



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

Secretoma de células madre mesenquimáticas humanas como tratamiento antioxidante y antinflamatorio de microglías de rata expuestas a opioides

Esteban Ariel Rodríguez Sanhueza

MEMORIA DE TÍTULO PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIOQUÍMICO

Director de Tesis

Dr. Fernando Ezquer
Centro de Medicina Regenerativa
Facultad de Medicina
Universidad del Desarrollo

Profesor Patrocinante de Tesis

Dr. Alfonso Paredes Vargas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Co-Director de Tesis

Dr. Pablo Berrios Cárcamo
Centro de Medicina Regenerativa
Facultad de Medicina
Universidad del Desarrollo

Agradecimientos

En primer lugar a mi familia, en especial a mi madre, por su constante apoyo y preocupación. A Valentina, por ser un pilar y la mejor compañera durante la mayor parte del periodo de mi formación académica. A mis amigos y compañeros de carrera, los que se perdieron en el camino y los que me acompañaron en él.

A todo el equipo de trabajo del CMR, que hicieron posible la gestión técnica y logística detrás de esta investigación. A Mati, Verito, Mauri, Simón, Lore, Vivi, Dani, Diego, Edu, Orlando y todos con quienes compartí, por generar un ambiente grato y ameno durante mi estadía en el laboratorio.

Al Dr. Pablo Berríos, cuyo apoyo y entrega constantes, fueron cruciales en la realización de este estudio. Al Dr. Fernando Ezquer, por guiar el proyecto y facilitar todas las condiciones para la realización de esta Memoria.

Una mención especial a Alexandra Elbakyan, por su contribución a la divulgación y al libre acceso del conocimiento científico.

Financiamiento

Esta Memoria de título fue financiada mediante el proyecto FONDECYT 1200287 “Opioid addiction and associated cognitive damage: Inhibition by intranasal mesenchymal stem cell secretome administration”, a cargo del Dr. Fernando Ezquer del Centro de Medicina Regenerativa, Facultad de Medicina, Universidad del Desarrollo.

Índice general

1. Introducción	1
1.1 Uso no controlado de opioides como problema de salud pública.	1
1.2 Mecanismos que promueven la adicción a opioides.	2
1.3 Alteraciones sinápticas involucradas en el desarrollo de la adicción: rol de astrocitos y microglías.	3
1.4 Efectos pro-oxidantes asociados al consumo de opioides.	4
1.5 Efectos pro-inflamatorios asociados al consumo de opioides.	5
1.6 Tratamientos actuales contra el abuso de opioides.	7
3. Objetivo general	10
4. Objetivos específicos	10
5. Materiales y métodos.	11
5.1. Reactivos, compuestos y modelos celulares.	11
5.2. Cultivo de la línea celular de astrocitos DI-TNC1.	12
5.3 Viabilidad de línea celular en respuesta a tratamientos con opioides.	12
5.4 Determinación de estrés oxidativo en línea DI-TNC1.	13
5.4.a. Determinación de fluorescencia mediante citometría de flujo:	13
5.4.b. Determinación de fluorescencia mediante fluorimetría.	13
5.5. Extracción y mantención de cultivo primario de microglías de rata.	14
5.6. Purificación de microglia primaria.	15
5.7. Ensayos de inmunohistoquímica en cultivo de microglías.	16
5.8. Determinación de niveles de estrés oxidativo en cultivos primarios de microglías.	17
5.8.a. Determinación de fluorescencia mediante citometría de flujo:	17
5.8.b. Determinación de fluorescencia mediante fluorimetría:	17
5.9. Determinación de niveles de mRNA de citoquinas pro-inflamatorias en cultivos primarios de microglías.	18
5.10. Análisis estadístico	20
6.-Resultados	21
6.1. Determinar si la incubación con opioides aumenta el estrés oxidativo en cultivos de microglías o astrocitos de rata.	21
6.1.1. Estandarización de las condiciones de cultivo para los próximos experimentos.	21
6.1.2. Determinación de viabilidad de células DI-TNC1 tratadas con morfina.	23
6.1.3. Obtención de un modelo de astrocitos que genere estrés oxidativo en respuesta a la activación de TLR4.	25
6.1.4. Obtención de un modelo de microglías que generan estrés oxidativo en respuesta a incubación con opioides.	27

6.1.5. Determinación de la concentración óptima de sonda DHDCFDA para ensayos de determinación de ROS con cultivos primarios de microglías.	29
6.1.6. Determinación de un modelo de microglías que genera estrés oxidativo en respuesta a la activación de TLR4.	30
6.1.7 Determinación de estrés oxidativo en cultivos primarios de microglías tratados con opioides.	33
6.2. Determinar si la incubación con opioides aumenta los niveles de citoquinas pro-inflamatorias en cultivos primarios de microglías de rata.	35
6.2.1. Determinación de un modelo de microglías que aumenta sus niveles de citoquinas pro-inflamatorias en respuesta a la activación de TLR4.	35
6.2.2. Determinación de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias en cultivos primarios de microglías tratadas con opioides.	36
6.3. Evaluar si el tratamiento con secretoma derivado de hMSC preconditionadas reduce el estrés oxidativo generado por el tratamiento con opioides en cultivos primarios de microglía.	38
6.3.1-Efecto del tratamiento con secretoma derivado de hMSC preconditionadas en los niveles de ROS generado por incubación de cultivos primarios de microglías con fentanilo.	38
6.4. Evaluar si el tratamiento con secretoma derivado de hMSC preconditionadas reduce los niveles de citoquinas pro-inflamatorias generado por el tratamiento con opioides en cultivos primarios de microglía de rata.	41
6.4.1. El tratamiento con secretoma derivado de hMSC preconditionadas reduce el aumento de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias causado por fentanilo.	41
7. Discusión	43
8. Conclusiones	46
9. Referencias	47

Índice de Tablas y Figuras

Figura 1	Estrés oxidativo en la homeostasis del glutamato	4
Figura 2	Los opioides aumentan los niveles de estrés oxidativo cerebral y forman un ciclo que mantiene la neuroinflamación	6
Tabla 1	Partidores específicos de citoquinas pro-inflamatorias	19
Figura 3	Expansión de la línea celular DI-TNC1	22
Figura 4	Crecimiento de la línea celular DI-TNC1 dependiente de FBS	22
Figura 5	Determinación del metabolismo celular de la línea celular DI-TNC1 cultivada con distintas concentraciones de FBS	23
Figura 6	Curvas de viabilidad de línea celular DI-TNC1 tratada con concentraciones crecientes de morfina	24
Figura 7	Efectos de LPS en la generación de estrés oxidativo en células DI-TNC1, evaluado mediante citometría de flujo	26
Figura 8	Determinación de estrés oxidativo en la línea celular DI-TNC1, en respuesta al tratamiento con LPS, evaluado mediante fluorimetría	27
Figura 9	Caracterización de los cultivos primarios de microglía	28
Figura 10	Determinación de calidad de la purificación de microglías mediante inmunocitofluorescencia	29
Figura 11	Determinación de la concentración óptima de sonda DHDCFDA para detección de ROS por citometría de flujo en cultivos primarios de microglías	30
Figura 12	Determinación de estrés oxidativo mediante citometría de flujo en cultivos primarios de microglías	31

Figura 13	Determinación de ROS en cultivos primarios de microglías expuesta a LPS evaluado mediante fluorimetría	32
Figura 14	Efecto de los opioides en los niveles intracelulares de ROS en cultivos primarios de microglía	34
Figura 15	Determinación de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en cultivos primarios de microglía tratados con LPS 1 µg/mL, mediante RT-qPCR	36
Figura 16	Efecto del tratamiento con opioides en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias	37
Figura 17	Efectos del tratamiento con secretoma en la generación de ROS	39
Figura 18	Efectos del tratamiento con secretoma en la generación de ROS	40
Figura 19	Tratamiento con secretoma derivado de hMSC preconditionadas reduce el aumento de expresión de citoquinas pro-inflamatorias causado por incubación con fentanilo	42

Abreviaturas

- cAMP:** Adenosin monofosfato cíclico
- DHDCFDA:** 2',7'-dihidro-dicloro-fluoresceína diacetato
- DMEM:** Dulbecco's modified Eagle medium
- DMSO:** Dimetilsulfóxido
- FBS:** Suero fetal bovino
- GABA:** Ácido gamma-aminobutírico
- GLT-1:** Transportador de glutamato 1
- GIRK:** Canales de K⁺ acoplados a proteína G
- GSH:** Glutación reducido
- HMGB1:** High mobility group box 1
- hMSC:** Células madre mesenquimáticas humanas
- IC50:** Concentración inhibitoria 50%
- iNOS:** óxido nítrico sintasa inducible
- LPS:** Lipopolisacárido
- NAc:** Núcleo accumbens
- NO:** Óxido nítrico
- NOX:** NADPH-oxidasa
- OST:** Terapia de sustitución de opioides
- PBS:** Amortiguador fosfato salino 1X
- PDL:** Poli-D-Lisina
- PFA:** Paraformaldehído
- RNS:** Especies reactivas del nitrógeno
- ROS:** Especies reactivas del oxígeno
- RPMI:** Roswell Park Memorial Institute Medium
- SEM:** Error estándar de la media
- SNC:** Sistema nervioso central
- TLR-4:** Toll like receptor 4
- VTA:** Área tegmental ventral

Resumen

El consumo no controlado de opioides se ha convertido en un grave problema de salud pública en el mundo, debido a la dependencia física que estos generan. Las tasas de adicción, recaída al consumo y muertes por sobredosis han aumentado fuertemente en los últimos años, principalmente asociadas al consumo de morfina y fentanilo. La generación de estrés oxidativo y neuroinflamación en el sistema de recompensa cerebral, causados por el uso reiterado de estas drogas de abuso, ha sido fuertemente relacionada con el desarrollo y el mantenimiento de conductas adictivas.

El estrés oxidativo y la neuroinflamación reducen la actividad de transportadores de glutamato (principal neurotransmisor excitatorio en el cerebro) presentes en microglías y astrocitos. Esto impide la regulación normal de los niveles de glutamato en el sistema de recompensa, lo que conduce a su sobreactivación patológica, promoviendo conductas que favorecen el consumo y la recaída a la droga. Por esto, son necesarias aproximaciones experimentales que busquen revertir este aumento de estrés oxidativo y neuroinflamación en microglías y astrocitos, y consecuentemente reducir el riesgo de desarrollar una adicción al consumo de opioides.

Como posible tratamiento, proponemos una terapia basada en la potente actividad antioxidante y antiinflamatoria de las células madre mesenquimáticas humanas (hMSC). Estas células secretan una gran variedad de moléculas con actividad paracrina antioxidante y antiinflamatoria (conocido como secretoma) para combatir cambios dañinos en su entorno. La actividad antioxidante y antiinflamatoria del secretoma de las hMSC es potenciada al estimular previamente estas células con moléculas pro-inflamatorias. De esta forma, se ha reportado que el tratamiento con secretoma de hMSC preconicionadas, disminuye el estrés oxidativo y la neuroinflamación en modelos animales de adicción al alcohol y a la nicotina, reduciendo su consumo voluntario, pero su uso como tratamiento en un modelo de adicción a opioides aún no ha sido evaluado.

Este estudio apunta a la generación de un modelo *in vitro* de microglías y astrocitos de rata, que genere estrés oxidativo e inflamación por exposición a opioides. De esta manera, se pretende evaluar la siguiente hipótesis **“El tratamiento con secretoma derivado de hMSC preconicionadas, reduce los niveles de citoquinas pro-inflamatorias y marcadores de estrés oxidativo, en un modelo *in vitro* de exposición a opioides”**. La cual fue abordada usando una línea celular inmortalizada de astrocitos de rata y cultivos primarios de microglías

de rata. Se evaluaron los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y los niveles de mRNA de citoquinas pro-inflamatorias, luego de la incubación de estas células con opioides. Se logró generar un modelo de cultivos primarios de microglías, en donde el tratamiento con morfina generó un aumento de mRNAs que codifican para citoquinas pro-inflamatorias (específicamente IL-6), pero un efecto antioxidante en las mediciones de ROS. Por otro lado, el tratamiento con fentanilo generó un aumento tanto de ROS como de los mRNA de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6, IL-1 y TNF- α , efectos que fueron prevenidos con el pretratamiento de estas células con secretoma de hMSC. En conclusión, este estudio logró demostrar un efecto benéfico del tratamiento de microglías con secretoma de hMSC, frente a la acción detrimental del fentanilo, en términos de generación de ROS y aumento de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias. Los resultados obtenidos aportan nueva evidencia sobre los posibles mecanismos mediante los cuales los opioides aumentan el estrés oxidativo e inflamación, eventos claves para el desarrollo, establecimiento y mantención de la adicción a opioides y sugieren una nueva alternativa terapéutica para el tratamiento de esta devastadora patología.

Abstract

Uncontrolled opioid use has become a serious global health problem due to the physical dependence that they generate. The rates of addiction, relapse and deaths due to overdose have increased sharply in recent years, mainly associated with the use of morphine and fentanyl. The generation of oxidative stress and neuroinflammation in the brain's reward system, caused by the repeated use of these drugs of abuse, has been strongly related to the development and maintenance of addictive behaviors.

Oxidative stress and neuroinflammation reduce the activity of glutamate transporters (the main excitatory neurotransmitter in the brain) present in microglia and astrocytes. This event prevents the normal regulation of glutamate levels in the reward system, which leads to its pathological overactivation, promoting behaviors that favor drug use and relapse. Therefore, new experimental approaches are needed that seek to reverse this increase in oxidative stress and neuroinflammation in microglia and astrocytes, and consequently reduce the risk of developing opioid addiction.

As a possible treatment, we propose a therapy based on the powerful antioxidant and anti-inflammatory capacity of human mesenchymal stem cells (hMSC). These cells secrete a broad array of molecules with paracrine antioxidant and anti-inflammatory activity (known as secretome) to combat harmful changes in their environment. The antioxidant and anti-inflammatory activity of the hMSC secretome is enhanced by the previous stimulation of these cells with pro-inflammatory molecules. In this way, it has been reported that the treatment with secretome derived from preconditioned hMSC decreases oxidative stress and neuroinflammation in animal models of addiction to alcohol and nicotine, reducing their voluntary intake, but its use as a treatment in an opioid addiction model has not yet been evaluated.

This study aims to generate an *in vitro* model of rat microglia and astrocytes, which generates oxidative stress and inflammation due to opioid exposure. In this way, it is intended to study the following hypothesis **"Treatment with secretome derived from preconditioned hMSC reduces the levels of pro-inflammatory cytokines and oxidative stress markers, in an *in vitro* model of opioid exposure"**. Which was approached using an immortalized rat astrocyte cell line and primary cultures of rat microglia. Intracellular ROS levels and pro-inflammatory cytokine mRNA levels were evaluated after incubation with opioids.

It was possible to generate a model of primary microglia, where morphine treatment generated an increase in inflammatory mRNAs (specifically IL-6), but it proved to have an antioxidant effect in ROS measurements. On the other hand, fentanyl treatment generated an increase in both ROS levels and IL-6, IL-1 and TNF- α levels, effects that were prevented by the pretreatment of these cells with the hMSC secretome. In conclusion, this study was able to demonstrate a beneficial effect of hMSC secretome treatment in microglia, against the detrimental action of fentanyl, in terms of ROS generation and increased levels of pro-inflammatory cytokines. The obtained results provide new evidence on the possible mechanisms by which opioids increase oxidative stress and inflammation, key events for the development, establishment and maintenance of opioid addiction and suggest a new therapeutic alternative for the treatment of this devastating pathology.

1. Introducción

1.1 Uso no controlado de opioides como problema de salud pública.

Los opioides, utilizados medicinalmente por sus propiedades analgésicas y sedantes para el manejo del dolor clínico, poseen un alto potencial adictivo y un estrecho margen terapéutico. Su uso a nivel mundial ha mostrado un notorio aumento en los últimos 20 años [1].

Como los opioides generan un efecto placentero, un importante número de pacientes que comienzan un tratamiento medicinal, sucumben ante la búsqueda de dicho efecto, desembocando en un consumo crónico recreativo no controlado [2]. Además, un importante número de pacientes desarrollan una dependencia física a los opioides, caracterizado por un violento síndrome de privación al dejar de consumir la droga. Estas características promueven el consumo crónico de opioides de uso común, como morfina y fentanilo, aumentando el riesgo de sobredosis debido al fácil acceso de dichas drogas [3].

El incremento en el uso de opioides ha llevado a un importante aumento de las conductas de abuso y de las muertes relacionadas a opioides en Estados Unidos, en tan solo 5 años [4], fenómeno que ha sido catalogado como “el problema de abuso de fármacos de mayor crecimiento en ese país” (CDC, 2012).

El consumo de opioides en dosis altas puede producir depresión respiratoria grave, principal causa de muerte por sobredosis. Se estima que 1 de cada 5 pacientes que ingresan a emergencia por sobredosis de opioides, mueren en el transcurso de un año por recaída y una sobredosis posterior [5], reportándose en Estados Unidos más de 130 muertes diarias por sobredosis de opioides [6,7]. Es por este motivo, que urge encontrar métodos para generar tratamientos efectivos que sean capaces de reducir la incidencia en el uso crónico de opioides. Chile está dentro de los países con mayor prevalencia de consumo de drogas en América del Sur [8], incluyendo el consumo de opioides [9]. Además, el notable incremento en el abuso de potentes opioides sintéticos, como el fentanilo y sus derivados debido a sus bajos costos de producción [10-12], hace que el pronóstico de prevalencia de trastorno de uso de opioides en Chile sea muy desalentador.

1.2 Mecanismos que promueven la adicción a opioides.

En general, los opioides actúan mediante la activación de cuatro receptores de opioides principales: MOP1 (Receptores tipo μ), KOP (tipo κ), DOP (tipo δ) y el NOP-R (receptor de nociceptina/orfanina FQ). La activación de dichos receptores, tanto por ligandos endógenos como por sustancias exógenas, genera analgesia, depresión respiratoria, euforia, liberación de hormonas, inhibición del tracto gastrointestinal, efectos de ansiedad y otros, dependiendo del subtipo de receptor del que se trate [13]. En el sistema nervioso central (SNC) se presentan principalmente receptores de opioides del tipo μ , κ y δ .

La activación de estos receptores, todos acoplados a proteína G_i , promueven una reducción de la actividad neuronal a través de mecanismos como: (i) inhibición de la adenilato ciclasa que conlleva a una reducción de la síntesis de cAMP, (ii) modulación de canales de Ca^{2+} , suprimiendo el influjo de este catión, y por consiguiente, atenuando la excitabilidad de neuronas y/o reduciendo la liberación de neuropéptidos pronociceptivos [14], y (iii) apertura de canales de K^+ acoplados a proteína G (GIRK), lo que hiperpolariza a las neuronas. Estos mecanismos en conjunto inhiben la propagación de los potenciales de acción y la liberación de neurotransmisores [15].

Mediante este efecto inhibitorio los opioides son capaces de activar los centros neuronales de la recompensa de manera indirecta, a través de los receptores μ en neuronas GABAérgicas del área tegmental ventral (VTA) de actividad inhibitoria local. La activación de estos receptores inhibe a las neuronas GABAérgicas, que normalmente mantienen un tono inhibitorio sobre sus neuronas dopaminérgicas vecinas, promoviendo la activación de estas últimas [16]. Así, las neuronas dopaminérgicas del VTA, que se proyectan hacia el núcleo accumbens (NAc) y a la corteza prefrontal, aumentan su liberación de dopamina en estas áreas del cerebro, lo que promueve el ansia por el consumo [17].

