



Universidad de Concepción  
Facultad de Farmacia

# **CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA PERIFÉRICA Y CENTRAL EN UN MODELO DE DEPRESIÓN INDUCIDO POR AISLAMIENTO SOCIAL EN HEMBRAS**

**POR MARÍA YAMILA CEPEDA BARRALES**

Tesis presentada en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción  
para optar al Grado de Magister en Bioquímica Clínica e Inmunología.

**Profesora Guía**

Dra. Karina Oyarce Merino.  
Laboratorio de Neuroinmunología,  
Facultad de Medicina y Ciencias,  
Universidad San Sebastián.

**Profesor Co-Guía**

Dr. Roberto Elizondo Vega.  
Laboratorio de Biología Celular,  
Facultad de Ciencias Biológicas,  
Universidad de Concepción.

Agosto, 2024  
Concepción, Chile.

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis profesores guía, Dra. Karina Oyarce y Dr. Roberto Elizondo, quienes han orientado esta investigación y mi formación como científica, permitiéndome desarrollarme en su laboratorio, brindándome su consejo y las más grandes oportunidades que una estudiante puede imaginar.

A mis seres queridos por su paciencia y, en especial, a mi Madre, quien ha abrazado mis penas y alegrías durante todos estos años de formación científica... y los que vendrán.

A los integrantes del laboratorio de Neuroinmunología de la Universidad San Sebastián por su inmenso apoyo, en particular a Claudio, Patricio, Camila y Matías, quienes, entre risas me han enseñado todo lo que sé, incluso lo más tonto.

Y, especialmente, a todos los animales que dieron su vida para llevar a cabo esta investigación. El trabajo con animales debe realizarse con el mayor y más profundo respeto por la vida. Siempre.

Agradecer el financiamiento entregado por la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Concepción, VRID con Enfoque de Género N° 2023000819; Fondecyt de iniciación N° 1190914; Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción y los Fondos Complementarios de la Facultad de Ciencias Biológicas VRID.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN</b>	08
<b>ABSTRACT</b>	09
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	10
1.1. Generalidades sobre el trastorno depresivo.	10
1.1.1. Modelos preclínicos de estrés asociados a comportamiento depresivo en murinos.	12
1.1.2. Etiopatogenia de la depresión.	15
1.1.2.1. Hipótesis de las monoaminas.	16
1.1.2.2. Hipótesis del eje Hipotálamo-pituitario-adrenal	18
1.2. Alteraciones del sistema inmune en la depresión	21
1.2.1. Neuroinflamación y depresión	22
1.3. Dimorfismo sexual en la depresión	31
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	33
<b>III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS</b>	34
Hipótesis	34
Objetivo	34
Objetivos específicos	34
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	35
4.1 Modelo animal de estrés	35
4.2 Análisis conductual	37
4.2.1 Prueba de campo abierto	37
4.2.2 Prueba <i>Light/Dark box</i>	38
4.2.3 Prueba de nado forzado	38
4.2.4 Prueba Splash	39
4.3 Obtención de sangre y tejidos	40
4.4 Obtención de esplenocitos	40

4.5 Tinción para citometría de flujo	41
4.6 Citometría de flujo	42
4.7 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas	43
4.8 Obtención de hipocampo de hembras aisladas	45
4.9 Obtención de proteínas hipocampales	46
4.10 Western blot	46
4.11 Tratamiento histológico	47
4.12 Inmunohistoquímica	39
4.13 Análisis morfométricos	49
4.14 Obtención de ARN y qRT-PCR	49
4.14.1 Obtención de ARN	49
4.14.2 Cuantificación de ARN total	50
4.14.3 Eliminación ADN Genómico Contaminante.	51
4.14.4 Transcripción Reversa (RT-PCR)	51
4.14.5 PCR en tiempo real (qRT-PCR)	52
4.16 Análisis Estadísticos	54
<b>V. RESULTADOS</b>	<b>55</b>
5.1. Cambios en el peso corporal inducidos por aislamiento social	55
5.2. Análisis de comportamiento tipo ansioso-depresivo luego del aislamiento social	60
5.3. Análisis de la respuesta inmune periférica de ratones hembra producto del estrés por aislamiento social.	67
5.3.1. Cambios en la respuesta inmune innata en sangre periférica de ratones hembra.	68
5.3.2. Cambios en la respuesta inmune adaptativa en sangre periférica de ratones hembra.	70
5.3.4. Análisis de las poblaciones de Linfocitos T provenientes de bazo de ratones sometidos a estrés por aislamiento social.	74

5.3.4.1. Frecuencia de células Teff en bazo de animales sometidos a estrés por aislamiento social.	75
5.3.4.2. Frecuencia de células Treg en bazo de animales sometidos a estrés por aislamiento social.	75
5.3.4.3. Frecuencia de células T helper 1 y T helper 17 en bazo de animales sometidos a estrés por aislamiento social.	76
5.3.5. Determinación de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias en bazo de ratones hembra expuestas a aislamiento social.	77
5.4. Determinación de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias en hipocampo de ratones hembra expuestas a aislamiento social.	82
5.5. Impacto del estrés por aislamiento social en la población de células GFAP positivas provenientes de hipocampo de hembra.	85
5.6. Impacto del estrés por aislamiento social en la población de células Iba-1 positivas provenientes de hipocampo de hembra.	87
5.6.1. Cambios morfométricos en células Iba-1 positivas producto del estrés.	90
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	96
6.1. Caracterización del modelo de estrés por aislamiento social como modelo de depresión	96
6.2. Caracterización de inflamación sistémica	102
6.3. Caracterización de parámetros indicativos de neuroinflamación	107
6.4. Limitaciones y proyecciones	114
<b>VII. CONCLUSION</b>	119
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>	121
<b>IX. ANEXOS</b>	145

## INDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Figura 1:</b> Representación esquemática de mecanismos y vías neuroinflamatorias mediante las cuales la inflamación se relaciona con la depresión	<b>25</b>
<b>Figura 2:</b> Principales fenotipos microgliales descritos en cerebro humano.	<b>30</b>
<b>Figura 3:</b> Línea de tiempo experimental y grupos experimentales	<b>36</b>
<b>Figura 4:</b> Análisis de la ganancia peso corporal, ingesta de alimentos y cortisol	<b>59</b>
<b>Figura 5:</b> Análisis de comportamiento del tipo ansioso	<b>65</b>
<b>Figura 6:</b> Análisis de comportamiento tipo depresivo	<b>66</b>
<b>Figura 7:</b> Evaluación de citoquinas en sangre asociada a estrés por aislamiento social.	<b>69</b>
<b>Figura 8:</b> Evaluación de poblaciones celulares en sangre asociada a estrés por aislamiento social.	<b>72</b>
<b>Figura 9:</b> Análisis mediante citometría de flujo del grado de inflamación periférica en animales sometidos a aislamiento social.	<b>79</b>
<b>Figura 10:</b> RT-qPCR para la determinación de la expresión relativa de citoquinas en hipocampo de ratones estresados por aislamiento social	<b>84</b>
<b>Figura 11:</b> Efecto del estrés por aislamiento social en células GFAP+ en hipocampo	<b>86</b>
<b>Figura 12:</b> Efecto del estrés por aislamiento social en células Iba-1+ en hipocampo	<b>89</b>
<b>Figura 13:</b> Análisis morfométrico de células microgliales (Iba-1+)	<b>94</b>
<b>Figura 14:</b> Resumen esquemático de los principales resultados	<b>120</b>

## RESUMEN

La depresión es un trastorno psiquiátrico que afecta profundamente la calidad de vida de las personas. A nivel mundial, 4,4% de la población padece esta afección, con mayor prevalencia entre las mujeres. Los conocimientos sobre las vías moleculares precisas que subyacen a la depresión aún no se han dilucidado por completo. Sin embargo, la evidencia acumulada a partir de estudios en roedores, donde se induce un comportamiento depresivo mediante estrés psicosocial, sugiere la participación de múltiples sistemas biológicos, incluidos el sistema neuroendocrino, el sistema inmunitario y los circuitos neurales. Evidencia reciente indica que la alteración en las respuestas inmunes periféricas y la neuroinflamación orquestada por la microglía están involucradas en la patogénesis de la depresión y podrían explicar la ineficacia del tratamiento convencional en un tercio de los pacientes. Lamentablemente, la mayoría de las observaciones provienen de modelos murinos de estrés en machos, aunque se sabe que existe dimorfismo sexual en la respuesta al estrés y la sintomatología depresiva. Por ello, el objetivo de este proyecto es evaluar el efecto del estrés por aislamiento social (AS) en la inflamación periférica y la neuroinflamación en ratones hembra. Se caracterizaron patrones conductuales asociados a comportamiento depresivo en ratones hembra sometidas a AS durante 7 semanas. Además, se evaluó la inflamación sistémica y la neuroinflamación a nivel del hipocampo, analizando distintas poblaciones celulares y la expresión de citoquinas pro y antiinflamatorias.

## **ABSTRACT**

Depression is a psychiatric disorder that profoundly affects the quality of life of individuals. Globally, 4.4% of the population suffers from this condition, with a higher prevalence among women. The precise molecular pathways underlying depression have not yet been fully elucidated. However, evidence accumulated from rodent studies, where depressive-like behavior is induced through psychosocial stress, suggests the involvement of multiple biological systems, including the neuroendocrine system, the immune system, and neural circuits. Recent evidence indicates that alterations in peripheral immune responses and neuroinflammation orchestrated by microglia are involved in the pathogenesis of depression and may explain the ineffectiveness of conventional treatment in one-third of patients. Unfortunately, most observations come from male rodent stress models, although it is known that there is sexual dimorphism in the stress response and depressive symptoms. Therefore, the aim of this project is to evaluate the effect of social isolation stress (SI) on peripheral inflammation and neuroinflammation in female mice. Behavioral patterns associated with depressive-like behavior were characterized in female mice subjected to SI for 7 weeks. Additionally, systemic inflammation and stress-induced neuroinflammation were evaluated at the hippocampal level by analyzing different cell populations and the expression of pro- and anti-inflammatory cytokines.

## INTRODUCCION

### 1.1. Generalidades sobre el trastorno depresivo.

La organización Mundial de la Salud (OMS) define a la depresión como un trastorno mental común, caracterizado por la presencia de tristeza, pérdida del interés o placer, sentimientos de culpa, falta de autoestima, trastornos del sueño y del apetito, sensación de cansancio y falta de concentración (OMS, 2023). La depresión es una patología que interfiere con el diario vivir del paciente, impidiendo que realice su vida de manera normal, siendo por lo tanto necesario, poder diagnosticar tempranamente la enfermedad para correcto tratamiento. Para que una persona sea diagnosticada con depresión, ésta debe cumplir con al menos cinco de los nueve criterios descritos en el Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, quinta edición (DSM-5), los cuales hacen referencia a los síntomas antes mencionados, incluyendo el criterio de temporalidad de la sintomatología.

El último informe de la OMS sobre depresión a nivel global consideró a la depresión como una de las condiciones médicas que provoca mayor agobio en el mundo, situándola en primer lugar de acuerdo con los años de vida perdidos o vividos con una discapacidad severa y de larga duración (OMS, 2017). Este

mismo informe indica que a nivel mundial la depresión afecta alrededor de 280 millones de personas, siendo una de las principales causas de consulta psiquiátrica (OMS, 2017). En Chile, se observa una prevalencia del 5% (OMS, 2017), siendo más prevalente en mujeres que en hombres (Nazar et al., 2021), mientras que en el año 2010 la prevalencia anual global fue del 5,5% en mujeres y 3,2% para hombres, representando una incidencia 1,7 veces mayor en mujeres (Albert, 2015). A pesar de las claras diferencias asociadas al género, los estudios clínicos y preclínicos de la patología históricamente han subestimado la variable género, extrapolando los resultados de los experimentos realizados en población masculina a ambos sexos (Mir & Rivarola, 2022).

A la fecha, no se han descrito biomarcadores que permitan confirmar clínicamente el diagnóstico de depresión (C. Li et al., 2023), lo que representa un gran obstáculo no solo para el diagnóstico certero de los pacientes, sino también para la investigación clínica y preclínica destinada a identificar las alteraciones neurobiológicas específicas de la depresión (Krishnan & Nestler, 2008). A pesar de los esfuerzos por dilucidar la base biológica de estos trastornos, la evidencia clínica sigue siendo escasa. Por este motivo, los modelos animales son herramientas poderosas para comprender la etiología de la depresión, sobre todo considerando las dificultades y lo invasivo que resulta estudiar el cerebro humano.

### **1.1.1. Modelos preclínicos de estrés asociados a comportamiento depresivo en murinos.**

Entre los modelos más utilizados para estudiar la depresión, encontramos diversos protocolos de estrés crónico en roedores (ratas y ratones), a los que se les aplica una amplia gama de factores estresantes de manera sostenida en el tiempo. Entre ellos se incluyen estímulos físicos, como descargas eléctricas en las patas, natación forzada, privación de alimento y agua, y/o factores estresantes psicológicos, que no producen dolor físico como tal, sino que implican la anticipación del dolor físico, la incomodidad o el miedo (Atrooz et al., 2021). Ejemplos de factores estresantes psicológicos incluyen la separación materna, los ruidos fuertes, la inmovilización, la amenaza por depredación y el aislamiento (Atrooz et al., 2021). Entre los paradigmas de estrés que utilizan factores estresantes psicológicos destaca el de derrota social (DS), el cual utiliza el conflicto social entre miembros de la misma especie, donde un macho dominante ataca y fuerza a la sumisión a otro animal introducido para generar estrés psicológico (Hollis & Kabbaj, 2014). Otro paradigma utiliza la privación o aislamiento social (AS) como estresor, ya sea en las primeras etapas de la vida, en la adolescencia o la adultez del roedor. El AS consiste en separar a los roedores de su camada y mantenerlos en jaulas individuales, sin contacto con otros roedores y con mínimo contacto humano. Estos protocolos, con diferencias en su temporalidad (periodo de aislamiento y edad del animal al inicio del protocolo), han sido ampliamente relacionadas con ansiedad severa y depresión

(Ieraci et al., 2016; Marco et al., 2015). Estudios han determinado que el AS, ya sea durante la adolescencia como en la adultez, escapaz de alterar la conducta social de los animales e inducir comportamiento similar al ansioso y depresivo, además de afectar la memoria espacial (Hu et al., 2023). Un modelo animal que simula comportamiento y procesos emocionales complejos humanos representa un desafío para la investigación, no solo para inducir dicho comportamiento, sino que también para evaluar la aparición del mismo (Belovicova et al., 2017). Por esta razón, se han desarrollado pruebas conductuales para verificar y respaldar una teoría de cognición o emoción (Belovicova et al., 2017). La gran mayoría de estas pruebas se basan en respuestas innatas de los animales, como, por ejemplo, la exploración de un espacio nuevo a través de la prueba de campo abierto (OFT) (Tucker & McCabe, 2021), o el acicalamiento a través de la prueba del “*splash*” (Bouguiyoud et al., 2021). Otras pruebas utilizan fuentes de motivación inherentes, como el miedo a ahogarse en la prueba de nado forzado (FST) o la preferencia a consumir alimento palatable en la prueba de preferencia a la sacarosa (SPT) (Belovicova et al., 2017). De este modo, podemos interpretar, por ejemplo, que un animal que demuestre menos miedo por ahogarse en la prueba FST o no prefiera consumir alimentos atractivos en SPT, presenta comportamiento similar al depresivo, por otro lado, menos tiempo explorando un área nueva durante la prueba OFT, puede indicar comportamiento similar al ansioso (Acikgoz et al., 2022; Belovicova et al., 2017). En ese sentido, estudios donde se utiliza el AS como modelo de estrés, han observado que luego de 4

semanas de aislamiento, ratones macho, presentan un comportamiento similar al ansioso en la prueba de OFT (Al Omran et al., 2022). Mientras que, cuando se aíslan ratones macho y hembra en la etapa de adolescencia durante 3 meses, estos presentaron comportamiento similar al depresivo en la prueba FST y demostraron ser menos sociables al presentarles a otro animal (Medendorp et al., 2018).

De este modo, el AS se considera una forma de estrés psicosocial crónico, capaz de inducir diversas alteraciones conductuales, pero también neurológicas, endocrinológicas e inmunológicas tanto en animales como en humanos (Farbstein et al., 2021). Por ejemplo, el AS suprime la actividad neuronal en algunas zonas de la corteza prefrontal, evidenciado mediante inmunohistoquímica para el marcador de actividad neuronal c-Fos, observándose una menor densidad de neuronas positivas para este marcador. Además, el AS induce hipomielinización en varias regiones cerebrales (Hu et al., 2023), lo que se ha asociado a déficit cognitivo (Hu et al., 2023). Un reciente estudio en hombres y mujeres adultos mayores observó asociación entre una disminución de la interacción social con la pérdida de volumen cerebral, lo cual además se asoció con la aparición de demencia (Walter & Sandsmark, 2023). Otros hallazgos interesantes en población humana (hombres y mujeres) determinaron que, tanto vivir en soledad como el sentimiento de soledad, se correlacionan con un aumento de los niveles plasmáticos del cortisol diurno y con la presencia de

interleuquina (IL) -6, una citoquina proinflamatoria (Zilioli & Jiang, 2021). De la mano con este último hallazgo, el AS en roedores también se ha observado que favorece la secreción de citoquinas proinflamatorias, como IL-6, IL-4 e IL-1, observándose un incremento en sus niveles plasmáticos en ratones macho aislados durante 12 semanas, (Ding et al., 2024)

### **1.1.2. Etiopatogenia de la Depresión.**

La depresión como enfermedad es considerada un desorden de origen multifactorial y de sintomatología heterogénea, lo que explica la gran dificultad que ha significado para la investigación en áreas como la neurofisiología y neuropsiquiatría entender su fisiopatología (Jesulola et al., 2018). El principal desafío para comprender los mecanismos fisiopatológicos que subyacen a la depresión, es que no existe una hipótesis única que explique todos los aspectos de los signos y síntomas de la depresión, siendo lo más probable que la depresión involucre múltiples mecanismos interrelacionados que se manifiestan como un conjunto. Entre los diversos factores que influyen en el desarrollo de la depresión, se han descrito causas provenientes del entorno del paciente, factores genéticos, así como también hormonales e inflamatorias (Dudek et al., 2021; Jesulola et al., 2018; Krishnan & Nestler, 2010). Múltiples antecedentes muestran que eventos adversos de la vida son factores altamente precipitantes en el desarrollo de la depresión. Muchos de ellos ocurren durante la infancia, como

crecer en una familia de bajo nivel socioeconómico, experimentar maltrato infantil y ausencia de los padres. Además, diferentes eventos adversos en la edad adulta, como la humillación o la pérdida de un familiar por muerte o separación, y la percepción de soledad pueden aumentar considerablemente el riesgo de depresión (Cordova-Palomera et al., 2016).

Los mecanismos biológicos que intentan explicar la fisiopatología de la depresión incluyen: i) la hipótesis de las aminas biogénicas; ii) la desregulación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA); iii) la pérdida de la neuroplasticidad y iv) el aumento de la secreción de citoquinas inflamatorias (factores inmunológicos), entre otros (Dudek et al., 2021; Jesulola et al., 2018).

#### **1.1.2.1 Hipótesis de las monoaminas.**

La primera gran hipótesis de la depresión se formuló el año 1950 y proponía que los principales síntomas de la depresión se deben a una deficiencia funcional de los transmisores monoaminérgicos (monoaminas) cerebrales norepinefrina (NE), serotonina (5-HT) y/o dopamina (DA) (Brigitta, 2002; Schildkraut, 1974). Se reconoce que los sistemas monoaminérgicos son responsables de muchos síntomas conductuales, como el estado de ánimo, la vigilancia, la motivación, la fatiga y agitación o retardo. Estudios actuales reconocen que una reducción en

estos neurotransmisores, como consecuencia de defectos en la síntesis, el almacenamiento o su liberación, así como una sensibilidad alterada de sus receptores, da como resultado una disminución de la neurotransmisión y un deterioro del rendimiento cognitivo que puede conducir a la depresión (Brigitta, 2002; Fang et al., 2023). La deficiencia funcional de estos neurotransmisores puede deberse a la degradación enzimática de los neurotransmisores en la hendidura sináptica por parte de monoaminooxidasas (MAO), así como también a una disminución de las funciones de los transportadores (Bowman et al., 2020; Suchting et al., 2021). La hipótesis serotoninérgica de la depresión se ve respaldada por datos que muestran que el metabolismo de la serotonina se reduce en pacientes deprimidos (Colle et al., 2020; Hirschfeld, 2000), observándose una disminución de serotonina y su precursor 5-hidroxitriptófano en plasma, sin una disminución del aminoácido precursor de ambas moléculas, el triptófano (Trp) (Colle et al., 2020). De este modo, se plantea que la transformación del Trp en quinurenina (KYN) a través de la enzima indolamin – 2,3 dioxigenasa (IDO), podría explicar la menor disponibilidad de Trp para la síntesis de serotonina (A. K. Walker et al., 2019).

De este modo, los fármacos más utilizados como tratamiento para la depresión son los antidepresivos que inhiben la recaptación de serotonina (ISRS), inhibidores de las enzimas MAO (MAOI) (Buch & Liston, 2021; Drysdale et al., 2017) y antidepresivos tricíclicos (ATC), que actúan como antagonistas

competitivos de las monoaminas en los receptores post-sinápticos (Kim et al., 2023). Estos agentes son eficaces para aliviar los síntomas en un porcentaje significativo de pacientes, sin embargo, se estima que entre el 10% y el 30% de los pacientes con depresión no responden a los antidepresivos típicos y que, por ende, se requieren diferentes estrategias de tratamiento (Al-Harbi, 2012; Voineskos et al., 2020).

#### **1.1.2.2. Hipótesis del eje hipotálamo pituitario adrenal.**

Otros antecedentes han sugerido que la depresión puede estar relacionada con una respuesta desadaptativa frente al estrés, que resulta en la activación crónica de las vías de respuesta al estrés del eje hipotálamo- pituitario- adrenal (HPA) (Hersey et al., 2022) y el sistema simpático-adrenal-medular (SAM) (O'Connor et al., 2021). La activación de la vía SAM tienen como objetivo la supervivencia, sin embargo, cuando se mantiene en el tiempo tiene repercusiones negativas para el organismo (Miller & Raison, 2016; O'Connor et al., 2021; Russell & Lightman, 2019). Cuando un individuo siente una amenaza, el hipotálamo activa al sistema nervioso autónomo (SNA), el cual desencadena la liberación de las hormonas noradrenalina y adrenalina, también conocidas como catecolaminas, a nivel de la glándula suprarrenal. Estas se transportan rápidamente a través del torrente sanguíneo para poner al organismo en alerta, para que este pueda responder mediante mecanismos de “lucha o huida” (Herman et al., 2016; McEwen, 2007)

La vía de respuesta al estrés a través del eje HPA tarda más tiempo en activarse, pero su duración es más prolongada (Sapolsky et al., 2000). La activación de este eje producirá la liberación de vasopresina y del factor liberador de corticotropina (CRF), desde el hipotálamo, el que a nivel de la glándula pituitaria estimulará la liberación de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH), la que a su vez estimulará la producción de glucocorticoides (GC): cortisol y corticosterona en la glándula suprarrenal (Stephens & Wand, 2012). Los GC son liberados a la circulación sistémica, lo que les permite viajar a sus tejidos diana y producir sus efectos metabólicos, cardiovasculares, inmunológicos y cognitivos característicos (Ramamoorthy & Cidlowski, 2016).

El eje HPA se autorregula mediante retroalimentación negativa, de forma que niveles elevados de GC inhiben la secreción de CRH y ACTH (Ramamoorthy & Cidlowski, 2016). El cortisol secretado por la glándula adrenal se une con gran afinidad a los receptores de mineralocorticoides (MR) y con menor afinidad a los receptores glucocorticoides (GR). Los GR están distribuidos ampliamente en el cerebro, mientras que los MR están localizados principalmente en el hipocampo (Meijer et al., 2019). Los pacientes que sufren de depresión exhiben una resistencia a la retroalimentación de GC que conduce a una mayor actividad del eje HPA (Pariante & Lightman, 2008; Wang et al., 2023), caracterizándose por una liberación exagerada de GC (Perrin et al., 2019). De este modo, el desarrollo

de depresión ha sido relacionada con una desregulación del eje HPA y sus receptores MR y GR (Keller et al., 2017). Estudios clínicos han observado que pacientes expuestos a estrés sostenido en el tiempo, pueden presentar deterioro a nivel cerebral y otros órganos debido a las elevadas concentraciones de GC, lo que se ha asociado al desarrollo de patologías neuropsiquiátricas, así como también autoinmunes, cardiometabólicas, entre otras (Glaser & Kiecolt-Glaser, 2005; Ortega-Montiel et al., 2015; Powell et al., 2013; Smith & Vale, 2006; Tyagi et al., 2022).

Diversos modelos animales evidencian la participación del eje HPA y de las hormonas GC en la patogenia de la depresión, demostrándose que la administración exógena de corticosterona en modelos murinos machos es capaz de inducir un comportamiento similar al depresivo (David et al., 2009; Sturm et al., 2015; Zalewska et al., 2018; Zhang et al., 2015). Por otro lado, la inducción de estrés en animales de manera crónica, por ejemplo, a través de DS en machos, activa el eje HPA, evidenciado como un aumento de la secreción de corticosterona acompañado de comportamiento depresivo (Emudainohwo et al., 2023). Finalmente, y de manera interesante, se reconoce que los GC tienen propiedades antiinflamatorias a corto plazo, sin embargo, la elevación crónica de GC puede desregular la respuesta inmunológica, produciendo un aumento de la expresión de biomarcadores inflamatorios tales como IL-6, IL-1, factor de necrosis tumoral alfa (TNF-  $\alpha$ ), entre otras (Frank et al., 2013).

## **1.2. Alteraciones del sistema inmune en la depresión.**

Como se mencionó anteriormente, la respuesta al estrés contempla la activación e interacción de los ejes SAM y HPA para restaurar el proceso homeostático. Sin embargo, esta activación tiene repercusiones en un tercer sistema; el sistema inmune (Elenkov & Chrousos, 2006). Se ha postulado que el estrés prepararía al organismo para enfrentar potenciales amenazas del ambiente y así anticipar la defensa frente a daños físicos y patógenos, involucrando la producción de citoquinas-proinflamatorias como la IL-6 (Miller & Raison, 2016). Esto permite explicar por qué el estrés promueve una respuesta inflamatoria incluso en ausencia de agentes infecciosos. De esta forma, se ha observado en pacientes con depresión un aumento en los niveles de la proteína C reactiva (PCR) y las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- $\alpha$  en plasma (Godoy et al., 2018). Además, estudios en humanos sugieren que la exposición crónica a GC tendría un efecto proinflamatorio, modificando la distribución y función de las células inmunes (Dhabhar, 2014; Morey et al., 2015), pudiendo incrementar el tráfico sistémico de linfocitos y monocitos (Cruz-Topete & Cidlowski, 2015) y la secreción de citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  (Haapakoski et al., 2015). Estas citoquinas, en conjunto con elevados niveles de cortisol, favorecerían la producción de proteínas de fase aguda como la PCR (Schreier & Chen, 2017).

Un estudio en roedores utilizando DS en machos, observó mediante citometría de flujo un aumento de la población de linfocitos proinflamatorios T helper 17 (Th17), así como una disminución de la población de linfocitos anti-inflamatorios T reguladores (Treg) en bazo, sugiriendo que el estrés por DS promueve inflamación sistémica (Ambree et al., 2019). De manera similar, se ha reportado, también mediante citometría de flujo, que el estrés por restricción crónica (CRS) en ratones macho, produce una disminución de la población de linfocitos CD4+ y un aumento de la relación Th1/Th2 en bazo (Zhao et al., 2015), sugiriendo que modelos crónicos de estrés pueden inducir incrementos de poblaciones celulares proinflamatorias. Estudios en pacientes con depresión, por otro lado, han observado que el incremento de marcadores inflamatorios no se limita únicamente a la periferia, sino también en sistema nervioso central (SNC). Diversos estudios han reportado un incremento en la expresión de varios genes y proteínas del sistema inmune, tales como el receptor tipo Toll (TLR) 3, TLR4, IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en muestras de cerebro post mortem de pacientes con depresión (Dowlati et al., 2010; Harsanyi et al., 2022; Miller et al., 2019; Shelton et al., 2011), indicando que en estos pacientes también existe neuroinflamación.

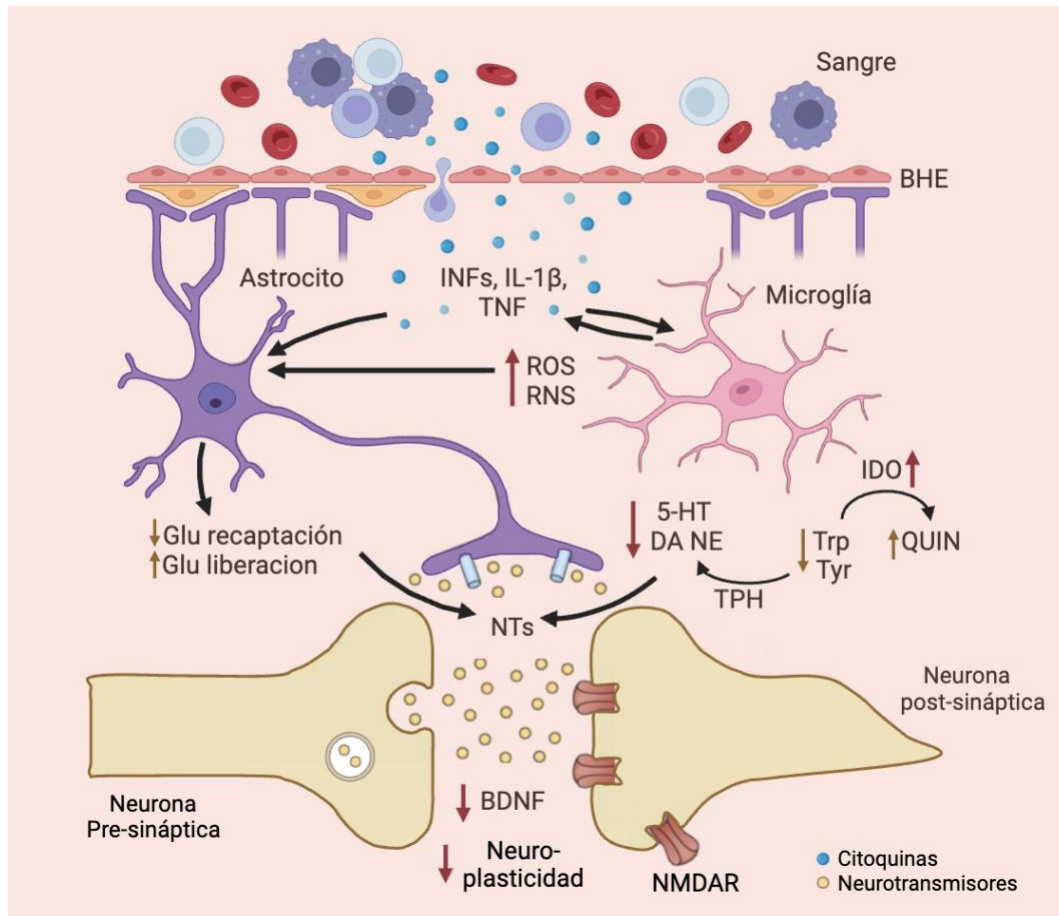
### **1.2.1. Neuroinflamación y depresión**

Una perspectiva psiconeuroinmunológica, sugiere que la depresión está mediada en parte, por respuestas inflamatorias a nivel periférico y central

(neuroinflamación) (Jeon & Kim, 2016), donde las citoquinas proinflamatorias juegan un papel fundamental. La neuroinflamación se puede definir como la respuesta inflamatoria que tiene lugar ya sea en el cerebro o en la medula espinal, y está mediada por citoquinas, quimioquinas y especies reactivas del oxígeno (ROS), entre otros, los que son producidos por las células de la microglía, astrocitos células endoteliales y células inmunes de la periferia (DiSabato et al., 2016).

