



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE SECRETOMA OBTENIDO DE CÉLULAS MADRE  
MESÉNQUIMÁTICAS PRECONDICIONADAS *IN VITRO* CON DEFEROXAMINA, DISMINUYE LA  
ATROFIA AXONAL, LA APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS DE SCHWANN Y LA PÉRDIDA DE  
MIELINA EN NERVIOS CIÁTICOS JUNTO CON ESTIMULAR LA REGENERACIÓN AXONAL EN  
EL MODELO ANIMAL DE NEUROPATÍA DIABÉTICA BKS DB/DB.

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIOQUÍMICA

MARÍA CONSTANZA CÁRCAMO AGUILERA

DIRECTOR DE TESIS: FERNANDO EZQUER ROMERO

CO-TUTOR: CRISTIAN DE GREGORIO CONCHA

UNIVERSIDAD DEL DESARROLLO / FACULTAD DE  
MEDICINA CLÍNICA ALEMANA- UNIVERSIDAD DEL  
DESARROLLO

PROFESOR PATROCINANTE:

VALENTINA PARRA ORTIZ

COMISIÓN EVALUADORA:

JENNY FIEDLER TEMER

MARIO CHIONG LAY

SANTIAGO DE CHILE

2020

## **FINANCIAMIENTO**

Esta memoria de título fue financiada en el marco del Proyecto FONDECYT REGULAR N° 1170712 (Fernando Ezquer, investigador principal).

Treating the whole not the hole: Administration of acellular derivative from mesenchymal stem cells subjected to a preconditioning stimulus reverts diabetic neuropathy and prevents diabetic foot ulcers (2017-2019)

El desarrollo de esta memoria de título se realizó en el Laboratorio de Medicina Regenerativa de la Facultad de Medicina Clínica Alemana-Universidad del Desarrollo.

La presente memoria dio origen a la siguiente presentación de poster en la XXXII Reunión Anual de la Sociedad de Biología Celular de Chile en Puerto Varas 2019:

Administration of secretome derived from mesenchymal stem cells reverts neuronal degeneration in an animal model of diabetic neuropathy

Constanza Cárcamo<sup>1,2</sup>, Cristian De Gregorio<sup>1</sup>, David Contador<sup>1</sup>, Daniela Santapau<sup>1</sup>, Marcelo Ezquer<sup>1</sup>, Fernando Ezquer<sup>1</sup>

1. Centro de Medicina Regenerativa, Facultad de Medicina, Universidad del Desarrollo.
2. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero partir agradeciendo a mis padres por incentivar me a cumplir mis sueños más locos, por el cariño y apoyo que me entregan de todas las formas posibles. Sin ellos nada de esto sería posible.

Quiero agradecer a mis amigos que siempre estaban ahí cuando más los necesitaba, por ayudarme a distraerme en las horribles semanas de pruebas, por subirme el animo y por las conversaciones.

Por supuesto también quiero agradecer a todos los integrantes del Laboratorio de Medicina Regenerativa, principalmente a Fernando Ezquer mi director de tesis y Cristian de Gregorio mi cotutor. Fue el mejor lugar que pude encontrar para hacer mi tesis, siempre me sentí apoyada y valoro enormemente todo el conocimiento que me entregaron. Gracias por los desayunos, almuerzos, por los trozos de torta, por los asados, por las risas, gracias por todo.

Por último, a los ratones perdón y gracias.

## ÍNDICE GENERAL

Financiamiento.....	2
Agradecimientos.....	3
Índice general.....	4
Abreviaturas.....	5-6
Resumen.....	7-8
Abstract.....	9-10
Introducción:	
Diabetes Mellitus.....	11
Neuropatía Diabética (ND).....	11-12
Mecanismos moleculares asociados a la atrofia neuronal en ND.....	12-14
Tratamientos actuales para la ND.....	14-15
Células madres mesenquimáticas (MSC) como tratamiento para la ND.....	15
Secretoma derivado de MSC como una alternativa al uso de células vivas.....	15-16
Ventajas del uso de secretoma derivado de MSC.....	16
Precondicionamiento de MSC para potenciar su efecto terapéutico.....	17-19
Hipótesis.....	20
Objetivo general.....	20
Objetivos específicos.....	20
Lista de reactivos y animales.....	21-22
Métodos.....	23-28
Diseño del estudio.....	29
Resultados:	
Medición de glucosa en sangre y peso corporal.....	30
Distribución del tamaño de las fibras nerviosas en nervio ciático.....	31-32
Ultraestructura del nervio ciático y determinación del radio-G.....	32-33
Niveles de expresión de genes relacionados con desmielinización en nervio ciático.....	33
Determinación del porcentaje de células TUNEL+ en el nervio ciático y en los DRGs.....	34-35
Regeneración de neuritas en cultivos primarios de neuronas de los DRGs.....	36-37
Efecto del tratamiento <i>in vitro</i> de secretoma derivado de MSC en cultivos neuronales de DRGs derivados de animales diabéticos.....	37-40
Discusión:	
Degeneración axonal a nivel estructural en nervio ciático.....	41-42
Niveles de expresión de genes de mielina en nervio ciático.....	42-43
Disminución de células apoptóticas en los DRGs y en nervio ciático.....	43-44
Regeneración neurítica en animales tratados con secretoma de forma sistémica.....	44-45
Tratamiento <i>in vitro</i> con secretoma en cultivos neuronales de animales diabéticos ..	45-46
Precondicionamiento de MSC.....	46-47
Proyecciones del uso de secretoma de MSC.....	47
Conclusiones.....	48
Referencias.....	49-53

## **ABREVIATURAS**

AGEs: Productos de glicación avanzada

AraC: Citosina  $\beta$ -D arabinofuranosido clorhidrato

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

BSA: Albumina de suero bovino

CNTF: Factor neurotrófico ciliar

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DFX: Deferoxamina

DM: Diabetes mellitus

DMEM F12: Medio esencial mínimo modificado suplementado con mezcla de nutrientes F12

DMT1: Diabetes mellitus tipo 1

DMT2: Diabetes mellitus tipo 2

DRGs: Ganglios de la raíz dorsal

FADPH: Flavin adenina dinucleótido fosfato

GDNF: Factor neurotrófico derivado de la glía

HBSS: Solución de sal equilibrada de Hank

HIF1 $\alpha$ : Factor inducible por hipoxia 1 $\alpha$

MBP: Proteína básica de la mielina

MPZ: Proteína cero de la mielina

MSC: Células madre mesenquimáticas

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

ND: Neuropatía diabética

NGF: Factor de crecimiento neuronal

NT3: Neurotrofina 3

PBS: Solución salina tamponada con fosfato

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PFA: Paraformaldehido

PMP22: Proteína periférica 22 de la mielina

RAGE: Receptor para AGEs

ROS: Especies reactivas del oxígeno

SOD3: Superóxido dismutasa extracelular 3

## RESUMEN

En la neuropatía diabética (ND) es una de las principales complicaciones de la diabetes mellitus (DM) afectando aproximadamente al 60% de los pacientes diabéticos. Se ha propuesto el aumento en el nivel de especies reactivas del oxígeno (ROS), debido al metabolismo exacerbado de glucosa, como el principal detonante en esta patología, induciendo daño estructural en los nervios periféricos en varios niveles. Las neuronas y las células de Schwann son especialmente sensibles a este ambiente oxidativo, lo que induce la apoptosis de estas células y finalmente la degeneración axonal en nervios sensitivos y la muerte neuronal en los ganglios de la raíz dorsal (DRGs) conduciendo a pérdida de sensibilidad. Recientemente, se ha propuesto el uso de células madre para el tratamiento de enfermedades complejas como la ND. Entre éstas, las células madres mesenquimáticas (MSC) son capaces de secretar un amplio espectro de moléculas terapéuticas, lo que se conoce como secretoma. En humanos, el secretoma de MSC consta de cientos de factores que incluyen citoquinas antiinflamatorias, factores tróficos y moléculas antioxidantes. Además, se ha descrito que el preconditionamiento de las MSC con el agente mimético de hipoxia deferoxamina (DFX) induce un aumento significativo en la secreción de factores angiogénicos, neuroprotectores, antiinflamatorios y antioxidantes, por lo que podría erigirse como un biofármaco con gran potencial para el tratamiento de la ND.

En base a estos antecedentes, en esta tesis postulamos que la administración sistémica de secretoma obtenido de células madre mesenquimáticas preconditionadas *in vitro* con deferoxamina, mejora la regeneración axonal, reduce la apoptosis de neuronas y de células de Schwann y disminuye la pérdida de mielina en nervio ciático en el modelo animal de neuropatía diabética BKS db/db.

Para ello, se extrajeron los nervios ciáticos y DRGs de animales diabéticos tratados con vehículo, animales diabéticos tratados con secretoma de MSC preconditionadas y no preconditionadas y de animales sanos a las 26 semanas de edad. En el nervio ciático se realizaron cortes semifinos teñidos con azul de toluidina para cuantificar el diámetro axonal, por medio de microscopía electrónica se determinó el radio G, y mediante RT-qPCR se analizó la expresión de genes relacionados con la desmielinización. Además, se midió el número de células TUNEL+ en el nervio ciático y en DRGs. Por último, se realizaron cultivos de neuronas de DRGs para analizar el crecimiento de neuritas, en lo que constituye un modelo simplificado de regeneración *in vitro*.

Se observó que el tratamiento de animales diabéticos con secretoma de MSC evitó tanto la pérdida de fibras de mayor diámetro en el nervio ciático, como también la disminución en el grosor de la capa de mielina en las fibras pequeñas y redujo la apoptosis de células de Schwann en comparación con animales diabéticos tratados con vehículo. Adicionalmente, el tratamiento con secretoma derivado de MSC mejoró la regeneración neurítica y disminuyó la apoptosis neuronal en los DRGs en comparación con animales diabéticos sin tratamiento.

De acuerdo con lo anterior, postulamos que el secretoma de MSC podría ser usado como un nuevo biofármaco para tratar las principales alteraciones estructurales asociadas a la ND.

## ABSTRACT

Diabetic Neuropathy (DN) is one of the most common complications of diabetes mellitus (DM), affecting 60% of diabetic patients. It has been postulated that the increased level of reactive oxygen species (ROS), due to the exacerbated glucose metabolism, is the main trigger in this pathology, inducing structural damage of peripheral nerves at various levels. Neurons and Schwann cells are especially sensitive to this oxidative environment, inducing the apoptosis of these cells and leading to axonal degeneration in sensory nerves and neuronal death in the dorsal root ganglia (DRGs), which finally results in sensory loss. The use of stem cells for the treatment of complex diseases such as DN has been recently proposed. Among these cells, mesenchymal stem cells (MSCs) are cells that secrete a broad spectrum of therapeutic molecules, known as secretome. In humans, MSC secretome consists of hundreds of factors that include anti-inflammatory cytokines, trophic factors, and antioxidant molecules. Furthermore, the preconditioning of MSC with the hypoxic mimetic agent deferoxamine (DFX) allows a significant increase in the secretion of angiogenic, neuroprotective, anti-inflammatory and antioxidant factors, which could be proposed as a next-generation biodrug with great therapeutic potential for the treatment of DN.

Therefore, in this thesis we postulate that systemic administration of secretome derived from *in vitro* preconditioned mesenchymal stem cells with deferoxamine, improves axonal regeneration, reduces apoptosis of neurons and Schwann cells and diminishes myelin loss in the sciatic nerve in the animal model of diabetic neuropathy BKS db/db.

To carry out the histological and molecular analysis, sciatic nerves and DRGs were extracted from diabetic animals treated with the vehicle, diabetic mice treated with secretome derived from preconditioned and non-preconditioned MSC and healthy animals at 26 weeks of age. The sciatic nerves were used to obtain semi-thin sections stained with toluidine blue to quantify axonal diameter. For ultrastructural analysis of axonal fibers, the g-ratio was determined by electron microscopy and the expression of genes related to demyelination was evaluated by RT-qPCR. In addition, the number of TUNEL<sup>+</sup> cells in the sciatic nerve and in DRGs was measured. Finally, DRGs were extracted from mice of the different experimental groups, and DRGs cultures were carried out to analyze neurite outgrowth, as a simplified *in vitro* regeneration assay.

We showed that MSC secretome administration prevented the loss of larger diameter fibers in the sciatic nerve, as well as the decrease of myelin layer thickness in small fibers, and induced a

significant reduction in Schwann cell apoptosis compared to diabetic animals treated with the vehicle. Furthermore, MSC secretome treatment improved neuritic regeneration and decreased neuronal apoptosis in DRG compared to diabetic animals treated with the vehicle.

Thus, we postulate that the MSC secretome could be used as a new biodrug for the treatment of the main structural alterations of ND.

## **INTRODUCCIÓN**

### **Diabetes Mellitus**

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica que se caracteriza por un estado de hiperglicemia persistente. En el páncreas, las células beta pancreáticas producen la hormona insulina, la cual facilita la absorción de glucosa hacia los tejidos para proveer energía, además de otras funciones. La DM ocurre debido a una falla en la secreción de insulina, resistencia a las acciones periféricas de esta hormona o ambas situaciones. Esta patología es principalmente clasificada de acuerdo con sus manifestaciones clínicas en dos tipos: DM tipo 1 (DMT1) y DM tipo 2 (DMT2) (Goyal, 2018). La DMT1 representa cerca del 5-10% de los casos de diabetes y está típicamente asociada con una falla en la producción de insulina, producto de la destrucción de las células beta pancreáticas debido a un proceso autoinmune. Por otro lado, la DMT2 representa el 90-95% de los casos restantes, y es caracterizada por la resistencia a la insulina y, en estados más avanzados, la reducción en la producción de esta hormona (Gharravi, 2018).

La Federación Internacional de Diabetes estima que 425 millones de personas en el mundo padecen esta patología, convirtiéndola en la epidemia mundial más grande del siglo (Tabish, 2007). Según la Encuesta Nacional de Salud (2016-2017), un 12,3% de la población chilena padece diabetes. Esta cifra nos ubica entre los países con más alta incidencia de diabetes a nivel mundial. Esta alta incidencia se debe a un aumento en la obesidad junto con un estilo de vida sedentario. Ambas condiciones son factores de muy alto riesgo para el desarrollo de DMT2 (Tan, 2019).

En sinergia con otras alteraciones metabólicas, los pacientes con DM pueden desarrollar a largo plazo complicaciones microvasculares y macrovasculares, causando daño en diversos órganos. Entre las complicaciones más comunes se encuentran la neuropatía, la retinopatía, la nefropatía, enfermedades cardiovasculares y úlceras de pie diabético (Harcourt, 2013).

### **Neuropatía Diabética**

La neuropatía diabética (ND) es una de las complicaciones microvasculares más temprana y más frecuente asociadas a la DM, afectando a más del 60% de los pacientes con DM (Boulton, 2005). La ND puede afectar fibras sensoriales, motoras o autonómicas en cualquier parte del cuerpo. Sin embargo, la forma más común es la polineuropatía simétrica distal, la cual afecta principalmente a las extremidades inferiores (Yasuda, 2003). Los pacientes afectados por la ND perciben una

reducción significativa en la calidad de vida debido a la pérdida de sensibilidad en diferentes áreas del cuerpo, dolor crónico y atrofia muscular (Argoff, 2006). A su vez, el principal problema relacionado con la ND es que, debido a la baja respuesta al dolor junto con una reducción del flujo sanguíneo en el área afectada, la ND está asociada a un alto riesgo de desarrollar úlceras de pie diabético, las cuales finalmente pueden terminar en la amputación de la extremidad afectada (Snyder, 2009).

La ND es una enfermedad multifactorial, y los mecanismos específicos que contribuyen tanto al desarrollo como a la progresión de esta enfermedad no están completamente dilucidados. Entre los mecanismos propuestos, se relaciona directamente a la hiperglicemia con el desarrollo de la patología. En este sentido, se ha postulado que un flujo exacerbado de glucosa desencadena una sobre-activación de diferentes vías para su metabolismo (Figuroa-Romero, 2008). El factor común de estas vías es la producción de altos niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) en la mitocondria, lo que sitúa al estrés oxidativo como un actor principal en el desarrollo y progresión de la ND (Figuroa-Romero, 2008; Vincent, 2004).