1.3 Alteraciones sinápticas involucradas en el desarrollo de la adicción: rol de astrocitos y microglías.

La adicción a sustancias de abuso es considerada un trastorno cerebral crónico, que conduce a cambios adaptativos complejos dentro del sistema de recompensa cerebral que involucra neurotransmisores como glutamato y dopamina, principalmente [18].

Las proyecciones glutamatérgicas de la corteza prefrontal, hipocampo y amígdala regulan la instauración de la adicción al vincular los estímulos ambientales del momento del consumo con el consumo mismo de la droga, promoviendo la generación de un condicionamiento patológico que refuerza el establecimiento de la adicción [19].

Las células gliales adyacentes a la sinapsis (astrocitos y microglías), juegan un rol crucial en el control de la actividad neuronal en el consumo crónico de opioides [20,21]. Estas células regulan los niveles de glutamato en la sinapsis por la presencia de transportadores que (i) captan el glutamato liberado por las neuronas (i.e. GLT-1) o (ii) liberan glutamato al espacio extra-sináptico que inhibe la neurotransmisión glutamatérgica por mecanismos de retroalimentación negativa (i.e. sistema X_c^-). Una reducción en la actividad de estos transportadores en astrocitos o microglías del sistema de recompensa aumenta la neurotransmisión glutamatérgica en áreas como el NAc, lo que potencia las conductas inducidas por señales ambientales y subjetivas aprendidas asociadas al consumo de la droga [22-27]. Debido a esto, se considera a los astrocitos y microglías como reguladores clave de la homeostasis del glutamato en el SNC. [28]

Microglías y astrocitos funcionan como células inmunes locales, siendo mediadores fundamentales de la neuroinflamación, por medio de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) [29]. Este estrés oxidativo es capaz de inhibir la actividad de los transportadores de glutamato previamente mencionados, especialmente al transportador GLT-1, que es responsable de cerca del 90% de la captación de glutamato en el cerebro [30]. El ROS producido por la exposición a opioides puede oxidar directamente residuos de cisteína en el transportador GLT-1, reduciendo su actividad e induciendo su degradación. Además, existe evidencia sobre la endocitosis de estos receptores, en donde el estrés oxidativo generado por opioides directamente, o como consecuencia de la neuroinflamación, se ha asociado con una reducción de la actividad y de los niveles de GLT-1 en el NAc. Adicionalmente, simulaciones *in silico* muestran que xCT

(unidad catalítica del sistema X_c^-) también posee residuos que podrían ser alterados por estrés oxidativo. Estos datos muestran el potencial de la generación de estrés oxidativo como posible causa de la desregulación glutamatergica que provoca comportamientos que favorecen el consumo de drogas de abuso, estimulando el ansia por el consumo y el posterior desarrollo de adicción a opioides [31-33] (**Figura 1**).

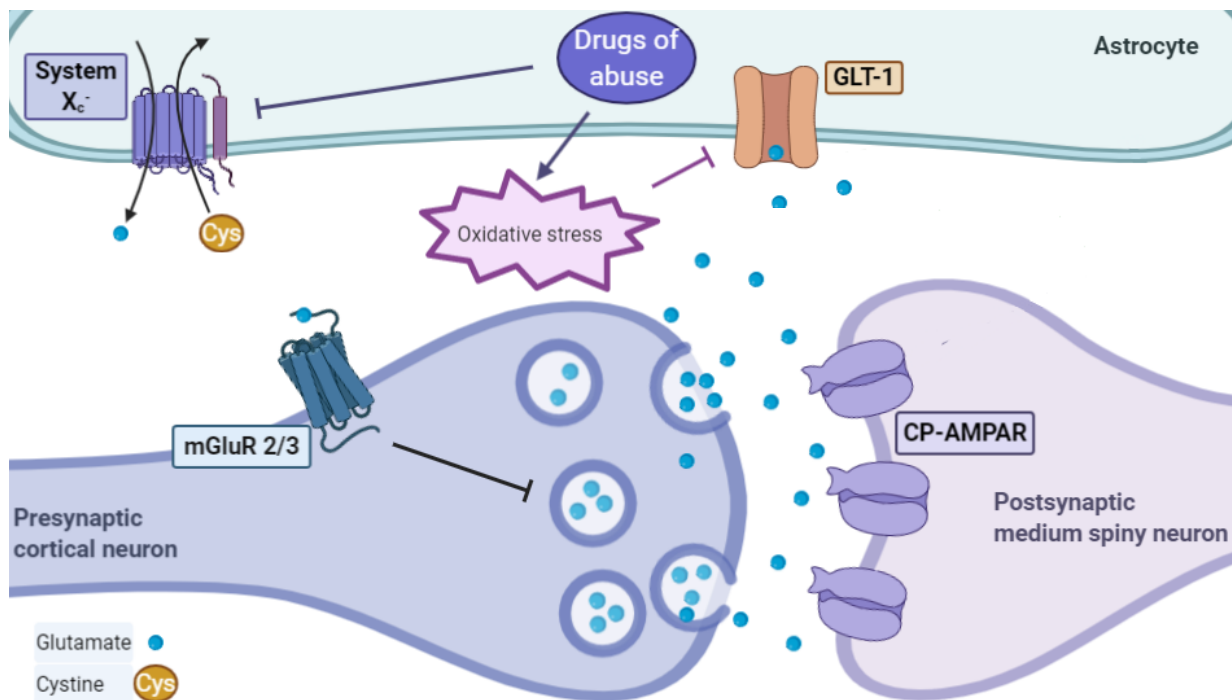


Figura 1. Estrés oxidativo en la homeostasis del glutamato. En condiciones normales, GLT-1 elimina el glutamato del espacio sináptico y el sistema glial X_c^- libera glutamato a la ubicación extrasináptica, lo que activa los receptores metabotrópicos inhibitorios de glutamato 2 y 3 (mGluR 2/3) que inhiben la liberación del glutamato al espacio sináptico. Las drogas de abuso alteran la homeostasis del glutamato al aumentar los niveles de estrés oxidativo, que deterioran la actividad del GLT-1 y reducen la actividad del sistema X_c^- . Los opioides también fortalecen la transmisión glutamatergica al promover el reclutamiento de receptores AMPA permeables al Ca^{+2} (CP-AMPA) (Figura adaptada de Berrios-Carcamo y cols. 2020 [58]).

1.4 Efectos pro-oxidantes asociados al consumo de opioides.

Estudios tanto en fase clínica como preclínica, evidencian los efectos pro-oxidantes y pro-inflamatorios del consumo crónico de drogas de abuso, como etanol, nicotina, cocaína y también opioides, reportándose un incremento en los marcadores de estrés oxidativo a nivel cerebral, en distintos modelos de adicción a sustancias de abuso [34-36].

En el caso específico de los opioides, se ha reportado que la morfina y el fentanilo aumentan los marcadores de estrés oxidativo en muestras cerebrales de ratas [37]. Este aumento también se observa en el circuito de recompensa en modelos animales de adicción [38-39] y en muestras de plasma de pacientes con historial de consumo crónico de morfina [40].

A nivel subcelular, el consumo crónico de opioides induce una fuerte reducción de la capacidad antioxidante, debido a la disminución de la actividad de importantes enzimas antioxidantes del cerebro como son glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa. Además, se observan aumentos en los niveles de peroxidación lipídica, como consecuencia del estrés oxidativo generado [41]. Adicionalmente, el consumo crónico de opioides genera una reducción de los niveles de glutatión reducido (GSH), una de las principales moléculas antioxidantes citoplasmáticas en las células gliales [42,43].

En síntesis, se han postulado dos mecanismos por los que los opioides pueden generar daño oxidativo: (i) promoviendo directamente la formación de ROS (ii) reduciendo la actividad de distintos componentes o sistemas antioxidantes en las células blanco [44].

1.5 Efectos pro-inflamatorios asociados al consumo de opioides.

Aproximaciones *in vivo*, *in vitro*, e *in silico* han demostrado que los opioides se unen al receptor de moléculas extrañas Toll-like receptor 4 (TLR4), de forma no estereoselectiva, activando su vía de señalización. Esto gatilla la activación de microglías y astrocitos, lo que induce la liberación de mediadores inmunes excitatorios, claves en el desarrollo de neuroinflamación (i.e: citoquinas y quimioquinas) [45, 46].

Se ha demostrado que opioides como la morfina y el fentanilo, se unen directamente al TLR4 [47-49]. Además, se ha evidenciado que la administración de morfina incrementa la expresión y liberación de HMGB1, un agonista endógeno de TLR4 [50, 51], conduciendo a la activación de una cascada de señalización pro-inflamatoria mediante liberación de múltiples citoquinas, incluyendo TNF- α , IL-1 β , e IL-6 [52-55]. La liberación de estas citoquinas aumenta exponencialmente frente a la administración repetida de morfina [56]. Dichas citoquinas actúan en los receptores expresados por las neuronas cercanas, aumentando la neurotransmisión excitatoria, lo que se opone a la acción inhibitoria inicial de la morfina. Las citoquinas pro-inflamatorias, además, activan tanto a microglías como a astrocitos, incrementando la producción de ROS y de RNS, mediante el incremento de la expresión de enzimas oxidantes como NADPH-oxidasa (NOX) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) [57]. Así, se genera un

ciclo vicioso auto-potenciado, entre la neuroinflamación y el estrés oxidativo, el cual es capaz de mantener un estado general inflamatorio alterado [58] (Figura 2).

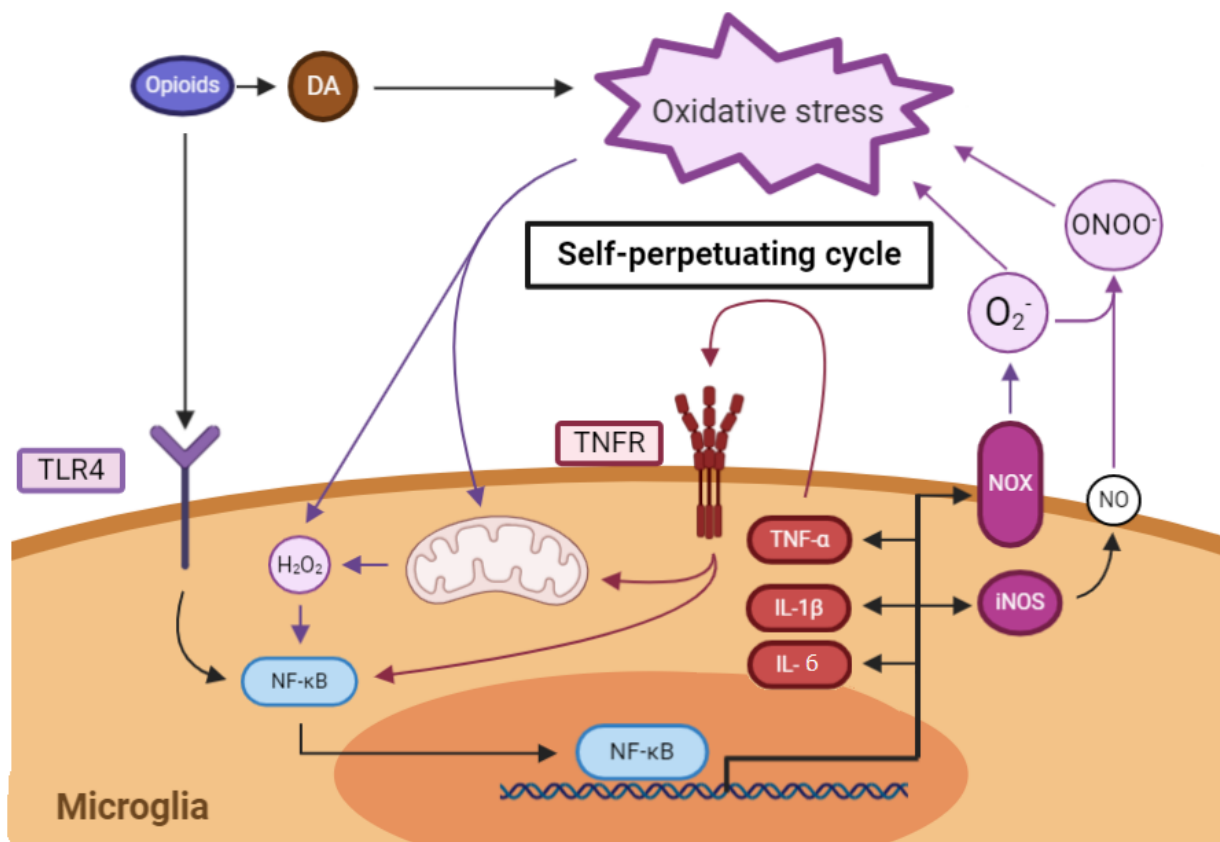


Figura 2. Los opioides aumentan los niveles de estrés oxidativo cerebral y desencadenan un ciclo que se perpetúa a sí mismo y mantiene la neuroinflamación.

Los opioides promueven la liberación de dopamina (DA), que se oxida rápidamente y de forma espontánea, generando iones superóxido y peróxido de hidrógeno, lo que aumenta el estrés oxidativo. El estrés oxidativo generado puede afectar la función mitocondrial, aumentando aún más la producción de estrés oxidativo, el cual promueve la activación y translocación nuclear de NF-κB en microglías. Adicionalmente, los opioides promueven la activación de TLR4, que también activa NF-κB en la microglía. En el núcleo, NF-κB promueve el aumento de la expresión de las enzimas pro-oxidantes NADPH-oxidasa (NOX) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), y de citoquinas pro-inflamatorias (TNF-α, IL-1β e IL-6), generando un círculo vicioso que se autoperpetúa en el tiempo (Figura adaptada de Berrios-Carcamo y cols. 2020 [58]).

1.6 Tratamientos actuales contra el abuso de opioides.

Actualmente, el principal tratamiento farmacológico que se adopta para pacientes adictos a los opioides es la terapia de sustitución de opioides (OST), la cual consiste en el reemplazo de opioides altamente adictivos y de vida media corta como la morfina o el fentanilo, por análogos de vida media más prolongada, como la metadona o la buprenorfina. El objetivo de esta terapia es reducir paulatinamente las dosis utilizadas, hasta alcanzar un umbral mínimo tolerable para discontinuar el tratamiento. Usando OST, se ha logrado reducir la mortalidad y la recaída en aproximadamente un 50% de los casos [59-61]. Sin embargo, existen variadas limitaciones asociadas a esta terapia, como las reacciones adversas generadas por el uso de estos medicamentos, la dificultad en la regulación de la prescripción y la imposibilidad en muchos casos de reducir el consumo de este nuevo opioide, por lo que finalmente se termina reemplazando una adicción por otra [62-64]. Estas limitaciones de la terapia actual han llevado a variados grupos de investigación a buscar nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de la adicción a opioides. Consecuentemente, estudios recientes han evidenciado que la inhibición del estrés oxidativo y la neuroinflamación generados por el consumo crónico de opioides, reducen el síndrome de privación y posterior recaída al consumo en diferentes modelos preclínicos [65-68].

1.7 Tratamiento alternativo con células madre mesenquimáticas.

En los últimos años las células madre mesenquimáticas humanas (hMSC) han surgido como una nueva alternativa terapéutica para el tratamiento de enfermedades neurológicas complejas [69]. Dichas células pueden extraerse de variados tejidos como médula ósea, tejido adiposo y cordón umbilical y son capaces de generar efectos antiinflamatorios y antioxidantes beneficiosos en modelos de enfermedades neurodegenerativas, donde se aprecia un daño similar al causado por el consumo de opioides [70]. La modulación del ambiente redox y del estrés oxidativo por parte de las hMSC, les otorga un potencial que puede ser aplicado como tratamiento en una amplia variedad de modelos. Esto debido a que el estrés oxidativo es mediado por constituyentes moleculares similares que están presentes en todo tipo de células y comparten funciones similares [64]. La disminución del daño por estrés oxidativo mediado por hMSC se debe a un amplio rango de mecanismos que incluyen; (i) secuestrar directamente radicales libres, (ii) aumentar las defensas antioxidantes del huésped, (iii) inhibir

la respuesta inflamatoria, (iv) aumentar la respiración celular y la función mitocondrial, secretando enzimas y moléculas antioxidantes y (v) transferir sus mitocondrias para proteger a células dañadas [72-76].

1.8 Potencial terapéutico del secretoma derivado de células madre mesenquimáticas.

Evidencia reciente muestra que el conjunto de moléculas secretadas por las hMSC, conocido como secretoma, es capaz en muchos casos de reproducir el efecto del tratamiento con células vivas. Esto debido a que las hMSC secretan productos biológicos con una potente actividad terapéutica, los cuales se pueden aislar *in vitro*, obteniéndose un conjunto de moléculas solubles y exosomas con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Esta clase de biofármaco posee un perfil de seguridad mejorado y un aumento en la facilidad de administración, para atravesar la barrera hematoencefálica [77, 78] en comparación a la administración de células vivas, lo que lo convierte en una alternativa terapéutica más atractiva.

Adicionalmente, existen reportes donde se ha evidenciado que el efecto terapéutico del secretoma puede ser potenciado al someter a las hMSC a un estímulo de preconditionamiento *in vitro*, generando así, un aumento en los niveles de moléculas terapéuticamente relevantes para el tratamiento de una patología específica. En este sentido, se ha demostrado que el preconditionamiento de hMSC por incubación con citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α e IFN- γ), genera un aumento en la secreción de moléculas con potentes actividades antiinflamatorias y antioxidantes [79].

El grupo de investigación a cargo del proyecto FONDECYT en el que se enmarca esta Memoria de Título, ha demostrado en modelos animales de adicción a etanol y a nicotina, que la terapia basada en administración intranasal de secretoma derivado de hMSC preconditionadas, por incubación con citoquinas pro-inflamatorias, reduce fuertemente la recaída al consumo de ambas drogas luego de un periodo de abstinencia. En ambos casos el efecto terapéutico fue relacionado directamente con la reducción del estrés oxidativo cerebral y la reducción de la neuroinflamación [79]. Sin embargo, no se han reportado modelos *in vitro* que permitan modular el efecto oxidante y pro-inflamatorio asociado al consumo de drogas de

abuso, que permita evaluar el efecto terapéutico del secretoma antes de pasar a su evaluación en un modelo animal.

En base a lo anterior, la presente memoria de título plantea la reducción del estrés oxidativo y la neuroinflamación, inducida por opioides, en modelos *in vitro* de microglías y astrocitos de rata, mediante el tratamiento con secretoma antioxidante y antiinflamatorio generado a partir de hMSC preconditionadas.

2. Hipótesis

El pretratamiento de cultivos de microglías y astrocitos de rata con secretoma derivado de hMSC preconditionadas reduce los niveles de estrés oxidativo y de marcadores de inflamación inducidos por la exposición a morfina y fentanilo.

3. Objetivo general

Evaluar si el secretoma derivado de hMSC preconditionadas previene el aumento en los niveles de estrés oxidativo y de mRNA de citoquinas pro-inflamatorias en modelos *in vitro* de microglías y astrocitos de rata expuestos a morfina y fentanilo.

4. Objetivos específicos

4.1. Determinar si la incubación de microglías o astrocitos de rata con opioides aumenta los niveles de estrés oxidativo y si este aumento es revertido por el pretratamiento con secretoma derivado de hMSC preconditionadas.

4.2. Determinar si la incubación de microglías o astrocitos de rata con opioides aumenta los niveles de citoquinas pro-inflamatorias y si este aumento es revertido por el pretratamiento con secretoma derivado de hMSC preconditionadas.

