



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
Instituto de Fisiología Celular

**MECANISMOS CELULARES DE LA RECUPERACIÓN ESPONTÁNEA TRAS EL INFARTO CEREBRAL
ISQUÉMICO: INFLUENCIA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES LIBERADAS POR LOS ASTROCITOS**

T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
M. en C. Yessica Rosalinda Heras Romero

Director de tesis:
Dr. Luis B. Tovar y Romo
Instituto de Fisiología Celular – división Neurociencias

Comité tutor:
Dr. Luis Concha Loyola
Instituto de Neurobiología
Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar
Instituto de Fisiología Celular

Ciudad Universitaria, Ciudad de México octubre de 2021



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.

AGRADECIMIENTOS OFICIALES

Este proyecto fue realizado con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CB219542 y A1-S-13219) y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (PAPIIT IN226617 e IN207020) y se contó con la beca de doctorado del CONACYT (428473).

Agradezco las facilidades brindadas para la realización del trabajo experimental de la Q.F.B. Cristina Aranda Fraustro, de la Dra. Ruth Rincón Heredia, M. en C. Ana María Escalante Gonzalbo, Ing. Francisco Pérez Eugenio, Daniela Rodríguez Montaña, MVZ Claudia V. Rivera Cerecedo y personal del Bioterio del I.F.C.

AGRADECIMIENTOS

A los miembros de mi comité tutor:

- Dr. Luis B. Tovar y Romo
- Dr. Luis Concha Loyola
- Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar

Por la dirección, apoyo, compromiso en todo momento para realizar este proyecto y sobre todo por ser parte de mi crecimiento académico.

A mis hijos por ser la luz que guía mi vida. Estefi, iluminas mis días con tu resplandor y energía inagotable, por llenarme de sonrisas, por ser esa personita increíble. Ale, por acompañarme en las madrugadas cuando trabajaba y en cualquier momento de este camino, por tu ayuda para lograr terminar este trabajo, por tus extraordinarios pensamientos y análisis, por ser esa personita maravillosa.

A mis padres, por hacer de mi la mujer que soy, por su apoyo incondicional, por mostrarme el camino cuando no lo encontraba, por darme la fuerza y enseñarme a seguir aun con su ausencia.

A la familia Heras, por enseñarme a salir adelante a pesar de la adversidad, especialmente a mi tía Sofía y mi tío Jesús, por ser mi ejemplo, por su gran amor y estar al pendiente de mi en todo momento.

A Germán, por el apoyo incondicional, por todo el amor, empatía y sinceridad.

A Q.F.B. Cristina Aranda Fraustro, por el apoyo logístico y administrativo para la realización del presente trabajo. Al Dr. Axayacatl Morales Guadarrama por todo lo compartido, todo lo aprendido en las asesorías de procesamiento de las imágenes de resonancia magnética, quedaron increíbles las imágenes. A la Dra. Ruth Rincón Heredia de la Unidad de Imagenología, por el apoyo en la obtención de las imágenes de inmunofluorescencia y siempre estar dispuesta. A la Dra. Martha Escobar Rodríguez por el gran apoyo para realizar los estudios de electrofisiología, a su equipo de trabajo: Dra. Araceli Martínez Moreno y Mtro. Esteban Urrieta Chávez.

A la M.V.Z. Claudia V. Rivera Cerecedo del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular, por el apoyo incondicional e invaluable amistad.

Gracias en especial a mis compañeros del laboratorio AL-305, Alfredo Cárdenas Rivero, Aura N. Campero Romero, Ricardo Santana Martínez, Marina Cristóbal Ortiz e Isaac Ponce Arias, por el apoyo constante y toda la ayuda en el trabajo del laboratorio, por compartir dentro y fuera de la ciencia, por su extraordinaria amistad.

Al Dr. Ernesto Roldan Valadez por esas platicas donde surgieron las ideas y mi interés por evaluar los parámetros de resonancia magnética después de un daño cerebral, por siempre estar pendiente de mi, por la gran amistad y ser parte de mi crecimiento académico.

A mis "queridas" Amaranta y Andira, por siempre estar para mi y su inmenso cariño.

En 1913, Santiago Ramón y Cajal, escribió:

“ ... una vez terminado el desarrollo, las fuentes de crecimiento y regeneración de los axones y dendritas se secan irrevocablemente. En los cerebros adultos las vías nerviosas son algo fijo, terminado, inmutable. Todo puede morir, nada puede regenerarse. Corresponde a la ciencia del futuro cambiar, si es posible, este cruel decreto”

Abreviaturas

- AD:** Difusión Axial.
- Alix y TSG-101:** proteínas del complejo ESCRT.
- AP:** anteroposterior.
- ATP:** Adenosina trifosfato.
- BBB:** barrera hematoencefálica.
- BDNF:** Factor neurotrófico derivado de cerebro.
- bFGF:** factor básico de crecimiento de fibroblastos.
- BSA:** Albumina bovina sérica.
- Ca²⁺:** calcio iónico.
- CAM:** concentración mínima alveolar.
- CAPs:** potenciales de acción compuestos.
- CC:** cuerpo calloso.
- CD9 y CD63:** tetraspaninas específicas de exosomas.
- Cl:** cloro iónico.
- CT-B:** subunidad B de la toxina del cólera.
- CREB:** Proteína de unión a elementos de respuesta a AMP cíclico.
- DE:** desviaciones estándar.
- DTI:** tensor de difusión.
- DV:** dorsoventral.
- EAAT:** Transportadores de aminoácidos excitatorios.
- EP:** eritropoyetina.
- ESCRT:** complejo endosomal necesario para el transporte.
- FA:** fracción de anisotropía.
- FGF:** factor de crecimiento fibroblástico.
- GDNF:** factor neurotrófico derivado de la glía.
- GLAST:** transportador de aspartato de glutamato.
- GLT-1:** transportador de glutamato-1.
- GFAP:** proteína ácida fibrilar glial.
- H⁺:** hidrógeno iónico.
- HIF-1:** Factor de crecimiento inducido por hipoxia 1 α .
- HxEv:** Vesículas extracelulares en condiciones de hipoxia.
- i.c.v.:** vía intracerebroventricular.
- IF:** inmunofluorescencia.
- IFN- γ :** interferón gamma.
- IL-1 α :** interleucina 1 alfa.
- IL-1 β :** interleucina 1 beta.
- IL-6:** interleucina 6.
- I/O:** entrada/salida.
- K⁺:** potasio iónico.
- MAP-2:** proteína asociada a microtúbulos 2.
- MD:** Difusión media.
- MCA:** arteria cerebral media
- MCAo:** oclusión de la arteria cerebral media
- MCAOt:** oclusión transitoria de la arteria cerebral media.
- mRNAs:** RNA mensajero.
- miRNAs:** pequeños RNA.
- MVB:** cuerpos multivesiculares.
- Na⁺:** sodio iónico.
- NaCl:** cloruro de sodio.
- NF- κ B:** factor nuclear kappa B.
- NGF:** factor de crecimiento nervioso.
- NMDA:** N-metil-D-aspartato.
- NxEv:** Vesículas extracelulares en condiciones de normoxia
- OGD:** privación de oxígeno-glucosa.
- PFA:** paraformaldehído al 4% en solución salina de buffer de fosfatos.
- PO2:** presión de oxígeno.
- RD:** Difusión Radial.
- RONS:** radicales libres de oxígeno y nitrógeno.
- RM:** resonancia magnética.
- SD:** despolarización expansiva.
- SEM:** error estándar de la media
- SNC:** Sistema Nervioso Central
- TBST:** solución salina tamponada con tritón.

TGF: factor de crecimiento transformante.

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.

TUJ-1: tubulina β III.

VPL: ventral posterolateral.

VPM: ventral posteromedial

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial.

VIM: vimentina.

WT: ratones silvestres.

Resumen

La recuperación espontánea es una respuesta adaptativa ante el daño que induce el infarto cerebral isquémico y explica la mayor parte de la recuperación neurológica que desarrollarán los pacientes dentro de los pocos meses posteriores al evento. Aunque es muy limitada, la recuperación espontánea es promovida mecánicamente por procesos de recuperación axonal, e incluso se han descrito previamente varias vías de señalización molecular. En el presente trabajo, evaluamos el efecto de la administración intracerebroventricular de una suspensión de vesículas extracelulares derivadas de astrocitos corticales primarios en cultivo incubados por 48 h bajo condiciones de normoxia (NxEV) o hipoxia (HxEV) durante 6 h seguidas de un periodo de recuperación de 42h, en un modelo de isquemia-reperusión inducido por oclusión transitoria de la arteria cerebral media en ratas adultas, en cursos temporales de la evolución de la lesión a las 24 horas, 7, 14 y 21 días postinfarto. A partir de estudios de resonancia magnética (RM) mostramos una reducción en el volumen de la lesión cerebral en el curso temporal de la evolución de la lesión; al cuantificar parámetros directamente relacionados con el estado fisiopatológico del cerebro como la fracción de anisotropía (FA), y el tensor de difusión (DTI) para calcular los diferentes índices de difusión y generar la reconstrucción 3D de las fibras nerviosas del cuerpo calloso (CC) y de las proyecciones aferentes y eferentes del núcleo talámico ventral posteromedial (VPM) y núcleo talámico ventral posterolateral (VPL) a la corteza cerebral. También realizamos la evaluación histológica a través de proteínas de citoesqueleto, que mostraron una correlación en la remodelación e integridad estructural con los datos obtenidos a través de RM. La recuperación funcional fue analizada a través de pruebas conductuales en una escala basada en la medición de los efectos funcionales del infarto isquémico. Finalmente generamos registros repetitivos de los potenciales de acción compuestos (CAPs) en el cuerpo calloso. En conjunto nuestros datos indican que la recuperación facilitada por los exosomas no solo es anatómica sino funcional y proporcionan evidencia de que los astrocitos tienen el potencial de facilitar la recuperación basal que ocurre naturalmente después del infarto cerebral isquémico a través de la liberación de mediadores celulares contenidos en vesículas extracelulares.

Abstract

Spontaneous recovery is an adaptative response after stroke, which explains the central part of the neurological recovery in patients a few months from the event. However limited, the spontaneous recovery is mechanistically driven by axonal restorative processes for which several molecular cues have been previously described. Astrocytes are major participants in this process, and here we evaluated how they contribute to this process by releasing extracellular vesicles (EVs). First, we incubated primary astrocytes for 48 h under normoxic conditions (NxEV) or for 6 h under hypoxia followed by 42 h for recovery in normoxia (HxEV), and collected the EVs released to the culture media. Then we administered these EVs to rats subjected to stroke by the occlusion of the middle cerebral artery (MCAO), and followed their recovery at 7, 14, and 21 days. We determined the temporal evolution of infarct assessed with magnetic resonance (MRI), and observed a significant reduction in the infarct volume along the evolution of the lesion; by quantifying parameters directly related to the pathophysiological state of the brain such as the anisotropy fraction (FA), and the diffusion tensor (DTI) to calculate the different diffusion rates and generate the 3D reconstruction of the nerve fibers of the corpus callosum (CC) and from the afferent and efferent projections of the ventral posterolateral thalamic nucleus (VPM) and ventral posteromedial thalamic nucleus (VPL) to the cerebral cortex. We also performed the histological evaluation through cytoskeletal proteins, which correlated in remodeling and structural integrity with the data obtained by MRI. Functional recovery was then analyzed by behavioral tests on a scale based on measuring the functional effects of ischemic infarction. Finally, we performed repetitive recordings of compound action potentials (CAPs) in the corpus callosum to assess the functional integrity of this structure after stroke and EVs treatment. Our data indicate that the recovery facilitated by astrocyte-derived EVs is not only anatomical but functional. We conclude that astrocytes can facilitate the natural occurring basal recovery after ischemic stroke through the release of cellular mediators contained in EVs.

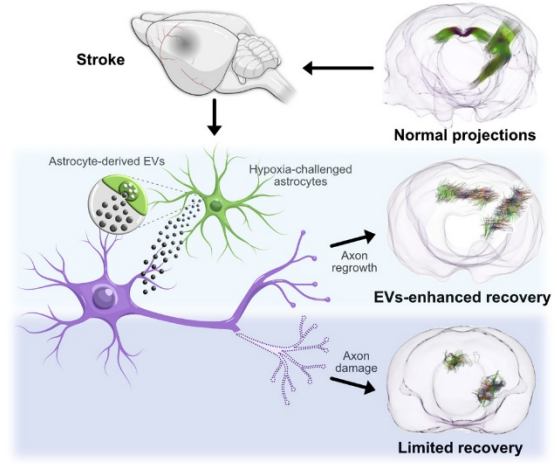
ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1 <i>Fisiopatología del infarto cerebral</i>	1
1.1.1 <i>Metabolismo cerebral durante la isquemia y liberación de glutamato al medio extracelular</i>	1
1.1.2 <i>Despolarización anóxica</i>	3
1.2.1 <i>Protección de astrocitos durante la isquemia</i>	4
1.2.2 <i>Neuroprotección por astrogliosis reactiva después del infarto cerebral isquémico</i> 4	
1.3 <i>Neuroprotección por factores tróficos y neurotrofinas derivados de astrocitos después del accidente cerebrovascular</i>	6
1.4 <i>Astrocitos en la neuro-reparación</i>	7
1.5 <i>Reparación y crecimiento axonal después del infarto isquémico</i>	7
1.6 <i>Exosomas</i>	8
2. Planteamiento del problema	10
3. Objetivo general	11
3.1 Objetivos específicos:	11
4. Métodos	12
<i>Animales</i>	12
<i>Diseño experimental</i>	12
<i>Modelo de infarto cerebral por MCAOt</i>	13
<i>Cultivo primario de astrocitos</i>	13
<i>Aislamiento y obtención de la suspensión de exosomas</i>	13

<i>Administración de exosomas</i>	14
<i>Resonancia magnética.....</i>	14
<i>Procesamiento de datos de RM</i>	15
<i>Evaluación de marcadores de proteínas de citoesqueleto y crecimiento axonal.....</i>	16
<i>Evaluación histológica de tractos axonales</i>	17
<i>Evaluación neurofuncional</i>	17
<i>Caracterización electrofisiológica de la función axonal</i>	20
5. Resultados	21
5.1 <i>Favorece la recuperación espontánea la administración de exosomas después del infarto.....</i>	21
5.3 <i>La administración de exosomas facilita la recuperación estructural del tejido afectado después del infarto</i>	25
5.4 <i>La preservación de las fibras nerviosas de las proyecciones aferentes y eferentes del núcleo talámico ventral posterolateral (VPM) a la corteza es promovida por la administración de exosomas derivados de astrocitos.....</i>	35
6. Discusión.....	44
7. Conclusión.....	52
8. Referencias.....	53
9. Anexo.....	63

TABLA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representación esquemática de los tiempos de la estrategia experimental. __ 21.
- Figura 2.** La administración intracerebroventricular de exosomas derivados de astrocitos reduce el volumen de infarto en ratas después de MCAOt. _____ 23.
- Figura 3.** La administración de exosomas derivados de astrocitos preserva la integridad estructural. _____ **iError! Marcador no definido.**26.
- Figura 4.** Cambios en los valores registrados a partir del DTI en el hemisferio contralateral. _____ 30.
- Figura 5.** Representación 3D de la segmentación de los tractos neurales. _____ 31.
- Figura 6.** Tractografías basada en imágenes de Tensor de Difusión DTI in vivo. _____ 33.
- Figura 7.** La administración de exosomas derivados de astrocitos promueve la recuperación de la integridad del tejido afectado después del infarto isquémico. _____ 34.
- Figura 8.** La administración de exosomas derivados de astrocitos promueve la recuperación del transporte axonal después del infarto isquémico. _____ 36.
- Figura 9.** Recuperación de CAP después de la administración de exosomas _____ 38.
- Figura 10.** La recuperación neurofuncional después del infarto isquémico es promovida por la administración de exosomas. _____ 40.