Anteriormente se creía que el cerebro estaba “inmunoprivilegiado” debido a la barrera hematoencefálica (BHE), sin embargo, estudios más recientes respaldan el concepto de que el aumento de la actividad inmunitaria y la liberación de citoquinas proinflamatorias en la periferia influye directamente en un aumento de la permeabilidad de la BHE producto del estrés (Menard et al., 2017), alterando la química cerebral que subyace a los trastornos psiquiátricos (Chang et al., 2024; Dantzer et al., 2008; Hoprekstad et al., 2024; Maes et al., 2009; Miller et al., 2009). La evidencia indica que la presencia de citoquinas proinflamatorias en el cerebro, como las que se han observado producto del estrés (Song et al., 2020), puede afectar las vías metabólicas y moleculares involucradas en la producción, liberación y recaptación de neurotransmisores que afectan los circuitos neuronales que regulan el comportamiento y que se encuentran alterados en varios trastornos neuropsiquiátricos, incluida la depresión (Dudek et al., 2020; Miller & Raison, 2016; Raison et al., 2010). Por ejemplo, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  pueden

reducir la disponibilidad de monoaminas al aumentar la expresión y función de los transportadores de serotonina mediante la activación de las vías de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) (Miller & Raison, 2016; Zhu et al., 2010). Además, pueden disminuir los precursores de monoamina al activar la enzima IDO, que descompone el Trp, el principal precursor de la serotonina, en KYN (Miller & Raison, 2016). Estos mecanismos se resumen en la Figura 1.



**Figura 1: Representación esquemática de mecanismos y vías neuroinflamatorias mediante las cuales la inflamación se relaciona con la depresión.** En el contexto de la depresión, citoquinas provenientes de circulación como IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$  y TNF ingresan al cerebro y son capaces de activar a las células astrogliales y microgliales. Estas últimas, frente al estrés, pueden secretar citoquinas inflamatorias. Este ambiente inflamatorio favorece la disminución de los precursores de neurotransmisores de serotonina (5HT) (triptófano (trp)), y dopamina (DA), norepinefrina (NE) y adrenalina (E) (tirosina (tyr)), a través de su conversión a quinurenina (KYN) y posteriormente a ácido quinolínico (QUIN), un agonista del receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR), por la enzima IDO presente en microglía reactiva. La microglía reactiva aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS). En astrocitos, existe una mayor liberación de glutamato (Glu, con menor capacidad de recaptación). El exceso de Glu, especialmente cuando se une a NMDAR, puede provocar excitotoxicidad glutamatérgica y una disminución del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF). **Modificado de (Miller & Raison, 2016)**

Se ha propuesto que las citoquinas generadas en la periferia atraviesan la BHE y llegan al cerebro, promoviendo neuroinflamación mediante la activación de las células gliales: astrocitos y microglía. El astrocito corresponde a la célula glial más abundante en el cerebro, participando de la regulación de distintos procesos cerebrales como la sinaptogénesis, neurotransmisión, soporte metabólico y trófico, además de neurogénesis, control de la permeabilidad de la BHE, entre otras funciones (Siracusa et al., 2019; Yao et al., 2023). Interesantemente, estudios tanto en humanos como en modelos animales han encontrado cambios en la densidad, la morfología y la función de astrocitos asociados a la depresión (Torres-Platas et al., 2016; Zhou et al., 2019). Por ejemplo, estudios en post mortem de pacientes con depresión han demostrado reducción en el número de astrocitos por área en ciertas zonas del hipocampo (Cobb et al., 2016; Torres-Platas et al., 2016), mientras que modelos de depresión en murinos demuestran atrofia de las células astrogiales también en hipocampo (Zhao et al., 2018).

Sin embargo, la célula más estudiada en el contexto de la depresión es la microglía, la cual corresponde a la principal célula inmunitaria que protege el parénquima cerebral, siendo capaz de responder a cambios en el microambiente cerebral y adoptar varios fenotipos estructurales y funcionales de manera dependiente del contexto (Dermitzakis et al., 2023; Frost & Schafer, 2016). Son células de origen mieloide derivadas del saco vitelino y constituyen alrededor del 10% de las células cerebrales (Dermitzakis et al., 2023; Frost & Schafer, 2016)

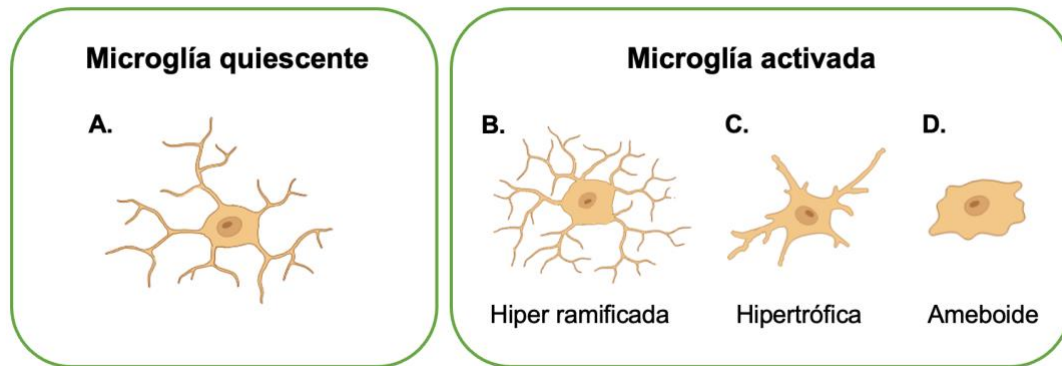
Aun cuando son la población menos abundante de células no neuronales, tienen una inmensa variedad de funciones biológicas en el cerebro maduro y en desarrollo (Dermitzakis et al., 2023). La microglía sensa constantemente el medio, de modo que es capaz de proporcionar una defensa de primera línea contra infecciones y daños de los tejidos. Además, ayuda a formar circuitos neuronales en el cerebro en desarrollo, a través de la secreción de factores neurotróficos y la fagocitosis de las neuronas dañadas (Schlegelmilch et al., 2011), interaccionando constantemente con otras células cerebrales, como las neuronas y los astrocitos, para mantener la homeostasis cerebral (Afridi & Suk, 2023; Wohleb, 2016).

En condiciones homeostáticas, la microglía presenta un fenotipo quiescente, el cual se caracteriza por presentar una morfología ramificada con un soma pequeño y con numerosos y finos procesos celulares (Fig. 2A) (Kreutzberg, 1996). A este estado se le llama en literatura clásica “reposo” sin embargo, la microglía en estado homeostático está inspeccionando el espacio extracelular, por lo que en realidad no se encuentra en completo reposo (Paolicelli et al., 2022). En condiciones inflamatorias, la microglía sufre extensos cambios morfológicos y funcionales principalmente para neutralizar los procesos inflamatorios en curso. La morfología de una microglía reactiva presenta una variabilidad enorme y depende del estado de activación y de la localización de la célula (Jurga et al., 2020). Una morfología hiperramificada (Fig. 2B), presenta mayor número de

ramificaciones o procesos y soma más grande, mientras que, la morfología hipertrófica (Fig. 2C) describe aumento del tamaño celular, de modo que, además de un soma más grande, se observan ramificaciones más gruesas, pero más cortas. Finalmente, una morfología completamente ameboide (Fig. 2D), se describe como una microglía con mayor poder fagocítico, que pierde sus ramificaciones y presenta un soma de gran tamaño (Beynon & Walker, 2012). La microglía quiescente u homeostática y la microglía reactiva corresponden a dos tipos de morfología opuestas, que delimitan el amplio espectro de fenotipos intermedios, los cuales dependen del tipo de activación y de la temporalidad del proceso inflamatorio (Jurga et al., 2020). Se ha demostrado que las funciones inmunitarias de la microglía son beneficiosas en entornos neuroinflamatorios agudos, así como en enfermedades neurodegenerativas (Frost & Schafer, 2016). Sin embargo, el aumento de la activación de la microglía inflamatoria durante períodos crónicos da como resultado una exacerbación de la neuropatología en curso (Afridi & Suk, 2023; Wohleb, 2016).

De manera interesante, en cerebros post mortem de pacientes deprimidos, hay un aumento en la proporción de células microgliales con morfología reactiva en comparación con los cerebros control (Torres-Platas et al., 2014). Interesantemente, estos aspectos son replicado en modelos murinos de estrés crónico, donde ratones macho sometidos a un modelo de estrés crónico no predecible (CUS), el cual consiste en someter a los roedores a una serie de

estímulos estresantes aleatorios que no le dan la oportunidad de acostumbrarse, presentan un comportamiento tipo depresivo, acompañado de cambios en la morfología de células microgliales, las cuales presentaron un soma de mayor tamaño con ramificaciones más complejas, y astrogliales, que presentaron un aumento de un 25% de su tamaño comparadas con los controles no estresados (Du Preez et al., 2021). Interesantemente, las células microgliales expresan diversos receptores que se han asociado al desarrollo de depresión, tales como el receptor de quimioquinas 1 CX3C (CX3CR1) (Y. Liu et al., 2020) y TLR4 (Zhang et al., 2020) (Afridi & Suk, 2023; Liu et al., 2014). En el contexto inflamatorio, estos receptores pueden ser activados por patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), los que pueden activar diversas vías de señalización, que incluyen la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK3), el factor nuclear kappa potenciado por la cadena ligera de las células B activadas (NF- $\kappa$ B) y el dominio de unión a nucleótidos, la repetición rica en leucina y el dominio pirina de la familia NLR 3 (NLRP3), los cuales inducen el incremento en la expresión y liberación de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , por parte de la microglía. La activación de la vía NLRP3 conduce al ensamblaje de un complejo multiproteico llamado inflamasoma NLRP3, que activa la caspasa-1 y, posteriormente, promueve la maduración y liberación de citoquinas proinflamatorias, como la IL-1 $\beta$  y la IL-18 (Smith et al., 2012) La activación de estas vías se ha informado en varios modelos animales de depresión inducida por estrés, incluido el estrés crónico por DS, CUS y CRS (Afridi & Suk, 2023; Cheng et al., 2016; Jiang et al., 2022; Liu et al., 2014).



**Figura 2: Principales fenotipos microgliales descritos en cerebro humano.**

A. Quiescente; se relaciona con condiciones no patológicas. En este estado las microglías se caracterizan por sus procesos ramificados y soma pequeño. En respuesta a daño la microglía se activa, de modo que presentará cambios morfológicos que responderán a la intensidad y naturaleza de la injuria. Esto es: B. Hiper ramificada, donde aumentará el tamaño del soma y ganará mayor número de ramificaciones; C. Hipertrófica, corresponde a un estado reactivo donde la microglía engrosa sus ramificaciones y se retrae; D. Ameboide, o fenotipo fagocítico donde el soma celular aumenta de tamaño y los procesos desaparecen.

### **1.3. Dimorfismo sexual en depresión**

Es esencial destacar la abundante evidencia experimental que documenta las diferencias asociadas al género en el funcionamiento cerebral (Cahill, 2006), así como en la respuesta al estrés y los fármacos (Labonte et al., 2017). Estas diferencias no solo se reflejan en distintas respuestas frente al mismo agente estresante, sino a diferencias fisiológicas en la regulación de los mediadores del estrés (Franceschelli et al., 2014). Por ejemplo, se ha observado una mayor prevalencia de trastornos conductuales como el autismo en hombres (Loomes et al., 2017), mientras que la ansiedad (McLean et al., 2011) y la depresión (S. Li et al., 2023) son más comunes en mujeres. Por otro lado, en ratas hembra sometidas a CUS, se observan niveles más bajos de neurotransmisores clave en la patología de la depresión; como serotonina y norepinefrina en el hipocampo y niveles elevados de glucocorticoides en plasma en comparación con machos (Xia et al., 2022). De los diferentes modelos de estrés crónico, el modelo de estrés CUS es uno de los modelos de estrés más utilizados. No obstante, solo algunos estudios han evaluado el comportamiento ansioso-depresivo en roedores hembra (Franceschelli et al., 2014), dificultando la extrapolación e interpretación de resultados.

El modelo de estrés por AS afecta el comportamiento de los animales de manera diferencial entre machos y hembras. Sin embargo, no existe evidencia respecto a los efectos del AS sobre la fisiología en hembras (Guo et al., 2004; Sullens et

al., 2021). De esta forma, encontramos que el estudio del estrés en hembras ha sido largamente descuidado en la literatura científica, afectando la capacidad de extrapolar algunos de estos resultados a población humana femenina (McCullough et al., 2014).

A pesar de los antecedentes presentados, se evidencia una notable carencia de estudios exhaustivos que caractericen las complejas alteraciones en las respuestas inmunológicas en modelos de hembras, especialmente en el contexto de la depresión inducida por estrés y el paradigma del AS. Esta laguna en el conocimiento científico es especialmente relevante dado que las investigaciones predominantemente se han centrado en modelos de machos, que, al extrapolarlo a humanos, son menos prevalentes a padecer la patología. Esto limita nuestra comprensión de cómo los factores de estrés afectan diferencialmente a los sistemas inmunológicos de ambos sexos. Por lo tanto, resulta crucial abordar esta brecha para obtener una visión más precisa de los mecanismos subyacentes a la interacción entre estrés, depresión e inmunidad en las hembras, así como para desarrollar enfoques terapéuticos más efectivos y personalizados para esta población particularmente vulnerable.

## 2. PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Existe un gran volumen de evidencia experimental que documenta diferencias ligadas al sexo en cuanto a la estructura y funcionalidad de ciertas regiones cerebrales y a las respuestas fisiológicas en la depresión y el estrés. A pesar de todos estos interesantes resultados, el mayor porcentaje de estos estudios sólo se ha realizado en ratones macho, por lo que la evidencia sobre si estos aspectos aplican también en hembras es escasa. Esto indica que los resultados obtenidos a la fecha en machos no necesariamente modelarán de manera correcta lo que sucede en hembras. En concreto, para el estrés por AS, hay estudios que evidencian diferencias en el comportamiento entre machos y hembras, pero no hay evidencia sobre los efectos que puede tener el AS sobre la respuesta inmunitaria en hembras.

De este modo surge la siguiente pregunta de investigación:

**¿Cuál es el efecto del estrés por aislamiento social sobre la conducta y la respuesta inflamatoria en ratones hembra?**

### **III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **Hipótesis:**

El estrés por aislamiento social promueve sintomatología depresiva asociada a una respuesta inflamatoria periférica y central en ratones hembra.

#### **Objetivo General:**

Evaluar el efecto del estrés por aislamiento social sobre la respuesta inflamatoria periférica y central en hembras.

#### **Objetivos específicos:**

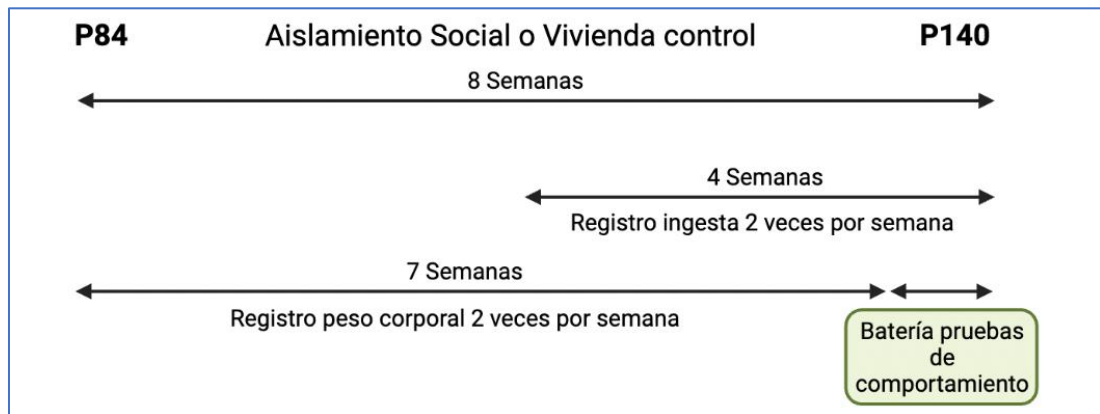
1. Caracterizar patrones conductuales asociados a comportamiento depresivo en ratones hembra sometidas a estrés crónico por aislamiento social.
2. Analizar la respuesta inflamatoria celular a nivel periférico en ratones hembra sometidas a estrés por aislamiento social.
3. Evaluar parámetros inflamatorios a nivel cerebral en ratones hembra sometidas a estrés por aislamiento social

## IV. METODOLOGÍA

### 4.1. Modelo animal de estrés:

En el contexto de esta tesis, se trabajó con ratones hembra de la cepa C57BL/6 *wild type*. A partir de las 12 semanas de edad, los animales se hospedaron durante 8 semanas en jaulas individuales (AS) o compartiendo jaula con otros 4 o 5 individuos (controles). Para comparar los efectos del estrés por AS sobre el comportamiento, se utilizó animales machos de la misma edad y en las mismas condiciones de vivienda. Todos los animales fueron mantenidos en el bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción (CREAV), en condiciones de luz/oscuridad de 12h/12h, con agua y comida *chow* estándar *ad libitum*. Se registró dos veces por semana el peso de los animales en balanza digital, mientras que la ingesta de alimento por jaula se midió desde las 4 semanas de aislamiento (Figura 3).

Todos los protocolos de manipulación animal y eutanasia a término de experimento se realizaron acorde al comité de ética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción (código interno: CEBB 1685-2024 del proyecto VRID:2023000819) y al comité de ética científico de la Universidad San Sebastián (código interno: 03-2019-20) .



**Figura 3: Línea de tiempo experimental y grupos experimentales** Hasta el inicio del aislamiento los animales vivieron en camadas, al día postnatal 84 (P84) los animales fueron asignados en dos grupos: una camada continuó viviendo en grupo, mientras que la otra camada fue separada en jaulas individuales y llevadas a la sala de aislamiento dispuesta en las instalaciones de CREAV UdeC. El registro del peso corporal se realizó desde el día 1 de aislamiento dos veces por semana, mientras que el registro de la ingesta se inició luego de 4 semanas de aislamiento, dos veces por semana. Durante la semana 7 de aislamiento, el comportamiento de los animales control y aisladas fue evaluado mediante una batería de pruebas de comportamiento que incluye OFT, LDBT, ST y FST (en ese orden). A punto final, P140, se diseccionarán los bazo y los cerebros y se recolectará sangre de la cavidad torácica de los animales.

## **4.2. Análisis conductual**

### **4.2.1 Prueba de campo abierto:**

La prueba de campo abierto (OFT, por sus siglas en inglés) se basa en el conflicto entre la tendencia del animal a explorar un área nueva y la evitación de la naturaleza aversiva del entorno nuevo expuesto. Los roedores tienden a evitar la zona central de la arena, manteniéndose en estrecho contacto con las paredes de la arena y como tal, la evitación de la zona central se ha utilizado como una medida de la ansiedad inducida por la exposición a un entorno nuevo (Tucker & McCabe, 2021).

Para llevar a cabo esta prueba, los animales se posicionaron en una esquina del campo de prueba delimitado por 45 cm x 45 cm y se filmó la actividad de los animales durante 10 minutos. Después se analizó el tiempo en el centro de la caja o en los bordes, para ello se delimitó un margen virtual de 9 cm, que representa el límite del centro de la caja. El análisis del tiempo en el centro y periferia se realizó con el programa *Kinoscope*, mientras que el análisis de la distancia recorrida y velocidad promedio del animal fueron obtenidas mediante el programa *Toxtrack* (Umeå University).

#### **4.2.2. Prueba *Light/Dark box*:**

la prueba de transición entre luz y oscuridad o "*light/dark box*" (LDBT) es una de las pruebas más utilizadas para medir el comportamiento similar a la ansiedad en ratones. La prueba se basa en la aversión natural de los ratones a las zonas muy iluminadas y en su comportamiento exploratorio espontáneo en entornos nuevos. (Erk et al., 2023; Takao & Miyakawa, 2006)

Para realizar esta prueba, los animales se colocaron en la esquina de la caja de 42 cm x 42 cm, la cual estaba dividida en un compartimento o cámara iluminada y otro oscuro unido por un agujero de 10 cm x 10 cm. Se filmó la actividad de los animales durante 5 minutos y fueron evaluados los parámetros de latencia hasta la primera entrada a la cámara iluminada y el tiempo que pasaron en la cámara iluminada como medida de ansiedad.

#### **4.2.3. Prueba de nado forzado:**

Esta prueba consiste en forzar a los animales a nadar en un cilindro lleno de agua del que no pueden escapar, después de un cierto tiempo, los animales quedan inmóviles en lo que se interpreta como un estado de desesperanza ante la imposibilidad de escapar. Un aumento en la duración de la inmovilidad de los sujetos durante FST representa una mayor fatiga y/o desesperación conductual,

lo cual es relacionado en literatura como comportamiento depresivo (Yankelevitch-Yahav et al., 2015).

Para llevar a cabo esta prueba, los animales se introdujeron en un cilindro plástico transparente con agua hasta tres cuartos de su capacidad, a una temperatura de 22°C. La prueba tiene una duración de 6 min, de los cuales los 2 primeros minutos no son considerados para la evaluación del comportamiento del animal sino se utilizan como periodo de ambientación, durante la prueba, los animales son observados por el investigador para asegurar el bienestar de estos. Se evaluó el tiempo de natación o lucha e inmovilidad, registrando la duración utilizando el programa Kinoscope.

#### **4.2.3 Prueba *Splash*:**

Para determinar comportamiento depresivo en los animales se evaluó a través de la prueba "*splash*" la disminución del autocuidado. La prueba consiste en registrar el tiempo que los animales pasan haciéndose aseo luego de ser rociados con una solución viscosa (Bouguiyoud et al., 2021). El protocolo consistió en rociar una solución de sacarosa al 10% sobre el pelaje dorsal del animal. Se registró la frecuencia, latencia y duración del acicalamiento durante 5 minutos.

#### **4.3 Obtención de sangre y tejidos.**

Al finalizar el periodo de aislamiento, se obtuvo sangre mediante punción en la vena facial y se recolectó en un tubo con 20  $\mu$ L de heparina (5000UI/mL, Laboratorio Sanderson, Chile). Se utilizaron 50  $\mu$ L de la sangre recolectada para análisis por citometría, mientras que el resto fue centrifugado a 3000 rpm durante 15 minutos para recolectar plasma, el cual se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Los animales fueron eutanasiados por dislocación cervical, posterior a una inyección i.p. de una mezcla del anestésico ketamina con el sedante xilazina en una proporción 1:1 (v/v).

#### **4.4. Obtención de esplenocitos.**

A través de una incisión en el costado izquierdo del animal, se extrajo el bazo, el cual se mantuvo en PBS (Tampón fosfato salino; NaCl (137 mM), KCl (2,7 mM),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (8,0 mM),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,5 mM)) 1X + 5% suero bovino fetal (SBF). Los bazos fueron colocados en un *cell strainer* de 70  $\mu\text{m}$  (Corning) y utilizando el émbolo de una jeringa fueron disgregados en 5 mL de PBS 1X + SBF 5%, luego se centrifugaron a 2000 rpm. Para eliminar los glóbulos rojos del precipitado se realizó una lisis con buffer ACK (amoníaco-cloruro-potasio) (Gibco) durante 2 minutos, posteriormente se recuperaron los esplenocitos por centrifugación. Los esplenocitos fueron resuspendidos en PBS 1X + SBF 5% y

se ajustó el número de células por animal a  $2 \times 10^6$  células para su posterior tinción para citometría.

#### **4.5. Tinción para citometría de Flujo.**

Para determinar la frecuencia de linfocitos Treg en sangre, se realizó una citometría de flujo utilizando 50  $\mu$ L de sangre obtenidos al punto final. Tras una incubación con 100  $\mu$ L de buffer de lisis ACK (Gibco) durante 10 minutos a 37°C para lisar eritrocitos, se hizo dos tinciones: primero para identificar neutrófilos, se utilizó los anticuerpos anti-CD45-FITC y anti-Ly6G-APC. A una concentración de 1:100 y 1:200 respectivamente. Para identificar células Treg, se marcó con los anticuerpos anti-CD4-APC (Biolegend), anti-CD25-PECy7 (BDBiosciences) y anti-Foxp3-PE (Invitrogen) a una concentración de 1:100, 1:200 y 1:100, respectivamente. Para la tinción intracelular con el anticuerpo anti-Foxp3-PE, se realizó una permeabilización y fijación de las células utilizando el kit eBioscience FOXP3/transcription factor staining Buffer set (Invitrogen, USA).

Para determinar la frecuencia de Treg en el bazo, se tiñeron  $3 \times 10^6$  esplenocitos con los anticuerpos unidos a fluoróforos anti-CD4-APC (Biolegend), anti-CD25-PECy7 (BDBioscience), anti-Foxp3-PE (Invitrogen) y anti-CD44-PerCP-Cy5.5 (BDBioscience) a concentraciones de 1:100, 1:200, 1:100 y 1:200, respectivamente. Para la tinción intracelular con el anticuerpo anti-Foxp3-PE, se

realizó una permeabilización y luego una fijación de las células con el kit eBioscience FOXP3/transcription factor staining Buffer set (Invitrogen, USA) para permitir su análisis posterior.

Para el análisis de los linfocitos Th1 y Th17, las células aisladas del bazo y los linfonodos fueron estimuladas con 50 ng/mL de acetato de forbolmiristato (PMA) (Merck, Alemania) y 1 µg/mL de ionomicina (Merck, Alemania), en presencia de 10 µg/mL de brefeldina A (Sigma, USA) durante 4 horas en una estufa a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, las células fueron incubadas durante 30 minutos a 4°C con el anticuerpo anti-CD4-APC (BD Pharmingen). Finalmente, las células fueron permeabilizadas durante 45 minutos a 4°C con el kit FOXP3 Cytotfix/Cytoperm buffer (eBioscience, USA), e incubadas durante 16 horas a 4°C con los anticuerpos conjugados a fluoróforos contra IFN-γ-PerCP-Cy5.5 (BD Pharmingen) e IL-17A-AF488 (BD Pharmingen) para la identificación de los linfocitos Th1 y Th17, respectivamente.

#### **4.6. Citometría de flujo.**

Después del marcaje, las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 100 µL de PBS 1X. El análisis de las subpoblaciones se llevó a cabo en el equipo FACS Canto II (BD BioScience) junto con su software FACSDiva (BD Bioscience), utilizando 50.000 eventos por muestra. Se registraron tanto los

porcentajes como la intensidad media de fluorescencia (MFI) de cada marcador. Para el análisis de los datos obtenidos, se utilizó el software FlowJo (Tree Star).

**Tabla 1:** Anticuerpos utilizados para citometría de flujo.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Clon</b>	<b>Compañía</b>	<b>Código</b>	<b>Dilución</b>
CD4 – APC	RMA-5	Biolegend	100516	1:100
CD25 – PE-Cy7	PC661	BD	561780	1:200
CD44– PerCP-Cy5.5	IM7	BD	560570	1:200
CD45 - FITC	30-F11	BD	553080	1:200
Foxp3 - PE	FJK-16S	Invitrogen	12577382	1:100
IL17A– PerCP-Cy5.5	TC1118H110	BD	560666	1:100
IFN $\gamma$ – AF488	XMG1.2	BD	557724	1:100
Ly6G - APC	1A8	Biolegend	127613	1:200

#### **4.7. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas**

Los niveles de cortisol, TGF- $\beta$  e IL-6 en plasma se determinaron utilizando un kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de cortisol (Cortisol Parameter Assay Kit, R&D Systems, cat. KGE008B), TGF- $\beta$  (TGF beta-1 Human/Mouse Uncoated ELISA Kit, Invitrogen. cat. 88-8350-88), IL-6 (IL-6 Mouse ELISA Kit, Invitrogen. cat. BMS603-2) siguiendo el protocolo del fabricante. El plasma obtenido por centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos

de las muestras sanguíneas fue almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Según el protocolo para la determinación de cortisol, se añadieron  $10\ \mu\text{L}$  de la muestra de plasma y se realizó un pretratamiento incluido en el kit, que permite eliminar posibles interferentes y las proteínas unidas a cortisol. El procedimiento general para este ELISA de tipo competitivo consistió en agregar a cada pocillo de la placa de 96 pocillos incluida en el kit  $100\ \mu\text{L}$  de la muestra tratada,  $50\ \mu\text{L}$  de cortisol conjugado seguido de  $50\ \mu\text{L}$  del anticuerpo primario. La placa se dejó incubar durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación a  $500\ \text{rpm}$ , luego se lavó la placa tres veces con buffer de lavado incluido en el kit. Finalmente, se agregaron  $200\ \mu\text{L}$  de la solución sustrato de la reacción colorimétrica a cada pocillo y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, protegiendo la placa de la luz.

Para la determinación de IL-6 el procedimiento general para el ELISA de tipo sándwich consistió en agregar a cada pocillo de la placa de 96 pocillos incluida en el kit  $50\ \mu\text{L}$  de la muestra,  $50\ \mu\text{L}$  del diluyente para muestras incluido en el kit y  $50\ \mu\text{L}$  del anticuerpo anti IL-6 conjugado a biotina y se dejó incubando 2 h a temperatura ambiente. Se añadió estreptavidina-peroxidasa de rabanito picante (HRP) incubando 1h en agitación a temperatura ambiente y posterior a esto se añadió la solución sustrato de tetrametilbenzidina (TMB), se esperó 30 min y se detuvo la reacción enzimática con  $100\ \mu\text{L}$  de la solución Stop.

