



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO  
FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO DE LOS  
EXOSOMAS OBTENIDOS DE SUERO SANGUÍNEO DE RATONAS  
BALB/C EXPUESTAS A UN AMBIENTE ENRIQUECIDO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

MARIA ELISA FERNANDEZ CERVANTES

TUTOR:

DR. GERARDO BERNABÉ RAMÍREZ RODRÍGUEZ

CIUDAD DE MÉXICO, 2022





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Índice

<b>Agradecimientos</b>	<b>I</b>
<b>Indice de figuras</b>	<b>III</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>IV</b>
<b>Resumen</b>	<b>VIII</b>
<b>I. Introducción</b>	<b>1</b>
i. Ambiente enriquecido (AE)	1
ii. Ambiente Enriquecido y periferia	2
iii. Citocinas	7
iv. Exosomas	13
v. Caracterización de los exosomas	22
<b>II. Justificación</b>	<b>27</b>
<b>III. Hipótesis</b>	<b>28</b>
<b>IV. Objetivo general</b>	<b>28</b>
<b>V. Objetivos particulares</b>	<b>28</b>
<b>VI. Metodología</b>	<b>29</b>
i. Animales y grupos experimentales	29
ii. Obtención del suero sanguíneo	29
iii. Aislamiento de exosomas	29
iv. Bradford	30
v. Fabricación de geles de acrilamida para técnica de Western Blot (WB)	31
vi. Preparación de las muestras, corrida de electroforesis y transferencia para la técnica de Western Blot (WB)	32
vii. Microarreglos	33
viii. Mapas de interacción proteína-proteína (PPI)	35
ix. Estadística	36
<b>VII. Resultados</b>	<b>37</b>
i. Determinación del contenido de proteína en los exosomas de suero sanguíneo	37
ii. Caracterización de exosomas por WB	37
iii. Microarreglos	38
iv. Mapa de interacción	41
<b>VIII. Discusión</b>	<b>44</b>
<b>IX. Conclusión</b>	<b>57</b>

<b>X. Limitaciones del Estudio</b>	<b>58</b>
<b>XI. Perspectivas del estudio</b>	<b>58</b>
<b>XII. Anexo. Expresión de las proteínas encontradas en los exosomas.</b>	<b>59</b>
<b>Referencias</b>	<b>62</b>

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias, por abrirme las puertas para formar parte de su comunidad y brindarme todo el apoyo y oportunidades para mi formación.

A mi tutor, el Dr. Gerardo Bernabé Ramírez Rodríguez, por el tiempo y la paciencia dedicados y todos los conocimientos brindados. Su calidad humana permite que el laboratorio se convierta en un espacio en donde no sólo se realiza investigación, sino que también se genera una red de apoyo entre todos los integrantes.

A los miembros del jurado, el Dr. Luis Felipe Jiménez García, la Dra. Lucía Alba Martínez Mota, el Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín y la Dra. Nelly Maritza Vega Rivera. Quienes dedicaron tiempo para revisar este trabajo y sus correcciones permitieron terminar de estructurarlo.

Al Dr. Jorge Vázquez, quien estuvo siempre presente como guía a lo largo de este proceso, dedicando tiempo y compartiendo su experiencia y conocimientos.

A las personas, que, en conjunto, forman la esencia de lo que hoy es el laboratorio de neurogénesis. Sin ellos el espacio de trabajo no sería ese lugar lleno de camaradería y colaboración, cualidades esenciales para el crecimiento de todos los miembros de un equipo.

A la Dra. Raquel Díaz, por acompañarme a lo largo de la licenciatura, tanto con su amistad como su conocimiento, lo que me permitió construir una estructura académica.

A mi madre, Margarita Cervantes Villarreal, pieza clave en mi vida y quién siempre ha creído en mí. Su compañía y apoyo me ha permitido crecer y poco a poco encontrar mi camino.

A mi padre, Jorge Fernandez Souza, quién siempre me ha acompañado con su experiencia, apoyo y cariño.

A mis compañeros y amigos, Ylenia, Jessica, Mark, Horacio, Oswaldo, Arancha, Paulina, Carlos y Gary. Por todos los momentos de acompañamiento mutuo que nos brindamos y la ayuda que me han dado a lo largo de la carrera. La experiencia hubiera sido distinta de no ser por ustedes.

A Constanza, Ana y Jimena, quienes me conocen desde la infancia y han sido pilares a lo largo de mi vida. Su escucha y compañía han estado presentes a través del tiempo, sin importar la distancia.

## Índice de figuras

<b>Figura 1. Efectos del AE en los sistemas periféricos.</b>	<b>5</b>
<b>Figura 2. Estructura y composición típica de exosomas.</b>	<b>15</b>
<b>Figura 4. Modulación de la respuesta inmune por exosomas.</b>	<b>20</b>
<b>Figura 5. Exosomas en el cerebro.</b>	<b>22</b>
<b>Figura 6. Mapa del microarreglo.</b>	<b>36</b>
<b>Figura 7. Contenido total de proteína en exosomas.</b>	<b>38</b>
<b>Figura 8. Determinación de marcadores exosómicos.</b>	<b>39</b>
<b>Figura 9. Imagen representativa para cada grupo experimental de las membranas de microarreglos con los spots de las proteínas.</b>	<b>40</b>
<b>Figura 10. Perfil de expresión de las 96 citocinas analizadas.</b>	<b>41</b>
<b>Figura 11. Intensidad relativa de citocinas en exosomas.</b>	<b>42</b>
<b>Figura 12. Mapa de interacción proteína-proteína.</b>	<b>43</b>
<b>Figura 13. Mapa de interacción proteína-proteína entre las proteínas con diferencias significativas y las agregadas a la primer capa.</b>	<b>44</b>

## Abreviaturas

AE	Ambiente Enriquecido
APC	Células presentadoras de antígenos
APS	Persulfato amónico
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BrdU	Bromodesoxiuridina
BSA	Albúmina sérica bovina
CA3	Cuerno de Amón 3
Células LepR+	Células positivas para el receptor de leptina
Células NK	Células <i>natural killer</i>
Células NKT	Células T <i>natural killer</i>
Células TCM	Células T de memoria central
Células Teff	Células T efectoras
Células Tem	Células T de memoria efectoras
Células Th1	Células T <i>helper</i> 1
Células Th17	Células T <i>helper</i> 17
Células Th2	Células T <i>helper</i> 2
Células TN	células T <i>naïve</i>
Células Treg	Células T reguladoras
CNS	Sistema Nervioso Central
CTACK/CCL27	Quimiocina atrayente de células T cutáneas/Quimiocina CC ligando 27
CTRL	Grupo experimental control
CX3CR1	Quimiocina CX3C receptor 1
CXCL16	Quimiocina CXC ligando 16
CXCR3	Quimiocina CXC receptor 3
CXCR5	Quimiocina CXC receptor 5
CXCR6	Quimiocina CXC receptor 6
DCs	Células dendríticas
DCX	Doblecortina
DHEA	dehidroepiandrosterona
DLS	Dispersión dinámica de luz
DNA	Ácido desoxiribonucleico
Eje HPA	Eje hipotalámico-pituitario-adrenal
ELISA	Enzimoimmunoanálisis de adsorción
ENR	Grupo experimental enriquecido
Eotaxina/CCL11	Quimiocina CC ligando 11
ERK	Cinasas reguladas por señales extracelulares
ESCRT	Complejo de clasificación endosomal necesarios para la maquinaria de transporte
EV	Vesícula extracelular
FasL	Ligando Fas



Fractalquina/CX3CL1	Quimiocina CX3C ligando 1
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GSSG	Glutación oxidado
HRP	Peroxidasa de rábano
HSA	hipotálamo-simpatoneural-adipocito
HSC	Células troncales hematopoyéticas
hsp90	Proteína de choque térmico 90
IFN	Interferón
IgE	Inmunoglobulina E
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
IGFBP-3	Proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 3
IGFBP-6	Proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina tipo 6
IGF-I	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo I
IGF-II	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo II
IL	Interleucina
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL-1ra	Antagonista del receptor de IL-1
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-21	Interleucina 21
IL-22	Interleucina 22
IL-25	Interleucina 25
IL-3	Interleucina 3
IL-33	Interleucina 33
IL-35	Interleucina 35
IL-37	Interleucina 37
IL3RB	Subunidad beta común del receptor para GM-CSF/IL-3/IL-5
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
ILC	Células linfoides innatas
ILC-2	Células linfoides innatas del grupo 2
ILV	Vesícula intraluminal
INF- $\gamma$	Interferón gamma
INPRFM	Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz
JAK	Janus cinasas

KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LDLox	Lipoproteínas de baja densidad oxidadas
LPS	Lipopolisacárido
LTP	Potenciación a largo plazo
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MCP-1/CCL2	Proteína quimiotáctica de monocitos 1/Quimiocina CC ligando 2
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MEK	Cinasa MAPK/ERK
MHC-I	Complejo mayor de histocompatibilidad de la clase I
MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad de la clase II
MIP-1 $\beta$	Proteína inflamatoria macrófágica 1 beta
miRNA	micro RNA
mRNA	RNA mensajero
MS	Espectrometría de masas
MVB	Cuerpo multivesicular
NF-kB	Factor nuclear kB
NSF	Factor sensible a la N-etilmaleimida
OVA	Ovoalbúmina
PAMP	Patrón molecular asociado a patógenos
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinasa
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
RPS	Detección de pulso resistivo
SAM	Sistema simpático-adrenomedular
SCF	Factor de células potenciales
SDS	Dodecilsulfato de sodio
siRNA	RNA de interferencia
SNAP	Proteína asociada a sinaptosoma
SNARE	Receptores de fijación de proteínas soluble de NSF
SNS	Sistema nervioso simpático
STAM1	Molécula adaptadora de transducción de señales 1
STAT	Transductores de señal y activadores de la transcripción
sTNF-r1	Receptor soluble de TNF 1
sTNF-r2	Receptor soluble de TNF 2
TBS	Solución buffer tris salino
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TEMED	Tetrametiletildiamina
TGF- $\beta$ 1	Factor de crecimiento transformante beta 1
TLR-2	Receptores tipo toll 2
TLR-4	Receptores tipo toll 4
TNF	Factor de necrosis tumoral

TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TSG101	Gen de susceptibilidad tumoral 101
TSPAN8	Tetraspanina 8
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WB	Western Blot

## Resumen

El ambiente enriquecido (AE) favorece la estimulación cognitiva, sensorial, motora y social. Lo cual, a su vez, tiene efectos tanto en el sistema nervioso central (CNS) como en la periferia. Recientemente, se propuso la comunicación bidireccional CNS-periferia provocando modificaciones en la conducta y en la plasticidad cerebral. Estas modificaciones son producidas por los factores solubles contenidos en el suero. Además de los factores solubles (citocinas, quimiocinas, neurotrofinas, factores de crecimiento, etcétera), el suero contiene vesículas extracelulares (EV, por sus siglas en inglés) llamadas exosomas, que, al poseer la capacidad de penetrar la barrera hematoencefálica, participan en esta comunicación CNS-periferia. Entre las funciones de los exosomas en la periferia se incluyen su participación en la estimulación o supresión de procesos del sistema inmune, mientras que, a nivel central, participan en procesos de comunicación celular con importancia en estados fisiológicos o patológicos. Sin embargo, el contenido de los exosomas de suero sanguíneo de roedores expuestos a un AE poco se ha explorado a nivel de su contenido proteico. En el presente trabajo se planteó como hipótesis que los exosomas de suero sanguíneo de roedores expuestos a un AE tienen un contenido diferencial de citocinas y quimiocinas comparado con el contenido proteico de los exosomas de roedores alojados en condiciones estándar. Las ratonas fueron asignadas a dos grupos experimentales: 1) el grupo control (CTRL) que corresponde a los roedores alojados en condiciones estándar (cama de aserrín y material de anidación) y 2) el grupo de roedores alojados en el ambiente enriquecido (ENR; túneles, materiales de anidación y legos). El AE se aplicó durante dos semanas y al final del alojamiento, los roedores fueron sacrificados para obtener la sangre. A partir de la sangre se aislaron los exosomas y su contenido se analizó con arreglos de anticuerpos. Los cambios en la expresión de las diversas proteínas se analizaron y los resultados indicaron que la exposición a un AE promueve cambios en ocho de las proteínas que detecta el arreglo. Las proteínas que mostraron cambios entre el ENR y CTRL fueron: La fractalquina (CX3CL1), eotaxina (CCL11), CXCL16, el ligando Fas (FasL), la subunidad beta común del receptor de GM-CSF/IL-3/IL-5 (IL3RB), la quimiocina atrayente de células T cutáneas (CTACK), el factor de células potenciales (SCF) y la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina tipo 6 (IGFBP-6). Las funciones de las proteínas varían desde la quimiotaxis celular hasta algunos procesos neurogénicos. Los resultados de este trabajo de tesis señalan que existe contenido proteico diferencial en los roedores expuestos al AE, en comparación con los roedores alojados en condiciones estándar.

Estos hallazgos apuntan a la necesidad de seguir explorando cuales son los mecanismos que el AE desencadena tanto a nivel periférico como a nivel central.

## I. Introducción

### i. Ambiente enriquecido (AE)

Dentro de un contexto experimental, el enriquecimiento ambiental hace referencia a condiciones de alojamiento que favorezcan niveles altos de estimulación sensorial, cognitiva, motora y social, con relación a las condiciones normales de alojamiento. A pesar de que, por el momento, no existe un modelo consolidado de enriquecimiento, ni una teoría unificada del paradigma, distintas características se pueden atribuir al AE (Kempermann, 2019). Por lo general, se aumenta el tamaño de las jaulas, lo que permite la incorporación de ambientes complejos y novedosos, ya sea por medio de la inclusión de objetos inanimados, o de un mayor número de animales por caja (Bayne & Würbel, 2012; Kondo, 2017; Nithianantharajah & Hannan, 2006; van Praag *et al.*, 2000). Los objetos utilizados incluyen túneles, materiales de anidación, refugios y ruedas para ejercitarse, con variaciones en cuanto al color, forma, tamaño, textura, olor y composición. Sin embargo, algunos estudios prescinden de la rueda para ejercitarse, pero incluyen túneles, materiales de anidación y refugios (Freund *et al.*, 2013). La introducción de ruedas para ejercitarse tiene implicaciones importantes dado que el ejercicio voluntario por sí solo tiene efectos tanto en el CNS como en la periferia (Nithianantharajah & Hannan, 2006). Dependiendo del diseño experimental, se puede optar por modificar continuamente la ubicación de los elementos dentro del alojamiento, proporcionando novedad y estimulación cognitiva adicional; en algunos casos, se recurre incluso a jaulas de exploración en dónde se coloca a los animales por un tiempo determinado durante el día. (Bayne & Würbel, 2012; Nithianantharajah & Hannan, 2006; van Praag *et al.*, 2000). La edad de los animales y el tiempo del ambiente enriquecido son otros parámetros que pueden variar dependiendo del enfoque de la investigación (Nithianantharajah & Hannan, 2006).

En 1947 Donald Hebb, fue el primero en documentar el efecto positivo del AE en el comportamiento (Nithianantharajah & Hannan, 2006). A partir de eso se han hecho múltiples investigaciones enfocados en la caracterización de los efectos del enriquecimiento en el cerebro, tanto a nivel molecular, como celular y de comportamiento. Varios estudios iniciales se enfocaron en las diferencias en el peso y las dimensiones de la corteza cerebral, siendo mayores en animales expuestos a un AE (Bennett *et al.*, 1969;

Diamond *et al.*, 1976). Posteriormente, la atención comenzó a centrarse en los cambios plásticos que se producen en el cerebro a raíz del enriquecimiento. En las dendritas, se producen aumentos en el número de ramificaciones y un mayor número de sinapsis (Greenough & Volkmar, 1973; Rampon *et al.*, 2000; Turner & Greenough, 1985). El ambiente enriquecido también promueve la neurogénesis (Kempermann *et al.*, 1996, 1998). Estos cambios a nivel celular están íntimamente relacionados con los efectos que el ambiente enriquecido ejerce en la expresión génica de distintas células (Rampon *et al.*, 2000; Rattazzi *et al.*, 2016), en la producción de proteínas (Zhang *et al.*, 2016) y en los niveles de neurotransmisores, factores de crecimiento y factores inmunológicos, entre otros (Gualtieri *et al.*, 2017; Mosaferi *et al.*, 2015; Singhal *et al.*, 2014; Varman & Rajan, 2015).

A nivel de comportamiento, el AE fomenta el desarrollo de la memoria y el aprendizaje (Rampon *et al.*, 2000; Schrijver *et al.*, 2002). Por el contrario, los comportamientos tipo ansiosos disminuyen, mientras que aumenta la actividad exploratoria (Benaroya-Milshtein *et al.*, 2004; Chapillon *et al.*, 1999; Roy *et al.*, 2001). La relevancia del ambiente enriquecido no se limita a los cerebros sanos, por ejemplo, ha demostrado ser beneficioso para contrarrestar los declives ocasionados por la senescencia (Diamond *et al.*, 1985; Kempermann *et al.*, 1998). Asimismo, es notable el impacto positivo que ejerce en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington (Van Dellen *et al.*, 2000) o la enfermedad de Alzheimer (Jankowsky *et al.*, 2005; Lazarov *et al.*, 2005) y de desórdenes psiquiátricos como la depresión (Mosaferi, Babri, Ebrahimi, *et al.*, 2015) o la drogadicción (Bezard *et al.*, 2003).

## ii. AE y periferia

Gran parte de la investigación referente al AE se ha centrado en el impacto que ejerce en el cerebro, no obstante, sus efectos en la periferia también son significativos y en gran medida están interconectados con aquellos observados en el SNC. La exposición a un AE con factores tanto cognitivos como sociales fomenta la inmunovigilancia y reduce la inflamación (Nieman & Wentz, 2019).

Por una parte, revierte el declive que se produce en las funciones inmunes como consecuencia de la edad; revierte la disminución en la actividad fagocítica y en la quimiotaxis de macrófagos, en la actividad antitumoral de las células *natural killer* (NK) y

en la capacidad proliferativa de las células T, frente a un estímulo, al igual que el deterioro en la migración de linfocitos. En paralelo, se produce una disminución en los receptores tipo toll 2 (TLR-2) y receptores tipo toll 4 (TLR4) en células T CD4+ y CD8+, los cuales aumentan con la edad (Arranz *et al.*, 2010). En ratones adultos expuestos a un AE, se ha observado un aumento en la actividad y maduración de células NK, esto se traduce en una mejor preparación del organismo para contender ante una posible infección o al desarrollo de un tumor (Benaroya-Milshtein *et al.*, 2004; Mansour *et al.*, 2021; Meng *et al.*, 2019). Los niveles de células T CD4+ y CD8+ también se ven alterados, algunos estudios encuentran menor cantidad de células CD4+ en animales expuestos a un AE, en el peritoneo, el bazo y timo (Arranz *et al.*, 2010; Marashi *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2019), y un mayor número de células CD8+ en el bazo, timo y nódulos linfáticos (Singhal *et al.*, 2021; Xiao *et al.*, 2016, 2019). Aunque, Marashi *et al.*, (2004), describe una disminución tanto en células CD4+ como en CD8+ en el bazo. Mientras que en otros estudios no detectan cambios en los niveles de estas células, pero sí en sus subtipos, como un aumento en los niveles de células T CD4+ y CD8+ naïve (N) en roedores expuestos a un AE con la inclusión de rueda para ejercitarse. Sin embargo, la exposición a los túneles o el uso de la rueda para actividad física, por separado, incrementa las células T CD4+ de memoria central (CM) y T CD8+ *early activated*, al mismo tiempo que disminuye las células T CD4+ de memoria efectoras (EM).

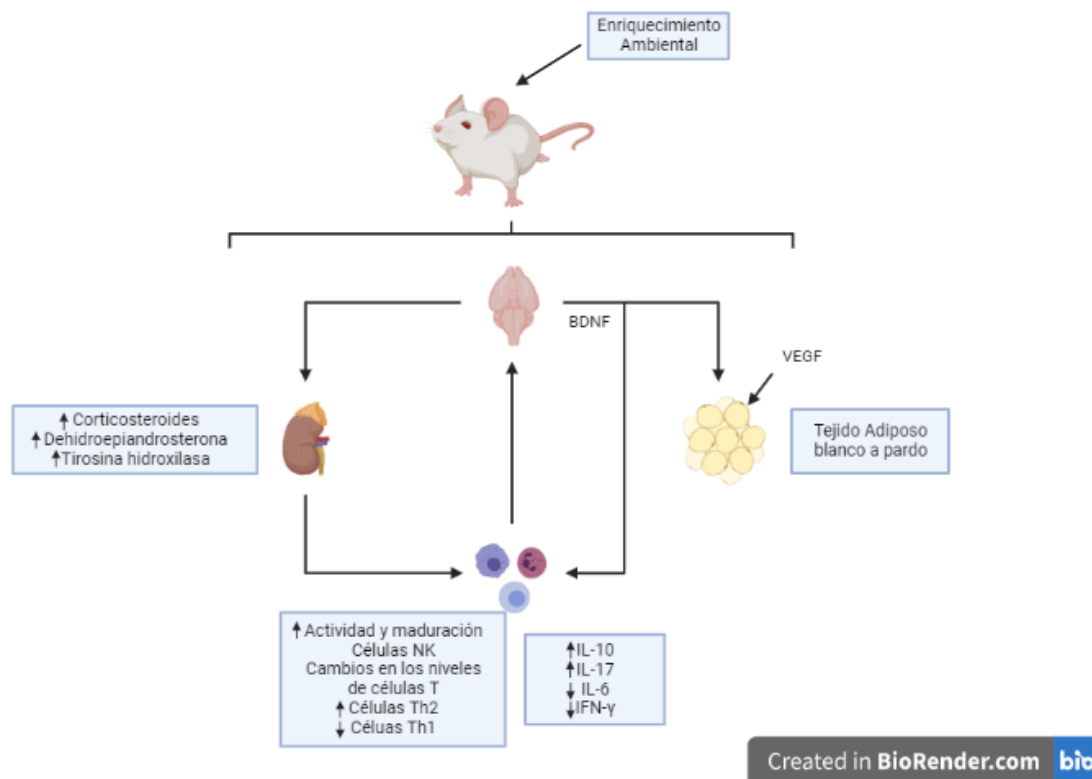
Tanto el aumento en la actividad citotóxica de las células NK como en las células T CD8+ favorece la disminución de la masa de tumores en ratones (Meng *et al.*, 2019; Xiao *et al.*, 2016). Aunado a esto, parece haber una composición diferente de células del sistema inmune en la sangre de animales expuestos a un AE, con un mayor número de neutrófilos y un menor número de linfocitos (Brod *et al.*, 2017). Los linfocitos también parecen disminuir en el bazo y timocito y aumentar en los nodos linfáticos y los tejidos linfáticos secundarios (Xiao *et al.*, 2016, 2019). Los efectos que el AE ejerce en el sistema inmune también se ven reflejados en un modelo de sepsis polimicrobiana, en donde se produce una acumulación rápida de leucocitos en la zona de infección y una mayor eficiencia para remover bacterias con un aumento modulado de citocinas proinflamatorias (Brod *et al.*, 2017). Además, también influyen en los efectos del AE en el CNS, se ha demostrado que las células CD8+ juegan un rol esencial en los efectos del AE tanto en la plasticidad hipocampal como en el aprendizaje espacial y la reducción de los comportamientos tipo ansiosos (Zarif *et al.*, 2018).



A nivel molecular, el ejercicio promueve la liberación de la interleucina 6 (IL-6) (Drenth *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 1994; Nielsen *et al.*, 1996; Ostrowski *et al.*, 1998; Kenneth Ostrowski *et al.*, 1999; Schobersberger *et al.*, 2000). Esta citocina se produce principalmente en el músculo esquelético (Ostrowski *et al.*, 1998), aunque el tejido adiposo y peritendular también la producen, en menor cantidad (Petersen & Pedersen, 2005). IL-6 es una citocina clasificada tanto como proinflamatoria, así como antiinflamatoria. Frente al ejercicio induce la liberación del antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1ra), un inhibidor de citocinas (Drenth *et al.*, 1995; Ostrowski *et al.*, 1998; Schobersberger *et al.*, 2000), y de la citocina antiinflamatoria interleucina 10 (IL-10) (Steensberg *et al.*, 2003). Otra característica de su naturaleza antiinflamatoria es que actúa como regulador negativo del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Mizuhara *et al.*, 1994; Petersen & Pedersen, 2005). Otros factores probablemente contribuyan a la disminución en los niveles de TNF- $\alpha$ , ya que el AE sigue produciendo ese efecto, aunque en menor medida, en ratones con un *knockout* para IL-6 (Keller *et al.*, 2004). Dentro de la cascada de inhibidores de citocinas inflamatorias, producida por la actividad física, también se encuentran los receptores solubles de TNF 1 (sTNF-r1) y 2 (sTNF-r2) (Ostrowski *et al.*, 1999; Schobersberger *et al.*, 2000). En personas con síndrome metabólico, el ejercicio también disminuye marcadores de inflamación, como la interleucina 8 (IL-8) y la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) en plasma, probablemente relacionado con una reducción en la grasa visceral (Trøseid *et al.*, 2004). El AE también modula la expresión de distintas citocinas, bajo esta condición, los animales presentan un aumento en citocinas antiinflamatorias, como IL-10 y la interleucina 17 (IL-17), junto con una disminución en citocinas proinflamatorias, como el interferón  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) (Marashi *et al.*, 2003; Rattazzi *et al.*, 2016; Scarola *et al.*, 2019; Scarola & Bardi, 2021). Scarola *et al.*, (2019), encontraron que, junto con el aumento en IL-10, se produce una disminución en IL-6 en ratones sometidos a un paradigma de estrés en conjunto con el enriquecimiento ambiental. En dicho artículo, se asocia IL-6 con la activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) y los síntomas tipo depresivos, por lo que su disminución resulta beneficiosa para afrontar el estrés.

El INF- $\gamma$  es una citocina característica de las células T *helper* 1 (Th1), en ese sentido, distintos estudios encuentran una disminución de las citocinas relacionadas con las células Th1 mientras que las relacionadas con las células T *helper* 2 (Th2) aumentan (Marashi *et al.*, 2003). Incluso se ha observado que el ambiente enriquecido promueve el fenotipo de las células Th2 (Rattazzi *et al.*, 2016) y una disminución en las células Th1, en

el timo y bazo (Xiao *et al.*, 2019). En un estudio realizado en crías, cuyas madres fueron sometidas a un paradigma de estrés por restricción de movimiento, se observó que el ambiente enriquecido revierte la disminución en linfocitos T CD4+, en la proporción de T CD4+/T CD8+ y disminuye la concentración de la interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), una citocina proinflamatoria, mientras que aumenta la de la interleucina 2 (IL-2), una citocina antiinflamatoria (Laviola *et al.*, 2004). En células del sistema inmune también se produce un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno en ratones alojados en un AE, aunque esto podría ser perjudicial para los organismos, el aumento es pequeño y está acompañado por una disminución de glutatión oxidado (GSSG). En ratones de edad avanzada expuestos a un AE, además de la disminución en GSSG también se produce una disminución de xantina oxidasa y un aumento en la actividad de la glutatión peroxidasa y de la catalasa (CAT), promoviendo una defensa antioxidante (Arranz *et al.*, 2010).



**Figura 1. Efectos del AE en los sistemas periféricos.** El AE promueve la liberación de BDNF hipotalámico, de VEGF y la activación del eje HPA. Los cuales a su vez, producen efectos en los niveles de hormonas, en las células del sistema inmune, en las citocinas que estas liberan y en el tejido adiposo.

Otras citocinas también experimentan variaciones como consecuencia del AE, como es el caso de VEGF, cuyos niveles aumentan (During *et al.*, 2015). La actividad física también promueve un aumento en la transcripción de VEGF, tanto en los pulmones como en el músculo esquelético de ratones (Tang *et al.*, 2010), así como un aumento de su concentración en el suero de humanos (Schobersberger *et al.*, 2000). El VEGF periférico es importante para el transporte de oxígeno tanto al músculo (Schobersberger *et al.*, 2000), como a los pulmones, pudiendo también tener un efecto en el mantenimiento de la barrera capilar alveolar (Tang *et al.*, 2010). Esa proteína también está implicada en el aumento de la neurogénesis hipocampal inducida por el ejercicio (Fabel *et al.*, 2003). Por otra parte, la actividad física aumenta los niveles en suero del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I) (Schwarz *et al.*, 1996), el cual modula el aumento de neuronas positivas a bromodesoxiuridina (BrdU) en el hipocampo (Trejo *et al.*, 2001). El mismo efecto producido por el ejercicio se puede observar en los niveles de factor de crecimiento similar a la insulina tipo II (IGF-II), de la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 3 (IGFBP-3) y la proteólisis de esta última (Schwarz *et al.*, 1996). Además, se observan cambios metabólicos, posteriores al AE, como el aumento en los niveles adiponectina y la disminución en los de leptina, adiponectinas cuya influencia en las células del sistema inmune ha sido demostrada (Meng *et al.*, 2019).

A nivel metabólico el AE promueve el cambio de tejido adiposo blanco a pardo regulado por el sistema nervioso simpático (SNS), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y VEGF (During *et al.*, 2015), lo cual se ha relacionado con una resistencia a la obesidad (Cao *et al.*, 2011). Por otra parte, el ambiente enriquecido también afecta al sistema endócrino, reflejado en los niveles de glucocorticoides en plasma o suero. Distintos estudios han mostrado una relación entre el ambiente enriquecido y un aumento del nivel de corticosterona. Por ejemplo, en ratas, los niveles de corticosterona aumentan después de la exposición al AE, sin la presencia de un estresor (Benaroya-Milshtein *et al.*, 2004; Marashi *et al.*, 2003). Este efecto puede estar relacionado con el aumento en las interacciones agonistas entre los animales expuestos a al AE, es decir aquellos comportamientos que surgen como consecuencia de una posible situación riesgosa (ataques, evitar el contacto, huir) (Marashi *et al.*, 2003, 2004), con la exposición a objetos novedosos o incluso con un aumento en la actividad física (Benaroya-Milshtein *et al.*, 2004; Marashi *et al.*, 2003). La diferencia en la concentración de corticosterona no está presente en ratones de la cepa dócil ABG expuestos al AE, que no presentan comportamientos agonistas (Marashi *et al.*, 2004). A pesar del aumento en los niveles de

glucocorticoides, exponer a ratones a un paradigma de estrés, no afecta los niveles basales de corticosterona (Benaroya-Milshtein *et al.*, 2004). Incluso, en crías provenientes de embarazos dónde la madre se sometió a un paradigma de estrés, el enriquecimiento ambiental prácticamente normaliza la concentración basal de corticosterona (Laviola *et al.*, 2004), lo mismo se observó en ratones expuestos a un estresor social (McQuaid *et al.*, 2018). Aunado a esto, los niveles de *dehidroepiandrosterona* (DHEA), un andrógeno de origen adrenal, aumentan tras la exposición al AE. Así que el AE, parece tener un efecto en la adaptación del eje HPA y la eficiencia de los corticosteroides, lo cual confiere cierta resistencia frente a un estresor (Benaroya-Milshtein *et al.*, 2004; Campeau *et al.*, 2010; Nyhuis *et al.*, 2010; Scarola & Bardi, 2021). La DHEA mejora la función inmune, y sus niveles parecen tener una correlación positiva con IL-10 y negativa con IL-6, por lo que podría estar modulando el efecto antiinflamatorio del ambiente enriquecido (Scarola & Bardi, 2021). En el mismo sentido, ratones alojados en un ambiente enriquecido presentan niveles más altos de tirosina hidroxilasa adrenal, esta enzima que es limitante para la síntesis de adrenalina, por lo que este otro parámetro también se relaciona con el nivel de estrés de los animales, al reflejar la activación del sistema simpático-adrenomedular (SAM) (Marashi *et al.*, 2003).

### iii. Efectos de la estimulación cognitiva y de la actividad física

Como se mencionó previamente, en gran parte de los estudios realizados sobre el AE se introduce una rueda para ejercitarse, dificultando la posibilidad de discernir las contribuciones específicas que aportan el AE y el ejercicio. Algunos investigadores se han dado a la tarea de identificar los efectos que ejercen cada uno por separado. En ese sentido, el AE sin rueda para ejercitarse promueve la neurogénesis en ratones (Freund *et al.*, 2013). Haciendo una comparación entre ambos, también se ha demostrado que tanto el ejercicio voluntario como el AE afectan positivamente la neurogénesis pero a niveles distintos, mientras que la actividad física promueve la proliferación, el AE sin ejercicio promueve la supervivencia (Fabel *et al.*, 2009; Kronenberg *et al.*, 2003). Por el contrario, un estudio más reciente, en dónde se compararon los efectos en ratones hembra del AE sin rueda para ejercitarse, del ejercicio voluntario y de ambos en conjunto, encontraron que el ejercicio promueve la neurogénesis y aumenta los niveles de BDNF en el hipocampo, mientras que el AE por sí solo no afecta ninguno; aunque sí permite una mayor habituación a la prueba de campo abierto (Kobilo *et al.*, 2011).

Por otra parte, a pesar de que, tanto el ejercicio como el AE sin actividad física promueven una disminución de tejido adiposo blanco, ésta es mayor en ratones expuestos al AE, y cada uno logra esto por mecanismos distintos (Cao *et al.*, 2011). Sin embargo, la promoción del “oscurecimiento” del tejido adiposo blanco disminuye cuando se quita la rueda para ejercitarse (Cao *et al.*, 2011). En los nodos linfáticos cervicales tanto el ejercicio como el AE sin rueda para ejercitarse promueven una expansión de células T CD4<sub>CM</sub> y una disminución de células T CD4<sub>EM</sub>, aunque sólo la combinación de ambos aumentó las células T CD4<sub>N</sub> (Singhal *et al.*, 2021). En la células CD8<sub>+</sub> tanto el AE con o sin rueda para ejercitarse aumenta el nivel de células TCD8<sub>N</sub>, pero a distintas edades, 3 y 13 meses, respectivamente, y la combinación de ambos promueve un aumento en las células CD8<sub>+</sub> early activated (Singhal *et al.*, 2021). Teniendo en cuenta los datos de estos estudios, parece que en ciertos casos los componentes individuales del AE, pueden ejercer efectos específicos en ciertos componentes del cerebro o del sistema inmune, sin descartar que se produzcan, en ciertos casos, cambios anatómicos y fisiológicos comunes.