5. Materiales y métodos.

5.1. Reactivos, compuestos y modelos celulares.

Se utilizó una línea comercial inmortalizada de astrocitos: DI-TNC1 (ATCC® CRL-2005™), provenientes de ratas Sprague-Dawley neonatas. La línea celular DI-TNC1 fue cultivada en medio RPMI-1640 (31800022; Thermo Fisher Scientific), el cual fue reconstituido según las especificaciones del fabricante, y luego preparado con suero fetal bovino (FBS) (Invitrogen) según se indica en cada ensayo. De la misma forma, se utilizó medio DMEM (12800017; Thermo Fisher Scientific) para la mantención de los cultivos primarios de microglía. Al momento de obtener dichos cultivos, la disección se llevó a cabo en un medio compuesto por: glucosa 16 mM; sacarosa 22 mM; NaCl 135 mM; KCl 5 mM; Na₂HPO₄ 1 mM; KH₂PO₄ 0,22 mM; HEPES 10 mM; pH = 7,4.

Para las determinaciones espectrofotométricas de fluorescencia en lector de microplacas, se utilizó medio DMEM sin rojo fenol (21063029; Thermo Fisher Scientific), 4,5 g/L D-Glucosa (31053028; Gibco) para ambos modelos celulares.

Los opioides de interés utilizados fueron morfina y fentanilo de uso médico, la morfina en forma de morfina clorhidrato (20 mg/ml, ampollas de 1 ml Laboratorios Sánderson) y el fentanilo en la forma de fentanilo citrato (50 µg/ml, ampollas de 10 ml Fresenius kabi). En el caso del fentanilo este fue concentrado por liofilización, en un equipo FreeZone de 2.5L (LABCONCO/Equilab), y resuspendido a 50 mg/ml en solución salina. Posteriormente, las alícuotas concentradas fueron disueltas en el medio de trabajo correspondiente a cada ensayo.

Se utilizó lipopolisacárido derivado de *Escherichia coli* O111:B4 (LPS) (297-473-0; Sigma-Aldrich) como un control positivo de activación del receptor TLR4, debido a que es un inductor potente de estrés oxidativo e inflamación celular. La concentración general utilizada para los ensayos fue de 1 µg/mL. Además, se utilizó Sin-1 clorhidrato (567028; EMD Millipore Corp, Merck), un productor químico de NO y radicales aniónicos superóxido como control positivo de determinación de estrés oxidativo. Este reactivo fue pesado, reconstituido y llevado a una concentración de trabajo de 100 µM.

5.2. Cultivo de la línea celular de astrocitos DI-TNC1.

La línea celular DI-TNC1 se mantuvo en medio RPMI, suplementado con 10% FBS y gentamicina sulfato 80 µg/mL (Laboratorio Sanderson). Se descongelaron viales conteniendo 2×10^6 células iniciales, las que fueron sembradas en botellas Falcon de 75 cm², y se mantuvieron en incubación a 37°C, 5% CO₂, con cambios de medio periódicos cada 3-4 días.

Al alcanzar entre un 70-80% de confluencia, las botellas fueron lavadas con 10 mL de PBS precalentado a 37°C, y luego tratadas con tripsina 0,25% (Invitrogen) durante 5 minutos a 37°C. Luego de chequear el desprendimiento celular al microscopio, se añadieron 10 mL de medio RPMI suplementado con 10% FBS para neutralizar la tripsina. Se recuperó el total del volumen en tubos Falcon de 15 mL, los cuales fueron centrifugados durante 10 minutos a 400 g. El sobrenadante de cada tubo fue retirado y las células resuspendidas en un total de 10 mL de medio completo.

Se usaron 10 µL de células en suspensión, en una proporción 1:1 con azul de Tripán, para el conteo en una cámara de Neubauer de 0.0025 mm².

El número de células sembradas está especificado para cada ensayo.

5.3 Viabilidad de línea celular en respuesta a tratamientos con opioides.

Se sembró la línea celular DI-TNC1 a una densidad de entre 13.000 y 52.000 células por mL (dependiendo del experimento) en placas de 24 pozos (1 mL por pozo), y mantenidas con medio RPMI suplementado al 10% con FBS. 48 horas después, se realizaron tres lavados con 200 µL de PBS por pozo, y se agregaron los estímulos en medio RPMI suplementado con FBS a distintas concentraciones según se indica en cada figura. Dicho estímulo se mantuvo por 48 horas antes de realizar las mediciones.

El análisis de la viabilidad celular fue realizado mediante el kit Cell-Titer Blue (Promega), que se basa en la capacidad de las células vivas de convertir el tinte redox (resazurina) a un producto fluorescente (resorufina), detectable en un lector de microplacas.

Una alícuota de reactivo fue descongelada en hielo, protegida de la luz y luego diluida en medio DMEM sin indicador de pH (rojo fenol), en una proporción 1:5. Se retiró el medio de cada placa y se agregaron 480 µL de reactivo diluido a cada pozo. Posteriormente la placa fue incubada a 37°C en oscuridad durante 3,5 horas, con chequeos periódicos. Una vez cumplido el tiempo, se extrajeron 200 µL de medio y se depositaron en una placa de 96 pozos de fondo transparente. Para determinar la fluorescencia basal se agregó reactivo a un pozo sin células.

5.4 Determinación de estrés oxidativo en línea DI-TNC1.

Se analizaron los niveles de estrés oxidativo mediante un ensayo con 2',7'-Dihidrofluorescein diacetato (DHDCFDA) (D6883; Sigma-Aldrich), una sonda que fluoresce al ser oxidada por ROS intracelulares. 3 mg de DHDCFDA fueron reconstituidos para cada ensayo en DMSO a una concentración inicial de 10 mM, luego se realizó una dilución seriada en medio RPMI (citometría) o DMEM sin rojo fenol (fluorimetría), para alcanzar una concentración de 20 μ M para el ensayo.

5.4.a. Determinación de fluorescencia mediante citometría de flujo:

Botellas T75 con células DI-TNC1 se trataron con tripsina durante 5 minutos. Posteriormente, se agregó medio RPMI suplementado con 10% FBS para neutralizar la tripsina, luego las células fueron centrifugadas a 400 g durante 10 minutos. El pellet celular fue resuspendido en 5 mL de medio RPMI suplementado al 10% con FBS y se mantuvieron 30 minutos a temperatura ambiente antes de comenzar los tratamientos. Se agregaron 1×10^5 células por tubo de 1,5 mL, uno por cada muestra a analizar. Las muestras fueron centrifugadas durante 5 minutos a 1500 g, se retiró el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 100 μ L de medio RPMI o medio RPMI+LPS a distintas concentraciones. A continuación, los tubos fueron incubados a 37°C durante 1 hora con agitación de los tubos cada 15 minutos. Durante este periodo se prepararon las distintas concentraciones de sonda DHDCFDA. Tras una hora de incubación se centrifugaron las células, el medio fue removido y el pellet resuspendido en 100 μ L de medio conteniendo la sonda o medio solo como blanco. La sonda fue incubada durante 30 minutos y una vez transcurrido el tiempo, se detuvo la reacción pasando rápidamente las muestras a hielo y añadiendo 700 μ L de medio RPMI a 4°C. Finalmente, cada muestra fue filtrada a través de fibra Nyltal (tamaño de poro de 80 μ m) y medida en un citómetro de flujo DakoCytomation CyAn ADP, de Beckman Coulter. Se evaluó cada muestra usando estimulación por láser de 488 nm y usando un filtro de excitación/emisión igual a 490/525 nm. Los datos fueron analizados mediante el programa FlowJo v.10.

5.4.b. Determinación de fluorescencia mediante fluorimetría.

Se sembraron 26.000 células por pozo en placas negras de fondo transparente, compatibles con un lector de microplacas. Al día siguiente se prepararon las distintas diluciones de LPS y Sin-1, según se indica en cada figura. Cada pozo fue lavado con 600 μ L de PBS y luego se

añadieron 500 μ L de DHDCFDA 20 μ M, exceptuando los controles para determinar el nivel de fluorescencia basal, y fueron incubados a 37°C, 5% CO₂ durante 30 minutos. Al cumplirse el tiempo se retiró el medio de cada pozo, reemplazándolo con 100 μ L de medio DMEM sin rojo fenol como control, o medio conteniendo LPS 1 μ g/mL.

Las células se incubaron durante 5 horas a 37°C, 5% CO₂, con mediciones de fluorescencia cada una hora en un lector de microplacas Modulus, Turner Biosystems, utilizando un filtro azul (excitación=490 nm, emisión=510-570 nm).

5.5. Extracción y mantención de cultivo primario de microglías de rata.

Los cultivos celulares primarios fueron mantenidos con medio de cultivo DMEM (12800017; Thermo Fisher Scientific) con gentamicina sulfato (80 μ g/mL), suplementado con FBS al 10% o 1% según se indique.

Para la preparación de cultivo cerebral primario, se usaron ratas Wistar neonatas de 0 a 2 días de edad, facilitadas por el laboratorio del Dr. Herrera-Marschitz, del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Cada preparación se realizó con un total de 8 animales, los cuales fueron sacrificados y diseccionados con material previamente esterilizado. Se extrajo cuidadosamente cada cerebro, luego fueron transferidos a placas de 60 mm con 5 mL de medio de disección (ver sección 5.1) mantenidas en hielo. Posteriormente los hemisferios cerebrales fueron separados y el bulbo olfatorio extraído. Se removió minuciosamente la capa meníngea de cada hemisferio con el uso de pinzas y lupa. Luego se recolectaron todos los hemisferios en otra placa de 60 mm con medio de disección frío. Dentro del gabinete de cultivo, y mantenidos en hielo, los hemisferios fueron cortados en trozos pequeños y divididos equitativamente en 2 tubos Falcon de 15mL.

Los tubos fueron centrifugados 10 segundos a 500 g, se descartó el medio de disección, se agregaron 5 mL de tripsina al 0,25% a cada tubo y luego fueron incubados durante 15 minutos a 37°C. Luego el tejido de cada tubo se transfirió a nuevos tubos de 15mL, intentando arrastrar el mínimo de tripsina. Se agregaron 4,8 mL de medio de disección y 200 μ L de DNasa 1,5 mg/mL (Sigma-Aldrich) a cada tubo y se trituro el tejido lentamente con una pipeta serológica. Luego se añadieron 10 mL por tubo de medio DMEM suplementado con 10% FBS y se dejó decantar el material más pesado por 5 minutos. Se recuperó el 80% del sobrenadante, en donde se encuentran las células suspendidas, a nuevos tubos Falcon de 50 mL. Se realizó un segundo proceso de extracción celular, esta vez con 3 mL de medio de

cultivo, recuperando el 80% del volumen a los mismos tubos de 50 mL. Finalmente, se llevó el volumen a 20 mL totales por tubo, con medio de cultivo DMEM suplementado con 10% FBS y se centrifugaron a 300 g por 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet celular fue resuspendido en 40 mL por tubo de medio DMEM suplementado con 10% FBS. Se colectaron ambas extracciones en una botella estéril de 200 mL a la que se agregaron 40 mL de medio DMEM. Se sembró una botella de 75 cm² por cada cerebro, con 15 mL de medio por botella. El cultivo primario se mantuvo en un ambiente humidificado, a 37°C, 5% CO₂. Se cambió el medio de cultivo 24 horas después del sembrado. En adelante se realizaron cambios de medio periódicos cada 3-4 días, hasta alcanzar un 100% de confluencia.

5.6. Purificación de microglia primaria.

Para extraer las microglías del cultivo mixto, se esperó a que los astrocitos presentes alcanzaran un 100% de confluencia, desplazando así a las células microgliales a una capa superior. Para esto se esperaron 3-4 días desde que los astrocitos alcanzaron la confluencia total. Una vez ocurrido este fenómeno, cada botella T75 fue golpeada firmemente contra el mesón en 4 series de 20 repeticiones, con chequeos al microscopio entre cada serie, tomando en cuenta que hay un pequeño porcentaje de astrocitos que se despega en el proceso.

Posteriormente se recolectó el medio de cada botella en tubos Falcon de 50 mL, sin perturbar la capa de astrocitos. Se repusieron 15 mL de DMEM suplementados con 10% FBS a cada botella golpeada y los tubos fueron centrifugados a 1500 g durante 5 minutos para posteriormente resuspender el pellet celular en 10 mL de DMEM suplementado con 10% FBS. Las células obtenidas fueron contadas mediante una cámara de Neubauer de 0.0025 cm² sin la adición de azul de Tripán (el azul de Tripán es captado por microglías vivas).

En caso de no contar con células suficientes, se realizó el mismo procedimiento con otras botellas, hasta alcanzar el número de células necesario. Para realizar los ensayos con cultivos primarios de microglías, las placas a sembrar se trataron previamente con poli-D-Lisina (10 µg/mL, 27964-99-4; Sigma-Aldrich) durante 2 horas y luego lavadas con agua bidestilada.

Las microglías fueron sembradas a una densidad de 100.000 células por cm². Luego se esperó un periodo de 2 horas y se realizó un cambio de medio a DMEM suplementado con 1% FBS. En este momento se realizó el tratamiento con secretoma, si el experimento lo requiriese. Las determinaciones de ROS se realizaron 24 horas después de sembradas.

5.7. Ensayos de inmunohistofluorescencia en cultivo de microglías.

Se utilizaron placas de 4 pocillos. A cada pozo se le agregó un cubreobjetos de vidrio tratado con poli-D-lisina y se sembraron microglías purificadas, a una concentración de 5×10^5 células por pozo. Al día siguiente se lavó cada pozo 2 veces con 1 mL de PBS estéril, luego de retirar el PBS, las células fueron fijadas durante 20 minutos con 300 μ L de una solución de paraformaldehído al 4% (Merck) en PBS. Una vez concluido el tiempo, se realizaron tres lavados con 1 mL de PBS para retirar el paraformaldehído y las placas se guardaron a 4°C hasta el día del ensayo de inmunohistofluorescencia.

Para estimar el grado de pureza de la extracción de microglías, se realizaron ensayos de inmunohistofluorescencia contra marcadores específicos de microglías (anti Iba-1, rabbit, 019-19741, Wako) y astrocitos (anti-GFAP, mouse, G3893; Sigma-Aldrich).

Para ello, cada placa se lavó 3 veces, durante 5 minutos con 1 mL de PBS estéril a temperatura ambiente. Luego de extraer el PBS, las células fueron permeabilizadas con 500 μ L de TBS-Tween durante 10 minutos. Luego se agregaron 500 μ L de FBS al 5% en TBS-Tween, durante una hora a temperatura ambiente con agitación suave.

La incubación con anticuerpos primarios se realizó diluyendo en buffer de anticuerpos Signal Stain (8112L; Cell Signaling) el anticuerpo primario contra Iba-1 (1:200) y contra GFAP (1:100) e incubando la placa durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se agregaron los anticuerpos secundarios respectivos (anti rabbit Alexa Fluor-555 44135; Cell Signaling para Iba-1 y anti-mouse Alexa Fluor-488 44085; Cell Signaling) en dilución 1:300 en TBS-Tween, y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con 1 mL de TBS-Tween, y se incubaron con 250 μ L de DAPI (1:150, Invitrogen) como marcador nuclear, durante 20 minutos en oscuridad. Finalmente, se extrajeron los cubreobjetos de cada placa y se montaron en portaobjetos de vidrio con 8 μ L de solución de montaje (Invitrogen). Las muestras fueron analizadas en un microscopio confocal Fluoview FV10i (Olympus). Las imágenes fueron analizadas mediante el software FV10-ASW v4.2b, (Olympus), contando el número de astrocitos y microglías por campo analizado.

5.8. Determinación de niveles de estrés oxidativo en cultivos primarios de microglías.

5.8.a. Determinación de fluorescencia mediante citometría de flujo:

En el momento de realizar la purificación de microglías, se separaron 1×10^5 células para evaluar la generación de estrés oxidativo mediante citometría de flujo. El ensayo se llevó a cabo usando los mismos protocolos que los previamente descritos para la línea celular DI-TNC1 (ver sección 5.4.a).

5.8.b. Determinación de fluorescencia mediante fluorimetría:

Se sembraron placas negras de 96 pozos, de fondo transparente y previamente tratadas con poli-D-lisina, con 32.000 células por pozo. A las 2 horas se realizó cambio de medio incluyendo concentraciones crecientes de secretoma en un rango de razones (1:3 -1:1000), tomando como premisa que la razón 1:1, es aquella en donde el secretoma producido por 1×10^6 hMSC es aplicado a 1×10^6 microglías.

Luego de 20 horas desde el tratamiento con secretoma, se analizaron los niveles de estrés oxidativo usando la sonda DHDCFDA. El día del ensayo se prepararon las distintas diluciones de morfina (0.3 -1000 μ M) y fentanilo (0.1-300 μ M). Dichas preparaciones fueron realizadas en la dilución correspondiente de secretoma en el medio. Luego se reconstituyeron 3 mg de DHDCFDA en DMSO y se diluyó en medio DMEM sin rojo fenol a una concentración de 20 μ M para el ensayo. Cada pozo fue lavado con 200 μ L de buffer PBS y luego se añadieron 100 μ L de sonda 20 μ M a cada pozo, exceptuando los controles para determinar el nivel de fluorescencia basal y fueron incubados a 37°C, 5% CO₂ durante 30 minutos.

Se preparó el volumen necesario de LPS 1 μ g/mL a partir de una alícuota descongelada de LPS 1 mg/mL. El Sin-1 fue disuelto en DMEM sin rojo fenol, para generar un stock de 10 mM, que luego se diluyó a 30 y 100 μ M para los ensayos. Al cumplirse los 30 minutos se retiró el medio con DHDCFDA de cada pozo, reemplazándolo con 100 μ L de medio DMEM sin rojo fenol como control sin tratamiento, morfina (0.3-1000 μ M), fentanilo (0.1-300 μ M), LPS (1 μ g/mL) o Sin-1 (30 y 100 μ M). Se incubaron durante 6 horas a 37°C, 5% CO₂, con mediciones de fluorescencia cada una hora. La fluorescencia fue medida en un lector de microplacas Modulus, Turner Biosystems siguiendo las instrucciones del fabricante y usando un filtro azul (Exc=490 nm, Em=510-570 nm).

5.9. Determinación de niveles de mRNA de citoquinas pro-inflamatorias en cultivos primarios de microglías.

Para este ensayo se sembraron placas de 6 pozos con 1×10^6 células por pozo. Se realizó un cambio de medio luego de 2 horas, en donde se realizó el tratamiento con secretoma o medio de cultivo como control. Al día siguiente se realizó el tratamiento con morfina 300 μM , fentanilo 30 μM , LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o medio DMEM suplementado con 1% FBS como control sin tratamiento durante 9 horas. Las diluciones de morfina y fentanilo se realizaron en medio con la dilución correspondiente de secretoma. Al finalizar el tratamiento se pusieron las placas en hielo y se retiró el medio de cada pozo, los cuales se lavaron con PBS frío y finalmente se agregaron 500 μL de TRIzol (Invitrogen) por pozo para extraer el RNA de las células. Dicho volumen se guardó a -80°C hasta realizar la purificación de RNA.

Para la purificación del RNA se descongelaron las muestras y se agregaron 100 μL de cloroformo a cada tubo. Luego los tubos fueron agitados vigorosamente durante 15 segundos, incubados 5 minutos a T° ambiente y luego centrifugados a 4°C , por 15 minutos, a 12000 g. Luego de la centrifugación, se recuperó la fase acuosa en nuevos tubos de 1,5 mL, correspondiente a la fracción que contiene al RNA y se agregaron 250 μL de isopropanol a cada muestra. Los tubos se guardaron a -20°C durante toda la noche, procedimiento que aumenta la eficiencia de precipitación del RNA respecto de una incubación a temperatura ambiente.