1. INTRODUCCIÓN

Estudio de los mecanismos de regeneración axonal modulados por exosomas derivados de astrocitos después del infarto cerebral isquémico

1. Introducción

El infarto cerebral isquémico es causado por una obstrucción de flujo sanguíneo en el cerebro que produce alteraciones neurológicas devastadoras con secuelas motoras y cognitivas permanentes [1, 2]. En 2017 el infarto cerebral isquémico fue catalogado como la segunda causa de muerte a nivel mundial por la Organización Mundial de la Salud y anualmente se reportan alrededor de 10 millones de casos en el mundo [3]. Se estima que la tasa de muerte neuronal en el parénquima cerebral afectado por el infarto cerebral isquémico de grandes vasos es de 120 millones de neuronas por hora con la pérdida de 714 km de fibras de mielina [4]. Sin embargo, inmediatamente después del evento la mayoría de los pacientes experimentan cierto grado de recuperación espontánea, definida como la mejoría de las funciones alteradas determinada exclusivamente por el transcurso del tiempo [5]. La evidencia reciente revela que la reparación axonal, la neurogénesis y la resolución de procesos inflamatorios, intervienen mecanísticamente en dicha recuperación [5-7]. Aunque el manejo adecuado del paciente en las primeras horas mejora significativamente la supervivencia [8], en la actualidad, el único tratamiento aprobado para el manejo clínico del infarto cerebral es la administración del activador del plasminógeno tisular en las primeras 3 horas para resolver la oclusión del vaso y restablecer el flujo sanguíneo al parénquima afectado [9].

1.1 Fisiopatología del infarto cerebral

1.1.1 Metabolismo cerebral durante la isquemia y liberación de glutamato al medio extracelular

El evento isquémico desencadena procesos fisiopatológicos complejos locales, como la muerte neuronal [9]. Las lesiones producidas por el infarto cerebral isquémico tienen dos regiones principales: la zona central llamada foco isquémico, determinada por la reducción severa del flujo sanguíneo con una tasa de tan sólo 20% del flujo basal en la profundidad del parénquima irrigado por la arteria ocluida [10]. Esa reducción del flujo sanguíneo conlleva a un rápido consumo de las escasas reservas de glucógeno en los astrocitos [11, 12] induciendo la severa disminución de las concentraciones de ATP en el foco del infarto, existe un reporte en un modelo de isquemia global donde la disminución de ATP puede llegar a reducirse hasta 60% en el primer minuto del evento isquémico [13].

La deficiencia de ATP aunado al estrés oxidativo dependiente de la producción de radicales libres de oxígeno y nitrógeno (RONS) resultado de la hipoxia [14] regula negativamente la actividad de la glutamina sintetasa [15] principalmente expresada en los astrocitos [16]. La glutamina sintetasa convierte el glutamato (principal neurotransmisor excitador y el más abundante en el cerebro) en glutamina, sin embargo este es un proceso dependiente de ATP [17]. El glutamato es liberado por las neuronas excitadoras glutamatérgicas a la hendidura sináptica y es rápidamente capturado por los astrocitos mediante los transportadores de aminoácidos excitadores (EAAT) 1 y 2, que dependen del cotransporte de 3 Na⁺ y 1 H⁺ [18]. El desbalance iónico producido por la severa disminución de ATP induce la inversión del transporte de glutamato por los transportadores de aminoácidos excitadores (EAAT) [19, 20], lo que incrementa las concentraciones de glutamato extracelular, que aunado a la disminución de la actividad de la glutamina sintetasa, ocasiona un daño severo por excitotoxicidad [21].

Además, el glutamato no reciclado activa rápidamente los receptores de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) extrasinápticos que, mediado por la proteína de unión a los elementos de respuesta a AMP cíclico (CREB), induce la regulación negativa de la expresión del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF). Mientras que la falla del ciclo glutamato-glutamina promueve la acumulación de amonio, que a concentraciones elevadas resulta neurotóxico [22]. Los mecanismos anteriormente descritos son el resultado de la falla energética que induce muerte neuronal rápida típicamente necrótica en el foco del infarto [10].

En la zona circundante al foco isquémico llamada penumbra, la reducción del flujo sanguíneo es parcial con una tasa del 65% del flujo basal, a pesar del estrés que sufren las neuronas que se encuentran críticamente vulnerables al perder su frágil equilibrio metabólico, las neuronas de la penumbra permanecen viables durante un período prolongado después de la isquemia [23]. Por tanto, mediante la restauración del flujo y/o de la homeostasis celular, las neuronas de esta zona son potencialmente rescatables [24].

El glutamato extracelular, progresivamente acumulado por falla en su reciclamiento [10], activa los receptores de NMDA promoviendo la entrada de Na⁺, Ca²⁺, Cl⁻ y la salida de K⁺ que se acumula en el espacio extracelular [20], incrementando su concentración de 3-4 a 70 mM en menos de 3 min [25, 26], elevando el potencial de reposo a un nivel cercano al umbral de potencial de acción [27]. La falla energética neuronal por desabastecimiento de ATP impacta negativamente en el funcionamiento de la ATPasa impidiendo el restablecimiento del potencial de membrana llevando a las neuronas a un estado de despolarización anóxica [20, 28, 29].

1.1.2 Despolarización anóxica

La despolarización anóxica provocada por la falla energética por depleción de ATP es un factor iniciador del daño isquémico irreversible en el núcleo del infarto [29] que se expande a una velocidad constante de 2-3mm/min, de acuerdo con determinaciones experimentales hechas en cortes coronales de cerebro de corteza, estriado e hipocampo de ratas machos Sprague Dawley de 21-30 días de edad [30].

A pesar del compromiso energético por la hipoxia las neuronas de la zona de penumbra mantienen el potencial de reposo. Sin embargo, el incremento de K^+ extracelular que se difunde desde el núcleo del infarto y la disminución de la recaptación de éste por los astrocitos, producen la elevación del potencial de reposo y favorecen la aparición de corrientes intermitentes espontáneas expansivas de despolarización (*spreading depolarization, SD*), [31].

La SD es una onda expansiva lenta de despolarización en donde la actividad sináptica transitoria en el tejido isquémico cesa, y se le ha relacionado al edema citotóxico neuronal, a alteraciones estructurales de las dendritas y al incremento del consumo local de oxígeno que incrementa el daño hipóxico inducido por el infarto [32]. Este evento fisiológico junto con la salida masiva de K^+ [33] y la activación de las caspasas por aumento del Ca^{2+} intracitoplasmático [34] induce la muerte neuronal por mecanismos apoptóticos [33-35], que expanden el núcleo del infarto un 19% después de cada onda de SD [36]. La despolarización anóxica y la SD están relacionadas con la disminución de la perfusión sanguínea permanente o transitoria, respectivamente, del parénquima isquémico, debido a la disminución del calibre vascular por vasoconstricción, lo que define el acoplamiento neurovascular constrictivo [36].

En la zona de penumbra las neuronas son potencialmente rescatables [7], y los astrocitos, que tienen una función importante en la fisiología cerebral al ser reguladores del soporte trófico y metabólico de las neuronas, modulan de manera central las respuestas de supervivencia y mantenimiento de la homeostasis cerebral, constituyendo importantes blancos reguladores de la adaptación postisquemia [37].

1.2. Función de los astrocitos en el infarto isquémico

1.2.1 Protección de astrocitos durante la isquemia

Algunos estudios *in vitro* han demostrado que los astrocitos son más resistentes a la privación de oxígeno-glucosa (OGD) con respecto a las neuronas, ya que la mayoría de las neuronas en cocultivos de astrocitos-neuronas mueren tras 60-90 min de OGD, mientras que los astrocitos se dañan irreversiblemente entre las 4-6 h [38].

En ensayos de isquemia cerebral experimental con modelos animales, se ha demostrado que los astrocitos se mantienen viables en la zona de penumbra, los cuales permiten a las neuronas residentes de la misma zona mantenerse vivas [39, 40], incluso en la fase de reperfusión posterior a la oclusión transitoria de la arteria cerebral media (MCAOt). Sin embargo, en el foco isquémico existen astrocitos metabólicamente activos [41]; por lo tanto, la supervivencia de los astrocitos facilita la posibilidad de restablecer la integridad neuronal para obtener un retorno de la función neuronal en la zona de penumbra isquémica. Incluso existen estudios que han demostrado un grado importante de neuroprotección en el infarto isquémico cuando se incrementa la supervivencia de los astrocitos, al administrar adrenomedulina [42].

1.2.2 Neuroprotección por astrogliosis reactiva después del infarto cerebral isquémico

Los astrocitos reactivos generalmente se consideran perjudiciales para la restauración del tejido después de un evento cerebral isquémico. Se ha demostrado que minutos después de la lesión, los astrocitos reactivos producen y liberan mediadores inflamatorios como las citocinas que incluyen interleucina 6, (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina alfa y beta (IL-1 α y β) e interferón gama (INF γ) [43-45], estas citocinas pueden inducir la muerte neuronal [46] y la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B) puede contribuir a la degeneración neuronal por inducción de liberación de citocinas inflamatorias y moléculas reactivas de oxígeno [47]. Además, la inactivación de NF- κ B astrogliar promueve la supervivencia neuronal en la lesión isquémica [48]. Sin embargo, durante la etapa inicial del evento isquémico, los astrocitos reactivos en respuesta al daño, sobreexpresan la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y muestran hipertrofia tanto del cuerpo celular como en los procesos astrocitarios con formación de cicatriz glial que inhibe la regeneración axonal y la migración celular [49], pero también la cicatriz glial ejerce funciones

benéficas, ya al que aísla el sitio de la lesión evitando una ola expansiva de daño tisular hacia el tejido sano [50, 51]. Por tanto, los astrocitos reactivos restringen la lesión y minimizan el área de inflamación en la etapa aguda después de la lesión del Sistema Nervioso Central (SNC) [52], y también pueden restringir la difusión de los factores secretados en la región de la lesión hacia el área de penumbra.

La oclusión de la arteria cerebral media en ratones doble knockout ^(GFAP^{-/-} Vim^{-/-}), que tienen la barrera hematoencefálica (BBB) estructuralmente alterada, demostró que la deficiente formación de cicatriz astrogliol en la zona de peri-infarto conlleva a una mayor expansión de la inflamación y un mayor volumen de infarto en comparación con los ratones silvestres (WT) [40]. También, en un modelo de infarto cerebral embólico en ratones con inhibición del factor de crecimiento transformante beta (TGF-β), una citocina antiinflamatoria sintetizada por astrocitos que se incrementa después del infarto isquémico se encontró que hay un incremento de la neuroinflamación y un déficit motor severo [53]. Estos datos sugieren que los astrocitos reactivos tienen una función esencial en la neuroprotección al limitar la inflamación en el área de peri-infarto y preservar la función cerebral durante el período subagudo después del infarto cerebral.

1.2.3 Neuroprotección por anti-excitotoxicidad de los astrocitos después del infarto cerebral

Uno de los mecanismos de muerte celular en el infarto cerebral isquémico más estudiado es la excitotoxicidad [54], el aumento de las concentraciones extracelulares de glutamato en el cerebro isquémico favorece la hiperactivación local de los receptores ionotrópicos de glutamato (NMDAR), desencadena la muerte neuronal a través de la entrada excesiva de Na⁺ y Ca²⁺ a la neurona [55]. Sin embargo, los astrocitos al ser los principales responsables de la captura de glutamato del espacio extracelular utilizando los transportadores de glutamato dependientes de Na⁺, el transportador de aspartato de glutamato (GLAST) y el transportador de glutamato-1 (GLT-1) regulan y mantienen las concentraciones adecuadas de glutamato en el espacio extracelular [38]. Estudios in vitro en cultivos corticales de cerebro de rata demuestran, que se requieren concentraciones de glutamato cien veces mayores para producir neurotoxicidad en presencia de astrocitos abundantes, lo que indica que los astrocitos protegen a las neuronas de la neurotoxicidad del glutamato por la captación del mismo [53].

Un estudio en ratones ^(GFAP^{-/-} Vim^{-/-}), demostró que la ausencia de GFAP y Vim produce una activación alterada de los astrocitos que disminuye su captura de glutamato, provocando un aumento del volumen del infarto después de MCAo [40].

1.3 Neuroprotección por factores tróficos y neurotrofinas derivados de astrocitos después del accidente cerebrovascular

En respuesta a la isquemia los astrocitos reactivos producen múltiples factores neurotróficos para proteger a las neuronas [54-58], incluido el factor de crecimiento nervioso (NGF) [57, 59, 60], el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) [57, 61, 62], el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) [63, 64], el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) [65, 66], el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [67, 68] y la eritropoyetina (EPO) [69]. Varios estudios *in vitro* han demostrado que los astrocitos sintetizan y liberan factores neurotróficos a los medios de cultivo [57, 70]. Un estudio mostró que la administración a través de una bomba de infusión continua de medio condicionado de astrocitos en ratas favorece la disminución del volumen del infarto después de la MCAo [71]. El incremento de la secreción de eritropoyetina derivada del precondicionamiento de astrocitos promueve la supervivencia neuronal en la lesión cerebral isquémica [72]. Los datos anteriores sugieren que la liberación de factores neurotróficos derivados de los astrocitos promueve la neuroprotección al disminuir el daño en la isquemia cerebral.

Los factores tróficos confieren un efecto neuroprotector ante el daño inducido por el infarto isquémico, son producidos en las primeras horas después del daño cerebral, incluyendo el factor de crecimiento nervioso NGF [73]; el factor neurotrófico derivado del cerebro, BDNF; [74, 75], el factor neurotrófico derivado de la glía, GDNF; los factores de crecimiento fibroblástico ácido, FGF y miembros de la familia del factor de crecimiento transformante, TGF, [76]. Estos factores confieren protección promoviendo la supervivencia e incluso contribuyen en la plasticidad neuronal después del infarto cerebral isquémico [76, 77].

También los miRNAs que son pequeños RNA no codificantes que regulan la traducción de RNA mensajeros, tienen un rol fundamental en enfermedades del SNC y efectos importantes en la reparación del daño en el infarto cerebral [78]. Algunos de los miRNAs dentro del axón distal de las neuronas regulan y favorecen el crecimiento axonal como miR15b, miR195 y miR26b [79], miRNA130a, regula indirectamente la expresión de VEGFR2 receptor de VEGF que es un factor

neurotrófico que se incrementa en las primeras horas del infarto cerebral [80, 81], involucrado en la neuroadaptación posterior al evento isquémico [82].