#### iv. Citocinas

Las citocinas son un conjunto de pequeñas proteínas secretadas, de menos de 40 kDa, cuya función es importante para la señalización celular (Kany *et al.*, 2019). El término citocina surgió originalmente como un nombre alternativo para las linfocinas, con el fin de disipar la idea de que son producidas únicamente por leucocitos (Vilček, 2003). Desde entonces, distintos tipos de proteínas han sido integradas a la categoría de citocinas, como los factores de crecimiento, interferones (INF), interleucinas (IL) y factores de necrosis tumoral (TNF) (Himmerich *et al.*, 2019; Vilček, 2003). Estas proteínas son producidas por células del sistema inmune como linfocitos B, linfocitos T, macrófagos y mastocitos. También son liberadas por fibroblastos, células endoteliales, epiteliales y estromales, mientras que, en el cerebro, son liberadas por las neuronas, la microglía y los astrocitos. La mayoría de las citocinas son secretadas, pero algunas se mantienen adheridas a la membrana e incluso pueden actuar como receptores. En general, estas proteínas participan en la homeostasis de tejidos y activación, traslado, proliferación y diferenciación celular (Punt *et al.*, 2019; Vilček, 2003). De igual manera, pueden promover la supervivencia o la muerte celular (Punt *et al.*, 2019).

La señalización de las citocinas exhibe una gran complejidad ilustrada por ciertas de sus características. Una misma célula puede liberar distintas citocinas y la misma citocina puede ser liberada por distintas células. Las citocinas pueden ejercer una señalización paracrina, autocrina o endocrina. En casos de trauma, estrés, infección, neoplasia e inflamación, se activa un sistema de defensa temprano, llamado fase aguda. Durante este proceso las células del sistema inmune innato liberan citocinas en la circulación para que actúen en órganos distantes (Himmerich *et al.*, 2019). Los efectos de las citocinas pueden variar dependiendo de la célula blanco, fenómeno que se denomina pleiotrópico. La señalización de las citocinas también puede ser redundante, es decir varias citocinas pueden tener las mismas funciones. Por otra parte, se puede dar un efecto sinérgico entre las citocinas, es decir, que, en ciertos casos, al actuar dos o más en conjunto, su efecto se potencia. O, por el contrario, entre ellas pueden antagonizar sus efectos. Finalmente, las mismas citocinas participan en la liberación de otras citocinas, promoviendo su liberación por distintas células (Himmerich *et al.*, 2019; Punt *et al.*, 2019).

La sensibilidad de la célula blanco a una citocina en particular está mediada por la presencia de receptores específicos. Los receptores de las citocinas son glicoproteínas transmembranales, conformados, por lo general, de distintas subunidades. La interacción entre las citocinas y sus receptores produce una transducción de señales en la célula. Dado que las afinidades receptor-citocina pueden ser muy altas y que estas últimas son secretadas a proximidad, pueden ejercer efectos biológicos poderosos (Dembic, 2015; Punt *et al.*, 2019). La acción que produzcan las citocinas en la célula puede ser lenta o rápida. La acción lenta usualmente implica la transducción de proteínas, mientras que la acción rápida puede tener consecuencias directas como, interacciones proteína-proteína en el citosol o movilización de iones. La quimiotaxis, promovida por las quimiocinas, es un ejemplo de acción rápida. Con esta señal se producen cambios en el citoesqueleto de actina. La señalización de acción lenta puede llevarse a cabo a lo largo de minutos, horas o, en algunos casos, días. Generalmente, implica una cascada de señalización intracelular en la cual se ven involucradas quinasas (Dembic, 2015). En gran medida, aunque no siempre, estas acciones están mediadas por cambios en la transcripción de genes en la célula blanco. Dicha transcripción es consecuencia de la transducción de señales que involucra vías de señalización como la de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), del factor nuclear kB (NF-kB) o la quinasa Jano (JAK)–transductores de señal y activadores de la transcripción (STAT) (Kany *et al.*, 2019; Turner *et al.*, 2014; Vilček, 2003).

Las citocinas liberadas por células del sistema inmune innato participan en distintos procesos. Por ejemplo, en el caso de una infección viral se puede producir la liberación de la interleucina 12 (IL-12), la cual estimula las células Th1. A su vez, las células Th1 producen citocinas como TNF- $\alpha$ , interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) e IL-2 para activar las células T citotóxicas, encargadas de destruir las células infectadas por un virus. Mientras que, en el caso de una infección bacteriana, las células del sistema inmune innato pueden liberar la interleucina 4 (IL-4), estimulando células Th2. Por su parte, las células Th2 liberan citocinas como la interleucina 13 (IL-13), la interleucina 5 (IL-5) y la IL-4 y así inducen la producción de anticuerpos que pueden marcar patógenos para su posterior eliminación. Las células T *helper* 17 (Th17) también son estimuladas por citocinas, como IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , promoviendo la liberación de las interleucinas 17, 21 (IL-21) y 22 (IL-22). Otras citocinas también pueden promover la activación o diferenciación de los subtipos de células del sistema inmune adaptativo. IL-1 $\beta$  ha demostrado tener un efecto estimulatorio e inducir la diferenciación a células Th17 y Th1 (Turner *et al.*, 2014). La interleucina 33 (IL-33) se asocia con la activación de células Th2. Adicionalmente promueve la diferenciación de células Th2 y puede actuar como quimiotáctico de las mismas (Kany *et al.*, 2019). Por su parte, IL-6 regula los fenotipos Th2 y células T reguladoras (Treg), su activación y reclutamiento y la maduración de células B (Turner *et al.*, 2014). Las citocinas interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IL-17, IL-21, y IL-22, son llamadas proinflamatorias dado su papel en la promoción de la inflamación. Por el contrario, a ciertas citocinas cuya función es el bloqueo de señales, inhibiendo la reacción inflamatoria, se les conoce como citocinas antiinflamatorias. Ese es el caso del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ ), liberada por células T *helper* 0 (Th0), que a su vez induce la liberación de IL-10 por células Treg (Himmerich *et al.*, 2019). IL-10 puede atenuar las respuestas celulares Th17 y de otras células T. Las citocinas también pueden ejercer funciones en las células del sistema inmune innato. Por ejemplo, IL-33 estimula la activación de eosinófilos, basófilos, mastocitos y linfoides innatas del grupo 2 (ILC-2). Por su parte IL-6, promueve el cambio en la dominancia entre neutrófilos y monocitos que se produce al pasar del proceso inflamatorio temprano a los estados tardíos. Esto mediando la supresión de citocinas que reclutan neutrófilos mientras regula positivamente aquellas que reclutan monocitos (Kany *et al.*, 2019). Puede también promover la diferenciación de monocitos a macrófagos, mediante la liberación del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). A diferencia de IL-33 e IL-6, IL-10 suprime respuestas del sistema inmune innato como la liberación de otras citocinas, la expresión antigénica y la

fagocitosis (Turner *et al.*, 2014). Adicionalmente, las citocinas pueden tener funciones en procesos como la angiogénesis, el metabolismo lipídico, la resistencia a la insulina, coagulación, la función endotelial y la muerte celular (Kany *et al.*, 2019; Turner *et al.*, 2014). Tanto la obesidad como el envejecimiento producen un estado inflamatorio crónico con una presencia elevada de citocinas proinflamatorias; junto con enfermedades como la osteoporosis y artritis reumatoide (Kany *et al.*, 2019)

Como se mencionó previamente, una forma de clasificar a las citocinas es dependiendo del efecto que producen en la reacción inflamatoria, es decir, citocinas proinflamatorias o antiinflamatorias (Himmerich *et al.*, 2019). Por otra parte, también pueden clasificarse basándose en los patrones de liberación de citocinas por los distintos tipos de células T *helper*. Estas clasificaciones funcionales se mencionan regularmente en la literatura, aunque no han sido aceptadas (Himmerich *et al.*, 2019). Esto se debe, en gran medida, a la existencia de plasticidad en ciertas células T *helper*, por lo que la expresión de citocinas puede variar frente a distintos factores (Raphael *et al.*, 2015), al igual que a la propiedad pleiotrópica de su señalización (Himmerich *et al.*, 2019). Por lo que también son clasificadas en grupos o familias con base en las similitudes estructurales que comparten las distintas citocinas, aunque esto no implica que tengan las mismas funciones (Punt *et al.*, 2019; Vilček, 2003) (Ver tabla 1).

<b>Familia</b>	<b>Citocinas representativas</b>
Familia de la interleucina-1	IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-18, IL-33
Familia de citocinas clase 1 (hemopoyetina)	L-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, IL-13, IL-15, IL-21, IL-23, GM-CSF, G-CSF, prolactina, eritropoyetina/hemopoyetina
Familia de citocinas clase 2 (Interferón)	IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24
Familia del Factor de necrosis tumoral	TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , CD40L, Fas (CD95), BAFF, APRIL, LT- $\beta$
Familia de la interleucina-17	IL-17 (IL-17A), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17
Quimiocinas	IL-8, CCL19, CCL21, RANTES, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ )

**Tabla 1. Principales familias de citocinas y sus miembros más representativos.** (Tomada de Punt *et al.*, 2019).



Por su parte, IL-10 es una citocina antiinflamatoria junto con IL-2, TGF, la interleucina 25 (IL-25), la interleucina 35 (IL-35) y la interleucina 37 (IL-37), y puede atenuar las respuestas celulares Th17 y T.

Mientras que las quimiocinas son citocinas, de entre 7.5 y 12.5 kDa, que reclutan leucocitos al sitio de inflamación o infección por un gradiente de concentración. Se caracterizan por contener una serie de residuos de cisteína altamente conservados. Inducen la expresión de integrinas en estas células para arrestar su movimiento de rodamiento o *rolling* y favorecer la diapédesis por el endotelio. Este sistema de transporte favorece, en parte, que las citocinas puedan penetrar una gran cantidad de tejidos y que lleguen los leucocitos a los órganos inmunes secundarios, y se diferencien a células efectoras (Dembic, 2015). Aunque la quimiotaxis es por lo que son más conocidas también pueden participar en procesos homeostáticos o de mantenimiento celular durante la hematopoyesis, iniciación de respuestas del sistema inmune innato e inmunovigilancia. Diferenciación y función de células Th y angiogénesis. El efecto que tienen en la diferenciación de células T puede ser directo o indirecto a través de la modificación del tráfico de las células presentadoras de antígenos (APC) o de la secreción de citocinas. IL-8 es una quimiocina originalmente descubierta por su función como quimiotáctico de neutrófilos. Aunque también recluta monocitos, linfocitos, basófilos y eosinófilos a los sitios de inflamación, además de ser factor angiogénico en células endoteliales microvasculares de humanos. MAPK y PI3, supervivencia celular, inflamación y proliferación y expresión de moléculas de adhesión (Kany *et al.*, 2019; Turner *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta la gran diversidad de funciones que pueden ejercer las citocinas, un desbalance o aumento excesivo en los niveles de estas proteínas se puede relacionar con distintas patologías. Por ejemplo, la interleucina 1 (IL-1) e IL-6 están involucradas con distintas enfermedades autoinmunes e inflamatorias, como artritis reumatoide, lupus nefritis o esclerosis sistémica y asma.

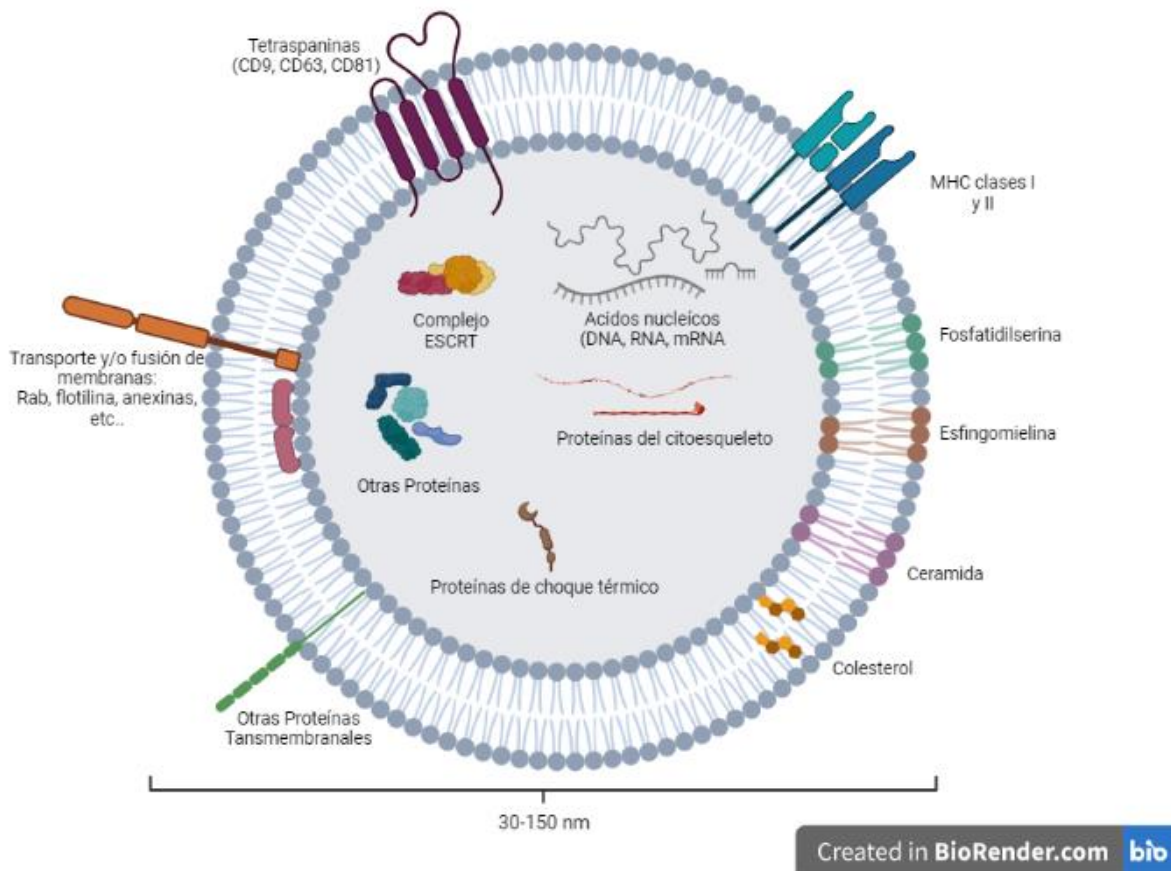
A su vez las citocinas ejercen diversas funciones en el sistema nervioso central. Estas pueden producirse localmente por células del sistema nervioso, pero también pueden ser transportadas desde la periferia. Dentro de las funciones que llevan a cabo, pueden alterar los sistemas de neurotransmisores, como modificar el metabolismo de la serotonina o modular la señalización ejercida por la misma. También pueden afectar la liberación de neurotransmisores, como sucede con el glutamato. Por otra parte, pueden afectar el eje HPA, promoviendo la liberación de glucocorticoides o por el contrario

disminuirlos. También pueden tener efectos perjudiciales o benéficos en la neurogénesis (Himmerich *et al.*, 2019). En ese sentido, no solo regulan la diferenciación neuronal, sino también de astrocitos y oligodendrocitos y el crecimiento y homeostasis de la microglía (Becher *et al.*, 2017). Además pueden modular la integridad de la barrera hematoencefálica (Becher *et al.*, 2017). En procesos inflamatorios, ya sea por una infección, por enfermedades inflamatorias crónicas o neurodegeneración, se puede llevar a cabo una serie de respuestas celulares, incluida la producción elevada de citocinas, ya sea de manera local o por medio de leucocitos invasores del CNS (Becher *et al.*, 2017). En ese contexto las citocinas pueden tener efectos protectores, al limitar la inflamación y promover la remodelación tisular, o perjudiciales. La alteración de citocinas se ha relacionado a desórdenes psiquiátricos. En el suero o plasma de pacientes con depresión se han observado concentraciones altas de IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18 y TNF- $\alpha$ , mientras que la concentración de IFN- $\gamma$  es menor que en pacientes sanos. Pacientes con trastorno bipolar también presentan concentraciones altas de TNF- $\alpha$  e IL-4. TNF- $\alpha$  también está elevado en personas con PTSD o esquizofrenia (Himmerich *et al.*, 2019). Las citocinas también han sido relacionadas con Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (Turner *et al.*, 2014). Algunas citocinas como IL-33 parece prevenir el daño tisular al mismo tiempo que promueve su reparación (Punt *et al.*, 2019).

#### v. Exosomas

La primera descripción de la existencia de los exosomas se realizó en 1983, cuando los investigadores Harding y Johnstone, al estudiar el proceso de endocitosis de transferrina en reticulocitos, describieron un proceso de reciclaje, en el que la transferrina se incorpora a los cuerpos multivesiculares (MVBs) y posteriormente es liberada al espacio extracelular (Harding *et al.*, 1983). Sin embargo, el término “exosoma” comenzó a usarse hasta 1987 para referirse a las vesículas extracelulares de origen endosómico (Johnstone *et al.*, 1987). Más tarde, se confirmó la existencia de exosomas en diferente linajes celulares, como linfocitos B (Raposo *et al.*, 1996), células dendríticas (DCs) (Zitvogel *et al.*, 1998), células epiteliales (van Niel *et al.*, 2001) y células tumorales (Wolfers *et al.*, 2001). Estas vesículas, están presentes y han sido aisladas en una gran variedad de fluidos corporales como la sangre, semen, plasma, saliva, orina, fluido cerebrospinal, fluido epididimal, fluido amniótico, fluido sinovial y leche materna (Gurunathan *et al.*, 2019).

Los exosomas son vesículas extracelulares (EVs), rodeadas por una bicapa lipídica, cuyo diámetro varía entre los 30 y 150 nm (Edgar, 2016; Gurunathan *et al.*, 2019; Théry *et al.*, 2002). Son formados mediante la invaginación de la membrana endosomática, dando lugar a cuerpos multivesiculares. Las vesículas formadas, también llamadas vesículas intraluminales (ILV), son liberadas al medio extracelular por medio de la fusión de los MVBs con la membrana plasmática (Gurunathan *et al.*, 2019). Su origen endosómico les confiere cierta particularidad tanto en la estructura de su envoltura lipídica como en su contenido. Estas EVs están compuestas por lípidos, proteínas, RNA mensajero (mRNA) y micro RNA (miRNA) (Dickens *et al.*, 2017; Gurunathan *et al.*, 2019; Valadi *et al.*, 2007). Contienen proteínas de origen endosómico, como las pertenecientes al complejo de clasificación endosomal necesarios para la maquinaria de transporte (ESCRT, por sus siglas en inglés), Alix y el gen de susceptibilidad tumoral 101 (TSG101); proteínas relacionadas con el tráfico de vesículas como las proteínas RAB y anexinas; tetraspaninas como CD9, CD63 y CD81 (Escola *et al.*, 1998), flotilina y proteínas de choque térmico como HSC70 y la proteína de choque térmico 90 (hsp90). Además de sus constituyentes proteicos los exosomas contienen lípidos provenientes de la membrana plasmática o de los compartimentos endosomáticos como el colesterol, la esfingomiélin, la ceramida y la fosfatidilserina (Escola *et al.*, 1998; Gurunathan *et al.*, 2019; J. Kowal *et al.*, 2014; Llorente *et al.*, 2013; Théry *et al.*, 1999, 2001; Wubbolts *et al.*, 2003; Zitvogel *et al.*, 1998).



**Figura 2. Estructura y composición típica de exosomas.** Los exosomas están formados por una bicapa lipídica enriquecida en lípidos y proteínas transmembranales. En su interior contienen proteínas relacionadas con la biogénesis de los exosomas y otras proteínas provenientes de distintos compartimentos. Además, pueden contener ácidos nucleicos como miRNAs y mRNAs. (Tomada y modificada de Gurunathan *et al.*, 2019; J. Kowal *et al.*, 2014; Maravillas-Montero & Martínez-Cortés, 2017; Saeedi *et al.*, 2019; Théry *et al.*, 2002).

### Biogénesis y secreción de los exosomas

A diferencia de otras EVs, los exosomas se forman en la vía endocítica. Su biogénesis se compone de tres fases, en un principio se forman las vesículas endocíticas por invaginación de la membrana plasmática, seguido de la formación de los MVBs por invaginación de la membrana endosomal y finalmente, los MVBs se fusionan con la membrana plasmática para liberar los exosomas (Gurunathan *et al.*, 2019). Las ILVs se pueden generar a partir de dos mecanismos, uno dependiente de los ESCRT y otro que es independiente de ESCRT (Edgar, 2016). Ambos mecanismos pueden coexistir dentro

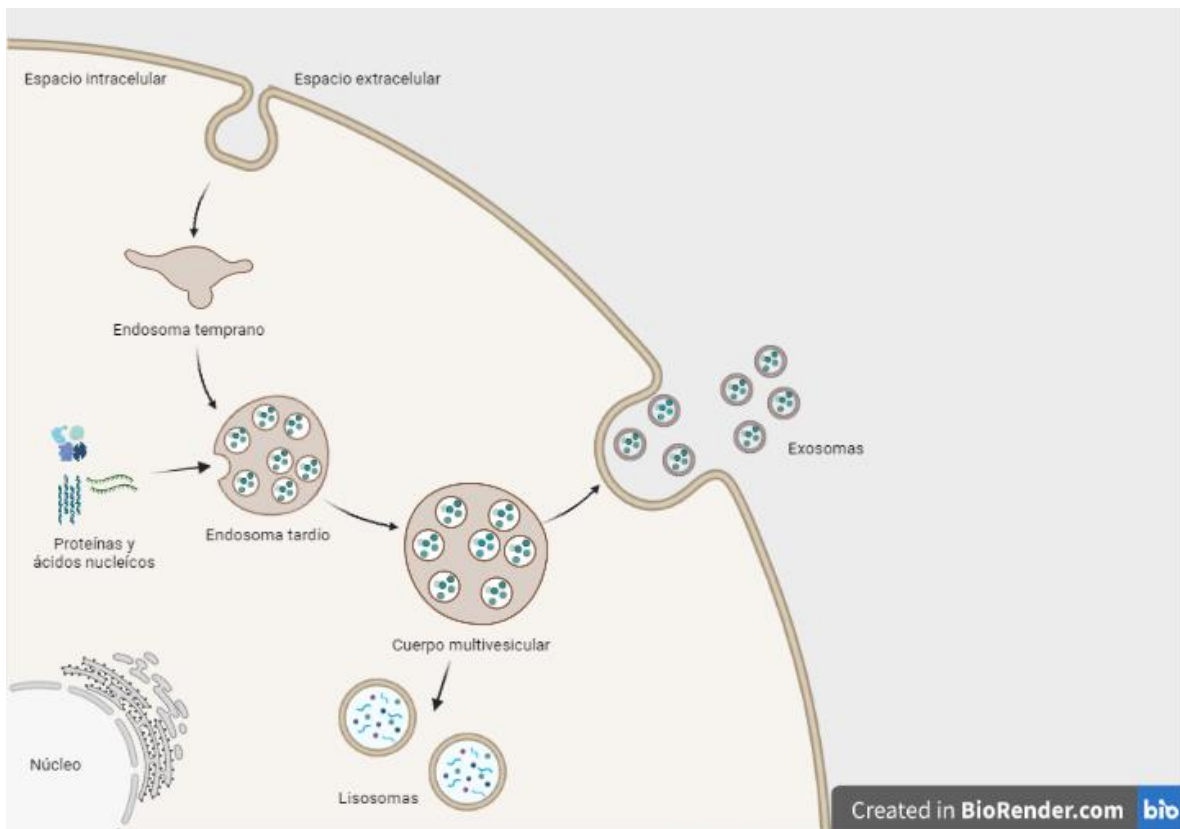
de los mismos MVBs y por lo tanto en las mismas células (Edgar *et al.*, 2014; van Niel *et al.*, 2011).

La maquinaria ESCRT está conformada por cuatro complejos proteicos citosólicos, ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II y ESCRT-III, y por proteínas accesorias, como VPS4, ATPasa y Alix. El complejo es reclutado por proteínas de membrana, generalmente marcadas con ubiquitina en los dominios citosólicos. Estas marcas son reconocidas por ESCRT-0, el cual pasa el cargo con la marca de ubiquitina a ESCRT-I, que reconoce la marca gracias a uno de sus componentes, TSG101. Tanto ESCRT-I como ESCRT-II promueven la invaginación de la membrana, mientras que ESCRT-III permite la escisión vesicular. Las proteínas accesorias ayudan a la disociación y el reciclaje de los complejos ESCRT (Edgar, 2016; Gurunathan *et al.*, 2019; J. Kowal *et al.*, 2014). Componentes de la maquinaria como, Hrs, la molécula adaptadora de transducción de señales 1 (STAM1) y TSG101 o ALIX, son necesarios para la producción de exosomas en distintos tipos de células, como MCF-7, HeLa, RPE1 y células dendríticas (Abrami *et al.*, 2013; Baietti *et al.*, 2012; Colombo *et al.*, 2013; Tamai *et al.*, 2010; Théry *et al.*, 2001).

Por otra parte, la biogénesis de los exosomas no siempre es dependiente de la maquinaria ESCRT (Stuffers *et al.*, 2009), existen otros mecanismos donde se ven involucrados lípidos, tetraspaninas o proteínas de choque térmico (Gurunathan *et al.*, 2019; J. Kowal *et al.*, 2014). Por ejemplo, en células oligodendrogliales de ratón, la ceramida promueve la invaginación para la formación de ILVs cargadas de proteína proteolípídica, posteriormente liberadas como exosomas (Trajkovic, 2008). La fosfolipasa D2 promueve la invaginación de ILVs en células MCF-7 (Ghossoub *et al.*, 2014). Mientras que en células precursoras oligodendrogliales la liberación de colesterol dentro de exosomas es dependiente de flotilina-2 (Strauss *et al.*, 2010). De igual forma, distintas tetraspaninas se han relacionado con la selección de cargos de exosomas, entre las cuales se encuentran CD63, la tetraspanina 8 (TSPAN8) y CD81 (Edgar, 2016; J. Kowal *et al.*, 2014; Nazarenko *et al.*, 2010; Perez-Hernandez *et al.*, 2013; van Niel *et al.*, 2011). CD63 también juega un papel en la formación de ILVs, no solo en la selección del cargamento de exosomas en células HeLa (Edgar *et al.*, 2014). Mientras que la activación de receptores S1P asociados a Gi crea una señal necesaria para la selección del cargamento (Kajimoto *et al.*, 2013). La chaperona HSC70 también parece favorecer el reclutamiento de transferina a los exosomas (Kowal *et al.*, 2014). Otras proteínas como la

lactadheria, los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas, anexinas, y GTPasas también podrían estar involucradas (Gurunathan *et al.*, 2019).

Una vez que se formaron las ILVs, los exosomas son secretados de las células al fusionarse los compartimentos endocíticos tardíos con la membrana plasmática. El proceso de secreción comienza con el anclaje de los MVB a la membrana plasmática. Distintas proteínas de la familia Rab son necesarias para que se lleve a cabo la secreción de exosomas. Estas proteínas, están involucradas en distintos procesos relacionados con el tráfico vesicular (Kowal *et al.*, 2014). La liberación de ciertos exosomas depende de Rab 27 mientras que para otros su participación no es necesaria (Bobrie *et al.*, 2012). En células Hela distintas proteínas Rab son necesarias para la secreción de exosomas y se demostró que Rab27a y Rab27b son necesarias para su transporte y anclaje a la membrana plasmática (Ostrowski *et al.*, 2010). En el caso de exosomas cargados con la toxina ántrax, dentro de células epiteliales, este proceso es dependiente de Rab11 y Rab35 (Abrami *et al.*, 2013). Rab 35 también es necesaria para la secreción de proteína proteolípida dentro de exosomas en células oligodendrogliales (Hsu *et al.*, 2010). Mientras que Rab7 está involucrado en la secreción de Alix dentro de exosomas en células MCF-7 (Baietti *et al.*, 2012). Al finalizar el anclaje, ambas membranas se fusionan. En la mayoría de los casos la fusión es mediada por los receptores de fijación de proteínas soluble de NSF (SNARE) y factores solubles, como las proteínas asociadas a sinaptosoma (SNAP) y el Factor sensible a la N-etilmaleimida (NSF). Los SNARE se sitúan en cada una de las membranas y dictan la especificidad del evento de fusión (Kowal *et al.*, 2014; Théry *et al.*, 2002). Se ha demostrado que una proteína R-SNARE, Ykt6, es necesaria para la secreción de proteínas Wnt dentro de exosomas en células HEK293 (Gross *et al.*, 2012).



**Figura 3. Biogénesis de los exosomas.** El proceso de biogénesis de los exosomas inicia con la invaginación de la membrana plasmática, que se unen a los endosomas tempranos. Posteriormente se lleva a cabo una reestructuración, donde moléculas citoplasmáticas son interiorizadas por los endosomas tardíos dando lugar a los cuerpos multivesiculares. Esos MVB pueden transportarse y fusionarse con la membrana plasmática para liberar las ILVs como exosomas o, pueden seguir la vía lisosomal, donde su contenido es degradado (Tomada y modificada de Gurunathan *et al.*, 2019).

El proceso de endocitosis de los exosomas se puede llevar a cabo de distintas formas. En el caso de exosomas liberados por células PC12 se produce una endocitosis dependiente de clatrina, al igual que macropinocitosis (Tian *et al.*, 2014), mientras que la endocitosis de exosomas provenientes de células de glioblastoma es mediada por balsas lipídicas (Svensson *et al.*, 2013). Otros exosomas pueden ser fagocitados por la célula aceptora, como es el caso de exosomas derivados de células K562, aunque células que no son capaces de realizar la fagocitosis pueden engullirlos en menor cantidad por macropinocitosis (Feng *et al.*, 2010). De igual forma, se ha documentado la internalización del contenido de exosomas por medio de la fusión o hemifusión de estos últimos con la membrana de DC y de células de melanoma (Montecalvo *et al.*, 2012; Parolini *et al.*,

2009). En células dendríticas foliculares exosomas, con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de la clase II (MHC-II), se mantienen adheridos a la superficie, por lo que es posible que ciertos exosomas no tengan que ser engullidos en la célula blanco para ejercer una función (Denzer *et al.*, 2000).

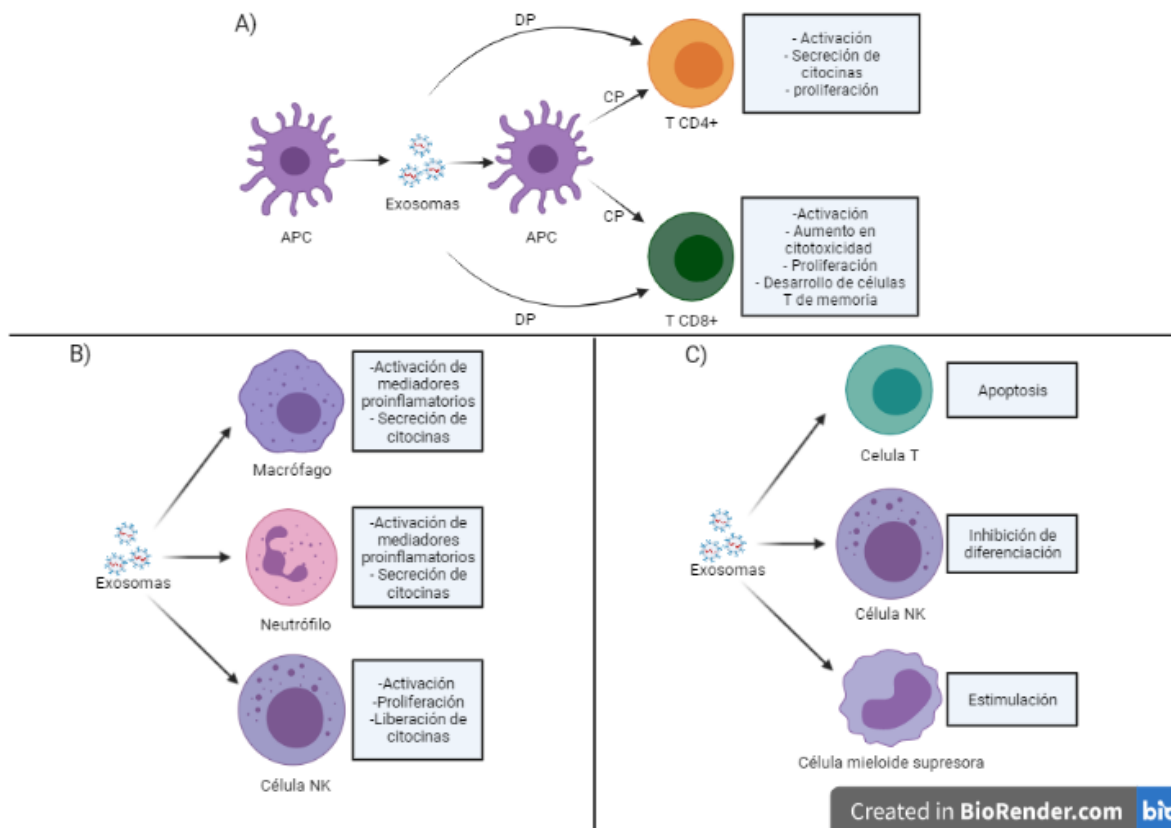
#### Función e importancia biológica de los exosomas

Las funciones de los exosomas dependen de su interacción con las células blanco y de su capacidad para presentar distintas proteínas, ácidos nucleicos y lípidos a dichas células. Los componentes de los exosomas tienen funciones celulares y en algunos casos son importantes para estados patológicos (Gurunathan *et al.*, 2019; Théry *et al.*, 2002). La función, biología y heterogeneidad de los exosomas depende de la célula de origen y el estado de la misma o del tejido al momento de la generación de las EVs (Gurunathan *et al.*, 2019). Gran parte de los estudios sobre exosomas resaltan su importancia en el sistema inmune (ver Figura 4). La abundancia de moléculas del complejo de histocompatibilidad de la clase I (MHC-I) y MHC-II en exosomas provenientes de distintas células apunta hacia una función de estas vesículas en la presentación de antígenos para modular la respuesta de células T. Los exosomas pueden llevar a cabo esta función, ya sea de manera directa (Utsugi-Kobukai *et al.*, 2003) o indirecta por *cross dressing* (Raposo *et al.*, 1996; Skokos *et al.*, 2001; Wolfers *et al.*, 2001). Los exosomas con moléculas MHC II incluso pueden adherirse a la membrana de Células Dendríticas Foliculares, estas células usan las moléculas para la presentación de antígenos y de esa forma atraer a células T (Denzer *et al.*, 2000).