Para TGF- $\beta$  el procedimiento general para este ELISA de tipo sándwich consistió pretratar una placa de 96 pocillos con 50  $\mu$ L del anticuerpo de captura durante 16 h a 4°C. Luego de 3 lavados con el buffer de lavado incluido en el kit, se bloqueó con 200  $\mu$ L solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Las muestras fueron activadas a su forma inmunoreactiva acidificándolas, agregando 10  $\mu$ L de HCl 1N a las muestras diluidas 1:5 en PBS 1X incubando por 10 min a temperatura ambiente. Luego de la incubación las muestras fueron neutralizadas con 10  $\mu$ L de NaOH 1N. Se añadió 50  $\mu$ L de las muestras tratadas a cada pocillo y se dejó incubando 16 h a 4°C. Luego de lavar los pocillos, se añadió el anticuerpo de detección conjugado a biotina y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Se añadió estreptavidina-HRP incubando 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, se añadió la solución sustrato TMB, se esperó 15 min y se detuvo la reacción enzimática con 50  $\mu$ L de la solución Stop.

La densidad óptica de cada pocillo se determinó a 450 nm utilizando el lector de microplacas Smart Reader (Accuris Instruments). Las concentraciones se calcularon comparando las muestras con las curvas estándar generadas con los kits.

#### **4.8 Obtención de hipocampo de hembras aisladas**

Inmediatamente después de la eutanasia, se procedió a remover cuidadosamente el cerebro de los animales. Para la obtención de proteínas, se disecó la zona del hipocampo y se trituró mecánicamente con la ayuda de un bisturí, luego se almacenó en 500  $\mu$ L de solución inhibidora de proteasas (Roche). Por otro lado, los cerebros destinados al procesamiento histológico también se les disecó la zona del hipocampo y se depositaron en tubos con 10 mL de solución PFA al 4%, los cuales fueron almacenados a 4°C hasta su inclusión.

#### **4.9. Obtención de proteínas hipocampales.**

Los extractos de proteínas totales se obtuvieron de los hipocampos de las hembras eutanasiadas. Las muestras fueron lisadas en una solución cocktail de inhibidores de proteasas (Roche) y fueron sonicadas 3 veces en hielo a 300W. La cuantificación de las proteínas se realizó mediante el método de Bradford, obteniendo la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro.

#### **4.10. Western Blot.**

Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida al 12% (w/v) (100  $\mu$ g/carril), para luego ser transferidas a una

membrana de PDVF (poro de 0,45  $\mu\text{m}$ , Amersham Pharmacia Biotech., Piscataway, NJ, USA) e incubadas durante 16 horas a 4°C con los anticuerpos primarios anti Iba-1 (Wako), anti-GFAP (Clon G-A-5, BioSB) y anti-actina (Santa Cruz biotechnology) (Dilución 1:2000, 1:5000 y 1:10000 respectivamente). Después de realizar lavados con solución TBS 1X-Tween 0.05%, las membranas de PVDF fueron incubadas durante 2 horas con anticuerpos conjugados a peroxidasa (HRP) (1:5000; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., PA, USA). La reacción fue revelada utilizando el sistema de análisis quimioluminiscente aumentado (ECL) (Amersham Biosciences, Pittsburgh, PA, USA). Se utilizó como control de expresión y carga  $\beta$ -actina para los análisis densitométricos.

#### **4.11. Tratamiento histológico.**

Las muestras fueron procesadas en la batería de inclusión la que consistió en: 2 alcoholes de 70° por 60 min cada uno, 3 alcoholes de 96° por 60 min cada uno, 3 alcoholes 100° de 60 min cada uno, 2 xilol por 60 min cada uno finalmente 2 parafinas por 60 minutos cada una en estufa a 60°C. Posteriormente, se confeccionó el *cassette* histológico. Los cortes del tejido se realizaron en un micrótopo a un grosor de 7 $\mu\text{m}$  y se montó la zona de interés.

#### 4.12. Inmunohistoquímica.

Para identificar a las células microgliales, los cortes fueron desparafinados y pasados por la batería de tinción, la cual consistió en: tres xiloles por 5 min cada uno, dos alcoholes de 100° por 3 min cada uno, dos alcoholes de 95° por 3 min cada uno, un alcohol de 70° por 3 min y finalmente agua corriente. Para la recuperación antigénica, se utilizó buffer citrato pH 6,0 por 30 min. Se Bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrogeno 30% durante 15 min en oscuridad. Para el bloqueo de las proteínas inespecíficas se utilizó 2,5% *normal horse serum* por 20 min. La incubación con el anticuerpo anti-Iba-1 se realizó durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda y en oscuridad a una concentración de 1:200 del anticuerpo diluido en PBS 1X. Después de la incubación con el anticuerpo, se incubó durante 30 minutos con anticuerpo secundario biotinilado, para luego incubar durante 30 minutos con el complejo avidin-biotina para amplificar la señal. Finalmente, las muestras fueron marcadas con diaminobecidina (DAB) y luego se realizó una contra tinción con Hematoxilina de Harris. Después de la tinción, las muestras fueron deshidratadas y aclaradas en la batería histológica que incluyó: un alcohol de 70° por 30 minutos, 2 alcoholes de 95° por 3 minutos cada uno, 2 alcoholes de 100° de 3 minutos cada uno, y tres xiloles de 5 minutos cada uno.

#### **4.13. Análisis morfométrico.**

El análisis morfológico de microglías fue realizado mediante el software ImageJ - FIJI. En él, se evaluó el número y área ocupada por las células junto con un análisis más acabado de la morfología de las células a través de los plugin “*analyze skeleton*” y “*Neuroanatomy – Sholl analysis*”. El análisis del esqueleto de las células se realizó con el plug in “*Analyze skeleton*” posterior a la deconvolución por color de la imagen (DAB – hematoxilina), la selección del umbral desde la imagen que solo incluye la marca de DAB y la esqueletización de la imagen obtenida. El análisis de la complejidad de las ramificaciones se realizó utilizando el *plug in “Neuroanatomy – Sholl analysis”* para esto se determinó el centro del soma de cada microglía a través del método de Sholl el cual consiste en el trazado de círculos concéntricos desde el centro del soma de cada célula y la cuantificación del número de intersecciones de las ramificaciones con cada una de las circunferencias. Para el análisis se determinó un radio de inicio de 10 $\mu$ m, seguido de circunferencias de radio 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 65, 70, 75 y 80  $\mu$ m.

#### **4.14. Obtención de ARN y RT-qPCR.**

##### **4.14.1. Obtención de ARN.**

Para determinar los niveles de ARN mensajero de diversas citoquinas, se aisló el ARN total del bazo e hipocampo. Para ello, las muestras fueron transferidas a un microtubo de 1.5 mL libre de ARNasa, donde se trataron con 500  $\mu$ L del Trizol Reagent (Invitrogen). Las muestras se mantuvieron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Para la extracción de ARN, se añadieron 100  $\mu$ L de cloroformo y se agitaron enérgicamente, luego se dejaron reposar por 3 minutos a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . A continuación, se recogió la fase acuosa y se transfirió a un nuevo microtubo libre de ARNasa, añadiendo el mismo volumen de isopropanol para que precipitara durante 5 minutos a temperatura ambiente. Una vez precipitado el ARN, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El precipitado de ARN se lavó con 100  $\mu$ L de etanol al 70% (v/v) libre de nucleasas, luego los tubos se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet de ARN en agua libre de nucleasas.

#### **4.14.2. Cuantificación de ARN total.**

La cuantificación de ARN se realizó en el lector de microplacas EPOCH (Biotek). Para ello, se diluyó la muestra en una razón de 1:10 en agua libre de nucleasas, y se utilizó un volumen de 4  $\mu$ L de muestra por duplicado para que el equipo midiera la absorbancia a 260 nm, que es la longitud de onda de máxima absorción

de los ácidos nucleicos. El equipo proporcionó como resultado la concentración de la muestra en  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **4.14.3. Eliminación ADN Genómico Contaminante.**

Con el propósito de eliminar el posible ADN genómico remanente de la extracción de ARN, las muestras fueron tratadas con ADNasa I libre de ARNasa. Estas fueron procesadas agregando 1  $\mu\text{L}$  de tampón de reacción 10x de ADNasa I a un volumen de muestra que contenía 2  $\mu\text{g}$  de ARN total, luego se añadió 1  $\mu\text{L}$  de ADNasa I a una concentración de 1  $\text{U}/\mu\text{L}$  y finalmente se agregaron 8  $\mu\text{L}$  de agua grado biología molecular hasta completar un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ . Las muestras se incubaron en el termociclador convencional durante 30 minutos a 37°C, luego se añadió 1  $\mu\text{L}$  de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y se incubaron durante 10 minutos a 65°C para inactivar la enzima remanente.

#### **4.14.4. Transcripción Reversa (RT-PCR).**

Para la obtención del ADN complementario (ADNc), se utilizó el kit iScript Reverse Transcription Supermix para RT-qPCR (Bio-Rad, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se emplearon 2  $\mu\text{g}$  de ARN total de las muestras, que previamente fueron tratadas con ADNasa, y se añadieron 4  $\mu\text{L}$  de iScript RT

Supernix a cada muestra y 5  $\mu$ L de agua grado biología molecular. Luego se incubó a 25°C durante 5 minutos, seguido de una incubación a 46°C durante 20 minutos (temperatura óptima de actividad de la enzima transcriptasa reversa), para finalmente inactivar la enzima incubando a 95°C durante 1 minuto. Estos procesos se hicieron en un termociclador convencional (LifeECO TC-96/G/H(b)B, BIOER Technology, China). El ADNc generado se almacenó a -20°C para su posterior utilización.

#### **4.14.5. PCR en tiempo real (qRT-PCR)**

El ADNc obtenido por transcripción reversa se utilizó para realizar los análisis de expresión génica. Para ello, se llevó a cabo la amplificación del gen a analizar utilizando partidores diseñados específicamente para la especie, verificando su especificidad mediante alineación de blast nucleótido ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) y analizando su calidad en el programa IDT ([www.idt.com](http://www.idt.com)), como se muestra en la Tabla 3.1. Además, para medir la expresión relativa, se empleó el gen housekeeping 18S.

La amplificación del cDNA por PCR en tiempo real (qRT-PCR) se realizó en el equipo Real-Time PCR Detection System (QuantStudio 3 system, Applied Biosystems, Thermo Fisher) con SYBR Green SsoAdvanced Universal Supernix (Bio-Rad, USA), siguiendo las siguientes condiciones: activación inicial a 95°C,

seguida de 40 ciclos de amplificación: 95°C durante 30 s, 55°C durante 30 s, y 72°C durante 30 s. El *fold change* se calculó utilizando el método 2-ddCt (Ecuación 1), normalizado al control interno 18S. Las secuencias de los genes a determinar y de 18S se enumeran en la Tabla 2.

**Tabla 2:** Secuencia de partidores utilizados para la determinar la expresión de genes de interés.

<b>Gen</b>	<b>Secuencia <i>Forward</i></b>	<b>Secuencia <i>Reverse</i></b>
IL-6	GTTGCCTTCTTGGGACTGAT	GCCATTGCACAACCTCTTTTC
IL-10	GACAATAACTGCACCCACTTC	ACCCAAGTAACCCTTAAAGTCC
IL-1β	GATGAGAGCATCCAGCTT	GTCACAGAGGATGGGCTCTT
TGF-β	TTTTGCTCCTGCATCTGGT	CCTGGTACTGTTGTAGATGGAA
18S	GCCCGAAGCGTTTACTTTGA	TTGCGCCGGTCCAAGAATTT

**Ecuación 1:**

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\text{con } \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{18s} - \Delta Ct_{gen\ interes}$$

$$\Delta Ct_{gen\ interes} = Ct_{control} - Ct_{gen\ interes} \text{ y } \Delta Ct_{18s} = Ct_{control} - Ct_{18s}$$

#### **4.15. Análisis Estadísticos:**

Los resultados están expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar. Para el análisis estadístico de los datos, se empleó el software GraphPad Prism 9.0 (San Diego, CA, USA). Se utilizó la prueba t de Student para los datos con distribución normal y la prueba de Mann-Whitney para los datos que no presenten distribución normal. Se considerarán significativos los valores de p inferiores a 0.05.

## V. RESULTADOS

### **Objetivo 1: Caracterizar patrones conductuales en ratones hembra sometidas a protocolo de estrés por aislamiento social.**

Con la finalidad de establecer la existencia de dimorfismo sexual en el modelo de estrés por AS, se realizaron análisis del comportamiento en cohortes de machos y hembras.

#### **5. 1. Cambios en el peso corporal inducidos por AS.**

Como parte del protocolo de supervisión animal, que busca monitorear su bienestar, se registró el peso de los animales desde el inicio del experimento para observar cambios debido al estrés. Existe evidencia de que el estrés crónico es capaz de inducir cambios en el peso corporal de los animales, observándose, por ejemplo, que ratones macho sometidos a los protocolos CRS y CUS, disminuyen su peso (Kuti et al., 2022), mientras que otros modelos de estrés psicosocial como el modelo de derrota social producen un aumento de este (Goto et al., 2014). Específicamente en hembras, el estrés por hacinamiento, por ejemplo, ha

demostrado disminuir el peso de hembras estresadas luego de 15 días (Furman et al., 2022).

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que las hembras control experimentaron una ganancia de peso (expresado como la diferencia del peso final respecto al día 0), de  $2,58 \pm 0,94$  g, mientras que para las hembras aisladas por 7 semanas se obtuvo una ganancia de peso de  $3,39 \pm 1,02$  g, lo que corresponde a una diferencia del 31,4%. Estos resultados muestran una ganancia de peso significativamente mayor en las hembras aisladas ( $p < 0.0225$ ). En los machos, en cambio, los animales control ganaron en promedio  $3,00 \pm 0,77$  g, mientras que los machos aislados al término del experimento ganaron en promedio  $1,01g \pm 0,53$  g, lo que corresponde a una diferencia del 66%. Esto muestra que los machos aislados ganaron significativamente menos peso ( $p < 0,0001$ ) (Fig 4.A).

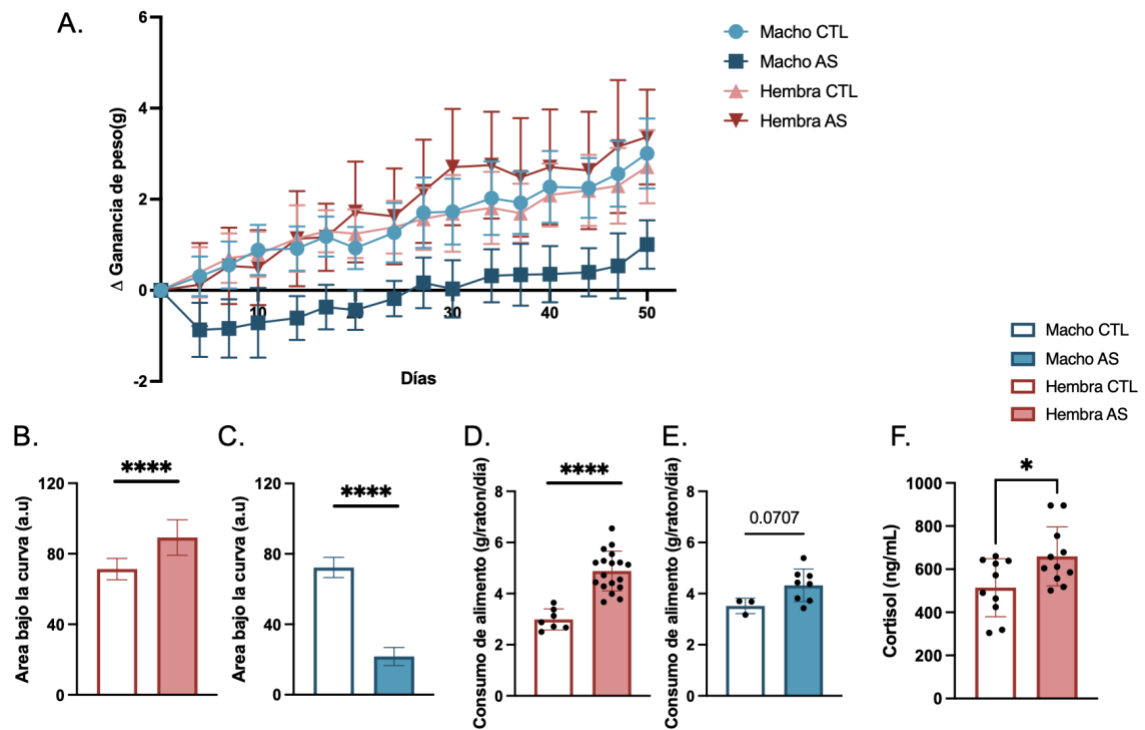
Por otro lado, apoyando la observación anterior, el análisis del área bajo la curva de la ganancia de peso para las hembras control es de  $71.3 \pm 6.06$ , para las hembras aisladas es de  $82,23 \pm 10,06$ , para los machos control  $21,71 \pm 10,06$  y para los machos aislados  $72,27 \pm 5,75$  (Fig 4.B y C). Así, observamos que 7 semanas de AS pueden inducir cambios opuestos respecto a la ganancia de peso según el sexo del animal, sugiriendo que el estrés por aislamiento social modifica el comportamiento alimenticio y/o el gasto energético.

Para determinar si la ganancia de peso fue producto de cambios en el consumo de alimento, evaluamos la cantidad de alimento ingerido durante las últimas cuatro semanas del protocolo de estrés. En la figura 4.D es posible observar que las hembras control consumieron en promedio  $2,99 \pm 0,41$  g/día, de alimento mientras que las hembras aisladas consumieron en promedio  $4,88 \pm 0,78$  g/día de alimento, lo que corresponde a un aumento significativo en casi el doble del alimento consumido por las hembras aisladas ( $p = 0,0004$ ). Este resultado es consistente con el aumento de peso observado en la figura 4.A y 4.B, de modo que podemos inferir que el aumento de peso está dado por un aumento en el consumo de alimento.

Cuando observamos el alimento consumido por los animales macho (Fig 4.E), los controles consumieron en promedio  $3,52 \pm 0,30$  g/día de alimento, mientras que los machos aislados consumieron en promedio  $4,33 \pm 0,64$  g/día de alimento. Esta diferencia no es significativa ( $p = 0,0707$ ), a pesar de mostrar una tendencia al aumento de la ingesta de alimento en los animales aislados. Contrario a lo observado en hembras, esta misma observación no explica la disminución de peso de los machos.

Se ha descrito que elevados niveles de cortisol se encuentran relacionados a un incremento de la ingesta en modelos de estrés (Furman et al., 2022; Yoshimura

et al., 2023), constituyendo además una medida de la activación del eje HPA producto del estrés (Gong et al., 2015). Por ello, decidimos analizar si la concentración de cortisol en plasma de las hembras aisladas estaba alterada. Al comparar la concentración de cortisol entre los grupos de estudio fue posible observar en las hembras control valores promedio de  $514,2 \pm 134,4$  ng/mL, mientras que en ratonas aisladas se observaron valores promedio de  $659,8 \pm 136,8$  ng/mL, mostrando un incremento estadísticamente significativo del 28.3% ( $p= 0.0238$ ) (Figura 4.F). Esta medición no pudo ser realizada en machos.



**Figura 4: Análisis de la ganancia peso corporal, ingesta de alimentos y cortisol.** A. Ganancia de peso en gramos a lo largo del protocolo de aislamiento. B y C. Área bajo la curva de ganancia de peso (n machos = 9, n hembras = 21) D y E. Ingesta de alimento en gramos de alimento consumidos por día. Los datos para los animales control se obtuvieron como el promedio de gramos consumidos por jaula dividido por el número de animales, siendo analizadas 8 jaulas control para las hembras y 3 para machos. (n para machos CTL: 3 jaulas, AIS: 9. N para hembras: 7 jaulas, n AIS: 18, de 5 experimentos independientes) F. Concentración de cortisol en plasma a punto final. (n CTL: 10; n AIS: 11, de 3 experimentos independientes). La comparación de los grupos de estudio se realizó mediante la prueba estadística t Student no pareado; ns: no significativo, \*: p < 0.05, \*\*: p < 0.01, \*\*\*: p < 0,001, \*\*\*\*: p < 0.0001)

## **5.2. Análisis de comportamiento tipo ansioso-depresivo luego del AS.**

El AS es un protocolo ampliamente descrito en machos, quienes se sabe presentan comportamiento tipo-ansioso (Al Omran et al., 2022) y -depresivo (Magalhaes et al., 2024) luego de varias semanas de AS. Sin embargo, en literatura, diversos autores ya han evidenciado la falta de estudios que utilicen este modelo en hembras (Tan et al., 2021; D. M. Walker et al., 2019).

Para validar el modelo en nuestro laboratorio, se realizaron las pruebas de comportamiento OFT y LDBT para evaluar comportamiento similar al ansioso y FST y ST para comportamiento similar al depresivo. La figura 5 muestra los resultados obtenidos en la prueba OFT, para los parámetros tiempo en el centro (Fig 5.A y B), número de entradas en el centro (Fig 5.C y D), distancia recorrida (Fig 5.E y F), velocidad promedio (Fig 5.G y H) y porcentaje del campo explorado (exploration index) (Fig 5.I y J).

Luego de 7 semanas de aislamiento, no se observaron diferencias significativas entre las hembras control y las aisladas en los parámetros de tiempo en el centro de la caja ( $p = 0,2960$ ) y frecuencia de entradas en el centro ( $p= 0,3761$ ), ampliamente asociadas en literatura a comportamiento ansioso. Por el contrario, en los machos se observó que los animales control promediaron una permanencia de  $53,6 \pm 20,07$  s en el centro de la caja, mientras que los aislados promediaron  $98,71,9 \pm 42,10$  s en el centro. Esta diferencia, que corresponde a

casi el doble del tiempo en el centro de la caja, fue estadísticamente significativa ( $p = 0,0160$ ).

Al evaluar el número de entradas en el centro de la caja, se observó que las hembras control entraron en promedio 41 veces al centro de la caja, mientras que las hembras aisladas 45 veces, sin existir una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio ( $p= 0,3761$ ). Los machos control, por otro lado, promediaron 23 entradas al centro, mientras que los aislados 47, Este incremento del doble en el número de entradas a la zona central fue estadísticamente significativa ( $p= 0,0017$ ).

No se observaron diferencias en los parámetros de actividad locomotora, como velocidad promedio ( $p = 0,1026$ ) y la distancia recorrida en hembras ( $p = 0,3201$ ), mientras que en machos no hay diferencias significativas en la velocidad promedio ( $p= 0,200$ ), pero se observa una tendencia a la disminución en los machos control en la distancia total recorrida en la caja ( $p=0,0675$ ). El parámetro de actividad exploratoria, "*exploration index*" que evalúa el porcentaje del área total explorada por el animal, resultó estar significativamente aumentado en los machos aislados ( $p = 0,0164$ ), pero no demostró diferencias significativas en hembras ( $p = 0,8654$ ).

De este modo observamos que luego de 7 semanas de aislamiento social, las hembras estresadas no presentan comportamiento ansioso en la prueba OFT, mientras que, contrario a lo que esperábamos, los machos estresados presentan un comportamiento menos ansioso que los controles al recorrer más distancia y pasar más tiempo al centro de la caja.

Para corroborar los datos obtenidos sobre sintomatología ansiosa, se realizó la prueba de caja Luz/Oscuridad (LDBT), donde se compara el tiempo que los animales pasan en la zona iluminada de la caja en lugar de permanecer en el área oscura que consideran más segura (Erk et al., 2023; Takao & Miyakawa, 2006). Los resultados muestran que, en promedio, las hembras control pasaron  $118,5 \pm 16,8$  s en la zona iluminada, mientras que las aisladas pasaron  $88,16 \pm 18,4$  s, es decir, pasan 25,6% menos tiempo en la zona iluminada que las control. Esta disminución es estadísticamente significativa ( $p = 0,01$ ) (Fig 5.K y L). Esto indica que las hembras aisladas exhiben comportamiento tipo-ansioso en esta prueba. No se pudo evidenciar una diferencia significativa en el tiempo que los animales machos sometidos a AS preferían la zona iluminada en comparación con los controles ( $p = 0,8687$ ), así que no se evidencia comportamiento ansioso mediante la prueba LDBT en machos tras 7 semanas de AS.

Posteriormente, se analizó el comportamiento depresivo a través de la prueba FST, ampliamente utilizada en literatura y que permite interpretar una a

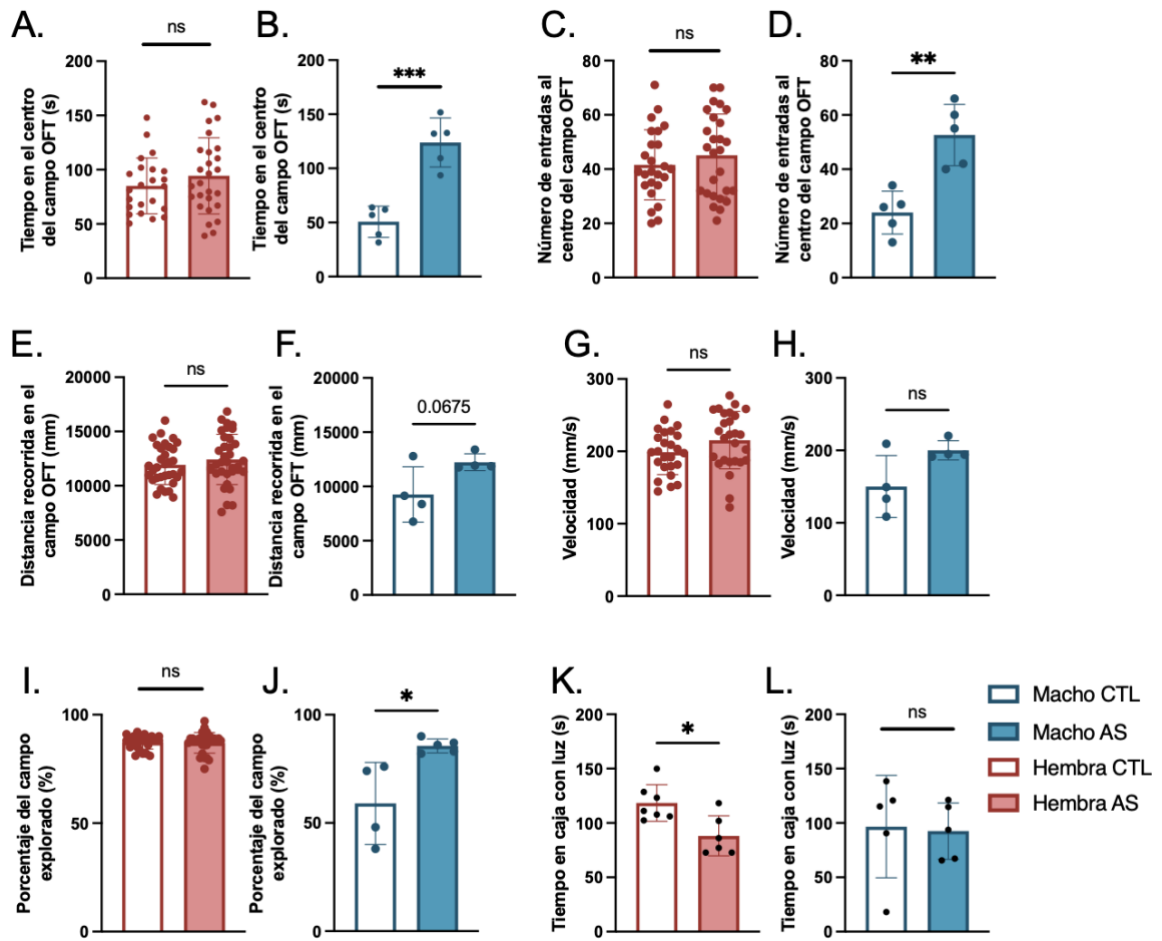
diminución del tiempo de nado o lucha durante la prueba como desesperanza del animal y, por tanto, comportamiento similar al ansioso (Yankelevitch-Yahav et al., 2015). Al analizar el comportamiento depresivo a través de la prueba de nado forzado o FST (Fig 6.A y B), fue posible observar que las hembras control presentaron en promedio  $87,52 \pm 37,67$  s de inmovilidad, mientras que las aisladas estuvieron en promedio  $130,1 \pm 20,66$  s, mostrando un incremento estadísticamente significativo ( $p < 0.0001$ ) del 48.84% en el tiempo inmóvil. En los machos, los animales control pasaron  $100,2 \pm 27,24$  s, mientras que los animales machos aislados pasaron  $139,6 \pm 27,43$  s, a pesar de no observar una diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0,052$ ), los animales aislados muestran una tendencia a estar más tiempo inmóvil que los animales control. De este modo, 7 semanas de AS, inducen comportamiento similar al depresivo evidenciado como una mayor desesperanza en la prueba FST.