Se ha postulado que el aumento de ROS puede inducir ND actuando principalmente a tres niveles: (a) reduciendo la microvasculatura de las fibras nerviosa (Coppey, 2001), (b) induciendo inflamación crónica (Vincent, 2011) y (c) produciendo apoptosis de neuronas y células de Schwann (Kalichman, 1998). Se ha descrito que las neuronas y células de Schwann son especialmente sensible al aumento del ambiente oxidativo, debido a su alta densidad de mitocondrias, lo que conduce a la apoptosis de estas células (Kalichman, 1998). Este escenario llevaría a una pérdida sostenida de las fibras nerviosas, un aumento del ambiente inflamatorio, una disminución de los factores neuroprotectores y finalmente la degeneración axonal.

### **Mecanismos moleculares asociados a la atrofia neuronal en ND**

En condiciones fisiológicas normales, la glucosa produce NADH y FADH<sub>2</sub> a través de la glucólisis y el ciclo del ácido tricarbóxico en células de Schwann de nervios periféricos y en neuronas sensitivas de los DRG. Sin embargo, durante un estado de hiperglicemia, existe una sobrecarga de sustrato, por lo que el sistema de transporte se satura y las moléculas de acetilCoA se convierten en acilcarnitinas. Se ha descrito que la acumulación de acilcarnitinas es tóxica tanto para las células de Schwann como para las neuronas de los DRG, ya que las acilcarnitinas acumuladas pueden ser liberadas de las células de Schwann e inducir la degeneración axonal (Viader, 2013).

Por otra parte, el NADH y FADH<sub>2</sub> producido se transporta a las mitocondrias para producir ATP a través del proceso de fosforilación oxidativa. Un subproducto de la fosforilación oxidativa es la producción de bajos niveles de ROS que se neutralizan fácilmente con los antioxidantes celulares, como la superóxido dismutasa, el glutatión y la catalasa (Vincent, 2011). Sin embargo, durante el exceso de carga de sustrato, la fosforilación oxidativa falla, lo que conduce a la pérdida de producción de ATP y al aumento de los niveles de ROS. Posteriormente, esto conduce a una falla mitocondrial, daño metabólico y oxidativo de las células de Schwann y las neuronas del DRG (Ferryhough, 2015). Las mitocondrias disfuncionales producen energía insuficiente, y las neuronas pierden la capacidad de transportar cargos en los axones de forma normal, promoviendo aún más la atrofia axonal (Rumora, 2018).

El aumento de los niveles de glucosa conduce también al metabolismo de ésta a través de las vías de poliol y hexosamina, lo que resulta en un aumento de ROS e inflamación, en gran parte debido a un daño mitocondrial (Feldman, 2017), lo que contribuye también a la disfunción continua del sistema nervioso del paciente diabético. A su vez, el aumento de los niveles de glucosa produce la glicación de numerosas proteínas estructurales y funcionales, producto del aumento de los productos finales de glicación avanzados (AGE). Los AGE provocan una alteración o pérdida de la función proteica e interactúan con el receptor específico de AGEs (RAGE), el cual modifica la expresión génica y la señalización intracelular, aumentando la liberación de moléculas proinflamatorias y radicales libres (Singh, 2014).

Las células de Schwann son la glía más numerosa de los nervios periféricos (Jessen y Mirsky 2005), manteniendo la estructura y función de estos nervios. Estas células recubren los axones no mielinizados (fibras de remak), mielinizan a los axones mielinizados, secretan factores neuroprotectores y otorgan soporte trófico. En numerosos trabajos se han descrito alteraciones en estas células con un papel crucial en los mecanismos patogénicos de la ND, ya que se ha reportado una elevada apoptosis de las células de Schwann en los nervios sensitivos y desmielinización de los axones en etapas tardías de la enfermedad (Bunge, 1993; Sharghi-Namini, 2006; Mizisin 1998). Como resumen, el aumento en los niveles de ROS intracelular producto de la hiperglicemia, produce un aumento en la muerte de neuronas en los DRGs y de células de Schwann en nervios periféricos, junto con un aumento del ambiente inflamatorio. Producto de la muerte de células de Schwann se produce una atrofia axonal y la disminución de factores tróficos que ayudan a la sobrevivencia de la neurona, creando un círculo vicioso que acelera aún más la atrofia neural.

Actualmente no existe un tratamiento que logre detener el avance de la ND en forma satisfactoria, por lo que el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas que logren frenar los factores que contribuyen al desarrollo de la ND (figura 1) es de suma importancia. De esta manera, se podría evitar que los pacientes desarrollen complicaciones como úlceras de pie diabéticos, lo que en un alto porcentaje de los casos termina en amputación de la extremidad afectada.

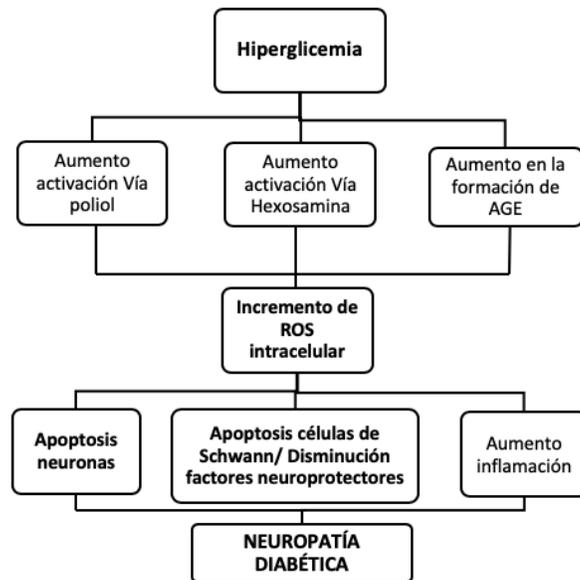


Figura 1. Mecanismos propuestos en la literatura para explicar el desarrollo y progresión de la neuropatía diabética.

### **Tratamientos actuales para la ND**

Debido a la gran variedad de factores involucrados en el desarrollo de esta patología y a toda la sintomatología presente en la ND, aún no existe un tratamiento específico efectivo para esta enfermedad. Actualmente, el tratamiento para pacientes con ND se limita a la administración de analgésicos y antidepresivos para el alivio del dolor sintomático (Argoff, 2006), junto con el control de los niveles de glucosa y de insulina. Pero ninguna de estas terapias se enfoca en atacar los mecanismos que conducen al desarrollo y la progresión de la ND.

Entre los nuevos blancos farmacológicos propuestos, se han probado compuestos dirigidos a los mecanismos causales del desarrollo de la ND. Los más utilizados hasta el momento son los inhibidores de la aldosa reductasa. Estos inhibidores han mostrado disminuir la apoptosis de células gliales además de disminuir el estrés oxidativo presente en la ND (Naruse, 2000). En modelos

murinos se ha testado el efecto de diferentes moléculas antioxidantes como el ácido lipoico (Ziegler, 2011), inhibidores de algunas isoformas de la PCK y terapias con factores neurotróficos (Feldman, 2019). Todos estos tratamientos experimentales han demostrado reducir ligeramente la pérdida de sensibilidad en las extremidades afectadas, pero sólo han mostrado una leve disminución en la pérdida de fibras nerviosas.

Recientemente, se ha propuesto que el uso de células madre podría ser una estrategia terapéutica prometedora para el manejo de enfermedades complejas, ya que, a diferencia de los tratamientos farmacológicos convencionales, las células madre pueden actuar a través de múltiples mecanismos (terapia multi-blanco) (Mizukami, 2014).

### **Células madre mesenquimáticas como tratamiento para la ND**

Dentro de los diferentes tipos de células madre adultas, las células madre mesenquimáticas (MSC) presentan ventajas comparativas que las hacen un atractivo candidato para el tratamiento de la ND. Dentro de estas ventajas se encuentra: i) pueden ser fácilmente aisladas desde diferentes tejidos como médula ósea, cordón umbilical o tejido adiposo, y pueden ser expandidas *in vitro*; ii) poseen plasticidad celular, por lo que pueden diferenciarse a células de distintos linajes (Frausin, 2015); iii) producen altos niveles de factores tróficos, incluyendo factores neuroprotectores y angiogénicos (Caplan, 2006); iv) son capaces de reducir altos niveles de estrés oxidativo (Kim, 2008); v) son definidas con células inmunomoduladoras, debido a que producen altos niveles de moléculas anti-inflamatorias. Estas propiedades han llevado a los investigadores a evaluar el papel tanto de la administración local como sistémica de las MSC en modelos animales de DM como una opción terapéutica en el tratamiento de la ND.

### **Secretoma derivado de MSC como una alternativa al uso de células vivas**

Se ha reportado en varios estudios que la administración unilateral intramuscular de MSC en animales con ND produce una recuperación de las velocidades de conducción nerviosa sensitiva y motora, la recuperación de la estructura normal de las fibras nerviosas y un aumento del flujo sanguíneo a los nervios dañados (Kim, 2011, Nuruse, 2011). Inicialmente, se postuló que el mecanismo principal asociado a los efectos terapéuticos observados después de la administración de MSC estaba relacionado con la capacidad de estas células para migrar a tejidos dañados, diferenciarse en el tipo de célula requerido y reemplazar a las células muertas (Song, 2004). Sin

embargo, ahora se sabe que la generación de un microentorno pro-regenerativo, a través de la secreción de factores tróficos, es el mecanismo terapéutico más aceptado asociado a las MSC (Caplan, 2006). De hecho, el notable potencial terapéutico de los factores tróficos derivados de MSC se ha demostrado consistentemente en varios modelos experimentales, incluidos los trastornos del sistema nervioso y las afecciones dolorosas (Rubio, 2008), al tiempo que reduce la complejidad de la terapia y los posibles efectos no deseados asociados con la administración de células vivas.

La gran variedad de moléculas secretadas por las MSC se conoce como secretoma, también llamado derivado acelular, el cual puede ser obtenido cultivando las células *in vitro*. En el caso de las MSC humanas, el secretoma consiste en más de 100 moléculas biológicamente activas que incluyen varios tipos de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento (Salgado, 2010). Hoy en día no hay datos sobre el uso del secretoma de MSC para tratar la ND. Sin embargo, se postula que este enfoque podría ser útil en esta patología, ya que mediante análisis proteómico y de RT-qPCR se ha detectado la presencia de: i) factores neuroprotectores como NGF, GDNF, CNTF, BDNF y NT-3; ii) factores angiogénicos tales como bFGF, VEGF y ANG1; iii) factores antiinflamatorios como IL-4, IL-5, IL-10 y TSG-6 y iv) moléculas antioxidantes como SOD3 y PDGF (J Salgado, 2010, Oses, 2017). Por lo tanto, este producto puede tener potencial terapéutico a través de la inhibición de los principales mecanismos que conducen al inicio y la progresión de la ND, evitando así la progresión de la enfermedad.

### **Ventajas del uso de secretoma derivado de MSC**

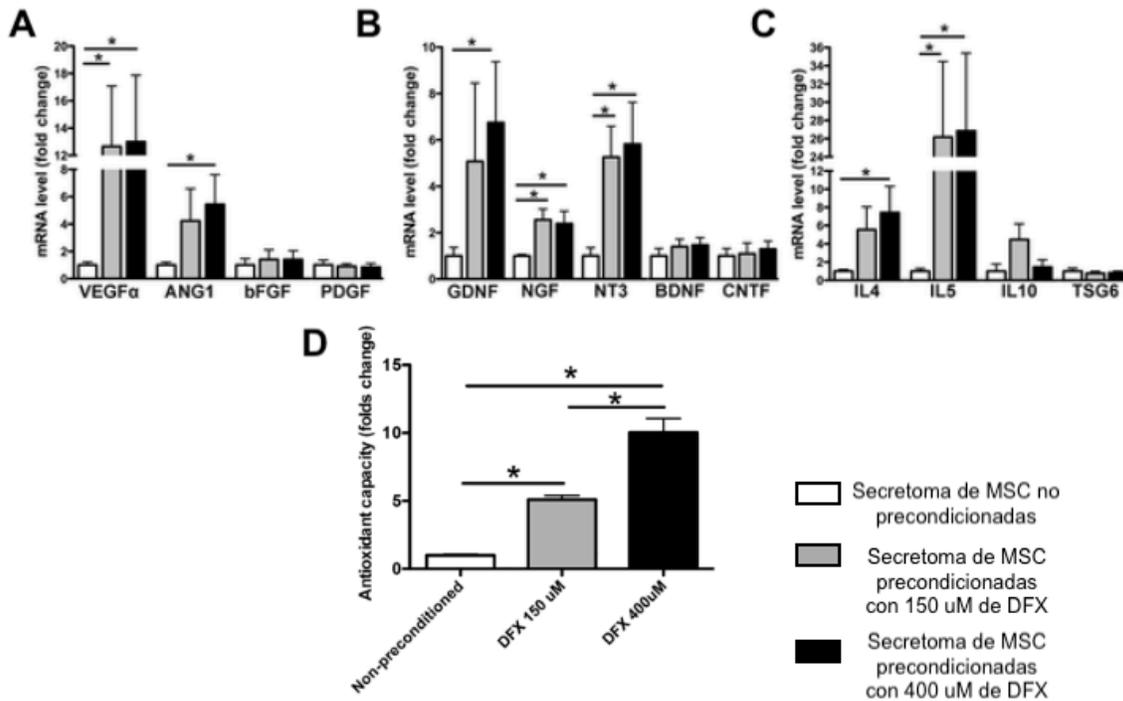
En comparación con el uso de células madre vivas, el secretoma tiene varias ventajas, que incluyen: i) mayor bioseguridad, ya que la administración de secretoma tiene menos consideraciones bioéticas y menos riesgo de formación de estructuras no deseadas que la administración de células vivas; ii) disponibilidad inmediata, ya que el secretoma puede liofilizarse, favoreciendo su almacenamiento, transporte y reduciendo los tiempos de espera; iii) mayor reproducibilidad de los efectos terapéuticos, ya que posee una composición definida, cuando las MSC se cultivan en condiciones equivalentes (que puede determinarse mediante un enfoque proteómico); iv) mayor facilidad de administración, ya que la administración de biofármacos requiere instalaciones médicas menos complejas que las necesarias para la administración de células vivas y v) menores

costos de producción, ya que el secretoma puede producirse en grandes cantidades, reutilizando las células.

### **Precondicionamiento de las MSC para potenciar su efecto terapéutico**

Uno de los principales problemas asociados al uso del secretoma derivado de MSC es que en algunos casos la concentración de citoquinas y factores de crecimiento deseados son demasiado bajos para un uso terapéutico (Angoulvant, 2011). Sin embargo, se ha reportado que es posible modificar la composición del secretoma, sometiendo a estas células a un estímulo de precondicionamiento *in vitro* (Yu, 2013) mediante la incubación con un agente tóxico en una concentración subletal, lo que conduce a la inducción de la expresión y la secreción de varias moléculas necesarias para reducir este daño. De esta forma, es posible inducir la secreción de una combinación apropiada y una relación de factores tróficos específicos para una patología determinada.

En este sentido, nuestro grupo de investigación demostró previamente que cuando las MSC se someten a un estímulo de precondicionamiento mediante incubación con el quelante de hierro deferoxamina (DFX), hay un aumento en el nivel intracelular del factor inducible por hipoxia HIF1 $\alpha$ , lo que resulta en un aumento significativo en la expresión y secreción de factores angiogénicos, neuroprotectores, antiinflamatorios y antioxidantes (Figura 2) (Oses, 2017). Además, también se mostró que el mejor efecto se logra al precondicionar las células con 400 $\mu$ M de DFX. De acuerdo con lo anterior, se demostró también que en cultivos de neuronas de DRGs sometidas a un estrés por alta concentración de glucosa (modelo *in vitro* de ND), el tratamiento con secretoma derivado de MSC no precondicionadas produjo una modesta disminución en la apoptosis de estas neuronas. Sin embargo, la incubación con secretoma de MSC precondicionado con DFX disminuyó fuertemente la muerte neuronal inducida por glucosa en los cultivos de neuronas de los DRGs (Oses, 2017), lo que podría sugerir un mayor efecto terapéutico al testarse en un modelo *in vivo*.