En este sentido, distintos estudios han demostrado la participación de estas EVs en procesos inflamatorios y en la estimulación inmune. Por ejemplo, exosomas liberados por macrófagos de ratones infectados con distintos patógenos contienen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), los cuales, a su vez activan otros macrófagos y neutrófilos, promoviendo la liberación de citocinas como TNF- $\alpha$  (Bhatnagar *et al.*, 2007). A su vez, exosomas liberados por DCs activan células NK por medio de TNF unido a la membrana de estos exosomas (Munich *et al.*, 2012). Exosomas de pacientes con sarcoidosis poseen también la capacidad de estimular la liberación de citocinas en células epiteliales y células mononucleares (Qazi *et al.*, 2010). Exosomas derivados de DCs promueven una respuesta inmune antitumoral por medio de la activación de células T (André *et al.*, 2004; Zitvogel *et al.*, 1998). Otros, por su parte, tienen efectos inmunosupresivos, como en el caso de vesículas similares a exosomas que contienen al



ligando Fas (FasL) o APO2L/TRAIL, permitiéndoles inducir la apoptosis de células T (Monleón *et al.*, 2001). El mismo efecto se observó en exosomas provenientes de células de carcinoma nasofaríngeo, los cuales contienen galectina-9, promotor de la apoptosis de células Th1 (Klibi *et al.*, 2009). Por otra parte, exosomas provenientes de tumores pueden bloquear la diferenciación de DCs relacionado con la inducción de IL-6 (Yu *et al.*, 2007). También se ha observado la inmunosupresión antígeno específica mediada por exosomas de plasma cargados con FasL y MHC-II, provenientes de ratones inmunizados con ovoalbúmina (OVA). Estas vesículas pueden suprimir la respuesta de hipersensibilidad retardada específica para OVA (Kim *et al.*, 2007). Este mismo efecto lo pueden llevar a cabo exosomas provenientes de células de melanoma que expresan OVA. Lo cual se relaciona con una disminución en los niveles de INF- $\gamma$  y el aumento de IL-4 y del TGF- $\beta$ 1 (Yang *et al.*, 2011).

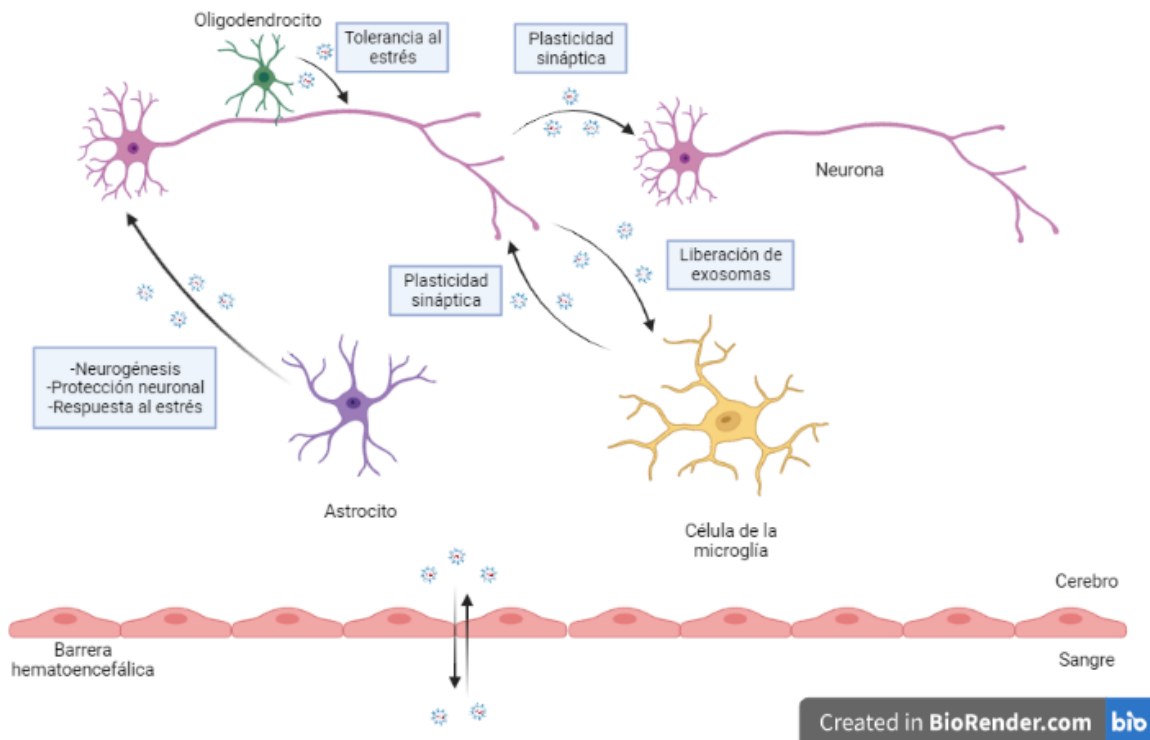


**Figura 4. Modulación de la respuesta inmune por exosomas.** Los exosomas A) presentación de antígenos mediada por exosomas. B) Funciones de los exosomas en la estimulación del sistema inmune. C) Funciones de los exosomas en la inhibición del sistema inmune. (Tomado y modificado de Greening *et al.*, 2015 y Maravillas-Montero & Martínez-Cortés, 2017).

En el CNS los exosomas también ejercen funciones relacionadas con la comunicación celular (Saeedi *et al.*, 2019). Existen evidencias de comunicación entre neuronas interconectadas a través de exosomas, e incluso se puede producir una re-secreción de estos exosomas, generándose un mecanismo de diseminación a mayor distancia (Polanco *et al.*, 2018). Por su parte, células de la glía también liberan exosomas, fomentando la comunicación glia-neuronal (Frühbeis *et al.*, 2012). Estas vesículas participan en procesos como la plasticidad, la neurogénesis y la neuroinflamación (Saeedi *et al.*, 2019). Por ejemplo, exosomas liberados por neuronas modifican la expresión de genes relacionados con la actividad fagocítica de células de la microglía. De esta forma, se produce un aumento en la eliminación de neuritas en degeneración (Bahrini *et al.*, 2015). Por otra parte, exosomas obtenidos del cultivo de células madre neurales promueven la diferenciación de las mismas por medio del miR-9 y de su interacción con el gen Hes1 (Yuan *et al.*, 2021). La exposición de células endoteliales de cerebro a TNF- $\alpha$  produce un cambio en el contenido proteico de los exosomas que liberan. Los autores de ese artículo encuentran que las proteínas reguladas positivamente están relacionadas con la señalización de TNF y la respuesta inmune (Dozio & Sanchez, 2017).

Aunado a esto, los exosomas pueden atravesar la barrera hematoencefálica. Esto se demostró al inyectar ratones con exosomas, los cuales exitosamente entregaron RNAs de interferencia (siRNA) a neuronas, microglía, astrocitos y sus precursores, en distintas regiones del cerebro (Alvarez-Erviti *et al.*, 2011). Mientras que exosomas provenientes del cerebro también fueron identificados en la sangre o suero de ratas expuestas a estrés (Gómez-Molina *et al.*, 2019). Esto permite que los exosomas funcionen en la comunicación entre el CNS y la periferia. En ese sentido, exosomas obtenidos de suero de ratones tratados con lipopolisacárido (LPS) promueven una inflamación tanto sistémica como del sistema nervioso central (Li *et al.*, 2018). Asimismo, en un modelo de lesión cerebral inducida por IL-1 $\beta$ , exosomas liberados por astrocitos promueven la liberación de citocinas en la periferia y así, el transporte de leucocitos al cerebro (Dickens *et al.*, 2017). Por otra parte, se ha demostrado que el AE promueve la liberación de exosomas que ejercen funciones en el CNS. Por ejemplo, exosomas provenientes de suero, promueven la mielinización por medio de la transmisión de miR-219 (Pusic & Kraig, 2014). Posteriormente este y otros miRNAs provenientes de células del sistema inmune demostraron promover la mielinización y reducir la inflamación en ratas expuestas a un AE (Pusic *et al.*, 2016). Células troncales/estromales de la médula ósea provenientes de

un modelo de diabetes expuesto a un AE, liberan miR-146-a dentro de exosomas, es posible que la liberación de estos exosomas se relacione con los efectos positivos del AE, tanto cognitivos como neuroprotectores en condiciones de hiperglicemia (Kubota *et al.*, 2018). El mismo miRNA aumenta *in vitro* en exosomas, provenientes de células del plexo coroideo, obtenidas de un modelo de Alzheimer expuesto a un AE, en dónde, *in vivo*, se observa un aumento en la densidad sináptica y una disminución de la inflamación en astrocitos (Nakano *et al.*, 2020). Por último, los exosomas también realizan otras funciones en estados patológicos. Proteínas como la  $\beta$ -amiloide (Rajendran *et al.*, 2006) y la  $\alpha$ -sinucleína (Emmanouilidou *et al.*, 2010), relacionadas con la enfermedad de Alzheimer y de Parkinson, respectivamente, pueden ser liberadas dentro de exosomas.



**Figura 5. Exosomas en el cerebro.** Los exosomas pueden ser liberados por distintas células en el cerebro. Una vez liberados realizan múltiples funciones fisiológicas y patológicas. Tomado y modificado de Saeedi *et al.*, 2019.

La amplia gama de funciones que poseen los exosomas, aunado a las características de su bicapa lipídica y la capacidad que tienen para atravesar la barrera hematoencefálica, los ha posicionado como una prominente herramienta terapéutica para tratar distintas

enfermedades. Por ejemplo, se ha incorporado algunos fármacos, como paclitaxel, en exosomas como tratamiento en procesos oncológicos, los cuales inhibieron el crecimiento de metástasis pulmonares en ratones incluso con la presencia de la glucoproteína-P, la cual confiere resistencia a las células cancerígenas (Kim *et al.*, 2016). Exosomas derivados de células troncales han demostrado tener beneficios en distintos modelos de patologías como en isquemia/reperfusión miocárdica (Lai *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2017), hipertensión pulmonar (Lee *et al.*, 2012) y lesión renal (Zhou *et al.*, 2013). La administración oral de exosomas extraídos de leche bovina probó ser efectiva para el retraso de artritis reumatoide en modelos animales (Arntz *et al.*, 2015). Además, se han comenzado a emplear como biomarcadores para enfermedades como cáncer, enfermedad hepática, enfermedad renal, entre otras (Gurunathan *et al.*, 2019).

#### vi. Caracterización de los exosomas

La composición molecular de las EVs, tanto interna como membranal, refleja sus funciones y también permite que sean reconocidas o transferidas a distintas células. Dada la importancia de lo exosomas en la comunicación celular y en estados tanto patológicos como fisiológicas, es importante tener protocolos que permitan su caracterización morfológica, molecular, y de sus propiedades bioquímicas y biofísicas (Szatanek *et al.*, 2017).

La caracterización de los exosomas se puede llevar a cabo por medio de principios físicos o bioquímicos. Los análisis físicos permiten que se determinen características como el tamaño, la distribución, la concentración y la morfología ultraestructural. Mientras que los análisis bioquímicos dan información sobre el contenido y la composición de los exosomas (Rastogi *et al.*, 2021).

#### Análisis físicos

La dispersión dinámica de luz (DLS), también llamada espectroscopía de correlación de fotones es una técnica que permite la medición del tamaño de los exosomas. Se hace pasar un haz de láser monocromático coherente por una suspensión de partículas para medir las fluctuaciones en la intensidad de dispersión como consecuencia de los movimientos Brownianos de las partículas y la interferencia que estos causan. La realización de esta técnica es relativamente sencilla, aunado a esto, es posible medir partículas que miden entre 1 nm y 6 µm. Sin embargo, es útil únicamente cuando la

suspensión contiene un tipo de partículas, a lo que se llama suspensión monodispersada. La DLS no permite obtener datos bioquímicos o sobre el origen celular de las EV (Gurunathan *et al.*, 2019; Szatanek *et al.*, 2017).

El análisis de seguimiento de nanopartículas es una técnica que usa tanto la dispersión lumínica como el movimiento Browniano para obtener la distribución de tamaño, concentración de partículas y en algunos casos, el fenotipo. A través de un análisis del movimiento de las partículas, se determina la velocidad del movimiento y se correlaciona con el tamaño de cada partícula mediante el cálculo de su diámetro hidrodinámico (Coumans *et al.*, 2017; Gurunathan *et al.*, 2019; Szatanek *et al.*, 2017). Esta técnica tiene distintas ventajas, permite un análisis individual de los exosomas (Coumans *et al.*, 2017; Gurunathan *et al.*, 2019) y con una capacidad de medir partículas de hasta 30 nm. Además, tanto la preparación de la muestra como la realización de la medición toman poco tiempo y es sencillo llevarlo a cabo. Es posible recuperar en su forma nativa los exosomas, una vez realizado el procedimiento (Gurunathan *et al.*, 2019; Szatanek *et al.*, 2017). También se pueden aplicar anticuerpos marcados con fluorescencia para detectar la presencia de antígenos, aunque la detección es limitada (Coumans *et al.*, 2017; Gurunathan *et al.*, 2019; Szatanek *et al.*, 2017). Por su parte, las desventajas de la técnica son que se debe prestar mucha atención tanto a la dilución de la muestra como a la presencia de materia particulada en los buffers de suspensión. Mientras que la presencia de materia particulada podría interferir con el conteo de exosomas (Coumans *et al.*, 2017; Szatanek *et al.*, 2017).

La citometría de flujo es una de las técnicas más utilizadas actualmente para el análisis de EV (Gurunathan *et al.*, 2019; Ramirez *et al.*, 2018; Szatanek *et al.*, 2017), debido a su capacidad para determinar los orígenes celulares de cada una (Gurunathan *et al.*, 2019; Szatanek *et al.*, 2017). Al dirigir un haz de láser, de longitud de onda conocida, a un fluido en movimiento que contiene las partículas, se determina el tamaño de las EV. Se pueden también usar marcadores fluorescentes para caracterizar las proteínas de la superficie y la estructura de los exosomas (Gurunathan *et al.*, 2019; Szatanek *et al.*, 2017). Esta técnica hace posible el análisis simultáneo de miles de EVs y de múltiples marcadores (Szatanek *et al.*, 2017). El principal problema es que los citómetros de flujo tienen la capacidad de medir partículas únicamente mayores a 300nm, lo cual excluye a los exosomas. Es por eso que se han desarrollado nuevas generaciones de citómetros de

flujo, los cuales usan múltiples ángulos de difusión frontal, teniendo así una mayor resolución y permitiendo el análisis de exosomas (Gurunathan *et al.*, 2019).

Una técnica ampliamente utilizada para caracterizar la morfología, estructura y tamaño de los exosomas es la Microscopía electrónica de transmisión (TEM). En esta técnica se crea una imagen por interferencia electrónica al momento que pasa un haz de electrones por la muestra. Un conflicto con esta técnica es que tanto los diversos pasos que implica la preparación de la muestra como el rayo de electrones podrían dañar las muestras o cambiar su morfología (Gurunathan *et al.*, 2019; Szatanek *et al.*, 2017). Para sobrellevar este problema se ha implementado la Crio-microscopía electrónica, para esta técnica no es necesario deshidratar y fijar las muestras ya que se usa nitrógeno líquido para mantenerlas intactas. Aunado a esta las bajas temperaturas protegen las EVs de los rayos de electrones (Gurunathan *et al.*, 2019).

La microscopia de fuerza atómica es una técnica que detecta y registra las interacciones entre una sonda y la superficie de la muestra. Cuando la sonda se acerca a la muestra, las interacciones de las fuerzas la alejan lo cual se registra en el sistema de detección, compuesto por un láser y un fotodiodo (Szatanek *et al.*, 2017). Una característica importante de esta técnica es que permite determinar la morfología, la abundancia y la conformación biomecánica y biomolecular de la muestra en condiciones nativas, con una preparación mínima. Además, permite realizar análisis con una precisión nanométrica y hacer análisis de muestras heterogéneas.

Más recientemente, se comenzó a emplear la técnica de detección de pulso resistivo (RPS). La base de dicha técnica es el principio de Coulter, a partir del cual se determina el diámetro y distribución de las partículas a analizar en un rango de 50 nm hasta el tamaño celular. Resulta muy útil para investigar la función celular y la captación de EV. La desventaja del RPS es que las medidas son susceptibles a problemas de estabilidad del sistema, como bloqueos del poro por partículas o problemas de sensibilidad. Aunque se ha demostrado que esto se puede mejorar con la optimización de los parámetros del sistema (Gurunathan *et al.*, 2019).

### Análisis bioquímicos

Las técnicas más usadas para determinar la presencia de ciertas proteínas en EVs son el Western Blot (WB) y la enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA). Ambos métodos se basan en reacciones antígeno-anticuerpo. Para el WB se tienen que aislar las proteínas

para después poder separarlas por electroforesis en gel de dodecil sulfato-poliacrilamida. El Western Blot es empleado a menudo para confirmar la presencia de marcadores como Alix, Tsg101 o CD63, y así de exosomas, en la muestra. Aunque, también puede proveer información sobre el tamaño, expresión y abundancia de distintas proteínas. El problema es que es una técnica que consume mucho tiempo (Kowal *et al.*, 2017; Rastogi *et al.*, 2021). Mientras que para la ELISA los anticuerpos son inmovilizados en un soporte sólido. De esta forma, los anticuerpos capturan las proteínas a analizar. A pesar que la técnica de ELISA consume menos tiempo que el WB, ambas técnicas tienen desventajas como su baja especificidad y calidad y el alto costo de los anticuerpos (Logozzi *et al.*, 2020; Rastogi *et al.*, 2021). Por otra parte, distintas técnicas de proteómica también son empleadas. La espectrometría de masas (MS) es la principal tecnología de proteómica usada con EV, permite la cuantificación e identificación de proteínas. Para realizar esta técnica es necesario extraer las proteínas de la muestra biológica y digerirlas a péptidos. Posteriormente se separan por electroforesis gel o cromatografía líquida y se analizan por espectrometría de masas. Los iones peptídicos son fragmentados en la fase gaseosa y así se pueden deducir su secuencia y sus modificaciones post-translacionales (Ramirez *et al.*, 2018). El problema con la MS es que sólo puede detectar péptidos ionizados, pero no todos lo están con la misma eficacia. Además, no es fácil detectar proteínas de bajo peso molecular, puesto que proveen pocos péptidos, ni aquellas que están presentes en baja abundancia. Teniendo esto en cuenta proteínas como las citocinas no pueden ser detectadas sin prefraccionamiento o enriquecimiento. Entonces la MS es una técnica con alta especificidad, pero baja sensibilidad (Skalnikova *et al.*, 2017). A diferencia de la MS los microarreglos proteicos son inmunoensayos de multiplexión que permiten la cuantificación de múltiples analitos, hasta cientos, en un solo análisis. Esto permite, por una parte, tener una visión más amplia de respuestas complejas en las que se ven involucradas redes de proteínas. Por otra parte, la determinación simultánea de analitos permite el ahorro de tiempo y costos y requerimientos de muestra (Brambilla *et al.*, 2019; Skalnikova *et al.*, 2017). En los microarreglos, se inmovilizan moléculas de captación en un soporte sólido, el cuál puede ser de distintos materiales, incluidos, portaobjetos para microscopio o nitrocelulosa. Al incubar la muestra con los microarreglos se produce la captación de las proteínas y éstas pueden ser detectadas por métodos sin marca o con marca como por anticuerpos de detección. Algunos estudios han utilizado esta técnica para detectar citocinas y factores de crecimiento en EVs (Aharon *et al.*, 2020).

La técnica más usada para el análisis de ácidos nucleicos, especialmente miRNAs y mRNAs, en EVs es la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR). La base de la qRT-PCR es la amplificación selectiva de ácidos nucleicos por la reacción en cadena de polimerasa y se detecta en tiempo real por medio de sondas fluorescentes. Esta técnica es útil para estudiar y caracterizar el transcriptoma de una muestra y permite una que se realice cuantificación absoluta y relativa. Tiene muchas ventajas como una alta sensibilidad, resolución, análisis de alto rendimiento, además, se pueden evaluar cientos de ácidos nucleicos (Ramirez *et al.*, 2018). A pesar de eso, no se puede medir la cantidad total de ácido ribonucleico (RNA) y sólo se pueden medir secuencias específicas (Rastogi *et al.*, 2021). Otras técnicas también se han empleado, como los microarreglos o la *next generation sequencing* (Ramirez *et al.*, 2018).



## II. Justificación

El AE ha demostrado ser beneficioso en el sistema nervioso, así como en la periferia. A nivel fisiológico, posee un efecto inmunomodulador, confiere resiliencia al sistema inmune mientras que aumenta su eficiencia. De esta forma, el AE promueve un estado antiinflamatorio. A su vez, promueve cambios plásticos en el cerebro que van desde parámetros bioquímicos, celulares y de comportamiento. Se ha propuesto una comunicación bidireccional CNS-periferia, en donde participan distintos factores solubles y vesículas extracelulares, como lo son los exosomas. Estas vesículas participan en la comunicación celular y tienen un impacto funcional en procesos fisiológicos. Justamente, se ha demostrado que la exposición a un AE afecta el contenido de miRNAs en los exosomas obtenidos de células madre de la médula ósea, de células mononucleares de sangre periférica, de bazo, de plexo coroideo y de suero. En ellos encuentran que estas EVs contienen miRNAs que promueven la diferenciación de oligodendrocitos, la mielinización (Pusic & Kraig, 2014; Pusic *et al.*, 2016) y la tolerancia al estrés oxidativo (Pusic *et al.*, 2016). Al igual que miRNAs que contrarrestan los efectos cognitivos e inflamatorios en modelos animales de Alzheimer y de hiperglicemia (Kubota *et al.*, 2018; Nakano *et al.*, 2020). Estos cuatro estudios son los únicos que evalúan el efecto del AE en el contenido de exosomas, centrándose en los miRNAs. Sin embargo, hasta el momento, no se ha analizado si se produce una variación en el contenido de proteínas de los exosomas en ratones expuestos a un paradigma de AE. Por lo que, en el presente trabajo se pretendió discernir las diferencias entre el contenido de citocinas en exosomas del suero sanguíneo de ratones Balb/C sometidos a un AE y el de ratones de la misma cepa mantenidos en un alojamiento estándar.

### **III. Hipótesis**

Los exosomas presentes en el suero de ratones expuestos a un AE contendrán un nivel más elevado de citocinas antiinflamatorias y más bajo de citocinas proinflamatorias, en comparación con los ratones en el alojamiento estándar.

### **IV. Objetivo general**

Determinar las diferencias en el contenido de citocinas de exosomas presentes en el suero sanguíneo de ratones, de la cepa Balb/C, expuestos a ambiente enriquecido y ratones en un alojamiento estándar.

### **V. Objetivos particulares**

- a. Aislar y caracterizar los exosomas presentes en el suero sanguíneo de ratones expuestos a un AE y ratones en un alojamiento estándar.
- b. Determinar el contenido total de proteína en los exosomas presentes en el suero de los ratones.
- c. Analizar las citocinas contenidas en dichos exosomas por medio de una matriz de microarreglos.

## VI. Metodología

### i. Animales y grupos experimentales

Para el manejo y uso de animales, se aplicaron los lineamientos establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, aprobados por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INPRFM).

Se emplearon 30 ratones hembra de la cepa Balb/c, de aproximadamente 8 semanas de edad, es decir, adultos jóvenes, y con un peso fluctuante entre los 22 g. Aleatoriamente, se dividieron los ratones en dos grupos experimentales, el grupo control (CTRL) y el grupo correspondiente al ambiente enriquecido (ENR), cada uno con una n de 15 ratones. El CTRL se alojó en cajas de policarbonato estándar de laboratorio (43.5x30.5x20 cm), con una cama de aserrín y tiras de papel. Por su parte, el ENR se alojó en cajas con las características recién descritas y, adicionalmente, se colocaron distintos túneles y estructuras fabricadas con legos. Después de siete días, se modificó la ubicación de los objetos dentro de las jaulas del ENR para agregar novedad al ambiente. El proceso experimental duró 14 días, tiempo que previamente ha demostrado ser suficiente para observar cambios producidos por el AE (Brod *et al.*, 2017; Buschler & Manahan-Vaughan, 2012). En todo momento del alojamiento, se les ofreció comida y agua *ad libitum*. Los ratones estuvieron en el bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, con condiciones de temperatura controlada y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas.

### ii. Obtención del suero sanguíneo

Al finalizar los 14 días los ratones fueron sacrificados por decapitación. Se extrajo la sangre colocándola en un tubo Eppendorf™. Para la obtención del suero, se dejó coagular la sangre por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó la sangre a 6000 x g durante 30 minutos a 24°C. Al concluir, se extrajo la fase acuosa, es decir el suero sanguíneo, con una micropipeta y se colocó en un tubo Eppendorf™ nuevo.

### iii. Aislamiento de exosomas.

Para realizar el aislamiento de los exosomas, se colocaron las muestras en un baño de hielo para la recuperación de su estado líquido. Del volumen de suero obtenido de cada sujeto, se tomaron 100 µl y se colocaron en un tubo Eppendorf™. En todo momento del procedimiento, las muestras que no estaban siendo manipuladas, se mantuvieron en baño

de hielo. Para el procedimiento se empleó el reactivo Total Exosome Isolation (for serum) by Life Technologies™ (ThermoFisher Scientific™).

Siguiendo las instrucciones del proveedor, se centrifugó el suero a 2000 x g por 30 minutos a 8°C, en el equipo Smart R17 (Hanil Science Industrial™) y se extrajo el sobrenadante, colocándolo en otro tubo Eppendorf™. Esto con el fin de eliminar cualquier desecho o células restantes. En seguida, se agregaron 20µl del reactivo, se mezcló en el Vortex Mixer™ (Labnet International Inc.) por 1 minuto, para homogeneizar la solución, y se dejó incubando por 30 minutos en hielo. Una vez transcurrido el tiempo, se colocaron de nuevo los tubos en la centrifuga Smart R17 (Hanil Science Industrial™), la cual se ajustó a 10 000 x g por 10 minutos y 8°C. Al finalizar la segunda centrifugación, se separó el sobrenadante con una micropipeta para colocarlo en tubos distintos. Los sobrenadantes se conservaron para futuras determinaciones, mientras que, a los tubos con los pellets de exosomas se le agregó 50 µl de RIPA, por muestra, para proceder con la lisis de las vesículas. Para lisar las membranas vesiculares se empleó un sonicador VibraCell™ SONICS por tres lapsos de 10 segundos. Conforme una muestra era manipulada el resto se mantuvo dentro de un vaso de precipitado con hielo, para conservar los exosomas en buen estado.

#### iv. Determinación de proteína

Posteriormente se realizó la determinación del contenido de proteína total en los exosomas de cada individuo por medio de la técnica de Bradford a microescala.

En un primer tiempo se prepararon las soluciones necesarias para la técnica, es decir, la solución de Albúmina Sérica Bovina (BSA) y el Reactivo de Bradford. En un tubo Eppendorf™ de 2 ml se pesó 1 mg de BSA (Sigma Aldrich™) y se agregó el correspondiente volumen de agua desionizada para obtener una concentración de 1 mg/ml. La solución se disolvió en el Vortex Mixer™ (Labnet International Inc.). Por su parte, se diluyó la solución stock del reactivo de Bradford (BioRad) en agua MiliQ, y así se obtuvo la solución a una concentración 1:5.

Posteriormente en una placa de 96 pozos se construyó la curva de estandarización de proteína por triplicado, con las concentraciones de BSA siguientes: 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625 y 0.078125 µg/µl. En cada pozo de las tres columnas se colocaron 100 µl de agua MiliQ a excepción de los últimos pozos, dónde se colocaron 180 µl de agua MiliQ y 20 µl de BSA. Tomando 100 µl de cada uno de los tres pozos finales (pozos “stock”) se

depositaron y mezclaron en el pozo correspondiente de la fila superior con la micropipeta. Siguiendo la misma lógica, para cada pozo se tomó el mismo volumen del pozo de la fila inferior, para realizar las diluciones seriadas. Cuatro pozos se destinaron al Blanco de reactivo de Bradford, en dichos pozos se colocaron 100 µl de agua MiliQ. En el resto de los pozos de la placa, se colocaron 99 µl de agua MiliQ y 1 µl de cada una de las muestras. Una vez realizado todo lo anterior se adicionaron 100 µl del Reactivo de Bradford a cada pozo. Transcurridos cinco minutos, se procedió a realizar la lectura a  $\lambda=600$  nm, con el lector de microplacas GloMax Discover™ PROMEGA®.

Las absorbancias obtenidas con el lector de microplacas y las concentraciones conocidas de BSA se usaron para construir la gráfica de calibración estándar. Con los programas EXCEL (Microsoft Inc.™) y SigmaPlot® se obtuvo el coeficiente de correlación lineal ( $r^2$ ), el cual debe ser mayor o igual a 0.95. También se obtuvo la ecuación de la recta, a partir de la cual se despejó x, permitiendo la determinación de la concentración de proteína en las muestras de exosomas aislados.

#### v. Fabricación de geles de acrilamida para técnica de Western Blot (WB)

La determinación de las proteínas CD9, CD63 y Alix, marcadores característicos de los exosomas (Gao et al., 2019; Théry et al., 2006), se realizó por medio de la técnica de WB. En un inicio, se fabricaron los geles discontinuos al 4%-12%, siguiendo las indicaciones del fabricante (Mini-PROTEAN Tetra Cell, BIO RAD). Las metodologías fueron estandarizadas previamente en el laboratorio.

Para la fabricación de los geles se prepararon previamente las soluciones a emplear, es decir, gel buffer y Acrilamida. Para cada porción del gel, *stacking* o *resolving*, se prepararon dos soluciones: TRIS 0.5M con un pH de 6.8 y TRIS 1.5M con un pH de 8.8, respectivamente. Por su parte, las soluciones de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10% y de persulfato amónico (APS, por sus siglas en inglés) al 10% se prepararon al momento. Todas las soluciones se integraron en un matraz Kitasato con los volúmenes determinados para obtener ya sea la solución *stacking* o *resolving*. Se cerró el matraz con un tapón de hule y se sometió a vacío entre 10 y 15 minutos. El vacío permite la desgasificación de las soluciones a polimerizar.

Por otra parte, se mezclaron la solución APS y el reactivo tetrametiletilendiamina (TEMED), y se agregaron, en un primer tiempo, al resto de los compuestos de la solución *resolving*, al terminar el tiempo de vacío. El conjunto se colocó cuidadosamente en el

sistema espaciador del gel, cuidando que no se formaran burbujas por el contacto con el aire y asegurando una distribución homogénea. El límite se marcó previamente con el peine de los pozos. Encima de la solución se colocó entre 1 y 2mL de alcohol isopropílico, para generar un límite liso en el gel. Todo el sistema se mantuvo inmóvil de 20 a 30 minutos, hasta que el gel se polimerizó.

Una vez terminado el proceso de solidificación de la solución *resolving*, se procedió a agregar las soluciones APS y TEMED a la solución *stacking*. Se retiró el alcohol isopropílico del sistema espaciador y se colocó la solución *stacking* sobre la *resolving*, cuidadosamente. Una vez que el sistema queda lleno, se colocó un peine espaciador de 12 pozos, con un espesor de 1 mm y se dejó polimerizar.

vi. Preparación de las muestras, corrida de electroforesis y transferencia para la técnica de Western Blot (WB)

A partir de la determinación del contenido total de proteína se realizaron los cálculos necesarios para determinar el volumen de muestra a cargar en cada pozo del gel. Para eso se dividieron los  $\mu\text{g}$  de proteína a cargar (10  $\mu\text{g}$ ), previamente estandarizados, entre los  $\mu\text{g}$  de proteína en un  $\mu\text{L}$  de muestra. Por otra parte, se calculó del volumen de la solución de Laemmli- $\beta$ -Mercaptoetanol necesaria para desnaturalizar las proteínas de cada muestra. Para esto se preparó previamente la solución mezclando los volúmenes de los reactivos Laemmli y Mercaptoetanol necesarios para obtener la dilución al 1X. El cálculo se realizó dividiendo el volumen de muestra que se debe cargar en cada pozo, obtenido previamente, entre el factor de dilución de la solución Laemmli- $\beta$ -Mercaptoetanol, es decir, 1.

Para desnaturalizar las proteínas se mezcló el volumen de muestra a cargar y el volumen de la solución Laemmli- $\beta$ -Mercaptoetanol. Posteriormente, las muestras se colocaron en baño María por cinco minutos. Transcurrido el tiempo, se cargaron las muestras en los pozos del gel con una micropipeta, el primer pozo se designó para el marcador de Peso Molecular (Prestained SDT Standards, Low Range BIO-RAD). Para realizar la corrida de electroforesis se montó la placa de gel en la cámara de electroforesis. Se llenó el tanque con el buffer de corrida, previamente preparado, y se introdujo la cámara de electroforesis en el mismo. Asegurando el emplazamiento correcto de la tapa con respecto al ánodo y al cátodo se cerró el sistema y se conectó a la fuente de poder. Se ajustaron los valores

de corriente e intensidad adecuados en el equipo PowerPac® HC BIO-RAD, determinadas previamente.

Posteriormente se procedió a transferir a la membrana. Se colocó el gel, en un recipiente con Buffer de Transferencia (Trans-Blot® Turbo™ 5X Transfer Buffer BIO-RAD), preparado previamente. De la misma forma, dos papeles filtro (Trans-Blot® Turbo™ Mini-size Transfer Stacks BIO-RAD) se sumergieron en el Buffer de Transferencia. Se procedió a hacer el acomodo de las partes a manera de “sándwich”, la membrana de celulosa (Trans-Blot® Turbo™ Mini-size Nitrocellulose BIO-RAD) se colocó sobre un papel filtro, el gel se colocó sobre la membrana y encima un segundo papel filtro. El conjunto se colocó en la charola del equipo Trans-Blot® Turbo™ Transfer System en donde se seleccionó el Protocolo Estándar Medio, predeterminado en el equipo. Para confirmar la correcta transferencia de las proteínas a la membrana, se empleó la Solución Rojo de Ponceau. La membrana se sumergió en un recipiente con la solución y se confirmó la coloración de las bandas.

Una vez asegurada la transferencia, se realizaron lavados de diez minutos, en agitación constante, con la Solución buffer tris salino (TBS)-Tween 20 al 0.05%. De esta forma, se retiró la coloración de la Solución Rojo de Ponceau y se procedió a realizar el bloqueo de la membrana. Se colocó la membrana en un recipiente con Solución de Bloqueo, i.e. leche descremada al 3%, por treinta minutos. Al finalizar los treinta minutos se incubó, por un periodo de 48 a 72 horas a 4°C y en agitación constante, la membrana con el anticuerpo primario correspondiente, previamente diluido en solución de bloqueo (Alix 1:1000, CD63 1:500 y CD9 1:2000). Posteriormente, se realizaron tres lavados cada uno de diez minutos con la Solución TBS-Tween 20 al 0.05%, en agitación constante. Una vez realizados los lavados se colocó el anticuerpo secundario, previamente diluido en Solución TBS-Tween 20 al 0.05%. La membrana permaneció en incubación entre 30 y 60 minutos. Después del tiempo de incubación se repitieron los tres lavados como descritos previamente.

