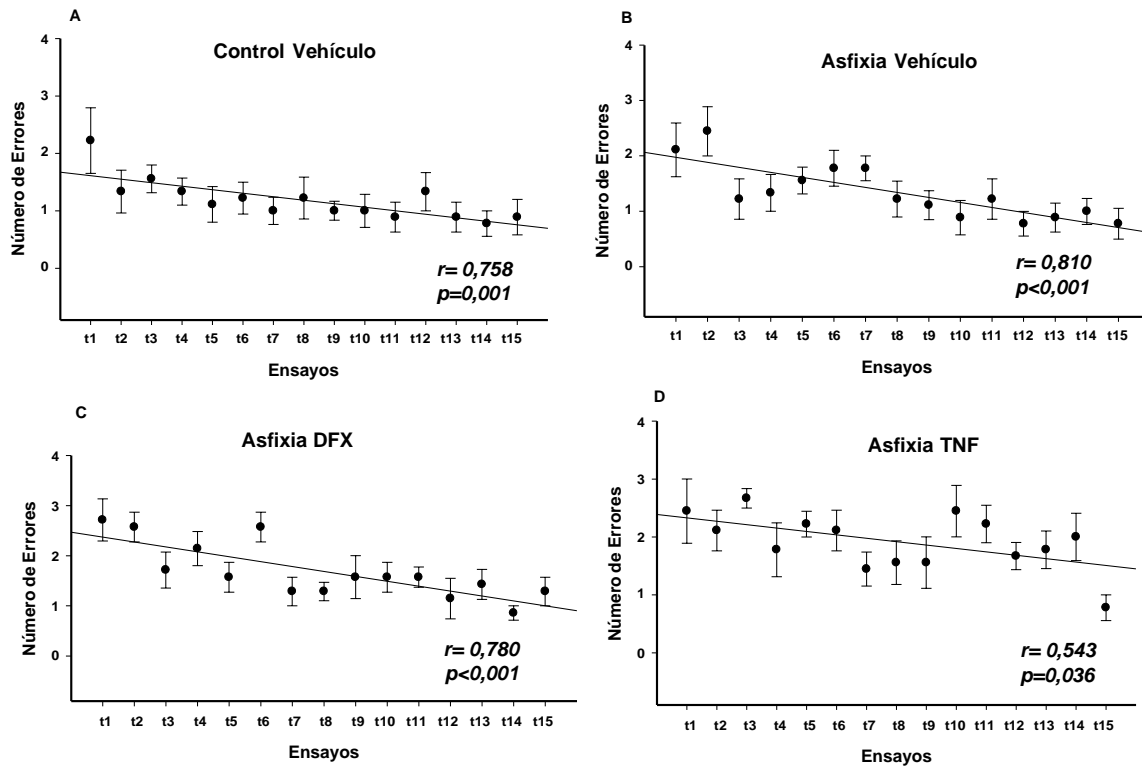


Figura 16: Cuantificación del Número de Errores en la fase de aprendizaje del test Oasis Maze en todos los grupos estudiados. Se realizó un análisis de Regresión Lineal Simple para cada uno de los grupos controles y experimentales ($N=7-9$ individuos por grupo). Análisis de Número de Errores para los grupos (A) Control Vehículo (B) Asfixia Vehículo (C) Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con DFX (D) Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con $TNF\alpha+INF\gamma$.

Para visualizar y comparar el rendimiento **intergrupar** en la fase de Aprendizaje y, de este modo, determinar qué grupo tuvo el mejor rendimiento en cada variable estudiada, se realizó un cálculo de la pendiente de aprendizaje en cada individuo de cada grupo. Luego, estos valores fueron agrupados por tratamiento, promediados y posteriormente graficados.

En la **Figura 17**, en todas las variables, se aprecian promedios de pendientes negativas para todos los grupos, a excepción de los grupos Asfixia DFX y Asfixia TNF en Latencia y en el grupo Control Vehículo en Tasa de Éxito. Se observa además que no hay diferencias significativas entre las pendientes de aprendizaje de los grupos estudiados en ninguna de las variables estudiadas en la fase de Aprendizaje del test.

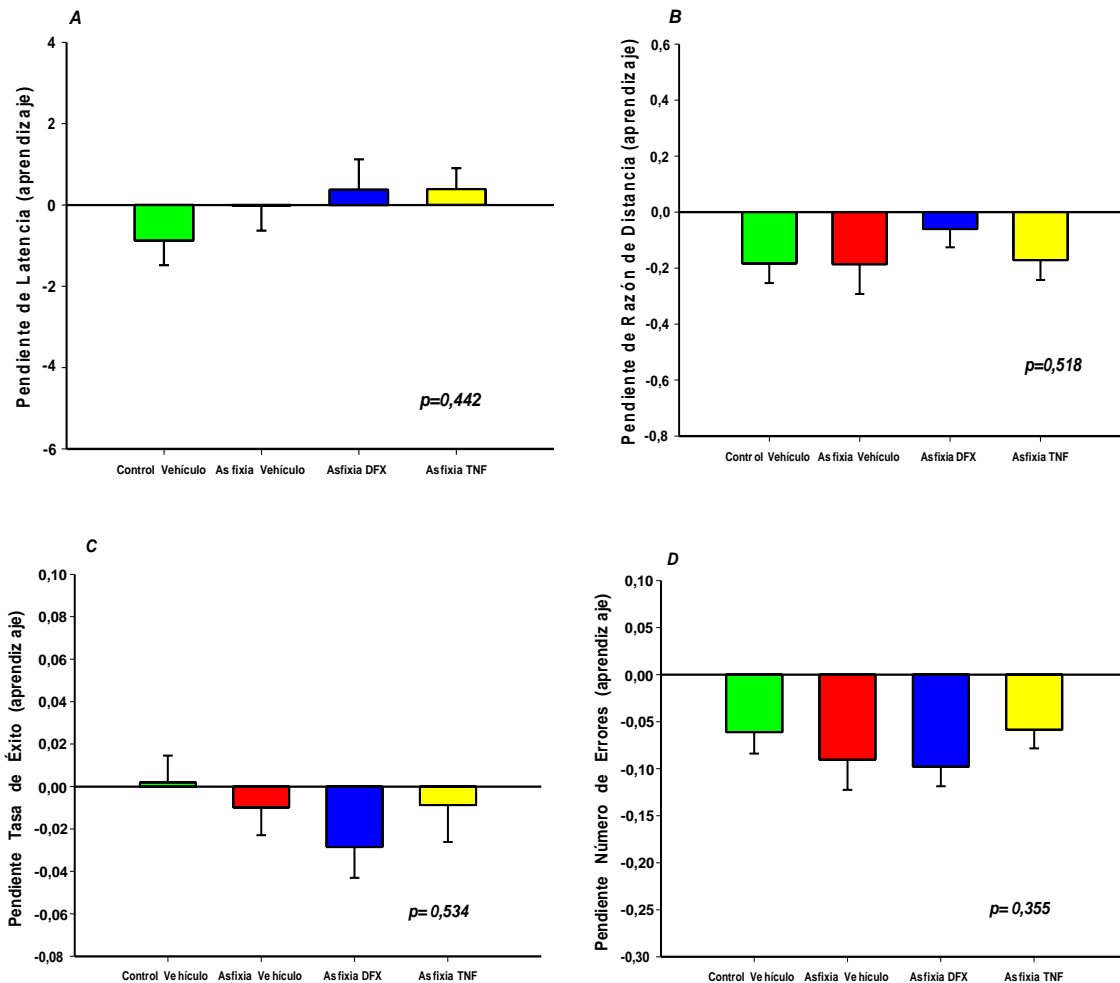


Figura 17: Promedio del valor de las pendientes de aprendizaje de las distintas variables estudiadas en los grupos experimentales y controles en la fase de aprendizaje del test Oasis Maze en todos los grupos estudiados. Se realizó un análisis ANOVA de Rango (Kruskal Wallis) ($*p<0,05$) ($N=7-9$ individuos por grupo). Análisis intergrupar en Pendiente de Aprendizaje para las variables (A) Latencia (B) Razón de Distancia (C) Tasa de Éxito (D) Número de Errores.

A modo de análisis complementario para estimar si había diferencias entre los grupos se realizó un ANOVA de una vía, seguido de un ANOVA de dos vías, en donde se encontraron hallazgos muy similares a los obtenidos y mostrados anteriormente (**Ver sección de Anexos, Figura 1 a 4 para ANOVA de una vía, Figura 9 a 12 para ANOVA de dos vías**).

Fase de Memoria:

En esta fase se evaluó el recorrido que el animal realizó en un minuto en búsqueda del pocillo recompensado y 24 horas posterior a la fase de Aprendizaje. Se trata de estimar si el animal recordaba o no la ubicación del pocillo que contenía la recompensa (gota de agua) con un total de 15 ensayos.

En las siguientes figuras se presenta el análisis **intragrupal** en la Fase de Memoria.

En la **Figura 18** se presenta el análisis de la Latencia evaluada en las 15 sesiones para el grupo Control Vehículo (Figura 18A), Asfixia Vehículo (Figura 18B), Asfixia tratado con secretomas derivados de MSC preconditionadas con DFX (Figura 18C) y Asfixia tratado con secretomas derivados de MSC preconditionadas con $TNF\alpha+INF\gamma$ (Figura 19D).

Se observa para todos los grupos un r superior a cero. Se muestra además una correlación negativa entre las variables para todos los grupos, existiendo una relación inversa entre la Latencia y número de ensayos. Esta correlación es estadísticamente significativa sólo para el grupo Asfixia Vehículo exhibiendo mejoría en memoria, no así para el resto de los grupos estudiados. Este resultado se muestra inconsistente con lo mostrado en la fase de aprendizaje, donde el grupo asfíctico sin tratamiento no tuvo un buen desempeño.

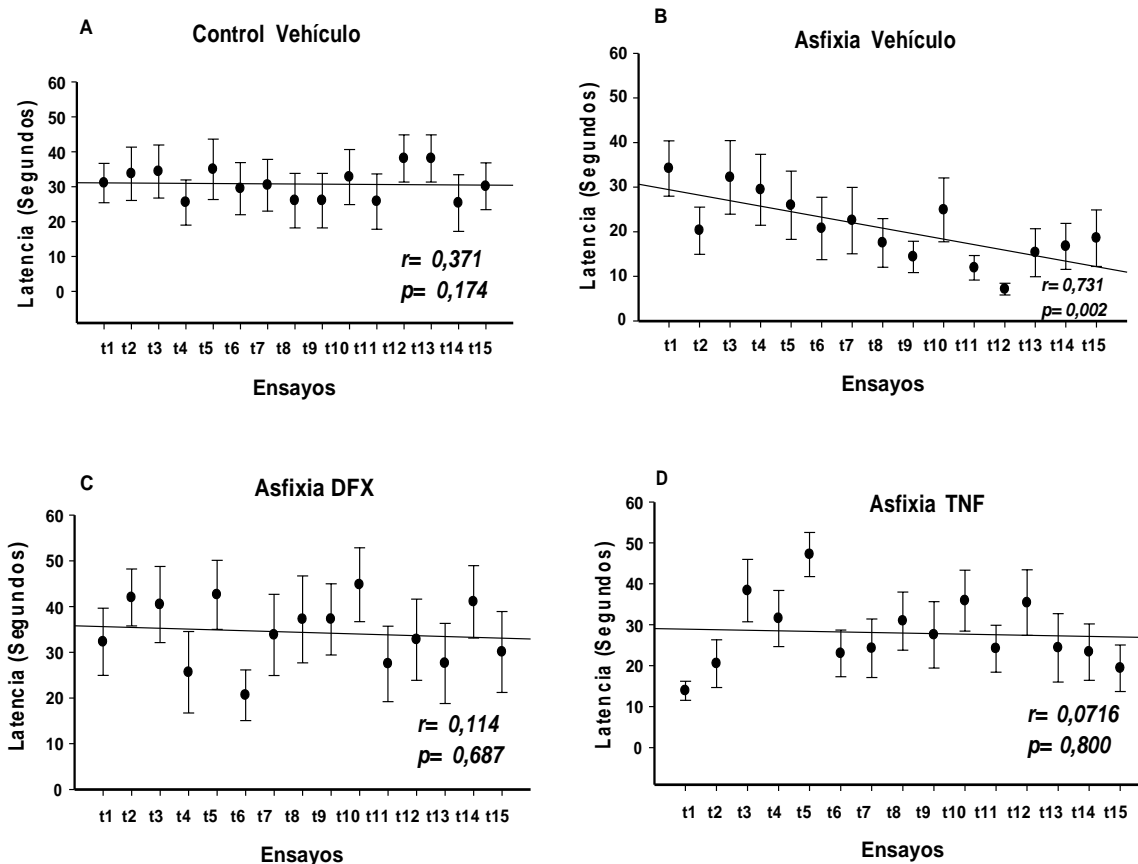


Figura 18: Cuantificación de la Latencia en segundos en la fase de memoria del test Oasis Maze en todos los grupos estudiados. Se realizó un análisis de Regresión Lineal Simple para cada uno de los grupos controles y experimentales ($N=7-9$ individuos por grupo). Análisis de Latencia para los grupos (A) Control Vehículo (B) Asfixia Vehículo (C) Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con DFX (D) Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con $TNF\alpha+INF\gamma$.

Resultados similares fueron los obtenidos para cada grupo de individuos en la variable **Razón de Distancia (Figura 19)**.

Al analizar esta variable se observó un r superior a cero para todos los grupos. Se muestra una correlación negativa entre las variables, existiendo una relación inversa entre la Razón de Distancia y número de ensayos, siendo estadísticamente significativa sólo para el grupo asfíctico tratado con $TNF\alpha+INF\gamma$. Se aprecia mejoría en la memoria únicamente en dicho grupo estudiado.