Al día siguiente, las muestras fueron centrifugadas a 4°C , 12000 g por 10 minutos. Se removió el sobrenadante y el pellet se lavó con etanol al 75%. Posteriormente, se removió el etanol y el pellet fue resuspendido en 15 μL de agua sin nucleasas. Se tomaron 2 μL de dicha solución para la cuantificación de RNA mediante un equipo Nanodrop 2000 (Thermo). 1 μg de RNA de cada muestra fue tratado con DNasa 1 (1U/ μL ; 18068-015; Invitrogen) para eliminar cualquier posible contaminación con DNA. Luego se añadió a cada muestra 1 μL de EDTA y se mantuvieron a 65°C durante 15 minutos.

La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo usando el kit de Transcriptasa Reversa M-MLV (28025013; Invitrogen), purificada a partir de *E. coli*. En síntesis, se agregaron 2 μL de oligo-DT a cada muestra y se incubaron por 10 minutos a 70°C en un termociclador. Luego se agregó a cada muestra 9,5 μL del mix para la reacción compuesto por: 4,5 μL del tampón proporcionado por el fabricante (First-Strand Buffer: 50 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 40 mM de KCl, 6 mM de MgCl_2), 2 μL de DTT 100 mM, 1 μL de DNTP's (10 mM cada uno), 1 μL de

RNAsa out (1U/ μ L, 10777-019; Invitrogen) (para eliminar posibles RNAsas presentes) y 1 μ L de la enzima de retrotranscripción M-MLV RT (200 U/ μ L) y se incubó a 42°C durante 1 hora. Al finalizar la retrotranscripción se llevó a cabo la reacción de qPCR, haciendo uso del kit LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche). En resumen, se preparó un master mix según las especificaciones del fabricante, compuesto por: 5 μ L de agua libre de nucleasas, 1 μ L de MgCl₂ 25 mM, 1 μ L de la enzima LightCycler® FastStart Enzyme y 0,5 μ L de cada partidador (*sentido* y *antisentido*), llegando a un total de 8 μ L del mix por cada muestra a ensayar. Se usaron partidores específicos de rata para IL-6, IL-1 y TNF- α y para β -actina (Integrated DNA Technologies) (**Tabla 1**) y la reacción fue llevada a cabo usando 2 μ L de muestra (cDNA) y 8 μ L del mix preparado para cada gen, usando un termociclador Light-Cycler 1.5 (Roche).

Partidor	Secuencia	Temperatura Annealing (°C)
IL-1 sentido	5'-CACCTCTCAAGCACAGCACAG-3'	57
IL-1 antisentido	5'-CACCTCTCAAGCACAGCACAG-3'	57
IL-6 sentido	5'-TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC-3'	59
IL-6 antisentido	5'-TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC-3'	59
TNF- α sentido	5'-AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC-3'	59
TNF- α antisentido	: 5'-TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC-3'	59
β -actina sentido	5'-AAGTCCCTCACCTCCCAAAG-3'	59
β -actina antisentido	5'-AAGCAATGCTGTACCTTCCC-3'	58

Tabla 1: Partidores específicos de citoquinas pro-inflamatorias. Se presentan las secuencias sentido y antisentido de los partidores utilizados para la amplificación de los mRNA de IL-6, IL-1, TNF- α y β -actina, como control basal de la expresión génica, además de las temperaturas de *annealing* correspondientes.

5.10. Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como el promedio \pm error estándar de la media (SEM) de al menos tres experimentos independientes. La comparación entre los distintos grupos experimentales en relación al control se realizó mediante análisis ANOVA de una vía, mediante el *software* GraphPad Prism 6.0. El valor $p < 0,05$ fue establecido como el valor mínimo de significancia (*).

6.-Resultados

6.1. Determinar si la incubación con opioides aumenta el estrés oxidativo en cultivos de microglías o astrocitos de rata.

6.1.1. Estandarización de las condiciones de cultivo para los próximos experimentos.

El objetivo principal de este trabajo es evaluar si el tratamiento de cultivos de astrocitos o microglías de rata con secretoma de hMSC puede reducir el estrés oxidativo y los marcadores de inflamación aumentados por la incubación de estas células con opioides, a fin de poder disponer de modelos de testeo rápido que permitan predecir el funcionamiento del secretoma en modelos *in vivo* más complejos.

La línea celular de astrocitos de rata DI-TNC1 se mantuvo en medio RPMI suplementado con 10% FBS, para fines de expansión de la misma (imágenes representativas del crecimiento de estas células se muestran en la **Figura 3**). Se analizó el crecimiento general de la línea DI-TNC1 a menores concentraciones de FBS, con el fin de evaluar la posibilidad de disminuir el porcentaje de FBS en el medio de trabajo, de manera de reducir posibles interferencias de este al evaluar el efecto del secretoma derivado de las hMSC. Al observar la placa al microscopio (**Figura 4**), no se observó crecimiento celular en los pozos mantenidos con medio libre de FBS o con medio libre de FBS suplementado con factores de crecimiento añadidos (OptiMEM, Gibco), mostrando que la presencia de FBS es necesaria para que estas células permanezcan en un estado proliferativo normal. Además, el crecimiento celular se vio disminuido al utilizar concentraciones de suero fetal bovino menores a 10%. Sin embargo, no existe aparente muerte celular en ninguno de los casos, sino un retardo en el crecimiento celular. Estos indicios fueron confirmados mediante el análisis de actividad metabólica por el reactivo Cell-Titer Blue en cultivos mantenidos en medio suplementado con distintos porcentajes de FBS por 48 horas (**Figura 5**). Se observa que todas las concentraciones de FBS ensayadas incrementaron su actividad metabólica con respecto al control incubado sin FBS. Por otra parte, aunque el aumento de la actividad metabólica de cultivos mantenidos con 1% FBS fue menor respecto a la de los otros grupos, fue significativamente mayor al control sin FBS. De estos experimentos se concluye que el medio para mantener las células DI-TNC1 debe contener FBS para no arrestar el crecimiento celular y que 1% FBS es suficiente para

que las células se mantengan en proliferación.

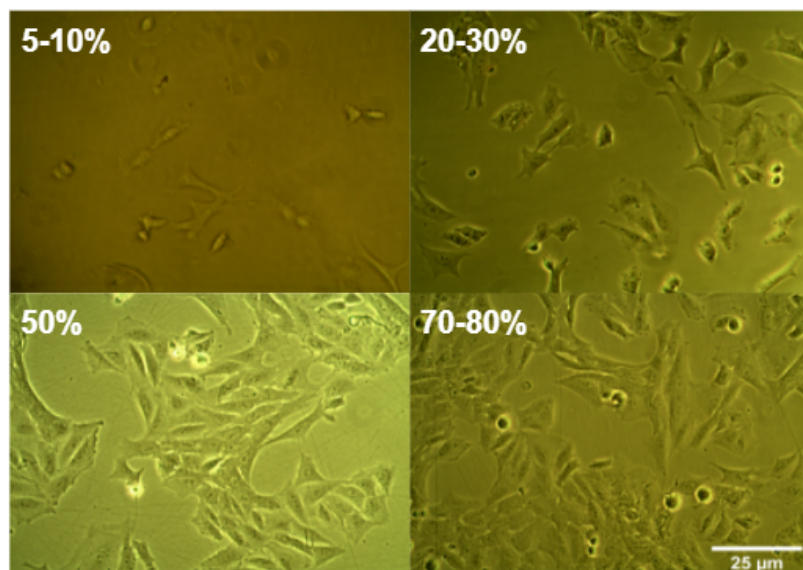


Figura 3: Expansión de la línea celular DI-TNC1. Imágenes representativas de la línea celular de astrocitos de rata DI-TNC1, a distintas confluencias del mismo cultivo (**A**: 5-10% confluencia; **B**: 20-30% confluencia; **C**: 50-60% confluencia; **D**: 70-80% confluencia) en medio RPMI, suplementado con FBS al 10%.

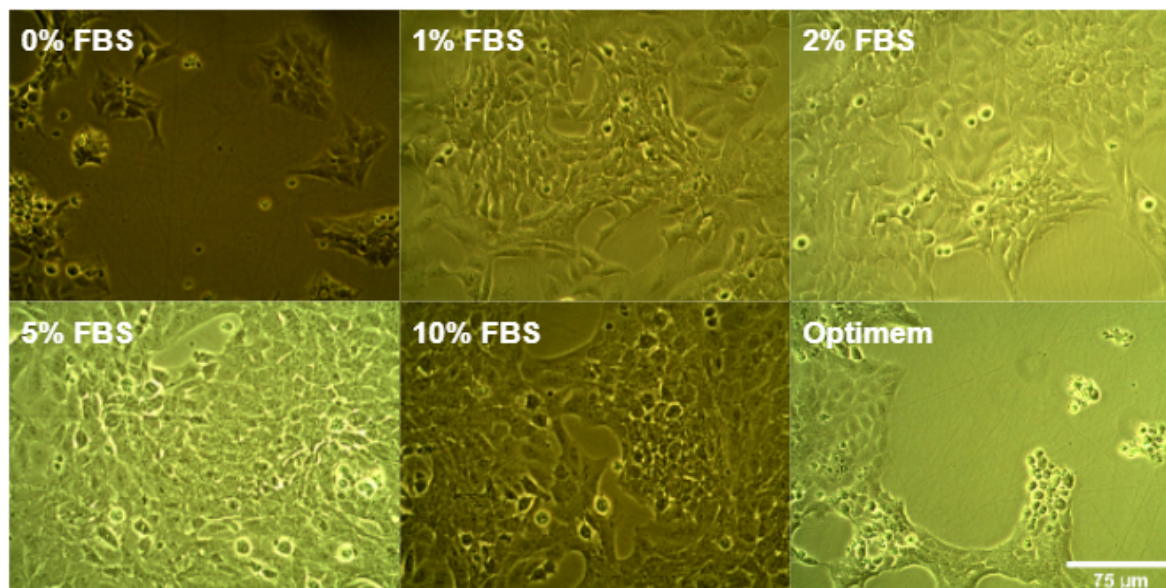


Figura 4: Crecimiento de la línea celular DI-TNC1 dependiente de FBS. Imágenes representativas de la línea celular DI-TNC1 mantenidas en distintas concentraciones de FBS durante 48 horas. Todos los pocillos fueron sembrados inicialmente con 52.000 células/mL.

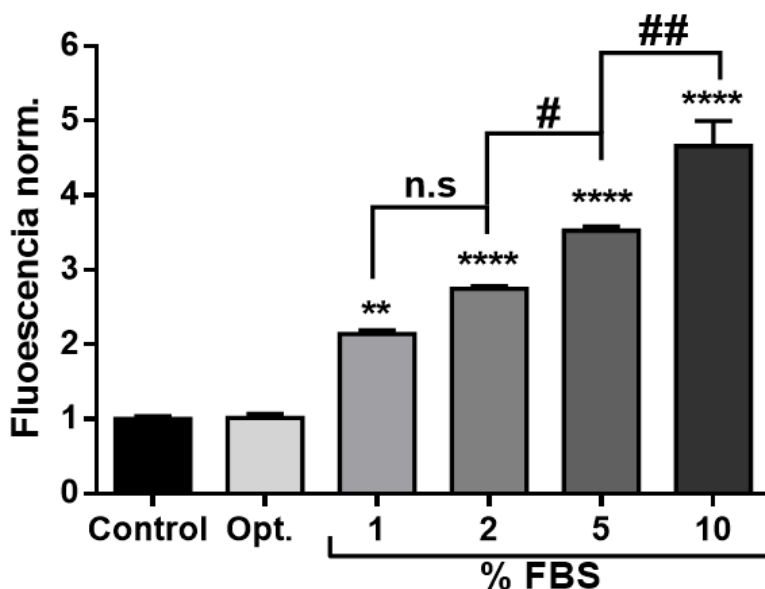


Figura 5. Determinación del metabolismo celular de la línea celular DI-TNC1 cultivada con distintas concentraciones de FBS: Se evaluó la capacidad metabólica de células DI-TNC1 luego de 48 horas de cultivo con 0 (control), 1, 2, 5 y 10% de FBS u Optimem, usando el kit Cell-Titer Blue, con un filtro verde (579 Ex/584 Em). Los valores son expresados como promedio de la intensidad de fluorescencia \pm SEM, normalizados por el promedio de la fluorescencia del medio sin suplementar (0% FBS Control). Los valores de significancia se expresan con respecto al grupo control (** $p < 0.002$; **** $p < 0.0001$) o entre distintas condiciones (# $p < 0.05$; ## $p < 0.002$). N=3.

6.1.2. Determinación de viabilidad de células DI-TNC1 tratadas con morfina.

Con el fin de evaluar si mantener a las células con concentraciones de FBS menores a la recomendada para células DI-TNC1 reduce la viabilidad de los cultivos tratados con morfina, se determinó la viabilidad celular luego de 48 horas de incubación con concentraciones crecientes de morfina. Para esto se co-incubaron células con morfina y FBS 1% o 2%. Se observó que la morfina afectó la viabilidad sólo a las concentraciones más altas estudiadas. Además, las curvas de viabilidad con FBS al 1% o al 2% presentan un valor de IC50 casi idéntico, cercano a 1 mM (**Figura 6**). Estos datos muestran que es posible estudiar el efecto del tratamiento con morfina en cultivos mantenidos con FBS al 1% en el medio de trabajo.

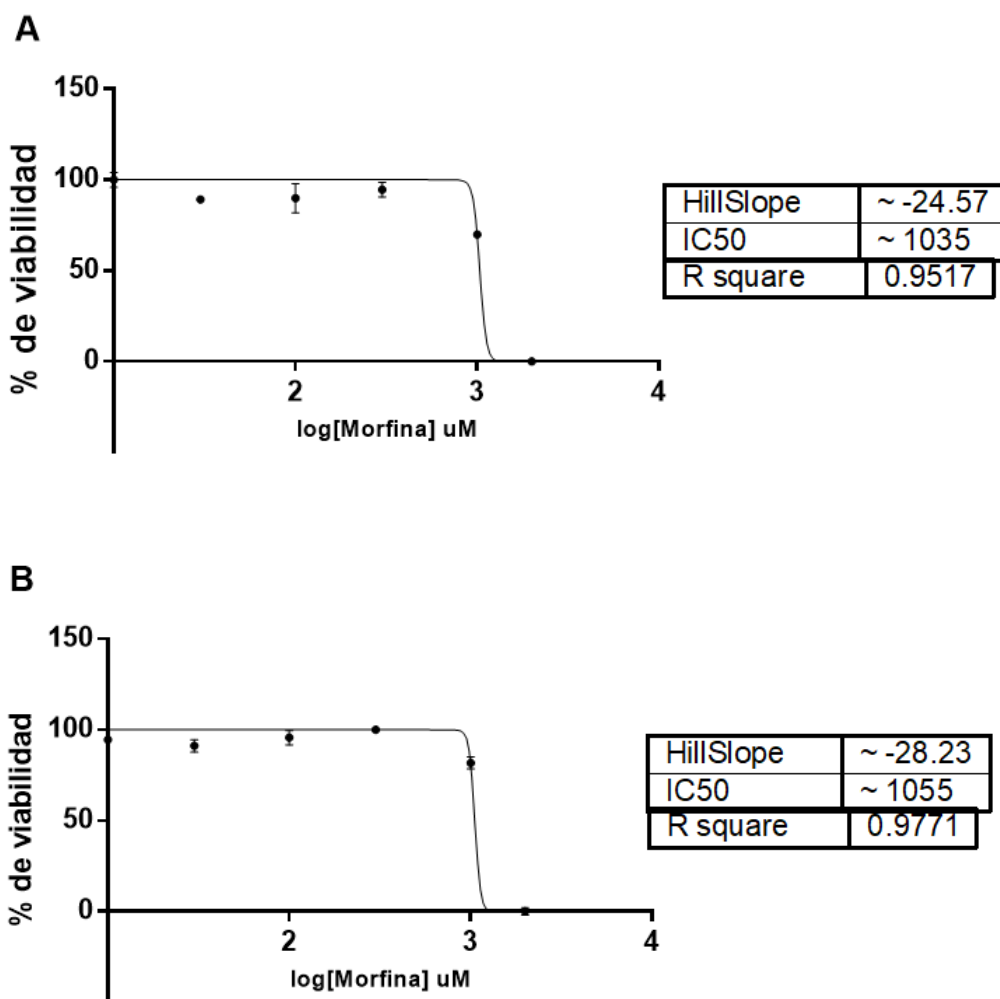


Figura 6. Curvas de viabilidad de la línea celular DI-TNC1 tratada con concentraciones crecientes de morfina. Curvas ajustadas de viabilidad para células tratadas durante 48 horas con distintas concentraciones de morfina en medio RPMI suplementado al 1% (A) y 2% (B) de FBS determinado mediante el kit Cell-Titer Blue. Los datos fueron analizados mediante un ajuste con una curva dosis-respuesta no lineal y la fluorescencia del medio control se consideró como 100% de viabilidad. Se presentan los valores respectivos de pendiente de la curva, IC50 y R de ajuste de cada curva. N=6.

6.1.3. Obtención de un modelo de astrocitos que genere estrés oxidativo en respuesta a la activación de TLR4.

Para determinar si este modelo celular (DI-TNC1) es apto para estudiar el efecto oxidante de los opioides se determinó si estas células responden a la activación de TLR4 generando estrés oxidativo. Para esto, se trató a células DI-TNC1 con 1 µg/mL LPS durante 1 hora.

Mediante la técnica de citometría de flujo no fue posible evidenciar un aumento del estrés oxidativo luego de la exposición a LPS, mientras que el tratamiento con 100 µM Sin-1, molécula que genera estrés oxidativo luego de su contacto con el medio acuoso, mostró un aumento significativo de estrés oxidativo intracelular (**Figura 7**).

Para confirmar estos resultados se realizaron dos estrategias diferentes para evaluar el estrés oxidativo generado por LPS en la línea celular, (i) mediante la medición del estrés oxidativo en células sembradas en placa de 96 pocillos (**Figura 8a**) y (ii) mediante medición del estrés oxidativo en lisado de astrocitos previamente sembrados y tratados a distintos tiempos con LPS y sonda DHDCFDA, en placas de 24 pocillos (**Figura 8b**). En concordancia con los datos obtenidos por citometría de flujo, en ningún caso se logró apreciar una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo tratado con LPS, por lo que se descartó el uso de la línea celular de astrocitos por su incapacidad de responder a LPS, control positivo de la activación de TLR4. Dado estos resultados, se decidió cambiar el enfoque hacia ensayos con cultivos primarios, potencialmente más representativos del efecto de los opioides *in vivo*, que los que pudieran obtenerse con el uso de líneas celulares.

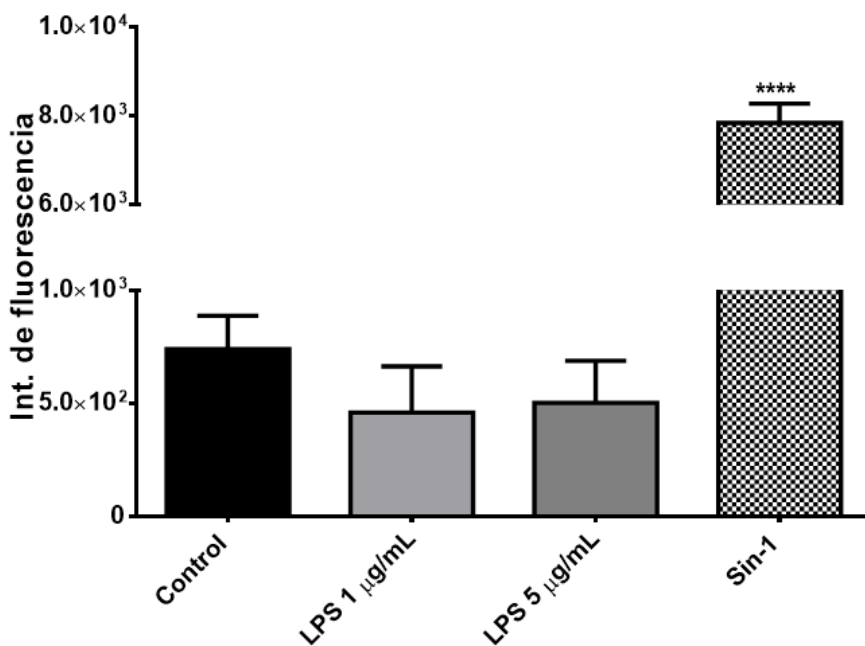


Figura 7. Efectos del LPS en la generación de estrés oxidativo en células DI-TNC1, evaluado mediante citometría de flujo. Medición de fluorescencia de astrocitos DI-TNC1 tratados durante 1 hora con LPS a 1 y 5 µg/mL o Sin-1 100 µM, usando DHDCFDA 20 µM como detector de ROS. Los valores son expresados como promedio de la intensidad de fluorescencia ± SEM. **** $p < 0.0001$ en comparación a todos los grupos experimentales. N=3.