Para realizar el revelado de las membranas se procedió a incubar las membranas con Solución de Sustrato de peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés) (Immobilon™ Western, Chemiluminescent HRP Substrate) por un tiempo de entre 5 y 10 minutos en agitación contante. La solución se preparó previamente mezclando volúmenes iguales de las soluciones incluidas en el Kit. En seguida, se colocaron las membranas entre dos placas de acetato plástico y se retiró el exceso de sustrato. Se colocaron en la

charola e introdujeron en el sistema Fotodocumentador ChemiDoc™ Touch Imaging System de BIO-RAD. Se selecciono la opción de quimioluminiscencia y se tomaron distintas imágenes a distintas exposiciones.

vii. Microarreglos

Dadas las indicaciones del proveedor y los resultados obtenidos del contenido total de proteínas en exosomas, se realizaron estandarizaciones en el laboratorio de Neurogénesis para saber la cantidad de muestra ideal para la determinación. Se realizaron los cálculos necesarios para determinar los volúmenes de exosomas resuspendidos de cada sujeto con un contenido de 100 µg de proteína, y se agruparon los volúmenes obtenidos de 5 sujetos del mismo grupo para formar un total de 500 µg, con los cuales se incubaron las membranas. De esta forma se obtuvieron 500 µg de los sujetos 1 a 5, 6 a 10 y 11 a 15, de cada grupo, i.e. CTRL y ENR. Todos los reactivos, las membranas y las placas se obtuvieron del Kit "Mouse Cytokine Antibody Array C1000" (RayBio®). Para todas las incubaciones descritas a continuación, las membranas se colocaron en uno de los pozos de la placa y se mantuvieron en agitación constante. Entre cada incubación se realizaron cinco lavados, de cinco minutos cada uno. Para los lavados se prepararon las Soluciones Buffer de Lavado I y II (1X), siguiendo las instrucciones del proveedor. Tres lavados se realizaron con 2 mL de la Solución Buffer de Lavado I, cada uno, y dos con 2 mL de la Solución de Buffer de Lavado II, cada uno.

En un principio, se colocaron 2 ml de la Solución Buffer de Bloqueo en cada uno de los pozos de la placa con las membranas C3 y C4 (ver Figura 6), las cuales en conjunto identifican 96 proteínas, empleadas previamente exitosamente para identificar cambios en citocinas (Li *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2021; Vega-Rivera *et al.*, 2020). Tras 30 min se retiró el buffer y se colocaron los 500 µl de las muestras diluidas en 500 µl de Buffer de bloqueo, para obtener un mililitro. La incubación duró 72hrs a 4°C. Al finalizar, se retiró la muestra diluida y se procedió a hacer la primera serie de lavados. Previamente, se prepararon las Soluciones Buffer de Lavado I y II (1X), siguiendo las instrucciones del proveedor. En un primer tiempo se realizaron tres lavados, cada uno de 5 minutos. Para estos primeros tres lavados se colocaron 2 mL de la Solución Buffer de Lavado I en los pozos con las membranas. Posteriormente, se realizaron dos lavados para los cuales se colocaron 2 mL de la Solución de Buffer de Lavado II en los pozos. Al finalizar las series de lavados, se añadió 1 mL del anticuerpo biotinilado, preparado con anterioridad según las instrucciones del proveedor, el cual se dejó durante 24 horas a una temperatura de 4°C y agitación



constante. Dado que los anticuerpos de las 96 proteínas fueron fijados en dos membranas, la C3 con 65 y C4 con 31, cada membrana se incubó con un anticuerpo específico. Transcurridas las 24 horas, se retiraron los anticuerpos y se repitieron los cinco lavados como descritos previamente. Posteriormente se colocaron 2 ml de la solución 1X HRP-estreptavidina, diluida previamente, en cada pozo durante 2 horas. Al finalizar, se retiró la solución 1X HRP-estreptavidina y se repitieron los lavados, como descritos previamente.

		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	
Each antibody is spotted in duplicate vertically	1	POS	POS	NEG	NEG	BLANK	Ax1	BLC (CXCL13)	CD30 Ligand (TNFSF8)	CD30 (TNFRSF8)	CD40 (TNFRSF5)	CRG-2	CTACK (CCL27)	CXCL16	Eotaxin-1 (CCL11)	
	2	Eotaxin-2 (CCL24)	Fas Ligand (TNFSF6)	Fractalkine (CX2CL1)	GCSF	GM-CSF	IFN-gamma	IGFBP-3	IGFBP-5	IGFBP-6	IL-1 alpha (IL-1 F1)	IL-1 beta (IL-1 F2)	IL-2	IL-3	IL-3 R beta	
	3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-9	IL-10	IL-12 p40/p70	IL-12 p70	IL-13	IL-17A	KC (CXCL1)	Leptin R	Leptin	LIX	L-Selectin (CD62L)	
	4	Ltn (XCL1)	MCP-1 (CCL2)	MCP-5	M-CSF	MIG (CXCL9)	MIP-1 alpha (CCL3)	MIP-1 gamma	MIP-2	MIP-3 beta (CCL19)	MIP-3 alpha (CCL20)	PF-4 (CXCL4)	P-Selectin	RANTES (CCL5)	SCF	
	5	SDF-1 alpha	TARC (CCL17)	I-309 (TCA-3/CCL1)	TECK (CCL25)	TIMP-1	TNF alpha	TNF RI (TNFRSF1A)	TNF RII (TNFRSF1B)	TPO	VCAM-1 (CD106)	VEGF-A	BLANK	BLANK	POS	
	6															
	7															
	8															
	9															
	10															

AAM-CYT-3

		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Each antibody is spotted in duplicate vertically	1	POS	POS	NEG	NEG	BLANK	bFGF	CD26 (DPPIV)	Dtk	E-Selectin	Fc gamma RIIB	Flt-3 Ligand	GITR (TNFRSF18)
	2	HGFR	ICAM-1 (CD54)	IGFBP-2	IGF-1	IGF-2	IL-15	IL-17 RB	IL-7	I-TAC (CXCL11)	Lungkine (CXCL15)	MDC (CCL22)	MMP-2
	3	MMP-3	OPN (SPP1)	OPG (TNFRSF11B)	Pro-MMP-9	Resistin	Shh-N	TCK-1 (CXCL7)	TIMP-2	TRANCE (TNFSF11)	TROY (TNFRSF19)	TSLP	VEGFR1
	4	VEGFR2	VEGFR3	VEGF-D	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	POS
	5												
	6												
	7												
	8												

AAM-CYT-4

**Figura 6. Mapa del microarreglo.** Membrana C3 en la parte superior y membrana C4 en la parte inferior.

Para revelar las membranas se colocaron las membranas en una lámina de plástico o acetato, se retiró cuidadosamente el exceso de los buffers con papel seda y se añadieron 500 µl de la Solución de los buffers de detección C y D (1:1), preparada previamente. Dos minutos después, se colocó una segunda placa de acetato plástico encima de las membranas sin retirar los buffers y se introdujeron en el sistema Fotodocumentador ChemiDoc™ Touch Imaging System de BIO-RAD. Se selecciono la opción de quimioluminescencia y se tomaron distintas imágenes a distintas exposiciones.

El análisis densitométrico de las imágenes obtenidas en el fotodocumentador se realizó con el software Image Lab 6.0.1 de Bio-Rad, dónde se obtuvieron los valores del *Volume* (int). Dichos valores se exportaron a la plantilla de EXCEL®, proporcionada por BIO-RAD, dónde se realizó la normalización de los datos de expresión. Obteniendo finalmente, los valores de intensidad relativa (IR) de expresión para cada proteína de los microarreglos.

#### viii. Mapas de interacción proteína-proteína (PPI)

Se realizó un análisis bioinformático de la interacción proteína-proteína, usando los algoritmos bioinformáticos de la página STRING con el fin de identificar asociaciones funcionales entre las proteínas con diferencias significativas entre ambos grupos experimentales y sus posibles interacciones con otras proteínas. Junto con el análisis de vías de señalización enriquecidas para las proteínas de la red construida por el programa. Para esto se buscaron los identificadores de cada citocina a través de la base de datos UniProt Knowledgebase. Esos identificadores se introdujeron en la página de inicio de STRING y se seleccionó como organismo *Mus musculus*. Finalmente, dentro de los ajustes se seleccionó un puntaje mínimo de interacción de alta confianza (0.700). Para la visualización de los mapas, se seleccionó el modo de evidencia, de esta forma, los ejes que aparecen en el mapa poseen distintos colores que representan los diferentes tipos de evidencias usadas para obtener las predicciones de las asociaciones. El programa de STRING realiza además un análisis de enriquecimiento de vías de señalización, es decir, que, a partir de las proteínas introducidas, presenta una lista de vías de señalización sobrerrepresentadas. El análisis de enriquecimiento se realiza para distintos marcos de clasificación de vías de señalización funcionales entre los que se encuentra la base de datos *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (Szklarczyk *et al.*, 2021), misma que se utilizó en este estudio.

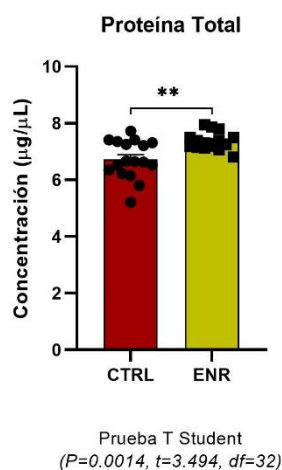
#### ix. Estadística

Para realizar el análisis estadístico y los gráficos de todas las pruebas se usó el programa GraphPad Prism 8. Las comparaciones entre los grupos se realizaron mediante la prueba de T de Student (Media  $\pm$  Error Estándar), con una significancia estadística  $P \leq 0.05$ .

## VII. Resultados

- i. Determinación del contenido de proteína en los exosomas de suero sanguíneo.

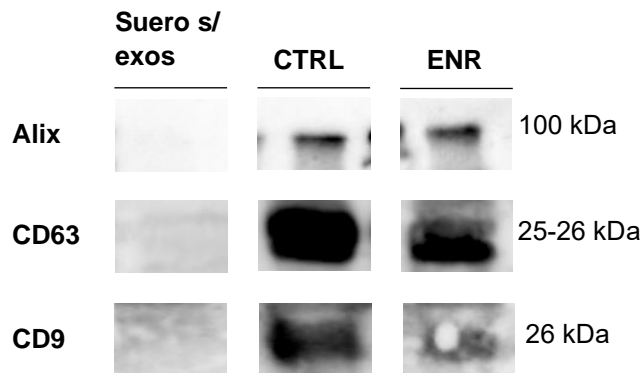
En un primer tiempo se cuantificó la proteína total contenida en los exosomas de cada uno de los grupos. Mediante el análisis estadístico de los resultados obtenidos en el Bradford se observó que en el grupo ENR los niveles de proteína eran más altos que en el grupo CTRL. La media del contenido de proteína en los exosomas del grupo CTRL fue de  $6.729 \pm 0.1625 \mu\text{g/mL}$ , mientras que en el grupo ENR hubo un aumento de  $0.6218 \pm 0.1780 \mu\text{g/mL}$ , dando una diferencia significativa con respecto al grupo CTRL ( $p=0.0014$ ) (ver figura 7).



**Figura 7. Contenido total de proteína en exosomas.** La concentración de proteína en el grupo enriquecido (ENR) es significativamente mayor que en el grupo control (CTRL). Los valores presentados son las medias  $\pm$  EE.  $**P < 0.01$ .

- ii. Caracterización de exosomas por WB

La validación del aislamiento de exosomas se realizó mediante la técnica de electroforesis en gel y WB. Como se observa en la figura 8, se determinó la presencia de tres marcadores específicos de exosomas, Alix, CD63 y CD9.

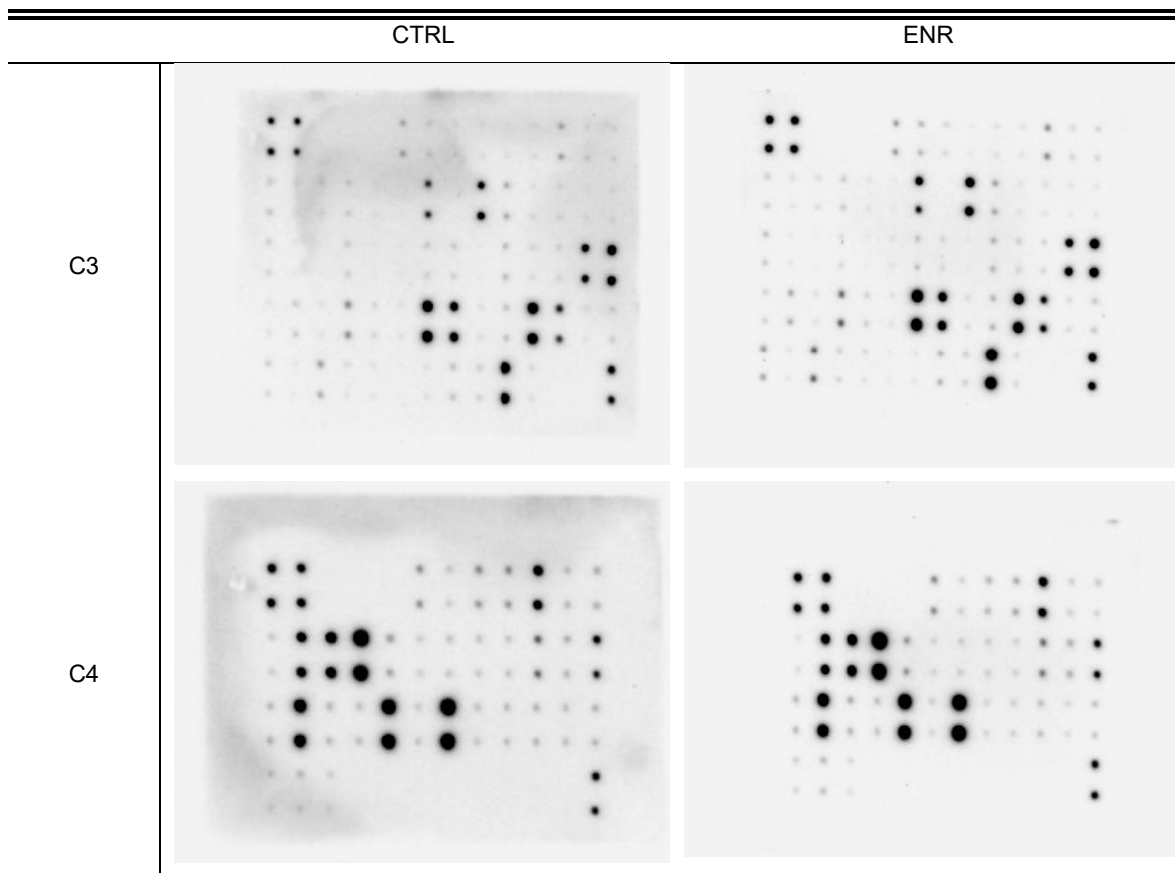


**Figura 8. Determinación de marcadores exosómicos.** Se muestran las bandas representativas de los marcadores de exosomas, Alix, CD63 y CD9, detectados por western blot (WB). Una banda corresponde al grupo control (CTRL) y una al grupo enriquecido (ENR).

CD63 y CD9 son tetraspaninas endosomales, especialmente enriquecidas en las membranas vesiculares a diferencia de los lisados celulares. Por su parte, Alix participa en la biogénesis de los exosomas por lo que es esperado que esté presente en los exosomas de cualquier origen. Las tres proteínas se observan tanto en el grupo CTRL como en el grupo ENR, lo que valida que la determinación de proteínas se llevó a cabo con exosomas.

### iii. Microarreglos

Con el fin de identificar el efecto producido por el AE en los niveles de citocinas liberadas dentro de exosomas en el suero de ratones Balb/C, se realizó un análisis semicuantitativo de las mismas por medio de microarreglos de anticuerpos. De esta forma se compararon las intensidades relativas de 96 proteínas entre el grupo CTRL y el grupo ENR, todas las proteínas analizadas se encuentran enlistadas en el anexo 1.



**Figura 9. Imagen representativa para cada grupo experimental de las membranas de microarreglos con los spots de las proteínas.**

Como se observa en la figura 10, las 96 citocinas que fueron analizadas por medio de los microarreglos están presentes en los exosomas tanto del grupo CTRL, como del grupo ENR. Por lo tanto, las variaciones que se observan entre los dos grupos experimentales representan variaciones en la expresión de las diferentes citocinas dentro de los exosomas.

### Perfil de expresión

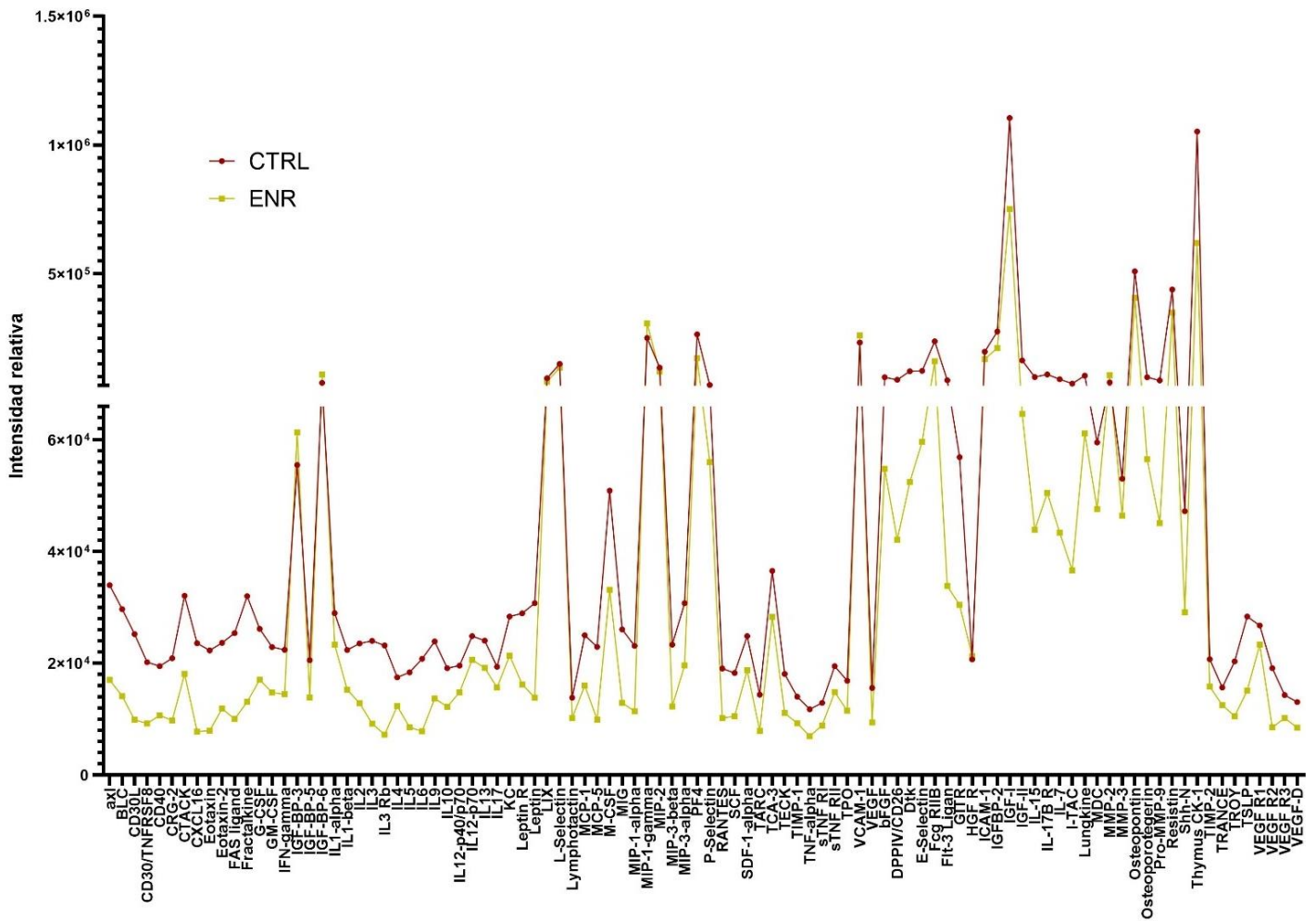
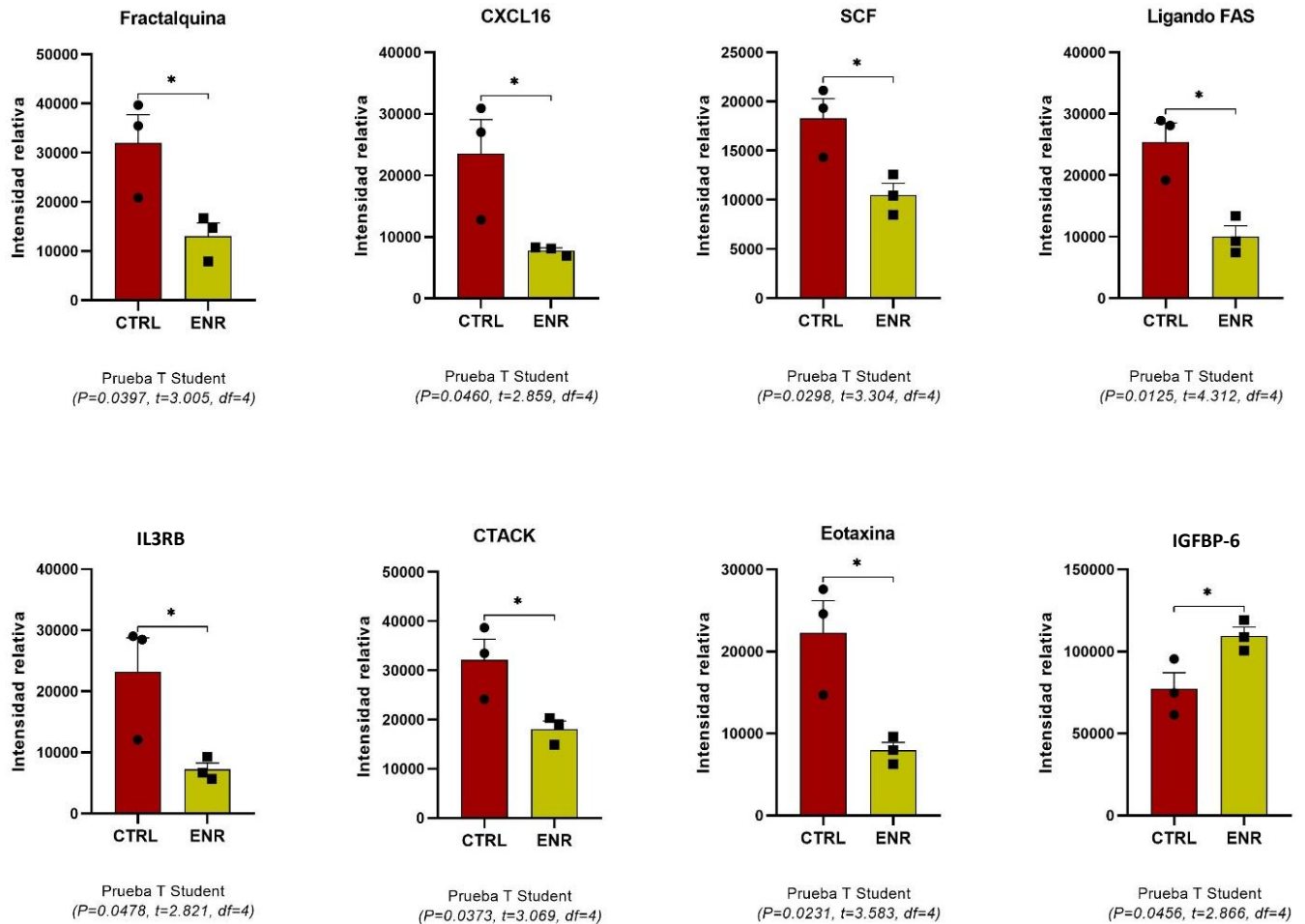


Figura 10. Perfil de expresión de las 96 citocinas analizadas.

De las 96 citocinas analizadas, únicamente 8 mostraron diferencias significativas entre los dos grupos (ver figura 11). La proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina tipo 6 (IGFBP-6) fue la única que se expresó en mayor cantidad en el grupo ENR ( $p = 0.0456$ ), donde se produjo un aumento del 41.8%. El resto de las proteínas tuvieron una menor expresión en el grupo ENR. La fractalquina disminuyó un 59,13% en el grupo ENR ( $p = 0.0397$ ), la quimiocina CXC ligando 16 (CXCL16) un 67% ( $p = 0.0460$ ), el factor de células potenciales (SCF) un 35.49% ( $p = 0.0298$ ), el ligando Fas un 60.54% ( $p = 0.0125$ ), la subunidad beta común del receptor para GM-CSF/IL-3/IL-5 (IL3RB) un 68.89% ( $p = 0.0478$ ), la quimiocina atrayente de células T cutáneas (CTACK) un 43.7% ( $p = 0.0373$ ) y la eotaxina un 64.34% ( $p = 0.0231$ ).

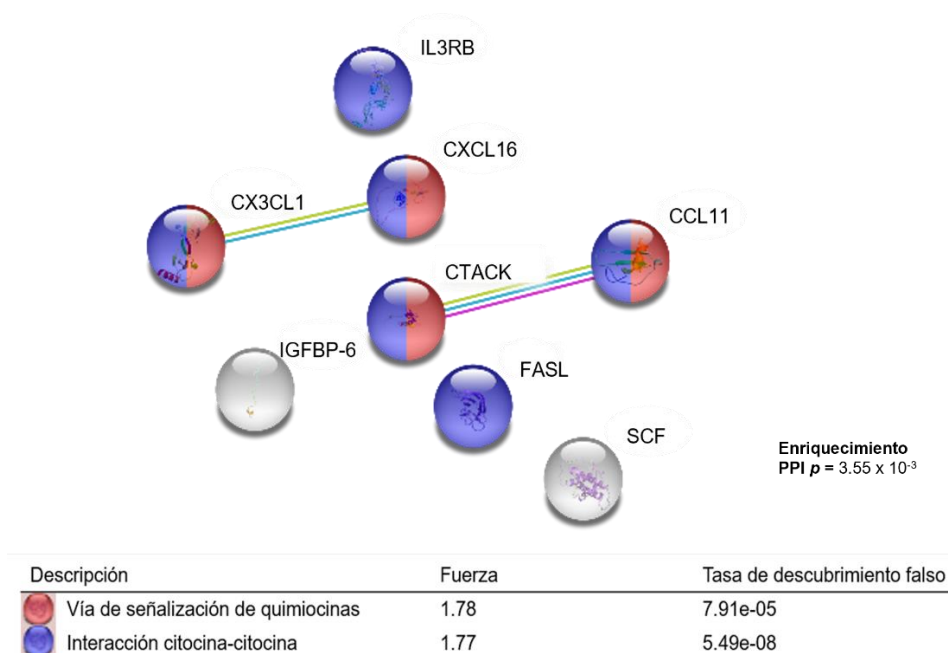


**Figura 11. Intensidad relativa de citocinas en exosomas.** Proteínas cuya expresión presentó diferencias significativas entre los grupos experimentales. En la parte superior, de izquierda a derecha, fractalquina (CX3CL1), CXCL16, SCF y ligando FAS. En la parte inferior, de izquierda a derecha, IL3 RB, CTACK, eotaxina (CCL11) e IGFBP-6. Los valores presentados son las medias  $\pm$  EE. \* $p < 0.05$ .

#### iv. Mapa de interacción

Dadas las diferencias presentadas, entre el grupo CTRL y el ENR, en la expresión de la fractalquina, CXCL16, SCF, FasL, IL-3RB, CTACK, CCL11 e IGFBP-6, se analizaron las interacciones proteína-proteína (PPI). Se emplearon las bases de datos UniProt y KEGG y el software STRING (<https://string-db.org>, accedido el 21 de julio del 2021). La base de datos STRING permite que se analicen las interacciones entre proteínas a partir de distintas fuentes de evidencia, representadas por los colores de los ejes, los cuales, a su vez, representan las interacciones. En la primera consulta que se realizó, únicamente con

las citocinas significativamente diferentes, es decir 8 entradas, los únicos nodos fueron CXCL16, CX3CL1, CCL11 y CTACK (enriquecimiento PPI  $p = 3.55 \times 10^{-3}$ ) (ver figura 12). Así, CXCL16 está asociado con la fractalquina mientras que la eotaxina se asocia a CTACK. Ambas asociaciones son con base en evidencia *textmining* y de base de datos, aunque la asociación entre la eotaxina y CTACK, adicionalmente, es respaldada por evidencia experimental. La base de datos de STRING además de crear la red de interacción, hace un análisis de enriquecimiento de rutas biológicas. Para este trabajo tomamos las rutas KEGG, para los 8 nodos iniciales las principales rutas KEGG son rutas de señalización de quimiocinas e interacciones citocinas-receptores de citocinas.

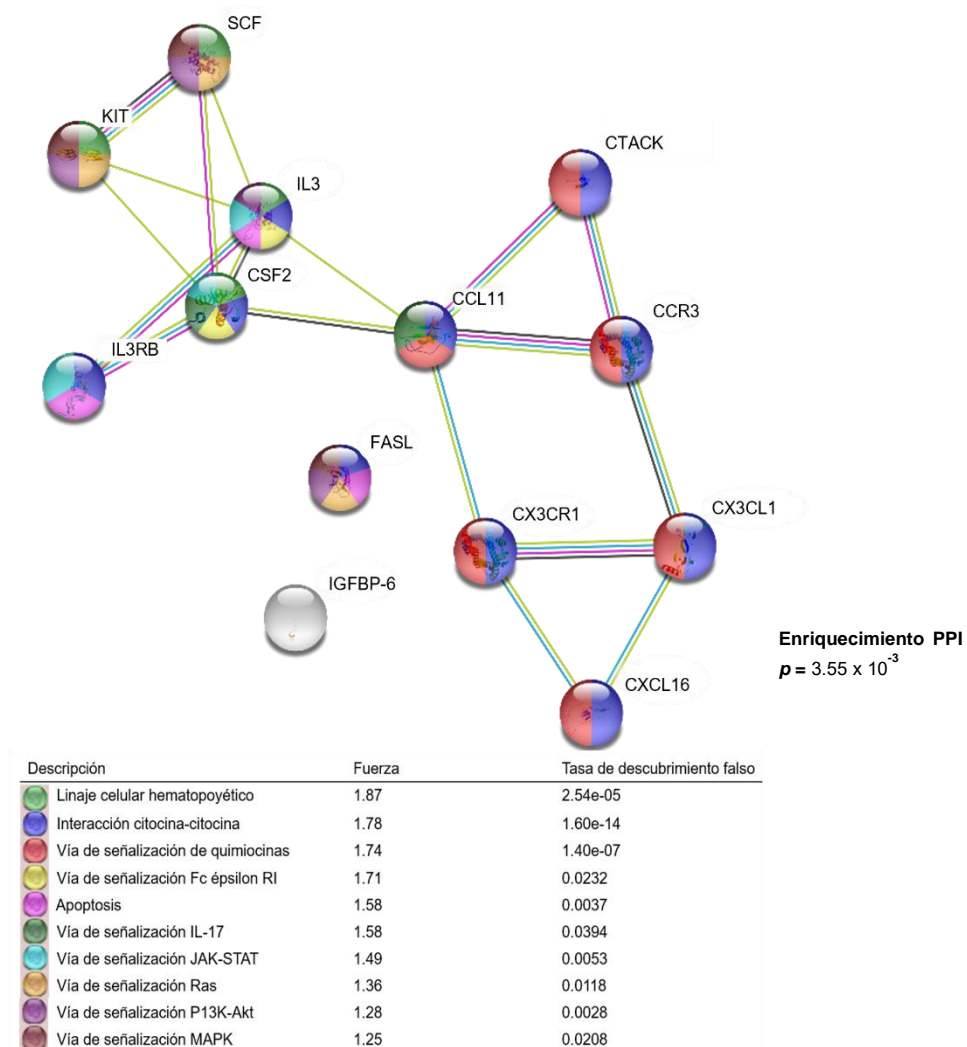


**Figura 12. Mapa de interacción proteína-proteína.** Obtenido a través de la base de datos de STRING (<https://string-db.org>). Interacciones entre las proteínas con cambios significativos entre el grupo control (CTRL) y enriquecido (ENR) y vías de señalización KEGG enriquecidas.

Posteriormente se agregaron cinco proteínas a la primera capa (ver figura 13). Las proteínas que aparecieron en el nuevo mapa de interacción son principalmente ligandos o receptores de las citocinas de la búsqueda inicial. Con esto, prácticamente todas las citocinas originales quedaron conectadas, excluyendo al ligando FAS e IGFBP6 (enriquecimiento PPI  $p = 2.41 \times 10^{-05}$ ). Siendo esta última, la única cuya expresión fue



significativamente mayor en el grupo ENR. La eotaxina parece ser un nodo central, siendo la proteína con más ejes, al tener cinco conexiones. En este segundo mapa, además de las rutas KEGG enriquecidas en la primera red, surgieron rutas adicionales, como la del linaje celular hematopoyético, apoptosis, de señalización JAK-STAT, Fc épsilon RI, MAPK, IL-17, RAS y fofastidilinositol 3 cinasa (PI3K)-Akt.



**Figura 13. Mapa de interacción proteína-proteína entre las proteínas con diferencias significativas y las agregadas a la primer capa.** Obtenido a través de la base de datos de STRING (<https://string-db.org>). Interacciones entre las proteínas con cambios significativos entre el grupo control (CTRL) y enriquecido (ENR) y las proteínas agregadas a la primera capa. Se muestran las vías de señalización KEGG enriquecidas.

## VIII. Discusión

En el presente trabajo se trazó como objetivo inicial el discernir las diferencias entre el contenido proteico de exosomas del suero sanguíneo de ratones hembra Balb/C sometidos a un AE durante 14 días en comparación con el de roedores alojados en condiciones conocidas como estándar. El racional de utilizar hembras en lugar de machos obedece a que las primeras presentan menos conductas de tipo agonistas relacionadas con la agresión (Cabrera-Muñoz *et al.* 2022). Por otra parte, la edad de las ratonas (8 semanas de edad) permite analizar los cambios que se producen por el AE sin que los resultados se vean influenciados por el desarrollo o la senescencia. A las 8 semanas de edad comienzan a disminuir los cambios rápidos en la masa y el número de células que se producen durante el desarrollo en el CNS (Fu *et al.*, 2013). El sistema inmune también termina de desarrollarse alrededor de las 8 semanas (Holladay & Smialowicz, 2000). Además, el impacto del AE disminuye con la edad, como se observó en ratones de 91 días en los que la mejoría a nivel cognitivo y en el potencial de las células madre neurales, producidos por la exposición a un AE durante dos semanas, es menos visible (Chandler *et al.*, 2020). En este estudio, Chandler *et al.*, 2020 realizan la comparación con ratones de 21 días de edad, sin embargo, en ratones de 8 semanas se ha observado un aumento en la plasticidad (Buschler & Manahan-Vaughan, 2012) y en la proliferación celular (Llorens-Martín *et al.*, 2010).