Los resultados de la prueba de *splash*, por otra parte, mostraron en las hembras que los animales control pasan en promedio  $50,64 \pm 36,85$  s realizando *grooming* o acicalamiento, mientras que las aisladas, realizan esta conducta por  $21,69 \pm 20,41$  s, mostrando una disminución estadísticamente significativa ( $p = 0,0033$ ), del 57,2% en el tiempo del acicalamiento (Fig 6.C). Cuando observamos lo que ocurre con los machos (Fig 6.D), al igual que las hembras, existe una disminución del tiempo que los animales aislados pasaron realizando *grooming*, con un promedio de  $7,117 \pm 3,17$  s en comparación al grupo control que promedió  $26,37$

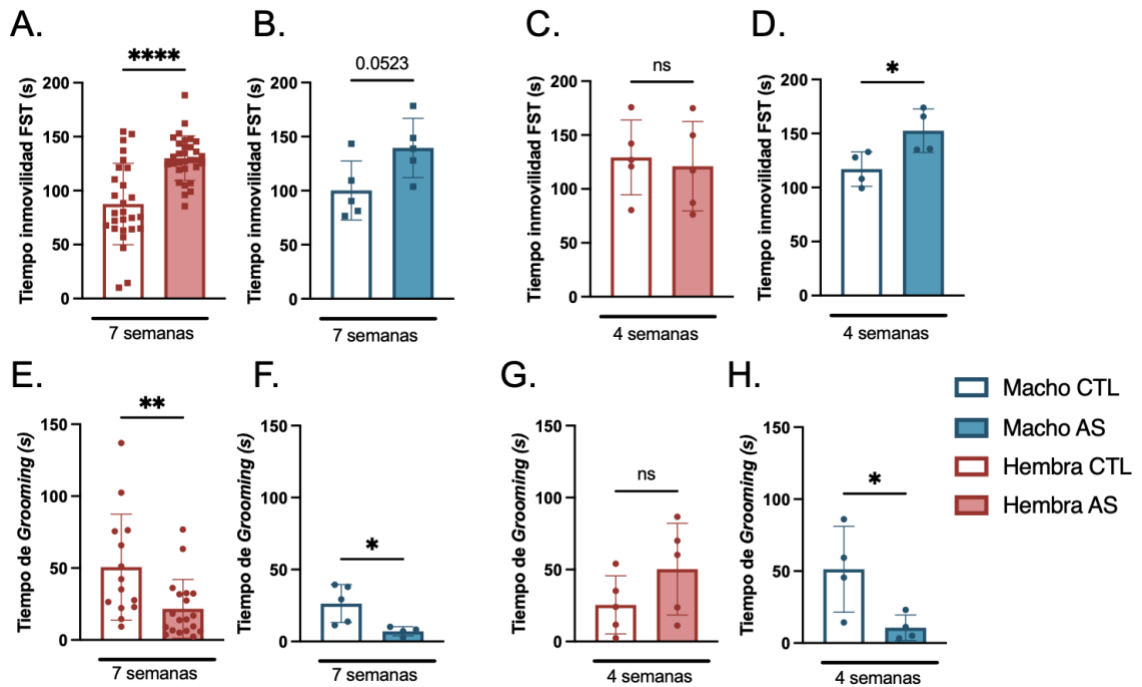
$\pm 13,19$  s. Así, en ambos sexos, los resultados muestran que 7 semanas de AS inducen comportamiento depresivo, dado por un incremento en la apatía.

Para entender la progresión temporal de la manifestación de síntomas similares a depresivos en las pruebas de comportamiento, una única cohorte de animales fue evaluada a las 4 semanas de aislamiento. Los resultados muestran para la prueba de FST que no existen diferencias significativas en el tiempo que las hembras control y aisladas pasan inmóviles durante la prueba ( $p = 0,744$ ). Por el contrario, los machos control promediaron  $117,1 \pm 15,98$  s. inmóviles, mientras que los aislados pasaron en promedio  $152,6 \pm 20,18$  s inmóviles, observándose un aumento significativo del tiempo de inmovilidad en la prueba ( $p = 0,0328$ ). En la prueba de *splash* los machos mostraron una disminución significativa ( $p = 0,0402$ ) del grooming promediando  $10,69 \pm 8,92$  s en comparación con los controles que promediaron  $51,32 \pm 29,85$  s, lo que corresponde a una disminución del 79,35% de este comportamiento. Sin embargo, cuando se evaluó a las hembras no se observó diferencias significativas entre los grupos de estudio ( $p = 0,1791$ ).

Así, el AS puede inducir comportamiento similar al depresivo, pero la aparición de la sintomatología es más temprana en machos, que manifiestan apatía y desesperanza ya a las 4 semanas, en cambio las hembras exhiben este comportamiento tras 7 semanas de aislamiento.



**Figura 5: Análisis de comportamiento del tipo ansioso:** A y B. Tiempo en el centro del campo. C y D. Número de entradas en el centro del campo OFT. E y F. Distancia recorrida en el campo. G y H. Velocidad promedio en el campo OFT. I y J. Índice de exploración del campo OFT. (Para hembras n CTL: 20; n AIS: 24, los datos representan el promedio de 5 experimentos independientes. Para machos n = 5 correspondiente a 1 experimento y n=4 para parámetros de actividad locomotora en C, D, E y F). La comparación de los grupos de estudio se realizó mediante la prueba estadística t Student no pareado). K y L. Tiempo de permanencia en la caja con luz en la prueba LDBT. (n machos = 5, n hembras= 6. Correspondiente a un experimento. La comparación de los grupos de estudio se realizó mediante la prueba estadística t Student no pareado) (ns: no significativo, \*:  $p < 0,05$  \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ )



**Figura 6: Análisis de comportamiento tipo depresivo:** A y B. Tiempo de inmovilidad en la prueba FST a las 7 semanas. C y D. Tiempo de inmovilidad para 4 semanas (N para 7 semanas; n machos: 5, correspondiente a un experimento, n hembras: CTL: 27; n AIS: 31, correspondientes al promedio de 6 experimentos independientes. N para 4 semanas: n machos: 4, n hembras: 5 correspondiente a un experimento) Analizados estadísticamente con la prueba estadística t- Student a excepción de 6.H, para la cual se utilizó Man-Whitney. E y F. Tiempo de acalamiento “Grooming” a las 7 semanas, luego de rociar al animal con solución viscosa durante la prueba *splash*. G y H. Tiempo de *grooming* para 4 semanas (N para 7 semanas: n machos: 5, CTL: 14; n AIS: 19, de 3 experimentos independientes. N para 4 semans n machos= 4, n hembras= 5 correspondiente a un experimento). La comparación de los grupos de estudio se realizó mediante la prueba estadística t-Student) (ns: no significativo, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ ).

**Objetivo 2: Analizar la respuesta inflamatoria celular a nivel periférico en ratones hembra sometidas a estrés por aislamiento social.**

### **5.3. Análisis de la respuesta inmune periférica de ratones hembra producto del estrés por AS.**

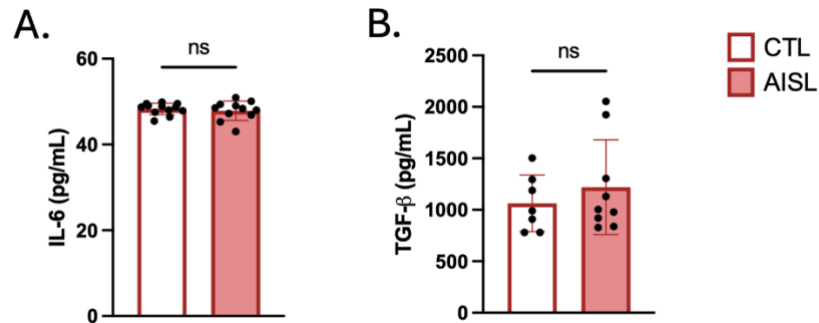
En literatura se ha sugerido que el estrés psicosocial crónico puede inducir una respuesta inmune disfuncional. Diversos artículos resumen y discuten los efectos del estrés en el sistema inmune, sus posibles consecuencias en la aparición de patologías, además de buscar los mecanismos que subyacen esta relación (Dhabhar, 2014; Liu et al., 2017; Morey et al., 2015; Zefferino et al., 2021). Entre ellas destacan: aumento de la concentración de citoquinas proinflamatorias en plasma, aumento de algunas poblaciones celulares como neutrófilos y monocitos y disminución de otras como linfocitos Th2 y Treg.

Como ya se discutió, el estrés puede inducir la activación de una respuesta inflamatoria y existe evidencia de que el estrés psicosocial produce un incremento en los niveles de citoquinas en plasma y a nivel cerebral, siendo una de las más reportadas IL-6, cuyos niveles se observan aumentados producto del estrés (Niraula et al., 2019; Qing et al., 2020). Por esta razón, como primera

aproximación, se evaluó la presencia de IL-6 en el plasma de los animales sometidos a AS como indicador de un ambiente proinflamatorio periférico. Contrario a lo que esperábamos, no se encontró una diferencia significativa en la concentración de IL-6 en plasma entre los grupos control y aislado ( $p = 0,5926$ ) (Fig 7.A). Cuando evaluamos TGF- $\beta$  en plasma, como ejemplo de citoquina antiinflamatoria, tampoco fue posible observar diferencias significativas entre las hembras control y aisladas ( $p = 0,5163$ ) (Fig 7.B).

### **5.3.1. Cambios en la respuesta inmune innata en sangre periférica de ratones hembra producto del estrés por AS.**

Para evaluar si existe un efecto del estrés por AS en el sistema inmune innato evaluamos a la población de neutrófilos circulantes en sangre identificados por citometría de flujo como la población CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> (Fig 8.A, B y C). Al comparar los grupos de estudio, no se encontró diferencias significativas en la frecuencia de neutrófilos entre hembras control y aisladas ( $p = 0,3939$ ) (Fig 8.C).



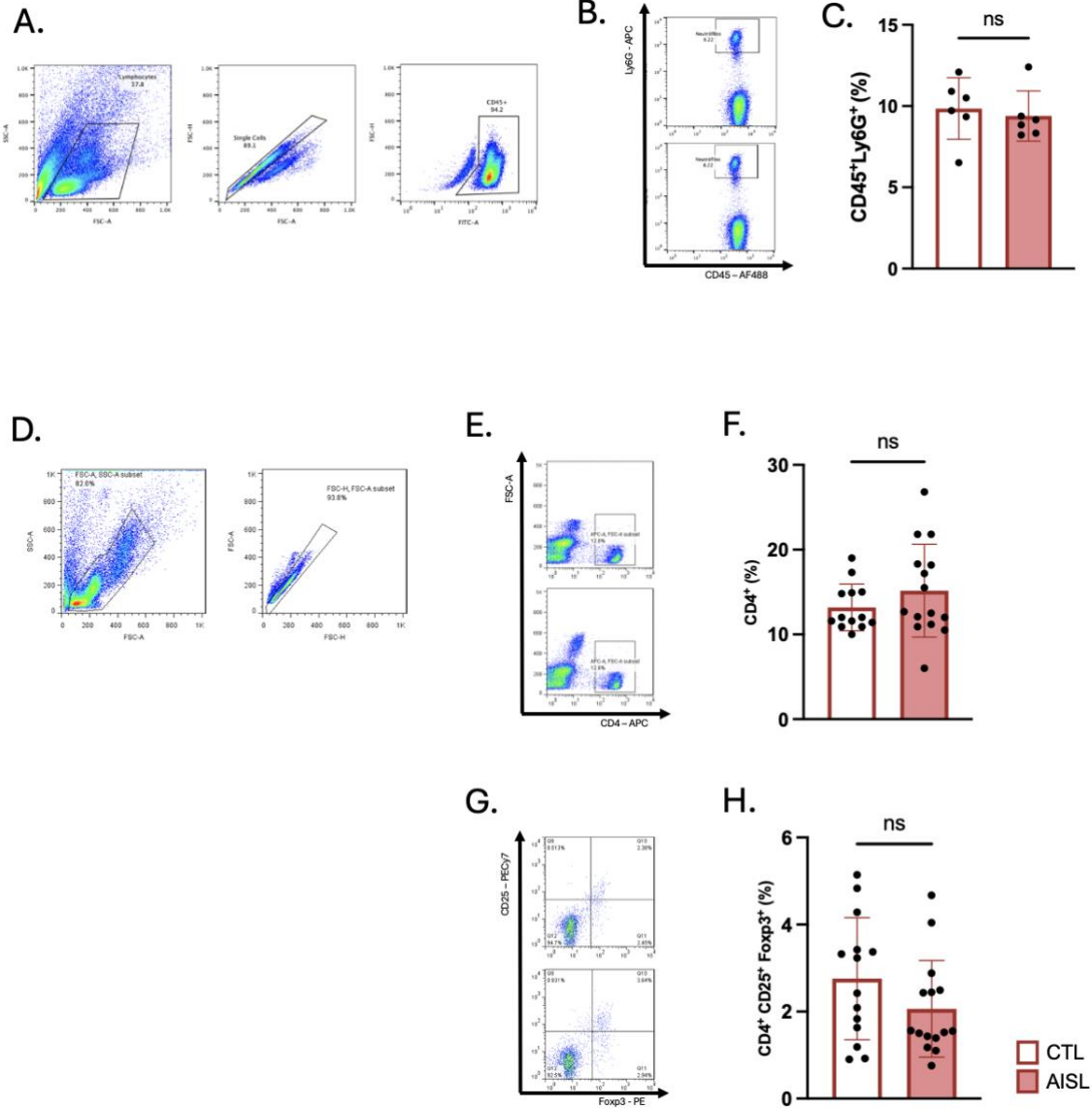
**Figura 7: Evaluación de citoquinas en sangre asociada a estrés por AS.** A. Concentración de IL-6 (pg/mL) determinada por ELISA (n: 12, los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes). B. Concentración de TGF-β (pg/mL) determinado por ELISA (n CTL: 7; n AIS: 9, los datos representan el promedio de 2 experimentos independientes). La comparación de los grupos de estudio se realizó mediante la prueba estadística t Student no pareado para 7.A y prueba estadística de Mann-Whitney para 7.B) (ns: no significativo, \*: p <0.05, \*\*: p <0.01, \*\*\*: p <0,001, \*\*\*\*: p<0.0001).

### **5.3.2. Cambios en la respuesta inmune adaptativa en sangre periférica de ratones hembra producto del estrés por AS.**

Una arista estudiada por algunos autores en el contexto de estrés corresponde a la pérdida de la regulación del sistema inmune en modelos de estrés psicosocial murino asociado a un ambiente proinflamatorio sostenido en el tiempo y a la disminución de la población celular encargada de recuperar la homeóstasis inmune: Los linfocitos T reguladores (Treg) (Harpaz et al., 2013; Schmidt et al., 2010). Con el objetivo de determinar cambios en la frecuencia de Treg en sangre periférica entre hembras socialmente aisladas y el grupo control, nuevamente utilizamos la técnica de citometría de flujo. Para ello desde sangre periférica, se evaluaron los marcadores de superficie CD4 y CD25, así como el marcador intracelular Foxp3.

Los resultados de citometría muestran que hembras control presentan en promedio un  $15,17 \pm 5,47\%$  de células positivas para CD4 y las hembras aisladas un  $13,18 \pm 2,76\%$ , sin observarse diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.2484$ ). Al observar lo que ocurre con la población de linfocitos Treg, (Fig 8.G), las hembras control tienen en promedio un  $2,755 \pm 1,4\%$  de células Treg, mientras que las hembras aisladas tienen un  $2,062 \pm 1,1\%$ , sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ( $p=0.4701$ ) (Fig 8.H).

En conjunto, nuestros resultados indican que el estrés por AS no produce alteraciones significativas en las frecuencias neutrófilos, células T CD4+, ni Tregs en circulación.



**Figura 8: Evaluación de poblaciones celulares en sangre asociada a estrés por AS.** A. Estrategia de *gate* y *plots* de citometría para identificación de población de Neutrófilos por citometría de flujo. B. Plots representativos para la población CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> en sangre periférica para grupos controles y aisladas. C. Frecuencia de neutrófilos (%) en sangre periférica (n= 10, los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes. La comparación de los grupos de estudio se realizó mediante la prueba estadística de Mann-Whitney). D. Estrategia de *gate* y *plots* de citometría para identificación de población de Linfocitos T CD4 por citometría de flujo. E. Plots representativos para la población CD4<sup>+</sup> en sangre periférica para grupos controles y aisladas. F. Gráficos de frecuencia (%) de Linfocitos T *helper*, correspondientes a la población total de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en sangre periférica evaluado por citometría de flujo y de la cual se evaluó a la población Treg CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. G. Plots representativos para la población CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> en sangre periférica para grupos controles y aisladas. H. Gráfico de frecuencia (%) linfocitos T reguladores en sangre periférica evaluado por citometría de flujo. (n CTL: 14; n AIS: 15, los datos representan el promedio de 4 experimentos independientes. La comparación de los grupos de estudio se realizó mediante la prueba estadística t Student no pareado para fig 8.F. y test de Mann-Whitney para fig 8.H).

#### **5.3.4. Análisis de las poblaciones de Linfocitos T provenientes de bazo de ratones sometidos a estrés por AS.**

El bazo, como órgano linfoide secundario de mayor tamaño, concentra un número importante de células inmunes que permite el análisis de diversas poblaciones de linfocitos T producto del proceso de “*homing*” inmunológico y corresponde a uno de los órganos donde ocurre la activación de los linfocitos y su diferenciación a linfocitos efectores (Sackstein et al., 2017). Debido a que se han encontrado diferencias en el porcentaje de algunas poblaciones celulares entre sangre periférica y el bazo, principalmente en la población CD4 (Pinchuk & Filipov, 2008), fuimos a evaluar distintas poblaciones de células T CD4+ presentes en el bazo por citometría de flujo y además determinamos si existían cambios expresión relativa de ARN mensajero de distintas citoquinas pro y antiinflamatorias.

El análisis de la población de linfocitos T CD4 provenientes de bazo muestra que los controles tienen en promedio  $18,42 \pm 2,045$  %, mientras que las hembras aisladas promedian  $17,76 \pm 1,673$  %, y, por tanto, no existe una diferencia significativa entre el porcentaje de células T CD4+ entre los grupos control y aislado ( $p = 0,2076$ ) (Fig 9.C).

Aun cuando la frecuencia de células T CD4<sup>+</sup> no se ve alterado producto del estrés por aislamiento social, nos preguntamos si existían diferencias en en las distintas subpoblaciones de células T CD4<sup>+</sup>, por esta razón se evaluó T efectoras totales (Teff), Treg, Th1 y Th17.

#### **5.3.4.1. Frecuencia de células Teff en bazo de animales sometidos a estrés por AS.**

Los linfocitos Teff, corresponden a células que están activadas, caracterizadas como CD4<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup>. La molécula CD44 participa en la adhesión y migración celular, la localización, activación y proliferación de linfocitos (Guan et al., 2009) y aumenta su expresión luego de la activación de células en estado naïve (Guan et al., 2009).

Los análisis por citometría muestran que un  $24,97 \pm 5,14\%$  de las células T CD4 son doble positivas para CD44 en las hembras control, y el  $25,92 \pm 5,7\%$  lo son en hembras aisladas (Fig 9.E) sin observarse diferencias significativas entre ellas ( $p = 0,644$ ).

#### **5.3.4.2. Frecuencia de células Treg en bazo de animales sometidos a estrés por AS.**

Cuando se observa lo que ocurre con la población de linfocitos Treg, se tiene que las hembras control tienen en promedio un  $3,199 \pm 0,81\%$  de las células Treg en bazo, mientras que las hembras aisladas tienen un  $3,072 \pm 0,57\%$ , no encontrando diferencias significativas entre los grupos de estudio ( $p= 0.9891$ ) (Fig 9.G)

#### **5.3.4.3. Frecuencia de células T helper 1 y T helper 17 en bazo de animales sometidos a estrés por AS.**

Modelos murinos de estrés han demostrado una estrecha relación entre las poblaciones T *helper* y la producción de determinadas citoquinas con la aparición de sintomatología depresiva (Palumbo et al., 2010). Aun cuando esta relación no resulta ser muy clara, se acepta que existe un aumento de INF- $\gamma$  producido por células Th1 y IL-17 producida por linfocitos Th17, así como un aumento de estas poblaciones producto del estrés (Palumbo et al., 2010; Russo et al., 2023). Estas observaciones no solo vienen de estudios en modelos animales (Nadeem et al., 2017; Russo et al., 2023), sino que también de estudios prospectivos en humanos (Huang & Lee, 2007; Kim et al., 2011; Palumbo et al., 2010).

Para evaluar lo que ocurre con la población de linfocitos Th17 se identificó mediante citometría de flujo, la expresión intracelular de IL-17 en células CD4<sup>+</sup>.

Los plots representativos para ambos grupos de estudio se presentan en la Fig 9.H. En el gráfico de la Fig 9.I, es posible observar que las hembras control tienen en promedio un  $0,686 \pm 0,21\%$  de las células Th17 en bazo, mientras que las hembras aisladas tienen un  $0,607 \pm 0,29\%$ . No se observó diferencias significativas entre los grupos de estudio ( $p= 0.4911$ ).

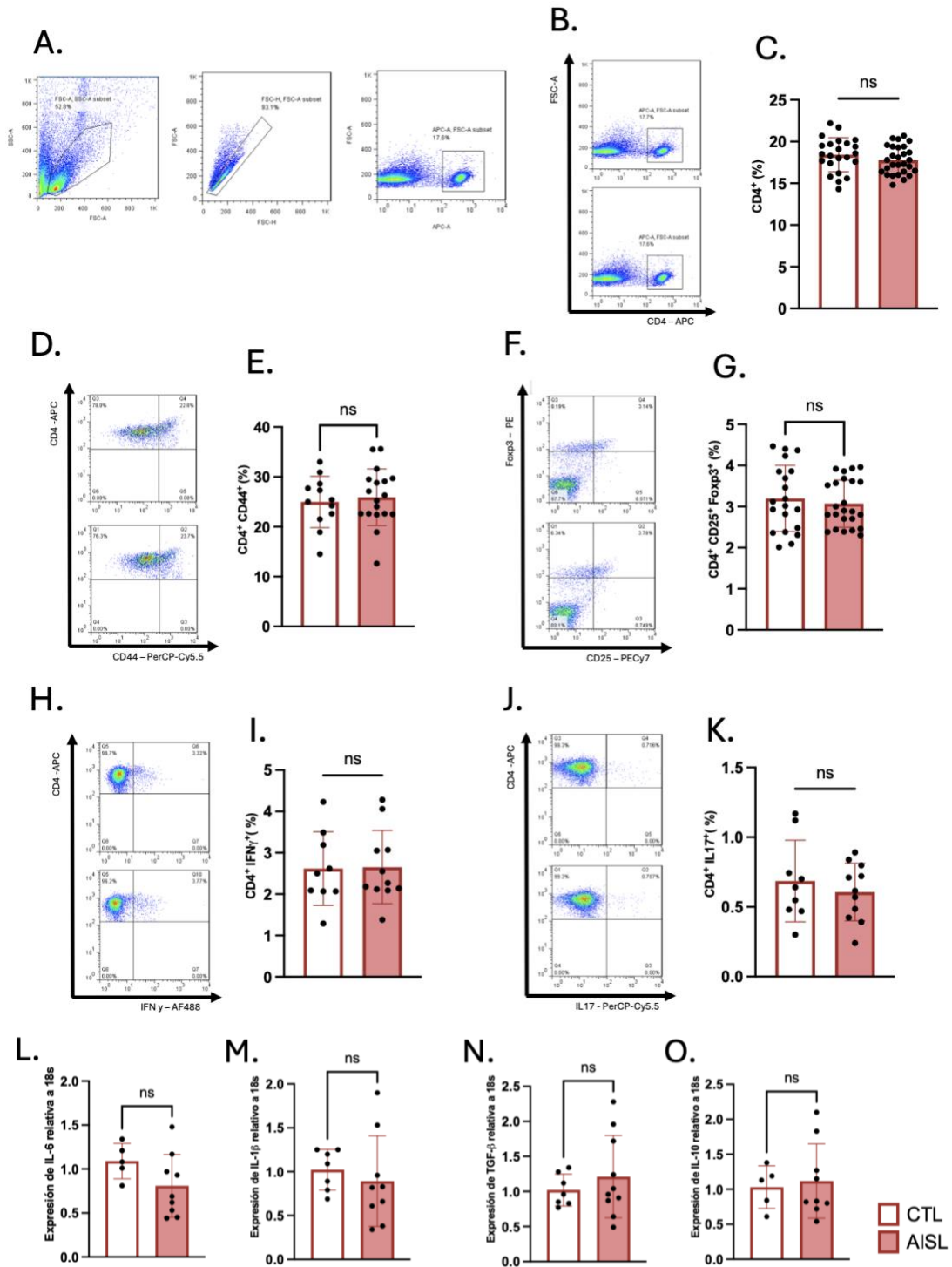
Al observar lo que ocurre con la población de linfocitos Th1  $CD4^+IFN\gamma^+$ , se determinó que las hembras control tienen en promedio un  $2,654 \pm 0,88\%$  de las células Th1 en bazo, mientras que las hembras aisladas tienen un  $2,617 \pm 0,89\%$ . No observándose diferencias significativas entre los grupos de estudio ( $p= 0.9891$ ) (Fig 9.J y 9.K)

### **5.3.5. Determinación de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias en bazo de ratones hembra expuestas a AS.**

Para complementar los resultados anteriores, se evaluó si en nuestro modelo de aislamiento social era posible identificar alteraciones en la expresión a nivel de ARNm de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-6 y las citoquinas antiinflamatorias: IL-10 y TGF- $\beta$ , comúnmente asociada a las Treg por su capacidad de disminuir la producción de citoquinas proinflamatorias, y promover la conversión de células T naïve en células Treg. En las figuras 9 L, M, N y O se

presentan los resultados de la expresión relativa al gen *house-keeping* rRNA 18s de ARNm de las citoquinas IL-6 (Fig 9.L), IL-1 $\beta$  (Fig 9.M), IL-10 (Fig 9.N) y TGF- $\beta$  (Fig 9.O), obtenidos mediante RT-qPCR. No fue posible determinar diferencias significativas entre la expresión relativa para ninguna de las citoquinas evaluadas en los grupos de hembras aisladas y control. (Para IL-6  $p= 0.9634$ , IL-1 $\beta$   $p= 0.376$ , IL-10  $p= 0.4889$  y TGF- $\beta$   $p= 0.5867$ ).

En resumen, los análisis realizados para abordar este objetivo sugieren que el estrés producto de AS no parece tener un impacto en la respuesta inmune periférica.



**Figura 9: Análisis mediante citometría de flujo del grado de inflamación periférica en animales sometidos a AS.** A. Estrategia de *gate* y *plots* de citometría para identificación de población de linfocitos por citometría de flujo. B. Plots de citometría representativos para la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. C. Frecuencia en % de la población CD4<sup>+</sup> en bazo para grupos controles y aisladas. (n CTL: 23; n AIS: 28, los datos representan el promedio de 6 experimentos independientes). D. Plots representativos para la población de células T eff CD4<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> en bazo para grupos controles y aisladas. E. Frecuencia (%) linfocitos T eff (CD4<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup>) en bazo evaluado por citometría de flujo (n CTL: 12; n AIS: 18, los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes). F. Dot plot representativos población T reg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) para control y aisladas G. Gráfico de frecuencia (%) linfocitos T reg en bazo evaluado por citometría de flujo (n CTL: 24; n AIS: 27, los datos representan el promedio de 6 experimentos independientes). H. Dot plot representativos población Th1 (CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>) para control y aisladas I. Gráfico de frecuencia (%) linfocitos Th1 en bazo evaluado por citometría de flujo (n CTL: 9; n AIS: 11, los datos representan el promedio de 2 experimentos independientes). J. Dot plot representativos población Th17 (CD4<sup>+</sup>IL17<sup>+</sup>) para control y aisladas K. Gráfico de frecuencia (%) linfocitos Th17 en bazo evaluado por citometría de flujo (n CTL: 9; n AIS: 11, los datos representan el promedio de 2 experimentos independientes). L - O. Expresión de citoquinas (IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  y IL-10) relativo a 18s. (n CTL: 7; n AIS: 10, de 2 experimentos independientes) Todos los datos fueron analizados con la prueba estadística t Student no pareado; ns: no significativo, \*: p <0.05, \*\*: p <0.01, \*\*\*: p <0,001, \*\*\*\*: p<0.0001)

**Objetivo 3: Evaluar parámetros de inflamación a nivel cerebral en ratones hembra sometidas a estrés por aislamiento social.**

A pesar de no observar alteraciones en el sistema inmune periférico producto del estrés, se evaluó la neuroinflamación como indicador de inflamación más localizada producto del estrés por AS en una de las regiones cerebrales que se ven más afectadas por el estrés y la depresión, el hipocampo.

El hipocampo es una estructura cerebral que se encuentra en el lóbulo prefrontal y forma parte del sistema límbico (Anand & Dhikav, 2012). Consta de los subcampos *alocorticales cornu ammonis* 1 a 4 (CA1-CA4) y el giro dentado (DG) (Roddy et al., 2019). Se conoce la importancia del hipocampo en procesos neuronales relacionados con el aprendizaje y la memoria, pero también está involucrado en la navegación espacial, el comportamiento emocional y la regulación de algunas funciones hipotalámicas (Anand & Dhikav, 2012).

Se han encontrado hipocampos de menor tamaño en pacientes deprimidos, lo cual se ha asociado a un mal pronóstico clínico (Frodil et al., 2004), a la neurotoxicidad inducida por glucocorticoides (Sheline et al., 1996), a la reducción de la neurogénesis hipocampal y al aumento de la apoptosis neuronal (Lucassen et al., 2010), apoyando la hipótesis de que el hipocampo cumple un rol crucial en el desarrollo de la depresión (Wise et al., 2017). En modelos murinos se han

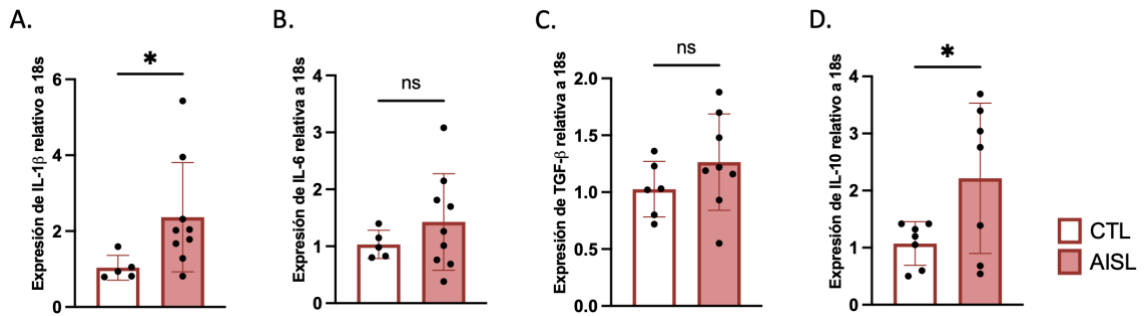
descrito procesos similares y se ha evidenciado un aumento de la actividad de neuronas del hipocampo en contextos ansiogénicos (Jimenez et al., 2018). Estos ejemplos permiten ilustrar la relevancia del hipocampo en el estudio de la patología depresiva y el estrés.

Es importante destacar que la respuesta neuroinflamatoria es un proceso progresivo y complejo, que se manifiesta principalmente por la activación y proliferación de células microgliales y astrocitos, la infiltración de células inflamatorias periféricas y la expresión de citoquinas inflamatorias, algunos de los cuales abordamos en este objetivo.