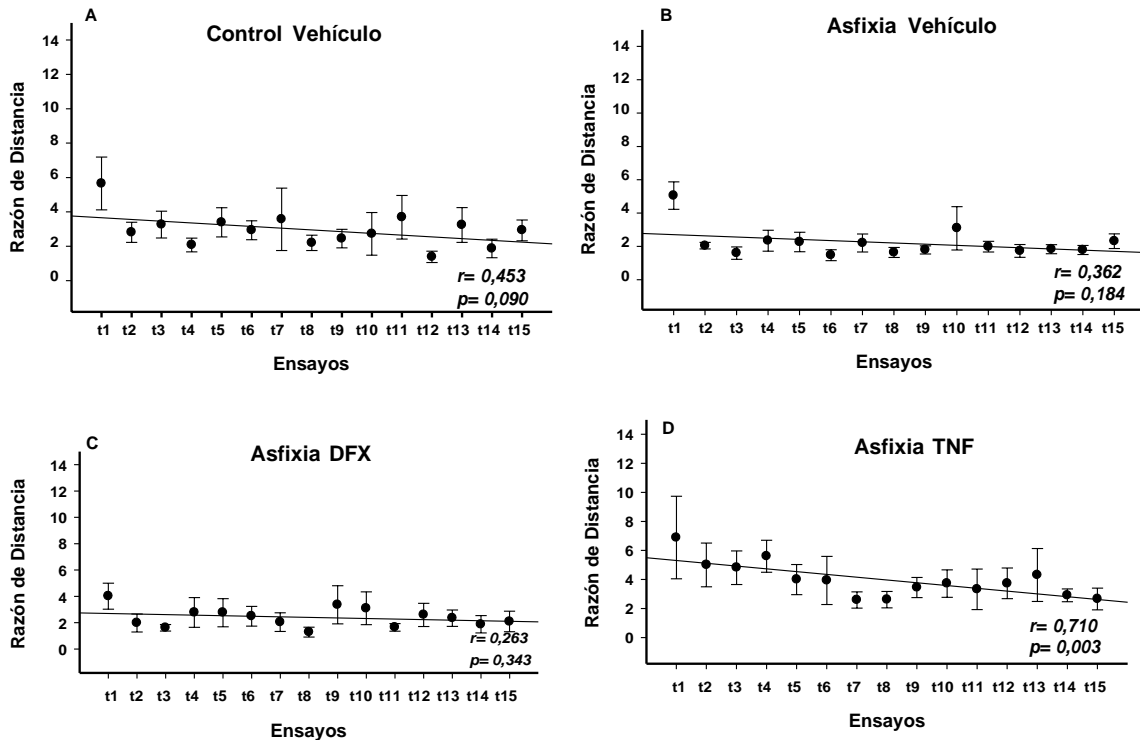


Figura 19: Cuantificación de la Razón de Distancia en la fase de memoria del test Oasis Maze en todos los grupos estudiados. Se realizó un análisis de Regresión Lineal Simple para cada uno de los grupos controles y experimentales (N=7-9 individuos por grupo). Análisis de Razón de Distancia para los grupos (A) Control Vehículo (B) Asfixia Vehículo (C) Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con DFX (D) Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con TNF α +INF γ .

Al analizar la variable **Tasa de Éxito** (Figura 20) se observó un r superior a cero en todos los grupos. Se evidencia que hay una correlación positiva entre las variables para los grupos Control Vehículo y Asfixia Vehículo, existiendo una relación directa entre la Tasa de Éxito y el número de ensayos siendo estadísticamente significativa para los grupos mencionados y donde sí se muestra mejoría en memoria. No ocurre aquello en los grupos asfícticos tratados con secretomas dado que muestran una correlación negativa entre las variables y una relación inversa entre las mismas.

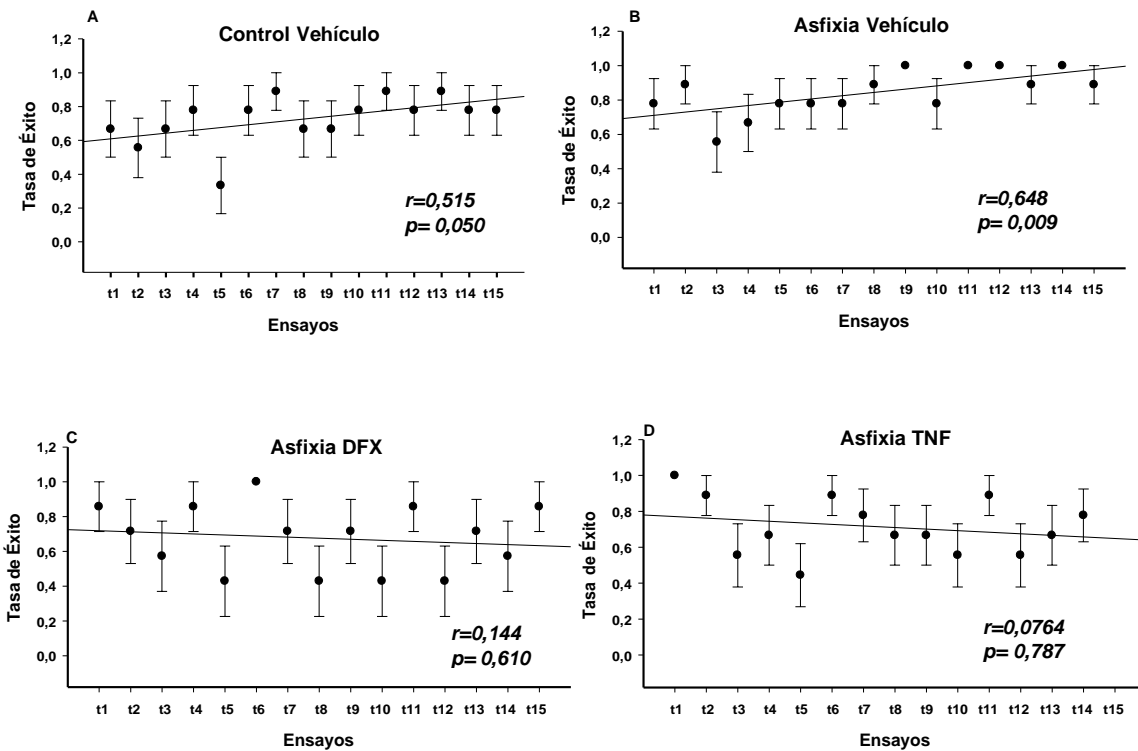


Figura 20: Cuantificación de la Tasa de Éxito en la fase de memoria del test Oasis Maze en todos los grupos estudiados. Se realizó un análisis de Regresión Lineal Simple para cada uno de los grupos controles y experimentales ($N=7-9$ individuos por grupo). Análisis de Tasa de Éxito para los grupos (A) Control Vehículo (B) Asfixia Vehículo (C) Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con DFX (D) Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con $TNF\alpha+INF\gamma$.

Al cuantificar la variable **Número de Errores** (Figura 21) se encontró que todos los grupos mostraron un r superior a cero. Se evidencia una correlación negativa entre las variables, existiendo una relación inversa entre el Número de Errores y número de ensayos, siendo estadísticamente significativa para todos los grupos y mostrando mejoría en los niveles de memoria en todos ellos.

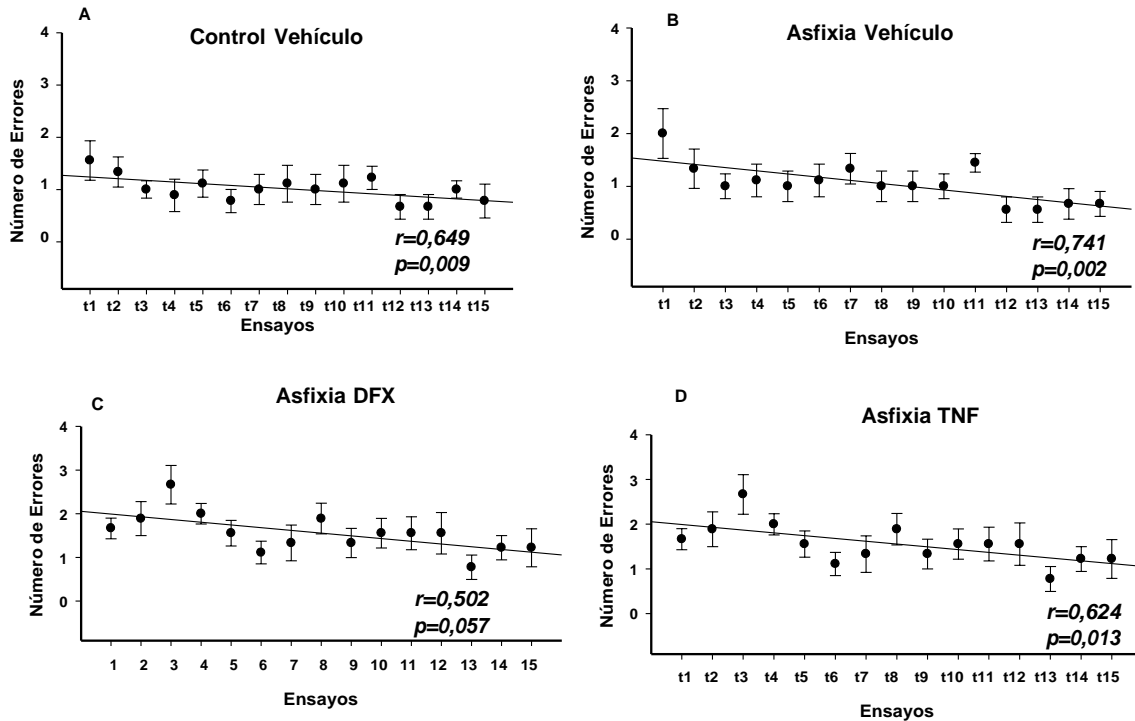


Figura 21: Cuantificación del Número de Errores en la fase de memoria del test Oasis Maze en todos los grupos estudiados. Se realizó un análisis de Regresión Lineal Simple para cada uno de los grupos controles y experimentales ($N=7-9$ individuos por grupo). Análisis de Número de Errores para los grupos (A) Control Vehículo (B) Asfixia Vehículo (C) Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con DFX (D) Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con $TNF\alpha+INF\gamma$.

Para visualizar y comparar el rendimiento **intergrupar** en la fase de Memoria del test y, de este modo determinar qué grupo tuvo el mejor rendimiento en cada variable estudiada, se realizó un cálculo de la pendiente de memoria en cada individuo de cada grupo. Luego, estos valores fueron agrupados por tratamiento, promediados y posteriormente graficados.

En la **Figura 22** se aprecia, en todas las variables, la existencia de pendientes negativas para todos los grupos, a excepción de Control Vehículo y Asfixia Vehículo en Tasa de Éxito. Se observa además que no hay diferencias significativas entre las pendientes de memoria de los grupos estudiados en ninguna de las variables estudiadas en la fase de Memoria del test.

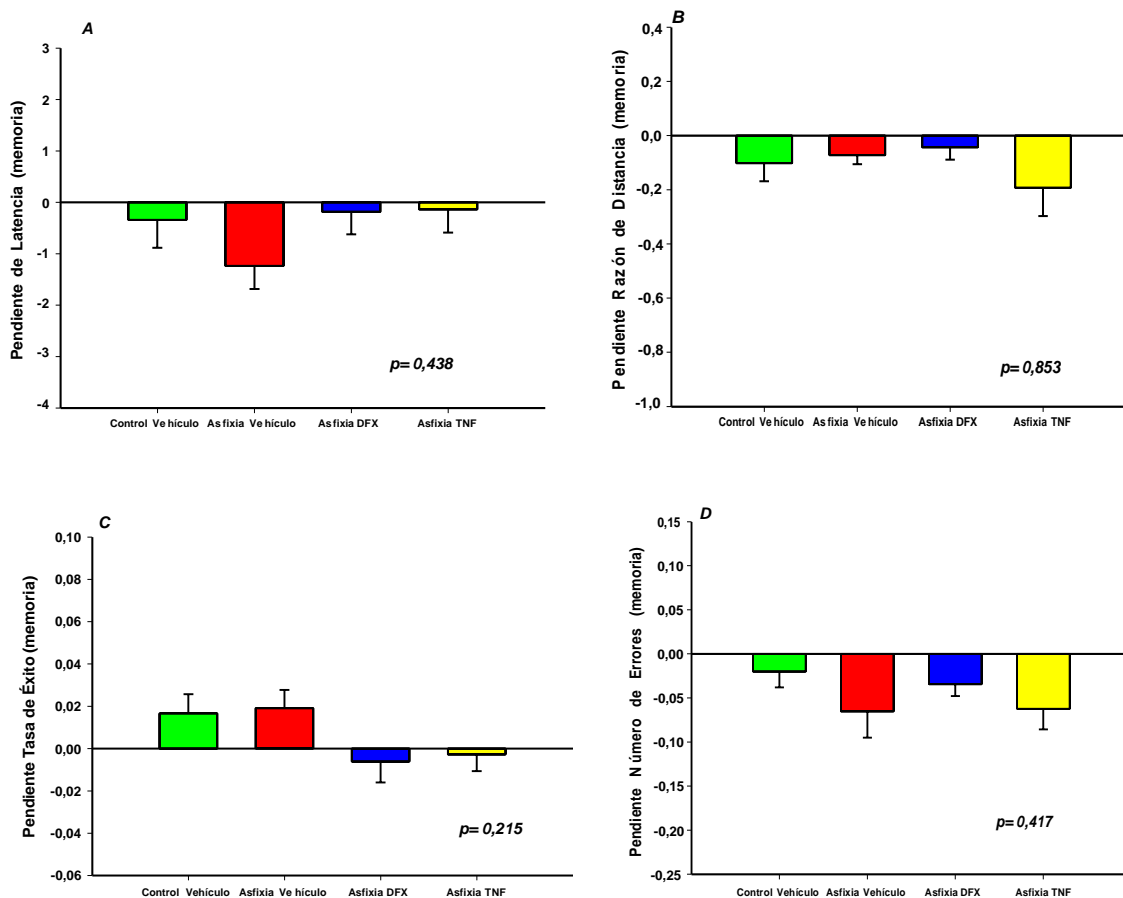


Figura 22: Promedio del valor de las pendientes de memoria de las variables estudiadas en los grupos experimentales y controles en la fase de aprendizaje del test Oasis Maze. Se realizó un análisis ANOVA de Rango (Kruskal Wallis) ($*p < 0,05$) ($N=7-9$ individuos por grupo). Análisis integrupal en Pendiente de Memoria para las variables (A) Latencia (B) Razón de Distancia (C) Tasa de Éxito (D) Número de Errores.

A modo de análisis complementario para estimar si había diferencias entre los grupos se realizó un ANOVA de una vía, seguido de un ANOVA de dos vías, en donde se encontraron hallazgos muy similares a los obtenidos y mostrados anteriormente. Se aprecia además que el modelo de Regresión Lineal Simple es el más adecuado para el análisis de esta prueba considerando que los modelos de ANOVA de una y dos vías no arrojan diferencias claras y tampoco en las gráficas asociadas. (Ver sección Anexos, Figura 5 a 8 para ANOVA de una vía, Figura 13 a 16 para ANOVA de dos vías).