El AE impacta una gran variedad de sistemas, como el nervioso, el inmune y el endocrino, afectando sus distintos niveles con repercusiones positivas sobre aspectos cognitivos de los animales (Smail *et al.*, 2020). La exposición a un AE durante 14 días ha comprobado ser suficiente para producir efectos tanto a nivel central (Buschler & Manahan-Vaughan, 2012), como a nivel periférico impactando el sistema inmune al promover variaciones en los porcentajes de neutrófilos y linfocitos en sangre (Brod *et al.*, 2017). Incluso con una exposición al AE de menos de 14 días se produce un incremento en la memoria y una disminución de la locomoción espontánea (Leger *et al.*, 2015), así como el aumento en la proliferación y disminución en la muerte neuronal (Llorens-Martín *et al.*, 2010). Por otro lado, en la periferia, la exposición a un AE de tan solo seis días promueve un cambio en el perfil de expresión génica del tejido adiposo blanco, aumentando la expresión de genes relacionados con el tejido adiposo pardo (During *et al.*, 2015). Por su parte, los exosomas son vesículas extracelulares cuya función es amplia, permitiendo la comunicación local y

entre distintos tejidos. Por el momento, sólo se han reportado cuatro estudios sobre el efecto del AE en los exosomas (Kubota *et al.*, 2018; Nakano *et al.*, 2020; Pusic & Kraig, 2014; Pusic *et al.*, 2016).

Una vez finalizando el AE, el contenido de los exosomas reveló que ocho de las 96 citocinas analizadas, presentaron cambios significativos en comparación con las ratonas alojadas en condiciones estándar. Entre las proteínas analizadas encontramos que únicamente IGFBP-6 aumentó en el ENR. En cambio, CXCL16, CX3CL1, SCF, FasL, CTACK, CCL11 e IL3RB disminuyeron en condiciones de AE (ver figura 11). Sin embargo, el hecho de haber mezclado el suero de cinco sujetos redujo el tamaño de la muestra de quince a tres. Un tamaño de muestra pequeño da pie a que se obtengan falsos negativos (Biau *et al.*, 2008), por lo que es posible que no hayamos podido observar todas las diferencias que se pueden estar llevando a cabo en el contenido de las citocinas analizadas en los exosomas de los grupos experimentales.

El análisis de interacción proteína-proteína permite obtener las posibles asociaciones funcionales entre las distintas proteínas significativas, es decir, que las proteínas, que reflejan asociaciones, contribuyen a los mismos procesos celulares. En el análisis se encontró la interacción entre la fractalquina y CXCL16, así como entre la eotaxina y CTACK. Derivado del análisis en la base de datos biológicos STRING y la base de datos de KEGG, (colección de bases de datos en línea de genomas, rutas enzimáticas, y químicos biológicos), se encontraron dos vías de señalización relacionadas con la interacción citocina-citocina y con la vía de señalización de quimiocinas (ver figura 12). En un segundo análisis se agregaron cinco proteínas que presentan interacciones directas con las ocho proteínas significativas (ver figura 13), lo que permite ver si a través de otras proteínas se podrían estar dando interacciones entre las proteínas introducidas manualmente, aunque sean indirectas. En esta nueva red, el programa agregó receptores y ligandos de las ocho proteínas originales, con esta adición, seis de las ocho proteínas quedaron interconectadas y surgieron nuevas vías de señalización. Tanto IL3RB como SCF se integraron a la red.

### **Exosomas y contenido proteico: efectos de las proteínas a nivel periférico**

El contenido proteico de los exosomas de ratones hembra expuestas a un AE es interesante ya que se ha reportado que, en la periferia, múltiples células expresan dichas

proteínas. Por ejemplo, la secreción de CTACK, también llamada CCL27, se produce principalmente en los queratinocitos de la piel (Homey *et al.*, 2000; Morales *et al.*, 1999). La proteína CXCL16 es producida por células vasculares, células presentadoras de antígenos (DCs, células B y macrófagos) y queratinocitos (Abel *et al.*, 2004; Matloubian *et al.*, 2000; Shimaoka *et al.*, 2000; Tohyama *et al.*, 2007). CX3CL1 se expresa en células endoteliales, células del músculo liso (Ludwig *et al.*, 2002), en macrófagos (Greaves *et al.*, 2001) y células epiteliales (Lucas *et al.*, 2001). Distintas citocinas influyen en los patrones de expresión de CXCL16, CX3CL1 y CTACK, mientras que éstas últimas promueven la liberación de otras citocinas. En el caso de CXCL16, las citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  inducen su expresión, mientras que IL-4 la regula negativamente (Abel *et al.*, 2004; Ludwig *et al.*, 2005). De hecho, en pacientes con trombocitopenia inmune, se ha encontrado una relación entre la forma soluble de esta citocina y citocinas Th1, por lo que los autores proponen una posible relación entre el desequilibrio de células Th1 y Th2, característico de esta enfermedad, y la regulación de CXCL16 (Hao *et al.*, 2017). Por otra parte, CXCR6 está presente en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide o psoriásica y en el hígado inflamado. Al parecer, la expresión del receptor forma parte de un mecanismo de retroalimentación para promover respuestas inflamatorias de tipo Th1 (Kim *et al.*, 2001). A su vez, la expresión de la fractalquina aumenta frente a la estimulación con TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-1 (Bazan *et al.*, 1997; Fraticelli *et al.*, 2001; Ludwig *et al.*, 2002). La regulación de la expresión de la fractalquina por estas citocinas en células endoteliales influye en los patrones de expresión de CX3CR1 en células Th1 y NK y la respuesta de estas a la fractalquina (Fraticelli *et al.*, 2001). Mientras que CX3CL1, por su parte, puede promover la liberación del IFN- $\gamma$  en células NK, sugiriendo su posible involucración en la polarización hacia respuestas Th1 (Yoneda *et al.*, 2003). En el caso de CTACK, tanto TNF- $\alpha$  como IL-1 $\beta$  inducen su producción (Homey *et al.*, 2002; Morales *et al.*, 1999). Con el fin de identificar moléculas relacionadas con la inducción de células T Th1 se observó también un aumento en la expresión de CTACK en DCs con un knockout de IL-10 (He *et al.*, 2005).

CXCL16 y CX3CL1 presentan dos formas distintas, ya sea como proteínas solubles o adheridas a la membrana plasmática (Bazan *et al.*, 1997; Matloubian *et al.*, 2000); ambas forman parte del grupo de quimiocinas. En su forma soluble, CXCL16, induce la quimiotaxis de células T CD8+, Th1 y NK (Matloubian *et al.*, 2000; Wilbanks *et al.*, 2001), por su parte, CX3CL1 atrae monocitos y linfocitos (Bazan *et al.*, 1997; Greaves *et al.*, 2001; Imai *et al.*, 1997; Lucas *et al.*, 2001). En general, las formas transmembranales de

ambas citocinas promueven la adhesión de células que expresan el receptor CX3CR1, para la fractalquina (Imai *et al.*, 1997) y CXCR6, para CXCL16 (Shimaoka *et al.*, 2004). Dentro de sus funciones como quimiocina, la CX3CL1 media la adhesión de leucocitos, principalmente monocitos (CD16+), en la sangre en conjunción con otras moléculas (Ancuta *et al.*, 2003; Fong *et al.*, 1998; Kerfoot *et al.*, 2003), aunque también se ha descrito su capacidad para adherir células CD8+ y células NK (Fong *et al.*, 1998). Por lo general, la forma soluble de CX3CL1 forma un gradiente que permite la quimioatracción de distintas células, como son las células T CD8+, T CD4+, NK y montitos (Ancuta *et al.*, 2003; Fraticelli *et al.*, 2001; Nishimura *et al.*, 2002). Se ha descrito la participación de exosomas en la migración quimioquinetica de células dendríticas a través de guías por medio de la presentación de CX3CL1 en su superficie (Brown *et al.*, 2018). Las células T que expresan CX3CR1 son mayoritariamente aquellas que están diferenciadas completamente y que poseen una alta actividad citotóxica (Nishimura *et al.*, 2002). De hecho, también se ha demostrado que las células Th1 tienen una respuesta quimiotáctica a CX3CL1 (Fraticelli *et al.*, 2001). Aunque los efectos quimiotácticos de la fractalquina se reservan a su forma soluble, la forma transmembranal puede fungir como guía para la migración de las células en dirección a otras quimiocinas en el endotelio inflamado (Nishimura *et al.*, 2002). Esta capacidad que posee la fractalquina para movilizar las células del sistema inmune no es exclusiva de estados patológicos. Por ejemplo, la quimiocina está involucrada en el movimiento de rodaje (*crawling*) de monocitos “patrulla” por el endotelio de los vasos sanguíneos (Auffray *et al.*, 2007). Además, tanto CX3CR1 como la fractalquina participan en el *homing* de distintas células a tejidos periféricos. Como lo demuestra la ausencia de CX3CR1 en ratones, en los cuales disminuye el número de DCs en el riñón. Mientras que, tanto en el riñón como en los pulmones, es necesaria la fractalquina para que se encuentren precursores de células dendríticas (Hochheiser *et al.*, 2013; H. Nakano *et al.*, 2017). Por su parte, la expresión de CX3CR1 afecta la abundancia de macrófagos en el intestino (Hochheiser *et al.*, 2013). Entre las múltiples funciones de CX3CL1, se ha demostrado que su receptor participa en la diferenciación de DCs (Łyszkiewicz *et al.*, 2011). Por otra parte, CX3CL1 parece tener un efecto anti-apoptótico en monocitos (White *et al.*, 2014). También se ha demostrado que la fractalquina puede promover la supervivencia de monocitos y en la formación de dendritas transepiteliales en macrófagos, tanto en humanos como en ratones (Kim *et al.*, 2011; White *et al.*, 2014). El receptor de CXCL16, CXCR6, participa en la localización de células T *natural killer* (NKT) en el hígado y en los pulmones en condiciones basales,

mientras que sin el receptor estas células aumentan en la médula ósea. De igual manera, CXCR6 es necesario para la maduración, la activación y la producción de citocinas como INF- $\gamma$ , IL-4 e IL-2 por estas células (Germanov *et al.*, 2008). CXCR6 también promueve el egreso de la médula ósea y transporte a la periferia de los precursores de células linfoides innatas (ILCs) (Chea *et al.*, 2015). Mientras que CXCR6 es necesario para dirigir la migración de células T de memoria residentes de pulmón y su mantenimiento en los pulmones (Wein *et al.*, 2019). CTACK también participa en procesos de migración. El receptor de CTACK, CCR10 se expresa principalmente en células T de memoria, de esta forma, la interacción CCL27-CCR10 permite la atracción de dichas células a la piel durante procesos inflamatorios o en homeostasis (Homey *et al.*, 2002; Morales *et al.*, 1999). A pesar de esto, también se ha demostrado que la migración a la piel de ciertas ILCs es dependiente de CCR10 y de CCR6 (Yang *et al.*, 2016). En ratones que no expresan CCR10, se produce una acumulación anormal de estas células en el bazo (Yang *et al.*, 2016). En un estado de homeostasis CCR10 promueve principalmente el *homing* de células T de memoria y el balance entre las células Treg y T efectoras (Teff), especialmente CD8+ en la piel, aunque no parece ser necesario para la iniciación de reacciones inflamatorias. La disminución de células T en la piel, producida por la ausencia de CCL27, resulta en un aumento de dichas células en los tejidos linfáticos secundarios como el bazo (Xia *et al.*, 2014).

Las funciones ejercidas por CXCL16, CTACK y CX3CL1 en la inflamación y migración celular afectan ciertos elementos del sistema inmune que, de igual forma, se ven afectadas por el AE. Por ejemplo, las tres citocinas están relacionadas con las respuestas Th1 y la quimiotaxis de distintas células como las células CD8+ y NK. Por su parte el AE disminuye las células Th1 en el timo y el bazo (Xiao *et al.*, 2019); y mientras que las citocinas relacionadas con estas células disminuyen con el AE (Marashi *et al.*, 2003), promueven la liberación de CXCL16, CTACK y CXCL1, como es el caso del INF- $\gamma$ . Las células CD8+, en cambio, aumentan en el bazo, timo y los nódulos linfáticos, con el AE (Singhal *et al.*, 2021; Xiao *et al.*, 2016, 2019), CTACK y CX3CL1 adhieren y promueven la migración de estas células. Que en el caso de CTACK se ha observado que la disminución de su receptor produce un aumento de estas células en el bazo. En cuanto a las células NK, en ratones adultos expuestos al AE, se ha observado un aumento en la actividad y maduración de células NK (Benaroya-Milshtein *et al.*, 2004; Mansour *et al.*, 2021; Meng *et al.*, 2019). CX3CL1, por su parte, promueve la migración, adhesión y la liberación de citocinas proinflamatorias en células NK. En este trabajo los niveles de estas

proteínas disminuyen en los exosomas hecho que pudiera estar relacionado con algunos de los efectos benéficos del AE en el sistema inmune.

El SCF es un factor de crecimiento que promueve la proliferación de células hematopoyéticas, como granulocitos y macrófagos (Broudy, 1997). Dentro de sus funciones en la hematopoyesis, el SCF induce la quimiotaxis, la proliferación, la supervivencia y la activación de mastocitos (Broudy, 1997; Reber *et al.*, 2006). Como parte de la activación mediada por SCF los mastocitos liberan cantidades pequeñas de IL-4 y TNF- $\alpha$  (Gibbs *et al.*, 1997). La liberación del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés) dependiente de la inmunoglobulina E (IgE) también se potencia en presencia de SCF (Okayama *et al.*, 1998). En eosinófilos, la activación mediada por SCF también conlleva la liberación de citocinas como la proteína inflamatoria macrofagica 1 beta (MIP-1 $\beta$ ), TARC, RANTES y MCP-1, al igual que de receptores como CXCR3 y CXCR5 (Oliveira *et al.*, 2002). Al mismo tiempo que su expresión promueve la liberación de ciertas proteínas proinflamatorias, otras citocinas proinflamatorias, como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , pueden ejercer la misma acción en SCF (Da Silva *et al.*, 2002).

No se encontró evidencia documental que indique un impacto del AE sobre la expresión de SCF. Sin embargo, el ejercicio voluntario produce un aumento en la expresión de SCF en células estromales, de la médula ósea, que expresan el receptor de leptina (LepR+), para mantener las células madre y progenitoras hematopoyéticas en estado quiescente. Esto se ve acompañado de una disminución en la movilización de células troncales hematopoyéticas (HSC) hacia la circulación y un menor número de leucocitos y de progenitores multipotenciales en sangre (Frodermann *et al.*, 2019). Teniendo en cuenta que el AE también disminuye los niveles de leucocitos en la sangre (Brod *et al.*, 2017) y que SCF, en parte, promueve el mantenimiento de HSC parece contraproducente la disminución de SCF en los exosomas. A pesar de esto, es importante mencionar que distintas células de la médula ósea, principalmente células endoteliales y células estromales LepR+ liberan SCF (Comazzetto *et al.*, 2019; Ding *et al.*, 2012) y no afectan las mismas células hematopoyéticas del nicho. Las HSC dependen del SCF producido por células endoteliales mientras que las células progenitoras restringidas dependen del SCF proveniente de células estromales LepR+ (Comazzetto *et al.*, 2019). Por lo que parece que distintos mecanismos afectan distintos tipos de células hematopoyéticas, entonces podría ser posible que la disminución en el contenido de SCF de exosomas en el

ambiente enriquecido promueva la disminución de diferenciación de leucocitos y no afecte directamente las HSC. Además, SCF, en ciertos casos, promueve la liberación de citocinas proinflamatorias, al igual que citocinas proinflamatorias promueven su liberación, como IL-1 $\beta$ , la cual disminuye en la corteza con el AE (McQuaid et al., 2018).

IL3RB es la subunidad común del receptor para la interleucina 3 (IL-3), IL-5 y GM-CSF. Estos receptores están conformados por una subunidad  $\alpha$ , específica para cada proteína, y una subunidad  $\beta$ . En el caso de los ratones, dos genes distintos codifican dos subunidades  $\beta$ , AIC2A y AIC2B, funcionalmente distintas (Gorman et al., 1990; Itoh et al., 1990). La subunidad AIC2A forma un receptor de alta afinidad a IL-3 (Hara & Miyajima, 1992). La diferencia entre las dos subunidades radica en que la subunidad AIC2A es específica para IL-3, mientras que AIC2B, también llamada CSFR2 o IL3RB, forma los complejos de alta afinidad para GM-CSF, IL-5 e IL-3 (Devos et al., 1991; Hara & Miyajima, 1992; Park et al., 1992; Takaki et al., 1991).

En el segundo mapa de interacciones, IL3RB presenta dos asociaciones con dos de sus ligandos, GM-CSF e IL-3. En la periferia, GM-CSF promueve la diferenciación de DCs (Xu et al., 2007) y de granulocitos y macrófagos a partir de células precursoras mieloides (Metcalf et al., 1986; Tomonaga et al., 1986). Por su parte IL-3 promueve el desarrollo de diversas células en el proceso de mielopoyesis, entre las cuales se encuentran los basófilos, mastocitos y eosinófilos (Kindler et al., 1986; Metcalf et al., 1986). A pesar de estas funciones, ni IL-3, ni GM-CSF parecen participar en la hematopoyesis en el estado de equilibrio, las únicas perturbaciones observadas, en ratones que no producen GM-CSF, son la disminución en un subtipo de células dendríticas en tejidos no linfoides y una ausencia de macrófagos alveolares (Greter et al., 2012; Guilliams et al., 2013; Lenzo et al., 2012; Nishinakamura et al., 1996).

Las únicas dos proteínas que no están interconectadas en el mapa son FasL e IGFBP6. El ligando Fas es una proteína transmembranal expresada principalmente por células T CD4+ y CD8+ activadas. Al unirse a su receptor Fas induce la muerte celular por apoptosis en células T, B y en algunos tejidos no linfoides (Ju et al., 1995; Kägi et al., 1994; Suda et al., 1993). Dada la importancia de este proceso es necesario tener un control sobre el mismo. La escisión del ligando Fas da lugar a su forma soluble para disminuir la actividad de este (Suda et al., 1997). Este proceso es importante para mantener la homeostasis del sistema inmune (Strasser et al., 2009). En ratones que no expresan FasL o Fas se produce autoinmunidad y una linfadenopatía caracterizada por la



acumulación de células del sistema inmune y el aumento de células T de memoria (Mabrouk *et al.*, 2008; Weant *et al.*, 2008).

Por otra parte, FasL también parece tener un papel en los procesos inflamatorios. Las DCs no son susceptibles a la apoptosis tras interactuar con el ligando Fas, sino que dicha interacción permite la maduración de las DCs inmaduras y promueve la liberación de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e incluso promueve el fenotipo Th1 en células T (Rescigno *et al.*, 2000). Por otra parte, se ha observado que la forma soluble del ligando Fas puede crear un gradiente para neutrófilos polimorfonucleares *in vitro* (Seino *et al.*, 1998). Mientras que en estudios *in vivo*, la forma transmembranal de FasL promueve una reacción inflamatoria a través de la liberación de factores quimiotácticos que a su vez promueven la extravasación de neutrófilos, mientras que la forma soluble la inhibe (Hohlbaum *et al.*, 2000). De la misma forma, el FasL contenido en microvesículas promueve la liberación de citocinas proinflamatorias y una respuesta de neutrófilos, tras interactuar con macrófagos y activar una reacción apoptótica (Hohlbaum *et al.*, 2001). Dado que la principal función fisiológica de fas es mantener la homeostasis en el sistema inmune, es posible que la reducción que observamos en los exosomas de ratones hembra de la cepa Balb/C alojados en un ambiente enriquecido este relacionado con la variación en los subtipos de células T que se ha observado previamente. Las células con mayor susceptibilidad a la inducción de apoptosis por FasL son las células T efectoras (Klebanoff *et al.*, 2016). De hecho, se ha observado que exosomas de origen tumoral que expresan FasL inhiben el sistema inmune promoviendo la apoptosis de células T CD8+, sin afectar a las células T CD4+ (Abusamra *et al.*, 2005). Como se mencionó previamente distintos estudios han observado un aumento en el número de células TCD8+ en el timo, el bazo y los nódulos linfáticos, tras la exposición a un AE (Singhal *et al.*, 2021; Xiao *et al.*, 2016, 2019). Por otra parte, Fas parece promover la diferenciación precoz de células T<sub>N</sub>, al aumentar la señalización de Akt, lo cual disminuye el número de células T<sub>CM</sub> y aumenta el de células T<sub>ME</sub> (Klebanoff *et al.*, 2016). Estas últimas disminuyen con el AE y se produce un aumento de las células T<sub>CM</sub> y T<sub>N</sub> (Singhal *et al.*, 2021).

De las citocinas analizadas, la única cuya expresión se eleva significativamente en los exosomas tras el enriquecimiento es IGFBP-6. IGFBP-6 pertenece a la familia de las proteínas de unión al factor de crecimiento parecido a la insulina, IGFBPs, por sus siglas en inglés. Esta familia de proteínas se encarga principalmente de la regulación de las acciones de los factores de crecimiento parecidos a la insulina (IGFs) (Bach, 2015).

IGFBP-6 es un inhibidor de las funciones de IGF-II, se caracteriza por poseer gran afinidad por IGF-II, mientras que su afinidad por IGF-I es baja (Roghani *et al.*, 1991). En osteoblastos, IGF-BP-6 disminuye los efectos proliferativos y metabólicos de IGF-II (Schmid *et al.*, 1995). También interfiere en la proliferación y diferenciación de mioblastos promovida por IGF-II (Bach *et al.*, 1994; Bach *et al.*, 1995). Otras células en las que se ha demostrado su efecto inhibitor de crecimiento son los queratinocitos (Kato *et al.*, 1995). A pesar de la relación existente entre IGF-II e IGFBP-6, esta última puede afectar la proliferación de fibroblastos de forma independiente a IGF-II (Raykha *et al.*, 2013). Recientemente, se ha demostrado un rol de IGFBP-6 en la activación y quimiotaxis de neutrófilos (Conese *et al.*, 2018). Al igual que en la quimiotaxis de células T y de monocitos *in vitro* (Alunno *et al.*, 2017; Liso *et al.*, 2017).

### **Exosomas y contenido proteico: efectos de las proteínas a nivel central**

La eotaxina, también llamada CCL11, es una quimiocina cuyo efecto quimioatractivo afecta específicamente a los eosinófilos (Jose *et al.*, 1994). Hasta el momento no existe algún estudio que describa el efecto del AE en los eosinófilos. En cambio, sí existen estudios sobre el AE y los niveles de eotaxina. En un estudio reciente, se demostró que el AE produce una disminución de CCL11 en el plasma de ratones, lo cual contribuye a la disminución en la activación de la microglía, al aumento de la neurogénesis y al mantenimiento a largo plazo de la memoria espacial (Scabia *et al.*, 2021). Datos que concuerdan con la disminución en la expresión de eotaxina dentro de los exosomas de las ratonas BALB/c expuestas a un AE por 14 días, observada en el presente trabajo. Además, existe una relación entre el aumento de edad y de los niveles de eotaxina (Jeon *et al.*, 2012; Villeda *et al.*, 2011). Villeda *et al.* (2011), identificaron a la eotaxina como uno de los responsables de la disminución en la neurogénesis, en el aprendizaje y la memoria, relacionados con la edad en ratones (Villeda *et al.*, 2011). Por lo que la disminución en los niveles de eotaxina en el presente estudio podría ser uno de los mecanismos por los cuales el AE favorece la neurogénesis y la memoria. Sin embargo, esta especulación requiere ser probada en el contexto de los posibles beneficios de los exosomas, además es necesario corroborar los cambios en la expresión de proteínas en los medios depletados de exosomas.

El AE también afecta la expresión de la fractalquina, en donde se produce un aumento a nivel hipocampal (Jurgens & Johnson, 2012). Mientras que la ausencia de CX3CR1 disminuye los efectos plásticos del AE, ilustrados por la falta de mejora en la LTP (Maggi

*et al.*, 2011). En ese sentido, en el CNS la fractalquina se expresa principalmente en las neuronas (Harrison *et al.*, 1998). Ha sido relacionada con efectos antiinflamatorios, mediante la regulación negativa de la activación de la microglía, en dónde disminuye la liberación de citocinas inflamatorias y de especies reactivas de oxígeno, promoviendo la neuroprotección (Jiang *et al.*, 2022; Zujovic *et al.*, 2000). También se le ha relacionado con la regulación positiva de la neurogénesis hipocampal (Bachstetter *et al.*, 2011). Por otra parte, en un knockout de CX3CR1 disminuye la poda neuronal y la conectividad sináptica junto con una disminución en el número de células de la microglía (Paolicelli *et al.*, 2011). Por otra parte, aunque no hay hasta el momento, estudios sobre CXCL16 y AE, esta citocina tiene efectos en SNC que son beneficiosos. En el SNC se ha demostrado su papel neuroprotector (Rosito *et al.*, 2012) y su capacidad para promover un fenotipo antiinflamatorio en las células de la microglía (Lepore *et al.*, 2018). La disminución de CXCL16 y de CX3CL1 dentro de los exosomas de las ratonas expuestas a AE parece contraponerse a lo documentado previamente con respecto a los efectos del AE a nivel central. Lo cual resulta más evidente para CX3CL1 puesto que ha sido demostrado un aumento con el AE y su efecto positivo en la plasticidad. De cualquier forma, CXCL16, teniendo en cuenta el papel que juega en el SNC, parecería tener efectos en el SNC que podrían mediar los beneficios del AE en la neurogénesis (Fabel *et al.*, 2009; Kempermann *et al.*, 1996). En cambio, no existen muchos estudios sobre las funciones de CTACK en el SNC, pero se ha documentado un aumento de CTACK, tanto en suero como en el fluido cerebroespinal en pacientes con esclerosis múltiple, una enfermedad autoinmune (Rizvanov, 2017).

A nivel central, el GM-CSF participa en procesos de memoria y aprendizaje, en animales con un knockout para esta proteína ambos procesos se ven deteriorados (Krieger *et al.*, 2012). GM-CSF ha demostrado un efecto positivo en modelos animales de la enfermedad de Alzheimer. La administración de GM-CSF beneficia la memoria de los ratones transgénicos, contrarresta la disminución de nuevas neuronas y de células Treg y promueve el fenotipo antiinflamatorio en las células de la microglía (Kiyota *et al.*, 2018). En la microglía estimulada con LPS, GM-CSF también puede promover la supervivencia, además, dichas células parecen ejercer una función neuroprotectora. El aumento en la producción de GM-CSF en las células de la microglía está acompañado de un aumento en la presencia de la subunidad beta del receptor (Kamigaki *et al.*, 2016). Además, contrarresta la disminución de BDNF, los cambios morfológicos de las células de la microglía y la reducción de astrocitos, provocada por la administración de LPS, al mismo

tiempo que protege a las neuronas de la toxicidad (Mangano *et al.*, 2011). GM-CSF también tiene funciones neuroprotectoras en un modelo de accidente isquémico y antiapoptóticas *in vitro* (Schäbitz *et al.*, 2008).

Por su parte la IL-3 parece favorecer la activación de la microglía, permitiendo una mayor actividad en la remoción de los agregados A $\beta$ . Esto está principalmente relacionado con un aumento en la sensibilidad de las células de la microglía a IL-3, por un aumento en el receptor IL-3R alfa. En ausencia de IL-3 o de su receptor, no solo aumenta la agregación de A $\beta$ , sino también se produce un incremento en el déficit de memoria (McAlpine *et al.*, 2021). De la misma forma, se demostró la función neuroprotectora de IL-3 contra la degeneración producida por los agregados A $\beta$ . En un modelo animal de Alzheimer con baja muerte neuronal se produce un aumento de la subunidad beta y alfa del receptor para IL-3 en neuronas corticales (Zambrano *et al.*, 2010). IL-3 también protege neuronas de la neurotoxicidad producida por A $\beta$  (Zambrano *et al.*, 2007). Por otra parte, una mezcla de GM-CSF e IL-3 en un modelo de Parkinson, promueve la supervivencia de neuronas y un fenotipo de células de la microglía neuroprotectoras (Choudhury *et al.*, 2011). Tanto IL-3 como GM-CSF promueven el crecimiento de neuritas y la supervivencia de neuronas *in vitro* (Kannan *et al.*, 2000). Por otra parte, IL-3 participa en el desarrollo del cerebro y promueve el desarrollo de progenitores neurales (Luo *et al.*, 2012). Es importante mencionar que tanto para IL-3 como para GM-CSF la subunidad beta es esencial para la transducción de la señalización, de hecho, Jak 2 se asocia específicamente con dicha subunidad (Hansen *et al.*, 2008; Lilly *et al.*, 2001; Quelle *et al.*, 1994).

SCF ha demostrado tener efectos neuro-protectores tanto en casos de apoptosis inducida y excitotoxicidad (Dhandapani *et al.*, 2005), como en modelos de isquemia cerebral (Zhao *et al.*, 2007). Mientras que mutaciones en el gen que codifica para SCF en ratones, perjudican la memoria y aprendizaje espacial, así como una disminución en la transmisión sináptica de referencia entre el giro dentado y las células piramidales del Cuerno de Amón 3 (CA3) (Motro *et al.*, 1996). En ratas con una mutación en el gen que codifica para c-kit también se observa una disminución en la potenciación a largo plazo (LTP), además de la afectación en la memoria y el aprendizaje espacial ((Katafuchi *et al.*, 2000).

Así que tanto los ligandos de IL3RB como SCF tienen acciones en el SNC relacionadas con los procesos neurogénicos, la neuroprotección y la plasticidad cerebral, procesos que se ven beneficiados por el AE (Fabel *et al.*, 2009; Kempermann *et al.*, 1998). Aunado a esto, algunas de estas funciones están relacionadas con las vías de señalización

enriquecidas en el mapa de interacciones proteína-proteína. Como, por ejemplo, la promoción de la supervivencia de neuronas por IL-3 que está relacionado, en parte, con la activación de jak2 (Zambrano *et al.*, 2007). La promoción en la supervivencia de células de la microglía estimuladas con LPS mediada por GM-CSF está relacionada con la vía de JAK/STAT (Kamigaki *et al.*, 2016). La vía JAK/STAT también se activa en neuronas protegidas por GM-CSF de la citotoxicidad provocada por esaturosporina (Choi *et al.*, 2007). Cuatro vías KEGG fueron relacionadas con SCF y con su receptor, KIT, la vía de linaje celular hematopoyético, la vía de las MAPK, la vía RAS y la vía PI3K-AKT. Estas vías han sido relacionadas por distintos investigadores con las funciones que ejerce SCF en el CNS. Por ejemplo, en un modelo animal de diabetes se demostró que la protección contra apoptosis de neuronas corticales por SCF está relacionada con la activación tanto de AKT como de MAPK (Li *et al.*, 2009). AKT también forma parte del mecanismo por el cual SCF protege las neuronas corticales de la apoptosis inducida por glutamato o por camptotecina (Dhandapani *et al.*, 2005). Además, a través de la vía de señalización cinasa MAPK/ERK (MEK)/cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK)/p58, SCF en conjunto con G-CSF promueve el crecimiento de neuritas (Gao & Zhao, 2018). Teniendo en cuenta las modificaciones que se producen en el SNC por la exposición al AE, es intrigante que se produzca una disminución de SCF y de IL3RB en los exosomas de suero de los ratones que estuvieron expuestos al AE. Dado que IL3RB es un receptor, es posible que sirva como un señuelo y que inhiba la captación de sus ligandos por receptores celulares, como ha sido reportado para exosomas con el receptor de tirotrina (Edo *et al.*, 2019). Otra posibilidad es que se transporte el receptor para aumentar su expresión en las células, una función que también se ha comprobado en el caso del receptor oncogénico EGFRvIII (Al-Nedawi *et al.*, 2008).

En cuanto a FasL, en los astrocitos la activación de Fas puede llevar a la apoptosis celular o a la liberación de citocinas proinflamatorias, en donde el IFN- $\gamma$  puede volverlos resistentes a la apoptosis (Saas *et al.*, 1999). Sin embargo, durante el desarrollo, FasL controla la morfogénesis neuronal y vascular del cerebro y de la retina por medio de un conjunto de señalizaciones en las que participan las vías PI3K/Akt y MAPK (ERK1/2) (Chen *et al.*, 2017). La activación de la vía de señalización de ERK, también promueve el desarrollo de células madre neurales y un aumento en la memoria espacial (Kim *et al.*, 2020). FasL también activa la vía de señalización de PI3K promoviendo la diferenciación y supervivencia de células madre neuronales, *in vitro*, mientras que la ausencia de FasL perjudica la memoria de trabajo y la neurogénesis (Corsini *et al.*, 2009). De nuevo, FasL

posee una gran variedad de funciones, promueve la inflamación, mantiene el sistema inmune en homeostasis y promueve la diferenciación y supervivencia de las células madre neuronales. Teniendo esto en cuenta y que las vías de señalización que surgieron con el segundo mapa de interacción proteína-proteína participan en la promoción de la memoria y la neurogénesis, parece que su disminución podría resultar contraproducente para el aumento que se observa en la neurogénesis con el AE (Fabel *et al.*, 2009), al igual que en la promoción de la memoria (Rampon *et al.*, 2000; Schrijver *et al.*, 2002).

A nivel del CNS, IGFBP-6 parece tener efectos perjudiciales a nivel celular y participar en estados patológicos. En ratones transgénicos con sobreexpresión de IGFBP-6 se observa una disminución en el tamaño y peso del cerebelo junto con una disminución en la proliferación de astrocitos (Bienvenu *et al.*, 2004). En un modelo de lesión de médula espinal, aumentan los niveles proteicos y la expresión del RNA de IGFBP-6 tras la lesión en neuronas, con una marcada presencia en el citoplasma y el núcleo. Es posible que IGFBP-6 se relacione con la apoptosis neuronal tras la lesión (Wang *et al.*, 2017). También se produce un aumento de IGFBP6 en neuronas motoras de pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica (Wilczak *et al.*, 2003). *In vitro* IGFBP6 también ha demostrado inhibir la diferenciación neuronal (Barkho *et al.*, 2006) y promover la apoptosis neuronal inducida por peróxido de oxígeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Wang *et al.*, 2017). Por otra parte, IGFBP-6 parece participar en distintos procesos como la senescencia. Sus niveles en plasma aumentan con la edad, en ratones y fibroblastos tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentan la secreción de esta proteína (Xie *et al.*, 2005). La liberación de IGFBP-6 en exosomas por células dendríticas se ha observado en condiciones de hipertermia y en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Conese *et al.*, 2020). Dadas las funciones antagónicas de IGFBP6 en la proliferación y diferenciación celular y su relación con la senescencia parece, de nuevo, estarse produciendo un efecto contrario dentro de los exosomas a lo que se esperaba.