1.4 *Astroцитos en la neuro-reparación*

La etapa temprana de recuperación después del infarto cerebral se caracteriza por la resolución del edema cerebral, la disminución de la inflamación y la excitotoxicidad; mientras que la recuperación después de las 2 semanas iniciales probablemente se deba a la plasticidad neurovascular. Aunque el cerebro lesionado de los mamíferos adultos es un entorno altamente inhibitorio para la regeneración neuronal, el cerebro isquémico responde dinámicamente al evento cerebrovascular para tratar de recuperar su homeostasis [83]. El proceso de reparación del tejido cerebral lesionado por la isquemia cerebral incluye: angiogénesis, neurogénesis, plasticidad neuronal y sinaptogénesis [57, 84, 85]. Los eventos celulares y moleculares endógenos abren una ventana de tiempo crucial para crear un microambiente permisivo de regeneración en la fase isquémica postaguda [86], estos eventos endógenos inducen la remodelación estructural y funcional del tejido cerebral intacto restante y conducen a la recuperación neurológica.

1.5 *Reparación y crecimiento axonal después del infarto isquémico*

El daño axonal es la principal característica en las lesiones del SNC. La extensión del daño axonal durante la fase aguda y el grado de regeneración axonal en la fase crónica son determinantes para la recuperación del tejido. [87]

Existen dos condiciones principales que limitan el crecimiento axonal después del infarto cerebral: la capacidad intrínseca disminuida de las neuronas para restablecer su axón y un entorno extrínseco inhibitorio [88-91]. Sin embargo, la evidencia indica que existen mecanismos endógenos que permiten a los axones crecer después de la lesión en el SNC [87, 92-96].

Después del infarto cerebral se pueden desencadenar mecanismos de reparación y crecimiento axonal que producen nuevas proyecciones en el hemisferio dañado [97]. Interesantemente, existe un incremento en las proyecciones axonales en el hemisferio contralateral que han sido asociadas a la recuperación funcional [98].

Se sabe que después del daño axonal se ensambla el cono de crecimiento que abarca la zona terminal de los procesos neuríticos y que a través de la reorganización del citoesqueleto en el muñón proximal del axón es el primer paso para una regeneración exitosa [98]. El cono de crecimiento controla la velocidad y la dirección del crecimiento, ensamblando elementos del

citoesqueleto y componentes de membrana para dar lugar a la extensión del axón [99]. Tanto la formación del cono de crecimiento como el avance del crecimiento del axón están regulados por factores extracelulares y moléculas de señalización intracelular [100, 101]. Se sabe que el crecimiento del axón se divide en dos zonas: la región periférica, rica en lamelipodios y filopodios, y la región central, localizada detrás de la región periférica formada por una red densa de microtúbulos y rica en organelos celulares como mitocondrias y vesículas excitóticas [101]. A pesar de que la mayoría de microtúbulos se encuentran en la zona central, algunos se proyectan hasta la región periférica produciendo interacciones con la actina y los componentes de la señalización celular necesarias para la motilidad del cono de crecimiento [102]. Finalmente, existe una tercera región, localizada entre la zona periférica y la zona central, denominada región de transición rica en estructuras contráctiles como la acto-miosina que regula las interacciones actina-microtúbulos [103].

En este proceso se activa la síntesis de proteínas relevantes de citoesqueleto como la tubulina β III (TUJ-1), uno de los principales componentes del citoesqueleto indispensable en la reorganización de microtúbulos que ocurre en el crecimiento axonal [101, 104]. Otra proteína importante que participa en el crecimiento axonal es la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP-2), que participa en el ensamblaje de los dímeros de tubulina para formar los microtúbulos [105]. Esta proteína se localiza tanto en las dendritas como en el axón y recubre al microtúbulo para establecer uniones con filamentos adyacentes [98, 99]. Es importante considerar que al mismo tiempo ocurren en el tejido cerebral dañado una serie de procesos que limitan la regeneración axonal asociados a mecanismos inflamatorios activados por citocinas [106].

1.6 Exosomas

Los exosomas son vesículas extracelulares que miden entre 30 y 100 nm de diámetro que se originan a partir del endosoma tardío [107, 108]. Tienen una bicapa lipídica enriquecida en colesterol, esfingomiélin, ceramida y fosfatidilserina [109], y además se caracterizan por su composición molecular, al presentar proteínas específicas que constituyen marcadores exosomales, entre las que se encuentran las tetraspaninas CD9 y CD63, Alix y Tsg101 [110].

Los exosomas contienen diversas proteínas de procesos involucrados en su biogénesis y además contienen en el lumen macromoléculas que incluyen proteínas, lípidos, mRNAs y miRNAs, procedentes todos ellos del citosol [111]. Muchos estudios de proteómica y transcriptómica de exosomas han demostrado que el contenido de proteínas y RNA depende de la célula

progenitora. La compilación de estos hallazgos está documentada en la base de datos ExoCarta [112, 113].

La formación de los exosomas se inicia con la invaginación de la membrana plasmática, generando un endosoma temprano, que mientras madura en el interior celular, incorpora de forma predeterminada su carga [114]. El endosoma tardío o cuerpo multivesicular MVB está conformado por pequeñas vesículas intraluminales (ILV en inglés), las cuales se invaginan y se convierten en exosomas cuando se fusiona con la membrana celular, liberándose así al espacio extracelular [115]. Este proceso es dirigido por complejos proteicos llamados ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required For Transport*), entre los que destacan el sistema Alix y el TSG101 [116]. Aunque también se han descrito mecanismos independientes del complejo ESCRT [117]. Los cuerpos multivesiculares (MVB) son conducidos por proteínas transportadoras de la familia RAB hacia el lisosoma para su reciclaje o hacia la membrana plasmática para ser secretados al exterior celular [114].

Los exosomas son secretados al medio extracelular por las células progenitoras, y en el SNC se han aislado y caracterizado exosomas derivados de cultivos primarios incluyendo: células de la glía [118] y microglía [119], neuronas [120] y astrocitos [121].

Estudios recientes sugieren que los exosomas forman parte de un importante mecanismo de comunicación celular en todo el organismo [107, 108, 122, 123], particularmente en la señalización paracrina y endocrina [124], e inclusive podrían ser responsables de los efectos a larga distancia de la terapia celular [125].

Existen estudios que evidencian que los exosomas derivados de células de Schwann se internalizan en los axones, sorprendentemente, los exosomas inducen la regeneración axonal *in vitro* y mejoran la regeneración después de la lesión en el nervio ciático *in vivo* [126]. Otro estudio *in vivo* demostró que la administración intravenosa de exosomas derivados de células mesenquimales después del infarto cerebral hemorrágico, mejora significativamente la recuperación funcional, la integridad de los tractos axonales, el crecimiento axonal e incrementa los marcadores de reparación en la sustancia blanca, además favorece la disminución del tamaño de la lesión [127].

2. Planteamiento del problema

En la fisiopatología del infarto cerebral isquémico se ha descrito que existe una fase de recuperación espontánea mediada a través de diferentes mecanismos endógenos que permiten la recuperación neurológica después de la lesión en el SNC [87, 92-96]. Esta recuperación espontánea aunque es limitada, esta mediada por mecanismos de recuperación axonal y vías de señalización molecular, poco estudiadas. [128]. Ante el daño isquémico los astrocitos muestran menor susceptibilidad a morir que las neuronas y reaccionan produciendo moléculas pro y antiinflamatorias [129]. Por ejemplo, los astrocitos de tipo A2 favorecen una respuesta neuroprotectora en la región lesionada[130], al dirigir vías de señalización que intervienen en la regulación de la angiogénesis y favorecen la regulación positiva de factores neurotróficos [131-134].

Se ha descrito que en enfermedades neurológicas, traumatismos nerviosos y eventos cerebrovasculares, la secreción de vesículas extracelulares origina señales dirigidas a disminuir el daño celular [128, 135], estos factores celulares podrían ser sintetizados y liberados por astrocitos [57, 70]. A través de exosomas que son moléculas lipídicas que se convierten en biocontenedores [136] que transportan y transfieren biomoléculas a otras células en el sistema nervioso incluyendo proteínas, lípidos, RNA y miRNAs [137, 138], modificando la función de las células receptoras.

Se ha determinado que la carga exosomal depende del tipo celular del cual son secretados [139], la composición de la carga de proteínas se ha relacionado con la respuesta específica del tipo celular a diferentes estímulos[140], al estado fisiológico o patológico de la célula donadora y a los mecanismos de biogénesis [141].

Con estos antecedentes nos preguntamos si la administración de una suspensión de exosomas derivados de astrocitos facilita la recuperación del tejido dañado en un modelo experimental de isquemia-reperfusión.

3. Objetivo general

Estudiar el efecto inducido por la administración intracerebroventricular (i.c.v.) de vesículas extracelulares (exosomas) derivadas de cultivos celulares primarios de astrocitos corticales de ratas, incubados en condiciones de normoxia o hipoxia en la fase aguda y sub-aguda en un modelo de isquemia-reperfusión inducido por oclusión transitoria de la arteria cerebral media en ratas adultas, en cursos temporales de la evolución de la lesión.

3.1 Objetivos específicos:

1. Aislar las vesículas extracelulares derivadas de cultivos celulares primarios de astrocitos corticales de ratas y obtener la suspensión de exosomas.
2. Evaluar el efecto de la administración i.c.v. de la suspensión de exosomas, a través de estudios de resonancia magnética en el modelo de infarto cerebral isquémico.
3. Evaluar la integridad estructural en las áreas cerebrales afectadas en el infarto cerebral isquémico, tras la administración i.c.v. de la suspensión de exosomas, a través de marcadores de proteínas de citoesqueleto y crecimiento axonal.
4. Generar la reconstrucción 3D de las fibras nerviosas del Cuerpo Callosos (CC) y de las proyecciones aferentes y eferentes del núcleo talámico ventral posteromedial (VPM) y núcleo talámico ventral posterolateral (VPL) a la corteza cerebral, para evaluar integridad estructural de estas áreas anatómicas.
5. Evaluar el efecto de la administración i.c.v. de la suspensión de exosomas en la recuperación motora y funcional, a través de pruebas neurológicas y generar registros repetitivos de los potenciales de acción compuestos (CAPs) en el cuerpo calloso para evaluar la función sináptica en el infarto cerebral isquémico.

4. Métodos

Animales

Para este estudio, se utilizaron ratas macho Wistar de 6 semanas de edad (270-280 g) obtenidas del Bioterio del IFC-UNAM; sometidas a infarto cerebral por MCAOt que se describe más adelante. Los animales se alojaron en cajas individuales con ciclos de luz/oscuridad 12h y se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*. Todos los experimentos se llevaron a cabo bajo la NOM-062-ZOO-1992 con la aprobación del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL-IFC-LTR93-16).

Diseño experimental

Los animales se dividieron en 4 grupos de estudio: animales intactos (n=4), animales sometidos a oclusión transitoria de la arteria cerebral media (tMCAo) con administración i.c.v. de vehículo (NaCl 0.9 % w/v; n=4), animales sometidos a tMCAo con administración i.c.v. de exosomas aislados de cultivos primarios de astrocitos bajo condiciones de normoxia (NxEV; n=4), animales sometidos a MCAOt con administración i.c.v. de exosomas aislados de cultivos primarios de astrocitos bajo condiciones de hipoxia (HxEV; n=4). El tamaño de la muestra se calculó con base en un estudio piloto previo, con un cálculo a priori detectamos un tamaño de efecto de Cohen medio > 0.3, β potencia de 0.8 y significancia de 0.05, con una tasa de mortalidad de 0.4 según los experimentos piloto. Estos parámetros se eligieron para utilizar el mínimo de animales necesarios. Para los estudios de RM y las pruebas neurofuncionales, los animales se distribuyeron al azar en los 4 grupos experimentales (n=4/grupo), realizando las determinaciones en cursos temporales de 1, 7, 14, y 21 días. Consideramos los siguientes criterios de inclusión: la disminución de la reperusión de más del 50% con respecto al valor basal durante los 60 min de oclusión de la arteria cerebral media, la ausencia de hemorragia subaracnoidea o intraparenquimatosa y la supervivencia por 21 días después del infarto. Por consideración ética se realizó punto final experimental a los animales que presentaron hemiplejia y/o debilidad generalizada que les impidiera comer o beber de manera autónoma. Para la evaluación histológica de los marcadores de proteína de citoesqueleto y crecimiento axonal (n=4/grupo) se realizaron determinaciones con replicas en 3 tiempos a los 7, 14 y 21 días después del infarto, independientes a los experimentos

descritos antes (se realizó eutanasia en los tiempos descritos). La evaluación histológica de los tractos axonales (n=2/grupo) se realizó a los 21 días después del infarto. Los estudios de electrofisiología (n=4/grupo) se realizaron a los 21 días después del infarto. En el estudio se utilizaron exclusivamente ratas machos para limitar los posibles efectos neuroprotectores de los estrógenos presentes en ratas hembras.

Modelo de infarto cerebral por MCAOt

Para producir el infarto los animales se anestesiaron con isoflurano a una concentración alveolar mínima (CAM) de 5% para inducir la anestesia, 1.5-2% CAM para mantenimiento y PO₂ de 400 ml, enseguida se les colocó sobre el cráneo una sonda de medición por láser-Doppler para determinar la perfusión sanguínea del parénquima cerebral irrigado por la arteria cerebral media (MCA) en las siguientes coordenadas estereotáxicas: AP: -2.0, L: -3.5 mm a partir de Bregma. Para producir la oclusión de la MCA se introdujo un monofilamento de nylon por la arteria carótida interna hasta el nacimiento de la MCA en el polígono de Willis. La oclusión de esta arteria se evidenció por una caída mayor al 65% de la perfusión sanguínea basal medida por el láser-Doppler.[142] La oclusión se mantuvo por 60 min y después se retira el filamento para permitir la reperfusión del tejido, provocando la lesión de las áreas motora y somatosensorial de la corteza cerebral y de los ganglios basales.

Cultivo primario de astrocitos

El cultivo primario de astrocitos se estableció a partir de cerebros de ratas Wistar de 3 a 4 días de edad. Se aislaron las cortezas cerebrales y se trituraron en fragmentos gruesos, posteriormente los fragmentos de tejido se digirieron con tripsina (1 mg/ml por 10 min a temperatura ambiente). Después de producir la inactivación de la tripsina, el tejido se disgregó mecánicamente para obtener una suspensión de células, la cual se lavó posteriormente 1 vez y se resuspendió en medio DMEM:F12 con 10% de suero bovino fetal. Las células se sembraron en cajas de Petri de plástico y los cultivos se caracterizaron a través de inmunofluorescencia para determinar la pureza utilizando a la proteína ácida fibrilar glial como marcador.