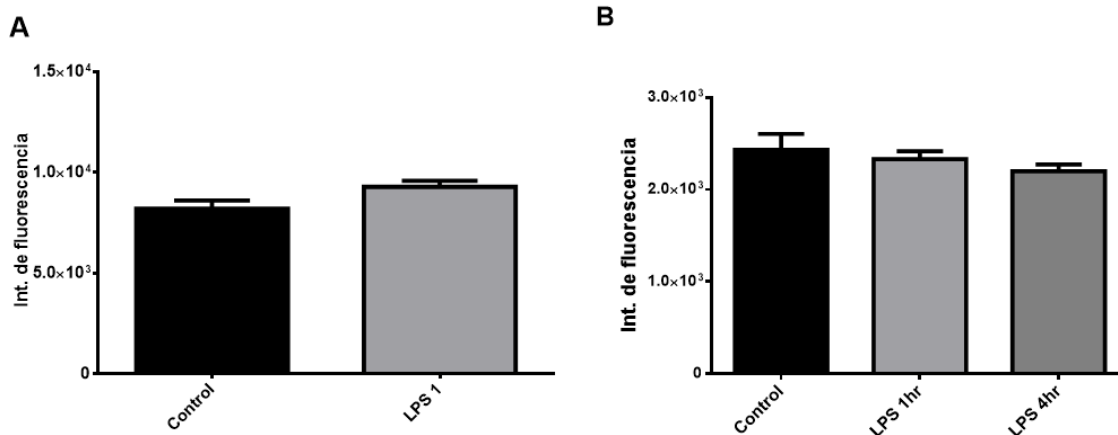


Figura 8. Determinación de estrés oxidativo en línea celular DI-TNC1, en respuesta a tratamiento con LPS, evaluado mediante fluorimetría. Los ensayos fueron medidos directamente en una placa negra de fondo transparente de 96 pozos sembrada con astrocitos y tratadas durante 1 hora con LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, (N=6) **(A)** y de astrocitos sembrados y tratados durante 1 o 4 horas con LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en placas de 24 pozos (N=8), lisados con buffer RIPA y luego transferidos a una placa de 96 pozos para la medición de fluorescencia en el lector de microplacas **(B)**. Los valores son expresados como promedio de la intensidad de fluorescencia \pm SEM. Se utilizó un filtro azul (Ex/Em: 492–495/517–527 nm) para la medición de fluorescencia de DHDCFDA.

6.1.4. Obtención de un modelo de microglías que generan estrés oxidativo en respuesta a incubación con opioides.

Al no observar un aumento de estrés oxidativo por el tratamiento de línea celular de astrocitos (DI-TNC1) con LPS, se optó por cambiar a un modelo de cultivos primarios de microglías, obtenidos a partir de cerebros de rata neonatal, ya que estas son las células cerebrales de mayor capacidad de respuesta oxidante y pro-inflamatoria [53,54 y 58].

Luego de preparar los cultivos mixtos de cerebros de rata, se purificaron las microglías mediante agitación mecánica. Se observó que las microglías que permanecían sobre los astrocitos **(Figura 9A)** fueron eficientemente removidas luego de la agitación **(Figura 9B)** y se adhirieron a placas pretratadas con poli-D-lisina **(Figura 9C)**.

El porcentaje de pureza de microglías a partir del cultivo mixto fue evaluado mediante inmunocitofluorescencia por recuento de núcleos totales vs células positivas para Iba-1 (marcador de microglía) y células positivas para GFAP (marcador de astrocitos) utilizando anticuerpos específicos (**Figura 10**). Los datos indican que se logró la separación eficiente de cada tipo celular, alcanzando un porcentaje de purificación del 86% para las microglías, con una baja contaminación de astrocitos (8%). Con estos resultados se decidió llevar a cabo las determinaciones de estrés oxidativo en estos cultivos primarios.

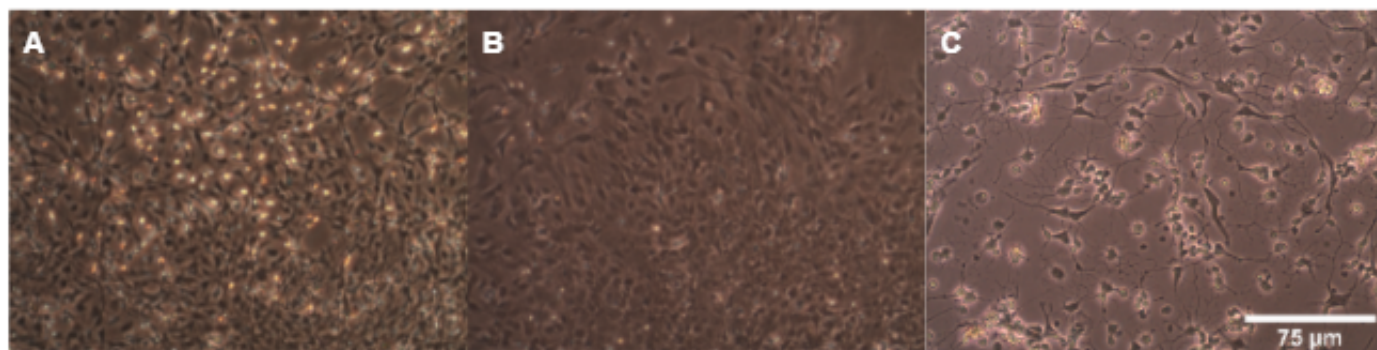


Figura 9. Caracterización de los cultivos primarios de microglía. Fotos representativas de los cultivos primarios mixtos (**A**) y purificados de astrocitos (**B**) y microglías (**C**). Las células del cultivo de microglías no se dividen, por lo que la imagen es representativa del sembrado a una densidad de 100.000 células/cm².

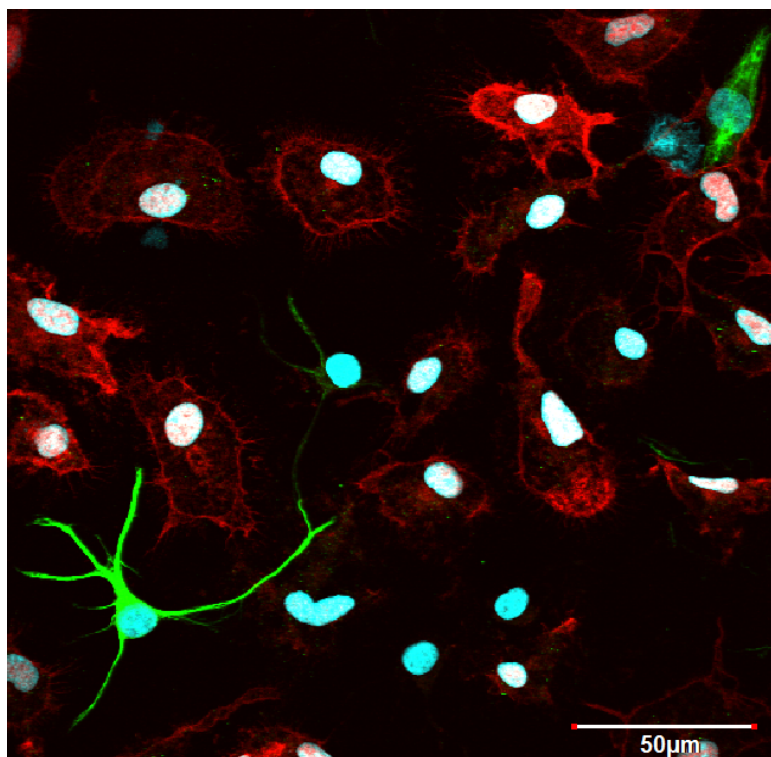


Figura 10. Determinación de calidad de la purificación de microglías mediante inmunocitofluorescencia. Foto representativa con aumento de 60x, de cultivos primarios de microglías purificados, marcados con anticuerpos fluorescentes contra Iba-1 (rojo marcador de microglía), GFAP (verde, marcador de astrocitos) y tinción DAPI (cyan, marcador de núcleos).

6.1.5. Determinación de la concentración óptima de sonda DHDCFDA para ensayos de determinación de ROS con cultivos primarios de microglías.

Se realizaron mediciones preliminares con cultivos primarios de microglía tratadas con Sin-1 100 μM , para determinar la intensidad de la señal generada por distintas concentraciones de sonda DHDCFDA (0.05, 1 y 20 μM) (**Figura 11**). La concentración de 50 nM no generó una señal por sobre el blanco (sin sonda, dato no mostrado). Para la concentración de 1 μM , la señal es detectable sólo en el caso de las células tratadas con Sin-1, no así en el medio control. Finalmente, la concentración 20 μM de DHDCFDA, demostró ser óptima para los ensayos de detección de ROS por citometría de flujo, generando un nivel basal de fluorescencia claramente diferenciable del tratamiento con Sin-1 100 μM .

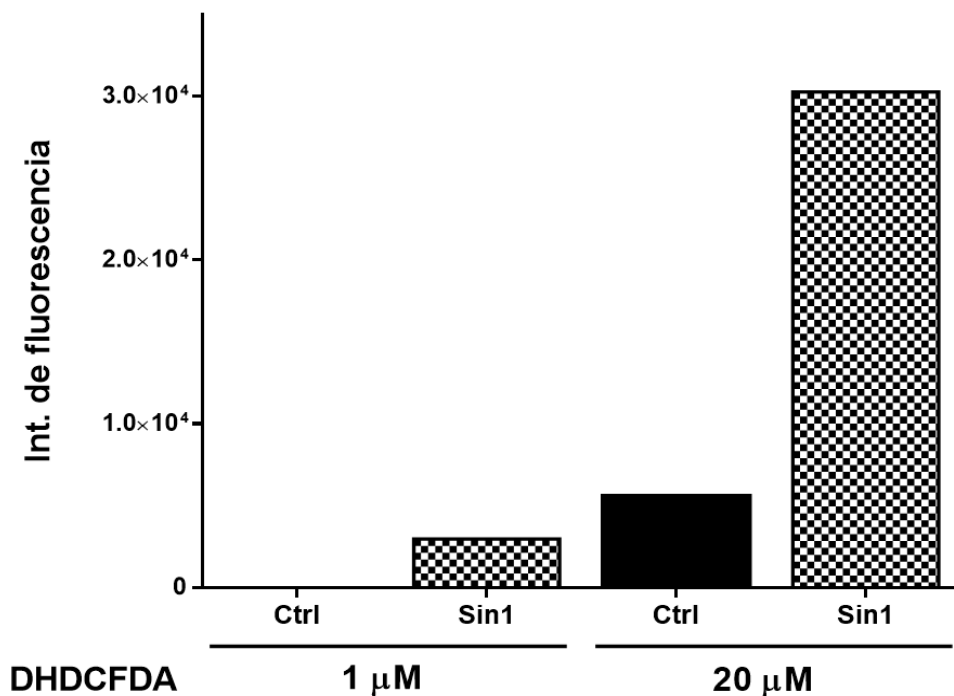


Figura 11.- Determinación de la concentración óptima de sonda DHDCFDA para detección de ROS por citometría de flujo en cultivos primarios de microglías. Medición de fluorescencia mediante citometría de flujo de cultivos primarios de microglías tratados con medio control o Sin-1 $100 \mu\text{M}$ durante una hora. Las células recibieron un pretratamiento de 30 minutos con DHDCFDA a concentración 1 y $20 \mu\text{M}$. Los valores son expresados como promedio de intensidad de fluorescencia. N=1.

6.1.6. Determinación de un modelo de microglías que genera estrés oxidativo en respuesta a la activación de TLR4.

Las primeras determinaciones de estrés oxidativo se realizaron en ensayos de citometría de flujo (**Figura 12**), al igual que para las células DI-TNC1, con el fin de establecer si las microglías responden con un aumento del estrés oxidativo luego del tratamiento con el agonista del receptor TLR4, LPS. Sin embargo, no se observaron mayores niveles de estrés oxidativo luego del tratamiento de microglías con LPS $1 \mu\text{g/mL}$ por 1 hora y posterior medición

de fluorescencia por citometría de flujo. Paralelamente se estudió si es posible detectar el aumento de estrés oxidativo luego del tratamiento de microglías con LPS en placas de 96 pocillos, cuantificando la fluorescencia generada por la oxidación de la sonda DHDCFDA mediante fluorimetría. Se probaron dos protocolos: (i) agregando la sonda DHDCFDA luego del tratamiento con LPS por 5 horas, no observándose un aumento de estrés oxidativo respecto del grupo control (**Figura 13A**). (ii) Por otra parte, en un segundo experimento las microglías fueron expuestas primero a la sonda DHDCFDA durante 30 minutos y luego tratadas con LPS o Sin-1 como control positivo. Además, se realizaron mediciones durante un mayor rango de tiempo. De esta forma, se logró observar el efecto oxidante, causado por el LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ desde la tercera hora de medición, llegando a un máximo aumento respecto del control sin tratamiento entre las 5 y 6 horas (**Figura 13B**). Por el contrario, la incubación de las microglías con LPS 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no tuvo efecto significativo en la generación de ROS. Con estos avances, se consideró el LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como un control válido de generación de ROS, lo que permitió la realización de los ensayos con opioides.

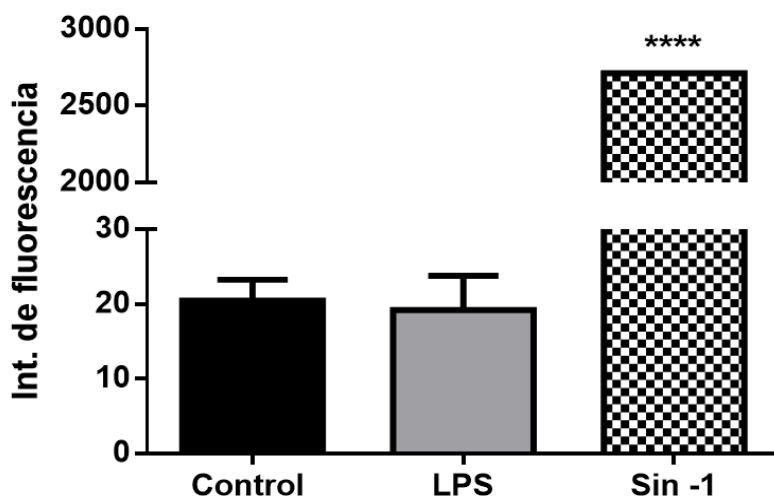
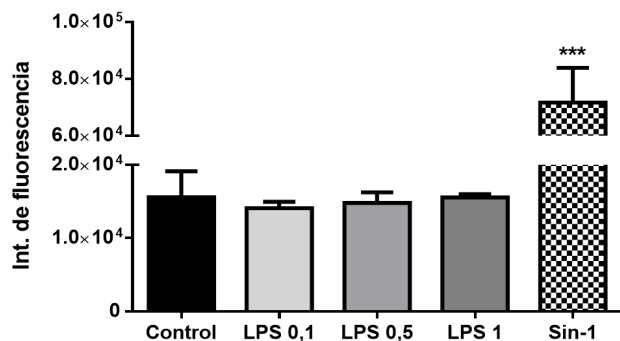


Figura 12. Determinación de estrés oxidativo mediante citometría de flujo en cultivos primarios de microglías. Promedio de la intensidad de fluorescencia \pm SEM, de cultivos primarios de microglías tratados por 30 minutos con DHDCFDA 20 μM y luego estimulados durante 1 hora, con LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y Sin-1 100 μM . N=3 (**** : $p < 0.0001$ vs control).

A



B

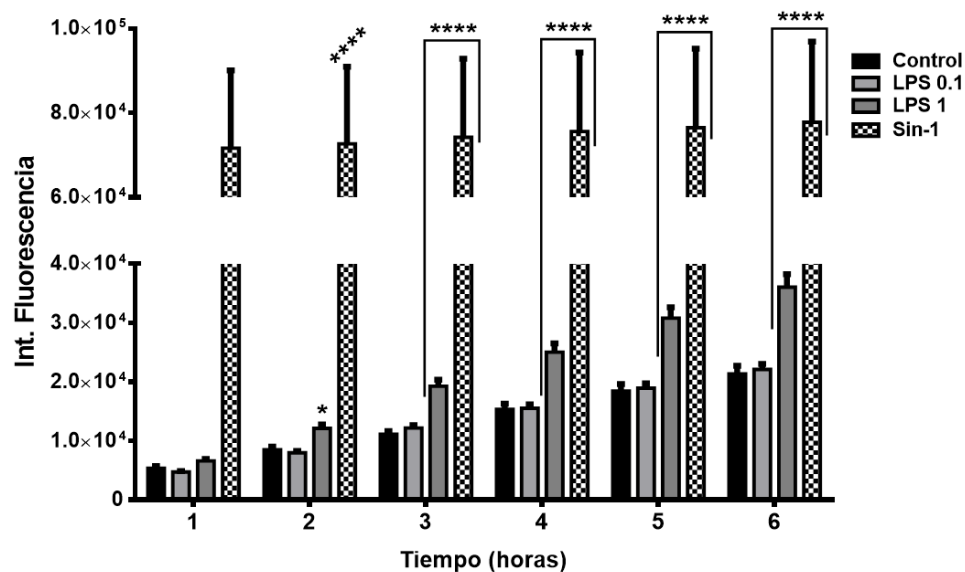


Figura 13. Determinación de ROS en cultivos primarios de microglías expuestos a LPS evaluado mediante fluorimetría. **A.-** Cultivos primarios de microglías fueron tratados durante 5 horas con LPS 0.1, 0.5 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y luego incubados con la sonda DHDCFDA durante 30 minutos (***) $p < 0.001$ vs control). **B.-** Las células fueron tratadas primero con DHDCFDA durante 30 minutos y luego estimuladas por 6 horas con LPS 0.1 o 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y Sin-1 100 μM (* $p < 0.05$; **** $p > 0.0001$ vs control). Las mediciones fueron realizadas en placas negras de 96 pocillos, y la fluorescencia medida con un filtro azul (Ex/Em:492–495/517–527 nm aprox). Los gráficos son representativos del promedio de la intensidad fluorescente \pm SEM. N=6 por condición experimental.

6.1.7 Determinación de estrés oxidativo en cultivos primarios de microglías tratados con opioides.

A partir de este modelo ya montado, se iniciaron los ensayos con opioides, en donde se probaron rangos de concentraciones de morfina y fentanilo durante la misma temporalidad discutida en el experimento anterior (hasta 6 horas). El objetivo fue determinar a qué concentración de morfina y fentanilo se observa un aumento consistente en la generación de ROS en cultivos primarios de microglías. Se observó que la incubación de las células con las diferentes concentraciones de morfina no generó un aumento en los niveles de ROS intracelular. Por el contrario, el tratamiento con morfina provocó una disminución de la intensidad de la señal, de manera apreciable a partir de la segunda hora de tratamiento y estadísticamente significativa a partir de la cuarta hora (**Figura 14A**). Se aprecia un comportamiento en la curva de concentraciones (campana invertida) que evidencia un mayor efecto antioxidante a concentraciones intermedias de morfina.