La información aquí conjuntada demuestra que las ocho citocinas cuya expresión varió tienen una gran cantidad de funciones tanto en el sistema inmune como a nivel central. Así mismo, los exosomas en la circulación pueden provenir de una gran cantidad de tejidos y de células (Zhou *et al.*, 2017), y sus blancos también son muy variados (Lai *et al.*, 2014). Teniendo esto en cuenta, en conjunto con el alcance del presente estudio, en el que solamente se analizaron las variaciones en la expresión de las citocinas dentro de los exosomas, no es posible determinar la implicación de estos cambios producidos por el

AE. Sin embargo, se demostró que la exposición al AE de tan solo 14 días tiene un efecto en el contenido de proteínas de los exosomas de suero sanguíneo.

## **IX. Conclusión y limitaciones**

El presente estudio demuestra que la exposición al AE de tan solo 14 días tiene un efecto en el contenido de proteínas de los exosomas de suero sanguíneo. Por medio de la realización de microarreglos de anticuerpos se encontraron cambios en la expresión de ocho proteínas, implicadas en el sistema inmunológico, pero también con efectos a nivel central. Estas proteínas, a excepción de FasL y de IGFBP-6, forman una red de interacciones con sus ligandos, como se determinó por medio del análisis bioinformático de interacción proteína-proteína, el cual, además, resaltó ciertas rutas que podrían estarse modificando con el AE mediante los cambios en el contenido de proteínas de los exosomas. Los resultados apuntan a la necesidad de continuar con la caracterización de estas vesículas y la exploración de su función, tanto a nivel periférico como a nivel central, así como realizar la comparación del contenido de proteínas de los exosomas obtenidos de cerebro. Ya que probablemente estas vesículas pueden contribuir a modular algunos eventos a nivel central como son la exploración de eventos plásticos que parecieran ser regulados por los exosomas periféricos y/o por su contenido.



## **X. Limitaciones del Estudio**

Entre las limitaciones del estudio se encuentran las siguientes:

1. Para la identificación de las proteínas de los exosomas se mezclaron los sueros de cinco roedores para cada uno de los tres arreglos de anticuerpos.
2. El estudio sólo analizó las variaciones en la expresión de las citocinas por lo que no se obtuvo información sobre si estas ejercen alguna función.

## **XI. Perspectivas del estudio**

1. Clasificar las proteínas identificadas con los microarreglos de acuerdo con su familia y función.
2. Analizar los sueros depletados de exosomas.
3. Caracterizar la morfología de los exosomas por microscopía electrónica.
4. Identificar proteínas marcadoras de exosomas utilizando anticuerpos específicos.
5. Comparar el contenido de exosomas de suero y el de exosomas de cerebro.

## XII. Anexo. Expresión de las proteínas encontradas en los exosomas.

Citocina	CTRL	ENR	Valor de P
	Media ± EE	Media ± EE	
axl	33986 ± 13806	17010 ± 1317	0.1013 (ns)
BLC	29698 ± 13655	14121 ± 1660	0.1214 (ns)
CD30L	25222 ± 11923	9892 ± 2665	0.0954 (ns)
CD30/TNFRSF8	20203 ± 9925	9225 ± 4094	0.1513 (ns)
CD40	19468 ± 7756	10675 ± 5162	0.1774 (ns)
CRG-2	20901 ± 6743	9771 ± 3589	0.0651 (ns)
CTACK*	32103 ± 7379	18086 ± 2849	0.0373*
CXCL16*	23576 ± 9542	7781 ± 731.6	0.0460*
Eotaxina*	22292 ± 6729	7950 ± 1670	0.0231*
Eotaxina-2	23668 ± 8426	11863 ± 3393	0.0875 (ns)
Ligando FAS*	25424 ± 5377	10035 ± 3049	0.0125*
Fractalquina *	32011 ± 9893	13083 ± 4601	0.0397*
G-CSF	26163 ± 3011	17063 ± 5966	0.0778 (ns)
GM-CSF	22920 ± 3409	14786 ± 5488	0.0947 (ns)
IFN-gamma	22399 ± 5351	14451 ± 5284	0.1411 (ns)
IGF-BP-3	55530 ± 15172	61352 ± 3907	0.5548 (ns)
IGF-BP-5	20552 ± 7732	13859 ± 5619	0.292 (ns)
IGF-BP-6 *	77220 ± 17140	109531 ± 9353	0.0456*
IL1-alpha	28978 ± 14634	23326 ± 4855	0.56 (ns)
IL1-beta	22389 ± 15892	15276 ± 6099	0.5092 (ns)
IL2	23554 ± 10021	12891 ± 5670	0.184 (ns)
IL3	24015 ± 9604	9200 ± 4028	0.0694 (ns)
IL3 Rb *	23195 ± 9636	7216 ± 1849	0.0478*
IL4	17473 ± 10264	12334 ± 2393	0.4459 (ns)
IL5	18374 ± 13014	8527 ± 2709	0.2687 (ns)
IL6	20813 ± 14288	7852 ± 2744	0.1977 (ns)
IL9	23915 ± 12776	13688 ± 4544	0.2615 (ns)
IL10	19130 ± 11621	12227 ± 4302	0.3892 (ns)
IL12-p40/p70	19581 ± 11277	14808 ± 4418	0.5324 (ns)
IL12-p70	24868 ± 13619	20637 ± 5698	0.6456 (ns)
IL13	24045 ± 14938	19151 ± 6411	0.6296 (ns)
IL17	19379 ± 18138	15669 ± 5202	0.7506 (ns)
KC	28360 ± 20291	21384 ± 4206	0.5911 (ns)
Leptina R	28961 ± 27375	16228 ± 4051	0.4701 (ns)
Leptina R	30765 ± 25295	13832 ± 5616	0.3209 (ns)
LIX	95316 ± 15745	81875 ± 8381	0.2618 (ns)
L-Selectina	150994 ± 23830	134994 ± 3637	0.3144 (ns)
Linfotactina	13849 ± 11323	10211 ± 2420	0.6153 (ns)

MCP-1	25032 ± 20705	16001 ± 1848	0.4936 (ns)
MCP-5	22949 ± 23680	9896 ± 2915	0.397 (ns)
M-CSF	50927 ± 32869	33157 ± 5854	0.4088 (ns)
MIG	26049 ± 24830	12924 ± 3456	0.4158 (ns)
MIP-1-alpha	23121 ± 21440	11422 ± 3139	0.4027 (ns)
MIP-1-gamma	251397 ± 14496	307634 ± 52222	0.1467 (ns)
MIP-2	136311 ± 29584	121523 ± 13093	0.4728 (ns)
MIP-3-beta	23356 ± 21884	12279 ± 3660	0.436 (ns)
MIP-3-alpha	30751 ± 26761	19618 ± 3829	0.515 (ns)
PF4	265181 ± 64283	173508 ± 17653	0.0758 (ns)
P-Selectina	68567 ± 22811	56048 ± 11831	0.4463 (ns)
RANTES	19044 ± 11539	10212 ± 4032	0.2789 (ns)
SCF *	18274 ± 3511	10513 ± 2055	0.0298*
SDF-1-alpha	24882 ± 19026	18763 ± 4626	0.6171 (ns)
TARC	14370 ± 13681	7866 ± 3022	0.4664 (ns)
TCA-3	36541 ± 22100	28302 ± 4224	0.5604 (ns)
TECK	18083 ± 14795	11084 ± 3486	0.4697 (ns)
TIMP-1	14012 ± 10340	9251 ± 1609	0.4748 (ns)
TNF-alpha	11763 ± 10060	6956 ± 787.4	0.4557 (ns)
sTNF RI	12920 ± 8305	8860 ± 1883	0.4554 (ns)
sTNF RII	19471 ± 7451	14848 ± 1996	0.3578 (ns)
TPO	16883 ± 7542	11518 ± 1863	0.2977 (ns)
VCAM-1	233634 ± 13017	260670 ± 13292	0.0656 (ns)
VEGF	15606 ± 10168	9408 ± 1730	0.3568 (ns)
bFGF	98891 ± 87029	54834 ± 36543	0.4642 (ns)
DPPIV/CD26	89119 ± 80968	42121 ± 39822	0.418 (ns)
Dtk	121743 ± 102761	52429 ± 45719	0.3459 (ns)
E-Selectina	123287 ± 103856	59666 ± 50851	0.3946 (ns)
Fcg RIIB	238362 ± 125171	160999 ± 70120	0.4032 (ns)
Ligando Flt-3	87402 ± 99344	33826 ± 24167	0.4154 (ns)
GITR	56898 ± 51694	30445 ± 23618	0.4653 (ns)
HGF R	20684 ± 18343	21263 ± 26872	0.9769 (ns)
ICAM-1	197755 ± 73847	168994 ± 58861	0.6257 (ns)
IGFBP-2	275899 ± 128558	211532 ± 28589	0.4449 (ns)
IGF-I	1105026 ± 500481	751701 ± 52552	0.2908 (ns)
IGF-II	164067 ± 179457	64673 ± 43989	0.4042 (ns)
IL-15	99670 ± 101548	43897 ± 32752	0.4165 (ns)
IL-17B R	109905 ± 115715	50504 ± 39885	0.4479 (ns)
IL-7	91407 ± 98447	43427 ± 29320	0.4639 (ns)
I-TAC	74348 ± 77249	36652 ± 21970	0.4619 (ns)
Lungquina	104868 ± 83509	61158 ± 27897	0.4383 (ns)
MDC	59557 ± 45297	47614 ± 29191	0.7206 (ns)
MMP-2	78910 ± 19221	107144 ± 53035	0.4349 (ns)

MMP-3	53042 ± 30295	46456 ± 57106	0.8685 (ns)
Osteopontina	510159 ± 255839	406164 ± 153710	0.5787 (ns)
Osteoprotegerina	98943 ± 93262	56565 ± 64282	0.5523 (ns)
Pro-MMP-9	86502 ± 87405	45092 ± 44213	0.5046 (ns)
Resistina	439238 ± 138580	349691 ± 100226	0.4158 (ns)
Shh-N	47224 ± 48606	29138 ± 16361	0.5743 (ns)
Thymus CK-1	1052104 ± 672473	620680 ± 109781	0.3344 (ns)
TIMP-2	20749 ± 9374	15830 ± 3734	0.446 (ns)
TRANCE	15678 ± 7000	12522 ± 3764	0.5294 (ns)
TROY	20324 ± 10209	10511 ± 5152	0.2114 (ns)
TSLP	28388 ± 16743	15129 ± 10743	0.3126 (ns)
VEGF R1	26752 ± 17276	23346 ± 17175	0.8205 (ns)
VEGF R2	19122 ± 21293	8525 ± 8293	0.4669 (ns)
VEGF R3	14300 ± 18978	10187 ± 3173	0.73 (ns)
VEGF-D	13037 ± 11630	8482 ± 8841	0.6178 (ns)

## Referencias

- Abel, S., Hundhausen, C., Mentlein, R., Schulte, A., Berkhout, T. A., Broadway, N., Hartmann, D., Sedlacek, R., Dietrich, S., Muetze, B., Schuster, B., Kallen, K.-J., Saftig, P., Rose-John, S., & Ludwig, A. (2004). The Transmembrane CXC-Chemokine Ligand 16 Is Induced by IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  and Shed by the Activity of the Disintegrin-Like Metalloproteinase ADAM10. *The Journal of Immunology*, *172*(10), 6362–6372. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.10.6362>
- Abrami, L., Brandi, L., Moayeri, M., Brown, M. J., Krantz, B. A., Leppla, S. H., & VanderGoot, F. G. (2013). Hijacking Multivesicular Bodies Enables Long-Term and Exosome-Mediated Long-Distance Action of Anthrax Toxin. *Cell Reports*, *5*(4), 986–996. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.019>
- Abusamra, A. J., Zhong, Z., Zheng, X., Li, M., Ichim, T. E., Chin, J. L., & Min, W. P. (2005). Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *35*(2), 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2005.07.001>
- Adams, G. R., Zaldivar, F. P., Nance, D. M., Kodesh, E., Radom-Aizik, S., & Cooper, D. M. (2011). Exercise and leukocyte interchange among central circulation, lung, spleen, and muscle. *Brain, Behavior, and Immunity*, *25*(4), 658–666. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.01.002>
- Aharon, A., Spector, P., Ahmad, R. S., Horrany, N., Sabbach, A., Brenner, B., & Aharon-Peretz, J. (2020). Extracellular Vesicles of Alzheimer's Disease Patients as a Biomarker for Disease Progression. *Molecular Neurobiology*, *57*(10), 4156–4169. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02013-1>
- Alunno, A., Bistoni, O., Manetti, M., Cafaro, G., Valentini, V., Bartoloni, E., Gerli, R., & Liso, A. (2017). Insulin-like growth factor binding protein 6 in rheumatoid arthritis: A possible novel chemotactic factor? *Frontiers in Immunology*, *8*(MAY), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00554>
- Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhali, S., & Wood, M. J. A. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature Biotechnology*, *29*(4), 341–345. <https://doi.org/10.1038/nbt.1807>
- Ancuta, P., Rao, R., Moses, A., Mehle, A., Shaw, S. K., Luscinskas, F. W., & Gabuzda, D. (2003). Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *Journal of Experimental Medicine*, *197*(12), 1701–1707. <https://doi.org/10.1084/jem.20022156>
- André, F., Chaput, N., Scharz, N. E. C., Flament, C., Aubert, N., Bernard, J., Lemonnier, F., Raposo, G., Escudier, B., Hsu, D.-H., Tursz, T., Amigorena, S., Angevin, E., & Zitvogel, L. (2004). Exosomes as Potent Cell-Free Peptide-Based Vaccine. I. Dendritic Cell-Derived

- Exosomes Transfer Functional MHC Class I/Peptide Complexes to Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 172(4), 2126–2136. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.4.2126>
- Arntz, O. J., Pieters, B. C. H., Oliveira, M. C., Broeren, M. G. A., Bennink, M. B., De Vries, M., Van Lent, P. L. E. M., Koenders, M. I., Van den Berg, W. B., Van der Kraan, P. M., & Van de Loo, F. A. J. (2015). Oral administration of bovine milk derived extracellular vesicles attenuates arthritis in two mouse models. *Molecular Nutrition and Food Research*, 59(9), 1701–1712. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500222>
- Arranz, L., De Castro, N. M., Baeza, I., Maté, I., Viveros, M. P., & De La Fuente, M. (2010). Environmental enrichment improves age-related immune system impairment: Long-term exposure since adulthood increases life span in mice. *Rejuvenation Research*, 13(4), 415–428. <https://doi.org/10.1089/rej.2009.0989>
- Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., & Geissmann, F. (2007). Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior. *Science*, 317(5838), 666–670. <https://doi.org/10.1126/science.1142883>
- Bach, L A, Hsieh, S., Brown, A. L., & Rechler, M. M. (1994). Recombinant human insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-6 inhibits IGF-II-induced differentiation of L6A1 myoblasts. *Endocrinology*, 135(5), 2168–2176. <https://doi.org/10.1210/endo.135.5.7525263>
- Bach, Leon A. (2015). Recent insights into the actions of IGFBP-6. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 9(2), 189–200. <https://doi.org/10.1007/s12079-015-0288-4>
- Bach, Leon A, Salemi, R., & Leeding, K. S. (1995). Roles of insulin-like growth factor (IGF) receptors and IGF-binding proteins in IGF-II-induced proliferation and differentiation of L6A1 rat myoblasts. *Endocrinology*, 136(11), 5061–5069. <https://doi.org/10.1210/endo.136.11.7588242>
- Bachstetter, A. D., Morganti, J. M., Jernberg, J., Schlunk, A., Mitchell, S. H., Brewster, K. W., Hudson, C. E., Cole, M. J., Harrison, J. K., Bickford, P. C., & Gemma, C. (2011). Fractalkine and CX 3CR1 regulate hippocampal neurogenesis in adult and aged rats. *Neurobiology of Aging*, 32(11), 2030–2044. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.11.022>
- Bahrini, I., Song, J. H., Diez, D., & Hanayama, R. (2015). Neuronal exosomes facilitate synaptic pruning by up-regulating complement factors in microglia. *Scientific Reports*, 5, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep07989>
- Baietti, M. F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., Zimmermann, P., & David, G. (2012).

- Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nature Cell Biology*, 14(7), 677–685. <https://doi.org/10.1038/ncb2502>
- Barkho, B. Z., Song, H., Aimone, J. B., Smrt, R. D., Kuwabara, T., Nakashima, K., Gage, F. H., & Zhao, X. (2006). Identification of astrocyte-expressed factors that modulate neural stem/progenitor cell differentiation. *Stem Cells and Development*, 15(3), 407–421. <https://doi.org/10.1089/scd.2006.15.407>
- Bayne, K., & Würbel, H. (2012). Mouse Enrichment. In *The Laboratory Mouse* (pp. 547–566). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382008-2.00023-4>
- Bazan, J. F., Bacon, K. B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., Greaves, D. R., Zlotnik, A., & Schall, T. J. (1997). A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*, 385(6617), 640–644. <https://doi.org/10.1038/385640a0>
- Becher, B., Spath, S., & Goverman, J. (2017). Cytokine networks in neuroinflammation. *Nature Reviews Immunology*, 17(1), 49–59. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.123>
- Benaroya-Milshtein, N., Hollander, N., Apter, A., Kukulansky, T., Raz, N., Wilf, A., Yaniv, I., & Pick, C. G. (2004). Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *European Journal of Neuroscience*, 20(5), 1341–1347. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03587.x>
- Bennett, E. L., Rosenzweig, M. R., & Diamond, M. C. (1969). Rat Brain: Effects of Environmental Enrichment on Wet and Dry Weights. *Science*, 163(3869), 825–826. <https://doi.org/10.1126/science.163.3869.825>
- Bezard, E., Dovero, S., Belin, D., Duconger, S., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S., Piazza, P. V., Gross, C. E., & Jaber, M. (2003). Enriched Environment Confers Resistance to 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine and Cocaine: Involvement of Dopamine Transporter and Trophic Factors. *Journal of Neuroscience*, 23(35), 10999–11007. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-35-10999.2003>
- Bhatnagar, S., Shinagawa, K., Castellino, F. J., & Schorey, J. S. (2007). Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood*, 110(9), 3234–3244. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-079152>
- Biau, D., Kernéis, S., Porcher, R. (2008). Statistics i Brief: The Importance of Sample Size in the Planning and Interpretation of Medical Research. *Clinical orthopedics and related research*, 466(9), 2282-2288.
- Bienvenu, G., Seurin, D., Grellier, P., Froment, P., Baudrimont, M., Monget, P., Le Bouc, Y., & Babajko, S. (2004). Insulin-like growth factor binding protein-6 transgenic mice: Postnatal

- growth, brain development, and reproduction abnormalities. *Endocrinology*, *145*(5), 2412–2420. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1196>
- Bobrie, A., Colombo, M., Krumeich, S., Raposo, G., & Théry, C. (2012). Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *Journal of Extracellular Vesicles*, *1*(1), 1–11. <https://doi.org/10.3402/jev.v1i0.18397>
- Brambilla, D., Chiari, M., Gori, A., & Cretich, M. (2019). Towards precision medicine: The role and potential of protein and peptide microarrays. *Analyst*, *144*(18), 5353–5367. <https://doi.org/10.1039/c9an01142k>
- Brod, S., Gobetti, T., Gittens, B., Ono, M., Perretti, M., & D'Acquisto, F. (2017). The impact of environmental enrichment on the murine inflammatory immune response. *JCI Insight*, *2*(7), e90723. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.90723>
- Broudy, V. C. (1997). Stem Cell Factor and Hematopoiesis. *BLOOD*, *90*(4), 1345–1364. <https://doi.org/10.1182/blood.V90.4.1345>
- Brown, M., Johnson, L. A., Leone, D. A., Majek, P., Vaahtomeri, K., Senfter, D., Bukosza, N., Schachner, H., Asfour, G., Langer, B., Hauschild, R., Parapatics, K., Hong, Y. K., Bennett, K. L., Kain, R., Detmar, M., Sixt, M., Jackson, D. G., & Kerjaschki, D. (2018). Lymphatic exosomes promote dendritic cell migration along guidance cues. *Journal of Cell Biology*, *217*(6), 2205–2221. <https://doi.org/10.1083/jcb.201612051>
- Buschler, A., & Manahan-Vaughan, D. (2012). Brief environmental enrichment elicits metaplasticity of hippocampal synaptic potentiation in vivo. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *6*(NOVEMBER 2012), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2012.00085>
- Cabrera-Muñoz, E. A., Olvera-Hernández, S., Vega-Rivera, N. M., Meneses-San Juan, D., Reyes-Haro, D., Ortiz-López, L., & Ramírez Rodríguez, G. B. (2022). Environmental Enrichment Differentially Activates Neural Circuits in FVB/N Mice, Inducing Social Interaction in Females but Agonistic Behavior in Males. *Neurochemical Research*, *47*(3), 781–794. <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03487-8>
- Campeau, S., Nyhuis, T. J., Sasse, S. K., Kryskow, E. M., Herlihy, L., Masini, C. V., Babb, J. A., Greenwood, B. N., Fleshner, M., & Day, H. E. W. (2010). Hypothalamic pituitary adrenal axis responses to low-intensity stressors are reduced after voluntary wheel running in rats. *Journal of Neuroendocrinology*, *22*(8), 872–888. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2010.02007.x>
- Cao, L., Choi, E. Y., Liu, X., Martin, A., Wang, C., Xu, X., & Durning, M. J. (2011). White to brown fat phenotypic switch induced by genetic and environmental activation of a hypothalamic-



- adipocyte axis. *Cell Metabolism*, 14(3), 324–338. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.06.020>
- Chapillon, P., Manneché, C., Belzung, C., & Caston, J. (1999). Rearing environmental enrichment in two inbred strains of mice: 1. Effects on emotional reactivity. *Behavior Genetics*, 29(1), 41–46. <https://doi.org/10.1023/A:1021437905913>
- Chea, S., Possot, C., Perchet, T., Petit, M., Cumano, A., & Golub, R. (2015). CXCR6 Expression Is Important for Retention and Circulation of ILC Precursors. *Mediators of Inflammation*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/368427>
- Chen, S., Tisch, N., Kegel, M., Yerbes, R., Hermann, R., Hudalla, H., Zuliani, C., Gülcüler, G. S., Zwadlo, K., von Engelhardt, J., Ruiz de Almodóvar, C., & Martin-Villalba, A. (2017). CNS Macrophages Control Neurovascular Development via CD95L. *Cell Reports*, 19(7), 1378–1393. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.056>
- Choi, J. K., Choi, B. H., Ha, Y., Park, H., Yoon, S. H., Park, H. C., & Park, S. R. (2007). Signal transduction pathways of GM-CSF in neural cell lines. *Neuroscience Letters*, 420(3), 217–222. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.03.065>
- Choudhury, M. E., Sugimoto, K., Kubo, M., Nagai, M., Nomoto, M., Takahashi, H., Yano, H., & Tanaka, J. (2011). A cytokine mixture of GM-CSF and IL-3 that induces a neuroprotective phenotype of microglia leading to amelioration of (6-OHDA)-induced Parkinsonism of rats. *Brain and Behavior*, 1(1), 26–43. <https://doi.org/10.1002/brb3.11>
- Colombo, M., Moita, C., Van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Manel, N., Moita, L. F., Théry, C., & Raposo, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of Cell Science*, 126(24), 5553–5565. <https://doi.org/10.1242/jcs.128868>
- Comazzetto, S., Murphy, M. M., Berto, S., Jeffery, E., Zhao, Z., & Morrison, S. J. (2019). Restricted Hematopoietic Progenitors and Erythropoiesis Require SCF from Leptin Receptor+ Niche Cells in the Bone Marrow. *Cell Stem Cell*, 24(3), 477–486.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.11.022>
- Conese, M., D’Oria, S., Castellani, S., Trotta, R., Montemurro, P., & Liso, A. (2018). Insulin-like growth factor-6 (IGFBP-6) stimulates neutrophil oxidative burst, degranulation and chemotaxis. *Inflammation Research*, 67(2), 107–109. <https://doi.org/10.1007/s00011-017-1107-6>
- Conese, M., Pace, L., Pignataro, N., Catucci, L., Ambrosi, A., Di Gioia, S., Tartaglia, N., & Liso, A. (2020). Insulin-like growth factor binding protein 6 is secreted in extracellular vesicles upon hyperthermia and oxidative stress in dendritic cells but not in monocytes. *International Journal*

of *Molecular Sciences*, 21(12), 1–10. <https://doi.org/10.3390/ijms21124428>

Corsini, N. S., Sancho-Martinez, I., Laudenklos, S., Glagow, D., Kumar, S., Letellier, E., Koch, P., Teodorczyk, M., Kleber, S., Klussmann, S., Wiestler, B., Brüstle, O., Mueller, W., Gieffers, C., Hill, O., Thiemann, M., Seedorf, M., Gretz, N., Sprengel, R., ... Martin-Villalba, A. (2009). The Death Receptor CD95 Activates Adult Neural Stem Cells for Working Memory Formation and Brain Repair. *Cell Stem Cell*, 5(2), 178–190. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.004>

Coumans, F. A. W., Brisson, A. R., Buzas, E. I., Dignat-George, F., Drees, E. E. E., El-Andaloussi, S., Emanuelli, C., Gasecka, A., Hendrix, A., Hill, A. F., Lacroix, R., Lee, Y., Van Leeuwen, T. G., Mackman, N., Mäger, I., Nolan, J. P., Van Der Pol, E., Pegtel, D. M., Sahoo, S., ... Nieuwland, R. (2017). Methodological guidelines to study extracellular vesicles. *Circulation Research*, 120(10), 1632–1648. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309417>

Da Silva, C. A., Kassel, O., Mathieu, E., Massard, G., Gasser, B., & Frossard, N. (2002). Inhibition by glucocorticoids of the interleukin-1 $\beta$ -enhanced expression of the mast cell growth factor SCF. *British Journal of Pharmacology*, 135(7), 1634–1640. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704617>

Dembic, Z. (2015). Introduction—Common Features About Cytokines. In *The Cytokines of the Immune System* (pp. 1–16). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-419998-9.00001-8>

Denzer, K., van Eijk, M., Kleijmeer, M. J., Jakobson, E., de Groot, C., & J. Geuze, H. (2000). Follicular Dendritic Cells Carry MHC Class II-Expressing Microvesicles at Their Surface. *The Journal of Immunology*, 165(3), 1259–1265. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.3.1259>

Devos, R., Plaetinck, G., Van Der Heyden, J., Cornelis, S., Vandekerckhove, J., Fiers, W., & Tavernier, J. (1991). Molecular basis of a high affinity murine interleukin-5 receptor. *EMBO Journal*, 10(8), 2133–2137. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07747.x>

Dhandapani, K. M., Wade, F. M., Wakade, C., Mahesh, V. B., & Brann, D. W. (2005). Neuroprotection by stem cell factor in rat cortical neurons involves AKT and NF $\kappa$ B. *Journal of Neurochemistry*, 95(1), 9–19. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03319.x>

Diamond, M. C., Ingham, C. A., Johnson, R. E., Bennett, E. L., & Rosenzweig, M. R. (1976). Effects of environment on morphology of rat cerebral cortex and hippocampus. *Journal of Neurobiology*, 7(1), 75–85. <https://doi.org/10.1002/neu.480070108>

Diamond, M. C., Johnson, R. E., Protti, A. M., Ott, C., & Kajisa, L. (1985). Plasticity in the 904-day-old male rat cerebral cortex. *Experimental Neurology*, 87(2), 309–317. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(85\)90221-3](https://doi.org/10.1016/0014-4886(85)90221-3)

Dickens, A. M., Tovar-Y-Romo, L. B., Yoo, S. W., Trout, A. L., Bae, M., Kanmogne, M., Megra, B.,

- Williams, D. W., Witwer, K. W., Gacias, M., Tabatadze, N., Cole, R. N., Casaccia, P., Berman, J. W., Anthony, D. C., & Haughey, N. J. (2017). Astrocyte-shed extracellular vesicles regulate the peripheral leukocyte response to inflammatory brain lesions. *Science Signaling*, *10*(473). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aai7696>
- Ding, L., Saunders, T. L., Enikolopov, G., & Morrison, S. J. (2012). Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature*, *481*(7382), 457–462. <https://doi.org/10.1038/nature10783>
- Dozio, V., & Sanchez, J. C. (2017). Characterisation of extracellular vesicle-subsets derived from brain endothelial cells and analysis of their protein cargo modulation after TNF exposure. *Journal of Extracellular Vesicles*, *6*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1302705>
- Drenth, J. P. H., Van Uum, S. H. M., Van Deuren, M., Pesman, G. J., Van Der Ven- Jongekrijg, J., & Van Der Meer, J. W. M. (1995). Endurance run increases circulating IL-6 and IL-1ra but downregulates ex vivo TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production. *Journal of Applied Physiology*, *79*(5), 1497–1503. <https://doi.org/10.1152/jappl.1995.79.5.1497>
- During, M. J., Liu, X., Huang, W., Magee, D., Slater, A., McMurphy, T., Wang, C., & Cao, L. (2015). Adipose VEGF links the white-to-brown fat switch with environmental, genetic, and pharmacological stimuli in male mice. *Endocrinology*, *156*(6), 2059–2073. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1905>
- E, L., Burns, J. M., & Swerdlow, R. H. (2014). Effect of high-intensity exercise on aged mouse brain mitochondria, neurogenesis, and inflammation. *Neurobiology of Aging*, *35*(11), 2574–2583. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.05.033>
- Edgar, J. R. (2016). Q & A: What are exosomes, exactly? *BMC Biology*, *14*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0268-z>
- Edgar, J. R., Eden, E. R., & Futter, C. E. (2014). Hrs- and CD63-Dependent Competing Mechanisms Make Different Sized Endosomal Intraluminal Vesicles. *Traffic*, *15*(2), 197–211. <https://doi.org/10.1111/tra.12139>
- Emmanouilidou, E., Melachroinou, K., Roumeliotis, T., Garbis, S. D., Ntzouni, M., Margaritis, L. H., Stefanis, L., & Vekrellis, K. (2010). Cell-produced  $\alpha$ -synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *Journal of Neuroscience*, *30*(20), 6838–6851. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5699-09.2010>
- Escola, J. M., Kleijmeer, M. J., Stoorvogel, W., Griffith, J. M., Yoshie, O., & Geuze, H. J. (1998). Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *Journal of Biological*

*Chemistry*, 273(32), 20121–20127. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.32.20121>

- Fabel, K., Fabel, K., Tam, B., Kaufer, D., Baiker, A., Simmons, N., Kuo, C. J., & Palmer, T. D. (2003). VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 18(10), 2803–2812. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2003.03041.x>
- Fabel, K., Wolf, S. A., Ehninger, D., Babu, H., Leal-Galicia, P., & Kempermann, G. (2009). Additive effects of physical exercise and environmental enrichment on adult hippocampal neurogenesis in mice. *Frontiers in Neuroscience*, 3(NOV), 1–7. <https://doi.org/10.3389/neuro.22.002.2009>
- Feng, D., Zhao, W. L., Ye, Y. Y., Bai, X. C., Liu, R. Q., Chang, L. F., Zhou, Q., & Sui, S. F. (2010). Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic*, 11(5), 675–687. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01041.x>
- Flanagan, J. G., & Leder, P. (1990). *The kit Ligand: A Cell Surface Molecule in Steel Mutant Fibroblasts*. 63.
- Foglesong, G. D., Queen, N. J., Huang, W., Widstrom, K. J., & Cao, L. (2019). Enriched environment inhibits breast cancer progression in obese models with intact leptin signaling. *Endocrine-Related Cancer*, 26(5), 483–495. <https://doi.org/10.1530/ERC-19-0075>
- Fong, A. M., Robinson, L. A., Steeber, D. A., Tedder, T. F., Yoshie, O., Imai, T., & Patel, D. D. (1998). Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *Journal of Experimental Medicine*, 188(8), 1413–1419. <https://doi.org/10.1084/jem.188.8.1413>
- Fratelli, P., Sironi, M., Bianchi, G., D'Ambrosio, D., Albanesi, C., Stoppacciaro, A., Chieppa, M., Allavena, P., Ruco, L., Girolomoni, G., Sinigaglia, F., Vecchi, A., & Mantovani, A. (2001). Fractalkine (CX3CL1) as an amplification circuit of polarized Th1 responses. *Journal of Clinical Investigation*, 107(9), 1173–1181. <https://doi.org/10.1172/JCI11517>
- Freund, J., Brandmaier, A. M., Lewejohann, L., Kirste, I., Kritzer, M., Kruger, A., Sachser, N., Lindenberger, U., & Kempermann, G. (2013). Emergence of Individuality in Genetically Identical Mice. *Science*, 340(6133), 756–759. <https://doi.org/10.1126/science.1235294>
- Frodermann, V., Rohde, D., Courties, G., Severe, N., Schloss, M. J., Amatullah, H., McAlpine, C. S., Cremer, S., Hoyer, F. F., Ji, F., van Koeveerden, I. D., Herisson, F., Honold, L., Masson, G. S., Zhang, S., Grune, J., Iwamoto, Y., Schmidt, S. P., Wojtkiewicz, G. R., ... Nahrendorf, M. (2019). Exercise reduces inflammatory cell production and cardiovascular inflammation via instruction of hematopoietic progenitor cells. *Nature Medicine*, 25(11), 1761–1771. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0633-x>