Se elaboró además una serie de tablas sintéticas con las que se pretende dar cuenta de los resultados obtenidos para cada condición en los valores r y p en cada variable estudiada. Los

datos obtenidos se desprenden de los análisis basados en el modelo de Regresión Lineal Simple aplicado.

En las **Tablas 2 y 3** se especifican los valores de r y p para todas las condiciones en la Fase de Aprendizaje y Memoria, respectivamente, dentro del análisis intragrupal. También se especifica el tipo de pendiente para Aprendizaje y Memoria junto con señalar si hay o no mejoría en ambas conductas.

VARIABLE	CONDICIÓN	VALOR p	VALOR r	Tipo de Pendiente de Aprendizaje	Mejora Aprendizaje
Latencia	Control Vehículo	0,008	0,655	Negativa	Sí
	Asfixia Vehículo	0,959	0,0144	Negativa	No
	Asfixia DFX	0,319	0,276	Positiva	No
	Asfixia TNF	0,199	0,352	Positiva	No
Razón de Distancia	Control Vehículo	0,036	0,544	Negativa	Sí
	Asfixia Vehículo	0,046	0,522	Negativa	Sí
	Asfixia DFX	0,435	0,218	Negativa	No
	Asfixia TNF	0,050	0,513	Negativa	Sí
Tasa de Éxito	Control Vehículo	0,372	0,173	Positiva	No
	Asfixia Vehículo	0,215	0,340	Negativa	No
	Asfixia DFX	0,014	0,618	Negativa	No
	Asfixia TNF	0,016	0,610	Negativa	No
Número de Errores	Control Vehículo	0,001	0,758	Negativa	Sí
	Asfixia Vehículo	<0,001	0,810	Negativa	Sí
	Asfixia DFX	<0,001	0,780	Negativa	Sí
	Asfixia TNF	0,036	0,543	Negativa	Sí

Tabla 2: Tabulación intragrupal de los valores de r y p para todas las condiciones y todas las variables estudiadas en la Fase de Aprendizaje. En amarillo se destacan los grupos que mostraron un $p < 0,05$ y que muestran o no mejoría en el aprendizaje.

VARIABLE	CONDICIÓN	VALOR p	VALOR r	Tipo de Pendiente de Memoria	Mejora Memoria
Latencia	Control Vehículo	0,174	0,371	Negativa	No
	Asfixia Vehículo	0,002	0,731	Negativa	Sí
	Asfixia DFX	0,687	0,114	Negativa	No
	Asfixia TNF	0,800	0,0716	Negativa	No
Razón de Distancia	Control Vehículo	0,090	0,453	Negativa	No
	Asfixia Vehículo	0,184	0,362	Negativa	No
	Asfixia DFX	0,343	0,263	Negativa	No
	Asfixia TNF	0,003	0,710	Negativa	Sí
Tasa de Éxito	Control Vehículo	0,050	0,515	Positiva	Sí
	Asfixia Vehículo	0,009	0,648	Positiva	Sí
	Asfixia DFX	0,610	0,144	Negativa	No
	Asfixia TNF	0,787	0,0764	Negativa	No
Número de Errores	Control Vehículo	0,009	0,649	Negativa	Sí
	Asfixia Vehículo	0,002	0,741	Negativa	Sí
	Asfixia DFX	0,057	0,502	Negativa	Sí
	Asfixia TNF	0,013	0,624	Negativa	Sí

Tabla 3: Tabulación intragrupal de los valores de r y p para todas las condiciones y todas las variables estudiadas en la Fase de Memoria. En amarillo se destacan los grupos que mostraron un $p < 0,05$ y que muestran o no mejoría en memoria.

En relación a estos resultados podemos apreciar que son inconsistentes y controversiales en lo referente a memoria espacial, aspectos que se discutirán en las siguientes líneas.

DISCUSIÓN

En la presente investigación se propuso indagar en el desempeño conductual de individuos controles y asfícticos, estos últimos tratados con secretomas derivados de MSC precondicionadas con DFX o $TNF\alpha+INF\gamma$ y del mismo modo establecer cuál de los dos tratamientos generó un mejor efecto. Dado que se deseaba evaluar específicamente el efecto de la administración de los tratamientos en un episodio de AP y no si existía o no un efecto deletéreo de los mismos se prescindió del uso de un grupo Control con tratamientos aplicados. Se observó que ambos secretomas mostraron una efectividad similar para disminuir los déficits inducidos por la AP.

Los efectos de la administración de secretomas han estado bien documentados en estudios anteriores. Los secretomas derivados de MSC precondicionadas con agentes proinflamatorios o miméticos de hipoxia han demostrado una actividad antioxidante y antiinflamatoria mejorada, lo que se caracteriza por un aumento de citoquinas antiinflamatorias IL-10 y TGF-1 en comparación con lo mostrado con el tratamiento con secretoma derivados de MSC no precondicionadas (Quintanilla et al., 2019). También se ha descrito que los secretomas derivados de MSC precondicionadas mejoran la producción y secreción de varios factores que participan en la homeostasis del glutamato (específicamente IL-10 y TGF-B1) (Quintanilla et al, 2019), principal neurotransmisor del sistema nervioso central y responsable del aprendizaje. Con todos aquellos beneficios descritos en la literatura es posible determinar que los cambios moleculares producto de la acción de los secretomas precondicionados en el sistema nervioso provocan claros cambios conductuales en los individuos, previniendo con ello los déficits inducidos por la asfixia.

Para analizar los efectos de la asfixia perinatal y su tratamiento con secretomas derivados de MSC precondicionadas con DFX y $TNF\alpha+INF\gamma$. en la respuesta cognitiva de las ratas se aplicaron diferentes pruebas conductuales. Estudios recientes efectuados en laboratorio con el modelo de AP nos indican que la estimulación con ejercicio físico, por ejemplo, provocó mejorías cognitivas, específicamente en la memoria de reconocimiento y que obedecen a plasticidad sináptica del hipocampo (Silva, 2017), lo cual respalda el hecho de que ciertas estimulaciones cerebrales, sean estas farmacológicas o no, producen efectos positivos en el sistema nervioso central. Se observó en este estudio que la AP indujo una disminución en los

niveles de memoria de reconocimiento de objetos, efecto prevenido por el tratamiento con ambos tipos de secretomas (constituido, conforme a lo anteriormente señalado, como una alternativa de estimulación de tipo farmacológica). Al analizar el efecto de la AP en la memoria espacial dependiente de hipocampo mediante la prueba Oasis Maze se encontró que el tratamiento no generó mejoría significativa en los niveles de memoria. Al analizar en efecto de la AP y su tratamiento con secretomas en Ansiedad mediante la prueba de Campo Abierto se encontró que la AP indujo una disminución en el tiempo expendido de la rata en el centro de la arena (indicador de la ansiedad). Este efecto fue prevenido en las ratas con administración intranasal de secretomas derivados de MSC precondicionadas con $TNF\alpha+INF\gamma$, no así con el tratamiento con secretomas DFX. Ambos tratamientos también previnieron la disminución de la velocidad de desplazamiento y de la actividad locomotora inducida por la AP. La existencia de un circuito conformado por el hipocampo ventral, la corteza prefrontal y la amígdala, muy comprometido en la ansiedad y con abundancia de conexiones dopaminérgicas (Morales et al., 2011) podría ser impactado positivamente con el tratamiento con secretomas precondicionados. Del mismo modo, en los aspectos vinculados a la actividad locomotora, el impacto de los tratamientos en las neuronas mesencefálicas dopaminérgicas también parece ser positivo. Puntualmente en el cuerpo estriado, estructura muy sensible a la hipoxia (Morales et al., 2011), los tratamientos pudieron haber generado efectos favorables en lo concerniente al aprendizaje motor. Los efectos antiinflamatorios y antioxidantes de largo plazo inducidos por las MSC han sido bien documentados en modelos animales adultos de accidente cerebrovascular, isquemia y lesión cerebral traumática (Tang et al. 2015) con lo que se aprecia que en los episodios de AP los secretomas también pueden producir efectos favorables tanto en la disminución de los niveles de ansiedad de los individuos y un aumento en la memoria de reconocimiento. Con ello, los secretomas pueden constituirse como una alternativa interesante de tratamiento en la mejora del rendimiento cognitivo en sujetos que han sido afectados por un episodio de AP, sustentándose en su amplia acción molecular para generar considerables cambios conductuales.

Se ha descrito que la AP induce en ratas un incremento en los niveles de estrés, ansiedad e hiperactividad (Hershkowitz et al., 1983). Considerando lo anterior es que se optó por aplicar los tratamientos indicados, generando en los individuos asfícticos una disminución de los niveles de ansiedad, evidenciado por el tiempo de las ratas en el centro de la arena,

específicamente en los individuos en los que se aplicó la dosis de secretoma $TNF\alpha+INF\gamma$. Sin embargo, en otras variables analizadas como Actividad Locomotora, Velocidad de Desplazamiento y Distancia Recorrida, ambos tratamientos mostraron ser efectivos en revertir los efectos de la AP. Se ha descrito que la administración intracerebral de secretomas en la sustancia nigra y el cuerpo estriado de ratas tratadas con 6-hidroxidopamina (un modelo de rata afectada por enfermedad de Párkinson) (Teixeira et al, 2017) generó un aumento en el número de neuronas y terminales dopaminérgicas en el cerebro. Se ha visto, además, en base a lo anterior, que el aumento de la liberación de dopamina contribuye a modular la ansiedad (Pérez de La Mora, 2003). También se ha descrito que la administración de secretomas derivados de células madre disminuye los niveles de ansiedad causados por la neofobia que los animales experimentan ante un entorno novedoso en la prueba de Campo Abierto (Teixeira et al, 2017). Existen estudios donde se demostró que el aumento de la excitabilidad neuronal a nivel de la amígdala lateral condujo a un miedo generalizado en ratas (Ghosh y Chattarji, 2015).

En modelos animales se ha evidenciado que la AP induce un rendimiento deficiente en la tarea de reconocimiento de objetos, lo que sugiere un déficit en memoria no espacial (Simola et al, 2008). Se ha demostrado también que, en un modelo de rata con enfermedad de Alzheimer la administración de secretomas mejoró la memoria, reduciendo la formación de placas amiloides y la gliosis, aumentando la densidad neuronal en la corteza cerebral y el hipocampo (Santamaría et al., 2020). En el presente estudio el cuadro asfíctico también generó una disminución en los niveles de memoria no espacial y la administración de secretomas en los individuos estudiados genera un incremento de la misma, obteniéndose en ambos tipos de secretomas niveles similares de mejoría, con un mejor rendimiento para Índice de Reconocimiento en el tratamiento con DFX y un mejor rendimiento en el Número de Aproximaciones al Objeto Nuevo en el tratamiento con $TNF\alpha+INF\gamma$. Así es como el tratamiento con secretomas promueve un aumento en los niveles de memoria no espacial o de reconocimiento. Se puede apreciar que el tratamiento con secretomas contribuye a mejorar los niveles de Memoria de Reconocimiento en los sujetos asfícticos y ambos tipos de secretomas provocan efectos similares en ella.

Al analizar los resultados de la prueba Oasis Maze, se encontró que éstos fueron inconsistentes y controversiales. El análisis intragrupal empleado indica que los resultados en la variable Latencia (determinante en parámetros de aprendizaje y memoria) no fueron consistentes, considerando que el grupo asfíctico sin tratamiento exhibe mejores niveles de latencia que el grupo control. La Latencia no fue afectada por la asfixia ni tampoco es mejorada por los tratamientos. Tampoco se reportaron resultados positivos en la variable Tasa de Éxito, donde la existencia de pendientes negativas indicó una relación inversa entre las variables, debiendo existir una relación directa entre Tasa de Éxito y Número de Ensayos. Con ello se aprecia además que la Tasa de Éxito es una variable que tampoco se ve afectada por la asfixia y tampoco fue mejorada por los tratamientos. No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el rendimiento de los grupos asfícticos tratados con secretomas y con vehículo. Además, los tratamientos no generaron efectos en memoria espacial. Estudios recientes, muestran que la AP también induce un rendimiento deficiente en memoria espacial (Blanco et al., 2015) aspecto que fue evaluado con el test del Laberinto Acuático de Morris, una prueba destinada a evaluar el rendimiento de los sujetos en memoria espacial y utilizando una piscina circular llena de agua en la que se ubica una plataforma que debe ser localizada por el individuo (Morris, 1984). Existe la posibilidad de que la memoria espacial no se vea afectada por el cuadro asfíctico y también que, durante el desarrollo de la prueba Oasis Maze, aplicada en este estudio para evaluar este tipo de memoria, existiesen algunas dificultades técnicas que no pudiesen haber sido controladas del todo como, por ejemplo, escaso movimiento de los sujetos al intentar encontrar el pocillo recompensado, entre otros elementos relevantes que pudiesen haber incidido.

Los efectos conductuales provocados por la administración de los tratamientos se traducen en un fenómeno preventivo de los daños estructurales y funcionales provocados por el episodio de AP. Es necesario considerar en base a aquello que los individuos estudiados se encontraban en una etapa del ciclo vital entre P30 y P60, lo que corresponde a ratas jóvenes.

En consecuencia, el fenómeno observado entonces se ajusta a los principios de la plasticidad neuronal y cerebral, cuya acción se aprecia de modo más amplio y más efectivo en la juventud de los individuos. Existe un principio llamado “*Principio de Kennard*” que nos indica que las lesiones cerebrales a temprana edad provocan un menor nivel de alteración debido a la presencia de una mayor cantidad de recuperación (Dennis, 2010; Finger y Wolf, 1988). Por lo tanto, la efectividad de los tratamientos aplicados se potencia aún más considerando la etapa del ciclo vital de los individuos en la que éstos fueron aplicados. Con ello el concepto de prevención adquiere una especial relevancia.

La administración de estos tratamientos provoca cambios en el cerebro, en especial en zonas sensibles a la hipoxia como el hipocampo. Tal como fue señalado, las células de la zona CA1 son las más sensibles dentro del hipocampo en conjunto con las células de Purkinje. La zona CA1 se ubica continua al subículum y se ha observado que la hipoxia genera cambios agudos y crónicos en la excitabilidad de la red neuronal de la misma (Crain et al., 1988; Petitto et al., 1987 y Jensen et al., 1998). Por lo tanto, la administración de los tratamientos provocaría efectos positivos en dichas estructuras, lo que se traduce en una mejoría en los parámetros conductuales estudiados.