Aislamiento y obtención de la suspensión de exosomas

Los exosomas se obtuvieron a partir del medio condicionado de cultivos primarios de astrocitos bajo dos condiciones experimentales: incubados durante 48 h en condiciones de normoxia o

incubados durante 6 h en condiciones de hipoxia seguidas de 42 h de recuperación en normoxia. Para garantizar la colección de exosomas secretados exclusivamente por los astrocitos se utilizó un medio con suero libre de exosomas para el condicionamiento de los cultivos. El medio condicionado es recuperado y posteriormente se filtró con una membrana con un poro de 220 nm de diámetro para eliminar restos celulares grandes, microvesículas derivadas de membrana plasmática con un diámetro mayor a 220 nm y cuerpos apoptóticos grandes. Posteriormente se realizó una ultracentrifugación a 50,000 x g por 30 min, para eliminar restos celulares pequeños. Finalmente se realizó una última ultracentrifugación a 100,000 x g por 70 min.

Administración de exosomas

En las ratas sometidas a MCAOt se administraron las suspensiones de NxEV o HxEV en un volumen de 4µl que contienen 400 ng de proteína total, determinado por el método de Lowry. La administración se llevó a cabo a través de una inyección estereotáxica i.c.v. en el hemisferio contralateral al infarto (AP: -0.8, ML: -1.5 y DV: -4.0 mm a partir de Bregma) 30 min después del inicio de la reperfusión, utilizando un microcapilar de vidrio graduado con una punta con diámetro de 50 µm.

Resonancia magnética

Estos estudios se realizaron en cursos temporales después de la MCAOt, por tanto, se cuenta con el seguimiento completo de la evolución de la recuperación tisular y funcional en el mismo animal (7, 14 y 21 d), la adquisición de imágenes se realizó en un equipo de 7 Teslas (Varian, Inc.), ubicado en el Laboratorio Nacional de Investigación en Imagenología e Instrumentación Médica en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, en la Ciudad de México. En otro grupo de animales se realizaron los estudios a las 24 h después de la MCAOt para contar con la información inicial de la recuperación tisular y funcional, la adquisición de estas imágenes se realizaron en un resonador de 7 Teslas Bruker Pharmascan 70/16 (Bruker Biospin, Ettlingen, Germany), ubicado en la Unidad de Resonancia Magnética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, ubicada en el Municipio de Juriquilla del Estado de Querétaro. Todos los animales se anestesiaron con isoflurano a una dosis de 5% CAM para inducción y 2% CAM durante la adquisición de las imágenes. Se obtuvieron secuencias Fast Spin-Echo (FSEMS) ponderada a T2, con los siguientes parámetros: TE/TR = 35.47/3714 ms; FOV = 64×64 mm; matriz = 256×256; resolución del voxel = 250 μ m; grosor del corte = 0.5 mm. Secuencias Gradient-Echo 3D sequence (GE3D) ponderada a T1, con los siguientes parámetros: TE/TR = 2.3/4 ms; FOV = 64mm×64mm; matriz = 256×256; resolución del voxel = 250 μ m; grosor del corte = 0.5 mm. Secuencias del tensor de difusión (DTI), Echo Planar Image Spin-Echo con los siguiente parámetros: TE/TR 30.5/2500 ms; FOV = 64mm × 64mm, matriz = 64 × 64, resolución del voxel = 1mm; grosor del corte = 1 mm, direcciones del gradiente = 6, duración del gradiente de difusión (δ) = 5 ms, b-values = 800 s/mm².

Procesamiento de datos de RM

Las imágenes generadas por DTI fueron preprocesadas y segmentadas mediante DSI Studio (Carnegie Mellon University, EUA). Utilizando un modelo de reconstrucción basado en DTI para poder generar un mapa de tensores. A partir del DTI se realizaron las mediciones cuantitativas de parámetros directamente relacionados con el estado fisiopatológico del cerebro; Fracción de Anisotropía (FA) y los diferentes índices de difusión: Difusión media (MD), Difusión Axial (AD), Difusión Radial (RD). Posteriormente, se crearon las regiones de interés: corteza, estriado, cuerpo calloso ipsilateral y contralateral con la finalidad de lograr delimitar las regiones y analizarlas para dar un seguimiento de la evolución de la lesión cerebral y de recuperación axonal

Para las tractografías se determinó el algoritmo de la reconstrucción tridimensional [143] de algunos tractos nerviosos en 6 direcciones, posteriormente se crearon las regiones de interés, cuerpo caloso y la vía cortico-talámica. Se utilizó un umbral de anisotropía de 0.21 y un ángulo de 30°. promediando la direccionalidad con 30% de la direccionalidad anterior para suavizar la trayectoria de las fibras.

Además se utilizó el código de color convencional que indica las direcciones de los tractos reconstruidos en un mapa anisotrópico, donde el rojo indica direcciones en el eje X: derecha a izquierda, por ejemplo, las fibras del cuerpo caloso; verde indica direcciones en el eje Y: rostro-caudal, por ejemplo, las fibras de conexiones interlobares; y azul indica direcciones en el eje Z: en dirección dorso-ventral, como las fibras nerviosas del haz piramidal [144-146].

Evaluación de marcadores de proteínas de citoesqueleto y crecimiento axonal

Al término del estudio los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (100 mg/kg) y perfundidos de manera transcárdial con 200 mL de NaCl 0.9% w/v seguida de 250 mL de paraformaldehído (PFA) 4% w/v. Se extrajeron los cerebros, inmediatamente se fijaron en 4% de PFA por 24 h y se preservaron posteriormente en sacarosa al 30% de donde posteriormente se obtuvieron cortes histológicos de 40 μm con un criostato para producir series consecutivas con una separación de 400 μm . Estas secciones histológicas incluyeron el área del núcleo del infarto y de la penumbra, las secciones se incubados con solución de bloqueo (TBS con Tritón x-100 al 0.5% y albumina de suero bovino al 5%) por 30 min a temperatura ambiente. Luego las secciones fueron incubadas en flotación con anticuerpos primarios: anti-MAP-2 (1:200; Invitrogen PAS-17646) y anti-TUJ-1 (1:200 Merk-Millipore, MAB380), por 48 h a 4°centígrados. Posteriormente se lavaron las secciones en 3 tiempos con solución (TBS con Tritón X-100 al 0.5%), cada una por 10 min en agitación constante. Y finalmente se incubaron con los anticuerpos secundarios: Alexa Fluor 488-contra ratón y Alexa 546 contra conejo (ambos a 1:300; ThermoFisher Scientific, A32723, A11035) en solución (TBS con Tritón X-100 al 0.5%) por 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Las imágenes fueron analizadas en un microscopio confocal Zeiss LSM 800 usando el objetivo de 20x, para la reconstrucción en z, se tomaron en promedio 45 microfotografías cada 0.5 μm , con promedio de 45.

Evaluación histológica de tractos axonales

Para estas determinaciones se realizó la administración de la subunidad B de la toxina del cólera (CT-B; 1% v/v en 2 μ l, Sigma) conjugada con Alexa-fluor 488 mediante inyección i.c.v. en el hemisferio ipsilateral al infarto (AP: -0.5, ML: -3 y DV: -5.0 mm a partir de Bregma) 72 h antes de sacrificar las ratas. Al momento del sacrificio los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico, posteriormente se extrajeron los cerebros y se congelaron con isopentano a -80°C. Dos días después se realizaron cortes histológicos de 40 μ m, utilizando un criostato y posteriormente se analizaron en un microscopio confocal Zeiss LSM 800, usando el objetivo de 20x, para la reconstrucción en z, se tomaron en promedio 45 microfotografías cada 0.5 μ m, con promedio de 45.

Evaluación neurofuncional

Para evaluar el deterioro neurofuncional de los animales sujetos a t-MCAo se les aplicó una batería de evaluaciones neurológicas a las 24 h, 7, 14 y 21 días después de producido el infarto isquémico. Se realizó con un test para cuantificar el grado de deterioro neurológico en una escala de 28 puntos, considerando el 0 como la máxima afectación neurológica y 28 la ausencia de alteraciones, con fundamento en reportes anteriores [147, 148], con ligeras modificaciones. La severidad de la deficiencia neurofuncional se evaluó con los parámetros que incluyen pruebas de función motora y sensorial: movimiento libre dentro de la jaula, comportamiento circular, estímulo doloroso, tracción prensil, cola suspendida, postura, prueba del cilindro, marcha. estímulo en hemicuerpo y estímulo en vibrisas.

Ítem	Actividad	Puntaje
Movimiento libre dentro de la jaula (5 min)	Adinamia: no se mueve, ni explora la caja a pesar del estímulo externo.	0
	Hipodinamia: se mueve y/o explora la caja de evaluación por menos de 10 s. con movimientos escasos	1
	Ligera hipodinamia: Se mueve y/o explora la caja de evaluación al menos 10 s. y no se translada al borde de la caja	2
	Se mueve y/o explora por más de 20 s la caja de evaluación toda la caja	3
Comportamiento circular levógiro	No se mueve incluso con ante el estímulo	0
	Comportamiento circular ante el estímulo	1
	Comportamiento circular espontáneo	2
	No tiene comportamiento circular	3
Estímulo doloroso (aducción del miembro torácico después de presionar ligeramente los dedos)	Movimiento asimétrico, aducción mínima del miembro contralateral a la lesión, permanece en el lugar	0
	Movimiento asimétrico, aducción incompleta con paresia del miembro torácico afectado por la lesión, permanece en el lugar incluso con estímulo.	1
	Movimiento asimétrico, aducción incompleta con paresia del miembro torácico afectado por la lesión, pero se aleja del estímulo doloroso	2
	Movimiento simétrico de los miembros torácicos y se aleja del estímulo doloroso	3
Tracción prensil (evalúa la fuerza y el equilibrio del animal al ser puesto sobre una reja)	Cae sin intentar sostenerse de la reja	0
	Movimiento asimétrico, incapaz de soportar el peso de su cuerpo con el miembro torácico y pélvico del lado afectado.	1
	Movimiento asimétrico, incapaz de soportar el peso de su cuerpo con el miembro anterior afectado, pero si con el posterior del lado afectado.	2
	Movimiento simétrico, es capaz de soportar el peso de su cuerpo con ambos miembros torácicos	3
Cola suspendida	En posición suspendida inmóvil, sin intentar incorporarse	0
	Elevar el cuerpo, pero se arquea	1

	Eleva el cuerpo indistintamente por ambos lados	2
Postura	Miembro torácico y pélvico contralateral a la lesión, con incapaces de sostener el peso del cuerpo, el cuerpo descansa en la mesa sobre el lado afectado por la lesión	0
	Miembro torácico contralateral a la lesión, es incapaz de sostener el peso del cuerpo	1
	Cabeza inclinada hacia al lado contralateral a la lesión	2
	Postura simétrica	3
Prueba del cilindro	No se eleva	0
	Se eleva pero no apoya el miembro torácico contralateral a la lesión	1
	Se eleva y apoya los miembros anteriores en la pared simétricamente.	2
Marcha	No apoya el miembro torácico contralateral a la lesión, durante la marcha	0
	Arrastra el dorso el miembro torácico contralateral a la lesión durante la marcha	1
	Apoya el lado cubital del miembro torácico contralateral a la lesión durante la marcha	2
	Marcha simétrica	3
Estímulo de hemicuerpo contralateral a la lesión	Sin respuesta bilaterales	0
	Sin respuesta en hemicuerpo contralateral a la lesión	1
	Sin respuesta en hemicuerpo torácico contralateral a la lesión	2
	Respuesta simétrica	3
Estímulo de vibrisas	Sin respuesta en vibrisas bilaterales	0
	Sin respuesta en vibrisas contralaterales a la lesión	1
	Moderada respuesta en vibrisas contralaterales a la lesión	2
	Respuesta simétrica	3
TOTAL		28

La puntuación máxima alcanzada es de 28 (sin deficiencia neurofuncional) y la mínima es de 0 (deficiencia neurofuncional severa).

Caracterización electrofisiológica de la función axonal

Para determinar si los exosomas promueven la preservación de la función sináptica en áreas afectadas, determinamos la integridad de las respuestas electrofisiológicas durante la estimulación eléctrica del cuerpo calloso. Para esto, se realizaron registros electrofisiológicos en animales intactos y de 21 d post-MCAOt. Animales intactos n=2, animales sometidos a MCAOt con administración i.c.v. de vehículo (NaCl 0.9 % w/v; n=4), animales sometidos a MCAOt con administración i.c.v. de exosomas aislados de cultivos primarios de astrocitos bajo condiciones de normoxia (EN; n=4), animales sometidos a MCAOt con administración i.c.v. de exosomas aislados de cultivos primarios de astrocitos bajo condiciones de hipoxia (EH; n=4), que fueron anestesiados con isoflurano (5% CAM inducción, 1.5-2% CAM mantenimiento, PO₂ de 400 ml) y se les mantuvo a una temperatura corporal de 35°C con una almohadilla térmica. Las respuestas fueron evocadas a través de la estimulación directa del cuerpo calloso ipsilateral utilizando un electrodo bipolar trenzado de acero de 0.005 pulgadas de diámetro colocado en las coordenadas AP +0.2 mm, ML +1 mm, DV -3.7 mm. [149] La estimulación fue suministrada por un estimulador Grass S48. Las respuestas evocadas fueron registradas por medio de un electrodo monopolar de acero de 0.005 pulgadas de diámetro, colocado en las coordenadas AP + 0.2 mm, ML +1 mm, DV -3.7 mm [149] con una unidad PSIU6, la cual envía la señal a un amplificador Grass P5. Posteriormente, la señal fue digitalizada para su almacenamiento y análisis en una computadora provista del software "Data Wave". Las señales electroencefalográficas fueron monitoreadas en todo momento del registro.

Con la finalidad de evaluar el nivel de excitabilidad basal de la vía de proyección del cuerpo calloso ipsi-contralateral se construyó una curva entrada/salida (I/O) para un rango determinado de valores de estimulación. Esto se logra midiendo la relación entre la entrada de corriente del cuerpo calloso ipsilateral y la salida de voltaje en el cuerpo calloso contralateral (I/O) utilizando múltiplos (x1 a x10) de una intensidad de corriente basal (x mA). La intensidad basal fue determinada como la estimulación (en mA) necesaria para evocar una respuesta de 0.10 mV [150]. Esta curva se construyó para los componentes 1 y 2 de la señal electrofisiológica del cuerpo calloso.

5. Resultados

La suspensión de exosomas aislados a partir del medio condicionado de cultivos primarios de astrocitos bajo condiciones de normoxia (NxEV) o hipoxia (HxEV), se administraron a través de una inyección estereotáxica i.c.v. en el hemisferio contralateral al infarto en las ratas sometidas a MCAO 30 min después del inicio de la reperusión para caracterizar sus efectos en la evolución del Infarto cerebral isquémico. (**Figura 1**).

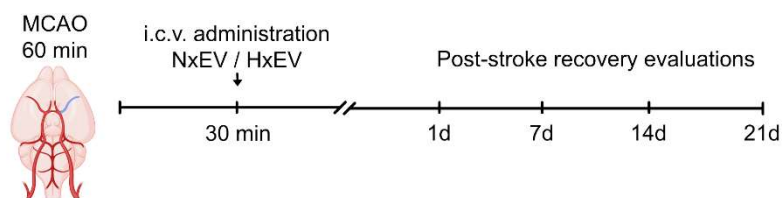


Figura 1. Representación esquemática de los tiempos de la estrategia experimental. En un modelo de infarto/reperusión por oclusión transitoria de la arteria cerebral media (MCAO) en ratas Wistar, se administran en el hemisferio contralateral al infarto por inyección estereotáxica intracerebroventricular (i.c.v.) 30 min después del inicio de la reperusión las suspensiones de exosomas a partir del medio condicionado de cultivos primarios de astrocitos bajo condiciones de normoxia (NxEV) o hipoxia (HxEV) para caracterizar sus efectos en la evolución del Infarto.