Basados en estos datos se tomó la decisión de no seguir trabajando con morfina en los ensayos siguientes, debido a que no fue capaz de aumentar la generación de ROS en nuestro modelo.

Se continuó con los análisis de fentanilo (**Figura 14B**), el cual si generó un aumento significativo en los niveles de estrés oxidativo, a partir de la tercera hora de medición. Dicho aumento se hizo más notorio a medida que pasó el tiempo, para concentraciones de 30 μM y superiores. Basados en estos datos, se fijó la concentración de fentanilo 30 μM para la realización de los ensayos para estudiar el efecto antioxidante del pretratamiento de microglías con secretoma de hMSC.

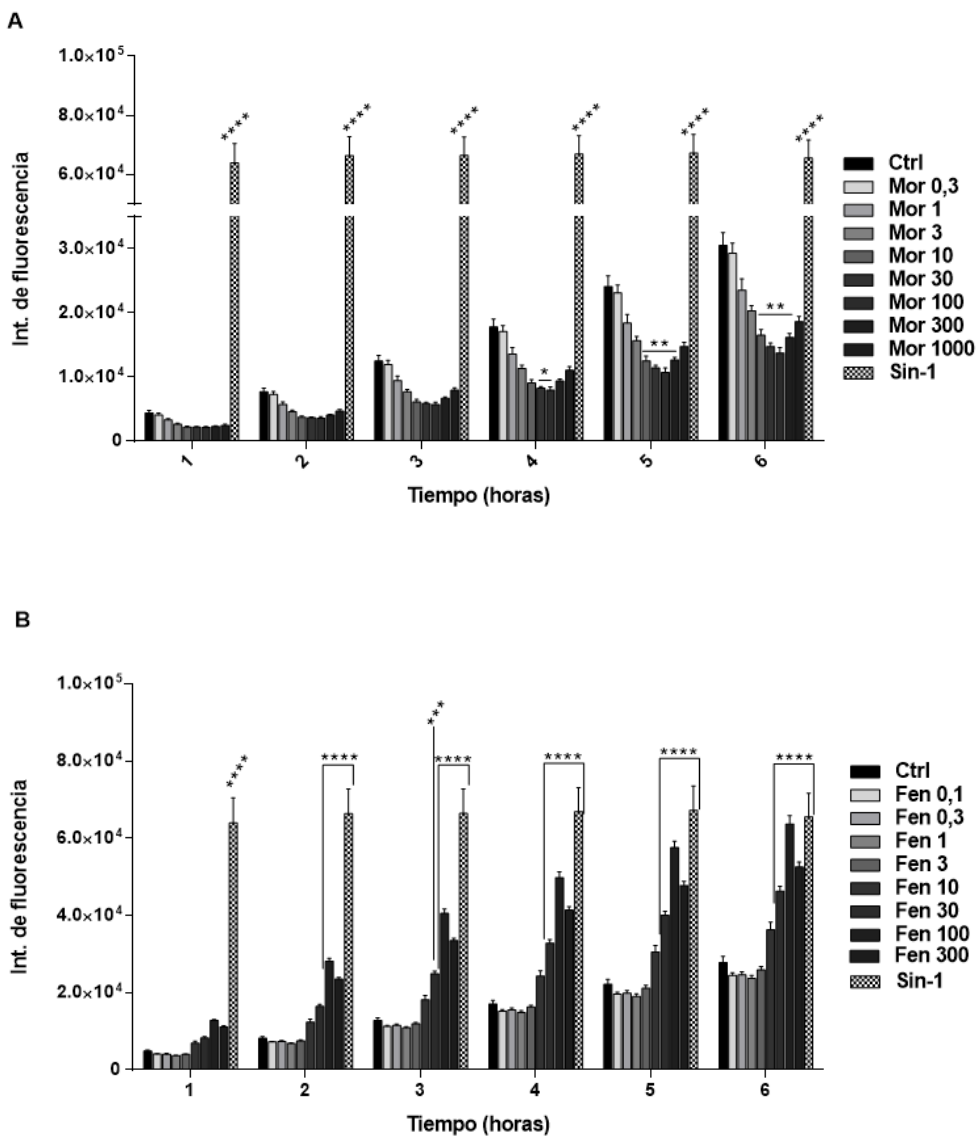


Figura 14.- Efecto de los opioides en los niveles intracelulares de ROS en cultivos primarios de microglía. Intensidad de fluorescencia de DHDCFDA, en microglías tratadas con distintas concentraciones micromolares (indicadas en cada gráfica) de morfina (**A**) y fentanilo (**B**), y Sin-1 100 μ M como control. Los gráficos son representativos de la media de la intensidad de fluorescencia, medida a cada hora en un lector de microplacas (Ex/Em: 492–495/517–527 nm). Los valores de significancia se evaluaron con respecto a la condición control. Cada barra representa el promedio de intensidad de fluorescencia \pm SEM. **** $p > 0.0001$ vs control, N=6 por condición experimental.

6.2. Determinar si la incubación con opioides aumenta los niveles de citoquinas pro-inflamatorias en cultivos primarios de microglías de rata.

6.2.1. Determinación de un modelo de microglías que aumenta sus niveles de citoquinas pro-inflamatorias en respuesta a la activación de TLR4.

De forma análoga a los experimentos anteriores, primero se buscó determinar si el tratamiento de las microglías con un agonista de receptores TLR4 (LPS) aumenta sus niveles de citoquinas pro-inflamatorias. En esta oportunidad, se analizó el nivel de mRNA de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6, IL-1 β , y TNF- α mediante RT-qPCR a partir del RNA de muestras de microglías tratadas o no con LPS 1 μ g/mL por 9 horas (**Figura 15**). Se observó un aumento significativo en las tres citoquinas estudiadas, siendo la IL-6 la que presentó el mayor aumento en su expresión, cercano a 700 veces sobre el control. Con estos resultados pudimos concluir que nuestro modelo de cultivos primarios de microglía fue capaz de responder frente a LPS, en términos de expresión de mRNA de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6, IL-1b y TNF- α . Esto dio pie a las mediciones en microglías tratadas con opioides.

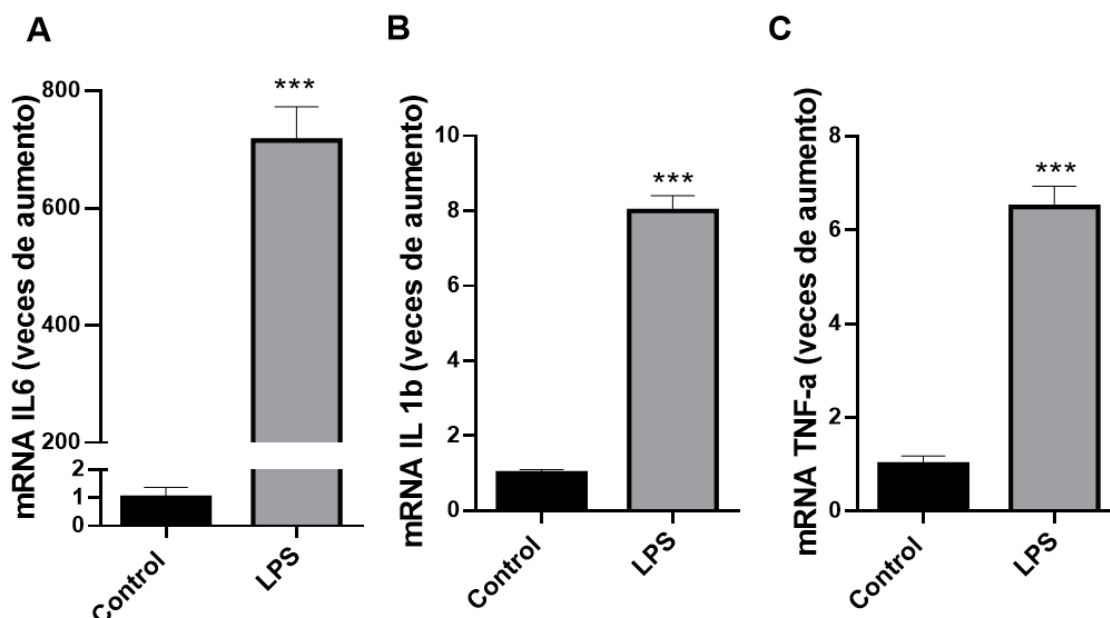


Figura 15. Determinación de expresión de citoquinas pro-inflamatorias en cultivos primarios de microglía tratados con LPS 1 µg/mL, mediante RT-qPCR. Niveles de mRNA (promedio ± SEM) de IL-6, IL-1β y TNF-α (A, B y C respectivamente), generado por el tratamiento por 9 horas con LPS 1 µg/mL o vehículo (control), normalizados frente a la expresión de β -actina como gen control, y expresados en función de veces de aumento sobre el control, *** $p > 0.001$ vs control, N=3.

6.2.2. Determinación de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias en cultivos primarios de microglías tratadas con opioides.

Una vez definido el efecto pro-inflamatorio del LPS, se probaron las concentraciones definidas en los ensayos de determinación de estrés oxidativo para morfina y fentanilo, (300 y 30 µM respectivamente), con el objetivo de evaluar si la incubación de las microglías con opioides es capaz de inducir el aumento en los niveles de mRNA de citoquinas pro-inflamatorias (**Figura 16**). El tratamiento de microglías con morfina no generó un aumento en los niveles de mRNA de las citoquinas pro-inflamatorias TNF-α e IL-1β, pero sí provocó un aumento significativo para IL-6, cercano al doble de la expresión observada en el grupo control sin tratamiento

(Figura 16A). Por otra parte, el aumento de los mRNA que codifican para citoquinas pro-inflamatorias generado por el tratamiento de microglías con fentanilo fue significativo solo para IL-1b (Figura 16B), pero se aprecia una tendencia al aumento en la expresión de todas las citoquinas estudiadas. Estos datos, en conjunto con el efecto antioxidante que se observó previamente para la morfina, nos llevaron a sólo estudiar el efecto de la exposición a fentanilo para los ensayos de tratamiento con secretoma.

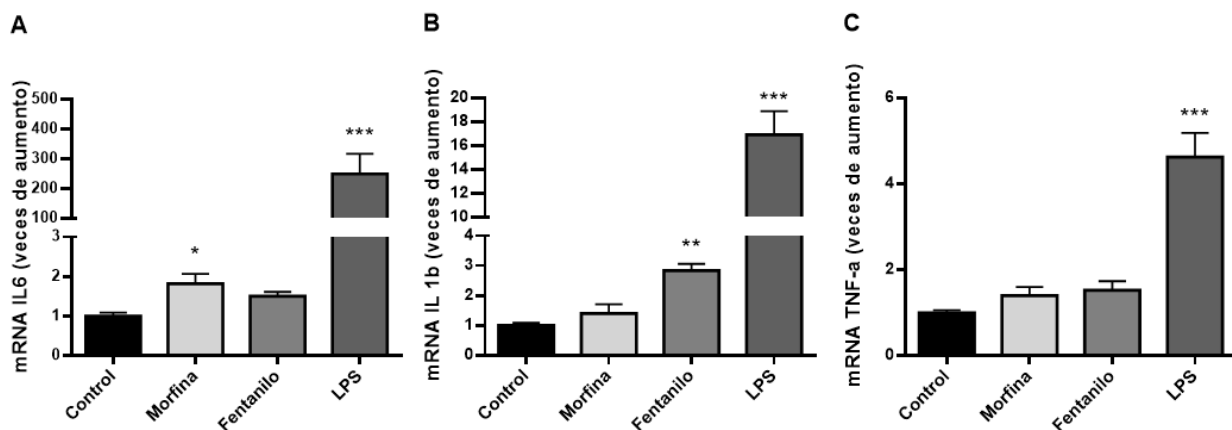


Figura 16. Efecto del tratamiento con opioides en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias. Niveles de mRNA (promedio \pm SEM) de IL-6, IL-1b y TNF- α (A, B y C respectivamente), generado por el tratamiento por 9 horas con medio DMEM como control, morfina 300 μ M, fentanilo 30 μ M o LPS 1 μ g/mL. Los datos están normalizados frente a la expresión de β -actina como gen control y expresados como veces de aumento sobre el control, * $p > 0.05$ vs control ** $p > 0.01$ vs control, *** $p > 0.001$ vs control. N=3.

6.3. Evaluar si el tratamiento con secretoma derivado de hMSC precondicionadas reduce el estrés oxidativo generado por el tratamiento con opioides en cultivos primarios de microglía.

6.3.1-Efecto del tratamiento con secretoma derivado de hMSC precondicionadas en los niveles de ROS generado por incubación de cultivos primarios de microglías con fentanilo.

El pre-tratamiento durante 24 horas, con diluciones de secretoma derivado de hMSC precondicionadas mostró una disminución en los niveles de ROS generados a partir de la exposición a fentanilo 30 μ M (**Figura 17**). Se logró reproducir el efecto oxidante causado por fentanilo, el cual es significativo a partir de la segunda hora de ensayo. Además, observamos un efecto antioxidante basal del secretoma. Interesantemente, las condiciones más diluidas de secretoma parecieran tener un efecto más pronunciado para disminuir los efectos oxidativos del fentanilo. Así, la dilución 1:30 generó la diferencia más marcada con respecto al tratamiento con fentanilo (F30), por lo que se eligió dicha dilución para los ensayos de expresión de citoquinas. El tratamiento con LPS en esta ocasión, generó un aumento de ROS significativo sólo a la sexta hora de medición.

Si bien, estos resultados parecen prometedores para demostrar el efecto antioxidante del secretoma, la repetición por duplicado del ensayo evidenció un comportamiento distinto (**Figura 18**). En esta oportunidad, no se observó efecto claro del tratamiento con secretoma, en ninguna de las diluciones. Por otra parte, los resultados muestran que el tratamiento de microglías con fentanilo 30 μ M aumenta su nivel de estrés oxidativo en forma consistente. Así, el pretratamiento de microglías con secretoma de hMSC solo redujo el estrés oxidativo generado por fentanilo 30 μ M en uno de tres ensayos, mostrando que el efecto antioxidante del secretoma en este sistema, si existe, es modesto.

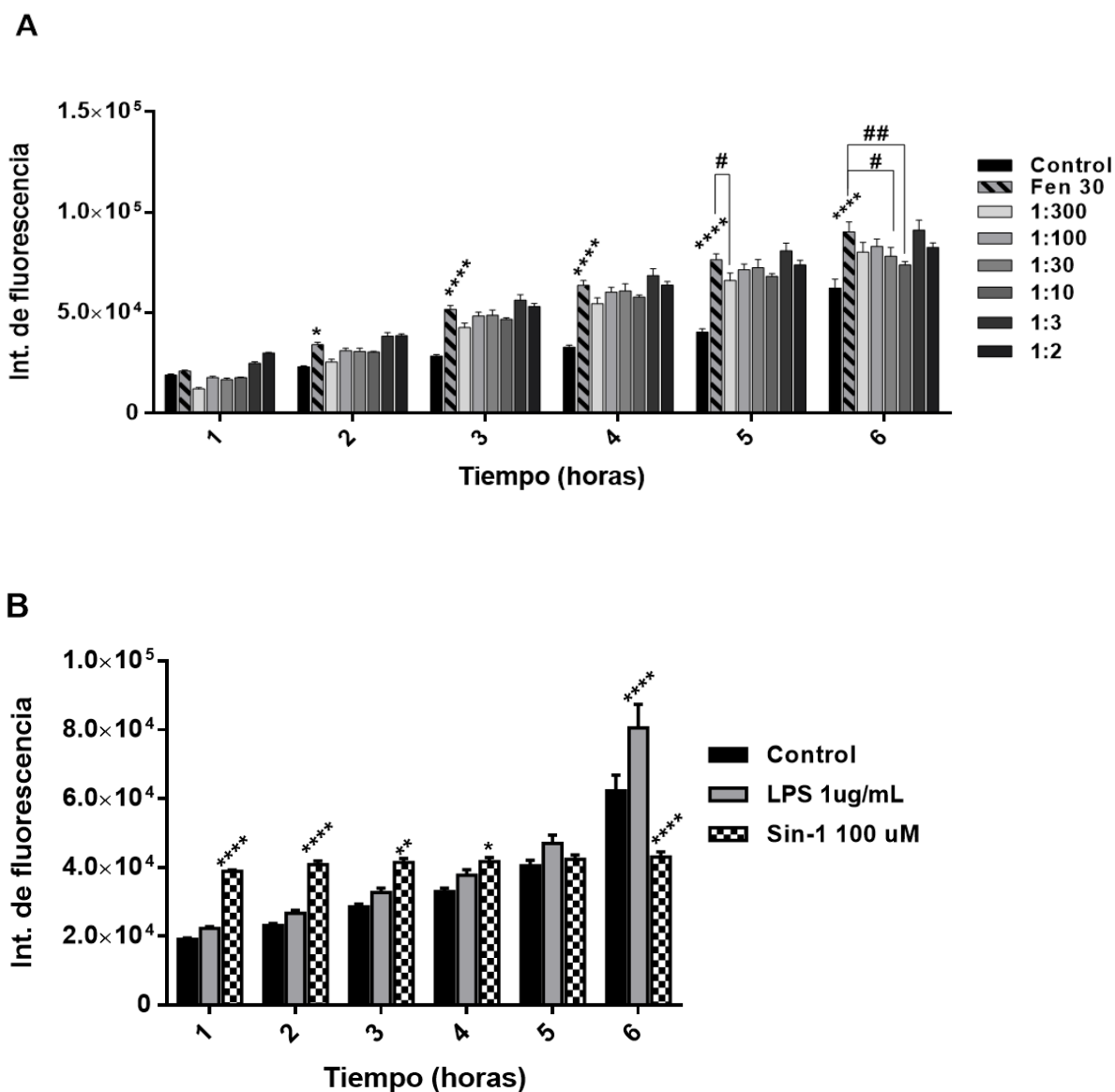


Figura 17. Efectos del tratamiento con secretoma en la generación de ROS. Medición de ROS intracelular, en lector de microplacas, de cultivos primarios de microglías tratados con opioides, con o sin el pretratamiento con secretoma en las proporciones indicadas, todas en medio con fentanilo 30 μM (A), además de los controles con LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ y Sin-1 100 μM (B). La fluorescencia fue medida con un filtro azul (Ex/Em: 492–495/517–527 nm) y graficada como el promedio de la intensidad de fluorescencia \pm SEM. * $p > 0.05$ vs control, ** $p > 0.002$ vs control, **** $p > 0.001$ vs control, # $p < 0,05$ vs Fen 30, ## $p < 0,0001$ vs Fen 30. N=6 por condición.