Uno de los principales elementos en el último tiempo ha sido conocer y profundizar en los mecanismos de pasaje de fármacos desde la cavidad nasal hacia el sistema nervioso central, siendo aquello fundamental para poder avanzar en el estudio de tratamientos intranasales desarrollados para diversas patologías neurológicas. Para este estudio se estudiaron los efectos que provocaron los tratamientos administrados por vía intranasal, lo que implica la participación del epitelio olfatorio. Aquel se constituye como un haz de sustancia blanca que se conecta directamente a cortezas primarias, sin conectar previamente con el tálamo (Tayebati et al., 2013). Además, la irrigación de la zona es muy amplia (Ferreira et al., 2019), con lo cual el ingreso de los fármacos al cerebro es mucho más eficiente y otorga un mayor margen de acción para generar sus efectos. De todos modos, se han reportado otras vías de pasaje de fármacos, aunque mucho menor, tales como la vasculatura, el líquido céfaloorraquídeo y el sistema linfático que actúan amplificando el transporte de las sustancias. En este sentido es posible que la combinación de todas estas vías ayude a generar el pasaje total, pero definitivamente la predominancia de una u otra dependería de las características

físicoquímicas del fármaco, la formulación del medicamento y del tipo de dispositivo de entrega utilizado (Dhuria et al., 2010). Con ello se reafirma que la administración intranasal de los tratamientos estudiados en esta investigación se constituye como un mecanismo efectivo.

Se ha descrito que el acondicionamiento *in vitro* de las MSC con las citoquinas proinflamatorias TNF- α + IFN- γ mejora en gran medida la secreción de una amplia gama de factores terapéuticos (Ezquer-Quintanilla et al. 2017). Aquello nos indica que los efectos de la administración de secretomas derivados de células madre acondicionadas pueden ser mayores en contraposición con aquellos efectos que pudiesen provocar los secretomas derivados de células madre no acondicionadas al estar los primeros mayormente potenciados. Estudios recientes demostraron que las MSC derivadas de tejido adiposo humano (hAD-MSC), acondicionadas previamente con citoquinas proinflamatorias, mejoraron su potencial antiinflamatorio, pro-regenerativo y antioxidante, lo que lo convierte en una herramienta atractiva para una terapia eficaz de recursos humanos neonatales. Los resultados obtenidos en las pruebas conductuales aplicadas demuestran que los secretomas acondicionados, al mejorar la capacidad antiinflamatoria del tejido cerebral y los efectos antioxidantes en las neuronas hipocámpicas (Farfán et al, 2020), actúan también de forma eficaz en áreas del sistema nervioso central vinculadas a la ansiedad y la actividad locomotora, produciendo también mejoría en aquellos aspectos. Un episodio de AP induce estrés oxidativo sostenido en las neuronas de los ganglios basales y del hipocampo y algunos mecanismos de reparación de tipo endógeno como la neurogénesis, la sinaptogénesis y las vías antiapoptóticas han sido sugeridos para revertir aquello, pero no siempre son suficientes (Farfán et al., 2020). Adicionalmente aquello se advierte incluso en otras patologías neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, donde la regeneración funcional no alcanza a cubrir los requerimientos necesarios para el restablecimiento estructural posterior al daño neurodegenerativo (Mata et al., 2018). Tal como se señaló entonces se requiere un soporte adicional para apoyar a los mecanismos de reparación de tipo endógeno lo que respalda la utilización de los secretomas como alternativa de tratamiento y, en este caso, como mecanismos que previenen los déficits cognitivos secundarios a un episodio de AP.

De esta manera la hipótesis de esta investigación se comprueba parcialmente dado que no todos los déficits cognitivos planteados en este estudio e inducidos por la AP son prevenidos por la administración de secretomas derivados de células madre preconicionadas. Es importante recalcar que los hallazgos de este estudio indican que el tratamiento con secretomas preconicionados provoca efectos específicos sólo en determinadas conductas, con un efecto sostenido de los secretomas derivados de células madre mesenquimales preconicionadas con DFX o $TNF\alpha+INF\gamma$ en el desarrollo motor, la ansiedad y la memoria de reconocimiento, no así en la memoria espacial. Los efectos se traducen en la mejoría del comportamiento de los individuos en lo referente a actividad locomotora, memoria de reconocimiento y también en la disminución de la ansiedad, sin generar efectos en la memoria espacial de los individuos en el período del ciclo vital estudiado. El secretoma finalmente provocó efectos muy similares si las células madre mesenquimales se encontraban preconicionadas con DFX o $TNF\alpha+INF\gamma$, mejorando con ello el rendimiento de individuos con AP en aspectos vinculados a la Memoria No Espacial y Actividad Locomotora. El tratamiento con $TNF\alpha+INF\gamma$ provocó un mayor efecto en lo referente a Ansiedad. Es así como se concluye que la administración intranasal de dichos componentes se constituye como una nueva estrategia terapéutica, dentro de los marcos de la medicina traslacional, para prevenir los diferentes efectos provocados a corto y a largo plazo en un cuadro de Asfixia Perinatal, contribuyendo con ello, en el futuro, a generar nuevas opciones de tratamiento en cuadros asfícticos en seres humanos, mejorando las capacidades cognitivas y también la calidad de vida.

ANEXOS

Anexo 1: Análisis ANOVA de una vía (FASE DE APRENDIZAJE OASIS MAZE)

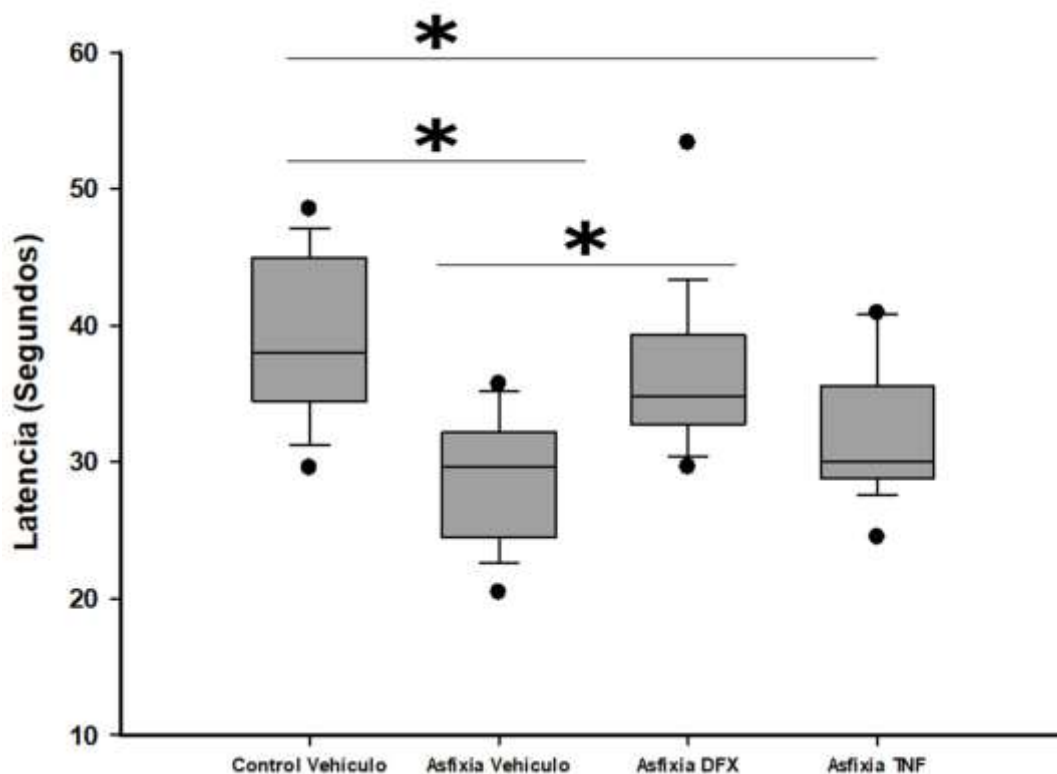


Figura 1: Cuantificación de la Latencia en la fase de aprendizaje del test Oasis Maze para cada uno de los grupos controles y experimentales (N=7-9 individuos por grupo). Análisis de Latencia para los grupos Control Vehículo, Asfixia Vehículo, Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con DFX y Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con TNF α +INF γ . A nivel estadístico se determinó la normalidad de los datos a través de la prueba Shapiro Wilk, seguido de una prueba ANOVA de una vía ($p < 0,001$) para luego aplicar un post hoc a través de la prueba Holm-Sidak ($*p < 0,05$ CV v/s AV; $*p < 0,05$ AV v/s A DFX; $*p < 0,05$ CV v/s A TNF)

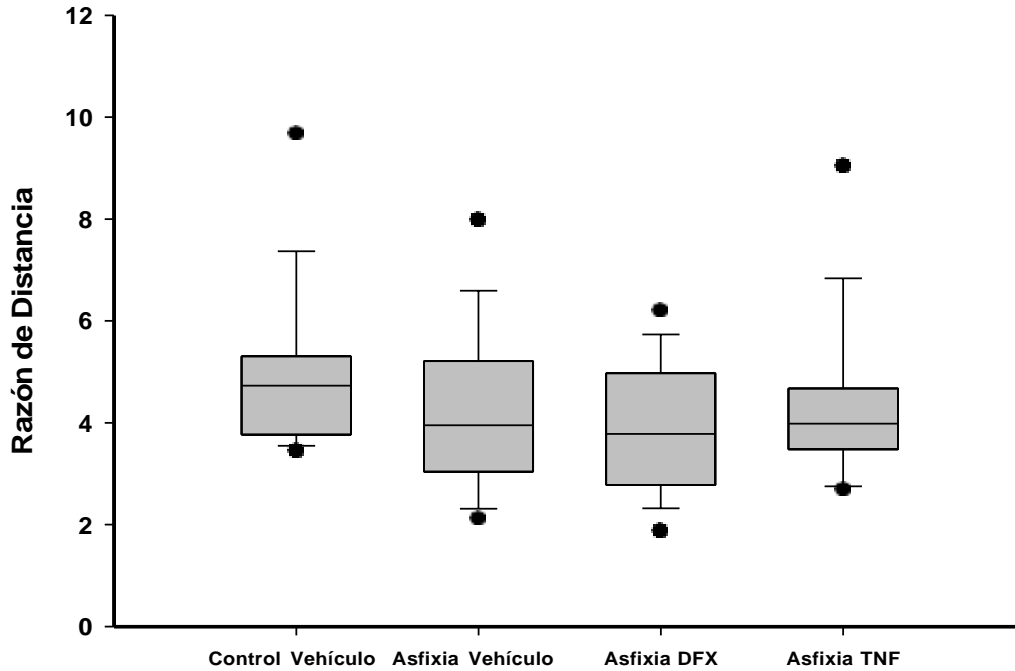


Figura 2: Cuantificación de la Razón de Distancia en la fase de aprendizaje del test Oasis Maze para cada uno de los grupos controles y experimentales (N=7-9 individuos por grupo). Análisis de Razón de Distancia para los grupos Control Vehículo, Asfixia Vehículo, Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con DFX y Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con TNF α +INF γ . A nivel estadístico se determinó la normalidad de los datos a través de la prueba Shapiro Wilk, seguido de una prueba ANOVA de una vía (p=0,223)

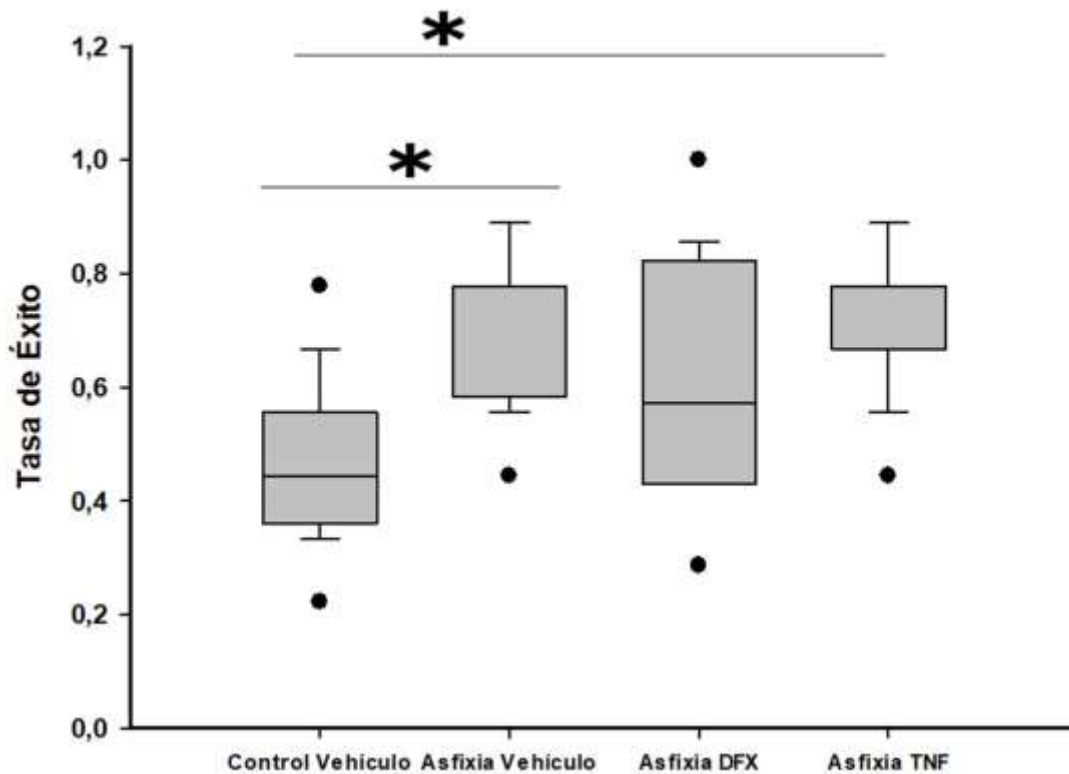


Figura 3: Cuantificación de la Tasa de Éxito en la fase de aprendizaje del test Oasis Maze para cada uno de los grupos controles y experimentales ($N=7-9$ individuos por grupo). Análisis de Tasa de Éxito para los grupos Control Vehículo, Asfixia Vehículo, Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con DFX y Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con $TNF\alpha+INF\gamma$. A nivel estadístico se determinó la normalidad de los datos a través de la prueba Shapiro Wilk, seguido de una prueba ANOVA de una vía ($p<0,001$) para luego aplicar un post hoc a través de la prueba Holm-Sidak ($*p<0,05$ CV v/s ATNF; $*p<0,05$ AV v/s CV)