**Figura 2: Precondicionamiento de MSC con Deferoxamina (DFX) incrementa los niveles de expresión de factores angiogénicos, neuroprotectores, antiinflamatorios y antioxidantes presentes en el secretoma, en comparación con el secretoma de MSC sin preconditionar.**

(A-C) Análisis de RT-qPCR en MSC no preconditionadas, preconditionadas con 150 μM de DFX, o 400 μM de DFX para (A) Factores angiogénicos, (B) Factores neuroprotectores y (C) Factores antiinflamatorios. (D) Análisis cuantitativo de la capacidad antioxidante del secretoma derivado de MSC no preconditionadas, preconditionadas con 150 μM de DFX, o 400 μM de DFX. (Adaptado de Osés, 2017)

Debido a los antecedentes anteriores, se decidió evaluar si el secretoma derivado de MSC preconditionadas con DFX puede tener un efecto terapéutico, pero ahora evaluado en un modelo animal de ND. Para esto se utilizaron ratones BKS db/db, uno de los modelos más robustos de DMT2 (De Gregorio, 2018). Estos animales desarrollan hiperfagia, llevándolos a un aumento rápido y sostenido del peso corporal, dislipidemia, resistencia a la insulina e inducción de hiperglicemia severa a partir de la cuarta semana de vida (Campero, 2015). Además, se ha reportado que a las 16 semanas de edad, estos ratones exhiben marcadores moleculares y funcionales tempranos de la ND, similar a lo observado en pacientes humanos. En concreto, estos animales presentan pérdida de la sensibilidad térmica y mecánica, disminución de la velocidad de conducción nerviosa y disminución de la densidad de las fibras nerviosas intraepidérmicas, entre otras características (De Gregorio, 2018). Por ello, el ratón BKS db/db es un excelente modelo para determinar si el secretoma derivado de MSC logra prevenir la pérdida de neuronas sensitivas en

los DRGs como también disminuir la muerte de células de Schwann en los nervios periféricos, y si este efecto puede ser potenciado al utilizar secretoma de MSC preconditionadas con DFX. Con estos antecedentes se formula la siguiente hipótesis:

## **HIPÓTESIS**

La administración sistémica de secretoma derivado de células madre mesenquimáticas preconditionadas con deferoxamina, reduce la degeneración axonal, la apoptosis de neuronas y células de Schwann y la pérdida de mielina en nervio ciático, junto con estimular la regeneración axonal en el modelo animal de neuropatía diabética BKS db/db.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar si la administración sistémica de secretoma derivado de células madre mesenquimáticas preconditionadas con deferoxamina, reduce la degeneración axonal, la apoptosis de neuronas y células de Schwann y la pérdida de mielina en nervio ciático, junto con estimular la regeneración axonal en el modelo animal de neuropatía diabética BKS db/db.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar si la administración sistémica de secretoma derivado de células madre mesenquimáticas, sometidas o no a estímulo de preconditionamiento, reduce la degeneración axonal, la apoptosis de neuronas y células de Schwann y la pérdida de mielina en el nervio ciático de animales BKS db/db, comparado con animales BKS db/db tratados con vehículo.
- Determinar si la administración sistémica de secretoma derivado de células madre mesenquimáticas, sometidas o no a un estímulo de preconditionamiento, mejora la capacidad regenerativa en neuronas de los ganglios de la raíz dorsal de animales BKS db/db, en comparación con animales BKS db/db tratados con vehículo.

## LISTA DE REACTIVOS Y ANIMALES

### Anticuerpos

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se resumen en la tabla 1.

**Tabla 1. Anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia**

Anticuerpo	Especie	Dilución	Catalogo	Marca
$\beta$ 3-tubulina	Ratón	1:150	#tu-20	Santa Cruz Biotechnology
Alexa Fluor 488	Anti-Ratón	1:400	4408	Cell Signaling

**Tabla 2. Anticuerpos utilizados en inmunofenotipificación de MSC**

Anticuerpo	Especie	Dilución	Clon	Marca
CD29-FITC	Humano	1:100	TS2 / 16	eBioscience
CD13-FITC	Humano	1:100	WM-15	eBioscience
CD105-PE	Humano	1:100	SN6	eBioscience
CD73-PE	Humano	1:100	AD2	eBioscience
CD90-PE	Humano	1:100	5E10	eBioscience
CD235a-APC	Humano	1:100	HIR2	eBioscience
CD31-APC	Humano	1:100	WM-59	eBioscience
CD45-APC	Humano	1:100	2D1	eBioscience

### Otros compuestos

**Tabla 3. Compuestos utilizados y sus características se resumen en la tabla 3**

Compuesto	Marca	Catalogo	Concentración uso
Albúmina sérica bovina	Sigma-Aldrich	A7906	5% p/v
Alfa-MEM	Gibco	22561	1x
Alizarin- red	Sigma-Aldrich	A5533	0,1 mg/ml
AraC	Sigma-Aldrich	C1768	50 mg/ml
Colagenasa tipo I	Gibco	17018	0,5% p/v
Collagenasa tipo II	Gibco	17101	3 mg/ml
DAPI	Invitrogen	D1306	2 $\mu$ g/ml
Deferoxamina	Sigma-Aldrich	D9533	400 $\mu$ M
DMEM/F12	Gibco	11320082	1x
DNAsa	Invitrogen	18068015	1 unidad por $\mu$ g de RNA
Gentamicina	Laboratorio Sanderson	-----	0,16 mg/ml
N2	Gibco	10502048	1x
NGF	Alamone Labs	N-100	10 ng/ml
Oil-red O	Sigma-Aldrich	O0625	0,1 mg/ml
Paraformaldehido	Merck	30525-89	4% p/v
Poli-D lisina	Sigma-Aldrich	P0899	1x
Tripsina	Gibco	25200072	0,25% v/v
Triton X-100	Sigma-Aldrich	T8787	0,2% v/v

Trizol	Invitrogen	15596026	1 ml por muestra
Sevofluorano	Abbot	-----	3% (inhalatorio)
Suero fetal bovino	Invitrogen	26140079	10% v/v

### **Animales**

Los ratones (BKS.Cg-Dock7<sup>m</sup>+/+ Lepr<sup>ob</sup>/J) hembras homocigotas (db/db) y heterocigotas (db/+) fueron obtenidos del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad del Desarrollo. El manejo y los procedimientos experimentales en animales durante este trabajo se realizaron de acuerdo con los protocolos de CICUAL correspondientes a la Facultad de Medicina de la Universidad del Desarrollo.

## **MÉTODOS**

### **Aislamiento de MSC**

Las MSC se aislaron desde tejido adiposo subcutáneo humano extraído desde la región abdominal en liposucciones cosméticas realizadas en Clínica Alemana, luego de la firma del consentimiento informado a 4 donantes. Para el aislamiento de las MSC, se lavaron alícuotas de 200 mL de grasa con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se cortaron en trozos pequeños. Luego se digirió con 3 mg/mL de colagenasa tipo II (Gibco, Grand Island, NY) en PBS a 37°C durante 30 minutos. Luego, la mezcla se centrifugó a 400 g durante 10 minutos para eliminar los adipocitos flotantes. Los sedimentos se resuspendieron en medio esencial mínimo  $\alpha$ -MEM (Gibco, Auckland, Nueva Zelanda) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% y gentamicina 0,16 mg/mL (Laboratorio Sanderson, Santiago, Chile). Las células se colocaron en placas a una densidad de 7000 células/cm<sup>2</sup> y se cultivaron a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 90%, se despegaron con tripsina al 0,25%, EDTA 2,65 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), se centrifugaron y se subcultivaron a una densidad de 7000 células/cm<sup>2</sup>. Después de dos subcultivos, las células se caracterizaron de acuerdo con su potencial de diferenciación adipogénica y osteogénica. Para evaluar el potencial adipogénico, los cultivos se trataron durante 15 días con el medio de inducción adipogénica y se tiñeron con Oil Red-O (Sigma-Aldrich). Para evaluar el potencial osteogénico, los cultivos se trataron por 21 días con medio de diferenciación osteogénica, se fijaron con etanol al 10 % y se tiñeron con Alizarin Red-S (Sigma-Aldrich) como se describió previamente (Oses, 2017). Finalmente, se realizó una inmunofenotipificación mediante análisis de citometría de flujo. Para ello se realizó una inmunomarcación con anticuerpos monoclonales contra putativos marcadores MSC humanos: CD29 (conjugado con FITC), CD13 (conjugado con FITC), CD105 (conjugado con PE), CD73 (conjugado con PE) y CD90 (conjugado con PE) y para marcadores característicos de otros linajes celulares: CD235a (conjugado con APC), CD31 (conjugado con APC), y CD45 (conjugado con APC), de acuerdo con lo descrito previamente en Oses, 2017.

### **Extracción del secretoma de MSC y acondicionamiento**

Las MSC en pasaje 3 se sometieron a un estímulo de acondicionamiento *in vitro* mediante incubación con una concentración de 400  $\mu$ M de deferoxamina (DFX) durante 48 horas, con el fin de aumentar la secreción de moléculas relevantes para el tratamiento de la ND (Oses, 2017). Por

otro lado, las MSC sin precondicionar se mantuvieron en medio suplementado con vehículo (suero salino) por 48 horas. Se purificó el secretoma de las MSC precondicionadas o no precondicionadas, mediante la recolección de los medios de cultivos y concentración mediante centrifugación en filtros Amicon de tamaño de corte de 3 kDa, luego se lavó con 2 volúmenes de PBS a fin de eliminar la DFX presente, y se concentró su volumen inicial en 30 veces. Los secretomas se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### **Modelo animal**

Se utilizaron ratones transgénicos hembras BKS.Cg-Dock7<sup>m+/+</sup> Lepr<sup>db</sup>/J homocigotos (BKS db/db; modelo animal de T2DM) y heterocigotos (BKS db/+; animales control sano). Este modelo animal presenta una mutación en el gen que codifica para el receptor de leptina. Los animales con la mutación en la forma homocigótica (BKS db/db) desarrollan hiperfagia, lo que lleva a un aumento rápido y sostenido del peso corporal, dislipidemia, resistencia a la insulina e inducción de hiperglicemia severa después de la cuarta semana de vida (Campero, 2015). Por otro lado, los animales con la mutación en la forma heterocigótica (BKS db/+) tienen un fenotipo normal (Campero, 2015; De Gregorio, 2018). Los animales se mantuvieron a temperatura y humedad constantes, con un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas, con acceso libre a alimento estándar y al agua. Se utilizaron ratones hembras ya que desarrollan la enfermedad de forma más lenta, y raramente se descompensan, lo que permite que sean un modelo más estable para poder observar complicaciones a largo plazo asociadas a la DM.

### **Medición de la glicemia y peso**

Se realizó la medición del peso mediante balanza y de la glicemia en sangre utilizando el sistema Accu-Chek Performance (Roche) cada 2 semanas, desde de la semana 14 de edad en adelante. Ambas mediciones se realizaron a las 9 AM. Para este estudio, sólo se consideraron como diabéticos los animales que presentaron una glicemia mayor a 300 mg/dL y un peso corporal  $\geq 50\text{g}$  a las 18 semanas de edad.

### **Administración del secretoma**

Se llevó a cabo la administración sistémica del secretoma en animales de 18 semanas de edad, cuando la ND ya estaba establecida (De Gregorio, 2018). Los ratones BKS db/db (ratón diabético)

se dividieron en 3 grupos en forma aleatoria: al primer grupo se le administró el vehículo (suero fisiológico), el segundo grupo recibió el secretoma derivado de MSC sin preconditionamiento y el tercer grupo recibió el secretoma derivado de MSC sometidas al estímulo de preconditionamiento *in vitro*. A los ratones BKS db/+ (ratón no diabético) se les administró vehículo (suero fisiológico). Cada dosis consistió en 50 µl de secretoma concentrado a partir del medio de cultivo de  $1 \times 10^6$  MSC (25 µg de proteínas totales, determinadas mediante kit de cuantificación de proteínas BCA kit). Los secretomas o vehículo se administraron de forma sistémica por la vena de la cola previa anestesia del animal con sevoflurano inhalatorio. El tratamiento se repitió cada 2 semanas hasta la 24ª semana de edad (4 dosis en total). Para cada análisis se usaron de 5 a 6 animales por grupo experimental (N= 5-6).

### **Extracción de ganglios de la raíz dorsal (DRGs) y nervio ciático**

En la semana 26 de edad, los animales se anestesiaron con tiopental sódico y se sometieron a eutanasia mediante dislocación cervical. Se extrajeron los 2 nervios ciáticos de cada animal, se lavaron con suero fisiológico, uno fue fijado en paraformaldehído al 4% (en PBS), y el otro fue congelado en nitrógeno líquido y almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para extraer los DRGs, se aisló la columna vertebral completa, y los ganglios fueron obtenidos específicamente de las vértebras lumbares L3-L4-L5, equivalentes al origen del nervio ciático. Una vez obtenidos, se les cortó los restos de nervio y meninge, y se lavaron con solución salina. Posteriormente, los DRGs que se utilizaron para el análisis de TUNEL fueron fijados en paraformaldehído al 4%, o mantenidos en hielo hasta realizar el cultivo celular.

### **Evaluación de la estructura del nervio ciático**

La estructura del nervio ciático se analizó en cortes semifinos ( $1\mu\text{m}$ ) de la zona distal del nervio ciático teñidos con azul de toluidina. Las muestras se analizaron mediante microscopía de campo claro. Se analizó la frecuencia de cada uno de los tipos de fibras presentes en el nervio (Campero et al, 2015).

Para la visualización de la ultraestructura del nervio ciático, se analizaron cortes ultrafinos (60 nm) de la zona distal del nervio ciático. Se obtuvieron imágenes a través de microscopía electrónica (Servicio de Microscopia, Pontificia Universidad Católica de Chile), en las cuales se determinó el radio G mediante el programa Image J (NIH, USA).

### **Evaluación de la desmielinación en el nervio ciático**

Se determinó la desmielinación en la zona distal del nervio ciático evaluando la expresión de genes relacionados con la demielinización. Se determinó expresión del receptor de NGF, MBP, PMP22, MPZ y S100 $\beta$  mediante RT-qPCR. Los partidores utilizados fueron:

NGF	5'-AATCGG CTCACAAGGGATTCA-3'	5'-TCCTCCCAGCTTAAAGATTTTGG-3'
MBP	5'-TCACAGCGATCCAAGTACCTG-3'	5'-CCCCTGTCACCGCTAAAGAA-3'
PMP22	5'CATCGCGGTGCTAGTGTTG-3'	5'AAGGCGGATGTGGTACAGTTC-3'
MPZ	5'CGGACAGGGAAATCTATGGTGC-3'	5'-TGGTAGCGCCAGGTAAAAGAG-3'
S100 $\beta$	5'-TGGTTGCCCTCATTGATGTCT-3'	5'-CCCATCCCCATCTTCGTCC-3'

El RNA total del nervio ciático se extrajo utilizando TRIzol, luego se realizó un tratamiento con DNAsa, para degradar restos de DNA contaminante. A continuación, se realizó una retrotranscripción para obtener el cDNA y finalmente se realizó PRC de tiempo real a partir de 50ng de cDNA utilizando el kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green (Roche) en un termociclador LightCycler 1.5. La expresión de cada gen fue normalizada en comparación a la expresión del gen de referencia  $\beta$ -actina utilizando el método  $\Delta\Delta CT$  (Oses, 2017).

### **Ensayo de TUNEL**

Se evaluó el número de células apoptóticas en muestras de DRGs y nervio ciático (zona distal) fijadas en 4% de formaldehído, utilizando el kit DeadEnd<sup>TM</sup> (Promega) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Los núcleos fueron contra-teñidos con DAPI y las muestras fueron analizadas por microscopía confocal. Para este estudio se fotografió el segmento distal completo del nervio ciático, incluyendo al menos 20 campos por nervio (de aproximadamente 400 $\mu m^2$  cada uno).

### **Cultivo de neuronas de DRGs**

Los DRGs se trataron con tripsina 0,625% en HBSS (sin iones divalentes) a 37°C durante 25 minutos, y luego con colagenasa tipo I 0,5% en HBSS (con Ca<sup>+2</sup> y Mg<sup>+2</sup>) a 37°C durante 25 minutos. Luego, los DRGs se disociaron utilizando pipetas Pasteur de diferentes calibres, y se sembró el cultivo en placas previamente tratadas con poli-D-lisina (Sigma-Aldrich). Se ocupó DMEM F12 (Gibco) suplementado con N2+AraC (Sigma-Aldrich), y penicilina con estreptomina como medio de cultivo. Se realizó un cambio de medio a las 24 horas, y finalmente

las neuronas se fijaron a las 48 horas de cultivo. Para la fijación, se utilizó PFA al 4% sacarosa al 4% en PBS.