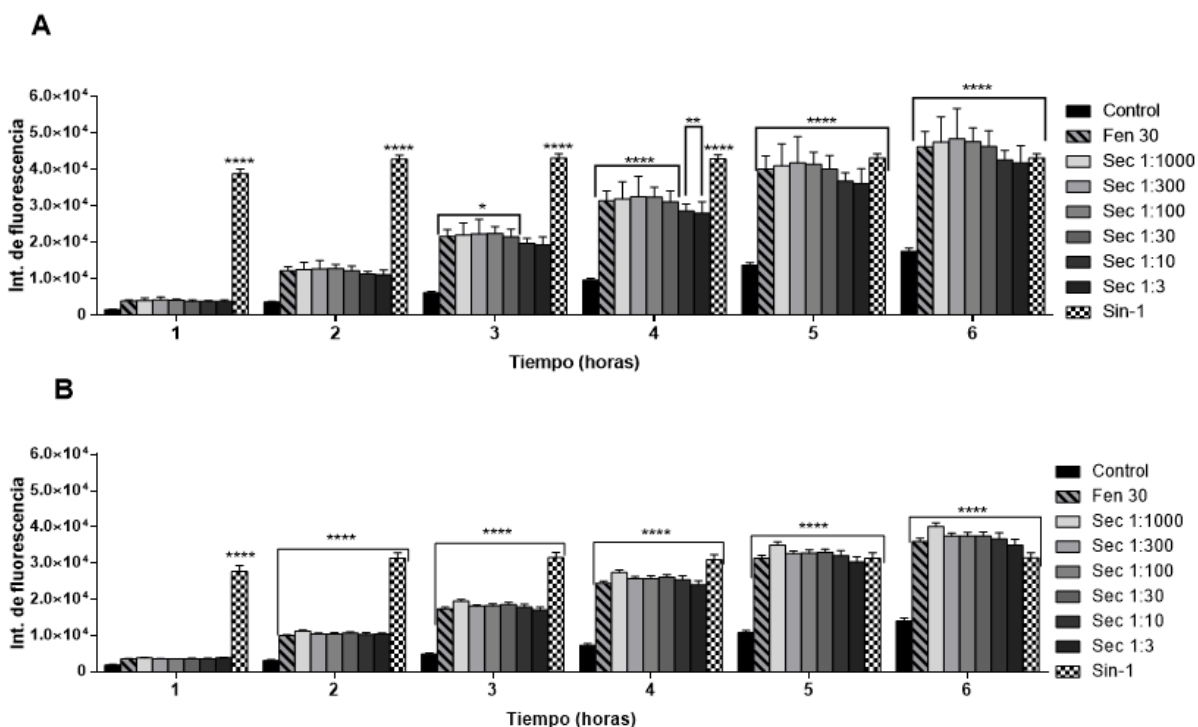


Figura 18. Efectos del tratamiento con secretoma en la generación de ROS. Repetición del ensayo anterior (Figura 17), usando las mismas condiciones y tratamiento de datos. Los gráficos fueron obtenidos a partir de 2 experimentos simultáneos, por 2 investigadores independientes (**A** y **B** respectivamente), a partir de cultivos primarios de microglías del mismo origen. Se utilizó, LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y Sin-1 100 μM . Los valores de significancia se evaluaron con respecto a la condición control. N=6 por condición experimental.

6.4. Evaluar si el tratamiento con secretoma derivado de hMSC precondicionadas reduce los niveles de citoquinas pro-inflamatorias generado por el tratamiento con opioides en cultivos primarios de microglía de rata.

6.4.1. El tratamiento con secretoma derivado de hMSC precondicionadas reduce el aumento de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias causado por fentanilo.

Al pretratar los cultivos primarios de microglía con secretoma derivados de hMSC precondicionadas en la relación 1:30 por 24 horas, se logró disminuir el efecto inflamatorio generado por el tratamiento con fentanilo 30 μ M por 9 horas (**Figura 19**). El tratamiento con secretoma redujo los niveles de mRNA hasta no ser significativamente diferentes del control, para el caso de IL-1b y TNF- α . El LPS en estos experimentos fue un potente inductor de las citoquinas pro-inflamatorias ensayadas, mostrando la capacidad del cultivo de microglías de responder a un activador de TLR4 de forma consistente.

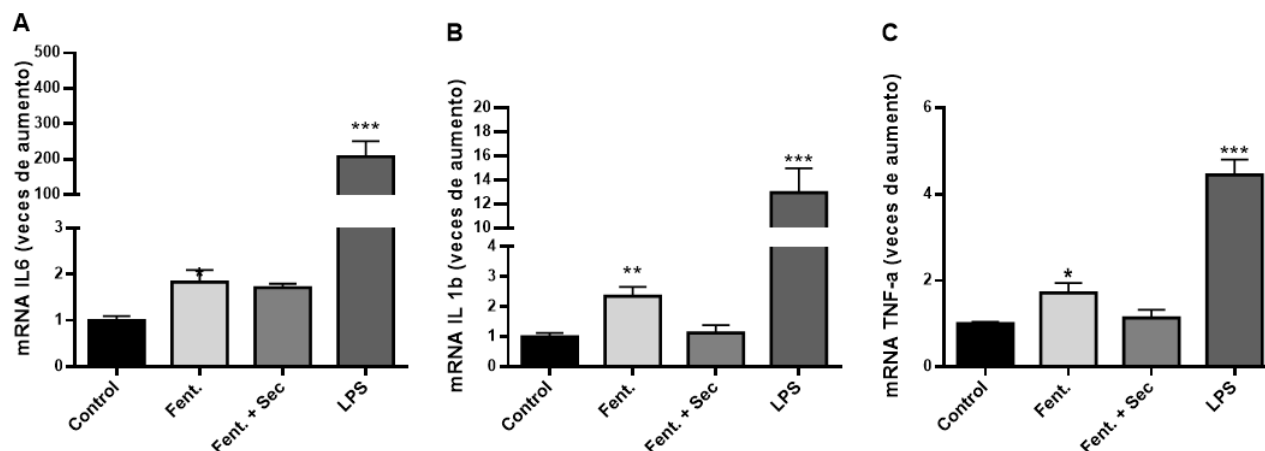


Figura 19. Tratamiento con secretoma derivado de hMSC preconditionadas reduce el aumento de expresión de citoquinas pro-inflamatorias causado por incubación con fentanilo. Aumento de IL-6, IL-1b y TNF- α (A, B y C respectivamente), generado por el tratamiento de cultivos primarios de microglías por 9 horas con fentanilo 30 μ M, con o sin el pretratamiento de 24 horas con secretoma (1:30). Los datos fueron normalizados frente a la expresión de β -actina como gen control y expresados como veces de aumento sobre el control. * $p > 0.05$ vs control, ** $p > 0.01$ vs control, *** $p > 0.001$ vs control, N=3 por condición experimental.

7. Discusión

Inicialmente en este trabajo se estudió si cultivos de microglías o astrocitos generaban un aumento de estrés oxidativo y de marcadores de inflamación luego del tratamiento con LPS, para determinar si los cultivos eran sensibles a su activación por un agonista de TLR4 como está reportado [44, 56 y 58]. Observamos que la línea celular inmortalizada de astrocitos de rata DI-TNC1 no generaba estrés oxidativo intracelular luego del tratamiento con LPS a las concentraciones y tiempos evaluados (Figuras 7 y 9). Por otra parte, al estudiar cultivos primarios de microglías de rata, estos si aumentaban sus niveles de estrés oxidativo luego del tratamiento con LPS (Figura 13b). Por este motivo, para los siguientes experimentos sólo se emplearon microglías de rata, ya que no logramos evidenciar que la línea celular de astrocitos (DI-TNC1) respondiera al tratamiento con LPS.

Esta decisión va de la mano con el uso de microglías, debido a que este tipo celular, posee un mayor potencial de respuesta frente a los estímulos inflamatorios y oxidativos [29, 57]. La posibilidad de trabajar con cultivos primarios de microglía, nos permitió establecer un modelo más cercano a la biología *in vivo*, en oposición al uso de una línea celular clonal. Sin embargo, el tratamiento de microglías con LPS sólo generó estrés oxidativo en forma significativa sobre el control cuando la sonda para detectarlo se agregó antes del tratamiento con LPS y esta estrategia no se ensayó con el cultivo celular de astrocitos, por lo que no se descarta que estas células pudiesen ser sensibles al aumento de generación de estrés oxidativo si se estudiara de esta manera.

Si bien, el método mecánico de purificación de microglías [80] demostró ser efectivo, generando un alto grado de pureza, cabe destacar que no se realizaron ensayos de caracterización de inmunoreactividad específica (marcadores CD11b, CD68, CD45 y MHC II) de los cultivos de microglía purificados a partir de cultivo primario mixto. Sin embargo, estudios en la literatura muestran que no debieran existir diferencias fenotípicas en los cultivos microgliales purificados en días distintos [81].

Posteriormente se estudió si las microglías aumentan sus niveles de estrés oxidativo o inflamación luego de la incubación con opioides. La incubación de microglías con fentanilo generó un aumento consistente en los niveles de estrés oxidativo al compararlo con microglías sin tratamiento, mientras que la incubación con morfina generó un efecto antioxidante (se redujeron los niveles de estrés oxidativo). El efecto antioxidante del tratamiento con morfina, a pesar de ser contrario a lo inicialmente propuesto, está respaldado por la literatura, en donde

la morfina en concentraciones terapéuticas, incluso a concentraciones sub-picomolares, es capaz de revertir el aumento de estrés oxidativo en cultivos de glía-neuronas generado por LPS [57, 82]. Sin embargo, los estudios sobre la relación entre la morfina y el estrés oxidativo son escasos, y los resultados que describen el rol pro o antioxidante de este opioide son contradictorios. El efecto antioxidante de la morfina ha sido descrito de manera independiente a la unión a los receptores de opioides, lo que lleva a la hipótesis de que uno o más mecanismos moleculares podrían explicar este efecto: por acción directa de *scavenging*, recuperación de los niveles de glutatión y/o inhibición de la NADPH oxidasa [42, 83-91]. Además, se ha demostrado que los agonistas opioides que generan internalización de receptores (DAMGO, β -endorfina, metadona y fentanilo), inducen fuertemente la síntesis de ROS vía activación de la fosfolipasa D2 (PLD2). Mientras que los agonistas que no generan endocitosis de receptores μ , ni activación de PLD2, como la morfina, son incapaces de inducir la generación de ROS en células reporteras HEK-293, que expresan receptores μ y PLD-2 [92]. Otro posible factor para la explicación del efecto antioxidante de la morfina es el hecho de que la señalización de opioides depende principalmente de receptores μ en microglías, mientras que en astrocitos depende mayoritariamente del TLR4 [93]. No se descarta que los astrocitos si puedan generar una respuesta oxidante frente al estímulo con morfina.

A continuación, estudiamos si el tratamiento con opioides promueve un aumento de los niveles de mRNA de marcadores de inflamación en microglías, específicamente los niveles de IL-6, IL-1 β , y TNF- α (Figura 16). Se observó que el tratamiento con morfina aumentó significativamente los niveles de IL-6, mientras que el tratamiento con fentanilo aumentó 3 veces los niveles de IL-1 β . Para el caso de TNF- α , sus niveles no aumentaron significativamente con ninguno de los dos tratamientos, pero sí se vio una tendencia al aumento tanto con morfina como fentanilo. Los resultados con morfina evidencian la dualidad del efecto de este opioide, al ser antioxidante y pro-inflamatorio simultáneamente. Se aleja de los objetivos de este trabajo discutir si el efecto neto del tratamiento con morfina *in vitro* puede reproducir el efecto neto que se evidenciaría *in vivo*, teniendo en cuenta la complejidad adicional de la presencia de otros tipos celulares en el cerebro y su particular estructuración. Por otra parte, el efecto del fentanilo fue consistentemente oxidante y pro-inflamatorio, por lo que los estudios del efecto preventivo del tratamiento con secretoma solo se evaluaron con este opioide.

Finalmente, se estudió si el pretratamiento con secretoma derivado de hMSC precondicionadas impide el aumento de estrés oxidativo y de marcadores de inflamación

causados por el tratamiento de microglías con fentanilo. El pretratamiento con secretoma sólo previno el aumento de estrés oxidativo causado por fentanilo en uno de tres experimentos (Figuras 17 y 18), mostrando que, de existir un efecto antioxidante del secretoma en este sistema, este solo es moderado. Por otra parte, se observó que el fentanilo aumentó significativamente los niveles de las 3 citoquinas estudiadas (IL-6, IL-1 β , y TNF- α) y que el pretratamiento con secretoma impidió que se produjeran estos aumentos (Figura 19), efecto previamente observado en la literatura, donde el secretoma es capaz de revertir el estrés oxidativo y la inflamación generada por sustancias de abuso en modelos animales [77, 79].

El hecho de que el aumento de estrés oxidativo y de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias sólo sean significativos en algunos ensayos puede ser causado por una subóptima reproducibilidad en el estado de activación basal de las microglías de rata purificadas. Existen reportes de una activación espontánea de las microglías extraídas mediante el método usado en este trabajo que alteran los niveles de citoquinas pro y antiinflamatorias secretadas, pudiendo afectar las mediciones [94]. Como alternativa a futuro, se podrían emplear distintos métodos de purificación de estas células, como la digestión suave con tripsina, con el fin de evaluar si este u otros métodos logran aumentar la reproducibilidad de los resultados al generar cultivos microgliales primarios más sensibles al tratamiento, en términos de generación de ROS y marcadores inflamatorios, en donde también el LPS funcione como control robusto de la activación de TLR4 y el tratamiento con secretoma de hMSC pueda tener un impacto más evidente [95, 96]. Otra posible manera de resolver esta heterogeneidad de los cultivos primarios sería mediante el uso de la línea celular de microglías (BV-2), en la cual ha sido demostrada una potente activación de TLR4 mediante la estimulación con LPS [97, 98].

Dicha heterogeneidad celular, se consideró como una posible causa de que la generación de ROS por exposición a LPS en cultivos primarios de microglía mostrara una señal diferenciable a la del control sólo alguna de las veces que se realizaron estos ensayos, comportamiento opuesto a lo reportado en la literatura [48]. Debido a esto, se consideró que el efecto reproducible del aumento de ROS por el tratamiento con fentanilo, y no con LPS, fue suficiente para determinar que el modelo es viable para este estudio. Además, la señal estable y reproducible de Sin-1 confirmaron que la técnica funcionaba correctamente. No se descarta un posible sesgo de publicación en la literatura, que no reporta estos datos inconsistentes.

8. Conclusiones

En el presente trabajo se logró generar un modelo representativo de cultivos primarios de microglías de rata neonatal, a partir de cultivos primarios mixtos. En dicho modelo, se demostró que el tratamiento con fentanilo 30 μ M, generó un aumento significativo tanto en los niveles de estrés oxidativo como en los niveles de mRNA de las citoquinas pro-inflamatorias estudiadas (TNF- α , IL-6 e IL-1 β).

Dicho efecto pudo ser revertido con el pretratamiento de las células con secretoma derivado de hMSC preconditionadas sólo para el caso de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias. En los ensayos para determinar el aumento de los niveles de ROS, el pretratamiento con secretoma generó un efecto leve, pero no significativo en la reducción de ROS causado por fentanilo 30 μ M.

Contrario a lo propuesto, la morfina generó un efecto antioxidante en los cultivos primarios de microglía. Sin embargo, evidenció una tendencia pro-inflamatoria leve, la cual fue significativa solo para el caso del mRNA de IL-6.

En conclusión, este estudio logró demostrar un efecto benéfico del tratamiento con secretoma derivado de hMSC preconditionadas en cultivos primarios de microglías, frente a la acción detrimental del fentanilo, en términos de generación de ROS y aumento en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias. Los resultados aportan nueva evidencia sobre los mecanismos mediante los cuales los opioides aumentan el estrés oxidativo e inflamación, potencialmente generando cambios necesarios para el desarrollo, establecimiento y mantención de la adicción y como el uso de secretoma derivado hMSC puede afectar este proceso de manera terapéutica.

9. Referencias

1. Powell, D., Pacula, R. L., & Taylor, E. (2020). How increasing medical access to opioids contributes to the opioid epidemic: evidence from Medicare Part D. *Journal of health economics*, 71, p 102286.
2. Cicero, T. J., & Ellis, M. S. (2017). The prescription opioid epidemic: a review of qualitative studies on the progression from initial use to abuse. *Dialogues in clinical neuroscience*, 19(3), p 259.
3. Harocopos, A., Allen, B., & Paone, D. (2016). Circumstances and contexts of heroin initiation following non-medical opioid analgesic use in New York City. *International Journal of Drug Policy*, 28, p106-112.
4. Gomes, T., Tadrous, M., Mamdani, M. M., Paterson, J. M., & Juurlink, D. N. (2018). The burden of opioid-related mortality in the United States. *JAMA Network Open*, 1(2), e180217-e180217.
5. Weiner, S. G., Baker, O., Bernson, D., & Schuur, J. D. (2020). One-year mortality of patients after emergency department treatment for nonfatal opioid overdose. *Annals of emergency medicine*, 75(1), p 13-17.
6. Hedegaard, H., Miniño, A. M., & Warner, M. (2020). Drug overdose deaths in the United States, 1999-2018.
7. Wilson, N., Kariisa, M., Seth, P., Smith IV, H., & Davis, N. L. (2020). Drug and opioid-involved overdose deaths—United States, 2017–2018. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 69(11), p 290.
8. de Drogas, O. C. (2017). Décimo segundo Estudio Nacional de drogas en población general de Chile 2010. Santiago de Chile: SENDA. Extraído en: <http://www.senda.gob.cl/wp-content/uploads/2017/12/InformeENPG2016.pdf>.
9. de Drogas, O. C. (2019). Décimo segundo Estudio Nacional de drogas en población general de Chile 2010. Santiago de Chile: SENDA. Extraído en: <https://www.senda.gob.cl/wp-content/uploads/2020/02/ENPEG-2018.pdf>.
10. Gladden, R. M., Martinez, P., & Seth, P. (2016). Fentanyl law enforcement submissions and increases in synthetic opioid-involved overdose deaths—27 states, 2013–2014. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 65(33), p 837-843.

11. O'Donnell, J. K., Halpin, J., Mattson, C. L., Goldberger, B. A., & Gladden, R. M. (2017). Deaths involving fentanyl, fentanyl analogs, and U-47700—10 states, July–December 2016. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 66(43), p 1197.
12. Fischer, B., Jones, W., Tyndall, M., & Kurdyak, P. (2020). Correlations between opioid mortality increases related to illicit/synthetic opioids and reductions of medical opioid dispensing-exploratory analyses from Canada. *BMC Public Health*, 20(1), p 1-7.
13. Waldhoer, M., Bartlett, S. E., & Whistler, J. L. (2004). Opioid receptors. *Annual review of biochemistry*, 73(1), p 953-990.
14. Stein, C. (2016). Opioid receptors. *Annual review of medicine*, 67, p 433-451.
15. Al-Hasani, R., & Bruchas, M. R. (2011). Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 115(6), p 1363-1381.
16. Johnson, S. W., & North, R. A. (1992). Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *Journal of neuroscience*, 12(2), p 483-488.
17. Scofield, M. D., Heinsbroek, J. A., Gipson, C. D., Kupchik, Y. M., Spencer, S., Smith, A. C. W. & Kalivas, P. W. (2016). The nucleus accumbens: mechanisms of addiction across drug classes reflect the importance of glutamate homeostasis. *Pharmacological reviews*, 68(3), p 816-871.
18. Trigo, J. M., Martín-García, E., Berrendero, F., Robledo, P., & Maldonado, R. (2010). The endogenous opioid system: a common substrate in drug addiction. *Drug and alcohol dependence*, 108(3), p 183-194..
19. Baik, J. H. (2013). Dopamine signaling in reward-related behaviors. *Frontiers in neural circuits*, 7, p 152.
20. Bowers, M. S., & Kalivas, P. W. (2003). Forebrain astroglial plasticity is induced following withdrawal from repeated cocaine administration. *European Journal of Neuroscience*, 17(6), p 1273-1278.
21. Haydon, P. G. (2001). GLIA: listening and talking to the synapse. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(3), p 185-193.
22. Wise, R. A. (2008). Dopamine and reward: the anhedonia hypothesis 30 years on. *Neurotoxicity research*, 14(2), 169-183.