#### **5.4. Análisis de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias en hipocampo de ratones hembra expuestas a AS**

Como primera aproximación, se determinó la expresión relativa de distintas citoquinas en el hipocampo, a nivel de ARNm. Así se encontró que los animales aislados presentan una expresión relativa  $2,36 \pm 1,43$  veces mayor de la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$  que las hembras controles ( $p= 0,0125$ ) (Fig. 10.A). Sin embargo, para IL-6, no se observa una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ( $p= 0,3371$ ) (Fig. 10.B). Al observar los resultados de la expresión relativa de las citoquinas antiinflamatorias TGF- $\beta$  e IL-

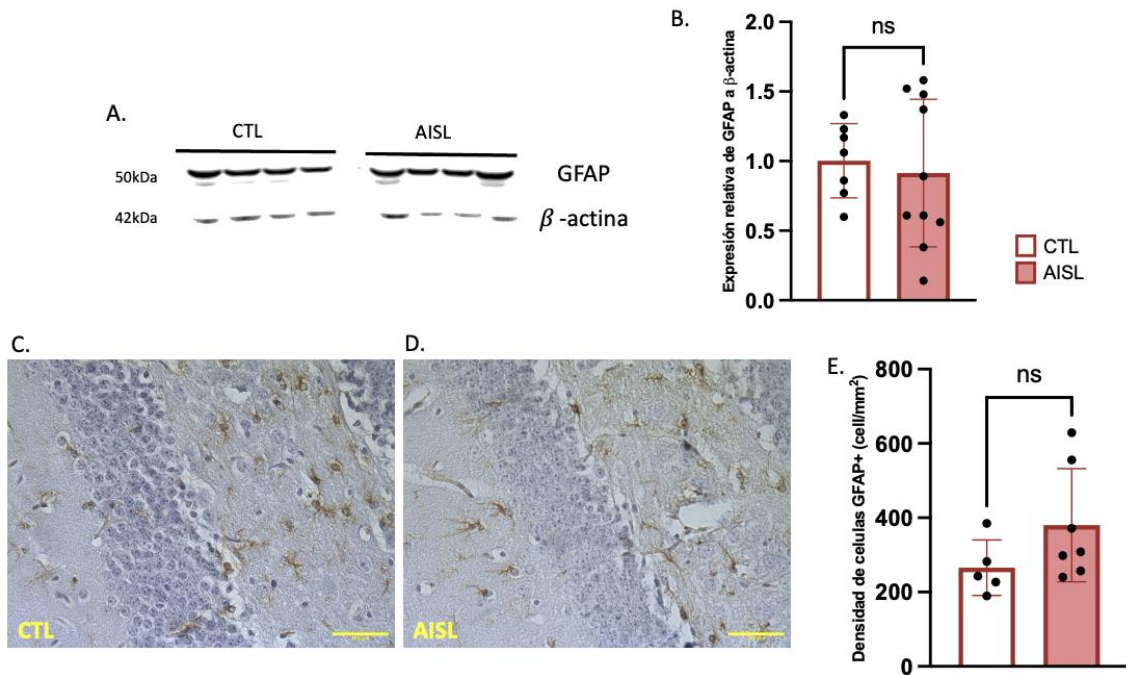
10, no se observaron diferencias significativas entre controles y aisladas para TGF- $\beta$  ( $p= 0,2459$ ) (Fig. 10.C), sin embargo, en el grupo de hembras bajo AS se observó un aumento significativo de la expresión relativa de IL-10, siendo  $2,21 \pm 1,31$  veces mayor que los controles ( $p= 0,0478$ ) (Fig. 10.D).



**Figura 10: RT-qPCR para la determinación de la expresión relativa de citoquinas en hipocampo de ratones estresados por AS: A, B, C y D** Expresión de citoquinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$  e IL-10, respectivamente) relativo a 18s. (n CTL: 6; n AISL: 8, de 2 experimentos independientes) Todos los datos fueron analizados con la prueba estadística t Student no pareado; ns: no significativo, \*: p <0.05, \*\*: p <0.01, \*\*\*: p <0,001, \*\*\*\*: p<0.0001)

### **5.5. Efecto del estrés por AS sobre el número de astrocitos hipocampales en ratones hembra.**

De la mano con la evidencia de cambios en la densidad de células astrogliales en hipocampo de pacientes deprimidos (Cobb et al., 2016), se ha observado que los astrocitos activados, o A1 son células clave en condiciones inflamatorias asociadas a patologías como el Alzheimer, el Parkinson y la esclerosis múltiple (Gao et al., 2024). Interesantemente esta activación también se ha observado en modelos de depresión, donde han evidenciado cambios morfológicos, moleculares y funcionales (Fang et al., 2022). Además, se ha observado que antidepresivos como la fluoxetina, son capaces de inhibir la activación de estas células (Fang et al., 2022). Debido al interesante rol de los astrocitos en la patología, decidimos estudiar el número de astrocitos mediante la detección de la proteína fibrilar glial ácida (GFAP). En primera instancia se evaluó cambios en la expresión de GFAP entre los grupos de estudio mediante western blot (Fig. 11.A), no encontrándose diferencias significativas ( $p= 0,867$ ) (Fig. 11.B). Posteriormente, se cuantificó mediante inmunohistoquímica el número de células GFAP positivas por área en el DG del hipocampo (Fig. 11.C-D), no encontrando diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y estresadas por AS ( $p= 0,1543$ ) (Fig. 11.E).



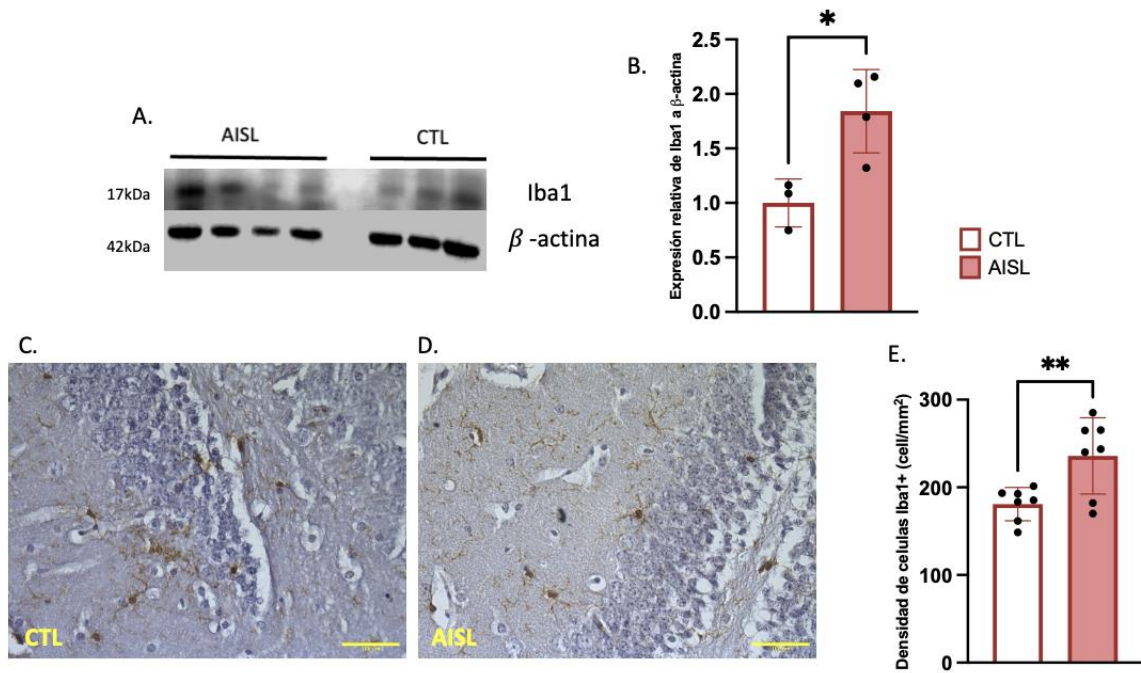
**Figura 11: Efecto del estrés por AS en células GFAP+ en hipocampo:** A. Western blot representativo de la inmunodetección de la proteína GFAP (50KDa) en animales control y aislados respecto al control de carga  $\beta$ -actina (42KDa). B. Cuantificación de la expresión relativa de GFAP a  $\beta$ -actina. C y D. Micrografías representativas de la inmunohistoquímica contra GFAP en el hipocampo de animales control (C) y aislados (D). E. Cuantificación de número de células GFAP+ por área en hipocampo. (Para el análisis por western blot n CTL: 7; n AISL: 9, de 2 experimentos independientes, mientras que para el análisis histológico n CTL: 5; n AISL: 7, de 1 experimento). El análisis estadístico de B se realizó mediante la prueba Mann-Whitney, mientras que los datos en E fueron analizados con la prueba estadística t Student no pareado; ns: no significativo, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ ). Barra de tamaño =  $100\mu\text{m}$ .

## **5.6. Efecto del estrés por AS en el número de células microgliales en el hipocampo de ratones hembra.**

La contribución fisiopatológica de la microglía a los trastornos depresivos es un tema de creciente interés en literatura. Por ejemplo, cambios en el número y la morfología microglial se han relacionado con un comportamiento similar a la depresión en ratones (Du Preez et al., 2021). Dado que la microglía es una fuente importante de mediadores proinflamatorios en el SNC, estas células son fundamentales para la teoría de que la depresión es una manifestación de un sistema inmunológico disfuncional (Hellwig et al., 2016). Por esta razón se determinó estudiar los cambios que el estrés por AS puede inducir en la microglía, y que puedan estar relacionados con la aparición de la sintomatología ansioso-depresiva observada en el modelo.

Para determinar diferencias en la expresión de la proteína microglial Iba-1, decidimos evaluar mediante western blot los niveles de expresión de Iba-1 en extractos proteínicos de hipocampos de hembras sometidos a estrés por aislamiento social (Fig. 12.A). Se encontró un aumento significativo de la expresión de Iba-1 en el hipocampo de animales aisladas en comparación con los animales control ( $p= 0,0199$ ) (Fig. 12.B). Posteriormente se cuantificó mediante inmunohistoquímica el número de células Iba-1 positivas por área en el hipocampo de animales control (Fig. 12.C) y estresadas por AS (Fig. 12.D). Los animales aislados socialmente presentaron en promedio una densidad de 235,9

células por  $\mu\text{m}^2$ , mientras que los animales control 180,9 células por  $\mu\text{m}^2$ , encontrándose un aumento significativo del número de células Iba-1+ por área en el DG del hipocampo de los animales aislados en comparación con los animales control ( $p= 0,0099$ ). Por tanto, el aislamiento social favorece la expresión de la proteína microglial Iba-1, producto de un aumento del número de células microgliales en el hipocampo.



**Figura 12: Efecto del estrés por AS en células Iba-1+ en hipocampo:** A. Western blot representativo de la inmunodetección de la proteína Iba-1 (17KDa) en animales control y aislados con respecto al control de carga  $\beta$ -actina (42KDa). B. Cuantificación de la expresión relativa de Iba-1 a  $\beta$ -actina. C y D. Micrografías representativas de la inmunohistoquímica contra Iba-1 en el hipocampo de animales control (C) y aislados (D). E. Cuantificación de número de células Iba-1 positivas por área en hipocampo. Para el análisis por western blot n CTL: 3; n AISL: 4, mientras que para el análisis histológico n: 7, de 2 experimentos. Todos los datos fueron analizados con la prueba estadística t Student no pareado; ns: no significativo, \*: p <0.05, \*\*: p <0.01, \*\*\*: p <0,001, \*\*\*\*: p<0.0001). Barra de tamaño = 100 $\mu$ m.

### **5.6.1. Cambios morfométricos en células Iba-1 positivas producto del estrés.**

Luego de evidenciar el efecto del estrés por aislamiento social en la densidad de microglías en el hipocampo, se determinó evaluar si existe un cambio en el estado de activación de estas células. Para determinar morfología activada de la microglía, se realizaron diversos análisis morfométricos a las células. Como ya se comentó, la microglía sufre importantes cambios morfológicos y funcionales en respuesta al estrés crónico, las cuales se resumen en la figura 2 de esta tesis. Esta respuesta es conocida como “reactividad” y consiste principalmente en somas hipertróficos y sus procesos, que normalmente son muy ramificados y delgados, se retraen y se engrosan. Por otro lado, adquieren capacidad fagocítica, y/o secretan moléculas potencialmente dañinas tales como citoquinas proinflamatorias y ROS.

La morfología de las células microgliales fue analizada mediante una inmunohistoquímica para Iba-1, cuantificando un total de microglías por animal, de modo que los datos presentados corresponden al promedio de estas (Fig. 13. A-F). Se determinó el área del soma de cada microglía para evidenciar la presencia de hipertrofia respecto al área del soma de los animales control. De este modo, el análisis de los somas permitió observar un área promedio de  $111,6 \pm 6,62 \mu\text{m}^2$  para los animales control y  $134,0 \pm 16,79 \mu\text{m}^2$  para los animales

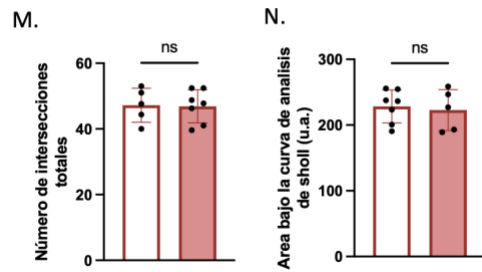
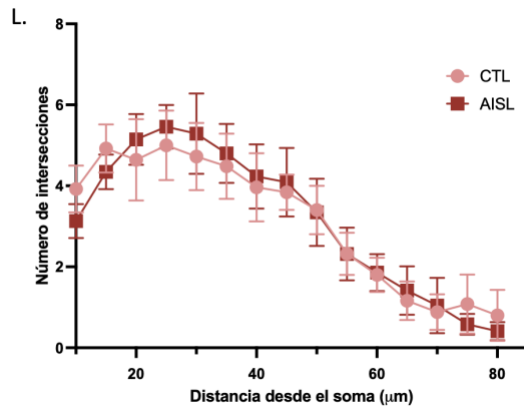
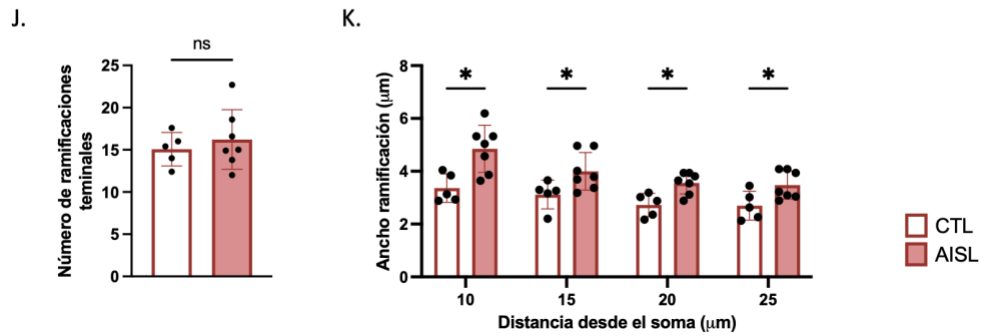
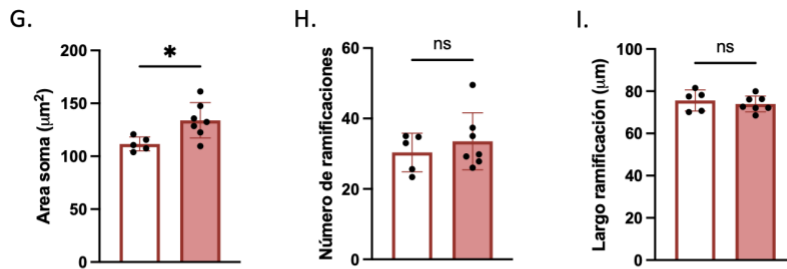
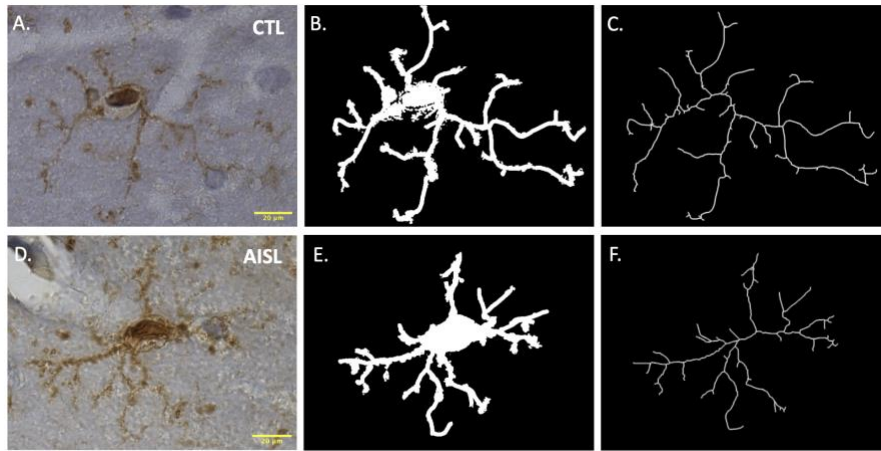
aislados, observándose un aumento significativo del área del soma en los animales aislados ( $p= 0,0191$ ) (Fig. 13.G). De esta forma, nuestros resultados sugieren que el estrés por AS induce una hipertrofia de los somas de las células microgliales.

Las imágenes binarias representativas para Iba-1 se presentan en las Fig. 13. B y E, mientras que las microglías esquelizadas se presentan en Fig. 13 C y F. Para cada microglía esquelizada se cuantificó el número de las ramificaciones (Fig. 13.H), el largo de la ramificación más larga (Fig. 13.I) y el número de ramificaciones terminales (Fig. 13.J). De este análisis se determinó que los animales control tienen  $30,36 \pm 5,4$  ramificaciones en promedio y los aislados  $33,53 \pm 8,107$ . De estas ramificaciones, la más larga mide  $70,10 \pm 4,99 \mu\text{m}$  en los controles, mientras que en los animales aislados mide  $68,52 \pm 3,75 \mu\text{m}$ . El número de ramificaciones terminales para los animales control corresponde a  $15,08 \pm 1,97$  ramificaciones y para los animales aislados  $16,23 \pm 3,53$  ramificaciones. Ninguna de estas observaciones representa diferencias significativas entre los grupos de estudio ( $p= 0,5264$ ,  $p= 0,4676$  y  $p= 0,5287$  respectivamente). De este modo observamos que el estrés por AS no induce cambios en las ramificaciones en términos de hiper o hipo ramificación de las células.

Lo siguiente fue evaluar si existía hipertrofia en las ramificaciones de las microglías producto del estrés por AS. Para esto, se determinó el ancho de la ramificación en el punto en que la ramificación interseca la circunferencia imaginaria de radio 10, 15, 20 y 25  $\mu\text{m}$  desde el centro del soma de la célula. De las mediciones se obtuvo que: para las ramificaciones que intersecan a una distancia de 10  $\mu\text{m}$  desde el centro miden un ancho promedio de 3,364  $\mu\text{m}$  en los animales control y 4,850  $\mu\text{m}$  en las hembras aisladas, siendo significativamente más anchas en estas últimas ( $p= 0,0082$ ). Cuando se midió el ancho a una distancia de 15  $\mu\text{m}$  desde el centro, las hembras control presentaron un ancho promedio de las ramificaciones de 3,118  $\mu\text{m}$  y las estresadas 3,996  $\mu\text{m}$ . A 20  $\mu\text{m}$  del centro el ancho de las ramificaciones de los animales control era en promedio 2,724  $\mu\text{m}$  y las de los animales estresados 3,554  $\mu\text{m}$ . Finalmente a una distancia de 25  $\mu\text{m}$  del centro del soma, las ramificaciones presentaron un ancho de 2,697  $\mu\text{m}$  en las hembras control y de 3,478  $\mu\text{m}$  en las aisladas. El análisis estadístico permitió determinar que las ramificaciones de las hembras aisladas socialmente seguían siendo significativamente más anchas que en las animales control a una distancia de 15  $\mu\text{m}$  ( $p= 0,0441$ ), 20  $\mu\text{m}$  ( $p= 0,0073$ ) y 25 $\mu\text{m}$  ( $p= 0,0320$ ) desde el centro del soma de la microglia (Fig. 13.K). Estos resultados sugieren que el estrés por aislamiento social induce una hipertrofia de las ramificaciones de la microglía localizada en el hipocampo.

Mediante el método de Sholl se analizó la complejidad de las ramificaciones de las microglías. El número de interacciones por cada circunferencia del método de Sholl fue graficado en la Fig. 13. L, donde es posible observar que para ambos grupos el radio de la circunferencia con más intersecciones es de 25  $\mu\text{m}$ , por tanto, es el punto de mayor complejidad para ambas condiciones. No se observan diferencias significativas para ningún punto de la curva de complejidad mediante el método de Sholl. El número total de intersecciones de las ramificaciones con las circunferencias delimitadas por el método de Sholl para los animales control es de  $47,20 \pm 5,194$ , mientras que para los aislados es de  $46,89 \pm 5,057$  interacciones, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos ( $p=0,9203$ ) (Fig. 13.M). Al evaluar el área bajo la curva de la gráfica del método de Sholl de la Fig. 13. L se obtiene un área promedio de  $222,8 \pm 31,16$  u.a. para los animales control y  $228,3 \pm 25,17$  u.a. para los animales aislados, por tanto, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $p=0,7411$ ) (Fig. 13.N). De este modo, no es posible observar diferencias en la complejidad de las ramificaciones de las microglías producto del estrés por aislamiento social mediante el método de Sholl.

Los datos recopilados de los análisis morfométricos permiten determinar que las microglías provenientes de animales aislados socialmente se encuentran en un estado reactivo, debido a un incremento de su morfología del tipo hipertrófica.



**Figura 13: Análisis morfométrico de células microgliales (Iba-1+):** A. y D. Fotomicrografías representativas de microglías marcadas mediante inmunohistoquímica contra la proteína Iba-1. B. y E. Imágenes binarizadas respecto al umbral del área Iba-1+. C. y F. Imágenes representativas de la esqueletización de las microglías analizadas. G. Área promedio del soma de las microglías analizadas para controles y animales aislados, H. Promedio de ramificaciones de las microglías analizadas, I. Largo promedio de la ramificación más larga, J. Promedio del número de ramificaciones terminales. K. Promedio del ancho de 4 ramificaciones por microglía en el punto de intersección con el círculo de radio 10, 15, 20 y 25  $\mu\text{m}$  respectivamente desde el soma de la célula. L. Análisis de Sholl de la complejidad de las ramificaciones con circunferencias con radio de inicio 10  $\mu\text{m}$  hasta 80  $\mu\text{m}$ , con paso de 5  $\mu\text{m}$ . M. Número de interacciones totales del análisis de Sholl. N. Área bajo la curva del análisis de Sholl. Todos los análisis morfológicos se realizaron con un n de 5 microglías por animal, siendo analizados 5 animales control y 7 aislados. Todos los datos fueron analizados con la prueba estadística t Student no pareado; ns: no significativo, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ ) Barra de tamaño = 20 $\mu\text{m}$

## **VI. DISCUSIÓN.**

Los resultados más importantes de este trabajo de tesis demostraron que el protocolo de aislamiento social (AS) de 7 semanas es capaz de inducir comportamiento similar al depresivo-ansioso en machos y hembras adultos. En hembras, el AS produce un aumento significativo de la hormona cortisol en plasma, mientras que a nivel central, específicamente en el hipocampo, es posible observar aumento de la expresión a nivel de ARNm de las citoquinas IL-1 $\beta$  e IL-10, junto con esto, un aumento del número de microglías en el DG del hipocampo, las cuales adquieren una morfología reactiva producto del estrés por AS. En esta misma zona, no se observaron diferencias en el número de astrocitos. Finalmente, a pesar de observar cambios en la respuesta inmune a nivel central, no se observan diferencias significativas a nivel periférico en la respuesta inmune innata y adaptativa producto del AS.

### **6.1. Caracterización del modelo de estrés por AS como modelo de depresión.**

El AS crónico es una forma profunda de estrés psicológico que afecta la salud mental de una gran proporción de la sociedad, y en humanos, la pérdida del soporte social se reconoce como un factor de riesgo importante para el desarrollo

de depresión (Ge et al., 2017; Luo, 2023). El AS ha sido caracterizado con anterioridad como un modelo de estrés capaz de inducir comportamiento ansioso y depresivo en animales de experimentación, pero es importante destacar que existe heterogeneidad en el tiempo de aislamiento utilizado en la literatura, variando desde 2 hasta 12 semanas y utilizando animales que ya han alcanzado la edad adulta o comenzando el aislamiento desde la adolescencia. Así por ejemplo, se ha descrito que 4 semanas de AS en machos adultos induce comportamiento ansioso en la prueba OFT, sin reportar sobre el comportamiento depresivo (Al Omran et al., 2021). Del mismo modo, Ieraci y cols., también con 4 semanas de AS en machos adultos encuentran comportamiento ansioso en la prueba OFT y además, encuentran comportamiento similar al depresivo en la prueba de suspensión de la cola (TST), que evalúa desesperanza como un aumento del tiempo de inmovilidad versus el tiempo que lucha por escapar mientras se le tiene colgado desde la cola (Ieraci et al., 2016). Por otro lado, 8 semanas de AS en machos adolescentes se observó que inducen comportamiento depresivo en la prueba FST y ansioso en OFT (Li et al., 2021). Resultados similares se observan en uno de los pocos estudios que compara el comportamiento de machos y hembras adultos luego de 8 semanas de AS, quienes a través de la prueba TST encuentran que los machos y las hembras presentan sintomatología similar a la depresiva, sin encontrar diferencias significativas en el tiempo de inmovilidad entre sexos, sin embargo, al evaluar el comportamiento depresivo mediante la prueba FST, solo encuentran diferencias

significativas en el tiempo de inmovilidad en machos (N. Liu et al., 2020). En este trabajo de tesis, se determinó utilizar 8 semanas de AS con la finalidad de no solo evidenciar cambios en el comportamiento, sino también evaluar posibles alteraciones en el eje HPA y el sistema inmune periférico y a nivel central.

Si bien el enfoque de este trabajo de tesis fue evaluar los efectos del estrés en hembras, se determinó utilizar una cohorte de animales macho que permitió demostrar diferencias asociadas al género en la aparición de la sintomatología depresiva y ansiosa. En ese sentido y similar a lo observado en literatura, 4 semanas de aislamiento social fueron suficientes para inducir comportamiento depresivo en las pruebas FST y ST en los animales macho, comportamiento que se mantuvo luego de 7 semanas de aislamiento. Por el contrario, las hembras aisladas no presentaron comportamiento depresivo a las 4 semanas, pero si a luego de 7 semanas de AS, similar a lo observado por Liu y cols (N. Liu et al., 2020). Este resultado es interesante, porque nos permite evidenciar la existencia de dimorfismo sexual (DS) en la patología de la depresión y en la respuesta al estrés. Otros modelos de estrés ya han demostrado la existencia de DS en la aparición de la depresión. Por ejemplo, en el modelo de derrota social, se ha observado que sólo los animales macho fueron susceptibles a este estrés y demostraron mayor inmovilidad en la prueba de suspensión desde la cola (que evalúa desesperanza al igual que la prueba FST) y disminución de la preferencia a consumir sacarosa (La Porta et al., 2024). En el modelo de AS, además se han

reportado diferencias ligadas al sexo en el comportamiento, demostrando que los machos son más agresivos, mientras que las hembras evitan contacto con otros animales posterior al aislamiento (Tan et al., 2021).

Aun cuando no observamos un comportamiento ansioso en la prueba de OFT, la cual es la más utilizada en literatura para determinar la presencia de dicho comportamiento (Tucker & McCabe, 2021), éste sí fue observado durante la prueba LDB. Interesantemente Tucker y Mc Cabe, discuten la importancia de utilizar más de una prueba de comportamiento para evidenciar la presencia de ansiedad, debido a que los parámetros evaluados en la prueba OFT responden a más de un comportamiento, viéndose influenciados no solo por el estado ansioso del animal sino también por su actividad locomotora y su interés por explorar (File, 2001). Además, resultados contradictorios encontrados en animales de experimentación expuestos a drogas ansiolíticas en esta prueba respaldan esta sugerencia, al no encontrar una disminución significativa del tiempo en el centro y por tanto no extinguir el comportamiento ansioso, luego de administrar benzodiazepinas a los animales como fármacos ansiolíticos (Thompson et al., 2015).

El estrés psicológico producto del aislar socialmente a los animales, además de inducir comportamiento ansioso, provoca desesperanza y pérdida de la motivación por el autocuidado (apatía), ambos considerados signos de depresión

en roedores (Becker et al., 2021). Esta observación respalda nuestra hipótesis y corresponde a un resultado esperado; los ratones son animales sociales (Netser et al., 2020) y por lo mismo, eliminar esta organización social interfiere en el desarrollo ontogénico del animal (Grigoryan et al., 2022).

La mayoría de los modelos de estrés crónico en ratones produce una disminución del peso corporal, producto de los estresores (Furman et al., 2022; Harpaz et al., 2013). Por ejemplo, en el estudio de Furman y cols, se evaluó la ganancia de peso durante un protocolo de estrés psicosocial en hembras por sobrepoblación, observando que las hembras estresadas ganaban menos peso corporal que las hembras control, mientras que Harpaz y cols, observaron resultados similares en hembras y machos expuestos a un protocolo de estrés CUS, que incluía como parte de los estímulos el aislamiento social de los individuos.

De manera interesante y contrario a lo que se ha encontrado en literatura, las hembras sometidas a AS en nuestro estudio aumentaron significativamente su peso durante el protocolo de estrés, lo que puede ser explicado por el aumento en la ingesta de alimento durante el protocolo de estrés, el cual corresponde a 1.89 veces más que el promedio de alimento consumido por los controles. Sin embargo, esta misma observación no permite explicar la disminución del peso en los machos, quienes al igual que las hembras, producto del estrés consumen más alimento.

Se sabe que la conducta alimentaria está relacionada con el estado emocional del individuo (Konttinen, 2020). En ese sentido, existe evidencia recopilada por Lam y cols donde se ha relacionado una disminución de las concentraciones de serotonina cerebral con un aumento en el peso y la ingesta de alimento (Lam et al., 2010). La mayoría de los estudios en humanos se centran en un aumento del consumo de alimento producto del estrés, pero el estrés también puede disminuir la ingesta calórica en algunas personas (Francois et al., 2022; Wallis & Hetherington, 2009). Aun cuando se observa esta heterogeneidad en la población, se ha encontrado que las características del estrés pueden influir en la dirección de la respuesta (Francois et al., 2022). Por ejemplo, el estrés físico es más propenso a suprimir la ingesta que los estresores psicológicos (O'Connor et al., 2008). Lo anterior va de la mano con lo observado en el contexto del AS como estresor psicológico, el cual induce un aumento de la ingesta de alimento en machos y hembras. Palanza y cols., llevaron a cabo una prueba de comportamiento para conocer la actividad de animales aislados en su jaula y su respuesta a áreas nuevas, para esto diseñaron un aparato que permitió abrir una de las paredes de la jaula y situarla dentro de una jaula mucho más grande y nueva para el animal. Los resultados encontrados por este grupo demostraron que las hembras exploraron menos y permanecieron más tiempo en su jaula que los machos (Palanza et al., 2001). Esta mayor actividad exploratoria de los machos, puede conducir a un incremento del gasto energético debido a un

aumento de la actividad física de los animales, de modo que este gasto energético pueda ser responsable de la pérdida de peso en los animales macho. Una mayor actividad locomotora en los machos podría explicar nuestros resultados. En esta tesis no evaluamos gasto energético durante o al finalizar el protocolo de estrés, nuestro único indicador de actividad locomotora corresponden a las mediciones realizadas durante la prueba OFT, donde observamos que los animales macho aislados exploran más la caja y tienden a recorrer una mayor distancia en comparación con los macho control, lo que podríamos interpretar como un mayor gasto energético asociado a mayor actividad física, sin embargo, metodologías más precisas como grabar a los animales en su jaula habitual durante días o la utilización de cajas metabólicas durante el protocolo de estrés, permitirían una interpretación más correcta de esta observación.