- Frühbeis, C., Fröhlich, D., & Krämer-Albers, E. M. (2012). Emerging roles of exosomes in neuron-glia communication. *Frontiers in Physiology*, 3 APR(April), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00119>
- Gao, K., Jin, J., Huang, C., Li, J., Luo, H., Li, L., Huang, Y., & Jiang, Y. (2019). Exosomes derived from septic mouse serum modulate immune responses via exosome-associated cytokines. *Frontiers in Immunology*, 10(JULY), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01560>
- Gao, M., & Zhao, L. R. (2018). Turning Death to Growth: Hematopoietic Growth Factors Promote Neurite Outgrowth through MEK/ERK/p53 Pathway. *Molecular Neurobiology*, 55(7), 5913–5925. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0814-x>
- Germanov, E., Veinotte, L., Cullen, R., Chamberlain, E., Butcher, E. C., & Johnston, B. (2008). Critical Role for the Chemokine Receptor CXCR6 in Homeostasis and Activation of CD1d-Restricted NKT Cells. *The Journal of Immunology*, 181(1), 81–91. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.1.81>
- Ghossoub, R., Lembo, F., Rubio, A., Gaillard, C. B., Bouchet, J., Vitale, N., Slavik, J., Machala, M., & Zimmermann, P. (2014). Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms4477>
- Gibbs, B. F., Arm, J. P., Gibson, K., Lee, T. H., & Pearce, F. L. (1997). *Human lung mast cells release small amounts of interleukin-4 and tumour necrosis factor- $\alpha$  in response to stimulation by anti-IgE and stem cell factor.* 73–78.
- Gómez-Molina, C., Sandoval, M., Henzi, R., Ramírez, J. P., Varas-Godoy, M., Luarte, A., Lafourcade, C. A., Lopez-Verrilli, A., Smalla, K.-H., Kaehne, T., & Wyneken, U. (2019). Small Extracellular Vesicles in Rat Serum Contain Astrocyte-Derived Protein Biomarkers of Repetitive Stress. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 22(3), 232–246. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyy098>
- Gorman, D. M., Itoh, N., Kitamura, T., Schreurs, J., Yonehara, S., Yahara, I., Arai, K. I., & Miyajima, A. (1990). Cloning and expression of a gene encoding an interleukin 3 receptor-like protein: Identification of another member of the cytokine receptor gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(14), 5459–5463. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.14.5459>
- Greaves, D. R., Häkkinen, T., Lucas, A. D., Liddiard, K., Jones, E., Quinn, C. M., Senaratne, J., Green, F. R., Tyson, K., Boyle, J., Shanahan, C., Weissberg, P. L., Gordon, S., & Ylä-Herttualla, S. (2001). Linked chromosome 16q13 chemokines, macrophage-derived chemokine, fractalkine, and thymus- and activation-regulated chemokine, are expressed in

- human atherosclerotic lesions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21(6), 923–929. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.21.6.923>
- Greening, D. W., Gopal, S. K., Xu, R., Simpson, R. J., & Chen, W. (2015). Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 40, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2015.02.009>
- Greenough, W. T., & Volkmar, F. R. (1973). Pattern of dendritic branching in occipital cortex of rats reared in complex environments. *Experimental Neurology*, 40(2), 491–504. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(73\)90090-3](https://doi.org/10.1016/0014-4886(73)90090-3)
- Greter, M., Helft, J., Chow, A., Hashimoto, D., Mortha, A., Agudo-Cantero, J., Bogunovic, M., Gautier, E. L., Miller, J., Leboeuf, M., Lu, G., Aloman, C., Brown, B. D., Pollard, J. W., Xiong, H., Randolph, G. J., Chipuk, J. E., Frenette, P. S., & Merad, M. (2012). GM-CSF Controls Nonlymphoid Tissue Dendritic Cell Homeostasis but Is Dispensable for the Differentiation of Inflammatory Dendritic Cells. *Immunity*, 36(6), 1031–1046. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.027>
- Gross, J. C., Chaudhary, V., Bartscherer, K., & Boutros, M. (2012). Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nature Cell Biology*, 14(10), 1036–1045. <https://doi.org/10.1038/ncb2574>
- Gualtieri, F., Brégère, C., Laws, G. C., Armstrong, E. A., Wylie, N. J., Moxham, T. T., Guzman, R., Boswell, T., & Smulders, T. V. (2017). Effects of environmental enrichment on doublecortin and BDNF expression along the dorso-ventral axis of the dentate gyrus. *Frontiers in Neuroscience*, 11(SEP), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00488>
- Guilliams, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., Deswarte, K., Malissen, B., Hammad, H., & Lambrecht, B. N. (2013). Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *Journal of Experimental Medicine*, 210(10), 1977–1992. <https://doi.org/10.1084/jem.20131199>
- Gurunathan, S., Kang, M.-H., Jeyaraj, M., Qasim, M., & Kim, J.-H. (2019). Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells*, 8(4), 307. <https://doi.org/10.3390/cells8040307>
- Hansen, G., Hercus, T. R., McClure, B. J., Stomski, F. C., Dottore, M., Powell, J., Ramshaw, H., Woodcock, J. M., Xu, Y., Guthridge, M., McKinstry, W. J., Lopez, A. F., & Parker, M. W. (2008). The Structure of the GM-CSF Receptor Complex Reveals a Distinct Mode of Cytokine Receptor Activation. *Cell*, 134(3), 496–507. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.053>
- Hao, Y., Li, Y., Li, H., Lyu, M., Zhang, D., Fu, R., Guan, Y., Wang, S., Sun, B., Dou, X., Zhang, L., &

- Yang, R. (2017). Increased plasma sCXCL16 levels may have a relationship with Th1/Th2 imbalance in primary immune thrombocytopenia. *Cytokine*, 99(March), 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.08.024>
- Hara, T., & Miyajima, A. (1992). Two distinct functional high affinity receptors for mouse interleukin-3 (IL-3). *EMBO Journal*, 11(5), 1875–1884. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05239.x>
- Harding, C., Heuser, J., & Stahl, P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *The Journal of Cell Biology*, 97(2), 329–339. <https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.329>
- Harrison, J. K., Jiang, Y., Chen, S., Xia, Y., Maciejewski, D., Mcnamara, R. K., Streit, W. J., Salafra, M. N., Adhikari, S., Thompson, D. A., Botti, P., Bacon, K. B., & Feng, L. (1998). Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(18), 10896–10901. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.18.10896>
- He, Q., Moore, T. T., Eko, F. O., Lyn, D., Ananaba, G. A., Martin, A., Singh, S., James, L., Stiles, J., Black, C. M., & Igietsme, J. U. (2005). Molecular Basis for the Potency of IL-10-Deficient Dendritic Cells as a Highly Efficient APC System for Activating Th1 Response. *The Journal of Immunology*, 174(8), 4860–4869. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.8.4860>
- Himmerich, H., Patsalos, O., Lichtblau, N., & Ibrahim, M. A. A. (2019). *Cytokine Research in Depression: Principles, Challenges, and Open Questions*. 10(February). <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00030>
- Hochheiser, K., Heuser, C., Krause, T. A., Teteris, S., Ilias, A., Weisheit, C., Hoss, F., Tittel, A. P., Knolle, P. A., Panzer, U., Engel, D. R., Tharaux, P. L., & Kurts, C. (2013). Exclusive CX3CR1 dependence of kidney DCs impacts glomerulonephritis progression. *Journal of Clinical Investigation*, 123(10), 4242–4254. <https://doi.org/10.1172/JCI70143>
- Hohlbaum, A. M., Gregory, M. S., Ju, S.-T., & Marshak-Rothstein, A. (2001). Fas Ligand Engagement of Resident Peritoneal Macrophages In Vivo Induces Apoptosis and the Production of Neutrophil Chemotactic Factors. *The Journal of Immunology*, 167(11), 6217–6224. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.11.6217>
- Hohlbaum, A. M., Moe, S., & Marshak-Rothstein, A. (2000). Opposing effects of transmembrane and soluble Fas ligand expression on inflammation and tumor cell survival. *Journal of Experimental Medicine*, 191(7), 1209–1219. <https://doi.org/10.1084/jem.191.7.1209>
- Homey, B., Alenius, H., Müller, A., Soto, H., Bowman, E. P., Yuan, W., McEvoy, L., Lauerma, A. I.,

- Assmann, T., Bünemann, E., Lehto, M., Wolff, H., Yen, D., Marxhausen, H., To, W., Sedgwick, J., Ruzicka, T., Lehmann, P., & Zlotnik, A. (2002). CCL27–CCR10 interactions regulate T cell–mediated skin inflammation. *Nature Medicine*, *8*(2), 157–165. <https://doi.org/10.1038/nm0202-157>
- Homey, B., Wang, W., Soto, H., Buchanan, M. E., Wiesenborn, A., Catron, D., Müller, A., McClanahan, T. K., Dieu-Nosjean, M.-C., Orozco, R., Ruzicka, T., Lehmann, P., Oldham, E., & Zlotnik, A. (2000). Cutting Edge: The Orphan Chemokine Receptor G Protein-Coupled Receptor-2 (GPR-2, CCR10) Binds the Skin-Associated Chemokine CCL27 (CTACK/ALP/ILC). *The Journal of Immunology*, *164*(7), 3465–3470. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.7.3465>
- Hsu, C., Morohashi, Y., Yoshimura, S. I., Manrique-Hoyos, N., Jung, S. Y., Lauterbach, M. A., Bakhti, M., Grønberg, M., Möbius, W., Rhee, J. S., Barr, F. A., & Simons, M. (2010). Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *Journal of Cell Biology*, *189*(2), 223–232. <https://doi.org/10.1083/jcb.200911018>
- Imai, T., Hieshima, K., Haskell, C., Baba, M., Nagira, M., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S., Nomiyama, H., Schall, T. J., & Yoshie, O. (1997). Identification and Molecular Characterization of Fractalkine Receptor CX3CR1, which Mediates Both Leukocyte Migration and Adhesion. *Cell*, *91*(4), 521–530. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80438-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80438-9)
- Itoh, N., Yonehara, S., Schreurs, J., Gorman, D., Maruyama, K., Ishii, A., Yahara, I., Arai, K., & Miyajima, A. (1990). Cloning of an interleukin-3 receptor gene: a member of a distinct receptor gene family. *Science*, *247*(4940), 324–327. <https://doi.org/10.1126/science.2404337>
- Jankowsky, J. L., Melnikova, T., Fadale, D. J., Xu, G. M., Slunt, H. H., Gonzales, V., Younkin, L. H., Younkin, S. G., Borchelt, D. R., & Savonenko, A. V. (2005). Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, *25*(21), 5217–5224. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5080-04.2005>
- Jeon, H., Mun, G. I., & Boo, Y. C. (2012). Analysis of serum cytokine/chemokine profiles affected by aging and exercise in mice. *Cytokine*, *60*(2), 487–492. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.07.014>
- Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L., & Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry*, *262*(19), 9412–9420. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)48095-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)48095-7)
- Jose, P. J., Griffiths-Johnson, D. A., Collins, P. D., Walsh, D. T., Moqbel, R., Totty, N. F., Truong, O., Hsuan, J. J., & Williams, T. J. (1994). Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant



- cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 179(3), 881–887. <https://doi.org/10.1084/jem.179.3.881>
- Ju, S. Te, Panka, D. J., Cui, H., Ettinger, R., Ei-Khatib, M., Sherrf, D. H., Stanger, B. Z., & Marshak-Rothstein, A. (1995). Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. In *Nature* (Vol. 373, Issue 6513, pp. 444–448). <https://doi.org/10.1038/373444a0>
- Kägi, D., Vignaux, F., Ledermann, B., Bürki, K., Depraetere, V., Nagata, S., Hengartner, H., & Golstein, P. (1994). Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science*, 265(5171), 528–530. <https://doi.org/10.1126/science.7518614>
- Kajimoto, T., Okada, T., Miya, S., Zhang, L., & Nakamura, S. I. (2013). Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes. *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms3712>
- Kamigaki, M., Hide, I., Yanase, Y., Shiraki, H., Harada, K., Tanaka, Y., Seki, T., Shirafuji, T., Tanaka, S., Hide, M., & Sakai, N. (2016). The Toll-like receptor 4-activated neuroprotective microglia subpopulation survives via granulocyte macrophage colony-stimulating factor and JAK2/STAT5 signaling. *Neurochemistry International*, 93, 82–94. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.01.003>
- Kannan, Y., Moriyama, M., Sugano, T., Yamate, J., Kuwamura, M., Kagaya, A., & Kiso, Y. (2000). Neurotrophic Action of Interleukin 3 and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor on Murine Sympathetic Neurons. *Neuroimmunomodulation*, 8(3), 132–141. <https://doi.org/10.1159/000054273>
- Kany, S., Vollrath, J. T., & Relja, B. (2019). Cytokines in Inflammatory Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 6008. <https://doi.org/10.3390/ijms20236008>
- Karlsson, L., González-Alvarado, M. N., Motalleb, R., Wang, Y., Wang, Y., Börjesson, M., Zhu, C., & Kuhn, H. G. (2021). Constitutive PGC-1 $\alpha$  Overexpression in Skeletal Muscle Does Not Contribute to Exercise-Induced Neurogenesis. *Molecular Neurobiology*, 58(4), 1465–1481. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02189-6>
- Katafuchi, T., Li, A. J., Hirota, S., Kitamura, Y., & Hori, T. (2000). Impairment of spatial learning and hippocampal synaptic potentiation in c-kit mutant rats. *Learning and Memory*, 7(6), 383–392. <https://doi.org/10.1101/lm.33900>
- Kato, M., Ishizaki, A., Hellman, U., Wernstedt, C., Kyogoku, M., Miyazono, K., Heldin, C. H., & Funahashi, K. (1995). A human keratinocyte cell line produces two autocrine growth inhibitors, transforming growth factor- $\beta$  and insulin-like growth factor binding protein-6, in a calcium- and

cell density-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*, 270(21), 12373–12379. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.21.12373>

Kaufman, J. C., Harris, T. J., Higgins, J., & Maisel, A. S. (1994). Exercise-induced enhancement of immune function in the rat. *Circulation*, 90(1), 525–532.

<https://doi.org/10.1161/01.CIR.90.1.525>

Keller, C., Keller, P., Giralt, M., Hidalgo, J., & Pedersen, B. K. (2004). Exercise normalises overexpression of TNF- $\alpha$  in knockout mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 321(1), 179–182. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.06.129>

Kempermann, G. (2019). Environmental enrichment, new neurons and the neurobiology of individuality. *Nature Reviews Neuroscience*, 20(4), 235–245. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0120-x>

Kempermann, G., Kuhn, H. G., & Gage, F. H. (1996). *in an Enriched Environment*. 7079(1995), 432–434.

Kempermann, G., Kuhn, H. G., & Gage, F. H. (1998). Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *Journal of Neuroscience*, 18(9), 3206–3212. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-09-03206.1998>

Kerfoot, S. M., Lord, S. E., Bell, R. B., Gill, V., Robbins, S. M., & Kubes, P. (2003). Human fractalkine mediates leukocyte adhesion but not capture under physiological shear conditions; a mechanism for selective monocyte recruitment. *European Journal of Immunology*, 33(3), 729–739. <https://doi.org/10.1002/eji.200323502>

Kim, C. H., Kunkel, E. J., Boisvert, J., Johnston, B., Campbell, J. J., Genovese, M. C., Greenberg, H. B., & Butcher, E. C. (2001). Bonzo/CXCR6 expression defines type 1-polarized T-cell subsets with extralymphoid tissue homing potential. *Journal of Clinical Investigation*, 107(5), 595–601. <https://doi.org/10.1172/JC111902>

Kim, K.-W., Vallon-Eberhard, A., Zigmond, E., Farache, J., Shezen, E., Shakhar, G., Ludwig, A., Lira, S. A., & Jung, S. (2011). In vivo structure/function and expression analysis of the CX3C chemokine fractalkine. *Blood*, 118(22), e156–e167. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-348946>

Kim, M. S., Haney, M. J., Zhao, Y., Mahajan, V., Deygen, I., Klyachko, N. L., Inskoe, E., Piroyan, A., Sokolsky, M., Okolie, O., Hingtgen, S. D., Kabanov, A. V., & Batrakova, E. V. (2016). Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 12(3), 655–664. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.10.012>

- Kim, S. H., Bianco, N. R., Shufesky, W. J., Morelli, A. E., & Robbins, P. D. (2007). MHC Class II + Exosomes in Plasma Suppress Inflammation in an Antigen-Specific and Fas Ligand/Fas-Dependent Manner. *The Journal of Immunology*, 179(4), 2235–2241. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.4.2235>
- Kim, S., Kim, N., Lee, J., Kim, S., Hong, J., Son, S., & Heo, W. Do. (2020). Dynamic Fas signaling network regulates neural stem cell proliferation and memory enhancement. *Science Advances*, 6(17), 1–15. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz9691>
- Kindler, V., Thorens, B., de Kossodo, S., Allet, B., Eliason, J. F., Thatcher, D., Farber, N., & Vassalli, P. (1986). Stimulation of hematopoiesis in vivo by recombinant bacterial murine interleukin 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(4), 1001–1005. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.4.1001>
- Kiyota, T., Machhi, J., Lu, Y., Dyavarshetty, B., Nemati, M., Yokoyama, I., Lee Mosley, R., & Gendelman, H. E. (2018). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor neuroprotective activities in Alzheimer's disease mice. *Journal of Neuroimmunology*, 319(January), 80–92. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.03.009>
- Klebanoff, C. A., Scott, C. D., Leonardi, A. J., Yamamoto, T. N., Cruz, A. C., Ouyang, C., Ramaswamy, M., Roychoudhuri, R., Ji, Y., Eil, R. L., Sukumar, M., Crompton, J. G., Palmer, D. C., Borman, Z. A., Clever, D., Thomas, S. K., Patel, S., Yu, Z., Muranski, P., ... Restifo, N. P. (2016). Memory T cell-driven differentiation of naive cells impairs adoptive immunotherapy. *Journal of Clinical Investigation*, 126(1), 318–334. <https://doi.org/10.1172/JCI81217>
- Klibi, J., Niki, T., Riedel, A., Pioche-Durieu, C., Souquere, S., Rubinstein, E., Moulec, S. L. E., Guigay, J., Hirashima, M., Guemira, F., Adhikary, D., Mautner, J., & Busson, P. (2009). Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells. *Blood*, 113(9), 1957–1966. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-142596>
- Kobilo, T., Liu, Q., Gandhi, K., Mughal, M., Shaham, Y., & van Praag, H. (2011). Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment. *Learning & Memory*, 18(9), 605–609. <https://doi.org/10.1101/lm.2283011>
- Kondo, M. (2017). Molecular mechanisms of experience-dependent structural and functional plasticity in the brain. *Anatomical Science International*, 92(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s12565-016-0358-6>
- Kowal, E. J. K., Ter-Ovanesyan, D., Regev, A., & Church, G. M. (2017). *Extracellular Vesicle Isolation and Analysis by Western Blotting* (W. P. Kuo & S. Jia (eds.); Vol. 1660, Issue page 114, pp. 143–152). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7253-1\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7253-1_12)

- Kowal, J., Tkach, M., & Théry, C. (2014). Biogenesis and secretion of exosomes. *Current Opinion in Cell Biology*, 29(1), 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.05.004>
- Krieger, M., Both, M., Kranig, S. A., Pitzer, C., Klugmann, M., Vogt, G., Draguhn, A., & Schneider, A. (2012). The hematopoietic cytokine granulocyte-macrophage colony stimulating factor is important for cognitive functions. *Scientific Reports*, 2(1), 697. <https://doi.org/10.1038/srep00697>
- Kronenberg, G., Reuter, K., Steiner, B., Brandt, M. D., Jessberger, S., Yamaguchi, M., & Kempermann, G. (2003). Subpopulations of Proliferating Cells of the Adult Hippocampus Respond Differently to Physiologic Neurogenic Stimuli. *Journal of Comparative Neurology*, 467(4), 455–463. <https://doi.org/10.1002/cne.10945>
- Kubota, K., Nakano, M., Kobayashi, E., Mizue, Y., Chikenji, T., Otani, M., Nagaishi, K., & Fujimiya, M. (2018). An enriched environment prevents diabetes-induced cognitive impairment in rats by enhancing exosomal miR-146a secretion from endogenous bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *PLoS ONE*, 13(9), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204252>
- Kupcova Skalnikova, H., Cizkova, J., Cervenka, J., & Vodicka, P. (2017). Advances in Proteomic Techniques for Cytokine Analysis: Focus on Melanoma Research. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12). <https://doi.org/10.3390/ijms18122697>
- Lai, R. C., Arslan, F., Lee, M. M., Sze, N. S. K., Choo, A., Chen, T. S., Salto-Tellez, M., Timmers, L., Lee, C. N., El Oakley, R. M., Pasterkamp, G., de Kleijn, D. P. V., & Lim, S. K. (2010). Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Research*, 4(3), 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2009.12.003>
- Laviola, G., Rea, M., Morley-Fletcher, S., Di Carlo, S., Bacosì, A., De Simone, R., Bertini, M., & Pacifici, R. (2004). Beneficial effects of enriched environment on adolescent rats from stressed pregnancies. *European Journal of Neuroscience*, 20(6), 1655–1664. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03597.x>
- Lazarov, O., Robinson, J., Tang, Y. P., Hairston, I. S., Korade-Mirnic, Z., Lee, V. M. Y., Hersh, L. B., Sapolsky, R. M., Mirnic, K., & Sisodia, S. S. (2005). Environmental enrichment reduces A $\beta$  levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell*, 120(5), 701–713. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.015>
- Lee, C., Mitsialis, S. A., Aslam, M., Vitali, S. H., Vergadi, E., Konstantinou, G., Sdrimas, K., Fernandez-Gonzalez, A., & Kourembanas, S. (2012). Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation*, 126(22), 2601–2611. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.114173>

- Leger, M., Paizanis, E., Dzahini, K., Quiedeville, A., Bouet, V., Cassel, J. C., Freret, T., Schumann-Bard, P., & Boulouard, M. (2015). Environmental enrichment duration differentially affects behavior and neuroplasticity in adult mice. *Cerebral Cortex*, *25*(11), 4048–4061. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhu119>
- Lenzo, J. C., Turner, A. L., Cook, A. D., Vlahos, R., Anderson, G. P., Reynolds, E. C., & Hamilton, J. A. (2012). Control of macrophage lineage populations by CSF-1 receptor and GM-CSF in homeostasis and inflammation. *Immunology and Cell Biology*, *90*(4), 429–440. <https://doi.org/10.1038/icb.2011.58>
- Lepore, F., D'Alessandro, G., Antonangeli, F., Santoro, A., Esposito, V., Limatola, C., & Trettel, F. (2018). CXCL16/CXCR6 axis drives microglia/macrophages phenotype in physiological conditions and plays a crucial role in glioma. *Frontiers in Immunology*, *9*(NOV), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02750>
- Li, J. J., Wang, B., Kodali, M. C., Chen, C., Kim, E., Patters, B. J., Lan, L., Kumar, S., Wang, X., Yue, J., & Liao, F. F. (2018). In vivo evidence for the contribution of peripheral circulating inflammatory exosomes to neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation*, *15*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-1038-8>
- Li, J. W., Li, L. L., Chang, L. L., Wang, Z. Y., & Xu, Y. (2009). Stem cell factor protects against neuronal apoptosis by activating AKT/ERK in diabetic mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *42*(11), 1044–1049. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2009005000031>
- Li, R., Huang, Y., & Lin, J. (2020). Distinct effects of general anesthetics on lung metastasis mediated by IL-6/JAK/STAT3 pathway in mouse models. *Nature Communications*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14065-6>
- Li, Z., Wang, Z., Dinh, P. U. C., Zhu, D., Popowski, K. D., Lutz, H., Hu, S., Lewis, M. G., Cook, A., Andersen, H., Greenhouse, J., Pessaint, L., Lobo, L. J., & Cheng, K. (2021). Cell-mimicking nanodecoys neutralize SARS-CoV-2 and mitigate lung injury in a non-human primate model of COVID-19. *Nature Nanotechnology*, *16*(8), 942–951. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-00923-2>
- Lilly, M. B., Zemskova, M., Frankel, A. E., Salo, J., & Kraft, A. S. (2001). Distinct domains of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor  $\alpha$  subunit mediate activation of Jak/Stat signaling and differentiation. *Blood*, *97*(6), 1662–1670. <https://doi.org/10.1182/blood.V97.6.1662>
- Liso, A., Castellani, S., Massenzio, F., Trotta, R., Pucciarini, A., Bigerna, B., De Luca, P., Zoppoli, P., Castiglione, F., Palumbo, M. C., Stracci, F., Landriscina, M., Specchia, G., Bach, L. A., Conese, M., & Falini, B. (2017). Human monocyte-derived dendritic cells exposed to

- hyperthermia show a distinct gene expression profile and selective upregulation of IGFBP6. *Oncotarget*, 8(37), 60826–60840. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18338>
- Llorens-Martín, M., Tejada, G. S., & Trejo, J. L. (2010). Differential regulation of the variations induced by environmental richness in adult neurogenesis as a function of time: A dual birthdating analysis. *PLoS ONE*, 5(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012188>
- Llorente, A., Skotland, T., Sylvänne, T., Kauhanen, D., Róg, T., Orłowski, A., Vattulainen, I., Ekroos, K., & Sandvig, K. (2013). Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(7), 1302–1309. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2013.04.011>
- Logozzi, M., Di Raimo, R., Mizzoni, D., & Fais, S. (2020). Immunocapture-based ELISA to characterize and quantify exosomes in both cell culture supernatants and body fluids. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 645, pp. 155–180). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2020.06.011>
- Lucas, A. D., Chadwick, N., Warren, B. F., Jewell, D. P., Gordon, S., Powrie, F., & Greaves, D. R. (2001). The transmembrane form of the CX3CL1 chemokine fractalkine is expressed predominantly by epithelial cells in vivo. *American Journal of Pathology*, 158(3), 855–866. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64034-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64034-5)
- Ludwig, A., Berkhout, T., Moores, K., Groot, P., & Chapman, G. (2002). Fractalkine Is Expressed by Smooth Muscle Cells in Response to IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  and Is Modulated by Metalloproteinase Activity. *The Journal of Immunology*, 168(2), 604–612. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.2.604>
- Ludwig, A., Schulte, A., Schnack, C., Hundhausen, C., Reiss, K., Brodway, N., Held-Feindt, J., & Mentlein, R. (2005). Enhanced expression and shedding of the transmembrane chemokine CXCL16 by reactive astrocytes and glioma cells. *Journal of Neurochemistry*, 93(5), 1293–1303. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03123.x>
- Luo, X. jian, Li, M., Huang, L., Nho, K., Deng, M., Chen, Q., Weinberger, D. R., Vasquez, A. A., Rijpkema, M., Mattay, V. S., Saykin, A. J., Shen, L., Fernández, G., Franke, B., Chen, J. chun, Chen, X. ning, Wang, J. kai, Xiao, X., Qi, X. bin, ... Su, B. (2012). The Interleukin 3 Gene (IL3) Contributes to Human Brain Volume Variation by Regulating Proliferation and Survival of Neural Progenitors. *PLoS ONE*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050375>
- Łyszkiewicz, M., Witzlau, K., Pommerencke, J., & Krueger, A. (2011). Chemokine receptor CX3CR1 promotes dendritic cell development under steady-state conditions. *European Journal of Immunology*, 41(5), 1256–1265. <https://doi.org/10.1002/eji.201040977>

- Mabrouk, I., Buart, S., Hasmim, M., Michiels, C., Connault, E., Opolon, P., Chiocchia, G., Lévi-Strauss, M., Chouaib, S., & Karray, S. (2008). Prevention of Autoimmunity and Control of Recall Response to Exogenous Antigen by Fas Death Receptor Ligand Expression on T Cells. *Immunity*, 29(6), 922–933. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.10.007>
- Mangano, E. N., Peters, S., Littelljohn, D., So, R., Bethune, C., Bobyn, J., Clarke, M., & Hayley, S. (2011). Granulocyte macrophage-colony stimulating factor protects against substantia nigra dopaminergic cell loss in an environmental toxin model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 43(1), 99–112. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.02.011>
- Mansour, A. G., Xiao, R., Bergin, S. M., Huang, W., Chrislip, L. A., Zhang, J., Ali, S., Queen, N. J., Caligiuri, M. A., & Cao, L. (2021). Enriched environment enhances NK cell maturation through hypothalamic BDNF in male mice. *European Journal of Immunology*, 51(3), 557–566. <https://doi.org/10.1002/eji.201948358>
- Marashi, V., Barnekow, A., Ossendorf, E., & Sachser, N. (2003). Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice. *Hormones and Behavior*, 43(2), 281–292. [https://doi.org/10.1016/S0018-506X\(03\)00002-3](https://doi.org/10.1016/S0018-506X(03)00002-3)
- Marashi, V., Barnekow, A., & Sachser, N. (2004). Effects of environmental enrichment on males of a docile inbred strain of mice. *Physiology and Behavior*, 82(5), 765–776. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.05.009>
- Maravillas-Montero, J. L., & Martínez-Cortés, I. (2017). Los exosomas de las células presentadoras de antígeno y su papel en la regulación de las respuestas inmunológicas. *Revista Alergia México*, 64(4), 463–476. <https://doi.org/10.29262/ram.v64i4.285>
- Martin, P., Palmo, J. A. N., Halkjker-kristensen, J., Diamant, M., Palm, J., & Halkjaer-kristensen, J. (1994). Bicycle exercise enhances plasma IL-6 but does not change Befoie During. *Cytokines*, 93–97.
- Matloubian, M., David, A., Engel, S., Ryan, J. E., & Cyster, J. G. (2000). A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nature Immunology*, 1(4), 298–304. <https://doi.org/10.1038/79738>
- McAlpine, C. S., Park, J., Griciuc, A., Kim, E., Choi, S. H., Iwamoto, Y., Kiss, M. G., Christie, K. A., Vinegoni, C., Poller, W. C., Mindur, J. E., Chan, C. T., He, S., Janssen, H., Wong, L. P., Downey, J., Singh, S., Anzai, A., Kahles, F., ... Swirski, F. K. (2021). Astrocytic interleukin-3 programs microglia and limits Alzheimer's disease. *Nature*, 595(7869), 701–706. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03734-6>

- McFarlin, B. K., Flynn, M. G., Campbell, W. W., Craig, B. A., Robinson, J. P., Stewart, L. K., Timmerman, K. L., & Coen, P. M. (2006). Physical activity status, but not age, influences inflammatory biomarkers and toll-like receptor 4. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, *61*(4), 388–393. <https://doi.org/10.1093/gerona/61.4.388>
- McMurphy, T., Huang, W., Queen, N. J., Ali, S., Widstrom, K. J., Liu, X., Xiao, R., Siu, J. J., & Cao, L. (2018). Implementation of environmental enrichment after middle age promotes healthy aging. *Aging*, *10*(7), 1698–1721. <https://doi.org/10.18632/aging.101502>
- McQuaid, R. J., Dunn, R., Jacobson-Pick, S., Anisman, H., & Audet, M. C. (2018). Post-weaning environmental enrichment in male CD-1 mice: Impact on social behaviors, corticosterone levels and prefrontal cytokine expression in adulthood. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *12*(July), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00145>
- Meng, Z., Liu, T., Song, Y., Wang, Q., Xu, D., Jiang, J., Li, M., Qiao, J., Luo, X., Gu, J., Tu, H., & Gan, Y. (2019). Exposure to an enriched environment promotes the terminal maturation and proliferation of natural killer cells in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, *77*(November 2018), 150–160. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.12.017>
- Metcalf, D., Begley, C., Johnson, G., Nicola, N., Lopez, A., & Williamson, D. (1986). Effects of purified bacterially synthesized murine multi-CSF (IL-3) on hematopoiesis in normal adult mice. *Blood*, *68*(1), 46–57. <https://doi.org/10.1182/blood.V68.1.46.46>
- Metcalf, D., Begley, C., Johnson, G., Nicola, N., Vadas, M., Lopez, A., Williamson, D., Wong, G., Clark, S., & Wang, E. (1986). Biologic properties in vitro of a recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, *67*(1), 37–45. <https://doi.org/10.1182/blood.V67.1.37.37>
- Mizuhara, H., O'Neill, E., Seki, N., Ogawa, T., Kusunoki, C., Otsuka, K., Satoh, S., Niwa, M., Senoh, H., & Fujiwara, H. (1994). T cell activation-associated hepatic injury: mediation by tumor necrosis factors and protection by interleukin 6. *The Journal of Experimental Medicine*, *179*(5), 1529–1537. <https://doi.org/10.1084/jem.179.5.1529>
- Monleón, I., Martínez-Lorenzo, M. J., Monteagudo, L., Lasierra, P., Taulés, M., Iturralde, M., Piñeiro, A., Larrad, L., Alava, M. A., Naval, J., & Anel, A. (2001). Differential Secretion of Fas Ligand- or APO2 Ligand/TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Carrying Microvesicles During Activation-Induced Death of Human T Cells. *The Journal of Immunology*, *167*(12), 6736–6744. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.12.6736>
- Montecalvo, A., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Stolz, D. B., Sullivan, M. L. G., Karlsson, J. M., Baty, C. J., Gibson, G. A., Erdos, G., Wang, Z., Milosevic, J., Tkacheva, O. A., Divito, S. J., Jordan, R., Lyons-Weiler, J., Watkins, S. C., & Morelli, A. E. (2012). Mechanism of transfer of



- functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood*, 119(3), 756–766. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-338004>
- Morales, J., Homey, B., Vicari, A. P., Hudak, S., Oldham, E., Hedrick, J., Orozco, R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., McEvoy, L. M., & Zlotnik, A. (1999). CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(25), 14470–14475. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.25.14470>
- Mosaferi, B., Babri, S., Ebrahimi, H., & Mohaddes, G. (2015). Enduring effects of post-weaning rearing condition on depressive- and anxiety-like behaviors and motor activity in male rats. *Physiology and Behavior*, 142, 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.02.015>
- Mosaferi, B., Babri, S., Mohaddes, G., Khamnei, S., & Mesgari, M. (2015). Post-weaning environmental enrichment improves BDNF response of adult male rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 46(1), 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2015.07.008>
- Motro, B., Wojtowicz, J. M., T, A. B., & Kooyii, D. V. A. N. D. E. R. (1996). *Steel mutant mice are deficient in hippocampal learning but not long-term potentiation*. 93(March), 1808–1813.
- Munich, S., Sobo-Vujanovic, A., Buchser, W. J., Beer-Stolz, D., & Vujanovic, N. L. (2012). Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands. *Oncotarget*, 1(7), 1074–1083. <https://doi.org/10.4161/onci.20897>
- Nakano, H., Lyons-Cohen, M. R., Whitehead, G. S., Nakano, K., & Cook, D. N. (2017). Distinct functions of CXCR4, CCR2, and CX3CR1 direct dendritic cell precursors from the bone marrow to the lung. *Journal of Leukocyte Biology*, 101(5), 1143–1153. <https://doi.org/10.1189/jlb.1a0616-285r>
- Nakano, M., Kubota, K., Hashizume, S., Kobayashi, E., Chikenji, T. S., Saito, Y., & Fujimiya, M. (2020). An enriched environment prevents cognitive impairment in an Alzheimer's disease model by enhancing the secretion of exosomal microRNA-146a from the choroid plexus. *Brain, Behavior, & Immunity - Health*, 9(September), 100149. <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2020.100149>
- Nazarenko, I., Rana, S., Baumann, A., McAlear, J., Hellwig, A., Trendelenburg, M., Lochnit, G., Preissner, K. T., & Zöller, M. (2010). Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. *Cancer Research*, 70(4), 1668–1678. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2470>
- Nielsen, H. B., Secher, N. H., Christensen, N. J., & Pedersen, B. K. (1996). Lymphocytes and NK

- cell activity during repeated bouts of maximal exercise. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 271(1) 40-1).  
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1996.271.1.r222>
- Nieman, D. C., Henson, D. A., Austin, M. D., & Brown, V. A. (2005). Immune response to a 30-minute walk. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 37(1), 57–62.  
<https://doi.org/10.1249/01.MSS.0000149808.38194.21>
- Nieman, D. C., & Wentz, L. M. (2019). The compelling link between physical activity and the body's defense system. *Journal of Sport and Health Science*, 8(3), 201–217.  
<https://doi.org/10.1016/j.jshs.2018.09.009>
- Nishimura, M., Umehara, H., Nakayama, T., Yoneda, O., Hieshima, K., Kakizaki, M., Dohmae, N., Yoshie, O., & Imai, T. (2002). Dual Functions of Fractalkine/CX3C Ligand 1 in Trafficking of Perforin + Granzyme B + Cytotoxic Effector Lymphocytes That Are Defined by CX3CR1 Expression. *The Journal of Immunology*, 168(12), 6173–6180.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.12.6173>
- Nishinakamura, R., Miyajima, A., Mee, P. J., Tybulewicz, V. L. J., & Murray, R. (1996). Hematopoiesis in mice lacking the entire granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/interleukin-3/interleukin-5 functions. *Blood*, 88(7), 2458–2464.  
<https://doi.org/10.1182/blood.v88.7.2458.bloodjournal8872458>
- Nithianantharajah, J., & Hannan, A. J. (2006). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(9), 697–709.  
<https://doi.org/10.1038/nrn1970>
- Nyhuis, T. J., Masini, C. V., Sasse, S. K., Day, H. E. W., & Campeau, S. (2010). Physical activity, but not environmental complexity, facilitates HPA axis response habituation to repeated audiogenic stress despite neurotrophin mRNA regulation in both conditions. *Brain Research*, 1362, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.09.038>
- Okayama, Y., Kobayashi, H., Ashman, L. K., Dobashi, K., Nakazawa, T., Holgate, S. T., Church, M. K., & Mori, M. (1998). *Human lung mast cells are enriched in the capacity to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in response to IgE-dependent stimulation.* 708–715.
- Oliveira, S. H. P., Taub, D. D., Nagel, J., Smith, R., Hogaboam, C. M., Berlin, A., & Lukacs, N. W. (2002). *Stem cell factor induces eosinophil activation and degranulation: mediator release and gene array analysis.* 100(13), 4291–4297.
- Ostrowski, K., Rohde, T., Zacho, M., Asp, S., & Pedersen, B. K. (1998). Evidence that interleukin-6

- is produced in human skeletal muscle during prolonged running. *Journal of Physiology*, 508(3), 949–953. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.949bp.x>
- Ostrowski, Kenneth, Rohde, T., Asp, S., Schjerling, P., & Pedersen, B. K. (1999). Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *The Journal of Physiology*, 515(1), 287–291. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.287ad.x>
- Ostrowski, M., Carmo, N. B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C. F., Schauer, K., Hume, A. N., Freitas, R. P., Goud, B., Benaroch, P., Hacohen, N., Fukuda, M., Desnos, C., Seabra, M. C., Darchen, F., Amigorena, S., Moita, L. F., & Thery, C. (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature Cell Biology*, 12(1), 19–30. <https://doi.org/10.1038/ncb2000>
- Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T. A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., & Gross, C. T. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*, 333(6048), 1456–1458. <https://doi.org/10.1126/science.1202529>
- Park, L. S., Martin, U., Sorensen, R., Luhr, S., Morrissey, P. J., Cosman, D., & Larsen, A. (1992). Cloning of the low-affinity murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor and reconstitution of a high-affinity receptor complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(10), 4295–4299. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.10.4295>
- Parolini, I., Federici, C., Raggi, C., Lugini, L., Palleschi, S., De Milito, A., Coscia, C., Iessi, E., Logozzi, M., Molinari, A., Colone, M., Tatti, M., Sargiacomo, M., & Fais, S. (2009). Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *Journal of Biological Chemistry*, 284(49), 34211–34222. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.041152>
- Perez-Hernandez, D., Gutiérrez-Vázquez, C., Jorge, I., López-Martín, S., Ursa, A., Sánchez-Madrid, F., Vázquez, J., & Yañez-Mó, M. (2013). The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 288(17), 11649–11661. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.445304>
- Petersen, A. M. W., & Pedersen, B. K. (2005). The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of Applied Physiology*, 98(4), 1154–1162. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00164.2004>
- Polanco, J. C., Li, C., Durisic, N., Sullivan, R., & Götz, J. (2018). Exosomes taken up by neurons hijack the endosomal pathway to spread to interconnected neurons. *Acta Neuropathologica Communications*, 6(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0514-4>
- Punt, J., Standford, S., Jones, P., & Owen, J. (2019). Recognition and Response. In L. Schultz

(Ed.), *Kuby Immunology* (Eight, pp. 219–135). W. H. Freeman and Company.