### **Evaluación de la regeneración de neuritas en neuronas de DRGs**

Se realizó inmunofluorescencia de la proteína  $\beta$ 3-tubulina en los cultivos de DRGs para poder visualizar específicamente las neuronas, con su morfología completa. Las células se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,2% (Sigma-Aldrich) y se bloquearon con albúmina sérica bovina al 5% (Sigma-Aldrich) en PBS. Luego se incubaron con el anticuerpo primario anti  $\beta$ 3-tubulina (1:100; Santa Cruz) y se utilizó como anticuerpo secundario anti-mouse Alexafluor 488, 1:400. Los núcleos se tiñeron con DAPI, 1:500 en PBS. Los cubreobjetos se montaron en medio de montaje fluorsave (Merck-Milipore). Las muestras se analizaron mediante microscopía confocal. Las imágenes obtenidas se sometieron al análisis de Sholl (Sholl, 1953) en el programa Image J (NIH, USA) para evaluar el largo y la ramificación neuronal.

### **Tratamiento *in vitro* de neuronas de DRGs con secretoma**

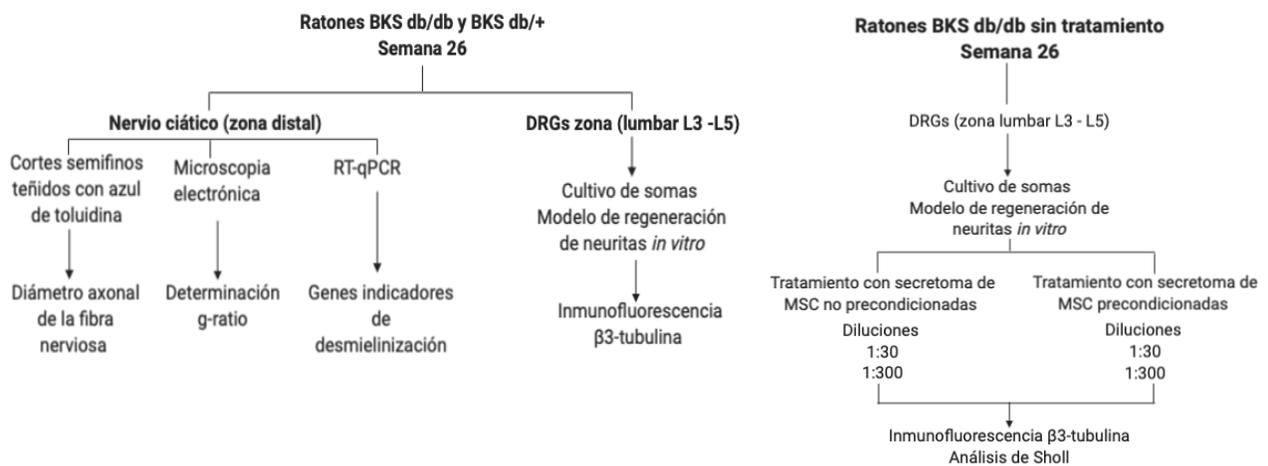
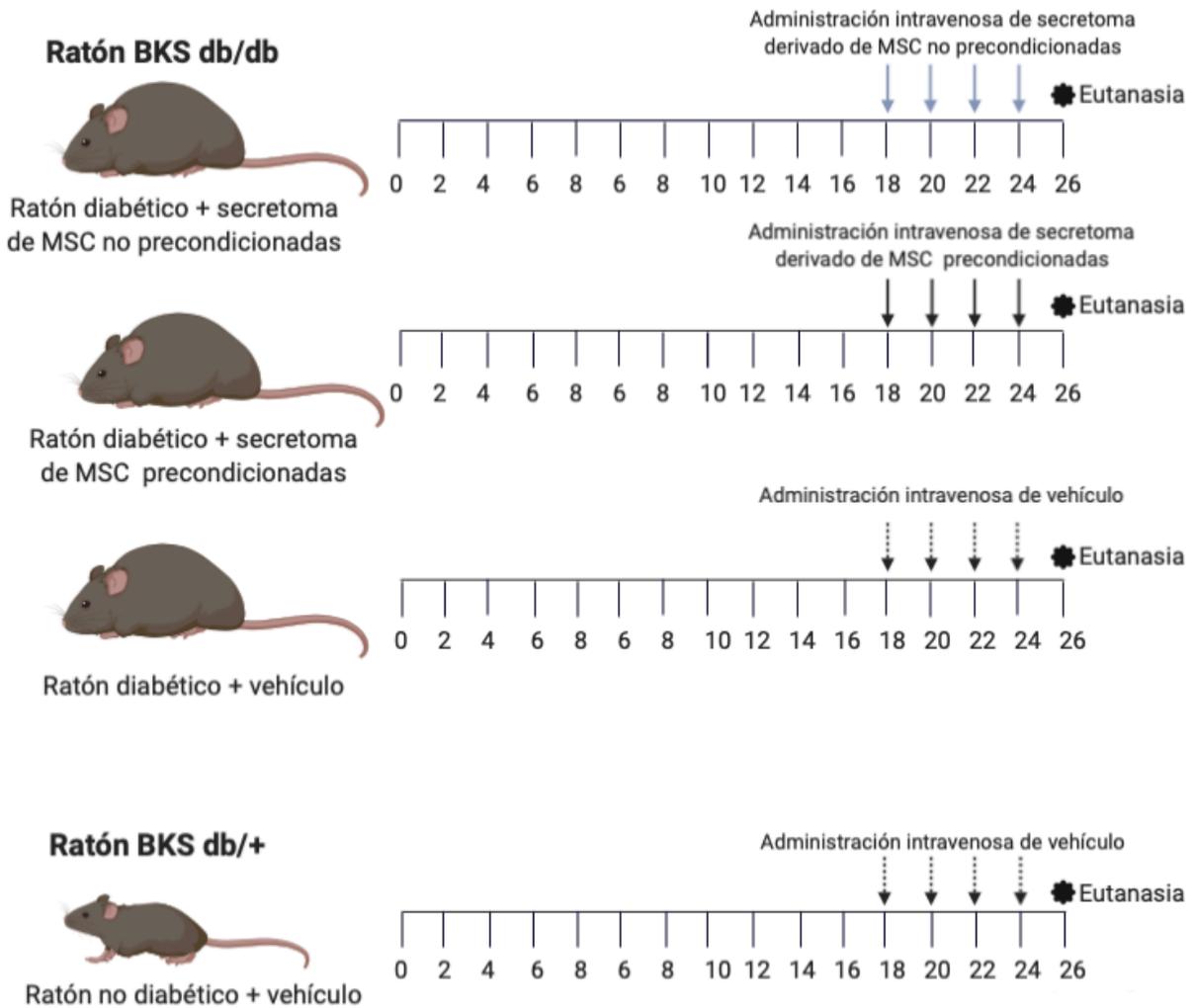
Los cultivos neuronales se realizaron a partir de DRGs de animales diabéticos de 26 semanas, los cuales recibieron tratamiento con vehículo. Los DRGs se trataron con tripsina 0,625% en HBSS (sin iones divalentes) a 37°C durante 25 minutos y luego con colagenasa tipo I 0,5% en HBSS (con iones divalentes) a 37°C durante 25 minutos. Luego, los DRGs se disociaron utilizando pipetas Pasteur de diferentes calibres y se sembró el cultivo en placas con poli-D-lisina. Se ocupó DMEM F12, suplementado con N2 +AraC y penicilina con estreptomina como medio de cultivo. Junto con el medio de cultivo, se agregó diluciones del secretoma, ya sea obtenido de MSC precondicionadas con DFX o no precondicionadas a una concentración de 1:30 (secretoma derivado de una MSC por cada 30 neuronas en cultivo); o de 1:300 (secretoma derivado de una MSC por cada 300 neuronas en cultivo). Adicionalmente, se utilizó 10 ng/ml de NGF (Alamone Labs) como control positivo y PBS como control negativo. Finalmente, se evaluó la capacidad de regeneración de las neuronas a través del análisis de Soll descrito anteriormente (Sholl, 1953).

### **Análisis estadístico**

Todos los datos son presentados como el promedio  $\pm$  S.E.M de al menos cuatro experimentos independientes. La progresión del peso y la glicemia se analizaron a través de ANOVA de

mediciones repetidas. Las diferencias en los otros parámetros se evaluaron mediante análisis de ANOVA de una vía. Se continuó el análisis con la prueba de Tukey para comparar los efectos de las distintas condiciones en los diferentes parámetros estudiados. El nivel de significancia establecido fue de  $p < 0,05$ . Se utilizó el software GraphPad Prism 8.0 (La Jolla, CA, USA) para los análisis estadísticos.

## DISEÑO DE ESTUDIO

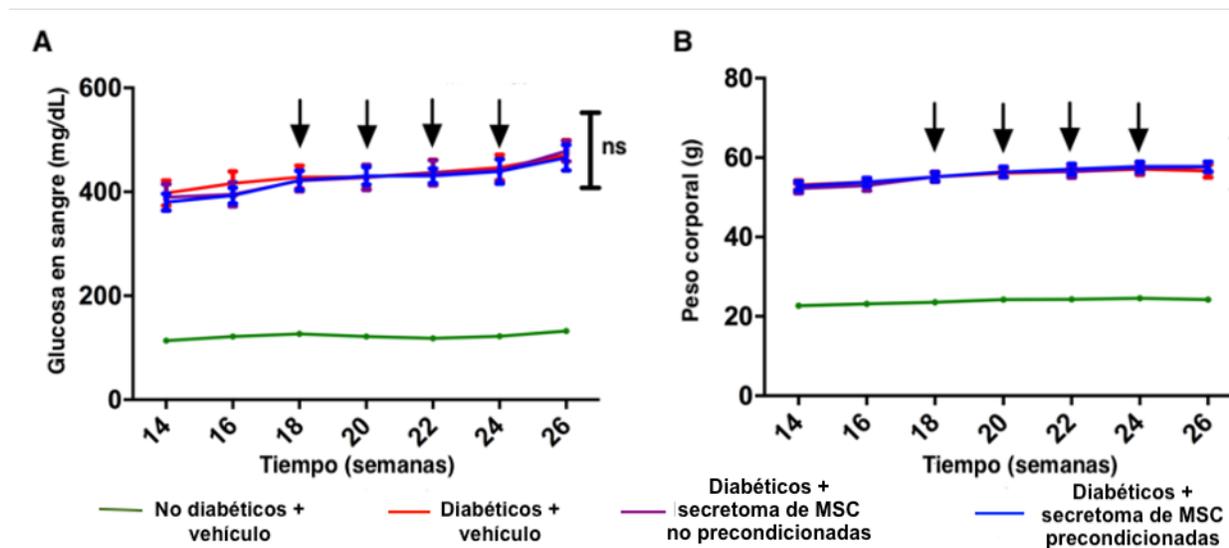


## RESULTADOS

### Medición de glucosa en sangre y peso corporal

Para este estudio, se midieron los niveles de glucosa en sangre en ayunas usando un glucómetro. Las muestras de sangre se obtuvieron cada dos semanas (de 14 a 26 semanas) de la cola de animales, mientras que para las mediciones de peso se utilizó una balanza convencional.

Se puede observar que los animales BKS db/+ (animales sanos) presentaron una glucosa plasmática en ayuna cercana a los 150 mg/dL (Fig. 3A) y un peso corporal cercano a los 20 gramos (Fig. 3B) que se mantuvieron en el tiempo. Por el contrario, los animales BKS db/db (modelo DMT2), presentaron valores elevados de glucosa plasmática, cercano a los 400 mg/dL y con tendencia al alza en las siguientes semanas (Fig. 3A). De igual modo, los animales diabéticos presentaron un peso mayor a 50 gramos (Fig. 3B). En cuanto a la administración tanto de secretoma (derivado de MSC preconditionadas o no preconditionadas) como de vehículo, estos no tuvieron ningún efecto en los niveles de glucosa sanguínea ni tampoco en la ganancia de peso corporal.

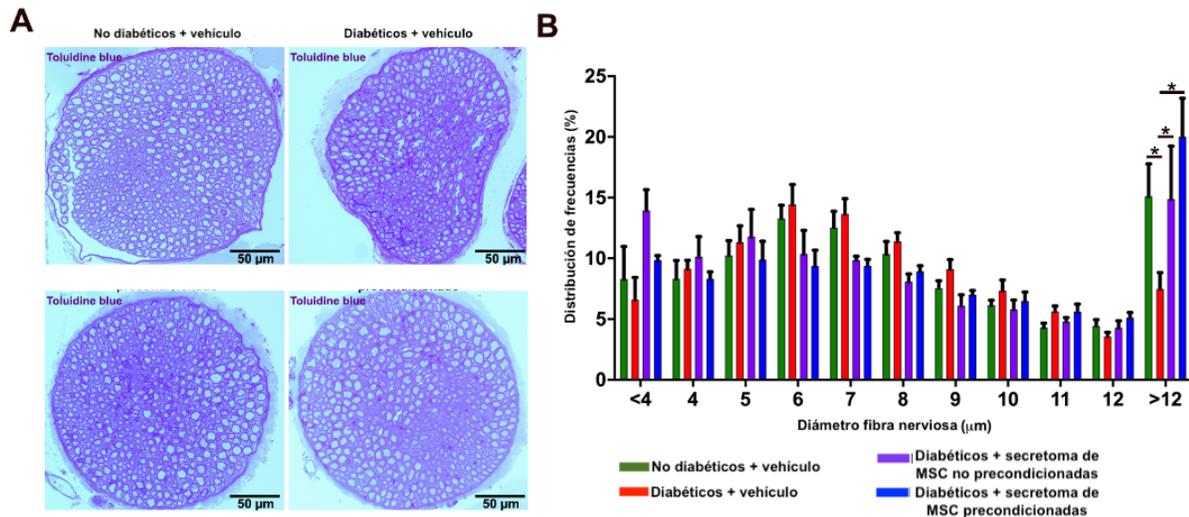


**Figura 3. Evaluación de niveles de glucosa en sangre y peso corporal de animales diabéticos y no diabéticos.**

(A) Los niveles de glucosa en sangre se evaluaron cada dos semanas usando un glucómetro. (B) El peso corporal se evaluó cada dos semanas. Los datos son presentados como el promedio  $\pm$  SEM ( $n = 20$  por grupo experimental, ANOVA mediciones repetidas).

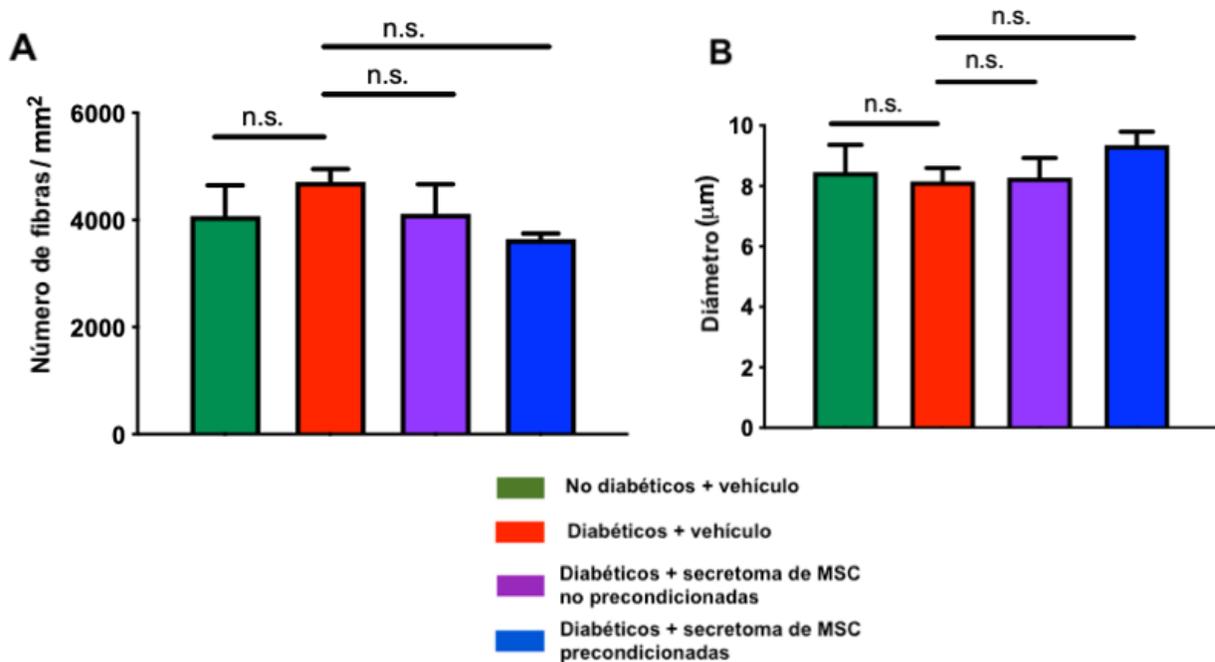
### Distribución del tamaño de las fibras nerviosas en nervio ciático.