## **6.2. Caracterización de inflamación sistémica.**

Los mamíferos cuentan con un sistema inmunológico que los protege de agentes infecciosos y diversas agresiones que pueden causar daño. El estrés físico y psicológico es capaz de favorecer la liberación de factores endógenos asociados a daño (DAMPs) y promover el desarrollo de una inflamación estéril, que se define como la activación de procesos inflamatorios en ausencia de factores

exógenos como patógenos. Estos factores endógenos son reconocidos por los PRRs (receptores de reconocimiento de patrones), promoviendo la producción de mediadores inflamatorios, como las citoquinas (Franklin et al., 2018). De este modo la exposición a eventos estresantes puede alterar la homeostasis del sistema inmune, contribuyendo al desarrollo de trastornos como la depresión (Beurel et al., 2020; Hang & Huh, 2019). En las últimas décadas, la evidencia recopilada sobre la depresión y su asociación con la activación inmune sistémica ha crecido considerablemente. El origen de esta asociación surge debido a las similitudes fenomenológicas entre la depresión clínica y el patrón conductual característico del paciente enfermo que consiste en malestar, apatía, desinterés en las interacciones sociales con el entorno, letargo, inhibición conductual, reducción de la actividad locomotora, la disminución de la actividad exploratoria, reducción del acicalamiento, reducción del rendimiento reproductivo, anhedonia, somnolencia, anorexia, falta de concentración y ansiedad (Dantzer et al., 2008; Maes et al., 2012). Esta idea ganó mayor relevancia al observar que pacientes con depresión, al igual que pacientes con enfermedades infecciosas, presentaban aumento de citoquinas circulantes (Haapakoski et al., 2015). Además, el uso de IFN $\gamma$  como fármaco en patologías como la osteoporosis, resultan en efectos adversos relacionados con la depresión (Pinto & Andrade, 2016). El aumento de la producción de citoquinas observado llevó a proponer la existencia de una hiperactivación del sistema inmune y desde los años 2000, la investigación se ha centrado en el estudio de esta hiperactivación, con especial

interés en el estudio de las poblaciones celulares propias del sistema inmune innato y adaptativo (Beurel et al., 2020). Sin embargo, a pesar de la evidencia, los mecanismos por los cuales el sistema inmunitario se activa antes o durante la enfermedad no se comprenden completamente.

Tomando en consideración lo anterior, determinamos evaluar en nuestro modelo de estudio si existían diferencias en los niveles de citoquinas pro y antiinflamatorias y el porcentaje de células pertenecientes a la respuesta inmune innata y a la adaptativa. Así encontramos que, contrario a lo observado en literatura respecto a alteraciones en el sistema inmune en pacientes deprimidos, en el modelo de AS, no observamos diferencias en la concentración de citoquinas IL-6 y TGF- $\beta$ . Además, también mediante ELISA, decidimos determinar la concentración de TNF- $\alpha$  plasmático. Sin embargo, la sensibilidad del kit comercial adquirido y la metodología empleada, no permitieron obtener resultados. De forma similar, no observamos diferencias en la expresión de ARNm de las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 ni TGF- $\beta$  en el bazo de los animales. La población de neutrófilos como parte del sistema inmune innato o las poblaciones de células T CD4 como parte del sistema inmune adaptativo tampoco se observaron alteradas producto del estrés por AS. Esto puede apuntar a que la inflamación reportada en literatura corresponde a una inflamación de bajo grado, que, mediante las técnicas utilizadas en este trabajo, no pudo ser determinada. Técnicas más sensibles o análisis de la capacidad funcional de

estas células podrían alinear la data con lo encontrado en literatura. Adicional a esto, es importante notar que no todos los pacientes con depresión presentan inflamación asociado a la patología, por lo que esto puede ser una de las razones por las que no podemos observar diferencias en las citoquinas ni en poblaciones evaluadas (Lamers et al., 2018).

Los modelos animales de depresión corresponden a un desafío para la investigación y la validez de estos radica no solo en la observación de cambios en el comportamiento, sino también en la capacidad de reproducir alteraciones biológicas observadas en pacientes con depresión. Diferentes facetas de la conducta similar a la depresión y los aspectos fisiológicos relacionadas a ella puedan ser inducidas por medios genéticos, ambientales, quirúrgicos o farmacológicos, siendo los modelos basados en estrés los que mejor modelan la patología (Planchez et al., 2019). En ese sentido, la gran variedad de métodos que se tiene para inducir depresión en animales también habla de la complejidad de la patología (Becker et al., 2021) y lo difícil que resulta encontrar modelos que sean capaces de abarcar la gran cantidad de efectos fisiopatológicos que se conocen a la fecha, por ejemplo alteraciones en el eje HPA, en neurotransmisores e inflamación. Por esa razón es importante conocer el modelo que, según lo reportado en literatura, imite de mejor manera lo observado en humanos en ambos sexos. En ese sentido, los resultados obtenidos en esta tesis presentan aspectos del modelo de AS que no han sido explorados en literatura como lo es

el análisis detallado de poblaciones inmunes en periferia y la neuroinflamación especialmente en hembras, quienes muchas veces son pasadas por alto en investigación científica.

Un aspecto importante a considerar es que el modelo desarrollado en esta tesis permite imitar un determinado comportamiento observado en humanos que no necesariamente logra replicar en su totalidad los procesos fisiológicos observados en pacientes deprimidos. Más aún, el sistema inmune es un sistema altamente complejo, que aun cuando los animales de experimentación comparten cierta homología con los humanos, se reconocen, por ejemplo, diferencias en las proporciones de ciertas poblaciones inmunes como neutrófilos y linfocitos entre especies (Mestas & Hughes, 2004). Estas diferencias pueden influir en la interpretación y aplicación de los resultados de los estudios.

Finalmente, un aspecto a considerar es la temporalidad en el proceso inflamatorio. Las mediciones realizadas en el contexto de este trabajo corresponden a determinaciones a punto final, por lo que se debe considerar que al evaluar de este modo perdemos la cinética del proceso inflamatorio, en el contexto de otros procesos que cursan con inflamación de bajo grado como lo observado en la obesidad inducida por dieta alta en grasa, las vías relacionadas con la inflamación presentan fluctuaciones respecto a su expresión génica durante un periodo de 24 semanas (Bae et al., 2023). Los efectos inmunológicos observados en

literatura en el contexto del estrés psicológico y la depresión pueden estar relacionados con etapas más tempranas de la enfermedad, como lo que ocurre con el proceso inflamatorio de bajo grado observado en otras patologías como los eventos cardiovasculares (Sharif et al., 2021).

### **6.3. Caracterización de parámetros indicativos de neuroinflamación.**

Se ha propuesto que, en un contexto inflamatorio, las citoquinas generadas en la periferia atraviesan la BHE y llegan al cerebro, promoviendo neuroinflamación mediante la activación de las células gliales: astrocitos y microglía (Miller & Raison, 2016). Sin embargo, en nuestro modelo de hembras sometidas a AS, no observamos inflamación periférica y, por el contrario, sí encontramos un aumento en la expresión de la citoquina proinflamatorias IL-1 $\beta$  en el hipocampo, el cual se reconoce como un signo de neuroinflamación producto del estrés (Song et al., 2020). La producción de IL-1 $\beta$  en el hipocampo está dada principalmente por la microglía y los macrófagos infiltrantes, sin embargo, otras células como astrocitos y neuronas también pueden producirla (Boraschi et al., 2023). Además esta citoquina ya se ha relacionado en literatura con estrés crónico (Johnson et al., 2019; Song et al., 2020) y específicamente en AS, se ha demostrado mediante western blot, un aumento de la expresión de IL-1 $\beta$  en el hipocampo de ratones macho luego de 8 semanas de aislamiento (Li et al., 2021).

Como ya se comentó, las células microgliales influenciadas por el entorno asumen una diversidad de fenotipos las cuales resultan en cambios morfológicos (resumidos en Fig. 2) y funcionales. Estos fenotipos en literatura clásica se denominan activación clásica M1 y activación alternativa M2, similar a la caracterización de los macrófagos. Actualmente, en el caso de la microglía, los avances en tecnologías *single-cell* han entregado mayor evidencia que respalda la existencia de un espectro de activación y no una dicotomía estricta M1/M2 (Paolicelli et al., 2022). Por esta razón se sugiere utilizar los términos entregando un contexto funcional (Paolicelli et al., 2022). Este paradigma más flexible permite describir con mayor precisión el estado de activación de las células.

En la activación M1 clásica, que suele ser inducida por interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y lipopolisacárido (LPS) (Colonna & Butovsky, 2017), las microglías producen citocinas y quimiocinas inflamatorias, como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-12. Expresan la enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa que produce superóxido y ROS y la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), que produce óxido nítrico (NO), el complejo mayor de histocompatibilidad-II (MHC-II), integrinas CD11b y CD11c, y moléculas co-estimuladoras CD36, CD45 y CD47 (Colonna & Butovsky, 2017), contribuyendo al daño neurológico (Nguyen et al., 2017). En la activación M2 alternativa, en cambio, inducida por citocinas antiinflamatorias como IL-4 e IL-13, la microglía produce citocinas

antiinflamatorias IL-10 y TGF- $\beta$ , el factor de crecimiento neurotrófico BDNF, neurotrofinas y el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) (Colonna & Butovsky, 2017). También libera el factor de supervivencia progranulina e inducen la expresión del receptor de manosa (CD206), la quitinasa-3-like-3 (Chil3, Ym1 en roedores) y la enzima arginasa 1 (Arg1) (Colonna & Butovsky, 2017). Las microglías M2 promueven la fagocitosis de restos celulares y proteínas mal plegadas, promueven la reconstrucción de la matriz extracelular y la reparación de tejidos, y apoyan la supervivencia neuronal mediante factores neurotróficos (Tang & Le, 2016).

Nuestros resultados en hembras sometidas a AS muestran que además del aumento de la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$ , la citoquina antiinflamatoria IL-10 también se encuentra elevada. La microglía sintetiza y secreta IL-10 en respuesta a citoquinas inflamatorias y daño, cuando se encuentra en fenotipo “M2” esto, al igual que lo que ocurre en macrófagos, indica una activación antiinflamatoria que se relaciona con la resolución de la inflamación, fagocitosis y la reparación de los tejidos, y por tanto, en el contexto de la microglía, un fenotipo neuroprotector (Lobo-Silva et al., 2016). Hipotetizamos que este fenómeno esté respondiendo a un intento de la microglía por recuperar la homeostasis y que por tanto el fenotipo similar a M1 y M2 estén coexistiendo durante la depresión. Este fenómeno de compensación se ha observado en pacientes con esquizofrenia, otro trastorno mental, quienes presentaron aumento de citoquinas TGF- $\beta$  en plasma junto con

un aumento de los monocitos circulantes con perfil proinflamatorio (Drexhage et al., 2011).

La producción de citoquinas a nivel cerebral es solo uno de los indicadores de activación de células gliales, y por ende indicador de neuroinflamación (DiSabato et al., 2016). De este modo, nuestra segunda aproximación fue evaluar cambios en el número y morfología de la microglía y el astrocito, mediante inmunocitoquímica con cortes finos de cerebro, obtenidos mediante microtomo.

Respecto a la microglía y su activación en el contexto del AS, encontramos que existe un aumento de la densidad de células Iba-1+ en el DG del hipocampo y además estas células presentan morfología reactiva, evidenciada como hipertrofia de somas y ramificaciones que corresponden a manifestaciones de activación (Al Omran et al., 2022; Stein et al., 2017). No observamos diferencias en la complejidad de estas células mediante el método de Sholl, así como tampoco diferencias en el número de ramificaciones. Un fenotipo similar al observado por nosotros encuentra Al orman y cols en el modelo de AS de 4 semanas en machos, donde evalúan las microglías en el CA1 y CA2 del hipocampo, sin embargo, los autores encuentran una disminución de la densidad de microglías (Al Omran et al., 2022). Mientras que, en otro estudio, tras 8 semanas de AS en machos, muestran un aumento de la densidad de microglías en el hipocampo y una disminución de las intersecciones de las ramificaciones

mediante el método de Sholl (Shi et al., 2023). El único estudio encontrado que compara las microglías de machos y hembras en el hipocampo, pero en el contexto de un protocolo de AS mucho más corto (14 días) muestra, mediante inmunofluorescencias en cortes de 50  $\mu\text{m}$ , morfología hipertrófica de las microglías en el CA2 del hipocampo solo de animales macho, mientras que esta morfología estaba presente para ambos sexos en el hipotálamo (Vu et al., 2023). De este modo, este trabajo permite demostrar que esta morfología está presente en el hipocampo en periodos más extensos de aislamiento, sin embargo, el estudio de otras zonas relacionadas con la depresión como el hipotálamo, la corteza prefrontal, la amígdala, entre otras, corresponden a una limitante de nuestro estudio.

Los cambios morfológicos de la microglía en respuesta a agentes no deben interpretarse en términos funcionales, sino más bien tomarse como una sugerencia a profundizar en la relación entre estructura y función de la microglía (Paolicelli et al., 2022). Como se comentó anteriormente, la categorización de la microglía como M1/M2, no es una caracterización actualizada, pero corresponde a la más ampliamente utilizada en literatura tanto en modelos animales como humanos post mortem (Paolicelli et al., 2022). Tomando en cuenta las consideraciones anteriores, la interpretación de nuestros resultados se vería beneficiada del estudio de marcadores M1 y M2 mediante inmunofluorescencia, de modo de correlacionar estructura con función. Algunos marcadores

interesantes para evaluar fenotipo M1 corresponden a la secreción de las citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e INF- $\gamma$  y la expresión de las proteínas CD32, CD16, MHCII, además de los marcadores de actividad fagocítica CD86 y CD68. Mientras que para M2, encontramos la expresión de citoquinas antiinflamatorias IL-10, TGF- $\beta$ , IL-4, las enzimas Arg1, Ym1 y las proteínas de membrana CD206 y Trem2 (Kobayashi et al., 2013).

Por otra parte, el papel de los astrocitos en la depresión se ha relacionado con una reducción de la densidad y actividad de estas células en pacientes deprimidos (Yao et al., 2023) y modelos animales de depresión (Guo et al., 2024). Por ejemplo, producto del estrés CUS un estudio señala observar disminución del número de astrocitos en el hipocampo (Fang et al., 2022), mientras otro estudio con modelo CUS, no encuentra alteraciones en el número de astrocitos del hipocampo producto del estrés, pero si una disminución de la funcionalidad de las células en su capacidad de formar redes astrocíticas (Aten et al., 2023). Por el contrario, otro estudio utilizando machos estresados por el modelo de AS durante 4 semanas encontró un aumento en la densidad de astrocitos en el DG (Watanabe et al., 2022).

En esta tesis, no encontramos alteraciones en el número de los astrocitos en el giro dentado del hipocampo, pero cabe destacar que los datos obtenidos respecto a la densidad de células GFAP+ en el DG de las hembras estresadas

por AS presentó gran dispersión lo que podría hablar de distintas respuestas en los animales frente al estrés. Además, la evidencia expuesta en literatura corresponde a modelos desarrollados en machos, por lo que nuestros resultados pueden responder a diferencias asociadas al sexo.

Por otra parte, se ha observado que el estrés agudo y crónico alteran la expresión de genes asociados con la funcionalidad de los astrocitos (Aten et al., 2023). En ese sentido, se proponen los genes como C3, Ggta1, Lign1, Gbp2, fkbp5, srgn, entre otros ya que fueron encontrados regulados a la alza en cultivos de astrocitos tratados con citoquinas proinflamatorias *in-vitro*, así como en el hipocampo de ratones sometidos a estrés CUS (Fang et al., 2022). Un análisis respecto a la funcionalidad de estas células podrían explicar mejor las diferencias observadas entre los distintos estudios; por ejemplo, evaluar la morfología de estas células y/o genes asociados a la activación hacia astrocito reactivo A1. Los astrocitos reactivos A1 son inducidos por la microglía activada a través de la secreción de citoquinas, y responden con efectos neurotóxicos producto de esta activación (Fang et al., 2022; Miller & Raison, 2016). Por estos motivos sería de particular interés poder profundizar en estudios posteriores sobre las perturbaciones que podrían observarse en las funciones de los astrocitos en el modelo de AS.

Nuestros resultados son de especial interés, ya que demuestran la necesidad de realizar experimentación considerando a la población femenina y las diferencias fisiológica que existen asociadas al sexo. Además, destaca el rol de la neuroinflamación y de la microglía durante el desarrollo de la depresión como patología.

#### **6.4. Limitaciones y proyecciones para futuras investigaciones.**

Como ya se discutió, ningún modelo animal de depresión hasta la fecha satisface todos los conceptos de validez, debido a dos principales dificultades (Becker et al., 2021; Planchez et al., 2019); primero, la etiología neurobiológica de la depresión no ha sido completamente descrita y, por lo tanto, no puede ser completamente replicada en modelos animales, segundo, la depresión clínica se diagnostica sobre la base de un conjunto de síntomas altamente variables propios de humanos y, como tal, solo un subconjunto de síntomas puede medirse objetivamente en roedores, incluso cuando existen comportamientos análogos como por ejemplo, la interacción social anormal o comportamiento de acicalamiento, la relación establecida con los síntomas humanos puede no ser correcta o puede estar sujeta a antropomorfismo. Además, dada la naturaleza heterogénea de la depresión, tanto en términos de manifestación de síntomas como de su fisiopatología, ningún modelo animal establecido de depresión será

completamente traducible, lo cual es una consideración importante al interpretar los hallazgos del trabajo en esta tesis. Teniendo en consideración esta limitación, plantamos el AS como un modelo más cercano a la vivencia humana, puesto que el AS es un proceso estresante que los humanos sufren a diario por diversas razones. Explorar cómo el AS influye en el comportamiento y la fisiología de los roedores, permite identificar posibles correlatos biológicos y conductuales que, aunque no replican completamente lo observado en humanos, ofrecen una perspectiva sobre los factores que contribuyen a los trastornos depresivos. De esta manera, se puede avanzar en la comprensión de la depresión y en el desarrollo de intervenciones terapéuticas más efectivas, a pesar de las limitaciones inherentes de los modelos animales.

Una limitación importante de este trabajo, y que se debe tener en consideración al trabajar con cohortes de hembras, es evaluar el ciclo estral del animal. El ciclo estral puede dividirse en cuatro etapas, proestro, estro, metaestro y diestro (Zeng et al., 2023) y similar al ciclo menstrual humano, las hormonas sexuales femeninas (progesterona y estrógenos principalmente) fluctúan a lo largo del ciclo y tienen efectos en distintos procesos fisiológicos, como por ejemplo, la respuesta del sistema inmune, donde se ha documentado que en presencia de progesterona, la respuesta de los macrófagos frente a estímulos se ve comprometida (Menzies et al., 2011). En lo que respecta a los efectos que tienen las hormonas en el comportamiento durante pruebas como FST y OFT, no se

observan diferencias significativas en las etapas estro y diestro del ciclo estral luego de una semana de AS (Zeng et al., 2023), de modo que podemos suponer que el comportamiento no se ve mayormente afectado producto de las hormonas en nuestro caso. Sin embargo, este trabajo se vería beneficiado al incluir el estudio de la etapa del ciclo estral mediante citología del descamado vaginal (Byers et al., 2012) o la determinación de la concentración de hormonas en plasma mediante ELISA.

Respecto a la temporalidad de las pruebas de comportamiento, identificamos como una limitante la determinación del comportamiento en un único punto final. Esto que nos impedía conocer la cinética de la aparición del comportamiento de tipo ansioso-depresivo en un protocolo tan largo como lo es 7 semanas de AS. Por esta razón, se realizó el análisis del comportamiento de los animales, tanto machos como hembras, con la batería de pruebas de comportamiento a las 4 semanas de AS. A esta misma cohorte de animales se le volvió a exponer a las pruebas una vez finalizado el periodo de aislamiento (7 semanas), encontrándose que los animales presentaban un comportamiento alterado en las pruebas, observándose inmovilidad casi total en la prueba FST y menor conducta exploratoria en la prueba OFT. Hipotetizamos que esto puede deberse a que la prueba FST es altamente estresante para los animales y volver a enfrentarse a ella produjo que estos se paralizaran por el miedo. Por otro lado, la prueba OFT utiliza la naturaleza exploratoria de un ambiente nuevo en contraposición a la

necesidad de refugiarse. Por tanto, volver a exponer al roedor a un área que ya es conocida por él, desvía el objetivo de la misma prueba. Incluir más cohortes de animales para conocer los efectos que tiene el AS a lo largo de las semanas del protocolo significa un aumento significativo en el número de animales, lo que presenta consideraciones éticas al no poder asegurar que los resultados proporcionarán información crucial y novedosa a la investigación, además de no responder a la hipótesis de este trabajo.

Finalmente, las inmunohistoquímicas para Iba-1 realizadas en este trabajo corresponden a cortes finos de 7  $\mu\text{m}$ , que permiten tener una idea en 2 dimensiones de la morfología de la microglía. Considerando que la microglía es una célula de aproximadamente 200  $\mu\text{m}$ , utilizar cortes tan finos nos llevan a la pérdida de información respecto a la complejidad de la célula y su estructura en 3 dimensiones. Además, tal como se sugiere en literatura (Paolicelli et al., 2022), la caracterización de la activación de la célula en respuesta a estímulos debe incluir la mayor cantidad de información y complejidad posible, por esta razón lo observado en este trabajo de tesis puede resultar favorecido al incorporar los marcadores mencionados en el apartado anterior para la identificación de fenotipos de activación.

Perspectivas futuras a analizar para este trabajo de tesis en particular deben considerar la inclusión de animales machos, de modo de además de tener

información sobre los efectos del AS en la conducta, conocer qué ocurre con el sistema inmune en la periferia y a nivel central y de este modo establecer la existencia de dimorfismo sexual frente a la respuesta al estrés por AS como modelo de depresión.

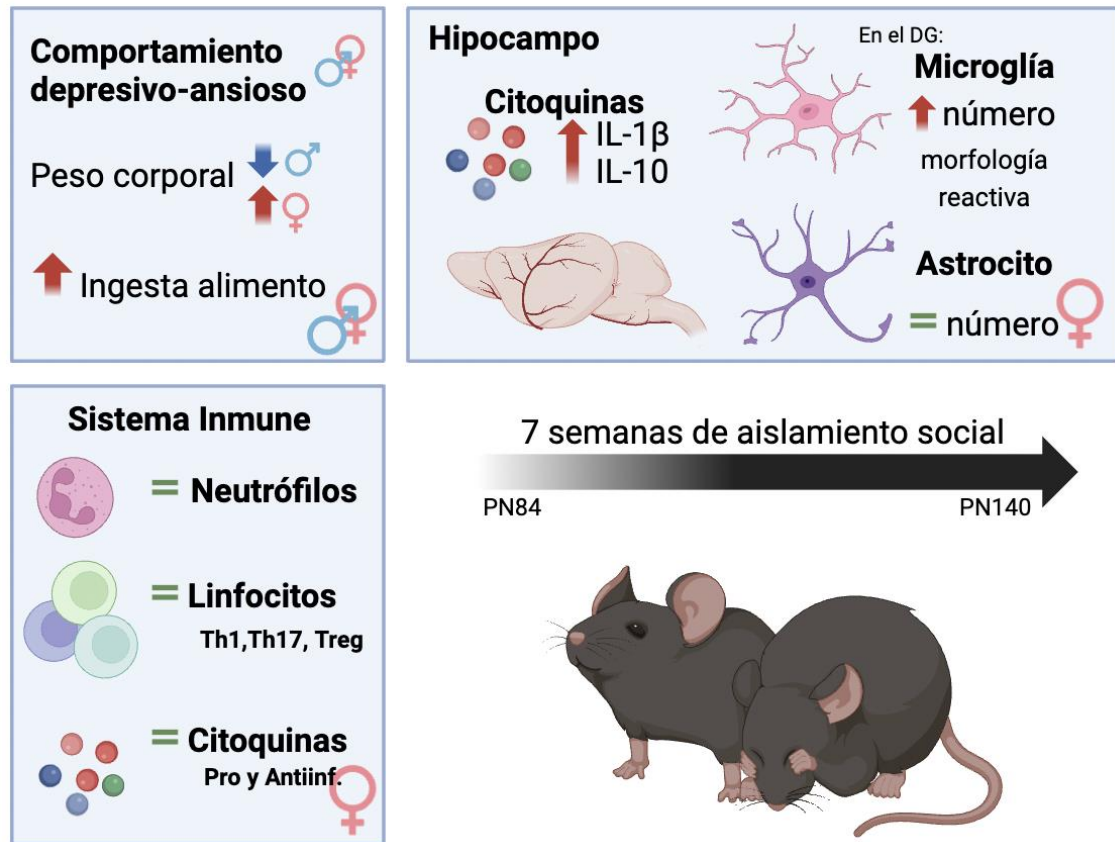
Para finalizar, este trabajo permite evidenciar que el AS es un estresor importante a considerar en la experimentación con modelos murino, por lo tanto, sería importante reconsiderar diseños experimentales que incluyan aislar animales, ya que como se discutió a lo largo de esta tesis, la fisiología del animal puede verse comprometida por los efectos del estrés crónico y por tanto los resultados obtenidos de dicha investigación verse opacados por los efectos que el AS tiene por ejemplo en el eje HPA, el sistema inmune y a nivel cerebral.

## VII. CONCLUSIÓN.

En esta tesis fue posible estandarizar un protocolo de estrés crónico por aislamiento social en un modelo murino de hembras con una duración de 8 semanas que, en primer lugar, es capaz de inducir una respuesta exacerbada del eje HPA, evidenciado como un aumento de los niveles plasmáticos de la hormona GC cortisol, demostrando que las hembras aisladas están estresadas. En segundo lugar, nuestro protocolo de estrés demostró ser un modelo válido para inducir comportamiento tipo depresivo y ansioso en hembras luego de 7 semanas de aislamiento. Además, pudimos establecer la existencia de dimorfismo sexual respecto a la temporalidad de la aparición de la sintomatología depresiva, siendo más temprana en machos.

Finalmente, se demostró que producto del estrés por aislamiento social no se detectan alteraciones en el sistema inmune innato ni adaptativo, pero sí se observan signos de neuroinflamación, evidenciado como un aumento de la expresión de citoquinas proinflamatorias y del número de microglías en el hipocampo. Además, pudimos demostrar que estas microglías presentan una morfología activada, evidenciado como hipertrofia de esta célula.

Los principales resultados de este trabajo se resumen en la figura 14.



**Figura 14: Resumen esquemático de los principales resultados:** Cambios conductuales y biológicos asociados con el estrés por aislamiento social (AS) de 7 semanas.