- Pusic, A. D., & Kraig, R. P. (2014). Youth and environmental enrichment generate serum exosomes containing miR-219 that promote CNS myelination. *Glia*, *62*(2), 284–299. <https://doi.org/10.1002/glia.22606>
- Pusic, K. M., Pusic, A. D., & Kraig, R. P. (2016). Environmental Enrichment Stimulates Immune Cell Secretion of Exosomes that Promote CNS Myelination and May Regulate Inflammation. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *36*(3), 313–325. <https://doi.org/10.1007/s10571-015-0269-4>
- Qazi, K. R., Paredes, P. T., Dahlberg, B., Grunewald, J., Eklund, A., & Gabrielsson, S. (2010). Proinflammatory exosomes in bronchoalveolar lavage fluid of patients with sarcoidosis. *Thorax*, *65*(11), 1016–1024. <https://doi.org/10.1136/thx.2009.132027>
- Quelle, F. W., Sato, N., Witthuhn, B. A., Inhorn, R. C., Eder, M., Miyajima, A., Griffin, J. D., & Ihle, J. N. (1994). JAK2 associates with the beta c chain of the receptor for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and its activation requires the membrane-proximal region. *Molecular and Cellular Biology*, *14*(7), 4335–4341. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.7.4335-4341.1994>
- Rajendran, L., Honsho, M., Zahn, T. R., Keller, P., Geiger, K. D., Verkade, P., & Simons, K. (2006). Alzheimer's disease  $\beta$ -amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(30), 11172–11177. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603838103>
- Ramirez, M. I., Amorim, M. G., Gadelha, C., Milic, I., Welsh, J. A., Freitas, V. M., Nawaz, M., Akbar, N., Couch, Y., Makin, L., Cooke, F., Vettore, A. L., Batista, P. X., Freezor, R., Pezuk, J. A., Rosa-Fernandes, L., Carreira, A. C. O., Devitt, A., Jacobs, L., ... Dias-Neto, E. (2018). Technical challenges of working with extracellular vesicles. *Nanoscale*, *10*(3), 881–906. <https://doi.org/10.1039/c7nr08360b>
- Rampon, C., Jiang, C. H., Dong, H., Tang, Y. P., Lockhart, D. J., Schultz, P. G., Tsien, J. Z., & Hu, Y. (2000). Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(23), 12880–12884. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.23.12880>
- Rampon, C., Tang, Y. P., Goodhouse, J., Shimizu, E., Kiyin, M., & Tsien, J. Z. (2000). Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nature Neuroscience*, *3*(3), 238–244. <https://doi.org/10.1038/72945>
- Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T. N., & Forsthuber, T. G. (2015). T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*, *74*(1), 5–17.

<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.09.011>

- Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., & Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *Journal of Experimental Medicine*, 183(3), 1161–1172. <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161>
- Rastogi, S., Sharma, V., Bharti, P. S., Rani, K., Modi, G. P., Nikolajeff, F., & Kumar, S. (2021). The evolving landscape of exosomes in neurodegenerative diseases: Exosomes characteristics and a promising role in early diagnosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 1–31. <https://doi.org/10.3390/ijms22010440>
- Rattazzi, L., Piras, G., Brod, S., Smith, K., Ono, M., & D'Acquisto, F. (2016). Impact of enriched environment on murine T cell differentiation and gene expression profile. *Frontiers in Immunology*, 7(SEP), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00381>
- Raykha, C., Crawford, J., Gan, B. S., Fu, P., Bach, L. A., & O'Gorman, D. B. (2013). IGF-II and IGFBP-6 regulate cellular contractility and proliferation in Dupuytren's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1832(10), 1511–1519. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.04.018>
- Reber, L., Silva, C. A. Da, & Frossard, N. (2006). *Stem cell factor and its receptor c-Kit as targets for inflammatory diseases*. 533, 327–340. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.12.067>
- Rescigno, B. M., Piguet, V., Valzasina, B., Lens, S., Zubler, R., French, L., Kindler, V., Tschopp, J., & Ricciardi-castagnoli, P. (2000). *Fas Engagement Induces the Maturation of Dendritic Cells ( DCs ), the Release of Interleukin ( IL ) -1  $\alpha$  , and the Production of Interferon  $\gamma$  in the Absence of IL-12 during DC – T Cell Cognate Interaction : A New Role for Fas Ligand in Inflammatory Respon.* 192(11), 1661–1668.
- Rizvanov, A. (2017). *Elevated Levels of Proinflammatory Cytokines in Cerebrospinal Fluid of Multiple Sclerosis Patients*. 8(May), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00531>
- Roghani, M., Lassarre, C., Zapf, J., Pova, G., & Binoux, M. (1991). Two Insulin-Like Growth Factor (IGF)-Binding Proteins Are Responsible for the Selective Affinity for IGF-II of Cerebrospinal Fluid Binding Proteins. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 73(3), 658–666. <https://doi.org/10.1210/jcem-73-3-658>
- Rosito, M., Deflorio, C., Limatola, C., & Trettel, F. (2012). CXCL16 orchestrates adenosine A 3 receptor and MCP-1/CCL2 activity to protect neurons from excitotoxic cell death in the CNS. *Journal of Neuroscience*, 32(9), 3154–3163. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4046-11.2012>
- Roy, V., Belzung, C., Delarue, C., & Chapillon, P. (2001). Environmental enrichment in BALB/c

- mice: Effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. *Physiology and Behavior*, 74(3), 313–320. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(01\)00561-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00561-3)
- Saas, P., Boucraut, J., Quiquerez, A. L., Schnuriger, V., Perrin, G., Desplat-Jego, S., Bernard, D., Walker, P. R., & Dietrich, P. Y. (1999). CD95 (Fas/Apo-1) as a receptor governing astrocyte apoptotic or inflammatory responses: a key role in brain inflammation? *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(4), 2326–2333. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9973511>
- Saeedi, S., Israel, S., Nagy, C., & Turecki, G. (2019). The emerging role of exosomes in mental disorders. *Translational Psychiatry*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0459-9>
- Scabia, G., Testa, G., Scali, M., Del Turco, S., Desiato, G., Berardi, N., Sale, A., Matteoli, M., Maffei, L., Maffei, M., & Mainardi, M. (2021). Reduced ccl11/eotaxin mediates the beneficial effects of environmental stimulation on the aged hippocampus. *Brain, Behavior, and Immunity*, 98(August), 234–244. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.08.222>
- Scarola, S. J., & Bardi, M. (2021). Environmental enrichment modulates inflammation during development in long-evans rats (*Rattus norvegicus*). *Developmental Psychobiology*, 63(2), 183–191. <https://doi.org/10.1002/dev.22007>
- Scarola, S. J., Perdomo Trejo, J. R., Granger, M. E., Gerecke, K. M., & Bardi, M. (2019). Immunomodulatory Effects of Stress and Environmental Enrichment in Long-Evans Rats (*Rattus norvegicus*). *Comparative Medicine*, 69(1), 35–47. <https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-18-000025>
- Schäbitz, W.-R., Krüger, C., Pitzer, C., Weber, D., Laage, R., Gassler, N., Aronowski, J., Mier, W., Kirsch, F., Dittgen, T., Bach, A., Sommer, C., & Schneider, A. (2008). A Neuroprotective Function for the Hematopoietic Protein Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF). *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 28(1), 29–43. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600496>
- Schmid, C., Schlapfer, I., Keller, A., Waldvogel, M., Froesch, E. R., & Zapf, J. (1995). Effects of Insulin-like Growth Factor (IGF) Binding Proteins (BPs)-3 and -6 on DNA Synthesis of Rat Osteoblasts: Further Evidence for a Role of Auto-/Paracrine IGF I but Not IGF II in Stimulating Osteoblast Growth. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 212(1), 242–248. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1962>
- Schobersberger, W., Hobisch-Hagen, P., Fries, D., Wiedermann, F., Rieder-Scharinger, J., Villiger, B., Frey, W., Herold, M., Fuchs, D., & Jelkmann, W. (2000). Increase in immune activation, vascular endothelial growth factor and erythropoietin after an ultramarathon run at moderate altitude. *Immunobiology*, 201(5), 611–620. [https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(00\)80078-9](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(00)80078-9)

- Schrijver, N. C. A., Bahr, N. I., Weiss, I. C., & Würbel, H. (2002). Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 73(1), 209–224. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(02\)00790-6](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(02)00790-6)
- Schwarz, A. J., Brasel, J. A., Hintz, R. L., Mohan, S., & Cooper, D. M. (1996). Acute effect of brief low- and high-intensity exercise on circulating insulin-like growth factor (IGF) I, II, and IGF-binding protein-3 and its proteolysis in young healthy men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 81(10), 3492–3497. <https://doi.org/10.1210/jcem.81.10.8855791>
- Seino, K. I., Iwabuchi, K., Kayagaki, N., Miyata, R., Nagaoka, I., Matsuzawa, A., Fukao, K., Yagita, H., & Okumura, K. (1998). Cutting edge: Chemotactic activity of soluble Fas ligand against phagocytes. *Journal of Immunology*, 161(9), 4484–4488.
- Shimaoka, T., Kume, N., Minami, M., Hayashida, K., Kataoka, H., Kita, T., & Yonehara, S. (2000). Molecular cloning of a novel scavenger receptor for oxidized low density lipoprotein, SR-PSOX, on macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 275(52), 40663–40666. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000761200>
- Shimaoka, T., Nakayama, T., Fukumoto, N., Kume, N., Takahashi, S., Yamaguchi, J., Minami, M., Hayashida, K., Kita, T., Ohsumi, J., Yoshie, O., & Yoehara, S. (2004). Cell surface-anchored SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates firm adhesion of CXC chemokine receptor 6-expressing cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(2), 267–274. <https://doi.org/10.1189/jlb.1003465>
- Singhal, G., Jaehne, E. J., Corrigan, F., & Baune, B. T. (2014). Cellular and molecular mechanisms of immunomodulation in the brain through environmental enrichment. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(1 APR), 1–29. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00097>
- Singhal, G., Morgan, J., Corrigan, F., Toben, C., Jawahar, M. C., Jaehne, E. J., Manavis, J., Hannan, A. J., & Baune, B. T. (2021). Short-Term Environmental Enrichment is a Stronger Modulator of Brain Glial Cells and Cervical Lymph Node T Cell Subtypes than Exercise or Combined Exercise and Enrichment. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 41(3), 469–486. <https://doi.org/10.1007/s10571-020-00862-x>
- Skokos, D., Le Panse, S., Villa, I., Rousselle, J.-C., Peronet, R., David, B., Namane, A., & Mécheri, S. (2001). Mast Cell-Dependent B and T Lymphocyte Activation Is Mediated by the Secretion of Immunologically Active Exosomes. *The Journal of Immunology*, 166(2), 868–876. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.2.868>
- Song, Y., Gan, Y., Wang, Q., Meng, Z., Li, G., Shen, Y., Wu, Y., Li, P., Yao, M., Gu, J., & Tu, H. (2017). Enriching the housing environment for mice enhances their NK cell antitumor immunity

- via sympathetic nerve-dependent regulation of NKG2D and CCR5. *Cancer Research*, 77(7), 1611–1622. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2143>
- Steensberg, A., Fischer, C. P., Keller, C., Møller, K., & Pedersen, B. K. (2003). IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 285(2 48-2), 433–437. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00074.2003>
- Stewart, L. K., Flynn, M. G., Campbell, W. W., Craig, B. A., Robinson, J. P., McFarlin, B. K., Timmerman, K. L., Coen, P. M., Felker, J., & Talbert, E. (2005). Influence of exercise training and age on CD14+ cell-surface expression of toll-like receptor 2 and 4. *Brain, Behavior, and Immunity*, 19(5), 389–397. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2005.04.003>
- Strasser, A., Jost, P. J., & Nagata, S. (2009). Review The Many Roles of FAS Receptor Signaling in the Immune System. *Immunity*, 30(2), 180–192. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.01.001>
- Strauss, K., Goebel, C., Runz, H., Möbius, W., Weiss, S., Feussner, I., Simons, M., & Schneider, A. (2010). Exosome secretion ameliorates lysosomal storage of cholesterol in Niemann-Pick type C disease. *Journal of Biological Chemistry*, 285(34), 26279–26288. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.134775>
- Stuffers, S., Sem Wegner, C., Stenmark, H., & Brech, A. (2009). Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic*, 10(7), 925–937. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00920.x>
- Suda, B. T., Hashimoto, H., & Tanaka, M. (1997). *Membrane Fas Ligand Kills Human Peripheral Blood T Lymphocytes, and Soluble Fas Ligand Blocks the Killing*. 186(12), 2045–2050.
- Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., & Nagata, S. (1993). Molecular cloning and expression of the fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*, 75(6), 1169–1178. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90326-L](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90326-L)
- Sugiura, H., Nishida, H., Sugiura, H., & Mirbod, S. M. (2002). Immunomodulatory action of chronic exercise on macrophage and lymphocyte cytokine production in mice. *Acta Physiologica Scandinavica*, 174(3), 247–256. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201x.2002.00930.x>
- Svensson, K. J., Christianson, H. C., Wittrup, A., Bourseau-Guilmain, E., Lindqvist, E., Svensson, L. M., Mörgelin, M., & Belting, M. (2013). Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. *Journal of Biological Chemistry*, 288(24), 17713–17724. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.445403>
- Szataneck, R., Baj-Krzyworzeka, M., Zimoch, J., Lekka, M., Siedlar, M., & Baran, J. (2017). The methods of choice for extracellular vesicles (EVs) characterization. *International Journal of*



*Molecular Sciences*, 18(6). <https://doi.org/10.3390/ijms18061153>

- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Nastou, K. C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., Doncheva, N. T., Legeay, M., Fang, T., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2021). The STRING database in 2021: Customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D605–D612. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1074>
- Takaki, S., Mita, S., Kitamura, T., Yonehara, S., Yamaguchi, N., Tominaga, A., Miyajima, A., & Takatsu, K. (1991). Identification of the second subunit of the murine interleukin-5 receptor: interleukin-3 receptor-like protein, AIC2B is a component of the high affinity interleukin-5 receptor. *The EMBO Journal*, 10(10), 2833–2838. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1915265>
- Tamai, K., Tanaka, N., Nakano, T., Kakazu, E., Kondo, Y., Inoue, J., Shiina, M., Fukushima, K., Hoshino, T., Sano, K., Ueno, Y., Shimosegawa, T., & Sugamura, K. (2010). Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 399(3), 384–390. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.083>
- Tang, K., Xia, F. C., Wagner, P. D., & Breen, E. C. (2010). Exercise-induced VEGF transcriptional activation in brain, lung and skeletal muscle. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 170(1), 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2009.10.007>
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, 30(1), 1–29. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>
- Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., & Amigorena, S. (2001). Proteomic Analysis of Dendritic Cell-Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles. *The Journal of Immunology*, 166(12), 7309–7318. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.12.7309>
- Théry, C., Regnault, A., Garin, J., Wolfers, J., Zitvogel, L., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., & Amigorena, S. (1999). Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes: Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *Journal of Cell Biology*, 147(3), 599–610. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.3.599>
- Théry, C., Zitvogel, L., & Amigorena, S. (2002). Exosomes: Composition, biogenesis and function. *Nature Reviews Immunology*, 2(8), 569–579. <https://doi.org/10.1038/nri855>
- Tian, T., Zhu, Y. L., Zhou, Y. Y., Liang, G. F., Wang, Y. Y., Hu, F. H., & Xiao, Z. D. (2014). Exosome

- uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *Journal of Biological Chemistry*, 289(32), 22258–22267. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.588046>
- Tohyama, M., Sayama, K., Komatsuzawa, H., Hanakawa, Y., Shirakata, Y., Dai, X., Yang, L., Tokumaru, S., Nagai, H., Hirakawa, S., Sugai, M., & Hashimoto, K. (2007). CXCL16 is a novel mediator of the innate immunity of epidermal keratinocytes. *International Immunology*, 19(9), 1095–1102. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxm083>
- Tomonaga, M., Golde, D., & Gasson, J. (1986). Biosynthetic (recombinant) human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: effect on normal bone marrow and leukemia cell lines. *Blood*, 67(1), 31–36. <https://doi.org/10.1182/blood.V67.1.31.31>
- Trajkovic, K. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes (Science (1244)). *Science*, 320(5873), 179. <https://doi.org/10.1126/science.320.5873.179>
- Trejo, J. L., Carro, E., & Torres-Alemán, I. (2001). Circulating Insulin-Like Growth Factor I Mediates Exercise-Induced Increases in the Number of New Neurons in the Adult Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 21(5), 1628–1634. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-05-01628.2001>
- Trøseid, M., Lappegård, K. T., Claudi, T., Damås, J. K., Mørkrid, L., Brendberg, R., & Mollnes, T. E. (2004). Exercise reduces plasma levels of the chemokines MCP-1 and IL-8 in subjects with the metabolic syndrome. *European Heart Journal*, 25(4), 349–355. <https://doi.org/10.1016/j.ehj.2003.12.006>
- Turner, A. M., & Greenough, W. T. (1985). Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. I. Synaptic and neuronal density and synapses per neuron. *Brain Research*, 329(1–2), 195–203. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)90525-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)90525-6)
- Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., & Pennington, D. J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1843(11), 2563–2582. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014>
- Utsugi-Kobukai, S., Fujimaki, H., Hotta, C., Nakazawa, M., & Minami, M. (2003). MHC class I-mediated exogenous antigen presentation by exosomes secreted from immature and mature bone marrow derived dendritic cells. *Immunology Letters*, 89(2–3), 125–131. [https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(03\)00128-7](https://doi.org/10.1016/S0165-2478(03)00128-7)
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötval, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), 654–659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>

- Van Dellen, A., Blakemore, C., Deacon, R., York, D., & Hannan, A. J. (2000). Delaying the onset of Huntington's in mice. *Nature*, *404*(6779), 721–722. <https://doi.org/10.1038/35008142>
- van Niel, G., Charrin, S., Simoes, S., Romao, M., Rochin, L., Saftig, P., Marks, M. S., Rubinstein, E., & Raposo, G. (2011). The Tetraspanin CD63 Regulates ESCRT-Independent and -Dependent Endosomal Sorting during Melanogenesis. *Developmental Cell*, *21*(4), 708–721. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.08.019>
- van Niel, G., Raposo, G., Candalh, C., Boussac, M., Hershberg, R., Cerf-Bensussan, N., & Heyman, M. (2001). Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology*, *121*(2), 337–349. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.26263>
- van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Reviews Neuroscience*, *1*(3), 191–198. <https://doi.org/10.1038/35044558>
- Varman, D. R., & Rajan, K. E. (2015). Environmental enrichment reduces anxiety by differentially activating serotonergic and neuropeptide y (NPY)-ergic system in Indian field mouse (*Mus booduga*): An animal model of post-traumatic stress disorder. *PLoS ONE*, *10*(5), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127945>
- Vega-Rivera, N. M., Ortiz-López, L., Granados-Juárez, A., Estrada-Camarena, E. M., & Ramírez-Rodríguez, G. B. (2020). Melatonin Reverses the Depression-associated Behaviour and Regulates Microglia, Fractalkine Expression and Neurogenesis in Adult Mice Exposed to Chronic Mild Stress. *Neuroscience*, *440*, 316–336. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.05.014>
- Vilček, J. (2003). The cytokines: An overview. In A. Thomson & M. Lotze (Eds.), *The Cytokine Handbook* (4a ed., pp. 3–18). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012689663-3/50005-3>
- Villeda, S. A., Luo, J., Mosher, K. I., Zou, B., Britschgi, M., Bieri, G., Stan, T. M., Fainberg, N., Ding, Z., Eggel, A., Lucin, K. M., Czirr, E., Park, J. S., Couillard-Després, S., Aigner, L., Li, G., Peskind, E. R., Kaye, J. A., Quinn, J. F., ... Wyss-Coray, T. (2011). The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature*, *477*(7362), 90–96. <https://doi.org/10.1038/nature10357>
- Wang, S., Liu, Y., Wu, C., Zhao, W., Zhang, J., Bao, G., Xu, G., Sun, Y., Chen, J., & Cui, Z. (2017). The Expression of IGFBP6 after Spinal Cord Injury: Implications for Neuronal Apoptosis. *Neurochemical Research*, *42*(2), 455–467. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2092-9>
- Weant, A. E., Michalek, R. D., Khan, I. U., Holbrook, B. C., Willingham, M. C., & Grayson, J. M. (2008). Apoptosis Regulators Bim and Fas Function Concurrently to Control Autoimmunity and CD8+ T Cell Contraction. *Immunity*, *28*(2), 218–230.

<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.12.014>

- Wein, A. N., McMaster, S. R., Takamura, S., Dunbar, P. R., Cartwright, E. K., Hayward, S. L., McManus, D. T., Shimaoka, T., Ueha, S., Tsukui, T., Masumoto, T., Kurachi, M., Matsushima, K., & Kohlmeier, J. E. (2019). CXCR6 regulates localization of tissue-resident memory CD8 T cells to the airways. *Journal of Experimental Medicine*, 216(12), 2748–2762. <https://doi.org/10.1084/jem.20181308>
- White, G. E., McNeill, E., Channon, K. M., & Greaves, D. R. (2014). Fractalkine promotes human monocyte survival via a reduction in oxidative stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(12), 2554–2562. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304717>
- Wilbanks, A., Zondlo, S. C., Murphy, K., Mak, S., Soler, D., Langdon, P., Andrew, D. P., Wu, L., & Briskin, M. (2001). Expression Cloning of the STRL33/BONZO/TYMSTR Ligand Reveals Elements of CC, CXC, and CX3C Chemokines. *The Journal of Immunology*, 166(8), 5145–5154. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.8.5145>
- Wilczak, N., De Vos, R. A. I., & De Keyser, J. (2003). Free insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding proteins 2, 5, and 6 in spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*, 361(9362), 1007–1011. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12828-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12828-0)
- Williams, D. E., Eisenman, J., Baird, A., Flauch, C., Ness, K. Van, March, C. J., Park, L. S., Martin, U., Mochizuki, D. Y., Boswell, H. S., Burgess, G. S., Cosman, D., & Lyman, S. D. (1990). *Identification of a Ligand for the c-kit*. 63, 167–174.
- Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Théry, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., Angevin, E., Amigorena, S., & Zitvogel, L. (2001). Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nature Medicine*, 7(3), 297–303. <https://doi.org/10.1038/85438>
- Wubbolts, R., Leckie, R. S., Veenhuizen, P. T. M., Schwarzmann, G., Möbius, W., Hoernschemeyer, J., Slot, J. W., Geuze, H. J., & Stoorvogel, W. (2003). Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes: Potential implications for their function and multivesicular body formation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(13), 10963–10972. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207550200>
- Xia, M., Hu, S., Fu, Y., Jin, W., Yi, Q., Matsui, Y., Yang, J., McDowell, M. A., Sarkar, S., Kalia, V., & Xiong, N. (2014). CCR10 regulates balanced maintenance and function of resident regulatory and effector T cells to promote immune homeostasis in the skin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134(3), 634–644.e10. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.03.010>
- Xiao, R., Bergin, S. M., Huang, W., Mansour, A. G., Liu, X., Judd, R. T., Widstrom, K. J., Queen, N.

- J., Wilkins, R. K., Siu, J. J., Ali, S., Caligiuri, M. A., & Cao, L. (2019). Enriched environment regulates thymocyte development and alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 75(April 2018), 137–148. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.09.028>
- Xiao, R., Bergin, S. M., Huang, W., Slater, A. M., Liu, X., Judd, R. T., Lin, E. J. D., Widstrom, K. J., Scoville, S. D., Yu, J., Caligiuri, M. A., & Cao, L. (2016). Environmental and Genetic Activation of Hypothalamic BDNF Modulates T-cell Immunity to Exert an Anticancer Phenotype. *Cancer Immunology Research*, 4(6), 488–497. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0297>
- Xie, L., Tsapralis, G., & Chen, Q. M. (2005). Proteomic identification of insulin-like growth factor-binding protein-6 induced by sublethal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress from human diploid fibroblasts. *Molecular and Cellular Proteomics*, 4(9), 1273–1283. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500032-MCP200>
- Xu, Y., Zhan, Y., Lew, A. M., Naik, S. H., & Kershaw, M. H. (2007). Differential Development of Murine Dendritic Cells by GM-CSF versus Flt3 Ligand Has Implications for Inflammation and Trafficking. *The Journal of Immunology*, 179(11), 7577–7584. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.11.7577>
- Yang, C., Kim, S. H., Bianco, N. R., & Robbins, P. D. (2011). Tumor-derived exosomes confer antigen-specific immunosuppression in a murine delayed-type hypersensitivity model. *PLoS ONE*, 6(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022517>
- Yang, J., Hu, S., Zhao, L., Kaplan, D. H., Perdew, G. H., & Xiong, N. (2016). Selective programming of CCR10+ innate lymphoid cells in skin-draining lymph nodes for cutaneous homeostatic regulation. *Nature Immunology*, 17(1), 48–56. <https://doi.org/10.1038/ni.3312>
- Yoneda, O., Imai, T., Nishimura, M., Miyaji, M., Mimori, T., Okazaki, T., Domae, N., Fujimoto, H., Minami, Y., Kono, T., Bloom, E. T., & Umehara, H. (2003). Membrane-bound form of fractalkine induces IFN- production by NK cells. *European Journal of Immunology*, 33(1), 53–58. <https://doi.org/10.1002/immu.200390007>
- Yu, S., Liu, C., Su, K., Wang, J., Liu, Y., Zhang, L., Li, C., Cong, Y., Kimberly, R., Grizzle, W. E., Falkson, C., & Zhang, H.-G. (2007). Tumor Exosomes Inhibit Differentiation of Bone Marrow Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 178(11), 6867–6875. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.11.6867>
- Yuan, P., Ding, L., Chen, H., Wang, Y., Li, C., Zhao, S., Yang, X., Ma, Y., Zhu, J., Qi, X., Zhang, Y., Xia, X., & Zheng, J. C. (2021). Neural Stem Cell-Derived Exosomes Regulate Neural Stem Cell Differentiation Through miR-9-Hes1 Axis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(May), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.601600>

- Zambrano, A., Otth, C., B. Maccioni, R., & I. Concha, I. (2010). IL-3 Control Tau Modifications and Protects Cortical Neurons from Neurodegeneration. *Current Alzheimer Research*, 7(7), 615–624. <https://doi.org/10.2174/156720510793499011>
- Zambrano, Angara, Otth, C., Mujica, L., Concha, I. I., & Maccioni, R. B. (2007). Interleukin-3 prevents neuronal death induced by amyloid peptide. *BMC Neuroscience*, 8(1), 82. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-8-82>
- Zarif, H., Nicolas, S., Guyot, M., Hosseiny, S., Lazzari, A., Canali, M. M., Cazareth, J., Brau, F., Golzné, V., Dourneau, E., Maillaut, M., Luci, C., Paquet, A., Lebrigand, K., Arguel, M. J., Daoudlarian, D., Heurteaux, C., Glaichenhaus, N., Chabry, J., ... Petit-Paitel, A. (2018). CD8 + T cells are essential for the effects of enriched environment on hippocampus-dependent behavior, hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity. *Brain, Behavior, and Immunity*, 69, 235–254. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.016>
- Zhang, Yafang, Crofton, E. J., Fan, X., Li, D., Kong, F., Sinha, M., Luxon, B. A., Spratt, H. M., Lichti, C. F., & Green, T. A. (2016). Convergent transcriptomics and proteomics of environmental enrichment and cocaine identifies novel therapeutic strategies for addiction. *Neuroscience*, 339, 254–266. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.09.051>
- Zhang, Yi, Chopp, M., Liu, X. S., Katakowski, M., Wang, X., Tian, X., Wu, D., & Zhang, Z. G. (2017). Exosomes Derived from Mesenchymal Stromal Cells Promote Axonal Growth of Cortical Neurons. *Molecular Neurobiology*, 54(4), 2659–2673. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9851-0>
- Zhao, L., Singhal, S., & Duan, W. (2007). *Brain Repair by Hematopoietic Growth Factors in a Rat*. 2584–2591. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.106.476457>
- Zhou, Y., Xu, H., Xu, W., Wang, B., Wu, H., Tao, Y., Zhang, B., Wang, M., Mao, F., Yan, Y., Gao, S., Gu, H., Zhu, W., & Qian, H. (2013). Exosomes released by human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced renal oxidative stress and apoptosis in vivo and in vitro. *Stem Cell Research and Therapy*, 4(2). <https://doi.org/10.1186/scrt194>
- Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., & Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nature Medicine*, 4(5), 594–600. <https://doi.org/10.1038/nm0598-594>
- Zsebo, K. M., Williams, D. A., Geissler, E. N., Broudy, V. C., Martin, F. H., Atkins, H. L., Hsu, R. Y., Birkett, N. C., Okino, K. H., Murdock, D. C., Jacobsen, F. W., Langley, K. E., Smith, K. A., Takeish, T., Cattnach, B. M., Galli, S. J., & Suggs, S. V. (1990). Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell*, 63(1),

213–224. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90302-U](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90302-U)

Zsebo, K. M., Wypych, J., McNiece, I. K., Lu, H. S., Smith, K. A., Karkare, S. B., Sachdev, R. K., Yuschenkoff, V. N., Birkett, N. C., Williams, L. R., Satyagal, V. N., Tung, W., Bosselman, R. A., Mendiaz, E. A., & Langley, K. E. (1990). Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver-conditioned medium. *Cell*, *63*(1), 195–201. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90300-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90300-4)

Zujovic, V., Benavides, J., Vigé, X., Carter, C., & Taupin, V. (2000). Fractalkine modulates TNF- $\alpha$  secretion and neurotoxicity induced by microglial activation. *Glia*, *29*(4), 305–315. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(20000215\)29:4<305::AID-GLIA2>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(20000215)29:4<305::AID-GLIA2>3.0.CO;2-V)