5.1 Favorece la recuperación espontánea la administración de exosomas después del infarto

Al evaluar la lesión producida por la MCAO, a través de RM por secuencias FSEMS ponderada a T2, mostró principalmente alteraciones en la región del estriado que corresponde al foco del infarto y la porción de la corteza motora primaria y somatosensorial que corresponde a la penumbra, en las primeras 24 h (**Figura 2A**), realizando el seguimiento completo de la evolución de la recuperación del infarto cerebral en el mismo individuo en cursos temporales (7, 14 y 21 d) la lesión se mantuvo en la zona del estriado y corteza somatosensorial, mientras que en la corteza motora primaria disminuyó considerablemente (**Figura 2B**).

A las 24 h fue evidente la reducción significativa del volumen de infarto en los animales que recibieron la administración i.c.v. de exosomas derivados de astrocitos sometidos a condiciones de normoxia (NxEV) en comparación con el grupo control ($p= 0.0045$ para NxEV y $p=0.0048$ para

HxEV, ANOVA 2 vías con Tukey, **Figura2C**). En este tiempo de estudio no hubo diferencia entre NxEV y HxEV ($p=0.9996$), pero la diferencia se hizo evidente en el transcurso del tiempo.

Para el día 7 de seguimiento de la evolución de recuperación del infarto, observamos que la administración de exosomas en comparación con el grupo control ($p= 0.0001$ para EN y $p=0.0001$ para EH, ANOVA 2 vías con Tukey, **Figura2C**), continuó favoreciendo la reducción del volumen de infarto con diferencia significativa entre NxEV y HxEV ($p<0.0008$ ANOVA 2 vías con Tukey, **Figura 2C**). Para el día 14 de recuperación del infarto, observamos que la administración de exosomas en comparación con el grupo control ($p= 0.0002$ para NxEV y $p=0.0001$ para HxEV, ANOVA 2 vías con Tukey, **Figura2C**) disminuyó el volumen de infarto con una diferencia significativa entre NxEV y HxEV ($p=0.0002$, ANOVA 2 vías con Tukey, **Figura 2C**).

Específicamente en el día 21 después del infarto, los valores de p fueron de $= 0.0021$ para NxEV y <0.0001 para NxEV comparado con el grupo control, y 0.0001 entre NxEV y HxEV (**Figura 2C**), demostrando que la administración de exosomas después de la fase de reperfusión contribuyó gradualmente a la reducción del volumen de infarto.

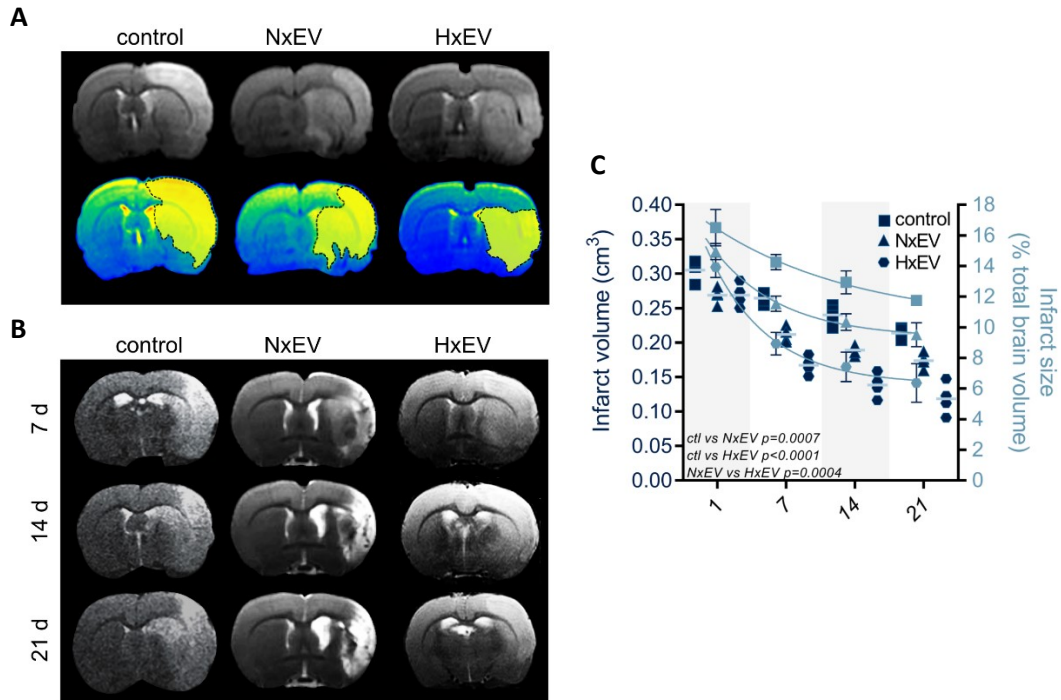


Figura 2. La administración intracerebroventricular de exosomas derivados de astrocitos reduce el volumen de infarto en ratas después de MCAO. A. Determinación del volumen infarto por resonancia magnética (RM) 24 h después del MCAO en ratas tratadas con vehículo, exosomas derivados de astrocitos sometidos a condiciones de normoxia (NxEV) e hipoxia (HxEV). Las imágenes de la izquierda muestran cortes coronales de secuencias FSEMS ponderada a T2, del lado derecho se muestra una representación esquemática del área de infarto en amarillo. B. Muestra el curso temporal de imágenes de RM en los diferentes grupos a las 7, 14 y 21 días postisquemia. Las imágenes de RM muestran el estriado, corteza motora primaria y somatosensorial afectadas y la reducción de las áreas afectadas en el transcurso del tiempo. C. Cuantificación del volumen de infarto determinado a partir del volumen total del cerebro, cuantificación del volumen en color azul oscuro y el volumen del cerebro afectado expresado en porcentaje después del infarto cerebral en azul claro. Los datos muestran una media \pm S.E.M. con una n=4 animales por grupo. ANOVA de dos vías seguido de Tukey post hoc.

5.3 La administración de exosomas facilita la recuperación estructural del tejido afectado después del infarto

Realizamos el análisis de las imágenes obtenidas de las secuencias en difusión de RM, para evaluar el efecto de la administración de exosomas en la evolución de la recuperación del tejido cerebral después del infarto. Medimos la difusión media, que es una determinación cuantitativa que nos proporciona una medida general de integridad de la estructura tisular, ya que refleja la densidad celular y de la membrana, el cual se incrementa significativamente en el edema y la necrosis derivados de la lesión producida por el infarto cerebral.

Los valores basales de la difusión media oscilan alrededor de $6 \times 10^{-4} \text{mm}^2/\text{ms}$ en el cuerpo calloso, $3 \times 10^{-4} \text{mm}^2/\text{ms}$ en el estriado y $4 \times 10^{-4} \text{mm}^2/\text{ms}$ en la corteza. Los valores prácticamente se duplicaron en todas las estructuras analizadas en ratas que se sometieron a la MCAOt a las 24 h después del infarto, independientemente del tratamiento.

Para el análisis de MD en el lado ipsilateral del cuerpo calloso a las primeras 24 h los animales tratados con HxEV mostraron una MD mejor preservada ($p < 0.0001$, ANOVA 1 vía, media = $9.58 \times 10^{-4} \text{mm}^2/\text{ms}$, D.E.= 0.46) comparado con el grupo control (media = $10.9 \times 10^{-4} \text{mm}^2/\text{ms}$, D.E.= 0.14), pero sin diferencia con el grupo tratado con ExEV (media = $10.20 \times 10^{-4} \text{mm}^2/\text{ms}$, D.E.=0.23), el cual no mostró diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control (**Figura 3A**).

En el día 7 de estudio este valor disminuyó considerablemente en los animales que recibieron los exosomas. Fue evidente que los animales tratados con HxEV presentaron una MD (media = $7.03 \times 10^{-4} \text{mm}^2/\text{ms}$, D.E.= 0.88), más cercana a los valores promedio al día 21; incluso el grupo tratado con EH ($p < 0.01$ ANOVA 2 vías con Tukey) tuvo diferencia significativa con el grupo NxEV (media = $7.98 \times 10^{-4} \text{mm}^2/\text{ms}$, D.E.= 0.51), los cuales mostraron una mejoría con respecto a los animales del grupo vehículo ($p < 0.0001$ ANOVA 2 vías con Tukey, media = $10.28 \times 10^{-4} \text{mm}^2/\text{ms}$, D.E.= 0.80).

Para el día 21 de estudio, el grupo tratado con HxEV (media = $6.55 \times 10^{-4} \text{mm}^2/\text{ms}$, D.E.=0.65) continuó siendo el grupo que mejor preservó la MD ($p < 0.0001$, ANOVA 2 vías con Tukey, media = $5.90 \times 10^{-4} \text{mm}^2/\text{ms}$, D.E.=0.26) comparado con el grupo control (media = $9.58 \times 10^{-4} \text{mm}^2/\text{ms}$, D.E.=0.69) (**Figura 3A**).

Estas alteraciones también se reflejan, aunque en menor medida, en el hemisferio contralateral 24 h después del infarto cerebral isquémico; los datos muestran un incremento en el valor de MD

en todos los animales sin importar el tratamiento con respecto del valor basal en los animales intactos ($p=0.0078$, ANOVA 2 vías con Tukey, media = $8.575 \times 10^{-4} \text{mm}^2/\text{ms}$, D.E.= 0.27 para control, $p=0.0336$ para NxEV, ANOVA 2 vías con Tukey, media = $8.075 \times 10^{-4} \text{mm}^2/\text{ms}$, D.E.= 0.36 y $p=0.0078$, para HxEV, ANOVA 2 vías con Tukey, media = $7.725 \times 10^{-4} \text{mm}^2/\text{ms}$, D.E.= 0.26 **Figura 4A**). Sin embargo al continuar con el análisis del estudio longitudinal la normalización de la MD después de su incremento en las primeras horas del infarto, es favorecido por la administración de exosomas. Interesantemente, los animales que recibieron HxEV presentan valores de MD similares al de los animales intactos después de 21 d del infarto (**Figura 4A**).

Como señalamos anteriormente, los procesos de recuperación espontánea están fuertemente vinculados a la recuperación del daño axonal. Con este análisis encontramos que los exosomas administrados a los 30 min del inicio de la reperfusión sanguínea mejoran de manera importante la recuperación de los tractos axonales del cerebro.

Al analizar los valores de la difusión axial (AD) a las 24 h posteriores al infarto, encontramos que todos los animales presentaban una reducción significativa de este parámetro ($p=0.0024$, ANOVA 2 vías con Tukey, media = $6.175 \times 10^{-4} \text{mm}^2/\text{ms}$, D.E.= 0.43 para control, $p<0.0001$ para NxEV, ANOVA 2 vías con Tukey, media = $6.825 \times 10^{-4} \text{mm}^2/\text{ms}$, D.E.= 0.11 y $p=0.0004$ para HxEV, ANOVA 2 vías con Tukey, media = $7.125 \times 10^{-4} \text{mm}^2/\text{ms}$, D.E.= 0.20 **Figura 4B**). El análisis de los valores de este parámetro indican una recuperación dependiente del tiempo en todos los grupos, sin embargo la recuperación se favoreció en los animales pertenecientes al grupo HxEV, seguidos por el grupo NxEV. Para el día 21 después del infarto, los valores de la difusión axial de todos los grupos en el estriado y la corteza se acercaron a los valores basales. La tendencia general de la recuperación del grupo HxEV fue significativamente diferente a la del grupo control, mostrando una diferencia significativa en el estriado y la corteza ($p=0.4259$ en el estriado y $p<0.0001$ en la corteza **Figura 4B**).

La difusión radial es otro parámetro de DTI que evalúa la integridad axonal, en la desmielinización y la disminución de la densidad axonal su valor se incrementa. Observamos que en todos los grupos independientemente del tratamiento este valor se duplicó en el cuerpo caloso, prácticamente se cuadruplicó en el estriado y se triplicó en la corteza 24 h después del infarto **Figura 4C**. Este parámetro también mostró una recuperación dependiente del tiempo en todos los grupos, de manera importante la recuperación se favoreció en los animales pertenecientes al grupo HxEV, seguidos por el grupo NxEV. Para el día 21 después del infarto, las difusiones radiales del grupo HxEV ($p=0.8923$, ANOVA 2 vías con Tukey, media = $2.87 \times 10^{-4} \text{mm}^2/\text{ms}$, D.E.= 0.24 **Figura**

4C) en el estriado alcanzaron prácticamente los valores basales. La tendencia general de la recuperación del grupo HxEV fue significativamente diferente a la del grupo control, ya que mostró una diferencia significativa en el estriado y la corteza ($p=0.0001$ en el estriado y $p=0.0001$ en la corteza).