Se ha reportado anteriormente que, tanto en humanos como en modelos animales, la ND altera la morfología de las fibras nerviosas de los nervios periféricos, induciendo la pérdida de las fibras de mayor diámetro, lo que se traduce en una disminución de la velocidad de conducción sensitiva y motora (Campero, 2015). Para poder analizar si el secretoma de MSC logra evitar alteraciones en las fibras nerviosas periféricas, se obtuvieron secciones semifinas del nervio ciático, las cuales se tiñeron con azul de toluidina para visualizar la mielina, y se evaluó la distribución del tamaño de las fibras nerviosas. Los resultados indican que el nervio ciático de los animales diabéticos tratados con vehículo presenta una reducción significativa en el porcentaje de las fibras de mayor diámetro ( $>12 \mu\text{m}$  de diámetro) en comparación con los animales sanos tratados con vehículo (Fig. 4A y B). Mientras que, en los animales tratados tanto con secretoma derivado de MSC no preconditionadas como los tratados con secretoma derivado de MSC preconditionadas con DFX, se puede observar que las fibras de mayor diámetro ( $>12 \mu\text{m}$  de diámetro) no presentan diferencias significativas respecto a los animales sanos. Este resultado sugiere que la administración de secretoma de MSC evita completamente la pérdida de las fibras de mayor diámetro, y no afecta la proporción de otros tipos de fibras ( $< 12 \mu\text{m}$  de diámetro), al compararlos con ratones diabéticos tratados con el vehículo (Fig. 4A y B).



**Figura 4: Evaluación de la administración de secretoma derivado de MSC sobre la distribución del tamaño de fibras axonales en el nervio ciático.** (A) Imágenes representativas de campo claro de secciones semifinas de nervios ciáticos, obtenidas de ratones no diabéticos de 26 semanas de edad o ratones diabéticos de 26 semanas de edad tratados con vehículo, secretoma de MSC no preconditionadas o secretoma de MSC preconditionadas con DFX. Las fibras mielinizadas se tiñeron con azul de toluidina. La barra representa 50 μm. (B) Histograma de distribución de frecuencia de las fibras mielinizadas. Los datos cuantitativos se presentan como promedio  $\pm$  S.E.M. \* indica diferencias significativas con el grupo diabéticos tratados con vehículo (n=6, ANOVA de una vía con post-test de Tukey).

Adicionalmente se cuantificó la densidad de fibras por área de nervio, junto con el promedio del diámetro de las fibras en los diferentes grupos experimentales. En ambos casos, no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos analizados (Fig. 5A y 5B). En su conjunto, estos datos sugieren que la hiperglicemia crónica afecta una población específica de las fibras (>12  $\mu\text{m}$  de diámetro) en este estadio de la enfermedad.

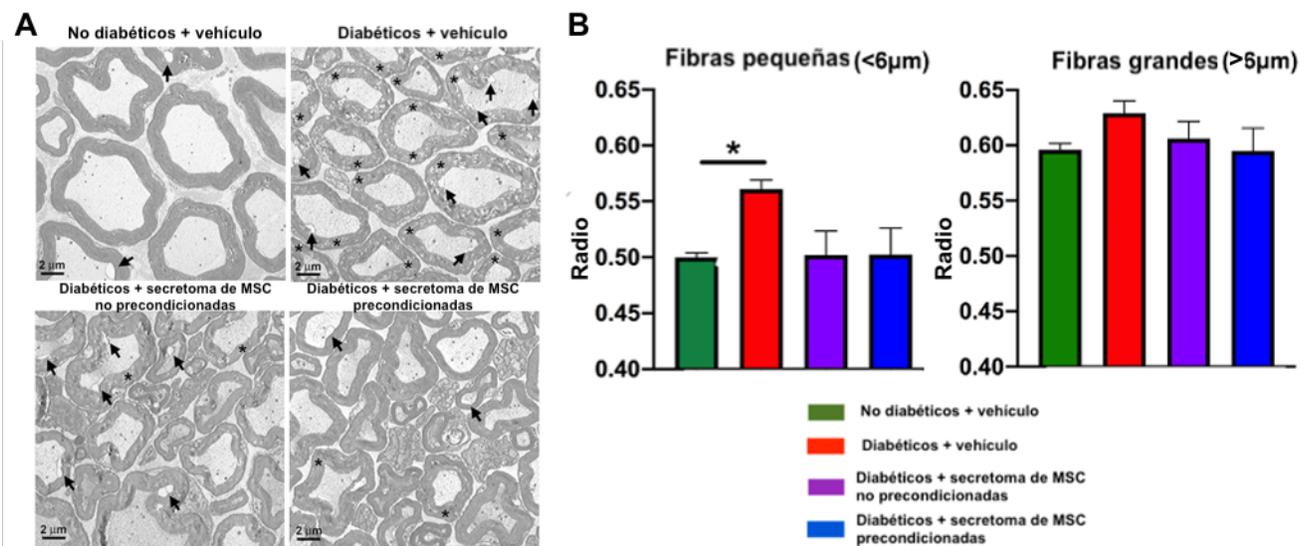


**Figura 5: Número de fibras por área y promedio del diámetro de las fibras en el nervio ciático.** (A) Cuantificación del promedio del número de fibras en el nervio ciático teñidas con azul de toluidina normalizadas por el área total cuantificada. (B) Cuantificación del diámetro promedio de las fibras del nervio ciático. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  S.E.M. n.s indica que no existen diferencias significativas entre los grupos (n=6, ANOVA de una vía con post-test de Tukey).

### Ultraestructura del nervio ciático y determinación del radio G.

Previamente, se ha descrito una pérdida de mielina y un aumento en la apoptosis de las células de Schwann en el nervio ciático en modelos animales de ND (Naruse, 2019). Para poder evaluar si la administración del secretoma derivado de MSC logra prevenir estas alteraciones, se evaluaron secciones del nervio ciático de los diferentes grupos experimentales a nivel ultraestructural. A través de microscopía electrónica fue posible evaluar el grosor de la capa de mielina en los axones mielinizados, a partir de la obtención del radio G (relación diámetro axón / diámetro de fibra nerviosa) (Waxman, 1972). Como se muestra en los gráficos de la figura 6B, el radio G no se vio afectado significativamente en fibras grandes (>6  $\mu\text{m}$  de diámetro), ya que en todos los grupos experimentales el valor del radio G obtenido bordea los 0.6, valor considerado no patológico. Por

otro lado, el radio G en las fibras pequeñas ( $<6\ \mu\text{m}$  diámetro) de animales diabéticos tratados con vehículo resultó significativamente mayor en comparación con los animales no diabéticos tratados con vehículo, lo que indica un estado de desmielinización en los animales diabéticos. En cuanto al tratamiento, ambos secretomas lograron evitar el incremento en el radio G, lo que se traduce en una ausencia de desmielinización en dichas fibras (Figura 6A y 6B). Adicionalmente, en nuestro análisis ultraestructural encontramos defectos en las fibras mielínicas de los animales diabéticos tratados con vehículo, incluyendo la pérdida de la compactación de la vaina de mielina (fibras con asteriscos) y la retracción del axón desde la vaina de mielina (flechas negras, Figura 6 A) en comparación a los animales sanos. Estos defectos fueron revertidos mayoritariamente por el tratamiento con ambos secretomas.

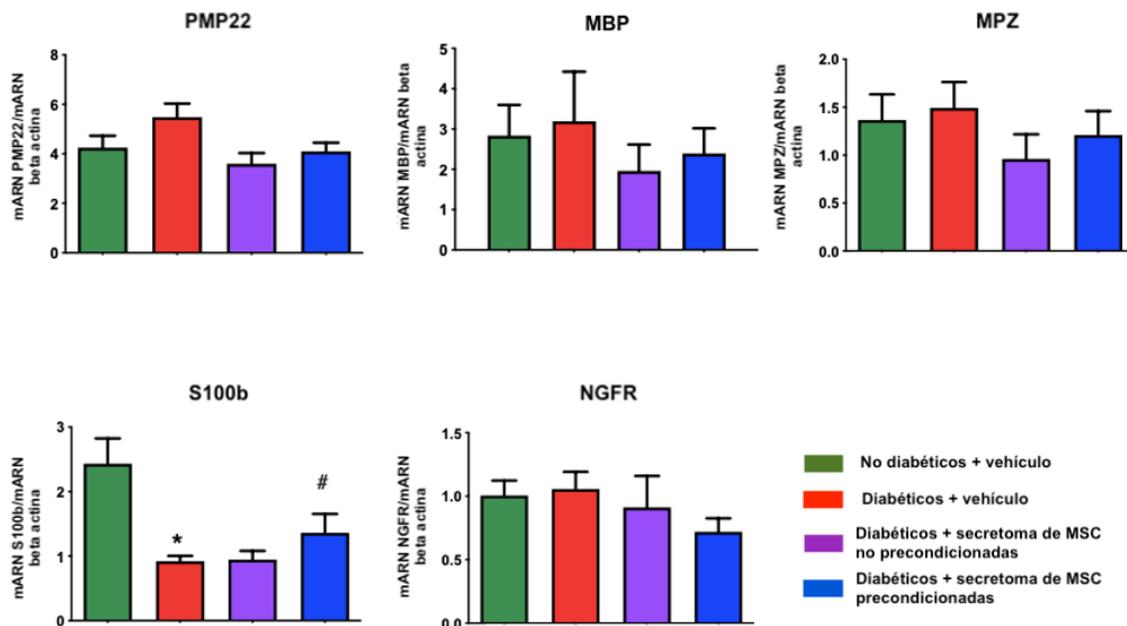


**Figura 6: Radio G de las fibras mielinizadas del nervio ciático.** (A) Imágenes representativas de microscopía electrónica de secciones ultrafinas de nervio ciático. La barra representa  $2\ \mu\text{m}$ . \* indica pérdida de la compactación de la vaina de mielina, flechas indican retracción del axón desde la vaina de mielina (B) A la izquierda se muestra la distribución del radio G de las fibras mielinizadas pequeñas y en el lado derecho de las fibras mielinizadas grandes del nervio ciático. Se muestra el promedio  $\pm$  S.E.M ( $n=4$ , 30 radios G fueron determinados por animal, un total de 120 radios G por condición, ANOVA de una vía con post-test de Tukey, \*  $p<0.05$ ).

### Niveles de expresión de genes relacionados con desmielinización en nervio ciático

A pesar de que la ND no es considerada una patología desmielinizante, se ha reportado pérdida de mielina en etapas avanzadas de la enfermedad y en casos de ND muy agresivas (Evangelista, 2018). A nivel de ultraestructura del nervio ciático, los animales diabéticos tratados con vehículo presentaron cambios significativos en el radio G en comparación con animales sanos tratados con

vehículo. Por esta razón, se quiso evaluar la expresión de genes estructurales de la mielina (como PMP22, MBP y MPZ), para poder corroborar una posible desmielinización. También se evaluó la expresión del gen marcador de células de Schwann S100 $\beta$ , y el receptor de NGF (p75<sup>NGFR</sup>), usado como marcador de lesión axonal. Nuestros resultados muestran que sólo existen cambios significativos en la expresión del gen S100 $\beta$  al comparar los animales diabéticos tratados con vehículo frente a los animales sanos tratados con vehículo. Interessantemente, se observa una recuperación parcial en la expresión de S100 $\beta$  en los animales diabéticos tratados con secretoma de MSC preconditionadas con DFX, no así en los tratados con secretoma de MSC no preconditionadas (Fig.7).

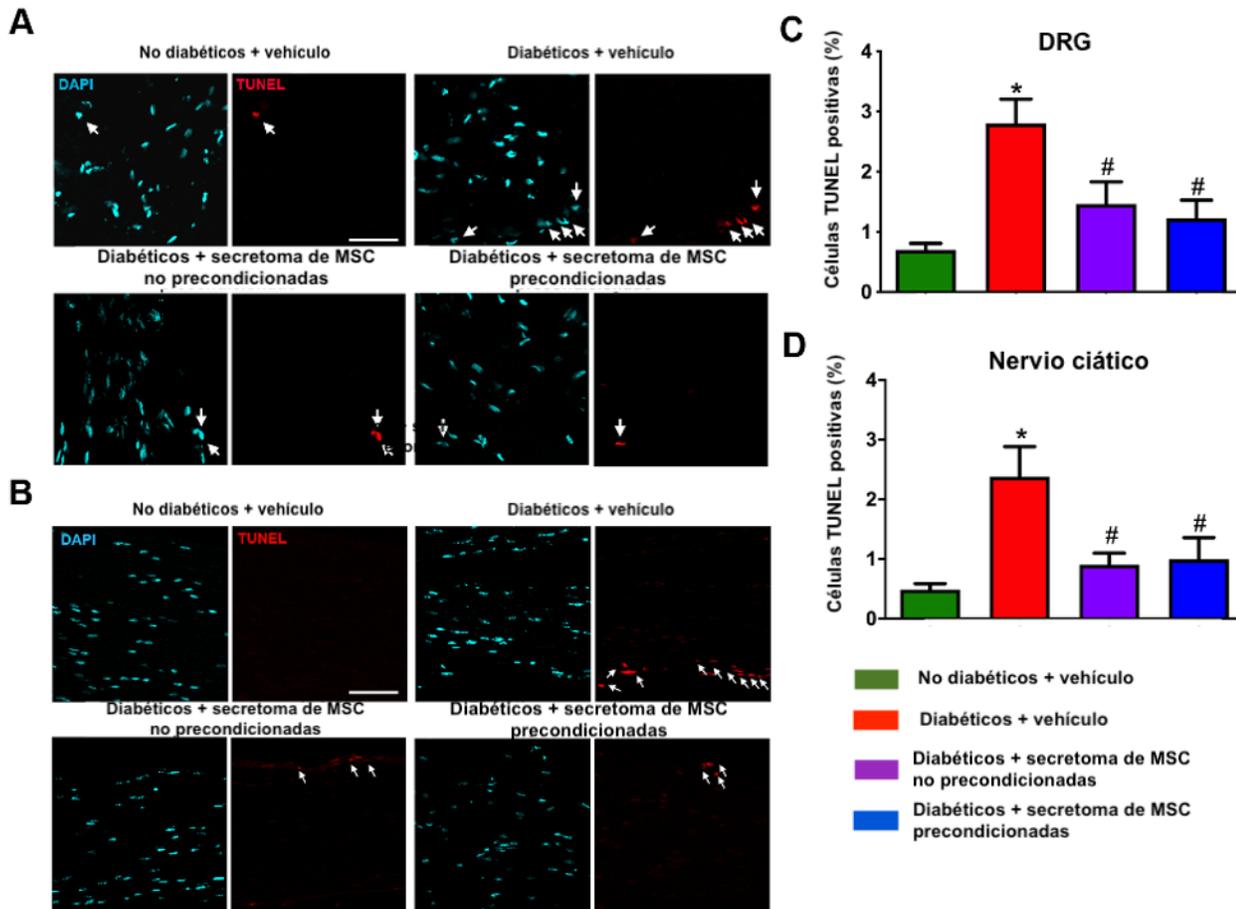


**Figura 7: Determinación de niveles de expresión de marcadores de desmielinización y de células de Schwann en nervio ciático.** Cuantificación de los niveles de mRNA de PMP22, MBP, MPZ, S100 $\beta$  y NGFR en nervios ciáticos de las diferentes condiciones experimentales mediante RT-qPCR. Los datos fueron normalizados contra la expresión del gen constitutivo  $\beta$ -actina. Los datos son presentados como el promedio  $\pm$  S.E.M. (n=6, ANOVA de una vía con Tukey después de la prueba). \* Indica diferencias significativas en comparación con los animales no diabéticos tratados con vehículo. # Indica diferencias significativas en comparación con los animales diabéticos tratados con vehículo.