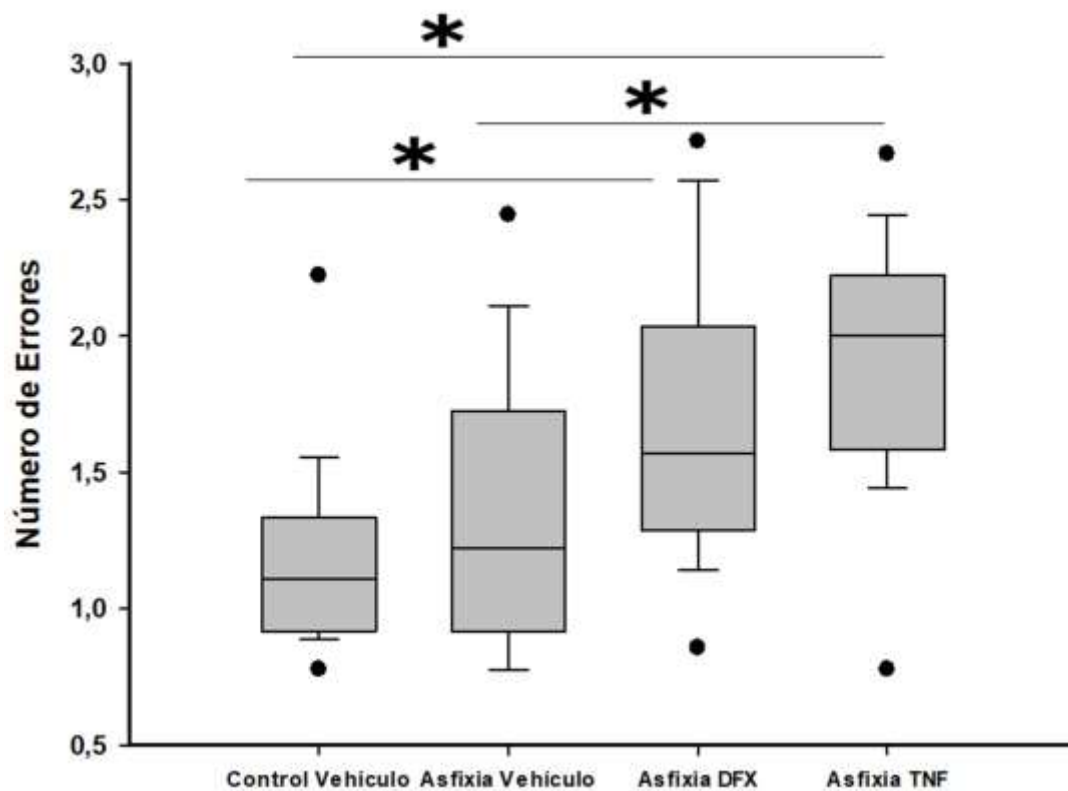


Figura 4: Cuantificación del Número de Errores en la fase de aprendizaje del test Oasis Maze para cada uno de los grupos controles y experimentales (N=7-9 individuos por grupo). Análisis de Número de Errores para los grupos Control Vehículo, Asfixia Vehículo, Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con DFX y Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con TNF α +INF γ . A nivel estadístico se determinó la normalidad de los datos a través de la prueba Shapiro Wilk, seguido de una prueba ANOVA de una vía ($p < 0,001$) para luego aplicar un post hoc a través de la prueba Holm-Sidak (* $p < 0,05$ CV v/s ATNF; * $p < 0,05$ AV v/s A TNF; * $p < 0,05$ CV v/s ADFX)

Anexo 2: Análisis ANOVA de una vía (FASE DE MEMORIA OASIS MAZE):

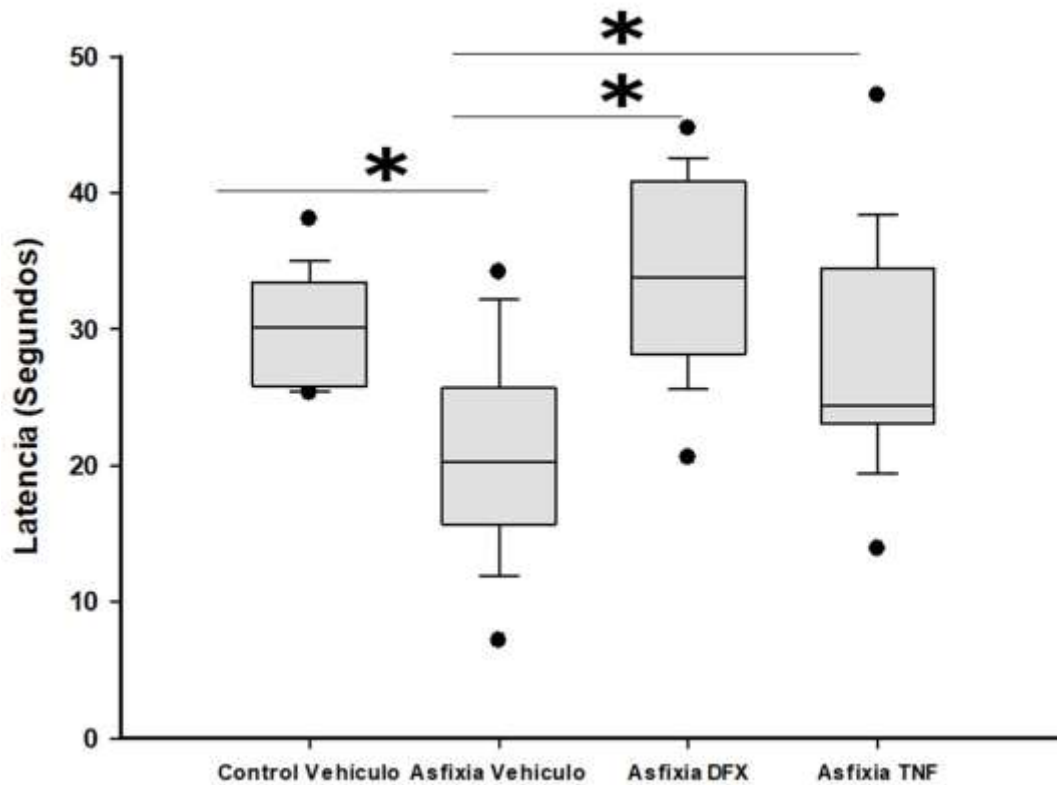


Figura 5: Cuantificación de la Latencia en la fase de memoria del test Oasis Maze para cada uno de los grupos controles y experimentales (N=7-9 individuos por grupo). Análisis de Latencia para los grupos Control Vehículo, Asfixia Vehículo, Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con DFX y Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con TNF α +INF γ . A nivel estadístico se determinó la normalidad de los datos a través de la prueba Shapiro Wilk, seguido de una prueba ANOVA de una vía ($p < 0,001$) para luego aplicar un post hoc a través de la prueba Holm-Sidak (* $p < 0,05$ AV v/s ADFX; * $p < 0,05$ CV v/s AV; * $p < 0,05$ AV v/s ATNF)

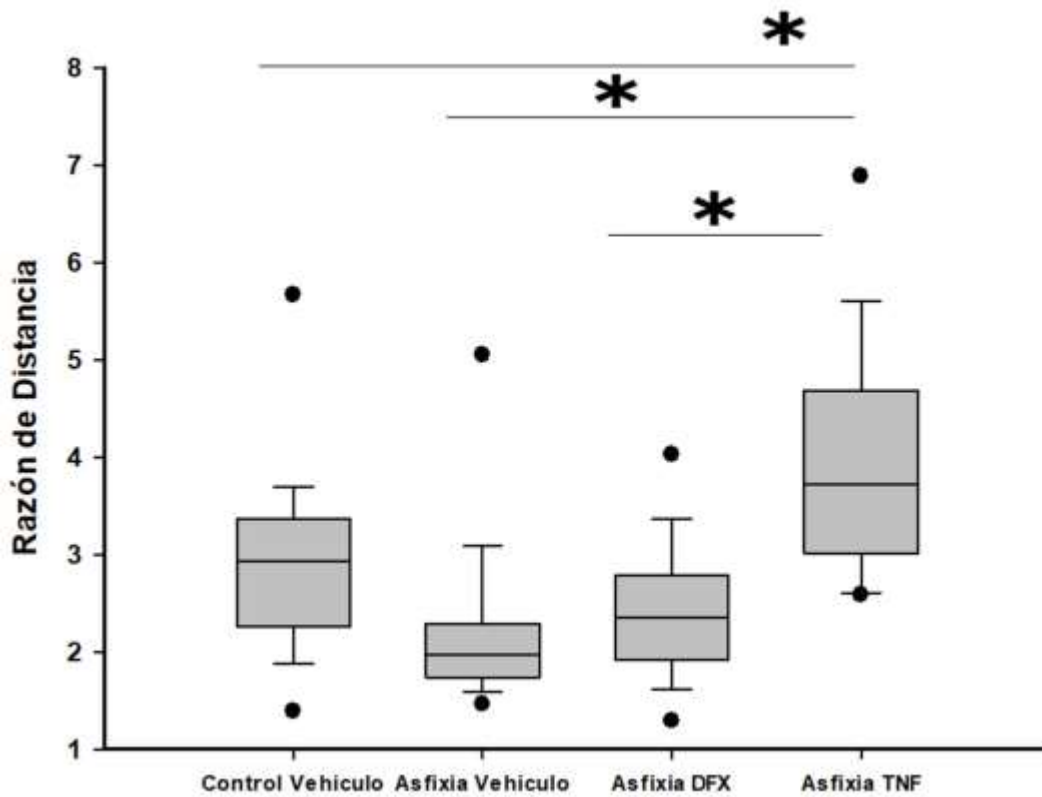


Figura 6: Cuantificación de la Razón de Distancia en la fase de memoria del test Oasis Maze para cada uno de los grupos controles y experimentales (N=7-9 individuos por grupo). Análisis de Latencia para los grupos Control Vehículo, Asfixia Vehículo, Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con DFX y Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con TNF α +INF γ . A nivel estadístico se determinó la normalidad de los datos a través de la prueba Shapiro Wilk, seguido de una prueba ANOVA de una vía ($p < 0,001$) para luego aplicar un post hoc a través de la prueba Holm-Sidak ($*p < 0,05$ AV v/s ATNF; $*p < 0,05$ ADFX v/s A TNF; $*p < 0,05$ CV v/s ATNF)

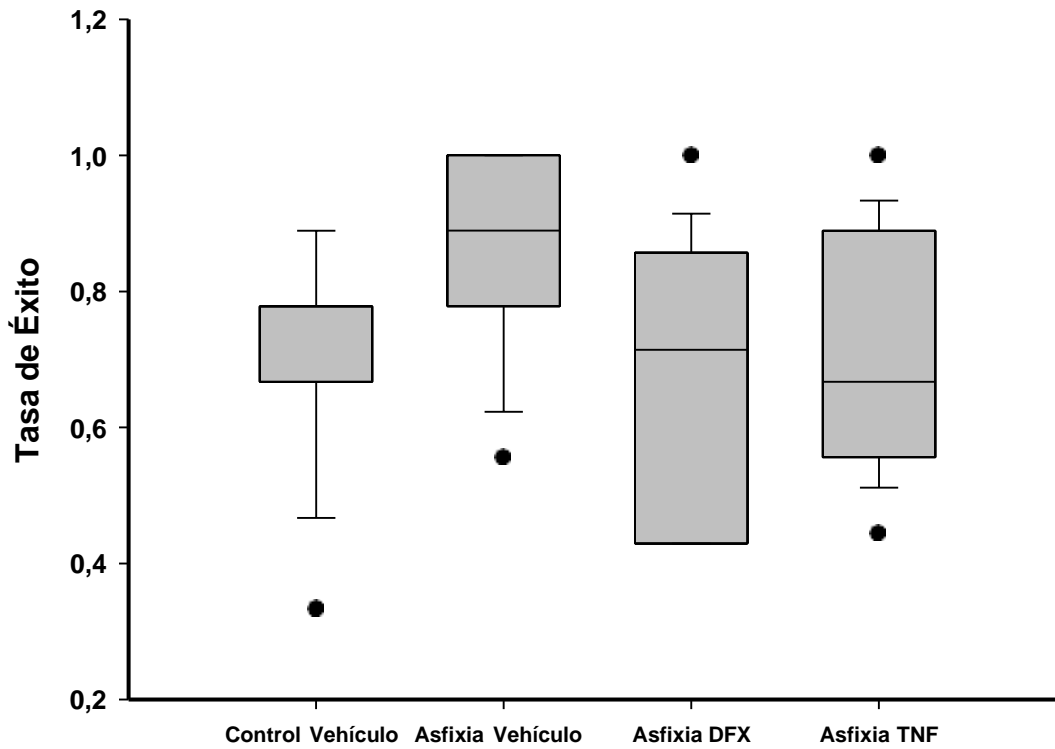


Figura 7: Cuantificación de la Tasa de Éxito en la fase de memoria del test Oasis Maze para cada uno de los grupos controles y experimentales (N=7-9 individuos por grupo). Análisis de Tasa de Éxito para los grupos Control Vehículo, Asfixia Vehículo, Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con DFX y Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con TNF α +INF γ . A nivel estadístico se determinó la normalidad de los datos a través de la prueba Shapiro Wilk, seguido de una prueba ANOVA de una vía ($p=0,036$).