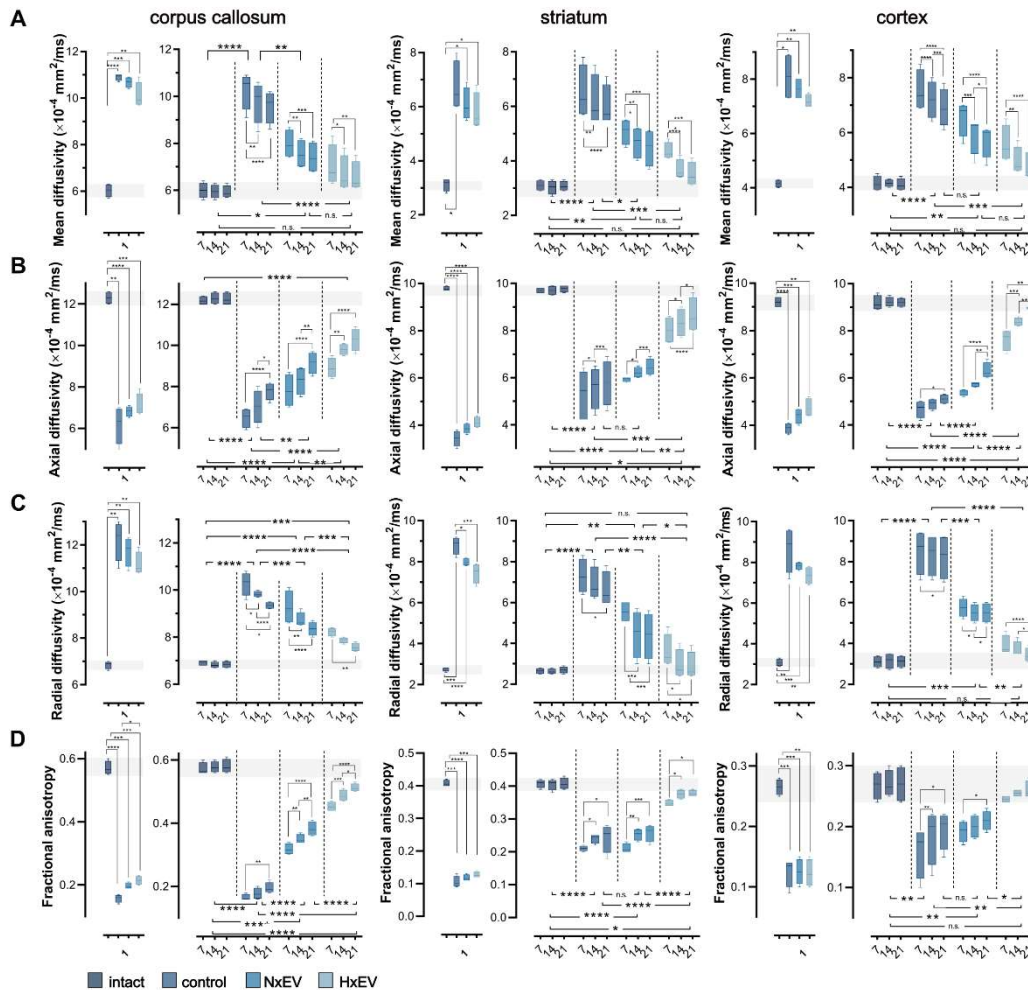


Figura 3. La administración de exosomas derivados de astrocitos preserva la integridad estructural. **A.** Difusión media, **B** difusión axial, **C** difusión radial, **D** fracción de anisotropía que fueron determinados a partir de imágenes del tensor de difusión (DTI) en cuerpo calloso ipsilateral (columna izquierda), estriado (columna central) y corteza motora (columna derecha) a los 1, 7, 14 y 21 días después del infarto cerebral isquémico. La gráfica del día 1 muestra las alteraciones de los 4 parámetros a partir del DTI, causadas por el infarto; no existen diferencias estadísticas entre los animales sometidos al MCAOt tratados con vehículo (control) y los que recibieron EV 30 min después del comienzo de la reperusión).

El último parámetro que evaluamos a partir del DTI fue la Fracción de anisotropía (FA), que esta relacionada con la forma en que las moléculas de agua se mueven libremente dentro a lo largo de los y refleja su integridad estructural. Una reducción en los valores de FA indica daño axonal. En el cuerpo calloso caracterizado por su formación estructural de fibras nerviosas, los valores basales de FA en esta estructura son más elevados que en el estriado y la corteza. A las 24 h después del infarto cerebral, en todos los grupos experimentales observamos que el valor basal de la FA en el cuerpo calloso ipsilateral disminuyó drásticamente a un tercio de su valor basal (alrededor de 0.60), los animales tratados con NxEV mostraron una FA ($p=0.029$, ANOVA 1 vía, media = 0.1975, D.E.= 0.01), mientras que HxEV ($p=0.029$, ANOVA 1 vía, media = 0.215, D.E.= 0.01), mejor preservada comparado con el grupo control (media = 0.14, D.E.=0.03) **Figura 3D**.

Al continuar con el análisis del estudio longitudinal a los 7 días, los valores de la FA se recuperaron de manera importante, fue evidente que los animales tratados con los exosomas ($p<0.0001$, ANOVA con Tukey, media = 0.45, D.E.= 0.02 para HxEV y para NxEV $p<0.0001$, media = 0.32, D.E.= 0.02) presentaron un incremento mayor del índice de anisotropía con respecto al grupo control (media = 0.165, D.E.= 0.03); incluso hubo una mejora significativa en la recuperación de la FA en el grupo HxEV comparado con el grupo NxEV. ($p<0.0001$, ANOVA con Tukey) **Figura 3D**. Mientras que la FA en el grupo control se recuperó ligeramente (media = 0.195, D.E.M.= 0.05) a los 21 días después del infarto, se produjo una recuperación muy evidente con la administración de NxEV ($p<0.0001$, ANOVA con Tukey, media = 0.39, D.E.= 0.03) y HxEV ($p<0.0001$, ANOVA con Tukey, media = 0.51, D.E.= 0.02) con respecto al grupo control. Este último en particular, mostró un efecto importante sobre el incremento del valor de la FA y una clara tendencia hacia la recuperación dependiente del tiempo, incluso se mantuvo la diferencia entre ambos grupos tratados con exosomas ($p<0.0001$, ANOVA con Tukey) **Figura 3D**.

La estructura anatómica más gravemente afectada a las 24 h después del infarto, fue el estriado, evidenciando una drástica disminución de la FA en todos los grupos experimentales, observamos que el valor de la FA disminuyó un 27% promedio de su valor basal (alrededor de 0.40). No hubo diferencia significativas entre los grupos experimentales ($p=0.0782$, ANOVA 1 vía, media = 0.12, D.E.= 0.006 para HxEV y para NxEV $p=0.6690$, ANOVA 1 vía, media = 0.11, D.E.= 0.01), comparado con el grupo control (media = 0.10, D.E.=0.03) **Figura 3D**.

Para el día 7 y 14 de estudio este valor se recuperó de manera importante en el grupo tratado con HxEV ($p<0.0001$ ANOVA 2 vías con Tukey, media = 0.34, D.E.= 0.01 para el día 7 y para el día 14

$p < 0.0001$, ANOVA 2 vías con Tukey, media = 0.37, D.E.= 0.01), mientras que en el grupo tratado con NxEV ($p > 0.9999$ ANOVA 2 vías con Tukey, media = 0.21, D.E.= 0.01 para el día 7 y para el día 14 $p = 0.6102$, ANOVA 2 vías con Tukey, media = 0.25, D.E.= 0.01), con respecto al grupo control.

Figura 3D.

En el día 21 la tendencia se mantuvo, el grupo tratado con HxEV ($p < 0.0001$, ANOVA 2 vías con Tukey, media = 0.37, D.E.= 0.01) tuvo diferencia significativa con el grupo NxEV (media = 0.25, D.E.= 0.01), los cuales tampoco mostraron una mejoría con respecto a los animales del grupo control (media = 0.24, D.E.= 0.01) **Figura 3D.**

Finalmente los estudios en la corteza cerebral, que es una estructura más heterogénea que la del cuerpo calloso y el estriado, los análisis de la FA a las 24 h mostraron que fue la estructura anatómica menos afectada después del infarto cerebral, ya que no hubo diferencia significativas entre los grupos experimentales ($p = 0.9999$, ANOVA 1 vía, media = 0.122, D.E.= 0.01 para HxEV y para NxEV $p = 0.9999$, ANOVA 1 vía, media = 0.125, D.E.= 0.005 **Figura 3D**), comparado con el grupo control (media = 0.125, D.E.=0.007) **Figura 3D.**

Para el día 7 y 14 de estudio este valor se incrementó en el grupo tratado con HxEV ($p < 0.0001$ ANOVA 2 vías con Tukey, media = 0.24, D.E.= 0.007 para el día 7 y para el día 14 $p < 0.0001$, ANOVA 2 vías con Tukey, media = 0.25, D.E.= 0.01), mientras que en el grupo tratado con NxEV ($p = 0.0013$ ANOVA 2 vías con Tukey, media = 0.19, D.E.= 0.007 para el día 7 y para el día 14 $p = 0.1931$, ANOVA 2 vías con Tukey, media = 0.20, D.E.= 0.007), con respecto al grupo control **Figura 3D.**

De manera relevante para el día 21 de estudio, el grupo tratado con HxEV ($p < 0.0001$, ANOVA 2 vías con Tukey, media = 0.26, D.E.= 0.007) tuvo diferencia significativa con el grupo control (media = 0.24, D.E.= 0.007) y con el grupo NxEV (media = 0.21, D.E.= 0.007), estos últimos no mostraron una mejoría con respecto a los animales del grupo control ($p = 0.1931$, ANOVA 2 vías con Tukey, media = 0.19, D.E.= 0.007 **Figura 3D**).

El infarto cerebral afecta a todas las estructuras anatómicas del cerebro y el daño parece no estar restringido exclusivamente al área particular donde ocurre la oclusión del flujo sanguíneo. Nuestro estudio de RM muestra que el hemisferio contralateral a la lesión, tuvo cambios en los valores de los parámetros con los que podemos determinar la severidad de la lesión, con el tiempo estos parámetros se normalizaron y la administración de los exosomas mejoró la recuperación. La corteza contralateral y el estriado mostraron cambios más sutiles en la MD que se normalizaron (valor basal alrededor de $5.6 \times 10^{-4} \text{mm}^2/\text{ms}$), en 14 días en el grupo HxEV (media = $0.6.02 \times 10^{-4} \text{mm}^2/\text{ms}$, D.E.= 0.10) y a los 21 d para el grupo NxEV (media = $6.05 \times 10^{-4} \text{mm}^2/\text{ms}$, D.E.=

0.10) **Figura 4D.** De manera similar, la difusión axial del cuerpo calloso y la corteza contralateral se recuperaron casi por completo al día 21 de la administración de los exosomas.

Finalmente, la FA de las estructuras anatómicas contralaterales mostraron un patrón de recuperación similar al del hemisferio ipsilateral con la administración de los exosomas, en el estriado (media = 0.24, D.E.= 0.01) y la corteza (para NxEV, media = 0.34, D.E.= 0.01 y para HxEV, media = 0.39, D.E.= 0.01), mostraron una recuperación completa con la administración de HxEV

Figura 4D.

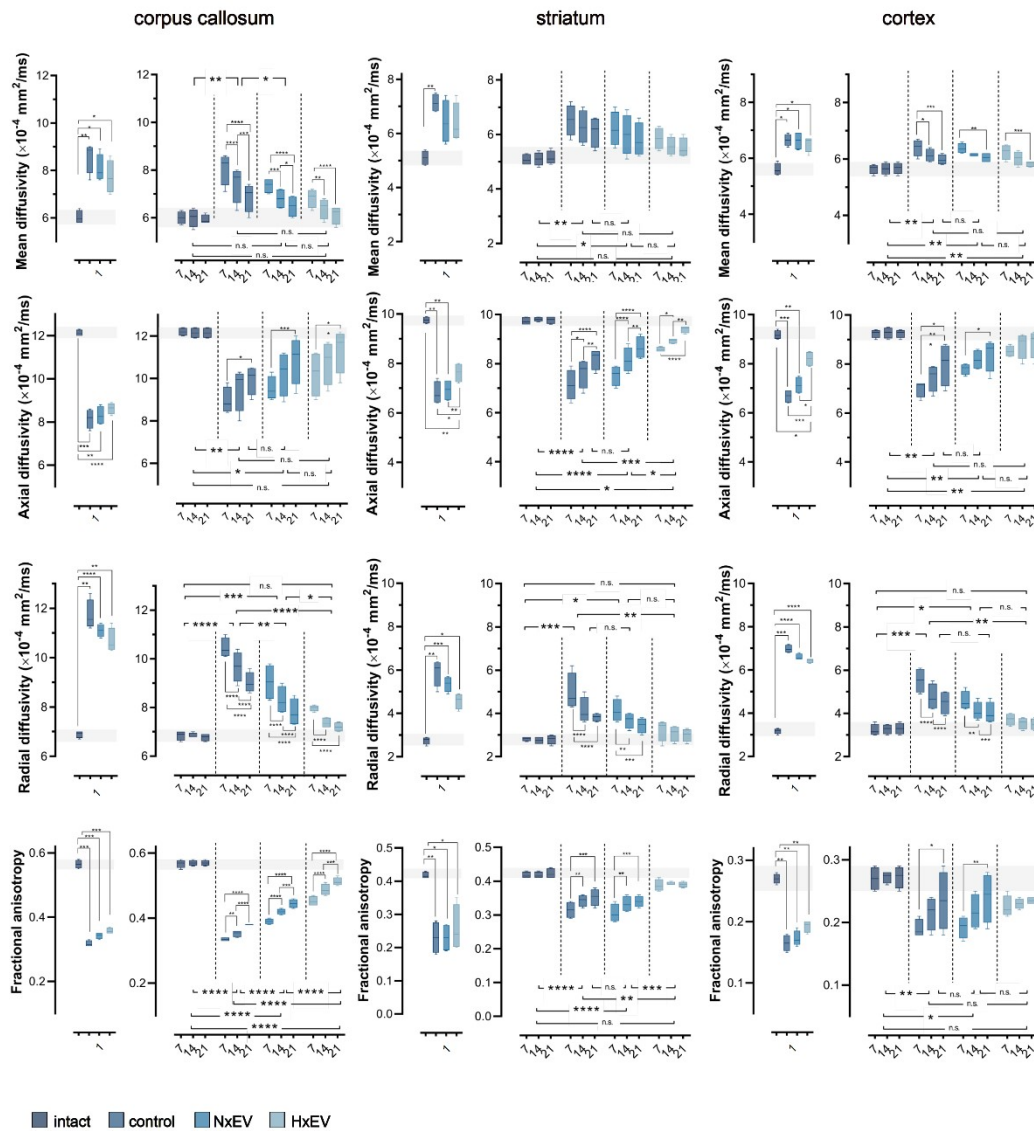


Figura 4. Cambios en los valores registrados a partir del DTI en el hemisferio contralateral. A. Difusión media, **B** difusión axial, **C** difusión radial, **D** fracción de anisotropía que fueron determinados a partir de imágenes del tensor de difusión (DTI) en cuerpo calloso ipsilateral (columna izquierda), estriado (columna central) y corteza motora (columna derecha) a los 1, 7, 14 y 21 días después del infarto cerebral isquémico. La gráfica del día 1 muestra las alteraciones de los 4 parámetros a partir del DTI, causadas por el infarto; no existen diferencias estadísticas entre los animales sometidos al MCAOt tratados con vehículo (control) y los que recibieron EV 30 min después del comienzo de la reperfusión. Las gráficas muestran los valores mínimos y máximos dentro de cada grupo, el rango de dispersión de Q1 a Q3 y la media, n=4. El sombreado de la barra horizontal en cada gráfica indica el lapso de ± 1 D.E. con respecto a los valores de referencia del grupo intacto. Las diferencias estadísticamente significativas en la tendencia de recuperación se indica entre los grupos con medidas ANOVA de dos vías seguido de Tukey post hoc de y también se indican los cambios a lo largo del tiempo dentro de cada grupo. ANOVA de dos vías

seguido de Tukey post hoc. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$.

A partir de las imágenes generadas por DTI que nos proporciona un campo vectorial tridimensional, en el cual cada vector representa la orientación de las fibras, generamos la representación gráfica para poder visualizar la recuperación de los tractos favorecida por la administración de los exosomas (**Figura 5**, muestra las regiones de interés donde se colocaron las semillas para generar las tractografías). También se generaron imágenes a partir del DTI de algunas regiones afectadas por el infarto cerebral, los tractos del cuerpo calloso se muestran en la **Figura 6e** y se muestra una porción del tracto corticoestriatal en la **Figura 6f**.