### Determinación del porcentaje de células TUNEL+ en el nervio ciático y en los DRGs

Se ha descrito que, debido a la alta densidad mitocondrial en neuronas y células de Schwann, estas células se ven afectadas tempranamente por el microambiente oxidativo presente en la DM, lo que resulta en un aumento de la tasa apoptótica (Kalichman, 1998). Para evaluar este parámetro, se realizó el ensayo TUNEL en muestras de DRGs y nervio ciático obtenidos de ratones diabéticos y

no diabéticos y se cuantificó el número de células TUNEL+. Como era de esperar, observamos que los ratones diabéticos tratados con vehículo tuvieron un aumento significativo en el número de células apoptóticas en ambas estructuras en comparación con los ratones no diabéticos de la misma edad (Figura 8A-D). La administración de secretoma derivado de MSC preconditionadas o no preconditionadas redujo significativamente el número de células apoptóticas en DRGs y nervio ciático (Figura 8A-D).

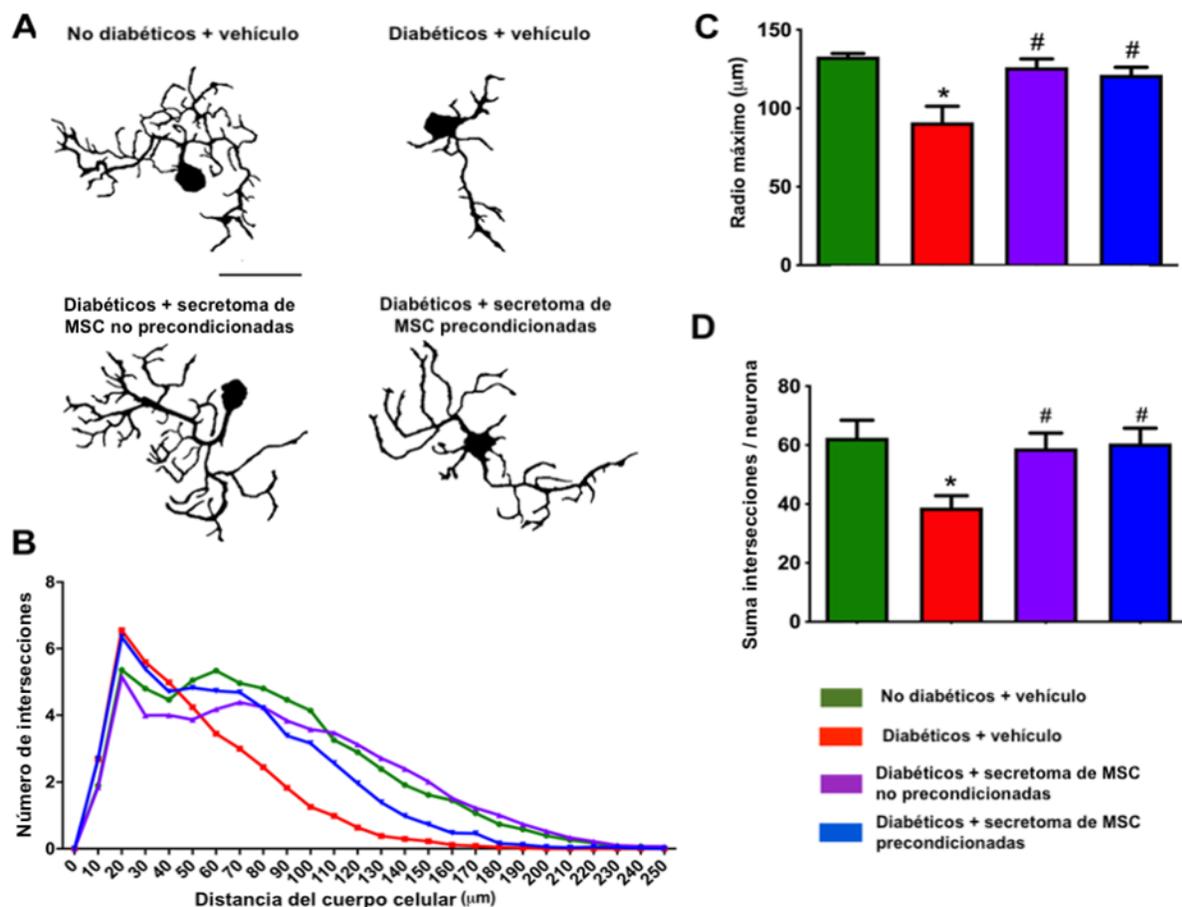


**Figura 8: Determinación de células TUNEL + en DRGs y nervio ciático (A-B)** Imágenes representativas de microscopía confocal mostrando las células TUNEL+ en DRG (A) y nervios ciáticos (B), obtenidos de ratones no diabéticos y diabéticos tratados con vehículo, secretoma derivado de MSC no preconditionadas, o secretoma derivado de MSC preconditionadas con DFX. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Las flechas blancas indican las células TUNEL+. La barra representa 50  $\mu$ m. (C-D) Cuantificación de células TUNEL+ en DRG (C) y nervios ciáticos (D). Los datos se presentan como promedio de células TUNEL+  $\pm$  S.E.M. (n = 6, ANOVA una vía con prueba posterior de Tukey). \* Indica diferencias significativas en comparación con los ratones no diabéticos. # Indica diferencias significativas en comparación con los ratones diabéticos tratados con vehículo.

### **Regeneración de neuritas en cultivos primarios de neuronas de los DRGs**

Existen evidencias clínicas y experimentales que indican que la regeneración axonal en pacientes con ND está altamente alterada (Sango, 2017; Britland, 1990). Para evaluar la contribución del tratamiento de secretoma derivado de MSC en animales diabéticos sobre la respuesta regenerativa en neuronas sensoriales, se obtuvieron neuronas de los DRGs (L3-L5, ganglios que conforman el nervio ciático en ratones) de ratones diabéticos tratados con secretoma derivado de MSC precondicionadas, tratados con secretoma derivado de MSC no precondicionadas, tratados con vehículo y animales sanos, y se sembraron en placas de cultivo para analizar su neuritogénesis, como un sistema simplificado para estudiar la regeneración axonal (Melli, 2010). Después de 40 horas en cultivo en ausencia de factores de crecimiento y SFB, las neuronas de DRGs se fijaron y se tiñeron con el marcador neuronal específico  $\beta$ 3-tubulina, y luego se evaluó la regeneración de neuritas mediante un análisis de Sholl

Observamos que las neuronas de DRGs obtenidas de ratones diabéticos tratados con vehículo mostraron una longitud y ramificación de neuritas reducidas en comparación con las neuronas de ratones no diabéticos, como se observa en el análisis del radio máximo derivado del análisis de Sholl, y el número de intersecciones por neurona, que dan cuenta de parámetros asociados a la longitud neurítica máxima y la ramificación neurítica, respectivamente (Figura 9, B-D). Importantemente, ambos secretomas derivados de MSC no precondicionadas y de MSC precondicionadas con DFX revirtieron completamente el fenotipo de regeneración deteriorado asociado a la condición diabética (Figura 9, A-D).

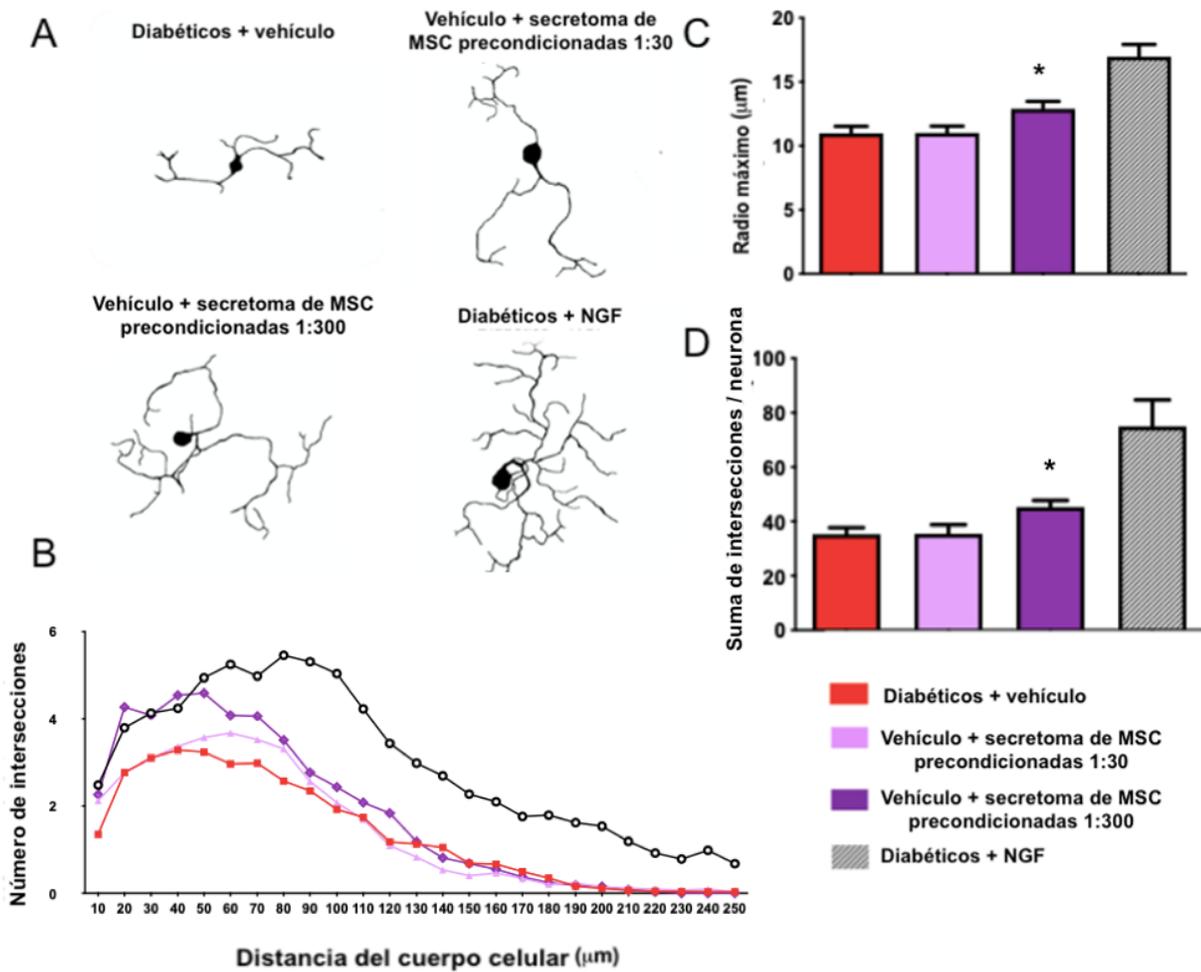


**Figura 9: Evaluación del efecto de la administración de secretoma de MSC sobre la regeneración de neuritas de neuronas de DRGs.** (A) Imágenes binarias (marca de  $\beta 3$ -tubulina) representativas de neuronas de DRGs derivadas de ratones no diabéticos y diabéticos tratados con vehículo, secretoma derivado de MSC no precondicionadas o secretoma derivado de MSC precondicionadas con DFX cultivadas *in vitro*. La barra representa 50  $\mu\text{m}$ . (B) Imagen representativa de análisis de Sholl de neuronas (desviación estándar no se muestra). (C) Cuantificación de radio máximo derivado del análisis de Sholl. (D) Cuantificación del número de intersecciones por neurona derivadas del análisis de Sholl. \*Indica diferencias significativas en comparación con la condición no diabética tratada con vehículo, # indica diferencias significativas en comparación con la condición diabética tratada con vehículo (n=4 cultivos diferentes, 120 neuronas totales analizadas por condición, ANOVA una vía con prueba posterior de Tukey).

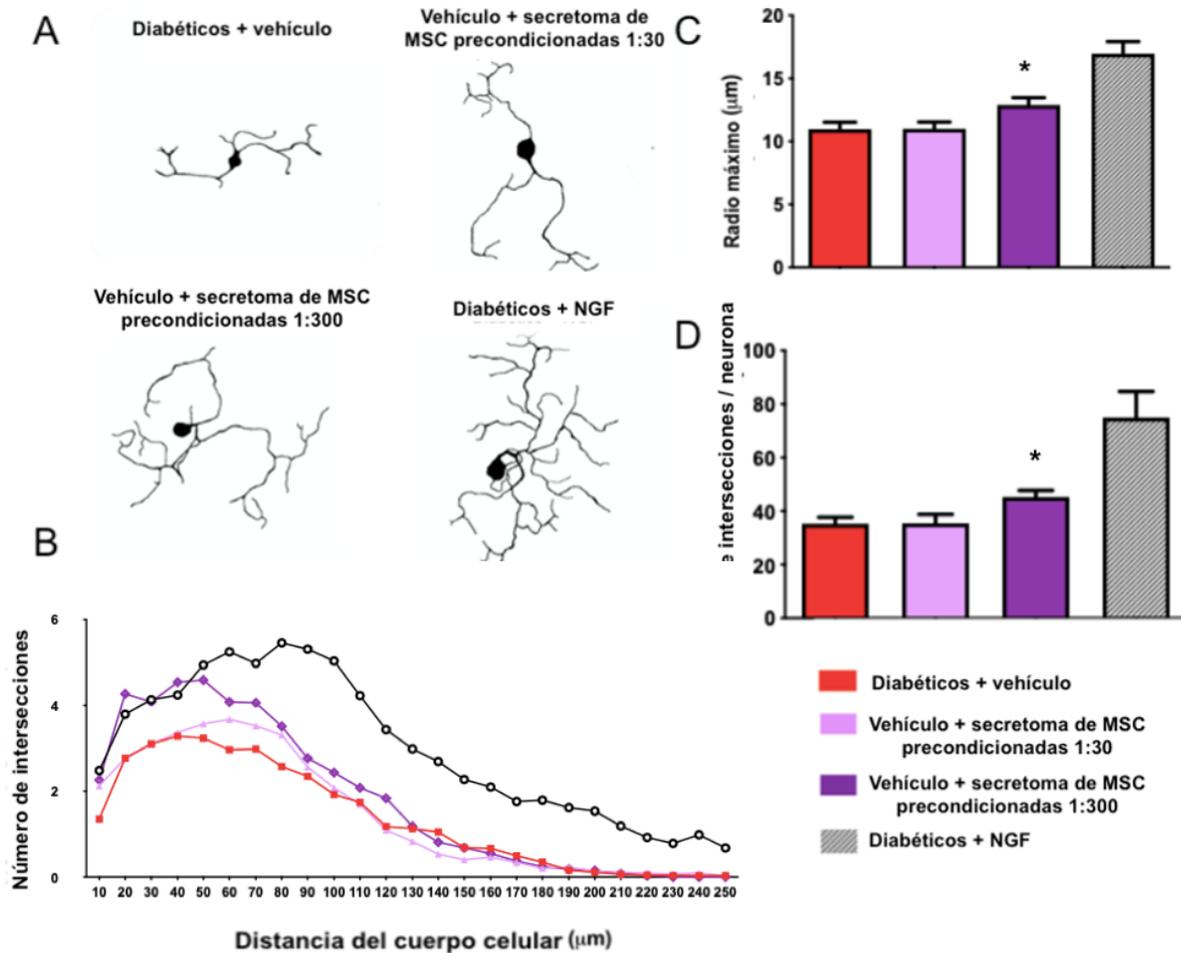
### Efecto del tratamiento *in vitro* de secretoma derivado de MSC en cultivos neuronales de DRGs derivados de animales diabéticos.

A continuación, para poder evaluar si el secretoma tiene un efecto directo sobre la regeneración neurítica en neuronas de animales diabéticos (efecto autónomo celular), realizamos cultivos neuronales de DRG obtenidos de animales diabéticos de 26 semanas de edad sin ningún tratamiento, para luego tratarlos *in vitro* con vehículo o con ambos secretomas en dos concentraciones. Como control positivo de regeneración neurítica utilizamos NGF, el cual ha sido ampliamente descrito como agente neuritogénico en neuronas de sistema nervioso central y

periférico (Powers, 1999). Luego de realizar inmunofluorescencias contra  $\beta$ 3-tubulina, pudimos observar que, en las neuronas de animales diabéticos tratadas con vehículo, existe una regeneración neurítica disminuida en comparación con animales tratados con ambos secretomas (Figura 10A-D). En los análisis de Sholl se puede observar que el tratamiento *in vitro* con secretoma derivado de MSC no precondicionadas logra un mayor efecto en la dilución 1:300 (secretoma derivado de una MSC por cada 300 neuronas en cultivo) en cuanto al radio máximo alcanzado (Figura 10C). En el caso del número de intersecciones por neurona, ambas diluciones del secretoma generaron un efecto similar (Figura 10D). En cuanto al tratamiento *in vitro* con secretoma derivado de MSC precondicionadas con DFX, se pudo observar que el radio máximo alcanzado por las neuronas también es mayor en la dilución 1:300 (Figura 11C) y el número de intersecciones es mayor con la dilución 1:300 del secretoma (Figura 11D).