El recuadro superior izquierdo resume los cambios conductuales relacionados con sintomatología depresiva y ansiosa en machos y en hembras posterior a AS. En el lado derecho se encuentran los cambios en la biología de células microgliales y astrocitos en el giro dentado (DG) del hipocampo. El cuadrante inferior izquierdo muestra los cambios sistémicos asociados al AS, específicamente en poblaciones celulares de neutrófilos y linfocitos T y de los niveles de citoquinas en plasma y en bazo.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Acikgoz, B., Dalkiran, B., & Dayi, A. (2022). An overview of the currency and usefulness of behavioral tests used from past to present to assess anxiety, social behavior and depression in rats and mice. *Behav Processes*, 200, 104670. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2022.104670>
- Afridi, R., & Suk, K. (2023). Microglial Responses to Stress-Induced Depression: Causes and Consequences. *Cells*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/cells12111521>
- Al Omran, A. J., Shao, A. S., Watanabe, S., Zhang, Z., Zhang, J., Xue, C., Watanabe, J., Davies, D. L., Shao, X. M., & Liang, J. (2021). Social Isolation Induces Neuroinflammation And Microglia Overactivation, While Dihydromyricetin Prevents And Improves Them. *Res Sq*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-923871/v1>
- Al Omran, A. J., Shao, A. S., Watanabe, S., Zhang, Z., Zhang, J., Xue, C., Watanabe, J., Davies, D. L., Shao, X. M., & Liang, J. (2022). Social isolation induces neuroinflammation and microglia overactivation, while dihydromyricetin prevents and improves them. *J Neuroinflammation*, 19(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02368-9>
- Al-Harbi, K. S. (2012). Treatment-resistant depression: therapeutic trends, challenges, and future directions. *Patient Prefer Adherence*, 6, 369-388. <https://doi.org/10.2147/PPA.S29716>
- Albert, P. R. (2015). Why is depression more prevalent in women? *J Psychiatry Neurosci*, 40(4), 219-221. <https://doi.org/10.1503/jpn.150205>
- Ambree, O., Ruland, C., Zwanzger, P., Klotz, L., Baune, B. T., Arolt, V., Scheu, S., & Alferink, J. (2019). Social Defeat Modulates T Helper Cell Percentages in Stress Susceptible and Resilient Mice. *Int J Mol Sci*, 20(14). <https://doi.org/10.3390/ijms20143512>
- Anand, K. S., & Dhikav, V. (2012). Hippocampus in health and disease: An overview. *Ann Indian Acad Neurol*, 15(4), 239-246. <https://doi.org/10.4103/0972-2327.104323>

- Aten, S., Du, Y., Taylor, O., Dye, C., Collins, K., Thomas, M., Kiyoshi, C., & Zhou, M. (2023). Chronic Stress Impairs the Structure and Function of Astrocyte Networks in an Animal Model of Depression. *Neurochem Res*, 48(4), 1191-1210. <https://doi.org/10.1007/s11064-022-03663-4>
- Atrooz, F., Alkadhi, K. A., & Salim, S. (2021). Understanding stress: Insights from rodent models. *Curr Res Neurobiol*, 2, 100013. <https://doi.org/10.1016/j.crneur.2021.100013>
- Bae, H. R., Shin, S. K., Yoo, J. H., Kim, S., Young, H. A., & Kwon, E. Y. (2023). Chronic inflammation in high-fat diet-fed mice: Unveiling the early pathogenic connection between liver and adipose tissue. *J Autoimmun*, 139, 103091. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2023.103091>
- Becker, M., Pinhasov, A., & Ornoy, A. (2021). Animal Models of Depression: What Can They Teach Us about the Human Disease? *Diagnostics (Basel)*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/diagnostics11010123>
- Belovicova, K., Bogi, E., Csatlosova, K., & Dubovicky, M. (2017). Animal tests for anxiety-like and depression-like behavior in rats. *Interdiscip Toxicol*, 10(1), 40-43. <https://doi.org/10.1515/intox-2017-0006>
- Beurel, E., Toups, M., & Nemeroff, C. B. (2020). The Bidirectional Relationship of Depression and Inflammation: Double Trouble. *Neuron*, 107(2), 234-256. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.06.002>
- Beynon, S. B., & Walker, F. R. (2012). Microglial activation in the injured and healthy brain: what are we really talking about? Practical and theoretical issues associated with the measurement of changes in microglial morphology. *Neuroscience*, 225, 162-171. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.07.029>
- Boraschi, D., Italiani, P., Migliorini, P., & Bossu, P. (2023). Cause or consequence? The role of IL-1 family cytokines and receptors in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. *Front Immunol*, 14, 1128190. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1128190>

- Bouguiyoud, N., Rouillet, F., Bronchti, G., Frasnelli, J., & Al Ain, S. (2021). Anxiety and Depression Assessments in a Mouse Model of Congenital Blindness. *Front Neurosci*, 15, 807434. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.807434>
- Bowman, M. A., Vitela, M., Clarke, K. M., Koek, W., & Daws, L. C. (2020). Serotonin Transporter and Plasma Membrane Monoamine Transporter Are Necessary for the Antidepressant-Like Effects of Ketamine in Mice. *Int J Mol Sci*, 21(20). <https://doi.org/10.3390/ijms21207581>
- Brigitta, B. (2002). Pathophysiology of depression and mechanisms of treatment. *Dialogues Clin Neurosci*, 4(1), 7-20. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2002.4.1/bbondy>
- Buch, A. M., & Liston, C. (2021). Dissecting diagnostic heterogeneity in depression by integrating neuroimaging and genetics. *Neuropsychopharmacology*, 46(1), 156-175. <https://doi.org/10.1038/s41386-020-00789-3>
- Byers, S. L., Wiles, M. V., Dunn, S. L., & Taft, R. A. (2012). Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS One*, 7(4), e35538. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035538>
- Cahill, L. (2006). Why sex matters for neuroscience. *Nat Rev Neurosci*, 7(6), 477-484. <https://doi.org/10.1038/nrn1909>
- Chang, J., Jiang, T., Shan, X., Zhang, M., Li, Y., Qi, X., Bian, Y., & Zhao, L. (2024). Pro-inflammatory cytokines in stress-induced depression: Novel insights into mechanisms and promising therapeutic strategies. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 131, 110931. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2023.110931>
- Cheng, Y., Pardo, M., Armini, R. S., Martinez, A., Mouhsine, H., Zagury, J. F., Jope, R. S., & Beurel, E. (2016). Stress-induced neuroinflammation is mediated by GSK3-dependent TLR4 signaling that promotes susceptibility to depression-like behavior. *Brain Behav Immun*, 53, 207-222. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.12.012>
- Cobb, J. A., O'Neill, K., Milner, J., Mahajan, G. J., Lawrence, T. J., May, W. L., Miguel-Hidalgo, J., Rajkowska, G., & Stockmeier, C. A. (2016). Density of GFAP-immunoreactive astrocytes is decreased in left hippocampi in major depressive

disorder. *Neuroscience*, 316, 209-220.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.12.044>

Colle, R., Masson, P., Verstuyft, C., Feve, B., Werner, E., Boursier-Neyret, C., Walther, B., David, D. J., Boniface, B., Falissard, B., Chanson, P., Corruble, E., & Becquemont, L. (2020). Peripheral tryptophan, serotonin, kynurenine, and their metabolites in major depression: A case-control study. *Psychiatry Clin Neurosci*, 74(2), 112-117.  
<https://doi.org/10.1111/pcn.12944>

Colonna, M., & Butovsky, O. (2017). Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol*, 35, 441-468.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>

Cordova-Palomera, A., Tornador, C., Falcon, C., Bargallo, N., Brambilla, P., Crespo-Facorro, B., Deco, G., & Fananas, L. (2016). Environmental factors linked to depression vulnerability are associated with altered cerebellar resting-state synchronization. *Sci Rep*, 6, 37384. <https://doi.org/10.1038/srep37384>

Cruz-Topete, D., & Cidlowski, J. A. (2015). One hormone, two actions: anti- and pro-inflammatory effects of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation*, 22(1-2), 20-32. <https://doi.org/10.1159/000362724>

Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., & Kelley, K. W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(1), 46-56.  
<https://doi.org/10.1038/nrn2297>

David, D. J., Samuels, B. A., Rainer, Q., Wang, J. W., Marsteller, D., Mendez, I., Drew, M., Craig, D. A., Guiard, B. P., Guilloux, J. P., Artymyshyn, R. P., Gardier, A. M., Gerald, C., Antonijevic, I. A., Leonardo, E. D., & Hen, R. (2009). Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron*, 62(4), 479-493. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.04.017>

Dermitzakis, I., Manthou, M. E., Meditskou, S., Tremblay, M. E., Petratos, S., Zoupi, L., Boziki, M., Kesidou, E., Simeonidou, C., & Theotokis, P. (2023). Origin and Emergence of Microglia in the CNS-An Interesting (Hi)story of an Eccentric Cell. *Curr Issues Mol Biol*, 45(3), 2609-2628. <https://doi.org/10.3390/cimb45030171>

- Dhabhar, F. S. (2014). Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. *Immunol Res*, 58(2-3), 193-210. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8517-0>
- Ding, L., Liu, J., Yang, Y., Cui, Z., & Du, G. (2024). Chronically socially isolated mice exhibit depressive-like behavior regulated by the gut microbiota. *Heliyon*, 10(8), e29791. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e29791>
- DiSabato, D. J., Quan, N., & Godbout, J. P. (2016). Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem*, 139 Suppl 2(Suppl 2), 136-153. <https://doi.org/10.1111/jnc.13607>
- Dowlati, Y., Herrmann, N., Swardfager, W., Liu, H., Sham, L., Reim, E. K., & Lanctot, K. L. (2010). A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry*, 67(5), 446-457. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.09.033>
- Drexhage, R. C., Hoogenboezem, T. A., Cohen, D., Versnel, M. A., Nolen, W. A., van Beveren, N. J., & Drexhage, H. A. (2011). An activated set point of T-cell and monocyte inflammatory networks in recent-onset schizophrenia patients involves both pro- and anti-inflammatory forces. *Int J Neuropsychopharmacol*, 14(6), 746-755. <https://doi.org/10.1017/S1461145710001653>
- Drysdale, A. T., Grosenick, L., Downar, J., Dunlop, K., Mansouri, F., Meng, Y., Fetcho, R. N., Zebley, B., Oathes, D. J., Etkin, A., Schatzberg, A. F., Sudheimer, K., Keller, J., Mayberg, H. S., Gunning, F. M., Alexopoulos, G. S., Fox, M. D., Pascual-Leone, A., Voss, H. U., . . . Liston, C. (2017). Resting-state connectivity biomarkers define neurophysiological subtypes of depression. *Nat Med*, 23(1), 28-38. <https://doi.org/10.1038/nm.4246>
- Du Preez, A., Onorato, D., Eiben, I., Musaelyan, K., Egeland, M., Zunszain, P. A., Fernandes, C., Thuret, S., & Pariante, C. M. (2021). Chronic stress followed by social isolation promotes depressive-like behaviour, alters microglial and astrocyte biology and reduces hippocampal neurogenesis in male mice. *Brain Behav Immun*, 91, 24-47. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.07.015>
- Dudek, K. A., Dion-Albert, L., Kaufmann, F. N., Tuck, E., Lebel, M., & Menard, C. (2021). Neurobiology of resilience in depression: immune and vascular insights from human and animal studies. *Eur J Neurosci*, 53(1), 183-221. <https://doi.org/10.1111/ejn.14547>

- Dudek, K. A., Dion-Albert, L., Lebel, M., LeClair, K., Labrecque, S., Tuck, E., Ferrer Perez, C., Golden, S. A., Tamminga, C., Turecki, G., Mechawar, N., Russo, S. J., & Menard, C. (2020). Molecular adaptations of the blood-brain barrier promote stress resilience vs. depression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *117*(6), 3326-3336. <https://doi.org/10.1073/pnas.1914655117>
- Elenkov, I. J., & Chrousos, G. P. (2006). Stress system--organization, physiology and immunoregulation. *Neuroimmunomodulation*, *13*(5-6), 257-267. <https://doi.org/10.1159/000104853>
- Emudainohwo, J. O. T., Ben-Azu, B., Adebayo, O. G., Aduema, W., Uruaka, C., Ajayi, A. M., Okpakpor, E. E., & Ozolua, R. I. (2023). Normalization of HPA Axis, Cholinergic Neurotransmission, and Inhibiting Brain Oxidative and Inflammatory Dynamics Are Associated with The Adaptogenic-like Effect of Rutin Against Psychosocial Defeat Stress. *J Mol Neurosci*, *73*(1), 60-75. <https://doi.org/10.1007/s12031-022-02084-w>
- Erk, E. E., Demir, B. N., Kursun, H. K., Ozkan, M. Y., Dalkara, T., & Kocak, E. E. (2023). The Effect of Inhibition of Perisynaptic Astrocyte Glycogen Utilization on Depression-Like Behavior. *Turk Psikiyatri Derg*, *34*(4), 272-281. <https://doi.org/10.5080/u27208> (Sinaptik Enerji Kaynagi Glikojenin Kullaniminin Engellenmesinin Depresyon-benzeri Davranislara Etkisi.)
- Fang, M., Li, Y., Liao, Z., Wang, G., Cao, Q., Li, Y., Duan, Y., Han, Y., Deng, X., Wu, F., Kamau, P. M., Lu, Q., & Lai, R. (2023). Lipopolysaccharide-binding protein expression is increased by stress and inhibits monoamine synthesis to promote depressive symptoms. *Immunity*, *56*(3), 620-634 e611. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2023.02.002>
- Fang, Y., Ding, X., Zhang, Y., Cai, L., Ge, Y., Ma, K., Xu, R., Li, S., Song, M., Zhu, H., Liu, J., Ding, J., Lu, M., & Hu, G. (2022). Fluoxetine inhibited the activation of A1 reactive astrocyte in a mouse model of major depressive disorder through astrocytic 5-HT(2B)R/beta-arrestin2 pathway. *J Neuroinflammation*, *19*(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02389-y>
- Farbstein, D., Hollander, N., Peled, O., Apter, A., Fennig, S., Haberman, Y., Gitman, H., Yaniv, I., Shkalim, V., Pick, C. G., & Benaroya-Milshtein, N. (2021). Social isolation in mice: behavior, immunity, and tumor growth. *Stress*, *24*(2), 229-238. <https://doi.org/10.1080/10253890.2020.1777976>

- File, S. E. (2001). Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behav Brain Res*, 125(1-2), 151-157. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(01\)00292-3](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(01)00292-3)
- Franceschelli, A., Herchick, S., Thelen, C., Papadopoulou-Daifoti, Z., & Pitychoutis, P. M. (2014). Sex differences in the chronic mild stress model of depression. *Behav Pharmacol*, 25(5-6), 372-383. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000062>
- Francois, M., Fernandez-Gayol, O., & Zeltser, L. M. (2022). A Framework for Developing Translationally Relevant Animal Models of Stress-Induced Changes in Eating Behavior. *Biol Psychiatry*, 91(10), 888-897. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2021.06.020>
- Frank, M. G., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (2013). Stress-induced glucocorticoids as a neuroendocrine alarm signal of danger. *Brain Behav Immun*, 33, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.02.004>
- Franklin, T. C., Xu, C., & Duman, R. S. (2018). Depression and sterile inflammation: Essential role of danger associated molecular patterns. *Brain Behav Immun*, 72, 2-13. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.10.025>
- Frodl, T., Meisenzahl, E. M., Zetzsche, T., Hohne, T., Banac, S., Schorr, C., Jager, M., Leinsinger, G., Bottlender, R., Reiser, M., & Moller, H. J. (2004). Hippocampal and amygdala changes in patients with major depressive disorder and healthy controls during a 1-year follow-up. *J Clin Psychiatry*, 65(4), 492-499. <https://doi.org/10.4088/jcp.v65n0407>
- Frost, J. L., & Schafer, D. P. (2016). Microglia: Architects of the Developing Nervous System. *Trends Cell Biol*, 26(8), 587-597. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.02.006>
- Furman, O., Tsoory, M., & Chen, A. (2022). Differential chronic social stress models in male and female mice. *Eur J Neurosci*, 55(9-10), 2777-2793. <https://doi.org/10.1111/ejn.15481>
- Gao, M., Song, Y., Liu, Y., Miao, Y., Guo, Y., & Chai, H. (2024). TNF-alpha/TNFR1 activated astrocytes exacerbate depression-like behavior in CUMS mice. *Cell Death Discov*, 10(1), 220. <https://doi.org/10.1038/s41420-024-01987-4>

- Ge, L., Yap, C. W., Ong, R., & Heng, B. H. (2017). Social isolation, loneliness and their relationships with depressive symptoms: A population-based study. *PLoS One*, *12*(8), e0182145. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182145>
- Glaser, R., & Kiecolt-Glaser, J. K. (2005). Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat Rev Immunol*, *5*(3), 243-251. <https://doi.org/10.1038/nri1571>
- Godoy, L. D., Rossignoli, M. T., Delfino-Pereira, P., Garcia-Cairasco, N., & de Lima Umeoka, E. H. (2018). A Comprehensive Overview on Stress Neurobiology: Basic Concepts and Clinical Implications. *Front Behav Neurosci*, *12*, 127. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00127>
- Gong, S., Miao, Y. L., Jiao, G. Z., Sun, M. J., Li, H., Lin, J., Luo, M. J., & Tan, J. H. (2015). Dynamics and correlation of serum cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice. *PLoS One*, *10*(2), e0117503. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117503>
- Goto, T., Kubota, Y., Tanaka, Y., Iio, W., Moriya, N., & Toyoda, A. (2014). Subchronic and mild social defeat stress accelerates food intake and body weight gain with polydipsia-like features in mice. *Behav Brain Res*, *270*, 339-348. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.05.040>
- Grigoryan, G. A., Pavlova, I. V., & Zaichenko, M. I. (2022). Effects of Social Isolation on the Development of Anxiety and Depression-Like Behavior in Model Experiments in Animals. *Neurosci Behav Physiol*, *52*(5), 722-738. <https://doi.org/10.1007/s11055-022-01297-1>
- Guan, H., Nagarkatti, P. S., & Nagarkatti, M. (2009). Role of CD44 in the differentiation of Th1 and Th2 cells: CD44-deficiency enhances the development of Th2 effectors in response to sheep RBC and chicken ovalbumin. *J Immunol*, *183*(1), 172-180. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802325>
- Guo, F., Fan, J., Liu, J. M., Kong, P. L., Ren, J., Mo, J. W., Lu, C. L., Zhong, Q. L., Chen, L. Y., Jiang, H. T., Zhang, C., Wen, Y. L., Gu, T. T., Li, S. J., Fang, Y. Y., Pan, B. X., Gao, T. M., & Cao, X. (2024). Astrocytic ALKBH5 in stress response contributes to depressive-like behaviors in mice. *Nat Commun*, *15*(1), 4347. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-48730-2>

- Guo, M., Wu, C. F., Liu, W., Yang, J. Y., & Chen, D. (2004). Sex difference in psychological behavior changes induced by long-term social isolation in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 28(1), 115-121. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2003.09.027>
- Haapakoski, R., Mathieu, J., Ebmeier, K. P., Alenius, H., & Kivimaki, M. (2015). Cumulative meta-analysis of interleukins 6 and 1beta, tumour necrosis factor alpha and C-reactive protein in patients with major depressive disorder. *Brain Behav Immun*, 49, 206-215. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.06.001>
- Hang, S., & Huh, J. R. (2019). The Immune-Mind Connection. *Cell*, 179(4), 803-805. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.012>
- Harpaz, I., Abutbul, S., Nemirovsky, A., Gal, R., Cohen, H., & Monsonogo, A. (2013). Chronic exposure to stress predisposes to higher autoimmune susceptibility in C57BL/6 mice: glucocorticoids as a double-edged sword. *Eur J Immunol*, 43(3), 758-769. <https://doi.org/10.1002/eji.201242613>
- Harsanyi, S., Kupcova, I., Danisovic, L., & Klein, M. (2022). Selected Biomarkers of Depression: What Are the Effects of Cytokines and Inflammation? *Int J Mol Sci*, 24(1). <https://doi.org/10.3390/ijms24010578>
- Hellwig, S., Brioschi, S., Dieni, S., Frings, L., Masuch, A., Blank, T., & Biber, K. (2016). Altered microglia morphology and higher resilience to stress-induced depression-like behavior in CX3CR1-deficient mice. *Brain Behav Immun*, 55, 126-137. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.11.008>
- Herman, J. P., McKlveen, J. M., Ghosal, S., Kopp, B., Wulsin, A., Makinson, R., Scheimann, J., & Myers, B. (2016). Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. *Compr Physiol*, 6(2), 603-621. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150015>
- Hersey, M., Hashemi, P., & Reagan, L. P. (2022). Integrating the monoamine and cytokine hypotheses of depression: Is histamine the missing link? *Eur J Neurosci*, 55(9-10), 2895-2911. <https://doi.org/10.1111/ejn.15392>
- Hirschfeld, R. M. (2000). History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. *J Clin Psychiatry*, 61 Suppl 6, 4-6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10775017>

- Hollis, F., & Kabbaj, M. (2014). Social defeat as an animal model for depression. *ILAR J*, 55(2), 221-232. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilu002>
- Hoprekstad, G. E., Skrede, S., Bartz-Johannessen, C., Joa, I., Reitan, S. K., Steen, V. M., Torsvik, A., Johnsen, E., Kroken, R. A., & Rettenbacher, M. (2024). Association between cytokines and suicidality in patients with psychosis: A multicentre longitudinal analysis. *Brain Behav Immun Health*, 37, 100756. <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2024.100756>
- Hu, Y. Y., Ding, X. S., Yang, G., Liang, X. S., Feng, L., Sun, Y. Y., Chen, R., & Ma, Q. H. (2023). Analysis of the influences of social isolation on cognition and the therapeutic potential of deep brain stimulation in a mouse model. *Front Psychiatry*, 14, 1186073. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2023.1186073>
- Huang, T. L., & Lee, C. T. (2007). T-helper 1/T-helper 2 cytokine imbalance and clinical phenotypes of acute-phase major depression. *Psychiatry Clin Neurosci*, 61(4), 415-420. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1819.2007.01686.x>
- Ieraci, A., Mallei, A., & Popoli, M. (2016). Social Isolation Stress Induces Anxious-Depressive-Like Behavior and Alterations of Neuroplasticity-Related Genes in Adult Male Mice. *Neural Plast*, 2016, 6212983. <https://doi.org/10.1155/2016/6212983>
- Jesulola, E., Micalos, P., & Baguley, I. J. (2018). Understanding the pathophysiology of depression: From monoamines to the neurogenesis hypothesis model - are we there yet? *Behav Brain Res*, 341, 79-90. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.12.025>
- Jiang, N., Zhang, Y., Yao, C., Huang, H., Wang, Q., Huang, S., He, Q., & Liu, X. (2022). Ginsenosides Rb1 Attenuates Chronic Social Defeat Stress-Induced Depressive Behavior via Regulation of SIRT1-NLRP3/Nrf2 Pathways. *Front Nutr*, 9, 868833. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.868833>
- Jimenez, J. C., Su, K., Goldberg, A. R., Luna, V. M., Biane, J. S., Ordek, G., Zhou, P., Ong, S. K., Wright, M. A., Zweifel, L., Paninski, L., Hen, R., & Kheirbek, M. A. (2018). Anxiety Cells in a Hippocampal-Hypothalamic Circuit. *Neuron*, 97(3), 670-683 e676. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.01.016>

- Johnson, J. D., Barnard, D. F., Kulp, A. C., & Mehta, D. M. (2019). Neuroendocrine Regulation of Brain Cytokines After Psychological Stress. *J Endocr Soc*, 3(7), 1302-1320. <https://doi.org/10.1210/js.2019-00053>
- Jurga, A. M., Paleczna, M., & Kuter, K. Z. (2020). Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Front Cell Neurosci*, 14, 198. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00198>
- Keller, J., Gomez, R., Williams, G., Lembke, A., Lazzeroni, L., Murphy, G. M., Jr., & Schatzberg, A. F. (2017). HPA axis in major depression: cortisol, clinical symptomatology and genetic variation predict cognition. *Mol Psychiatry*, 22(4), 527-536. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.120>
- Kim, J., Kim, T. E., Lee, S. H., & Koo, J. W. (2023). The Role of Glutamate Underlying Treatment-resistant Depression. *Clin Psychopharmacol Neurosci*, 21(3), 429-446. <https://doi.org/10.9758/cpn.22.1034>
- Kim, S. J., Lee, H., Joung, H. Y., Lee, G., Lee, H. J., Shin, M. K., Kim, S. H., Shim, I., & Bae, H. (2011). T-bet deficient mice exhibit resistance to stress-induced development of depression-like behaviors. *J Neuroimmunol*, 240-241, 45-51. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2011.09.008>
- Kobayashi, K., Imagama, S., Ohgomori, T., Hirano, K., Uchimura, K., Sakamoto, K., Hirakawa, A., Takeuchi, H., Suzumura, A., Ishiguro, N., & Kadomatsu, K. (2013). Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death Dis*, 4(3), e525. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.54>
- Konttinen, H. (2020). Emotional eating and obesity in adults: the role of depression, sleep and genes. *Proc Nutr Soc*, 79(3), 283-289. <https://doi.org/10.1017/S0029665120000166>
- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, 19(8), 312-318. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(96\)10049-7](https://doi.org/10.1016/0166-2236(96)10049-7)
- Krishnan, V., & Nestler, E. J. (2008). The molecular neurobiology of depression. *Nature*, 455(7215), 894-902. <https://doi.org/10.1038/nature07455>

- Krishnan, V., & Nestler, E. J. (2010). Linking molecules to mood: new insight into the biology of depression. *Am J Psychiatry*, 167(11), 1305-1320. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2009.10030434>
- Kuti, D., Winkler, Z., Horvath, K., Juhasz, B., Szilvasy-Szabo, A., Fekete, C., Ferenczi, S., & Kovacs, K. J. (2022). The metabolic stress response: Adaptation to acute-, repeated- and chronic challenges in mice. *iScience*, 25(8), 104693. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104693>
- La Porta, C., Plum, T., Palme, R., Mack, M., & Tappe-Theodor, A. (2024). Repeated social defeat stress differently affects arthritis-associated hypersensitivity in male and female mice. *Brain Behav Immun*, 119, 572-596. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2024.04.025>
- Labonte, B., Engmann, O., Purushothaman, I., Menard, C., Wang, J., Tan, C., Scarpa, J. R., Moy, G., Loh, Y. E., Cahill, M., Lorsch, Z. S., Hamilton, P. J., Calipari, E. S., Hodes, G. E., Issler, O., Kronman, H., Pfau, M., Obradovic, A. L. J., Dong, Y., . . . Nestler, E. J. (2017). Sex-specific transcriptional signatures in human depression. *Nat Med*, 23(9), 1102-1111. <https://doi.org/10.1038/nm.4386>
- Lam, D. D., Garfield, A. S., Marston, O. J., Shaw, J., & Heisler, L. K. (2010). Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight. *Pharmacol Biochem Behav*, 97(1), 84-91. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.09.003>
- Lamers, F., Milaneschi, Y., de Jonge, P., Giltay, E. J., & Penninx, B. (2018). Metabolic and inflammatory markers: associations with individual depressive symptoms. *Psychol Med*, 48(7), 1102-1110. <https://doi.org/10.1017/S0033291717002483>
- Li, C., Cai, Q., Su, Z., Chen, Z., Cao, J., & Xu, F. (2023). Could peripheral 5-HT level be used as a biomarker for depression diagnosis and treatment? A narrative minireview. *Front Pharmacol*, 14, 1149511. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1149511>
- Li, S., Zhang, X., Cai, Y., Zheng, L., Pang, H., & Lou, L. (2023). Sex difference in incidence of major depressive disorder: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2019. *Ann Gen Psychiatry*, 22(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s12991-023-00486-7>
- Li, W., Niu, L., Liu, Z., Xu, X., Shi, M., Zhang, Y., Deng, Y., He, J., Xu, Y., Wan, W., Sun, Q., Zhong, X., & Cao, W. (2021). Inhibition of the NLRP3 inflammasome with MCC950

prevents chronic social isolation-induced depression-like behavior in male mice. *Neurosci Lett*, 765, 136290. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136290>

Liu, J., Buisman-Pijlman, F., & Hutchinson, M. R. (2014). Toll-like receptor 4: innate immune regulator of neuroimmune and neuroendocrine interactions in stress and major depressive disorder. *Front Neurosci*, 8, 309. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00309>

Liu, N., Wang, Y., An, A. Y., Banker, C., Qian, Y. H., & O'Donnell, J. M. (2020). Single housing-induced effects on cognitive impairment and depression-like behavior in male and female mice involve neuroplasticity-related signaling. *Eur J Neurosci*, 52(1), 2694-2704. <https://doi.org/10.1111/ejn.14565>

Liu, Y., Zhang, T., Meng, D., Sun, L., Yang, G., He, Y., & Zhang, C. (2020). Involvement of CX3CL1/CX3CR1 in depression and cognitive impairment induced by chronic unpredictable stress and relevant underlying mechanism. *Behav Brain Res*, 381, 112371. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112371>

Liu, Y. Z., Wang, Y. X., & Jiang, C. L. (2017). Inflammation: The Common Pathway of Stress-Related Diseases. *Front Hum Neurosci*, 11, 316. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2017.00316>

Lobo-Silva, D., Carriche, G. M., Castro, A. G., Roque, S., & Saraiva, M. (2016). Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation. *J Neuroinflammation*, 13(1), 297. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0763-8>

Loomes, R., Hull, L., & Mandy, W. P. L. (2017). What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 56(6), 466-474. <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2017.03.013>

Lucassen, P. J., Stumpel, M. W., Wang, Q., & Aronica, E. (2010). Decreased numbers of progenitor cells but no response to antidepressant drugs in the hippocampus of elderly depressed patients. *Neuropharmacology*, 58(6), 940-949. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.01.012>

Luo, M. (2023). Social Isolation, Loneliness, and Depressive Symptoms: A Twelve-Year Population Study of Temporal Dynamics. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci*, 78(2), 280-290. <https://doi.org/10.1093/geronb/gbac174>

- Maes, M., Berk, M., Goehler, L., Song, C., Anderson, G., Galecki, P., & Leonard, B. (2012). Depression and sickness behavior are Janus-faced responses to shared inflammatory pathways. *BMC Med*, *10*, 66. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-10-66>
- Maes, M., Yirmiya, R., Noraberg, J., Brene, S., Hibbeln, J., Perini, G., Kubera, M., Bob, P., Lerer, B., & Maj, M. (2009). The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. *Metab Brain Dis*, *24*(1), 27-53. <https://doi.org/10.1007/s11011-008-9118-1>
- Magalhaes, D. M., Mampay, M., Sebastiao, A. M., Sheridan, G. K., & Valente, C. A. (2024). Age-related impact of social isolation in mice: Young vs middle-aged. *Neurochem Int*, *174*, 105678. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2024.105678>
- Marco, E. M., Llorente, R., Lopez-Gallardo, M., Mela, V., Llorente-Berzal, A., Prada, C., & Viveros, M. P. (2015). The maternal deprivation animal model revisited. *Neurosci Biobehav Rev*, *51*, 151-163. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.01.015>
- McCullough, L. D., de Vries, G. J., Miller, V. M., Becker, J. B., Sandberg, K., & McCarthy, M. M. (2014). NIH initiative to balance sex of animals in preclinical studies: generative questions to guide policy, implementation, and metrics. *Biol Sex Differ*, *5*, 15. <https://doi.org/10.1186/s13293-014-0015-5>
- McEwen, B. S. (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev*, *87*(3), 873-904. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2006>
- McLean, C. P., Asnaani, A., Litz, B. T., & Hofmann, S. G. (2011). Gender differences in anxiety disorders: prevalence, course of illness, comorbidity and burden of illness. *J Psychiatr Res*, *45*(8), 1027-1035. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2011.03.006>
- Medendorp, W. E., Petersen, E. D., Pal, A., Wagner, L. M., Myers, A. R., Hochgeschwender, U., & Jenrow, K. A. (2018). Altered Behavior in Mice Socially Isolated During Adolescence Corresponds With Immature Dendritic Spine Morphology and Impaired Plasticity in the Prefrontal Cortex. *Front Behav Neurosci*, *12*, 87. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00087>

- Meijer, O. C., Buurstede, J. C., & Schaaf, M. J. M. (2019). Corticosteroid Receptors in the Brain: Transcriptional Mechanisms for Specificity and Context-Dependent Effects. *Cell Mol Neurobiol*, 39(4), 539-549. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0625-2>
- Menard, C., Pfau, M. L., Hodes, G. E., Kana, V., Wang, V. X., Bouchard, S., Takahashi, A., Flanigan, M. E., Aleyasin, H., LeClair, K. B., Janssen, W. G., Labonte, B., Parise, E. M., Lorsch, Z. S., Golden, S. A., Heshmati, M., Tamminga, C., Turecki, G., Campbell, M., . . . Russo, S. J. (2017). Social stress induces neurovascular pathology promoting depression. *Nat Neurosci*, 20(12), 1752-1760. <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0010-3>
- Menzies, F. M., Henriquez, F. L., Alexander, J., & Roberts, C. W. (2011). Selective inhibition and augmentation of alternative macrophage activation by progesterone. *Immunology*, 134(3), 281-291. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03488.x>
- Mestas, J., & Hughes, C. C. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*, 172(5), 2731-2738. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2731>
- Miller, A. H., Maletic, V., & Raison, C. L. (2009). Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry*, 65(9), 732-741. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.11.029>
- Miller, A. H., & Raison, C. L. (2016). The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nat Rev Immunol*, 16(1), 22-34. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.5>
- Miller, E. S., Apple, C. G., Kannan, K. B., Funk, Z. M., Plazas, J. M., Efron, P. A., & Mohr, A. M. (2019). Chronic stress induces persistent low-grade inflammation. *Am J Surg*, 218(4), 677-683. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2019.07.006>
- Mir, F. R., & Rivarola, M. A. (2022). Sex Differences in Anxiety and Depression: What Can (and Cannot) Preclinical Studies Tell Us? *Sexes*, 3(1), 141-163. <https://doi.org/10.3390/sexes3010012>
- Morey, J. N., Boggero, I. A., Scott, A. B., & Segerstrom, S. C. (2015). Current Directions in Stress and Human Immune Function. *Curr Opin Psychol*, 5, 13-17. <https://doi.org/10.1016/j.copsyc.2015.03.007>