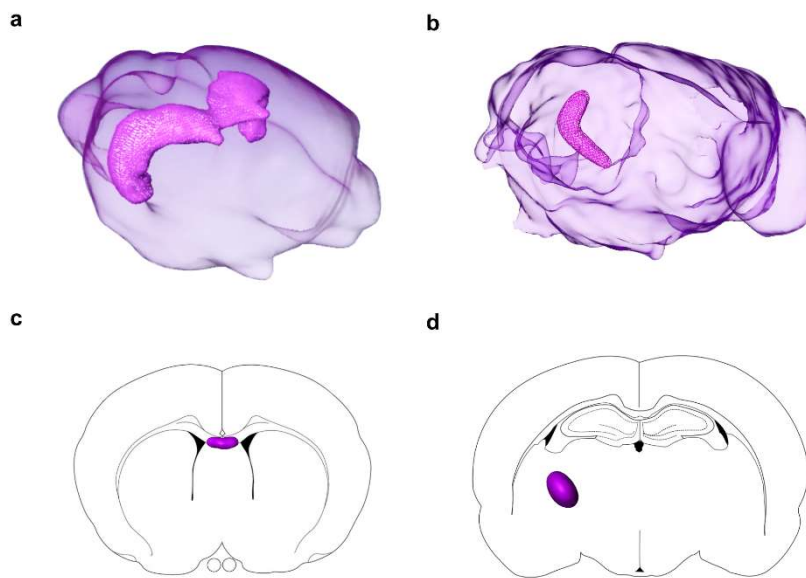


Figura 5. Representación 3D de la segmentación de los tractos neurales basada en imágenes de Tensor de Difusión del cuerpo calloso (a), tracto corticoestriatal (b) del cerebro de rata. Regiones de interés donde se colocaron las semillas para generar las tractografías, cuerpo calloso (AP 0.2 de Bregma) (c) y vía corticoestriatal (AP -2.8 de Bregma) (d).

5.4 La preservación de las fibras nerviosas de las proyecciones aferentes y eferentes del núcleo talámico ventral posterolateral (VPM) a la corteza es promovida por la administración de exosomas derivados de astrocitos.

Generamos las tractografías in vivo a partir del DTI para llevar a cabo la reconstrucción completa 3D de los tractos del cuerpo caloso y de la vía corticotalámica (**Figura 6**) para compararlo con los cerebros de los grupos sometidos al infarto isquémico.

Posteriormente se realizaron tractografías de las fibras nerviosas del cuerpo caloso a los 21 d después del infarto isquémico, la visualización mostró que el número de fibras que se pudieron reconstruir en el grupo control fue significativamente limitado y los tractos se visualizan altamente desorganizados. En las reconstrucciones del grupo NxEV y HxEV, la longitud de los tractos es más grande con respecto al grupo control y el número de fibras reconstruidas también incrementa significativamente. (**Figura 6A**).

Por otra parte se sabe que la interacción recíproca entre el tálamo y la corteza cerebral mediada por las proyecciones talamocorticales regulan las capacidades sensitivo-motoras y cognitivas en los mamíferos, así como su ajuste dinámico en los diversos estados conductuales [151], por lo anterior se realizaron tractografías de las fibras nerviosas de las proyecciones aferentes y eferentes del núcleo talámico ventral posterolateral (VPM) a la corteza (**Figura 6B**). Derivado de lo anterior, observamos en la tractografía del grupo tratado con vehículo (control) a los 21 d después del infarto isquémico, la pérdida de la trayectoria de las fibras nerviosas en gran parte los núcleos VPM que van hacia la corteza fronto-parietal y somatosensorial, aunado a gran desorganización en las proyecciones (**Figura 6B**). En la tractografía del grupo tratado con NxEV la mayor pérdida y desorganización está presente en los tractos neurales de los núcleos VPM que van hacia la corteza parietal y temporal (**Figura 6B**), pero es menor que en la tractografía del grupo control, en el grupo tratado con HxEN también hay pérdida y ligera desorganización en las proyecciones de los núcleos VPM hacia la corteza parietal y temporal (**Figura 6B**) pero es menor comparada con tractografía del grupo tratado con NxEV.

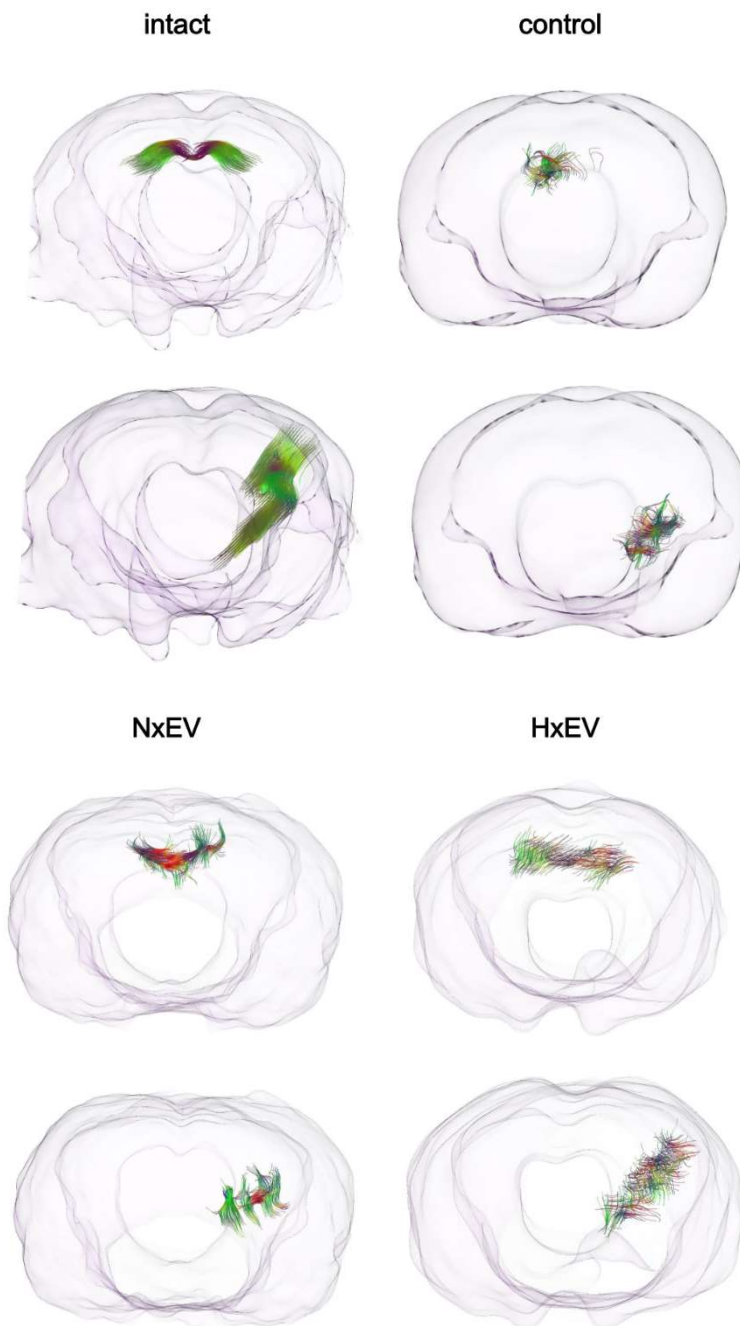


Figura 6. Tractografías basada en imágenes de Tensor de Difusión DTI in vivo. Reconstrucción de los tractos neurales del Cuerpo calloso y de la vía corticoestriatal del hemisferio ipsilateral, incluyendo la trayectoria de los núcleos VPM y VPL que van hacia la corteza fronto-parietal y somatosensorial. Cada imagen corresponde a la representación de una rata de cada grupo experimental al día 21 después del infarto. Los colores de los tractos indican la orientación de las fibras: fibras transversales (rojo), fibras rostro-caudales (verde) y fibras dorso-ventrales (azul).

5.5 Correlaciones estructurales de fibras nerviosas con resonancia magnética.

Evaluamos la integridad de las fibras nerviosas del cerebro utilizando marcadores de inmunofluorescencia, Proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP-2) y tubulina III (TUJ-1), en todos los grupos experimentales a los 7, 14 y 21 d después del MCAOt.

Al analizar el tejido en el periodo de recuperación del infarto cerebral del tejido estriado, área adyacente al foco isquémico y el tejido que compromete una parte importante de la corteza cerebral ipsilateral, la mayor pérdida de los procesos dendríticos se encontró al día 7 después del infarto, con una disminución pronunciada de las células con inmunofluorescencia + de MAP-2 y TUJ-1, en los grupos controles en contraste con los grupos tratados con exosomas mostraron un incremento en las células reactivas, menor fragmentación de axones, dendritas y una mayor cantidad de microtúbulos (**Figura 7**).

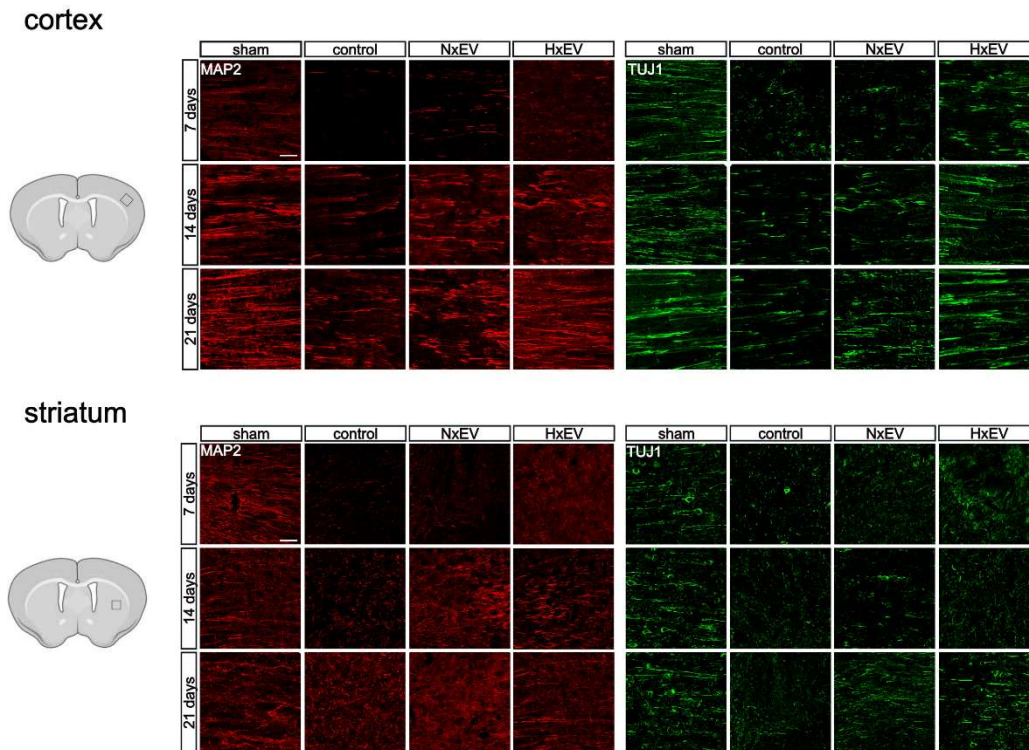


Figura 7. La administración de exosomas derivados de astrocitos promueve la recuperación de la integridad del tejido afectado después del infarto isquémico.

Microfotografías representativas de secciones de 40 μm de espesor con inmunotinción de MAP-2 en rojo (Alexa Fluor 647) y TUJ-1 en verde (Alexa Fluor 488), de cada grupo experimental. Las imágenes muestran la evolución de la recuperación del tejido en la corteza motora ipsilateral afectada y el estriado dorsal a los 7, 14 y 21 días después del infarto isquémico. Las

microfotografías son proyecciones confocales en Z de 10-15 cortes ópticos. Barras de escala: 50 μm .

En los siguientes puntos de tiempo de evaluación después del infarto, fue evidente un aumento dinámico temporal en la marca de microtúbulos MAP-2 + y de TUJ-1 + en todos los grupos se produjo una recuperación gradual, aunque limitada en el grupo control los cuales presentaron mayor fragmentación de microtúbulos y mayor pérdida de inmunofluorescencia de MAP-2 y TUJ-1 en el cuerpo estriado (**Figura 7**).

A los 21 d la recuperación del tejido fue evidente para todos los grupos, ya que todos mostraron un aumento de la inmunofluorescencia de MAP-2 en la zona límite exterior de la corteza cerebral ipsilateral, sin embargo el grupo control mostró fibras estructuralmente alteradas en cuanto a su morfología y es importante destacar que el grupo HxEV se caracterizó por una marca uniforme sobre todo en la corteza cerebral con anti-MAP-2 y anti-TUJ-1 en los procesos dendríticos de dicha zona, sin embargo los EV no favorecieron a proporcionar forma en cuanto a la organización de las fibras, como lo podemos visualizar en la direccionalidad de los tractos (**Figura 7**).

En general la recuperación de los procesos neurales + a MAP2 y TUJ 1 se correlaciona positivamente con los parámetros de RM descritos anteriormente, con los análisis histológicos y las determinaciones obtenidas de las mediciones del DTI.

Los datos anteriores indican una remodelación activa del cerebro después del infarto isquémico, caracterizada por una mayor proliferación de microtúbulos principalmente en la corteza cerebral que sufre muerte celular secundaria en comparación con las áreas estriatales proximales a la región del foco isquémico ipsilateral; también confirman los hallazgos por RM que encontramos, los cuales sugieren mayor integridad estructural de los axones y mejor organización en el grupo HxEV, con respecto al grupo NxEV con respecto al control (**Figura 7**).

Aunque la administración de los exosomas facilitó la recuperación de la arquitectura neuronal del cerebro, intentamos descubrir si el tratamiento con los exosomas también permitía el crecimiento de axones desde el núcleo de la lesión en el estriado hacia las áreas corticales. Al día 14 después del infarto, inyectamos la subunidad B de la toxina del cólera, que es transportada de manera retrógrada por los axones y le dimos seguimiento al transporte axonal a través de la localización de la tinción fluorescente en las regiones corticales al día 21 después del infarto (**Figura 8**).

Evidentemente encontramos que el infarto causó, una pérdida drástica de proyecciones estriatales hacia la corteza somatosensorial y motora. La administración de los exosomas no

recuperó ligeramente las inervaciones perdidas y promovió la reorganización de las proyecciones hacia el área cortical. Los patrones de reorganización de los grupos tratados con los exosomas fueron notablemente similares entre NxEV y HxEV. Observamos en nuestros experimentos que la corteza motora se preservó, posiblemente por el tamaño pequeño del infarto.

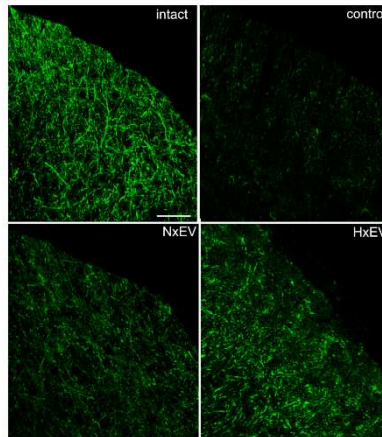


Figura 8. La administración de exosomas derivados de astrocitos promueve la recuperación del transporte axonal después del infarto isquémico.