**Figura 10: Evaluación del tratamiento *in vitro* con secretoma derivado de MSC no preconditionadas en cultivos neuronales de DRGs derivados de animales diabéticos sin tratamiento previo.** (A) Imágenes representativas de neuronas de DRGs derivadas de ratones diabéticos de 26 semanas, tratadas *in vitro* con secretoma de MSCs no preconditionadas en diluciones 1:30 y 1:300. (B) Imagen representativa del análisis de Sholl de neuronas de ratones diabéticos tratadas *in vitro* con secretoma de MSC no preconditionadas (error estándar no se muestra para simplificar la figura). (C) Cuantificación del radio máximo derivado del análisis de Sholl. (D) Cuantificación del número de intersecciones por neurona derivadas del análisis de Sholl. (n=4 cultivos diferentes, 90 neuronas totales analizadas por condición, ANOVA una vía con prueba posterior de Tukey, \* indica diferencias significativas en comparación con diabéticos tratados con vehículo. Grupo de diabéticos tratados con NGF no se consideró en los análisis estadísticos).



**Figura 11: Evaluación del tratamiento *in vitro* con secretoma derivado de MSC preconicionadas con DFX en cultivos neuronales de DRGs derivados de animales diabéticos sin tratamiento previo.** (A) Imágenes representativas de neuronas de DRGs derivadas de ratones diabéticos de 26 semanas, tratadas *in vitro* con secretoma de MSC preconicionadas con DFX en diluciones 1:30 y 1:300. (B) Imagen representativa del análisis de Sholl de neuronas de ratones diabéticos tratadas *in vitro* con secretoma derivado de MSC preconicionadas con DFX (error estándar no se muestra para simplificar la figura). (C) Cuantificación del radio máximo derivado del análisis de Sholl. (D) Número de intersecciones por neurona derivadas del análisis de Sholl. (n=4 cultivos diferentes, 90 neuronas totales analizadas por condición, ANOVA una vía con prueba posterior de Tukey \* indica diferencias significativas en comparación con diabéticos tratados con vehículo. Grupo de diabéticos tratados con NGF no se consideró en los análisis estadísticos).

## **DISCUSIÓN**

La ND se ha descrito como una complicación clínica de la DM que evoluciona desde alteraciones funcionales en las primeras fases de la enfermedad hasta cambios estructurales e histológicos en etapas avanzadas (Boucek, 2006). En este trabajo se probó si la administración sistémica de secretoma de MSC no precondicionadas o precondicionadas con DFX, logra evitar la progresión de la ND en animales que ya presentan características de la patología (administración a partir de la semana 18 de edad), enfocándonos en los principales parámetros estructurales asociados a esta enfermedad. Adicionalmente, analizamos si el tratamiento con secretomas derivados de MSC recupera la capacidad de regeneración de neuritas en neuronas sensitivas, uno de los defectos funcionales mejor caracterizados de las neuronas de pacientes diabéticos y de modelos experimentales.

Para ello se utilizó uno de los modelos animales más robustos para el estudio de la DMT2, que incluye entre sus características la presencia de los principales marcadores de ND que han sido identificados en humanos. Por ello, el animal BKS db/db se considera un modelo de gran utilidad para poder entender los mecanismos moleculares asociados a la patología, como también para probar nuevos tratamientos que en un futuro podrían escalar a ser evaluados en humanos (Sullivan, 2007; De Gregorio, 2018). Por su parte, en este modelo animal, entre la semana 18 y la 26 de edad se presentan las principales características fisiológicas y estructurales de la ND, por lo que elegimos esta ventana temporal para realizar el tratamiento con secretoma (De Gregorio, 2018).

### **Degeneración axonal a nivel estructural en nervio ciático**

El nervio ciático ha sido ampliamente usado como modelo para estudiar trastornos del sistema nervioso periférico, y se ha reportado previamente tanto en pacientes (Behse, 1977) como en modelos animales de ND (Campero 2015; De Gregorio, 2018) que existe una disminución en las fibras axonales de mayor tamaño (diámetro  $>12\mu\text{m}$ ) en etapas avanzadas de la enfermedad. Interesantemente, la pérdida de estas fibras de mayor diámetro es completamente evitada cuando los animales son tratados tanto con secretoma de MSC no precondicionadas como también en los animales tratados con secretoma de MSC precondicionadas con DFX. Este hallazgo resulta fisiológicamente relevante, ya que las fibras nerviosas de mayor diámetro son también las fibras más largas y se caracterizan por tener un bajo umbral eléctrico y una alta velocidad de conducción (Trevillion, 2010). En animales diabéticos, al existir pérdida de estas fibras, se ve afectada la

electrofisiología de la transmisión eléctrica, siendo este uno de los factores que contribuye a la degeneración axonal y a la pérdida de la sensibilidad. Además, también se ha descrito en este mismo modelo animal que existe un aumento en el porcentaje de fibras de menor diámetro (Campero, 2015; De Gregorio, 2018), lo cual también fue posible observar en los animales diabéticos tratados con vehículo al comparar con los animales sanos. Al comparar el efecto de ambos secretomas, se pudo observar que tanto el secretoma de MSC sin precondicionar como el secretoma de MSC precondicionadas con DFX, lograron evitar completamente la pérdida de las fibras grandes, no existiendo diferencias significativas entre el efecto de ambos. Al analizar la densidad total de fibras por área ( $\text{mm}^2$ ), no se obtuvieron diferencias significativas entre las diferentes condiciones experimentales. Lo que puede deberse a que las alteraciones son específicas para las fibras grandes, las cuales constituyen sólo un porcentaje reducido de las fibras totales.

En cuanto a la ultraestructura del nervio ciático, en nuestros resultados pudimos detectar un valor significativamente mayor en el radio G de fibras pequeñas en animales diabéticos tratados con vehículo en comparación con animales no diabéticos, esto sugiere que estas fibras pequeñas están en un proceso de desmielinización/remielinización (Wright, 1994). De acuerdo con esto, se puede pensar que este estadio de la enfermedad no se pueden evidenciar signos de desmielinización en fibras de mayor diámetro, y quizás en un estado más avanzado de la enfermedad si se observe disminución en la capa de mielina de estas fibras, como se ha descrito en otros trabajos (Thomas, 1990). El fenómeno de desmielinización observado en fibras de menor diámetro indica que las fibras pequeñas son más susceptibles a perder proteínas de mielina en un estado de hiperglicemia. En este sentido, previamente se ha reportado que la hiperglicemia afecta la mielinización en cultivos neuronales de ratas embrionarias, retrasando la maduración y engrosamiento de la capa de mielina (Wright, 1994). En este caso se puede observar que la hiperglicemia también puede afectar a axones de ratones maduros, afectando en un principio la capa de mielina de fibras pequeñas.

### **Niveles de expresión de genes de mielina en nervio ciático**

En modelos de DM se han reportado disminución en la expresión de genes de mielina y marcadores de células de Schwann, como también en la cantidad de proteínas estructurales de la mielina en nervio ciático (Celiknilek, 2014). En este trabajo no fue posible detectar diferencias significativas en la expresión de los genes más importantes para la formación de la mielina (MBP, PMP22, MPZ)

en el nervio ciático de los diferentes grupos experimentales. Sin embargo, logramos detectar cambios entre animales sanos y diabéticos en la expresión del gen que codifica para la proteína S100 $\beta$ , la cual es una proteína de unión a calcio que se expresa principalmente en células de Schwann y atrociitos, por ello, es utilizado como marcador indirecto de desmielinización, por ejemplo, para tumores periféricos de la vaina nerviosa o patologías donde se observa muerte de las células de Schwann (Helbok, 2018; Celiknilek, 2014). Interesantemente, los niveles de mRNA de S100 $\beta$  se recuperaron parcialmente sólo en el grupo experimental de animales diabéticos tratados con secretoma derivado de MSC precondicionadas con DFX. Hubiera sido interesante medir los niveles de proteínas de mielina en el nervio ciático, ya que si bien no detectamos cambios en la expresión de los genes relacionados con la mielinización, las proteínas podrían estar sufriendo alteraciones que finalmente terminen en su degradación. En este sentido, se ha reportado que proteínas de la mielina son susceptibles a la glicación y a la oxidación por el aumento de ROS en la ND, esto altera su antigenicidad, haciéndolas vulnerables al ataque de células del sistema inmune (Tang, 2013). De esta forma, se podría explicar la disminución en el grosor de la capa de mielina (aumento de radio G) observado por microscopia electrónica en el nervio ciático.

### **Disminución de células apoptóticas en los DRGs y nervio ciático**

El aumento del estrés oxidativo producto de la hiperglicemia, conduce a la activación de la vía de la poli ADP-ribosa polimerasa (PARP), que es responsable de regular la expresión de citoquinas proinflamatorias (Vincent, 2011). Esto crea un estado inflamatorio crónico que ejerce un efecto tóxico directo sobre las neuronas y las células de Schwann, induciendo la apoptosis. Este proceso acelera la desmielinización y la atrofia de las fibras nerviosas y contribuye al dolor crónico característico de los pacientes con ND (Vincent, 2011). En este estudio se pudo observar que el porcentaje de células TUNEL<sup>+</sup> disminuyó en los DRGs y en el nervio ciático en los animales tratados con secretoma de MSC precondicionadas y no precondicionadas, en comparación con los animales diabéticos tratados con vehículo. Sin embargo, tampoco se logró observar una diferencia significativa al comparar los efectos de ambos secretomas.

Debido a la metodología utilizada, no se puede asegurar que la totalidad de las células TUNEL<sup>+</sup> sean neuronas o células de Schwann. Para ello se debería haber realizado una inmunofluorescencia doble, marcando por ejemplo  $\beta$ 3-tubulina para neuronas y alguna proteína de la mielina para las células de Schwann. De esta forma se podría haber asegurado que las células TUNEL<sup>+</sup> son

realmente neuronas o células de Schwann. Incluso se podría haber identificado si alguna población neuronal estaba particularmente afectada, utilizando marcadores de subpoblaciones neuronales. Además, hubiera sido útil poder comprobar la muerte por apoptosis mediante un segundo ensayo, por ejemplo, mediante activación de caspasa 3 o visualizando degradación del ADN de forma escalonada mediante ensayos bioquímicos.

### **Regeneración neurítica en animales tratados con secretoma de forma sistémica**

Los DRGs son estructuras situadas en los agujeros intervertebrales de la columna vertebral, que contienen los somas de las células neuronales sensoriales pseudo-unipolares que inervan los órganos periféricos, por lo que constituyen un sitio importante para observar los cambios fisiopatológicos que conducen al dolor neuropático (Sapunar, 2012). Las neuronas de DRGs son uno de los componentes de sistema nervioso sensorial periférico más vulnerable en la ND, debido a esto, las neuronas de los DRGs cultivadas *in vitro* se han utilizado para estudiar el desarrollo, la función y la regeneración de las neuronas sensoriales (Kim, 2004), para ayudar en el descubrimiento de fármacos y para dilucidar los mecanismos subyacentes a los trastornos nerviosos periféricos, como en el caso de la ND (Gumy, 2008). Es importante destacar que las neuronas sensoriales cultivadas *in vitro* conservan fielmente las características de las neuronas *in vivo* y reflejan la población diversa de células del DRG en el momento de la disección (Baccaglini, 1983). Los cultivos primarios de neuronas de los DGRs de roedores son ampliamente utilizados para el estudio de la ND, estos cultivos pueden realizarse desde modelos animales en estadios embrionarios e inducir un estrés incubándolos con una alta concentración de glucosa o aislarse desde un modelo de animal diabético adulto, como en este trabajo. En este caso, los cultivos de neuronas fueron ocupados como modelo de regeneración neurítica, ya que al extraer los DRGs, se cortan sus ramas axonales, por lo que todas las neuritas crecen *de novo* en el pocillo de cultivo. Para evitar sesgos en los tratamientos utilizados, las neuronas fueron cultivadas en ausencia de factores de crecimiento. Debido a que a las 72 horas comienzan a formarse redes neuronales y es más difícil identificar la morfología de neuronas individuales, decidimos analizar la morfología a las 48 horas de cultivo.

En los cultivos se ocupó AraC como inhibidor de la mitosis para disminuir la presencia de células no neuronales, pero, aún así, en los cultivos existe presencia de otros tipos celulares como

fibroblastos y células de Schwann. Sin embargo, el uso de  $\beta$ 3-tubulina, nos permitió hacer el análisis centrándonos sólo en neuronas.

El análisis de Sholl es un método de análisis cuantitativo comúnmente utilizado en estudios neuronales para analizar diversas características morfológicas de una neurona a partir de imágenes de microscopía (Sholl, 1953). En este estudio, utilizamos este método para determinar el número de intersecciones con los anillos del Sholl, como un método de cuantificar la arborización neurítica, y además identificamos el radio de Sholl más externo alcanzado por cada neurona, como una medida indirecta de la longitud neurítica máxima.

De acuerdo con lo observado en los cultivos de neuronas de los DRGs, podemos afirmar que las neuronas de animales diabéticos tienen afectada la regeneración de neuritas y que ambos secretomas lograron recuperar de forma similar el radio máximo y el total de la suma de intersecciones. Nuevamente, no se observa un efecto potenciado del secretoma de MSC precondicionadas con DFX respecto al secretoma de MSC sin precondicionar.

### **Tratamiento *in vitro* con secretoma en cultivos neuronales de animales diabéticos**

Por último, para entender si el efecto del secretoma sobre los DRGs es autónomo celular, realizamos el tratamiento con secretoma *in vitro* en cultivos de neuronas de los DRGs de animales diabéticos no tratados. Al comparar los cultivos neuronales de los tratamientos con secretoma *in vivo* e *in vitro*, se puede apreciar que en general el efecto logrado por el secretoma administrado *in vivo* es más potente que el observado al administrar el secretoma *in vitro* ya que las primeras alcanzan un radio máximo y un número de intersecciones mayor al que se observa con el tratamiento a las neuronas con secretoma *in vitro*, por lo que se puede postular que el efecto en la mejora de la regeneración de neuritas logrado por el secretoma es tanto directo como indirecto. De esta forma, el secretoma tendría un efecto directo sobre las neuronas de los DRG, pero también podría actuar sobre células que dan soporte a estas, como, por ejemplo, sobre las células de Schwann.

Por otra parte, en ambos secretomas se logra una tendencia a un mayor efecto en la dilución 1:300 (secretoma derivado de 1 MSC para 300 neuronas en cultivo), esto se puede interpretarse como que en una concentración muy alta de secretoma la presencia de moléculas perjudiciales para el efecto regenerativo es muy alta (moléculas proinflamatorias), lo que se pierde diluyendo la dosis a una concentración menor.

## **Precondicionamiento de MSC**

Anteriormente se había descrito que el precondicionamiento de MSC, mediante incubación con un agente tóxico en concentración sub-letal, es capaz de generar un estrés en las células haciendo que estas secreten moléculas necesarias para disminuir este daño. De esta forma, mediante el precondicionamiento de las MSC con el agente mimético de hipoxia DFX, es posible lograr aumentar la secreción de factores que pueden ser útiles para tratar la ND. El uso de DFX en comparación con otros agentes generadores de hipoxia, como cloruro de cobalto, tiene sus ventajas, ya que la DFX además de ser uno de los más potentes inductores de hipoxia en forma química, se encuentra aprobado por la FDA y ha sido ampliamente usado para tratar intoxicaciones por hierro. El cloruro de cobalto, en cambio, podría no resultar tan inocuo para las células, y al realizar la traslación a la clínica, podrían quedar trazas de este compuesto que podrían ejercer efectos tóxicos en los pacientes. Existen reportes que indican que el cloruro de cobalto puede interferir con el ciclo celular e inducir la expresión de genes de apoptosis (Bae S., 2012).