- Nadeem, A., Ahmad, S. F., Al-Harbi, N. O., Fardan, A. S., El-Sherbeeney, A. M., Ibrahim, K. E., & Attia, S. M. (2017). IL-17A causes depression-like symptoms via NFkappaB and p38MAPK signaling pathways in mice: Implications for psoriasis associated depression. *Cytokine*, *97*, 14-24. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.05.018>
- Nazar, G., Gatica-Saavedra, M., Provoste, A., Leiva, A. M., Martorell, M., Ulloa, N., Petermann-Rocha, F., Troncoso-Pantoja, C., Celis-Morales, C., & Consorcio de Investigacion, E.-C. (2021). [Factors associated with depression in Chilean adults. Results of the 2016-2017 National Health Survey]. *Rev Med Chil*, *149*(10), 1430-1439. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872021001001430> (Factores asociados a depresion en poblacion chilena. Resultados Encuesta Nacional de Salud 2016-2017.)
- Netser, S., Meyer, A., Magalnik, H., Zylbental, A., de la Zerda, S. H., Briller, M., Bizer, A., Grinevich, V., & Wagner, S. (2020). Distinct dynamics of social motivation drive differential social behavior in laboratory rat and mouse strains. *Nat Commun*, *11*(1), 5908. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19569-0>
- Nguyen, H. M., Grossinger, E. M., Horiuchi, M., Davis, K. W., Jin, L. W., Maezawa, I., & Wulff, H. (2017). Differential Kv1.3, KCa3.1, and Kir2.1 expression in "classically" and "alternatively" activated microglia. *Glia*, *65*(1), 106-121. <https://doi.org/10.1002/glia.23078>
- Niraula, A., Witcher, K. G., Sheridan, J. F., & Godbout, J. P. (2019). Interleukin-6 Induced by Social Stress Promotes a Unique Transcriptional Signature in the Monocytes That Facilitate Anxiety. *Biol Psychiatry*, *85*(8), 679-689. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.09.030>
- O'Connor, D. B., Jones, F., Conner, M., McMillan, B., & Ferguson, E. (2008). Effects of daily hassles and eating style on eating behavior. *Health Psychol*, *27*(1S), S20-31. <https://doi.org/10.1037/0278-6133.27.1.S20>
- O'Connor, D. B., Thayer, J. F., & Vedhara, K. (2021). Stress and Health: A Review of Psychobiological Processes. *Annu Rev Psychol*, *72*, 663-688. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-062520-122331>
- Ortega-Montiel, J., Posadas-Romero, C., Ocampo-Arcos, W., Medina-Urrutia, A., Cardoso-Saldana, G., Jorge-Galarza, E., & Posadas-Sanchez, R. (2015). Self-

- perceived stress is associated with adiposity and atherosclerosis. The GEA Study. *BMC Public Health*, 15, 780. <https://doi.org/10.1186/s12889-015-2112-8>
- Palanza, P., Gioiosa, L., & Parmigiani, S. (2001). Social stress in mice: gender differences and effects of estrous cycle and social dominance. *Physiol Behav*, 73(3), 411-420. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(01\)00494-2](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(01)00494-2)
- Palumbo, M. L., Canzobre, M. C., Pascuan, C. G., Rios, H., Wald, M., & Genaro, A. M. (2010). Stress induced cognitive deficit is differentially modulated in BALB/c and C57Bl/6 mice: correlation with Th1/Th2 balance after stress exposure. *J Neuroimmunol*, 218(1-2), 12-20. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.11.005>
- Paolicelli, R. C., Sierra, A., Stevens, B., Tremblay, M. E., Aguzzi, A., Ajami, B., Amit, I., Audinat, E., Bechmann, I., Bennett, M., Bennett, F., Bessis, A., Biber, K., Bilbo, S., Blurton-Jones, M., Boddeke, E., Brites, D., Brone, B., Brown, G. C., . . . Wyss-Coray, T. (2022). Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron*, 110(21), 3458-3483. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.10.020>
- Pariante, C. M., & Lightman, S. L. (2008). The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci*, 31(9), 464-468. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.06.006>
- Perrin, A. J., Horowitz, M. A., Roelofs, J., Zunszain, P. A., & Pariante, C. M. (2019). Glucocorticoid Resistance: Is It a Requisite for Increased Cytokine Production in Depression? A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Psychiatry*, 10, 423. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2019.00423>
- Pinchuk, L. M., & Filipov, N. M. (2008). Differential effects of age on circulating and splenic leukocyte populations in C57BL/6 and BALB/c male mice. *Immun Ageing*, 5, 1. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-5-1>
- Pinto, E. F., & Andrade, C. (2016). Interferon-Related Depression: A Primer on Mechanisms, Treatment, and Prevention of a Common Clinical Problem. *Curr Neuropharmacol*, 14(7), 743-748. <https://doi.org/10.2174/1570159x14666160106155129>

- Planchez, B., Surget, A., & Belzung, C. (2019). Animal models of major depression: drawbacks and challenges. *J Neural Transm (Vienna)*, *126*(11), 1383-1408. <https://doi.org/10.1007/s00702-019-02084-y>
- Powell, N. D., Tarr, A. J., & Sheridan, J. F. (2013). Psychosocial stress and inflammation in cancer. *Brain Behav Immun*, *30* Suppl, S41-47. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.06.015>
- Qing, H., Desrouleaux, R., Israni-Winger, K., Mineur, Y. S., Fogelman, N., Zhang, C., Rashed, S., Palm, N. W., Sinha, R., Picciotto, M. R., Perry, R. J., & Wang, A. (2020). Origin and Function of Stress-Induced IL-6 in Murine Models. *Cell*, *182*(2), 372-387 e314. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.054>
- Raison, C. L., Borisov, A. S., Woolwine, B. J., Massung, B., Vogt, G., & Miller, A. H. (2010). Interferon-alpha effects on diurnal hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: relationship with proinflammatory cytokines and behavior. *Mol Psychiatry*, *15*(5), 535-547. <https://doi.org/10.1038/mp.2008.58>
- Ramamoorthy, S., & Cidlowski, J. A. (2016). Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheum Dis Clin North Am*, *42*(1), 15-31, vii. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2015.08.002>
- Roddy, D. W., Farrell, C., Doolin, K., Roman, E., Tozzi, L., Frodl, T., O'Keane, V., & O'Hanlon, E. (2019). The Hippocampus in Depression: More Than the Sum of Its Parts? Advanced Hippocampal Substructure Segmentation in Depression. *Biol Psychiatry*, *85*(6), 487-497. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.08.021>
- Russell, G., & Lightman, S. (2019). The human stress response. *Nat Rev Endocrinol*, *15*(9), 525-534. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0228-0>
- Russo, S., Chan, K., Li, L., Parise, L., Cathomas, F., LeClair, K., Shimo, Y., Lin, H. Y., Durand-deCuttoli, R., Aubry, A., Alvarez, J., Drescher, T., Osman, A., Yuan, C., Fisher-Foye, R., Price, G., Schmitt, Y., Kaster, M., Furtado, G. C., . . . de Araujo, I. (2023). Stress-activated brain-gut circuits disrupt intestinal barrier integrity and social behaviour. *Res Sq*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3459170/v1>
- Sackstein, R., Schatton, T., & Barthel, S. R. (2017). T-lymphocyte homing: an underappreciated yet critical hurdle for successful cancer immunotherapy. *Lab Invest*, *97*(6), 669-697. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2017.25>

- Sapolsky, R. M., Romero, L. M., & Munck, A. U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev*, 21(1), 55-89. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.1.0389>
- Schildkraut, J. J. (1974). Biogenic amines and affective disorders. *Annu Rev Med*, 25(0), 333-348. <https://doi.org/10.1146/annurev.me.25.020174.002001>
- Schlegelmilch, T., Henke, K., & Peri, F. (2011). Microglia in the developing brain: from immunity to behaviour. *Curr Opin Neurobiol*, 21(1), 5-10. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.08.004>
- Schmidt, D., Reber, S. O., Botteron, C., Barth, T., Peterlik, D., Uschold, N., Mannel, D. N., & Lechner, A. (2010). Chronic psychosocial stress promotes systemic immune activation and the development of inflammatory Th cell responses. *Brain Behav Immun*, 24(7), 1097-1104. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.04.014>
- Schreier, H. M., & Chen, E. (2017). Low-Grade Inflammation and Ambulatory Cortisol in Adolescents: Interaction Between Interviewer-Rated Versus Self-Rated Acute Stress and Chronic Stress. *Psychosom Med*, 79(2), 133-142. <https://doi.org/10.1097/PSY.0000000000000377>
- Sharif, S., Van der Graaf, Y., Cramer, M. J., Kapelle, L. J., de Borst, G. J., Visseren, F. L. J., Westerink, J., & group, S. s. (2021). Low-grade inflammation as a risk factor for cardiovascular events and all-cause mortality in patients with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol*, 20(1), 220. <https://doi.org/10.1186/s12933-021-01409-0>
- Sheline, Y. I., Wang, P. W., Gado, M. H., Csernansky, J. G., & Vannier, M. W. (1996). Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(9), 3908-3913. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.9.3908>
- Shelton, R. C., Claiborne, J., Sidoryk-Wegrzynowicz, M., Reddy, R., Aschner, M., Lewis, D. A., & Mirnics, K. (2011). Altered expression of genes involved in inflammation and apoptosis in frontal cortex in major depression. *Mol Psychiatry*, 16(7), 751-762. <https://doi.org/10.1038/mp.2010.52>
- Shi, M. M., Xu, X. F., Sun, Q. M., Luo, M., Liu, D. D., Guo, D. M., Chen, L., Zhong, X. L., Xu, Y., & Cao, W. Y. (2023). Betaine prevents cognitive dysfunction by suppressing

- hippocampal microglial activation in chronic social isolated male mice. *Phytother Res*, 37(10), 4755-4770. <https://doi.org/10.1002/ptr.7944>
- Siracusa, R., Fusco, R., & Cuzzocrea, S. (2019). Astrocytes: Role and Functions in Brain Pathologies. *Front Pharmacol*, 10, 1114. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01114>
- Smith, J. A., Das, A., Ray, S. K., & Banik, N. L. (2012). Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull*, 87(1), 10-20. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.10.004>
- Smith, S. M., & Vale, W. W. (2006). The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci*, 8(4), 383-395. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2006.8.4/ssmith>
- Song, A. Q., Gao, B., Fan, J. J., Zhu, Y. J., Zhou, J., Wang, Y. L., Xu, L. Z., & Wu, W. N. (2020). NLRP1 inflammasome contributes to chronic stress-induced depressive-like behaviors in mice. *J Neuroinflammation*, 17(1), 178. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01848-8>
- Stein, D. J., Vasconcelos, M. F., Albrechet-Souza, L., Cereser, K. M. M., & de Almeida, R. M. M. (2017). Microglial Over-Activation by Social Defeat Stress Contributes to Anxiety- and Depressive-Like Behaviors. *Front Behav Neurosci*, 11, 207. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00207>
- Stephens, M. A., & Wand, G. (2012). Stress and the HPA axis: role of glucocorticoids in alcohol dependence. *Alcohol Res*, 34(4), 468-483. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23584113>
- Sturm, M., Becker, A., Schroeder, A., Bilkei-Gorzo, A., & Zimmer, A. (2015). Effect of chronic corticosterone application on depression-like behavior in C57BL/6N and C57BL/6J mice. *Genes Brain Behav*, 14(3), 292-300. <https://doi.org/10.1111/gbb.12208>
- Suchting, R., Tirumalajaru, V., Gareeb, R., Bockmann, T., de Dios, C., Aickareth, J., Pinjari, O., Soares, J. C., Cowen, P. J., & Selvaraj, S. (2021). Revisiting monoamine oxidase inhibitors for the treatment of depressive disorders: A systematic review and network meta-analysis. *J Affect Disord*, 282, 1153-1160. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2021.01.021>

- Sullens, D. G., Gilley, K., Jensen, K., Vichaya, E., Dolan, S. L., & Sekeres, M. J. (2021). Social isolation induces hyperactivity and exploration in aged female mice. *PLoS One*, *16*(2), e0245355. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245355>
- Takao, K., & Miyakawa, T. (2006). Light/dark transition test for mice. *J Vis Exp*(1), 104. <https://doi.org/10.3791/104>
- Tan, T., Wang, W., Liu, T., Zhong, P., Conrow-Graham, M., Tian, X., & Yan, Z. (2021). Neural circuits and activity dynamics underlying sex-specific effects of chronic social isolation stress. *Cell Rep*, *34*(12), 108874. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108874>
- Tang, Y., & Le, W. (2016). Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*, *53*(2), 1181-1194. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9070-5>
- Thompson, T., Grabowski-Boase, L., & Tarantino, L. M. (2015). Prototypical anxiolytics do not reduce anxiety-like behavior in the open field in C57BL/6J mice. *Pharmacol Biochem Behav*, *133*, 7-17. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.03.011>
- Torres-Platas, S. G., Cruceanu, C., Chen, G. G., Turecki, G., & Mechawar, N. (2014). Evidence for increased microglial priming and macrophage recruitment in the dorsal anterior cingulate white matter of depressed suicides. *Brain Behav Immun*, *42*, 50-59. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.05.007>
- Torres-Platas, S. G., Nagy, C., Wakid, M., Turecki, G., & Mechawar, N. (2016). Glial fibrillary acidic protein is differentially expressed across cortical and subcortical regions in healthy brains and downregulated in the thalamus and caudate nucleus of depressed suicides. *Mol Psychiatry*, *21*(4), 509-515. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.65>
- Tucker, L. B., & McCabe, J. T. (2021). Measuring Anxiety-Like Behaviors in Rodent Models of Traumatic Brain Injury. *Front Behav Neurosci*, *15*, 682935. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.682935>
- Tyagi, R., Vaidya, B., & Sharma, S. S. (2022). Crosstalk between neurological, cardiovascular, and lifestyle disorders: insulin and lipoproteins in the lead role. *Pharmacol Rep*, *74*(5), 790-817. <https://doi.org/10.1007/s43440-022-00417-5>

- Voineskos, D., Daskalakis, Z. J., & Blumberger, D. M. (2020). Management of Treatment-Resistant Depression: Challenges and Strategies. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 16, 221-234. <https://doi.org/10.2147/NDT.S198774>
- Vu, A. P., Lam, D., Denney, C., Lee, K. V., Plemel, J. R., & Jackson, J. (2023). Social isolation produces a sex- and brain region-specific alteration of microglia state. *Eur J Neurosci*, 57(9), 1481-1497. <https://doi.org/10.1111/ejn.15966>
- Walker, A. K., Wing, E. E., Banks, W. A., & Dantzer, R. (2019). Leucine competes with kynurenine for blood-to-brain transport and prevents lipopolysaccharide-induced depression-like behavior in mice. *Mol Psychiatry*, 24(10), 1523-1532. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0076-7>
- Walker, D. M., Cunningham, A. M., Gregory, J. K., & Nestler, E. J. (2019). Long-Term Behavioral Effects of Post-weaning Social Isolation in Males and Females. *Front Behav Neurosci*, 13, 66. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00066>
- Wallis, D. J., & Hetherington, M. M. (2009). Emotions and eating. Self-reported and experimentally induced changes in food intake under stress. *Appetite*, 52(2), 355-362. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2008.11.007>
- Walter, A. E., & Sandsmark, D. K. (2023). The Importance of Social Contact on Brain Atrophy Among Older Individuals. *Neurology*, 101(11), 459-460. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000207720>
- Wang, Y. F., You, G. Y., Han, T., Liu, Y., Li, J., Ji, X., & Xie, X. M. (2023). Network analysis of comorbid depression, suicidality and biomarkers on HPA axis among mood disorder patients to psychiatric emergency services. *Transl Psychiatry*, 13(1), 203. <https://doi.org/10.1038/s41398-023-02503-5>
- Watanabe, S., Omran, A. A., Shao, A. S., Xue, C., Zhang, Z., Zhang, J., Davies, D. L., Shao, X. M., Watanabe, J., & Liang, J. (2022). Dihydromyricetin improves social isolation-induced cognitive impairments and astrocytic changes in mice. *Sci Rep*, 12(1), 5899. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09814-5>
- Wise, T., Radua, J., Via, E., Cardoner, N., Abe, O., Adams, T. M., Amico, F., Cheng, Y., Cole, J. H., de Azevedo Marques Perico, C., Dickstein, D. P., Farrow, T. F. D., Frodl, T., Wagner, G., Gotlib, I. H., Gruber, O., Ham, B. J., Job, D. E., Kempton, M. J., . . . Arnone, D. (2017). Common and distinct patterns of grey-matter volume

alteration in major depression and bipolar disorder: evidence from voxel-based meta-analysis. *Mol Psychiatry*, 22(10), 1455-1463. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.72>

Wohleb, E. S. (2016). Neuron-Microglia Interactions in Mental Health Disorders: "For Better, and For Worse". *Front Immunol*, 7, 544. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00544>

Xia, J., Wang, H., Zhang, C., Liu, B., Li, Y., Li, K., Li, P., & Song, C. (2022). The comparison of sex differences in depression-like behaviors and neuroinflammatory changes in a rat model of depression induced by chronic stress. *Front Behav Neurosci*, 16, 1059594. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.1059594>

Yankelevitch-Yahav, R., Franko, M., Huly, A., & Doron, R. (2015). The forced swim test as a model of depressive-like behavior. *J Vis Exp*(97). <https://doi.org/10.3791/52587>

Yao, J., Chen, C., Guo, Y., Yang, Y., Liu, X., Chu, S., Ai, Q., Zhang, Z., Lin, M., Yang, S., & Chen, N. (2023). A Review of Research on the Association between Neuron-Astrocyte Signaling Processes and Depressive Symptoms. *Int J Mol Sci*, 24(8). <https://doi.org/10.3390/ijms24086985>

Yoshimura, M., Flynn, B. P., Kershaw, Y. M., Zhao, Z., Ueta, Y., Lightman, S. L., & Conway-Campbell, B. L. (2023). Phase-shifting the circadian glucocorticoid profile induces disordered feeding behaviour by dysregulating hypothalamic neuropeptide gene expression. *Commun Biol*, 6(1), 998. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05347-3>

Zalewska, K., Pietrogrande, G., Ong, L. K., Abdolhoseini, M., Kluge, M., Johnson, S. J., Walker, F. R., & Nilsson, M. (2018). Sustained administration of corticosterone at stress-like levels after stroke suppressed glial reactivity at sites of thalamic secondary neurodegeneration. *Brain Behav Immun*, 69, 210-222. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.014>

Zefferino, R., Di Gioia, S., & Conese, M. (2021). Molecular links between endocrine, nervous and immune system during chronic stress. *Brain Behav*, 11(2), e01960. <https://doi.org/10.1002/brb3.1960>

- Zeng, P. Y., Tsai, Y. H., Lee, C. L., Ma, Y. K., & Kuo, T. H. (2023). Minimal influence of estrous cycle on studies of female mouse behaviors. *Front Mol Neurosci*, *16*, 1146109. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1146109>
- Zhang, H. Y., Zhao, Y. N., Wang, Z. L., & Huang, Y. F. (2015). Chronic corticosterone exposure reduces hippocampal glycogen level and induces depression-like behavior in mice. *J Zhejiang Univ Sci B*, *16*(1), 62-69. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1400166>
- Zhang, K., Lin, W., Zhang, J., Zhao, Y., Wang, X., & Zhao, M. (2020). Effect of Toll-like receptor 4 on depressive-like behaviors induced by chronic social defeat stress. *Brain Behav*, *10*(3), e01525. <https://doi.org/10.1002/brb3.1525>
- Zhao, J., Liu, J., Denney, J., Li, C., Li, F., Chang, F., Chen, M., & Yin, D. (2015). TLR2 Involved in Naive CD4+ T Cells Rescues Stress-Induced Immune Suppression by Regulating Th1/Th2 and Th17. *Neuroimmunomodulation*, *22*(5), 328-336. <https://doi.org/10.1159/000371468>
- Zhao, Y., Lin, Z., Chen, L., Ouyang, L., Gu, L., Chen, F., & Zhang, Q. (2018). Hippocampal astrocyte atrophy in a mouse depression model induced by corticosterone is reversed by fluoxetine instead of benzodiazepine diazepam. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *83*, 99-109. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.01.011>
- Zhou, X., Xiao, Q., Xie, L., Yang, F., Wang, L., & Tu, J. (2019). Astrocyte, a Promising Target for Mood Disorder Interventions. *Front Mol Neurosci*, *12*, 136. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00136>
- Zhu, C. B., Lindler, K. M., Owens, A. W., Daws, L. C., Blakely, R. D., & Hewlett, W. A. (2010). Interleukin-1 receptor activation by systemic lipopolysaccharide induces behavioral despair linked to MAPK regulation of CNS serotonin transporters. *Neuropsychopharmacology*, *35*(13), 2510-2520. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.116>
- Zilioli, S., & Jiang, Y. (2021). Endocrine and immunomodulatory effects of social isolation and loneliness across adulthood. *Psychoneuroendocrinology*, *128*, 105194. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2021.105194>

## **IX. ANEXOS**

**Anexo 9.1. Informe comité de bioética y bioseguridad, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.**



Concepción, 20 de noviembre de 2023

### INFORME COMITÉ DE BIOÉTICA Y BIOSEGURIDAD

Comité de Bioética y Bioseguridad Dirección de Investigación Facultad de Ciencias Biológicas Universidad de Concepción  <input type="checkbox"/> Dra. Carola Muñoz M. <input type="checkbox"/> Dra. Carla Estrada M. <input type="checkbox"/> Dr. Fabián Segovia M. <input type="checkbox"/> Dr. Ítalo Fernández F.	PROYECTO	VRID N°2023000819
	TÍTULO	"EFECTO DEL ESTRÉS POR AISLAMIENTO SOCIAL SOBRE LA INFLAMACIÓN EN RATONES HEMBRA"
	INVESTIGADOR	Dr. Roberto Elizondo Vega

A solicitud del Sr. Roberto Elizondo Vega, se recibe documento (adjunto) con precisiones a la metodología incluida en la postulación al Proyecto VRID antes mencionado, solicitando que este Comité emita una carta de aprobación.

Estas precisiones, así como la metodología del Proyecto, han sido analizadas de acuerdo a las recomendaciones de GUIDE for the Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Science National Research Council), los principios elaborados por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas, Organización Mundial de la Salud (1985), el texto "Aspectos Bioéticos de la Experimentación Animal", editado por CONICYT en 2009, y el "Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados" editado por CONICYT en 2018.

De acuerdo con lo señalado en el documento, las precisiones a la metodología son consecuentes con el principio de las "3 Rs" empleado para la investigación con animales. En particular:

1. Dado que no existe un modelo alternativo para realizar el estudio, el Investigador necesita emplear animales, Especie/cepa: *Mus Musculus/C57BL6*, correspondiendo a especies apropiadas para realizar la investigación, lo que representa una buena aproximación al requisito de REEMPLAZAR.
2. En términos de REDUCIR, se utilizará un número de animales dentro de los rangos admisibles.
3. El uso de analgesia y eutanasia son apropiados para la especie en términos de REFINAR. Además, el Proyecto incluye el uso de un protocolo de supervisión de animales de experimentación.
4. En consecuencia, los protocolos existentes son adecuados.
5. El estudio propuesto permitirá realizar avances en los conocimientos en beneficio humano y animal.
6. El personal involucrado es idóneo en el manejo y uso de las muestras animales.



Facultad de  
Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Campus Concepción  
Edificio Arco s/n, primer piso  
[www.cienciasbiologicasudec.cl](http://www.cienciasbiologicasudec.cl)  
T: (56-41) 2204508

7. Los estudios serán desarrollados en el LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR de nuestra Facultad, donde se encuentran disponibles tanto las facilidades como el equipamiento necesario para realizar los estudios con animales incluidos en el Proyecto.

8. Cabe mencionar que nuestra Facultad cuenta con los servicios de la Unidad de Seguridad MATPEL ([www2.udec.cl/matpel](http://www2.udec.cl/matpel)), quienes colectan y procesan en forma rutinaria los residuos biológicos y químicos generados por nuestros investigadores, de acuerdo con las indicaciones del "Manual de Bioseguridad" de CONICYT.

En consecuencia, el comité de Bioética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción valida los estudios señalados.

Sin otro particular, les saluda muy atentamente,



**Dra. Carola Muñoz Montesino**  
Presidenta  
Comité de Bioética y Bioseguridad  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

## Anexo 9.2. Certificado comité ético científico Universidad San Sebastián



Santiago, 14 de Octubre 2019

Código interno CEC del Proyecto	03-2019-20
Fecha de Resolución	14/10/2019
Vencimiento de Vigencia de Resolución	14/10/2020

Investigador/Responsable	Karina Alejandra Oyarce Merino
Unidad Académica	Facultad de Medicina y Ciencia. Sede Concepción.
Título del Proyecto	"Immuno modulator y effect of vitamin D-treated Tregs on eripheral and central inflammation, on murine models of depression". Fondecyt de Iniciación N° 11190914
Patrocinador	Universidad San Sebastián.
Lugar de Ejecución	Bioterio del Centro Regional de Estudios Avanzados para la vida (CREAV) Facultad de Ciencias Biológicas.Universidad de Concepción.

El Comité Ético Científico de la Universidad San Sebastián ha basado la evaluación del Proyecto en la revisión de los siguientes documentos presentados por la investigadora responsable:

- Carta de la investigadora responsable a la Presidenta del Comité Ético Científico USS solicitando revisión del proyecto.
- Proyecto
- Resumen del proyecto
- Referencias del proyecto
- Solicitud de autorización al proyecto por parte del Decano de la Facultad de Medicina y Ciencia, al Comité Ético Científico Universidad San Sebastián (CEC USS).
- Currículo Vitae Investigadora
- Anexo de consideraciones éticas
- Certificado de capacitación de la investigadora principal
- Carta que acredita experiencia en procedimientos experimentales en ratones
- Autorización escrita de la autoridad correspondiente del sitio de investigación donde se realizarán los experimentos del estudio.
- Protocolo de manejo animal.
- Protocolo de supervisión en animales.

- Bioseguridad de Institución Patrocinante.
- Bioseguridad otras instituciones donde se realice la experimentación.

## 1. EVALUACIÓN ASPECTOS GENERALES DEL PROYECTO:

1.1 La versión del proyecto presentado a la evaluación por el Comité de Ético Científico USS presenta un planteamiento claro, justificado, con una metodología pertinente y con un alto valor social.

1.2 El protocolo de manejo animal hace referencia a:

- Lugar de obtención de los animales y sus características (especie, edad, peso, sexo)
- Lugar de mantención de los animales
- N° de animales a utilizar
- Método de identificación del animal
- Justificación de uso de modelo animal seleccionado en lugar de usar modelos alternativos
- Justificación de la especie a utilizar
- Justifica el tamaño muestral indicando la fórmula utilizada y los valores que se ingresan en la misma.
- Descripción de los procedimientos
- Refiere idoneidad de las condiciones del lugar e instalaciones donde se realizará el procedimiento quirúrgico y no quirúrgico.
- Identificación de niveles de dolor y tratamientos. Describe métodos de control para uso de analgésicos y sacrificio.
- Describe criterios de interrupción en circunstancias claramente especificados
- Presenta anexo con la ficha de supervisión de signos de estrés y dolor que se evaluarán, en los animales que eventualmente experimentarán dolor.
- Describe formas en que se cumplirá el principio de las tres "R" (Russell y Buch) que se refieren a Reemplazar (sustituir uso de animales), Refinar (disminuir incidencia y severidad de procedimiento) y Reducir (minimizar el número de animales).
- Define los mecanismos de eutanasia.

## 2 EVALUACIÓN DE ASPECTOS ESPECÍFICOS

2.1 Incorpora en forma explícita que todos los procedimientos quirúrgicos y no quirúrgicos, así como el manejo de animales, se realizará acorde a las exigencias éticas, normativas y leyes para el correcto uso y cuidado de los animales.

## 2.2 Sobre idoneidad en el manejo animal:

La investigadora principal que trabajará directamente con los animales demuestra experiencia e idoneidad, respaldada por certificados de capacitación.

- El método de eutanasia que se utilizará es el recomendado para este procedimiento en ratones.
- Todos los procedimientos experimentales serán ejecutados por investigadores con experiencia en el manejo de animales, además de ser monitoreados por personal veterinario calificado, que forma parte del bioterio del CREAV.
- Incorpora y justifica lo dispuesto en la Ley 20.380, sobre protección de Animales, especialmente lo relativo a:
  - La consideración al tratamiento ético y humanitario que se expone para la investigación con animales.

## 3. DECISIÓN DEL COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO<sup>1</sup>:

El Comité Ético Científico de la Universidad San Sebastián considera que el proyecto cumple con las exigencias ético científicas en experimentación con animales.

Resolución: **Proyecto Aprobado.**

La Investigadora Responsable se compromete a informar cualquier evento no previsto en el proyecto, a cumplir con las exigencias del proceso de seguimiento y a entregar un informe final cuando el proyecto esté terminado.



Dra. Alejandrina Arratia Figueroa  
Presidenta Comité Ético Científico  
Universidad San Sebastián

<sup>1</sup> El Comité Ético Científico de la Universidad San Sebastián adhiere a las exigencias internacionales contenidas en la Declaración de Helsinki y en las normas del Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS). A nivel nacional cumple con la ley 20.120 sobre la investigación científica en el ser humano, su genoma y prohíbe la clonación humana, con la ley 19.628 sobre protección de la vida privada y sobre protección de datos de carácter personal y con la Ley 20.584 sobre derechos y deberes que tienen las personas en relación con acciones vinculadas a su atención en salud y con la Ley 20.380 sobre protección de animales.