23. Narita, M., et al. (2006). Direct evidence of astrocytic modulation in the development of rewarding effects induced by drugs of abuse. *Neuropsychopharmacology*, 31(11), p 2476-2488.
24. Liu, X. L., Li, L., Li, J. N., Tang, J. H., Rong, J. H., Liu, B., & Hu, Z. X. (2017). Quantifying absolute glutamate concentrations in nucleus accumbens of prescription opioid addicts by using 1H MRS. *Brain and behavior*, 7(8), e00769.
25. Kalivas, P. W. (2009). The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nature reviews neuroscience*, 10(8), p 561-572.
26. Scofield, M. D., & Kalivas, P. W. (2014). Astrocytic dysfunction and addiction: consequences of impaired glutamate homeostasis. *The Neuroscientist*, 20(6), p 610-622.
27. Ho, I. K., Feng, Y. Z., Tokuyama, S., Hoshi, K., & Rockhold, R. W. (1997). Glutamate in opioid dependence. *Japanese journal of psychopharmacology*, 17(4), p 175-180.
28. Colombo, E., & Farina, C. (2016). Astrocytes: key regulators of neuroinflammation. *Trends in immunology*, 37(9), p 608-620.
29. Kraft, A. D., & Harry, G. J. (2011). Features of microglia and neuroinflammation relevant to environmental exposure and neurotoxicity. *International journal of environmental research and public health*, 8(7), p 2980-3018.
30. Mansouri, M. T., Naghizadeh, B., Ghorbanzadeh, B., Amirgholami, N., Houshmand, G., & Alboghobeish, S. (2020). Venlafaxine inhibits naloxone-precipitated morphine withdrawal symptoms: Role of inflammatory cytokines and nitric oxide. *Metabolic brain disease*, 35(2), p 305-313.
31. Auvity, S., Saba, W., Goutal, S., Leroy, C., Buvat, I., Cayla, J., ... & Tournier, N. (2017). Acute morphine exposure increases the brain distribution of [18F] DPA-714, a PET biomarker of glial activation in nonhuman primates. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 20(1), p 67-71.
32. Auvity, S., Saba, W., Goutal, S., Leroy, C., Buvat, I., Cayla, J., ... & Tournier, N. (2017). Acute morphine exposure increases the brain distribution of [18F] DPA-714, a PET biomarker of glial activation in nonhuman primates. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 20(1), p 67-71.
33. J Roberts-Wolfe, D., & W Kalivas, P. (2015). Glutamate transporter GLT-1 as a therapeutic target for substance use disorders. *CNS & Neurological Disorders-Drug*

- Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders), 14(6), p 745-756.
34. McCarthy, G. M., Warden, A. S., Bridges, C. R., Blednov, Y. A., & Harris, R. A. (2018). Chronic ethanol consumption: role of TLR3/TRIF-dependent signaling. *Addiction biology*, 23(3), p 889-903.
 35. Quintanilla, M. E., Morales, P., Ezquer, F., Ezquer, M., Herrera-Marschitz, M., & Israel, Y. (2018). Commonality of ethanol and nicotine reinforcement and relapse in Wistar-derived UChB rats: inhibition by N-acetylcysteine. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 42(10), p 1988-1999.
 36. Dietrich, J. B., Mangeol, A., Revel, M. O., Burgun, C., Aunis, D., & Zwiller, J. (2005). Acute or repeated cocaine administration generates reactive oxygen species and induces antioxidant enzyme activity in dopaminergic rat brain structures. *Neuropharmacology*, 48(7), p 965-974.
 37. Yadav, S. K., Nagar, D. P., & Bhattacharya, R. (2020). Effect of fentanyl and its three novel analogues on biochemical, oxidative, histological, and neuroadaptive markers after sub-acute exposure in mice. *Life sciences*, 246, p 117400.
 38. Famitafreshi, H., & Karimian, M. (2020). Reduction of anxiety level is associated with an oxidative-stress imbalance in the hippocampus in morphine administration period in male rats. *Journal of addictive diseases*, 38(1), p 64-70.
 39. Famitafreshi, H., & Karimian, M. (2018). Socialization alleviates burden of oxidative-stress in hippocampus and prefrontal cortex in morphine addiction period in male rats. *Current molecular pharmacology*, 11(3), p 254-259.
 40. Salarian, A., Kadkhodae, M., Zahmatkesh, M., Seifi, B., Bakhshi, E., Akhondzadeh, S., ... & Arbabi, M. (2018). Opioid use disorder induces oxidative stress and inflammation: the attenuating effect of methadone maintenance treatment. *Iranian journal of psychiatry*, 13(1), p 46.
 41. Xu, B., Wang, Z., Li, G., Li, B., Lin, H., Zheng, R., & Zheng, Q. (2006). Heroin-administered mice involved in oxidative stress and exogenous antioxidant-alleviated withdrawal syndrome. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 99(2), p 153-161.
 42. Guzmán, D. C., Vázquez, I. E., Brizuela, N. O., Alvarez, R. G., Mejía, G. B., García, E. H., ... & Olguín, H. J. (2006). Assessment of oxidative damage induced by acute doses

- of morphine sulfate in postnatal and adult rat brain. *Neurochemical research*, 31(4), p549-554.
43. Gutowicz, M., Kaźmierczak, B., & Barańczyk-Kuźma, A. (2011). The influence of heroin abuse on glutathione-dependent enzymes in human brain. *Drug and alcohol dependence*, 113(1), p 8-12.
 44. Skrabalova, J., Drastichova, Z., & Novotny, J. (2013). Morphine as a potential oxidative stress-causing agent. *Mini-reviews in organic chemistry*, 10(4), p 367-372.
 45. Zhang, P., Yang, M., Chen, C., Liu, L., Wei, X., & Zeng, S. (2020). Toll-like receptor 4 (TLR4)/opioid receptor pathway crosstalk and impact on opioid analgesia, immune function, and gastrointestinal motility. *Frontiers in Immunology*, 11, p 1455.
 46. Rekatsina, M., Paladini, A., Piroli, A., Zis, P., Pergolizzi, J. V., & Varrassi, G. (2020). Pathophysiology and therapeutic perspectives of oxidative stress and neurodegenerative diseases: a narrative review. *Advances in therapy*, 37(1), p 113-139.
 47. Hutchinson, M. R., Northcutt, A. L., Hiranita, T., Wang, X., Lewis, S. S., Thomas, J., ... & Galer, E. (2012). Opioid activation of toll-like receptor 4 contributes to drug reinforcement. *Journal of Neuroscience*, 32(33), p 11187-11200
 48. Stevens, C. W., Aravind, S., Das, S., & Davis, R. L. (2013). Pharmacological characterization of LPS and opioid interactions at the toll-like receptor 4. *British journal of pharmacology*, 168(6), p 1421-1429.
 49. Wu, R., & Li, J. X. (2020). Toll-like receptor 4 signaling and drug addiction. *Frontiers in Pharmacology*, 11.
 50. Qian, J., Zhu, Y., Bai, L., Gao, Y., Jiang, M., Xing, F., ... & Xu, J. T. (2020). Chronic morphine-mediated upregulation of high mobility group box 1 in the spinal cord contributes to analgesic tolerance and hyperalgesia in rats. *Neurotherapeutics*, 17(2), p 722-742.
 51. Shibasaki, M., Sasaki, M., Miura, M., Mizukoshi, K., Ueno, H., Hashimoto, S., ... & Amaya, F. (2010). Induction of high mobility group box-1 in dorsal root ganglion contributes to pain hypersensitivity after peripheral nerve injury. *Pain*, 149(3), p 514-521.
 52. Cahill, C. M., & Taylor, A. M. (2017). Neuroinflammation—a co-occurring phenomenon linking chronic pain and opioid dependence. *Current opinion in behavioral sciences*, 13, p 171-177.

53. Hutchinson, M. R., Zhang, Y., Shridhar, M., Evans, J. H., Buchanan, M. M., Zhao, T. X., ... & Watkins, L. R. (2010). Evidence that opioids may have toll-like receptor 4 and MD-2 effects. *Brain, behavior, and immunity*, 24(1), p 83-95.
54. Song, P., & Zhao, Z. Q. (2001). The involvement of glial cells in the development of morphine tolerance. *Neuroscience research*, 39(3), p 281-286.
55. Eidson, L. N., Inoue, K., Young, L. J., Tansey, M. G., & Murphy, A. Z. (2017). Toll-like receptor 4 mediates morphine-induced neuroinflammation and tolerance via soluble tumor necrosis factor signaling. *Neuropsychopharmacology*, 42(3), p 661-670.
56. Eidson, L. N., & Murphy, A. Z. (2019). Inflammatory mediators of opioid tolerance: Implications for dependency and addiction. *Peptides*, 115, p 51-58.
57. Block, M. L., Zecca, L., & Hong, J. S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(1), p 57-69.
58. Berríos-Cárcamo, P., Quezada, M., Quintanilla, M. E., Morales, P., Ezquer, M., Herrera-Marschitz, M., ... & Ezquer, F. (2020). Oxidative stress and neuroinflammation as a pivot in drug abuse. A focus on the therapeutic potential of antioxidant and anti-inflammatory agents and biomolecules. *Antioxidants*, 9(9), p 830.
59. Mattick, R. P., Breen, C., Kimber, J., & Davoli, M. (2009). Methadone maintenance therapy versus no opioid replacement therapy for opioid dependence. *Cochrane database of systematic reviews*, (3).
60. Mattick, R. P., Breen, C., Kimber, J., & Davoli, M. (2014). Buprenorphine maintenance versus placebo or methadone maintenance for opioid dependence. *Cochrane database of systematic reviews*, (2).
61. Sordo, L., Barrio, G., Bravo, M. J., Indave, B. I., Degenhardt, L., Wiessing, L., ... & Pastor-Barriuso, R. (2017). Mortality risk during and after opioid substitution treatment: systematic review and meta-analysis of cohort studies. *bmj*, 357.
62. Dahan, A. (2006). Opioid-induced respiratory effects: new data on buprenorphine. *Palliative medicine*, 20(8_suppl), p 3-8.
63. Cunningham, C. O., Kunins, H. V., Roose, R. J., Elam, R. T., & Sohler, N. L. (2007). Barriers to obtaining waivers to prescribe buprenorphine for opioid addiction treatment among HIV physicians. *Journal of general internal medicine*, 22(9), p 1325-1329.
64. Eitan, S., Emery, M. A., Bates, M. S., & Horrax, C. (2017). Opioid addiction: who are your real friends?. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 83, p 697-712.

65. Kumar, S., & Bhargava, H. N. (1997). Time course of the changes in central nitric oxide synthase activity following chronic treatment with morphine in the mouse: reversal by naltrexone. *General Pharmacology: The Vascular System*, 29(2), p 223-227.
66. Mori, T., Ito, S., Matsubayashi, K., & Sawaguchi, T. (2007). Comparison of nitric oxide synthase inhibitors, phospholipase A2 inhibitor and free radical scavengers as attenuators of opioid withdrawal syndrome. *Behavioural pharmacology*, 18(8), p 725-729.
67. Herman, B. H., Vocci, F., & Bridge, P. (1995). The effects of NMDA receptor antagonists and nitric oxide synthase inhibitors on opioid tolerance and withdrawal. *Neuropsychopharmacology*, 13(4), p 269-293.
68. DEMİRKAPU, M. J., YANANLI, H. R., MAMMADOV, E., DERVİSHİ, İ., KIRBAŞ, A., YAŞAR, Ş. R., ... & TOPKARA, B. (2020). The effects of L-NAME and agmatine in the nucleus accumbens core region on morphine withdrawal syndrome. *Namık Kemal Tıp Dergisi*, 8(1), p 65-72.
69. Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research*, 9(5), p 641-650.
70. Lindvall, O., Barker, R. A., Brüstle, O., Isacson, O., & Svendsen, C. N. (2012). Clinical translation of stem cells in neurodegenerative disorders. *Cell stem cell*, 10(2), p 151-155.
71. Stavely, R., & Nurgali, K. (2020). The emerging antioxidant paradigm of mesenchymal stem cell therapy. *Stem Cells Translational Medicine*, 9(9), p 985-1006.
72. Shalaby, S. M., Amal, S., Abd-Allah, S. H., Selim, A. O., Selim, S. A., Gouda, Z. A., ... & Abdelazim, S. (2014). Mesenchymal stromal cell injection protects against oxidative stress in Escherichia coli-induced acute lung injury in mice. *Cytotherapy*, 16(6), p 764-775.
73. Pulavendran, S., Vignesh, J., & Rose, C. (2010). Differential anti-inflammatory and anti-fibrotic activity of transplanted mesenchymal vs. hematopoietic stem cells in carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *International immunopharmacology*, 10(4), p 513-519.
74. Iyer, S. S., Torres-Gonzalez, E., Neujahr, D. C., Kwon, M., Brigham, K. L., Jones, D. P., ... & Rojas, M. (2010). Effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on endotoxin-induced oxidation of plasma cysteine and glutathione in mice. *Stem Cells International*, 2010.

75. Mahrouf-Yorgov, M., Augeul, L., Da Silva, C. C., Jourdan, M., Rigolet, M., Manin, S., ... & Rodriguez, A. M. (2017). Mesenchymal stem cells sense mitochondria released from damaged cells as danger signals to activate their rescue properties. *Cell Death & Differentiation*, 24(7), p 1224-1238.
76. DeSantiago, J., Bare, D. J., & Banach, K. (2013). Ischemia/reperfusion injury protection by mesenchymal stem cell derived antioxidant capacity. *Stem cells and development*, 22(18), p 2497-2507.
77. Quintanilla, M. E., Ezquer, F., Morales, P., Santapau, D., Berríos-Cárcamo, P., Ezquer, M., ... & Israel, Y. (2019). Intranasal mesenchymal stem cell secretome administration markedly inhibits alcohol and nicotine self-administration and blocks relapse-intake: mechanism and translational options. *Stem cell research & therapy*, 10(1), p 1-16.
78. Zhang, Y., Chopp, M., Liu, X. S., Katakowski, M., Wang, X., Tian, X., ... & Zhang, Z. G. (2017). Exosomes derived from mesenchymal stromal cells promote axonal growth of cortical neurons. *Molecular neurobiology*, 54(4), p 2659-2673.
79. Ezquer, F., Quintanilla, M. E., Morales, P., Ezquer, M., Lespay-Rebolledo, C., Herrera-Marschitz, M., & Israel, Y. (2019). Activated mesenchymal stem cell administration inhibits chronic alcohol drinking and suppresses relapse-like drinking in high-alcohol drinker rats. *Addiction biology*, 24(1), p 17-27.
80. Tamashiro, T. T., Dalgard, C. L., & Byrnes, K. R. (2012). Primary microglia isolation from mixed glial cell cultures of neonatal rat brain tissue. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (66).
81. Floden, A. M., & Combs, C. K. (2007). Microglia repetitively isolated from in vitro mixed glial cultures retain their initial phenotype. *Journal of neuroscience methods*, 164(2), p 218-224.
82. Almeida, M. B., Costa-Malaquias, A., Nascimento, J. L. M., Oliveira, K. R., Herculano, A. M., & Crespo-López, M. E. (2014). Therapeutic concentration of morphine reduces oxidative stress in glioma cell line. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 47, p 398-402.
83. Kanesaki, T., Saeki, M., Ooi, Y., Suematsu, M., Matsumoto, K., Sakuda, M., ... & Maeda, S. (1999). Morphine prevents peroxynitrite-induced death of human neuroblastoma SH-SY5Y cells through a direct scavenging action. *European journal of pharmacology*, 372(3), p 319-324.

84. Gülçin, I., Beydemir, Ş., Alici, H. A., Elmastaş, M., & Büyükokuroğlu, M. E. (2004). In vitro antioxidant properties of morphine. *Pharmacological Research*, 49(1), p 59-66.
85. Lee, J., Kim, M. S., Park, C., Jung, E. B., Choi, D. H., Kim, T. Y., ... & Park, R. (2004). Morphine prevents glutamate-induced death of primary rat neonatal astrocytes through modulation of intracellular redox. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 26(1), p 17-28.
86. Qian, L., Tan, K. S., Wei, S. J., Wu, H. M., Xu, Z., Wilson, B., ... & Flood, P. M. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity is inhibited by morphine through an opioid receptor-independent reduction of NADPH oxidase activity. *The Journal of Immunology*, 179(2), p 1198-1209.
87. Özmen, İ., Nazıroğlu, M., Alici, H. A., Şahin, F., Cengiz, M., & Eren, I. (2007). Spinal morphine administration reduces the fatty acid contents in spinal cord and brain by increasing oxidative stress. *Neurochemical Research*, 32(1), p 19-25.
88. Feng, Y., Lu, Y., Lin, X., Gao, Y., Zhao, Q., Li, W., & Wang, R. (2008). Endomorphins and morphine limit anoxia–reoxygenation-induced brain mitochondrial dysfunction in the mouse. *Life sciences*, 82(13-14), p 752-763.
89. Zhou, J., Li, Y., Yan, G., Bu, Q., Lv, L., Yang, Y., ... & Cen, X. (2011). Protective role of taurine against morphine-induced neurotoxicity in C6 cells via inhibition of oxidative stress. *Neurotoxicity research*, 20(4), p 334-342.
90. Rozisky, J. R., Laste, G., De Macedo, I. C., Santos, V. S., Krolow, R., Noschang, C., ... & Torres, I. L. S. (2013). Neonatal morphine administration leads to changes in hippocampal BDNF levels and antioxidant enzyme activity in the adult life of rats. *Neurochemical research*, 38(3), p 494-503.
91. Abdel-Zaher, A. O., Mostafa, M. G., Farghaly, H. S., Hamdy, M. M., & Abdel-Hady, R. H. (2013). Role of oxidative stress and inducible nitric oxide synthase in morphine-induced tolerance and dependence in mice. Effect of alpha-lipoic acid. *Behavioural brain research*, 247, p 17-26.
92. Koch, T., Seifert, A., Wu, D. F., Rankovic, M., Kraus, J., Börner, C., ... & Höllt, V. (2009). μ -Opioid receptor-stimulated synthesis of reactive oxygen species is mediated via phospholipase D2. *Journal of neurochemistry*, 110(4), p 1288-1296.
93. Carranza-Aguilar, C. J., Hernández-Mendoza, A., Mejias-Aponte, C., Rice, K. C., Morales, M., González-Espinosa, C., & Cruz, S. L. (2020). Morphine and fentanyl repeated administration induces different levels of NLRP3-dependent pyroptosis in the

- dorsal raphe nucleus of male rats via cell-specific activation of TLR4 and opioid receptors. *Cellular and Molecular Neurobiology*, p 1-18.
94. Roy, J. (2018). Primary microglia isolation from mixed cell cultures of neonatal mouse brain tissue. *Brain research*, 1689, p 21-29.
 95. Bohlen, C. J., Bennett, F. C., & Bennett, M. L. (2019). Isolation and culture of microglia. *Current protocols in immunology*, 125(1), e70.
 96. Agalave, N. M., Lane, B. T., Mody, P. H., Szabo-Pardi, T. A., & Burton, M. D. (2020). Isolation, culture, and downstream characterization of primary microglia and astrocytes from adult rodent brain and spinal cord. *Journal of neuroscience methods*, 340, p 108742.
 97. Willis, L. M., Bielinski, D. F., Fisher, D. R., Matthan, N. R., & Joseph, J. A. (2010). Walnut extract inhibits LPS-induced activation of BV-2 microglia via internalization of TLR4: possible involvement of phospholipase D2. *Inflammation*, 33(5), p 325-333.
 98. Liu, L., Xu, Y., Dai, H., Tan, S., Mao, X., & Chen, Z. (2020). Dynorphin activation of kappa opioid receptor promotes microglial polarization toward M2 phenotype via TLR4/NF- κ B pathway. *Cell & bioscience*, 10(1), p 1-12.