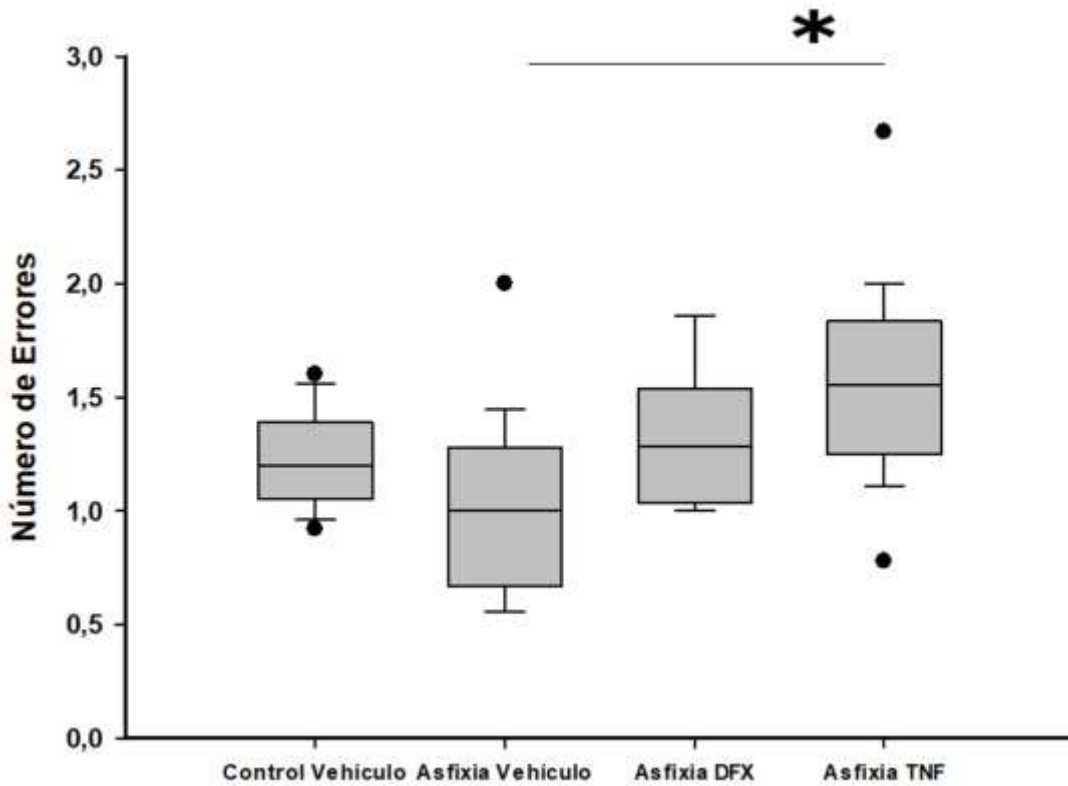


Figura 8: Cuantificación del Número de Errores en la fase de memoria del test Oasis Maze para cada uno de los grupos controles y experimentales (N=7-9 individuos por grupo). Análisis de Número de Errores para los grupos Control Vehículo, Asfixia Vehículo, Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con DFX y Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con TNF α +INF γ . A nivel estadístico se determinó la normalidad de los datos a través de la prueba Shapiro Wilk, seguido de una prueba ANOVA de una vía ($p=0,001$) para luego aplicar un post hoc a través de la prueba Holm-Sidak (* $p<0,05$ AV v/s A TNF)

Anexo 3: Análisis ANOVA de dos vías (FASE DE APRENDIZAJE OASIS MAZE):

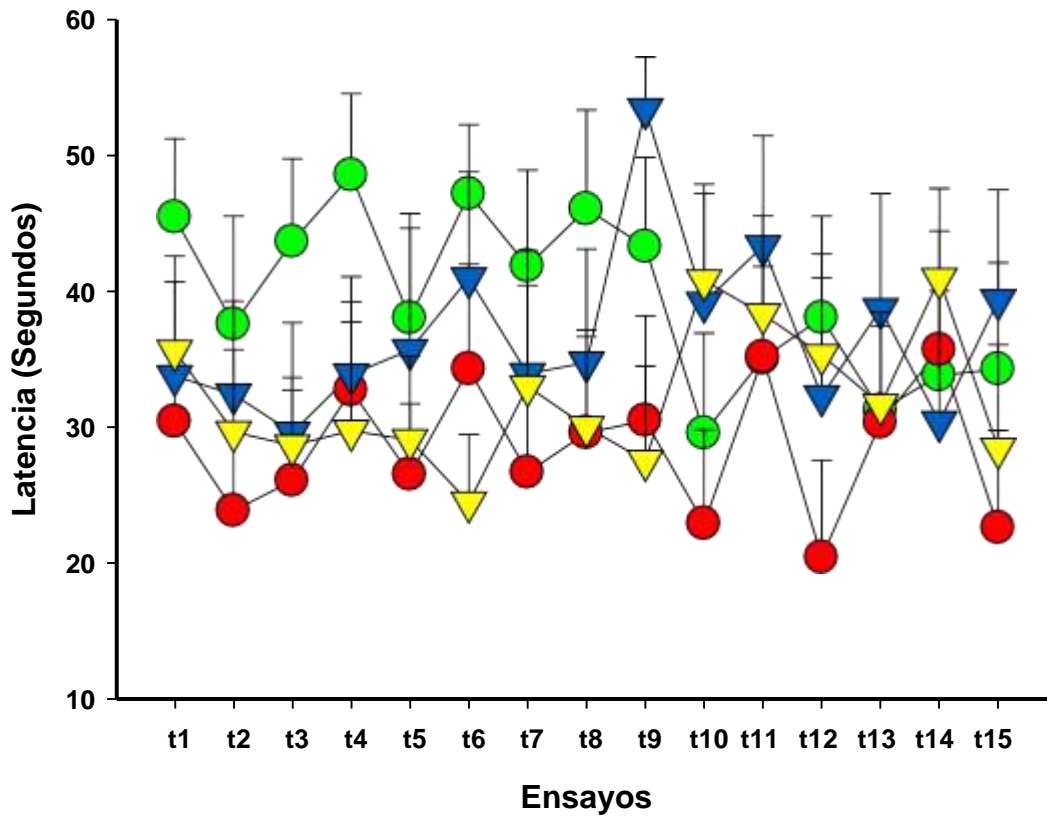


Figura 9: Cuantificación de la Latencia en la fase de aprendizaje del test Oasis Maze en todos los grupos estudiados. Se realizó un análisis de Regresión Lineal Simple para cada uno de los grupos controles y experimentales (N=7-9 individuos por grupo). Análisis de Tasa de Éxito para los grupos Control Vehículo (**verde**) Asfixia Vehículo (**rojo**) Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con DFX (**azul**) Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con TNF α +INF γ (**amarillo**) A nivel estadístico se determinó la normalidad de los datos a través de la prueba Shapiro Wilk, seguido de una prueba ANOVA de doble vía (p ensayos= 0,937; p tratamientos <0,001; p Ensayos por Tratamiento=0,973).

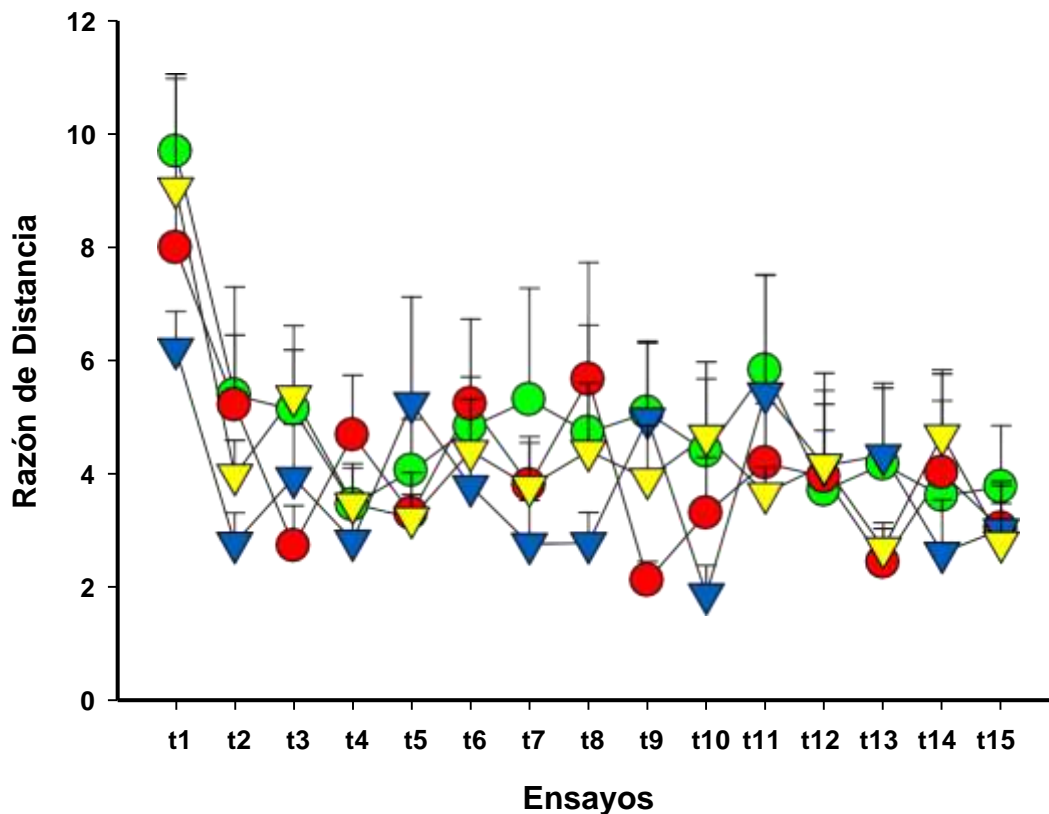


Figura 10: Cuantificación de la Razón de Distancia en la fase de aprendizaje del test Oasis Maze en todos los grupos estudiados. Se realizó un análisis de Regresión Lineal Simple para cada uno de los grupos controles y experimentales (N=7-9 individuos por grupo). Análisis de Tasa de Éxito para los grupos Control Vehículo (**verde**) Asfixia Vehículo (**rojo**) Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con DFX (**azul**) Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con TNF α +INF γ (**amarillo**) A nivel estadístico se determinó la normalidad de los datos a través de la prueba Shapiro Wilk, seguido de una prueba ANOVA de doble vía (p ensayos<0,001; p tratamientos= 0,103; p Ensayos por Tratamiento=0,978).

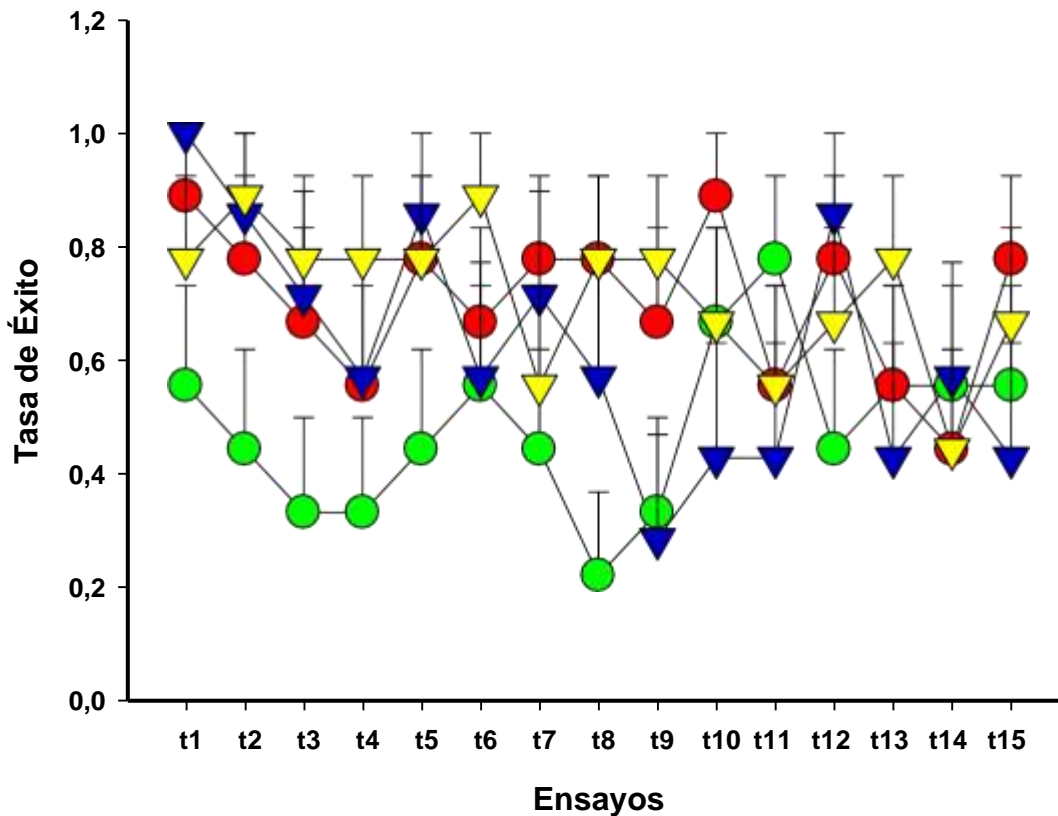


Figura 11: Cuantificación de la Tasa de Éxito en la fase de aprendizaje del test Oasis Maze en todos los grupos estudiados. Se realizó un análisis de Regresión Lineal Simple para cada uno de los grupos controles y experimentales (N=7-9 individuos por grupo). Análisis de Tasa de Éxito para los grupos Control Vehículo (**verde**) Asfixia Vehículo (**rojo**) Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con DFX (**azul**) Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con TNF α +INF γ (**amarillo**) A nivel estadístico se determinó la normalidad de los datos a través de la prueba Shapiro Wilk, seguido de una prueba ANOVA de doble vía (p ensayos=0,426; p tratamientos<0,001; p Ensayos por Tratamiento=0,779).