De acuerdo con nuestros resultados, ambos secretomas revirtieron de manera similar y muy potente la progresión de la mayoría de las alteraciones estructurales características de la ND a nivel de nervio ciático y de los DRGs, ya que en la mayoría de los parámetros analizados no se observaron diferencias significativas entre el efecto de ambos secretomas. Una posibilidad para poder explicar esto, sería que la dosis de secretoma que se administró a los animales sea demasiado alta, y por ello, la mayor expresión de las moléculas terapéuticas presentes en el secretoma derivado de MSC precondicionadas podría ser irrelevante si estas se encuentran en exceso. En este sentido, queda por determinar si en dosis menores de secretoma se pueden observar diferencias en la eficacia terapéutica de ambos biofármacos,

Mediante análisis proteómico se pudo observar que la mayoría de las moléculas se comparten entre ambos secretomas (datos no mostrados), entre estas moléculas, se observó que principalmente factores proangiogénicos como VEGF están diferencialmente sobreexpresados en el secretoma precondicionado con DFX. De acuerdo con esto, el secretoma precondicionado puede tener un mayor efecto en el proceso angiogénico que el secretoma de MSC no precondicionado, mejorando por ejemplo el proceso de proliferación y migración de células endoteliales. De acuerdo con esto, puede ser que el efecto observado entre ambos secretomas en este trabajo, a nivel de nervio ciático y neuronas de los DRG, puede no ser tan diferencial, pero si al analizar otras alteraciones asociadas a la ND no cubiertas en el presente trabajo.

### **Proyecciones del uso de secretoma de MSC**

En comparación con la administración de un “coctel” de múltiples moléculas recombinantes, la estrategia de administrar secretoma derivado de MSC tiene la ventaja de que todos los factores deseados son producidos por las mismas células, reduciendo el alto costo asociado a la industria de fármacos de proteínas recombinantes.

En cuanto al escalamiento de su uso como tratamiento para la ND en pacientes humanos, debería tenerse ciertas consideraciones de bioseguridad. Se ha reportado que en la retinopatía diabética, otra complicación de la DM, se produce una neoformación de vasos sanguíneos en la parte posterior del ojo, comandada por una secreción anormalmente elevada de factores proangiogénicos como VEGF (Martinez-Zapata, 2014). Al utilizar el secretoma derivado de MSC preconditionado con DFX de forma sistémica, habría que tener en consideración esto, ya que podría acelerar los problemas de visión que pueden llegar a desarrollar estos pacientes, por la alta concentración de VEGF presente en este biofármaco.

## CONCLUSIONES

En el presente estudio se pudo demostrar que la administración sistémica de secretoma derivado de MSC preconditionadas con DFX o de MSC no preconditionadas revierte las principales alteraciones estructurales características de la ND, ya que:

- Logró reducir la degeneración axonal evitando la pérdida de fibras axonales de mayor calibre ( $>12\ \mu\text{m}$  de diámetro) en el nervio ciático.
- Disminuyó el número de células TUNEL+ en el nervio ciático y en los DGRs.
- Disminuyó la pérdida de mielina en fibras pequeñas en el nervio ciático.
- Mejoró la regeneración neurítica en los cultivos de neuronas de DRGs *in vitro*.

En cuanto al preconditionamiento de las MSC con DFX, no se logró observar un efecto más potente en comparación con el secretoma de MSC sin preconditionar, sin embargo, no se puede descartar que el secretoma pueda tener un efecto diferencial cuando se utiliza en dosis menores.

## REFERENCIAS

Angoulvant, D., Ivanov, F., Ferrera, R., Matthews, P. G., Nataf, S., & Ovize, M. (2011). Mesenchymal stem cell conditioned media attenuates in vitro and ex vivo myocardial reperfusion injury. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 30(1), 95-102.

Argoff, C. E., Backonja, M. M., Belgrade, M. J., Bennett, G. J., Clark, M. R., Cole, B. E., McLean, M. J. (2006). Consensus guidelines: treatment planning and options. In *Mayo Clinic Proceedings*, 81(4), S12-S25.

Baccaglini, P. I., & Hogan, P. G. (1983). Some rat sensory neurons in culture express characteristics of differentiated pain sensory cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(2), 594-598.

Bae, S., Jeong, H. J., Cha, H. J., Kim, K., Choi, Y. M., An, I. S., ... & An, S. (2012). The hypoxia-mimetic agent cobalt chloride induces cell cycle arrest and alters gene expression in U266 multiple myeloma cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 30(5), 1180-1186.

Behse, F., Buchthal, F., & Carlsen, F. (1977). Nerve biopsy and conduction studies in diabetic neuropathy. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 40(11), 1072-1082.

Boucek, P. (2006). Advanced diabetic neuropathy: a point of no return?. *The Review of Diabetic Studies*, 3(3), 143.

Boulton, A. J., Vinik, A. I., Arezzo, J. C., Bril, V., Feldman, E. L., Freeman, R., & Ziegler, D. (2005). Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 28(4), 956-962.

Britland, S. T., Young, R. J., Sharma, A. K., & Clarke, B. F. (1990). Association of painful and painless diabetic polyneuropathy with different patterns of nerve fiber degeneration and regeneration. *Diabetes*, 39(8), 898-908.

Campero, M., Ezquer, M., & Ezquer, F. (2015). Nerve excitability and structural changes in myelinated axons from diabetic mice. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 123(08), 485-491.

Bunge, R. P. (1993). Expanding roles for the Schwann cell: ensheathment, myelination, trophism and regeneration. *Current Opinion in Neurobiology*, 3(5), 805-809.

Caplan A, et al. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98:1076-1084.

Caplan, A. I., & Dennis, J. E. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98(5), 1076-1084.

Celikbilek, A., Akyol, L., Sabah, S., Tanik, N., Adam, M., Celikbilek, M., & Yilmaz, N. (2014). S100B as a glial cell marker in diabetic peripheral neuropathy. *Neuroscience Letters*, 558, 53-57.

- Coppey, L. J., Gellett, J. S., Davidson, E. P., Dunlap, J. A., Lund, D. D., & Yorek, M. A. (2001). Effect of antioxidant treatment of streptozotocin-induced diabetic rats on endoneurial blood flow, motor nerve conduction velocity, and vascular reactivity of epineurial arterioles of the sciatic nerve. *Diabetes*, 50(8), 1927-1937.
- De Gregorio, C., Contador, D., Campero, M., Ezquer, M., & Ezquer, F. (2018). Characterization of diabetic neuropathy progression in a mouse model of type 2 diabetes mellitus. *Biology Open*, 7(9).
- Feldman, E. L., Callaghan, B. C., Pop-Busui, R., Zochodne, D. W., Wright, D. E., Bennett, D. L., & Viswanathan, V. (2019). Diabetic neuropathy. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 1-18.
- Feldman, E. L., Nave, K. A., Jensen, T. S., & Bennett, D. L. (2017). New horizons in diabetic neuropathy: mechanisms, bioenergetics, and pain. *Neuron*, 93(6), 1296-1313.
- Fernyhough, P. (2015). Mitochondrial dysfunction in diabetic neuropathy: a series of unfortunate metabolic events. *Current Diabetes Reports*, 15(11), 89.
- Figueroa-Romero, C., Sadidi, M., & Feldman, E. L. (2008). Mechanisms of disease: the oxidative stress theory of diabetic neuropathy. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 9(4), 301-314.
- Frausin, S., Viventi, S., Falzacappa, L. V., Quattromani, M. J., Leanza, G., Tommasini, A., & Valencic, E. (2015). Wharton's jelly derived mesenchymal stromal cells: Biological properties, induction of neuronal phenotype and current applications in neurodegeneration research. *Acta Histochemica*, 117(4-5), 329-338.
- Gharravi, A. M., Jafar, A., Ebrahimi, M., Mahmodi, A., Pourhashemi, E., Haseli, N., ... & Hajiasgarli, P. (2018). Current status of stem cell therapy, scaffolds for the treatment of diabetes mellitus. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 12(6), 1133-1139.
- Goyal, R., & Jialal, I. (2018). Diabetes mellitus, type 2. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Gumy, L. F., Bampton, E. T., & Tolkovsky, A. M. (2008). Hyperglycaemia inhibits Schwann cell proliferation and migration and restricts regeneration of axons and Schwann cells from adult murine DRG. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 37(2), 298-311.
- Harcourt, B. E., Penfold, S. A., & Forbes, J. M. (2013). Coming full circle in diabetes mellitus: from complications to initiation. *Nature Reviews Endocrinology*, 9(2), 113.
- Helbok, R., & Beer, R. (2018). Cerebrospinal fluid and brain extracellular fluid in severe brain trauma. In *Handbook of Clinical Neurology*, 146, 237-258.
- Jessen, K. R., & Mirsky, R. (2005). The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(9), 671-682.

- Kalichman, M. W., Powell, H. C., & Mizisin, A. P. (1997). Reactive, degenerative, and proliferative Schwann cell responses in experimental galactose and human diabetic neuropathy. *Acta Neuropathologica*, 95(1), 47-56.
- Kim, W. S., Park, B. S., Kim, H. K., Park, J. S., Kim, K. J., Choi, J. S., & Sung, J. H. (2008). Evidence supporting antioxidant action of adipose-derived stem cells: protection of human dermal fibroblasts from oxidative stress. *Journal of Dermatological Science*, 49(2), 133-142.
- Kim, B. J., Jin, H. K., & Bae, J. S. (2011). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve the functioning of neurotrophic factors in a mouse model of diabetic neuropathy. *Laboratory Animal Research*, 27(2), 171-176.
- Kim, J. E., Liu, B. P., Park, J. H., & Strittmatter, S. M. (2004). Nogo-66 receptor prevents raphespinal and rubrospinal axon regeneration and limits functional recovery from spinal cord injury. *Neuron*, 44(3), 439-451.
- Naruse, K. (2019). Schwann Cells as Crucial Players in Diabetic Neuropathy. In Springer, Singapore, 345-356.
- Naruse, K., Sato, J., Funakubo, M., Hata, M., Nakamura, N., Kobayashi, Y., ... & Matsubara, T. (2011). Transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells improves mechanical hyperalgesia, cold allodynia and nerve function in diabetic neuropathy. *PloS One*, 6(11).
- Naruse, K., Nakamura, J., Hamada, Y., Nakayama, M., Chaya, S., Komori, T., ... & Hotta, N. (2000). Aldose reductase inhibition prevents glucose-induced apoptosis in cultured bovine retinal microvascular pericytes. *Experimental Eye Research*, 71(3), 309-315.
- Martinez-Zapata, M. J., Martín Carvajal, A. J., Sola, I., Pijoan, J. I., BuilCalvo, J. A., Cordero, J. A., & Evans, J. R. (2014). Anti-vascular endothelial growth factor for proliferative diabetic retinopathy. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (11).
- Melli, G., & Höke, A. (2009). Dorsal root ganglia sensory neuronal cultures: a tool for drug discovery for peripheral neuropathies. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 4(10), 1035-1045.
- Mizisin, A. P., Shelton, G. D., Wagner, S., Rusbridge, C., & Powell, H. C. (1998). Myelin splitting, Schwann cell injury and demyelination in feline diabetic neuropathy. *Acta Neuropathologica*, 95(2), 171-174.
- Mizukami, H., & Yagihashi, S. (2014). Exploring a new therapy for diabetic polyneuropathy the application of stem cell transplantation. *Frontiers in Endocrinology*, 5, 45.
- Oses, C., Olivares, B., Ezquer, M., Acosta, C., Bosch, P., Donoso, M., & Ezquer, F. (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).

- Powers, J. F., Shahsavari, M., Tsokas, P., & Tischler, A. S. (1999). Nerve growth factor receptor signaling in proliferation of normal adult rat chromaffin cells. *Cell and Tissue Research*, 295(1), 21-32.
- Rubio, D., Garcia, S., Paz, M. F., De la Cueva, T., Lopez-Fernandez, L. A., Lloyd, A. C., & Bernad, A. (2008). Molecular characterization of spontaneous mesenchymal stem cell transformation. *PLoS One*, 3(1).
- Rumora, A. E., Lentz, S. I., Hinder, L. M., Jackson, S. W., Valesano, A., Levinson, G. E., & Feldman, E. L. (2018). Dyslipidemia impairs mitochondrial trafficking and function in sensory neurons. *The FASEB Journal*, 32(1), 195-207.
- Salgado, A., L Reis, R., Sousa, N., & M Gimble, J. (2010). Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 5(2), 103-110.
- Sango K, Mizukami H, Horie H, Yagihashi S (2017). Impaired Axonal Regeneration in Diabetes. Perspective on the Underlying Mechanism from In Vivo and In Vitro Experimental Studies. *Frontiers in Endocrinology*. 8:12.
- Sapunar, D., Kostic, S., Banozic, A., & Puljak, L. (2012). Dorsal root ganglion—a potential new therapeutic target for neuropathic pain. *Journal of Pain Research*, 5, 31.
- Sharghi-Namini, S., Turmaine, M., Meier, C., Sahni, V., Umehara, F., Jessen, K. R., & Mirsky, R. (2006). The structural and functional integrity of peripheral nerves depends on the glial-derived signal desert hedgehog. *Journal of Neuroscience*, 26(23).
- Sholl D. A. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *Journal of anatomy*, 87(4), 387–406.
- Singh, V. P., Bali, A., Singh, N., & Jaggi, A. S. (2014). Advanced glycation end products and diabetic complications. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 18(1), 1-14.
- Snyder, R. J., & Hanft, J. R. (2009). Diabetic foot ulcers—effects on quality of life, costs, and mortality and the role of standard wound care and advanced-care therapies in healing: a review. *Ostomy/wound management*, 55(11), 28.
- Song, L., & Tuan, R. S. (2004). Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *The FASEB Journal*, 18(9), 980-982.
- Sullivan, K. A. Hayes JM, Wiggin TD, Backus C, Su Oh S, Lentz SI, Brosius F., Feldman EL (2007). Mouse models of diabetic neuropathy. *Neurobiol Dis*, 28, 276-285.
- Tabish, S. A. (2007). Is diabetes becoming the biggest epidemic of the twenty-first century?. *International Journal of Health Sciences*, 1(2).

Tan, Sin Yee, et al (2019). Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews* 13.1: 364-372.

Tang W, et al. (2013) CD8(+) T cell-mediated cytotoxicity toward Schwann cells promotes diabetic peripheral neuropathy. *Cell Physiol Biochem* 32:827- 837.

Thomas, P. K., Fraher, J. P., O'Leary, D., Moran, M. A., Cole, M., & King, R. H. M. (1990). Relative growth and maturation of axon size and myelin thickness in the tibial nerve of the rat. *Acta neuropathologica*, 79(4), 375-386.

Trevillion L, Howells J, Bostock H, Burke D (2010). Properties of low-threshold motor axons in the human median nerve. *The Journal of Physiology*, 588:2503-15.

Viader, A., Sasaki, Y., Kim, S., Strickland, A., Workman, C. S., Yang, K., & Milbrandt, J. (2013). Aberrant Schwann cell lipid metabolism linked to mitochondrial deficits leads to axon degeneration and neuropathy. *Neuron*, 77(5), 886-898.

Vincent, A. M., Russell, J. W., Low, P., & Feldman, E. L. (2004). Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocrine Reviews*, 25(4), 612-628.

Vincent, A. M., Callaghan, B. C., Smith, A. L., & Feldman, E. L. (2011). Diabetic neuropathy: cellular mechanisms as therapeutic targets. *Nature Reviews Neurology*, 7(10), 573.

Waxman, S. G., & Bennett, M. V. (1972). Relative conduction velocities of small myelinated and non-myelinated fibres in the central nervous system. *Nature New Biology*, 238(85), 217-219.

Wright, A., & Nukada, H. (1994). Sciatic nerve morphology and morphometry in mature rats with streptozocin-induced diabetes. *Acta Neuropathologica*, 88(6), 571-578.

Yasuda H, Terada M, Maeda K, Kogawa S, Sanada M, Haneda M (2003). Diabetic neuropathy and nerve regeneration. *Progress in Neurobiology*; 69: 229-85

Yu, S. P., Wei, Z., & Wei, L. (2013). Preconditioning strategy in stem cell transplantation therapy. *Translational Stroke Research*, 4(1), 76-88.

Ziegler, D., Low, P. A., Litchy, W. J., Boulton, A. J., Vinik, A. I., Freeman, R., ... & Schütte, K. (2011). Efficacy and safety of antioxidant treatment with  $\alpha$ -lipoic acid over 4 years in diabetic polyneuropathy: the NATHAN 1 trial. *Diabetes Care*, 34(9), 2054-2060.