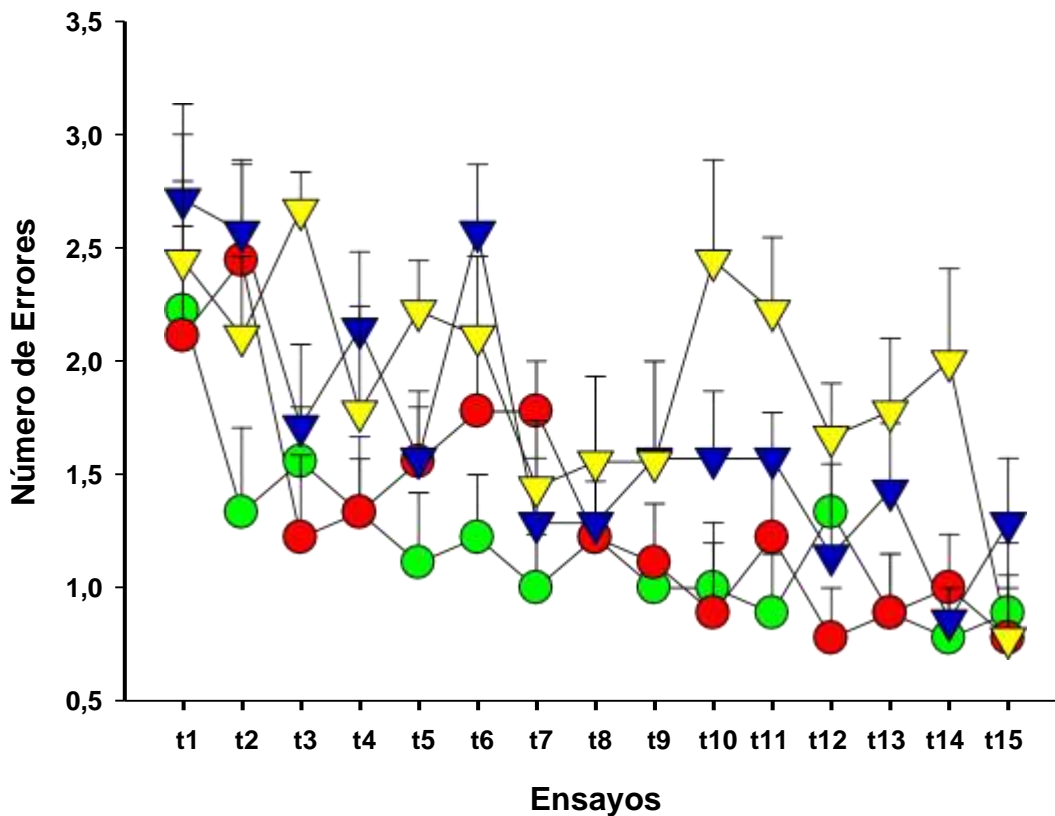


Figura 12: Cuantificación del Número de Errores en la fase de aprendizaje del test Oasis Maze en todos los grupos estudiados. Se realizó un análisis de Regresión Lineal Simple para cada uno de los grupos controles y experimentales ($N=7-9$ individuos por grupo). Análisis de Tasa de Éxito para los grupos Control Vehículo (**verde**) Asfixia Vehículo (**rojo**) Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con DFX (**azul**) Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con $TNF\alpha+INF\gamma$ (**amarillo**) A nivel estadístico se determinó la normalidad de los datos a través de la prueba Shapiro Wilk, seguido de una prueba ANOVA de doble vía (p ensayos $<0,001$; p tratamientos $<0,001$; p Ensayos por Tratamiento $=0,430$).

Anexo 4: Análisis ANOVA de dos vías (FASE DE MEMORIA OASIS MAZE):

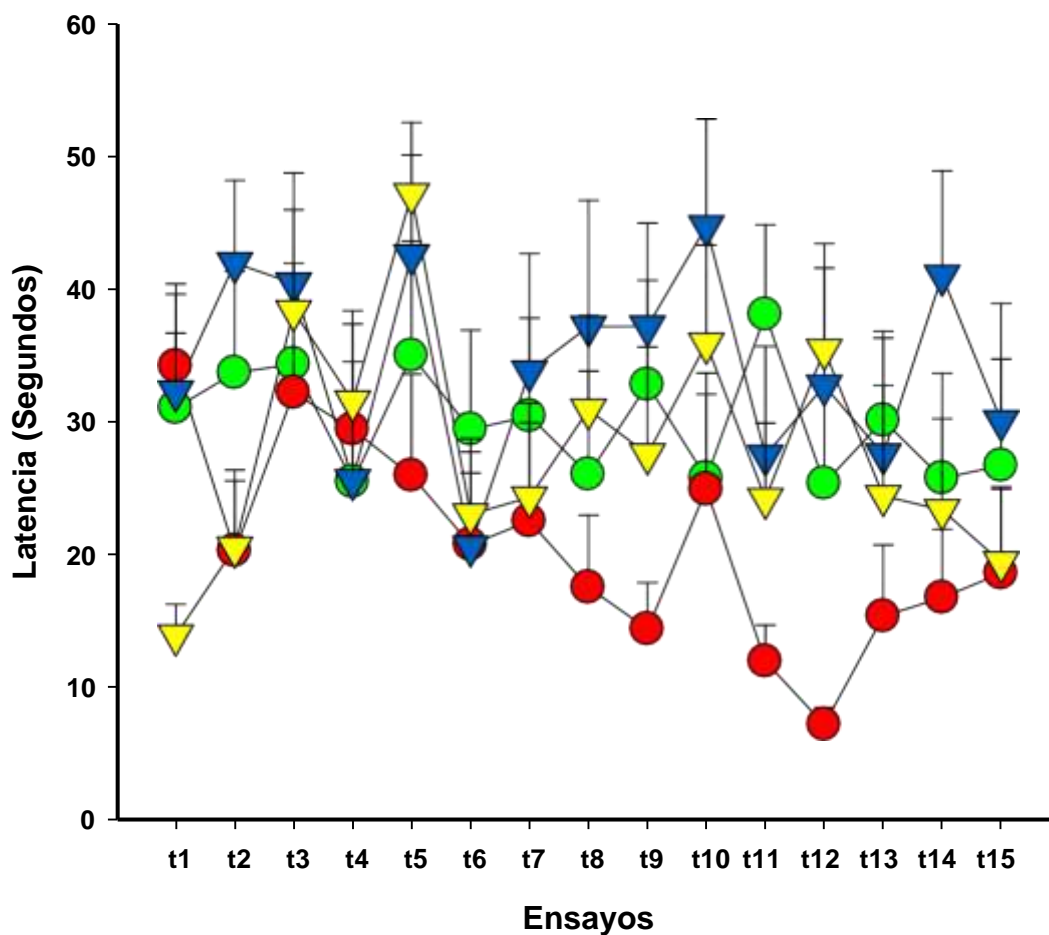


Figura 13: Cuantificación de la Latencia en la fase de memoria del test Oasis Maze en todos los grupos estudiados. Se realizó un análisis de Regresión Lineal Simple para cada uno de los grupos controles y experimentales (N=7-9 individuos por grupo). Análisis de Tasa de Éxito para los grupos Control Vehículo (**verde**) Asfixia Vehículo (**rojo**) Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con DFX (**azul**) Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con TNF α +INF γ (**amarillo**) A nivel estadístico se determinó la normalidad de los datos a través de la prueba Shapiro Wilk, seguido de una prueba ANOVA de doble vía (p ensayos=0,130; p tratamientos<0,001; p Ensayos por Tratamiento=0,743).

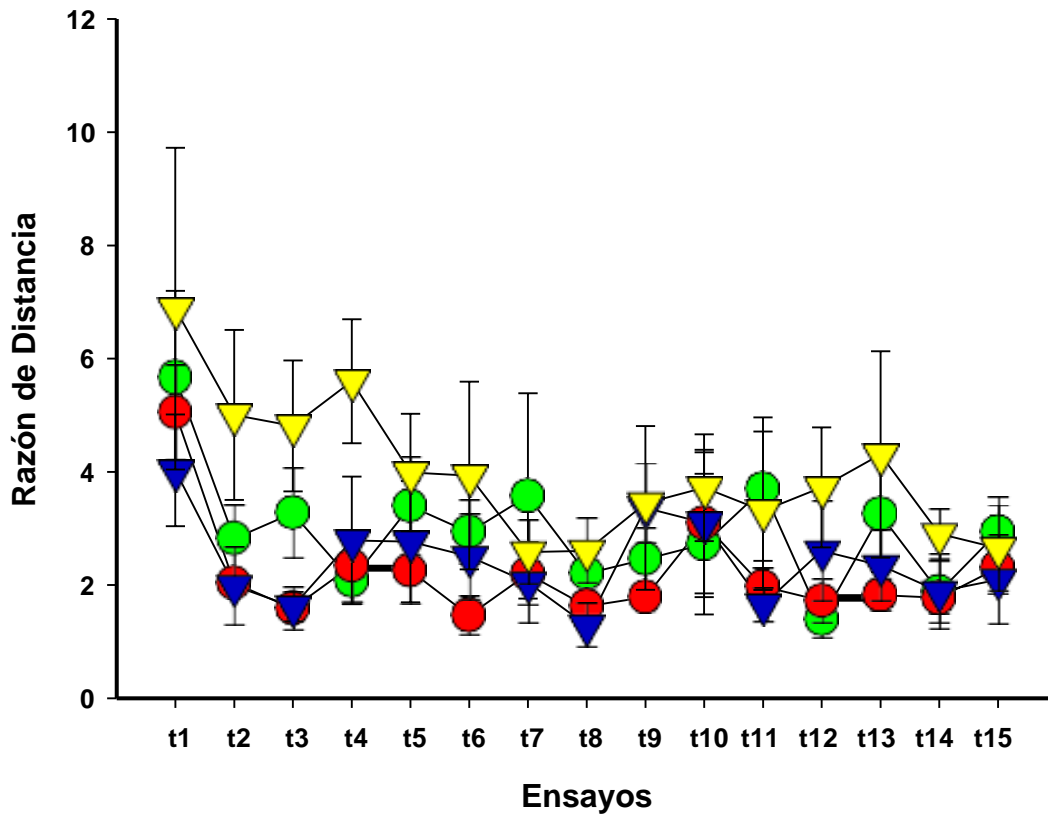


Figura 14: Cuantificación de la Razón de Distancia en la fase de memoria del test Oasis Maze en todos los grupos estudiados. Se realizó un análisis de Regresión Lineal Simple para cada uno de los grupos controles y experimentales ($N=7-9$ individuos por grupo). Análisis de Tasa de Éxito para los grupos Control Vehículo (verde) Asfixia Vehículo (rojo) Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con DFX (azul) Asfixia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con $TNF\alpha+INF\gamma$ (amarillo) A nivel estadístico se determinó la normalidad de los datos a través de la prueba Shapiro Wilk, seguido de una prueba ANOVA de doble vía (p ensayos=0,001; p tratamientos<0,001; p Ensayos por Tratamiento= 0,999).

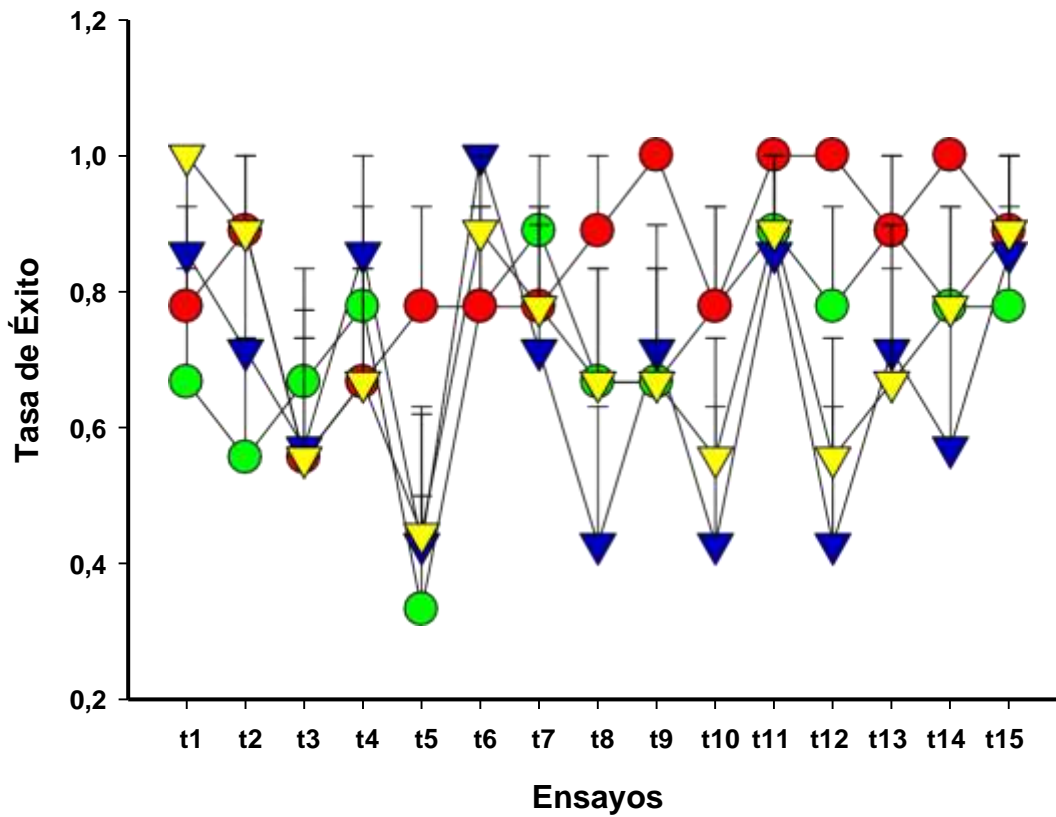


Figura 15: Cuantificación de la Tasa de Éxito en la fase de memoria del test Oasis Maze en todos los grupos estudiados. Se realizó un análisis de Regresión Lineal Simple para cada uno de los grupos controles y experimentales (N=7-9 individuos por grupo). Análisis de Tasa de Éxito para los grupos Control Vehículo (**verde**) Asfíxia Vehículo (**rojo**) Asfíxia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC precondicionadas con DFX (**azul**) Asfíxia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC precondicionadas con TNF α +INF γ (**amarillo**) A nivel estadístico se determinó la normalidad de los datos a través de la prueba Shapiro Wilk, seguido de una prueba ANOVA de doble vía (p ensayos=0,006; p tratamientos=0,016; p Ensayos por Tratamiento=0,835).

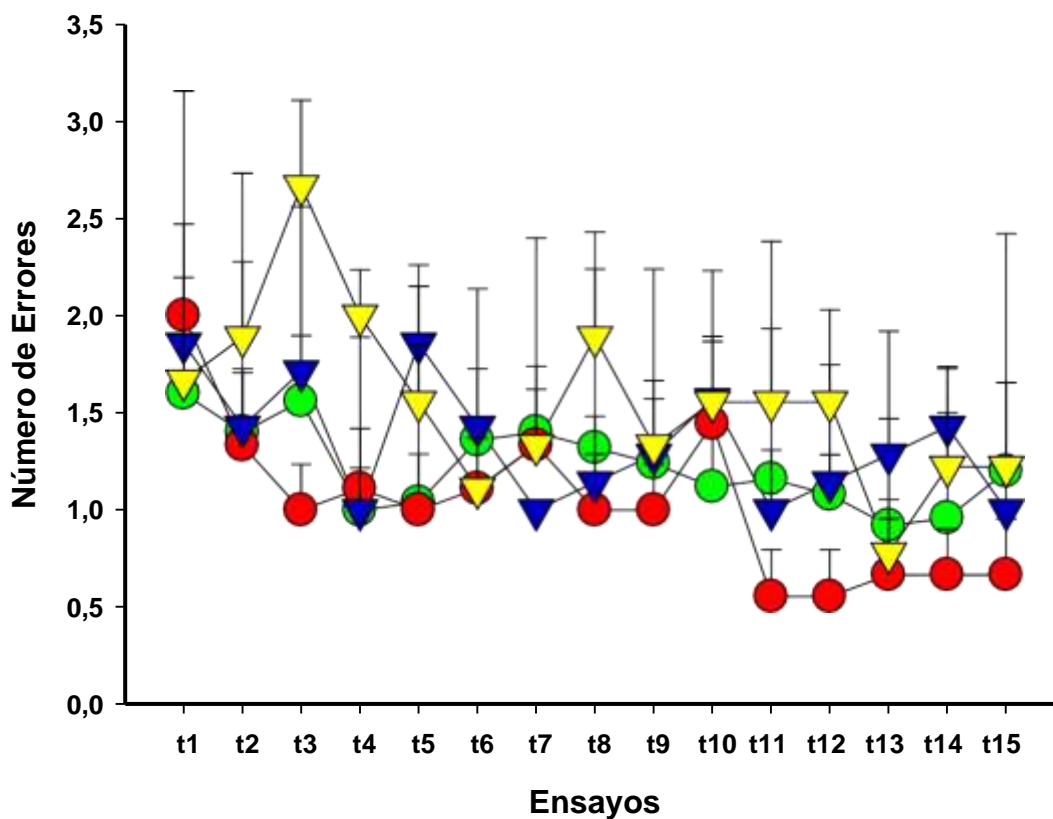


Figura 16: Cuantificación del Número de Errores en la fase de memoria del test Oasis Maze en todos los grupos estudiados. Se realizó un análisis de Regresión Lineal Simple para cada uno de los grupos controles y experimentales (N=7-9 individuos por grupo). Análisis de Tasa de Éxito para los grupos Control Vehículo (**verde**) Asfíxia Vehículo (**rojo**) Asfíxia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con DFX (**azul**) Asfíxia tratado con la administración intranasal de secretomas derivados de MSC preconditionadas con TNF α +INF γ (**amarillo**) A nivel estadístico se determinó la normalidad de los datos a través de la prueba Shapiro Wilk, seguido de una prueba ANOVA de doble vía (p ensayos=0,002; p tratamientos<0,001; p Ensayos por Tratamiento=0,609).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Blanco et al. (2015). *Perinatal asphyxia results in altered expression of the hippocampal acylethanolamide/endocannabinoid signaling system associated to memory impairments in postweaned rats*. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9, 1-16
2. Bustamante D, Morales P, Torres J, Goiny M, Herrera-Marschitz M. 2007. *Nicotinamide prevents the effect of perinatal asphyxia on dopamine release evaluated with in vivo microdialysis 3 months after birth*. *Experimental brain research* 177:358-369.
3. Campbell et. al. (2018). *Hypothermia for perinatal asphyxia: trial-based quality of life at 6–7 years*. *Archives of Disease in Childhood*, 103(7), 654–659.
4. Castillo-Meléndez et al. (2013). *Experimental modelling of the consequences of brief late gestation asphyxia on newborn lamb behaviour and brain structure*. *Plos One*, 6, 1-13.
5. Crain BJ, Westerkam WD, Harrison AH, Nadler JV. *Selective neuronal death after transient forebrain ischemia in the Mongolian gerbil: a silver impregnation study*. *Neuroscience* 1988;27:387-402.

6. Dhuria SV, Hanson LR, Frey WH 2nd. 2010. *Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations*. Journal of Pharmaceutical Sciences. 99(4):165473

7. Ezquer et al. (2017). *Anti-inflammatory Mesenchymal Stem cell-Derived Spheroids Inhibit Chronic and relase-like ethanol intake and reduce oxidative stress..* Alcohol and Alcoholism, 52, i31–i49.

8. Farfán et al. (2020). *Intranasal Administration of Mesenchymal Stem Cell Secretome Reduces Hippocampal Oxidative Stress, Neuroinflammation and Cell Death, Improving the Behavioral Outcome Following Perinatal Asphyxia*. International Journal of Molecular Sciences, 21, 7800; doi:10.3390/ijms21207800

9. Ferreira et al., (2019). *Vía intranasal: una alternativa para la administración de fármacos de acción central en equinos*. Anacleto Vet, Enero-Junio;39(1):1020

10. Flores-Compadre et al. (2013). *Hipoxia perinatal y su impacto en el neurodesarrollo*. Revista Chilena de Neuropsicología, 1, 26-31.

11. Flores-Balter et al. (2016). *Effect of perinatal asphyxia on tuberomammillary nucleus neuronal density and object recognition memory: A possible role for histamine?*. Elsevier, 313, 226-232.
12. Galeano et al. (2013). *Moderate and severe perinatal asphyxia induces differential effects on cocaine sensitization in adult rats*. Synapse, 67, 553-667.
13. González et al. (2005). *Tratamiento de la asfixia perinatal con hipotermia corporal total (Caso clínico)*. Revista Chilena de Pediatría, 76, 275-280
14. Ghosh, S. y Chattarji, S. (2015). *Neuronal encoding of the switch from specific to generalized fear*. Nature Neuroscience volume 18, pages112–120(2015)
15. Griffin E, Bechara R, Birch A, Kelly A. 2009. *Exercise enhances hippocampal-dependent learning in the rat: evidence for a BDNF-related mechanism*. Hippocampus 19:973-980
16. Grinspun, N.; Fuentealba, Y.; Falcon, R.; Valdés, J.L. *c-Fos expression in the ascending arousal system induced by physical exercise in rats: Implication for memory performance*. Brain Res. 2019, 1723, 146376

17. Guzowski et al. (2000) *Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory*. En Journal of Neuroscience 20 (11); 3993-4001

18. Hanson, L. y Frey, W (2008) *Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease*. BMC Neuroscience , 9(Suppl 3):S5

19. Hershkowitz M. et al (1983): *The effects of postnatal anoxia on behavior and on the muscarinic and beta-adrenergic receptors in the hippocampus of the developing rat*. Brain Res 283:147-155.

20. Hott, M (2012) *Expresión de la proteína asociada con plasticidad neuronal ARC en células de neuroblastoma y neuronas corticales infectadas con HSV-1*. Tesis de Grado, Universidad Austral de Chile (Valdivia, Chile).

21. Iranzo Martínez, M (2018). *Estudio comparativo de la proteómica del secretoma cutáneo en función de la metodología de obtención, la transformación tumoral y la metástasis*. Tesis Doctoral, Universitat de Lleida, Lérida, España.

22. Jeong Lee et al. (2010). *Proteomic Analysis of Tumor Necrosis Factor- α -Induced Secretome of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells*. *Journal of Proteome*, 9 (4), 1754–1762
23. Jensen FE, Wang C, Stafstrom CE, Liu Z, Geary C, Stevens MC. *Acute and chronic increases in excitability in rat hippocampal slices after perinatal hypoxia in vivo*. *J Neurophysiol* 1998;79:73-81.
24. Khan et al (2017). *Intranasal Delivery of A Novel Amnion Cell Secretome Prevents Neuronal Damage and Preserves Function In A Mouse Multiple Sclerosis Model*. *Scientific Reports*, 7: 41768
25. Klawitter et al (2005) *Effect of perinatal asphyxia on cell survival, neuronal phenotype and neurite growth evaluated with organotypic triple cultures*. *Amino Acids* 28: 149–155
26. Link et al (1995), *Somatodendritic expresión of an immediate early gene is regulated by synaptic activity*, *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 92, 5374-8

27. Lugo, R. (2015), *Relación de la escala de Apgar con hypoxia del lóbulo temporal*, Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España
28. Martínez-Biarge, et al (2010). *Outcomes after central grey matter injury in term perinatal hypoxic ischemic encephalopathy. Early Human Development*, 86, 675-682.
29. Mañeru, C., & Junqué, C. (2002). *Deficit cognitivos en la asfixia perinatal. Revista de Neurología*, 34(12), 1171-1177
30. Marlow, N. et al. (2005). *Neuropsychological and educational problems at school age associated with neonatal encephalopathy. Archives Dis Child Fetal Neonatal*, 90, F380–F387.
31. Marriott et al (2017) *Models of progressive neurological dysfunction originating early in life. En Progress in Neurobiology* 155, 2-20.
32. Mata, A. et al (2018). *New functions of Semaphorin 3E and its receptor PlexinD1 during developing and adult hippocampal formation. Scientific Reports* 8, 1381

33. Morales et al (2003) *Perinatal asphyxia impairs connectivity and dopamine neurite branching in organotypic triple culture from rat substantia nigra*. *Neurosci Lett* 348: 175–179
34. Morales et al. (2011). *Pathophysiology of perinatal asphyxia: can we predict and improve individual outcomes?*. *EMPA Journal*, 2, 211-230.
35. Morales P, Simola N, Bustamante D, Lisboa F, y cols. 2010. *Nicotinamide prevents the long-term effects of perinatal asphyxia on apoptosis, non-spatial memory and anxiety in rats*. *Experimental brain research*. 202:1 1-14
36. Morales et al. 2008. «*Plasticity of hippocampus following perinatal asphyxia: Effects on postnatal apoptosis and neurogenesis*». *Journal of Neuroscience Research* 86(12):2650-62.
37. Morris, R.G.M. (1984). Development of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 11, 47-60.

38. Nakayama et al (2015) *Long delayed expresión of the immediate early gene Arc/Arg 3.1 refines the neuronal circuits to perpetuate fear memory*. En Journal of Neuroscience 35, 819-830
39. Novoa et al. (2012). *Consenso sobre manejo integral del neonato con encefalopatía hipóxica isquémica*. Revista Chilena de Pediatría, 83, 492-501.
40. Nombela- Arrieta, C. et al. (2011). *The elusive nature and function of mesenchymal stem cells.. Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 12, 126-31.
41. Núñez et al. (2018). *Estrés oxidativo en la asfixia perinatal y la encefalopatía hipóxica-isquémica*. Anales de Pediatría, 88, 228.e1-228.e9.
42. Oses et al. (2017). *Preconditioning of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with deferoxamine increases the production of pro-angiogenic, neuroprotective and anti-inflammatory factors: Potential application in the treatment of diabetic neuropathy*. Plos One, 12 (5), 1-22
43. Pérez de La Mora, M (2003). *Dónde y cómo se produce la ansiedad: sus bases biológicas*. Ciencia (2003), 16-28.

44. Pet G y Juul S. (2014). *The potential of erythropoietin to treat asphyxia in newborns. Research and reports in Neonatology Journal*, 4, 195-207.
45. Petito CK, Morgello S, Felix JC, Lesser ML. *The two patterns of reactive astrocytosis in postischemic rat brain. J Cereb Blood Flow Meta* 1990;10:850-859.
46. Plath et al (2006) *Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. En Neuron*, 52(3); 437-44
47. Quintanilla, M.E.; Ezquer, F.; Morales, P.; Santapau, D.; Berríos-Cárcamo, P.; Ezquer, M.; Herrera-Marschitz, M.; Israel, Y. *Intranasal mesenchymal stem cell secretome administration markedly inhibits alcohol and nicotine self-administration and blocks relapse-intake: Mechanism and translational options. Stem Cell Res. Ther.* 2019, 10, 205
48. Ramírez, Y., & Novoa, M. (2008). *Estudio neuropsicológico en niños de 6 años con antecedentes de hipoxia perinatal. Archivos de Neurociencia*, 13(3), 162-169
49. Ramirez-Amaya et al (2013) *Spatial Exploration-Induced Arc mRNA and Protein Expression: Evidence for Selective, Network-Specific Reactivation. En Journal of Neuroscience* 25(7) 1761-1768

50. Rennie, J., Hagmann, C., & Robertson, N. (2007). *Outcome after intrapartum hypoxic ischaemia at term. Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 12, 398-407.
51. Sanchez, J (2018) *Efecto del antagonista de los receptores H3 de histamina sobre memoria espacial, neurogénesis y plasticidad hipocampal en ratas con asfixia perinatal* (Tesis de Magíster), Universidad de Chile, Santiago, Chile.
52. Santamaria, G.; Brandi, E.; La Vitola, P.; Grandi, F.; Ferrara, G.; Pischituta, F.; Vegliante, G.; Zanier, E.R.; Re, F.; Uccelli, A.; et al. *Intranasal delivery of mesenchymal stem cell secretome repairs the brain of Alzheimer's mice*. Cell Death Dis. 2020.
53. Simola, N. et al. (2008). *Acute perinatal asphyxia impairs non-spatial memory and alters motor coordination in adult male rats*. Exp Brain Res, 185, 595–601.
54. Silva, J. (2017). *Efecto del ejercicio físico voluntario sobre las capacidades de memoria en un modelo animal de asfixia perinatal*. Tesis de Magíster; Universidad de Chile, Santiago de Chile

55. Tang et al. (2015). *Pertussis toxin reduces calcium influx to protect ischemic stroke in a middle cerebral artery occlusion model. Journal of Neurochemistry*, 135, 998-1006.
56. Tayebati SK, Nwankwo IE, Amenta F. 2013. *Intranasal drug delivery to the central nervous system: present status and future outlook. Current Pharmaceutical Design*. 19(3):51026.
57. Teixeira, F.G.; Carvalho, M.M.; Panchalingam, K.M.; Rodrigues, A.J.; Mendes-Pinheiro, B.; Anjo, S.; Manadas, B.; Behie, L.A.; Sousa, N.; Salgado, A.J. *Impact of the Secretome of Human Mesenchymal Stem Cells on Brain Structure and Animal Behavior in a Rat Model of Parkinson's Disease. Stem Cells Transl. Med.* 2017, 6, 634–646.
58. Thorne et al. (2004) *Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. Neuroscience* 127(2):481-96.
59. Van Handel et al. (2007). *Long-term cognitive and behavioral consequences of hypoxia of neonatal encephalopathy following perinatal asphyxia: a review. Eur J Pediatr.* 2007 Jul;166(7):645-54.

60. Van Velthoven et al. (2012). *Mesenchymal stem cells as a treatment for neonatal ischemic brain damage*. *Pedriatic Research*, 71, :474-81.
61. Vizoso et al. (2017). *Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine..* *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1852.
62. Volpe, J. (2008). *Hypoxia-ischemic encephalopathy: Clinical aspects*. En J. Volpe (Ed.), *Neurology of the newborn* (pp. 331-394). Philadelphia: W.B. Saunders Company.
63. Wilson- Pauwels, L. (2013). *Nervios Craneales. En la salud y la enfermedad*. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.