Microfotografías confocales representativas de secciones de 40 μm de espesor con inmunotinción (Alexa Fluor 488), de cada grupo experimental. La administración de la subunidad B de la tóxina del cólera, que se transporta retrógradamente a través del sistema axonal, se realizaron al día 14 después del infarto, para darle seguimiento a través de la localización de la tinción fluorescente en las regiones corticales al día 21 después del infarto. Barras de escala: 50 μm .

5.6 Recuperación de la funcionalidad axonal en el cuerpo calloso después del infarto isquémico.

El CAP se ha caracterizado por tener una forma de onda bifásica con un componente temprano generado predominantemente por axones mielinizados de conducción rápida (N1) y un componente posterior que refleja axones no mielinizados más lentos (N2)[152, 153] (**Figura 9A**). Los CAPs in vivo evocados en el cuerpo calloso de los animales pertenecientes a todos grupos de estudio, mostraron una forma de onda bifásica consistente con investigaciones previas [154, 155] (**Figura 9B**), con un pico N1 en una latencia media de 4.82 ± 0.31 ms, y el pico de N2 a 16.19 ± 0.49 ms. El análisis de regresión no lineal de la relación de I/O mostro diferencias significativas entre los grupos para los picos de P1 y P2 ($p < 0.001$). Para ambos componentes, los animales pertenecientes al grupo intacto mostraron las amplitudes más grandes, mientras que los animales

pertenecientes al grupo tratado con vehículo mostraron las amplitudes más bajas con diferencias significativas ($p < 0.001$). La administración de exosomas mostraron amplitudes del CAP mayores a los animales del grupo control y menores a los animales del grupo intacto. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos NxEV y HxEV, para ambos picos. La amplitud del pico N2 no mostró diferencias significativas entre los animales pertenecientes al grupo control y los animales del grupo HxEV (**Figura 9C**).

Los datos de los CAPs sugieren que la administración i.c.v. de los exosomas a los 30 min después del infarto isquémico, preservan de manera importante la integridad y funcionalidad de los axones mielinizados y no mielinizados.

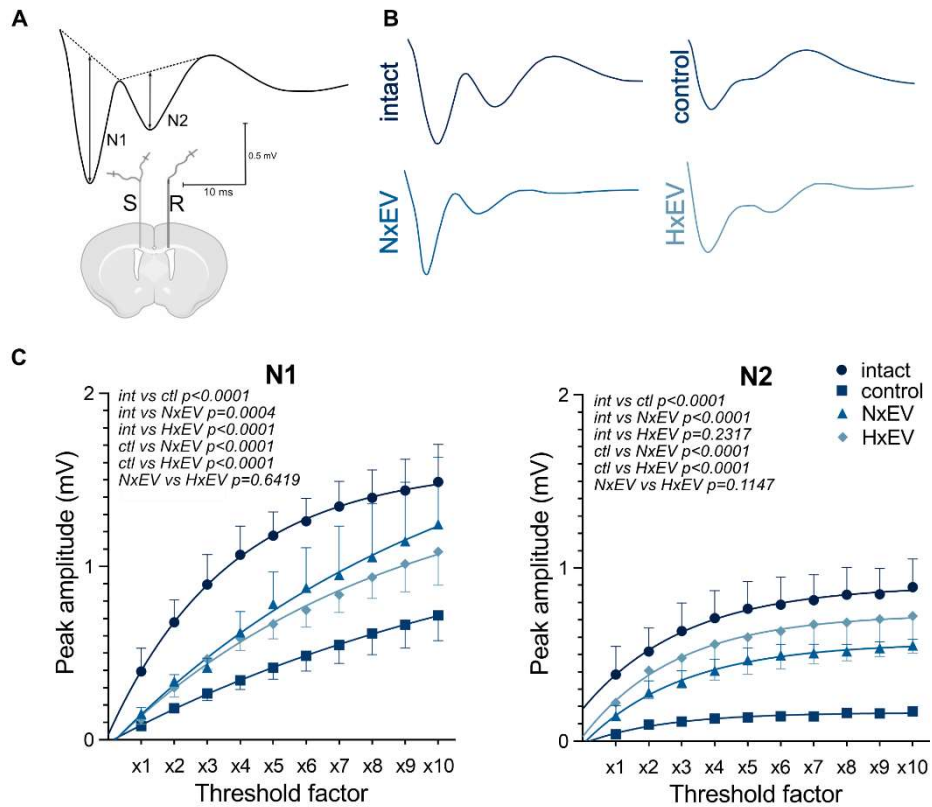


Figura 9. Recuperación de CAP después de la administración de exosomas. **A.** Representación de la colocación del electrodo que muestra el sitio de estimulación (S) y registro (R) en un plano coronal. **B.** La onda del potencial de acción compuesto (CAP) muestran un componente temprano (N1) y uno tardío (N2), generados por axones mielinizados y no mielinizados, respectivamente. Las líneas discontinuas en los CAP explican las mediciones de amplitudes de pico desde sus bases proyectadas. **C.** CAP evocados que representan el nivel de estimulación máxima para los grupos intacto (intact), control, exosomas normoxia (NxEV) e exosomas hipoxia (HxEV). **D.** Gráfica de curvas de I/O para el componente N1 para los grupos intact, control, NxEV y HxEV. $p < 0,001$. **E.** Gráfica de curvas de I/O para el componente N2 para grupos intact, control, NxEV y HxEV. $p < 0,001$.

5.7 Recuperación neurofuncional después del infarto isquémico.

El desempeño neurológico de los animales fue un hallazgo muy relevante, pues reafirma los resultados descritos con anterioridad. El análisis de la recuperación funcional se realizó a través de pruebas de función motora, sensorial y la integración de ambos en la medición de los efectos funcionales del infarto isquémico, en la que los déficits en las tareas específicas se reflejan con un menor puntaje.

A las 24 h en la evaluación de la función integrada (motora y sensorial) del grupo HxEV ($p < 0.0001$, ANOVA 2 vías con Tukey) presentaron desde el inicio un menor déficit neurofuncional comparadas con el grupo NxEV, aunque en ambos hubo una recuperación gradual a través del tiempo, de igual manera el grupo NxEV ($p < 0.0001$, ANOVA 2 vías con Tukey) tuvieron un menor déficit de la función sensorial y motora en contraste con el grupo control, las cuales tuvieron la menor recuperación a lo largo del tiempo (**Figura 10**).

En la evaluación neurofuncional general del día 7 y 14 de recuperación después del infarto, la recuperación del grupo HxEV tuvo una diferencia significativa ($p < 0.0001$, ANOVA 2 vías con Tukey) con respecto al grupo NxEV y al grupo control, los cuales mantuvieron esa disfunción neurofuncional hasta los 21 d. El grupo NxEV también mantuvo una diferencia significativa ($p < 0.0001$, ANOVA 2 vías con Tukey) en comparación con el grupo control (**Figura 10**).

A los 21 días fue muy relevante la mejoría en el grupo HxEV ($p = 0.0408$ ANOVA 2 vías con Tukey y $p < 0.0001$ ANOVA 2 vías con Tukey) con respecto al grupo NxEV y al grupo control, respectivamente (**Figura 10**).

Por tanto, la administración de exosomas favorece a lo largo del tiempo la recuperación motora y sensorial después del infarto cerebral isquémico.

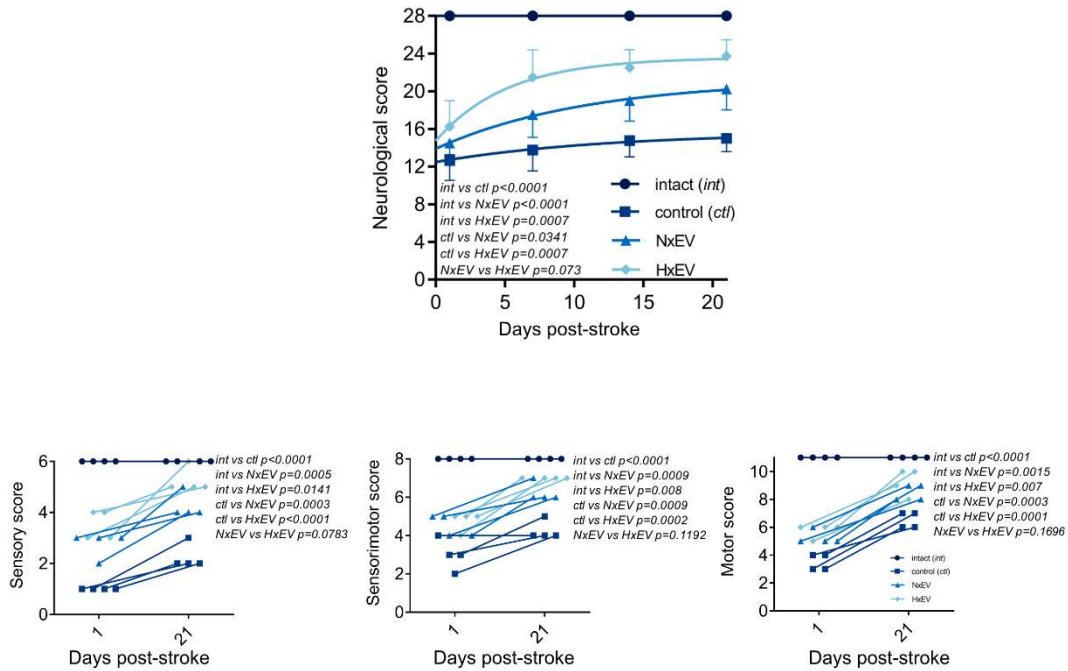


Figura 10. La recuperación neurofuncional después del infarto isquémico es promovida por la administración de exosomas. Comparación del desempeño neurofuncional en ratas pertenecientes a todos los grupos experimentales durante 21 días posteriores al infarto. Muestra la media \pm S.E.M. de las mediciones realizadas en 4 ratas por grupo en el transcurso del tiempo. La evaluación neurológica se realizó a través de pruebas de función motora, sensorial y la integración de ambos. Las gráficas muestran la evaluación inicial 24h, 7, 14 y 21 días de cada rata en los tiempos de evaluación. ANOVA dos vías seguido por Tukey post hoc.

6. Discusión

En este trabajo demostramos que los exosomas derivados de astrocitos sometidos a condiciones de normoxia e hipoxia favorecen la recuperación después del infarto isquémico, incluso los últimos tienen una mayor capacidad de reparación. Después del infarto, la reorganización del cerebro comienza en la fase de reperfusión y se produce cierto grado de recuperación espontánea; sin embargo, existe evidencia limitada sobre los mecanismos moleculares subyacentes a esta recuperación posterior al evento isquémico [128].

Ante el daño isquémico los astrocitos muestran menor susceptibilidad a morir que las neuronas y reaccionan a través de un proceso biológico complejo, son capaces de producir una amplia variedad de moléculas pro y antiinflamatorias, cuya secreción es mediada por moléculas de señalización para regular la inflamación [129]. Los astrocitos son una población celular heterogénea que intervienen en el correcto funcionamiento de cerebro. Específicamente los astrocitos de tipo A2 favorecen una respuesta neuroprotectora en la región lesionada [130], éstos son principalmente reparadores al dirigir vías de señalización que intervienen en la regulación de la angiogénesis siendo muy importantes para la formación de vasos sanguíneos [156, 157], ya que secretan factores angiogénicos como VEGF-A [158]. También favorecen la recuperación del tejido dañado a través de la regulación positiva de factores neurotróficos como NGF, BDNF, [131], estimulador de la neurogénesis con una función importante en el desarrollo neurológico normal, GDNF [132], que participa estimulando y controlando la neurogénesis debido a sus propiedades de neuroprotección [133, 134]. Por otra parte, se ha demostrado que los astrocitos participan activamente en la sinaptogénesis tras la lesión isquémica. Sin embargo, los astrocitos con fenotipo A1 son perjudiciales para la recuperación al favorecer la inflamación y por tanto la degradación del tejido, también generan moléculas de señalización incluida la excitotoxicidad a través de la regulación a la baja de GLT-1 y la liberación de efrina-A5 que inhibe el crecimiento axonal [106, 128].

Estudios *in vitro* demuestran que los cultivos de astrocitos, están libres de microglía activada, es decir, astrocitos reactivos que promueven la muerte neuronal y de oligodendrocitos [159], generando un ambiente inhibitorio extrínseco que limita el crecimiento axonal después del daño cerebral. En estas condiciones de cultivo también constituyen una población heterogénea, conformada por el astrocito típico que representa aproximadamente el 70% del cultivo celular, los

cuales promueven la adhesión y el crecimiento de neuritas en las neuronas y el astrocito atípico que inhibe tales procesos [160].

El sistema de tráfico vesicular es altamente dinámico y es un proceso celular complejo que organiza tanto el transporte de proteínas y moléculas solubles a través del citoplasma, como de moléculas que son secretadas y constituyen la base de la comunicación intercelular [161].

En enfermedades neurológicas, traumatismos nerviosos y eventos cerebrovasculares, la secreción de vesículas extracelulares refleja la desregulación en la homeostasis celular, así como la disfunción celular y tisular, pero también pueden ser señales dirigidas a disminuir el daño celular [128, 135].

En este sentido, las vesículas extracelulares, en particular los exosomas, cumplen una función paracrina, ya que al ser liberados al medio extracelular inducen respuestas antiapoptóticas, angiogénicas e inmunomoduladoras [162]. Los exosomas son moléculas lipídicas generadas por endocitosis membranal, que se convierten en biocontenedores que transportan y transfieren biomoléculas a otras células en el sistema nervioso incluyendo proteínas, lípidos, RNA y miRNAs [137, 138], modificando la función de las células receptoras.

Hay evidencia que sugiere que los exosomas derivados de células madre favorecen la recuperación después del infarto cerebral y que pueden estar asociados a una mayor neurogénesis, angiogénesis y neuroprotección [163]; incluso algunos estudios indican que los exosomas derivados de células progenitoras modificadas genéticamente, contienen miRNAs que participan activamente en enfermedades neurodegenerativas [164], neurológicas, traumatismos nerviosos y eventos cerebrovasculares; también son mediadores de la señalización durante la actividad cerebral [128]

Se ha determinado que la carga exosomal depende del tipo celular del cual son secretados [139], la composición de la carga de proteínas se ha relacionado con la respuesta específica del tipo celular a diferentes estímulos [140], al estado fisiológico o patológico de la célula donadora y a los mecanismos de biogénesis [141].

En el presente estudio utilizamos la administración de una suspensión de exosomas derivados de los astrocitos como estrategia para facilitar la recuperación del tejido dañado en un modelo de isquemia-reperusión. En los humanos, la oclusión de la arteria cerebral media es la causa más común de todos los tipos de isquemia cerebral [165, 166], por tanto para estudiar la fisiopatología de la isquemia cerebral, la selección adecuada del modelo animal es crucial y depende, entre otros factores, del tipo de isquemia a estudiar permanente o transitorio, en función de la

fisiopatología de la reperfusión isquémica; de la intensidad de la isquemia cerebral, la integración motora y sensitiva, el tipo de la neocorteza y la vascularización cerebral, la duración del estudio experimental (estudio en fase aguda o crónica), son los factores más importantes a la hora de elegir un modelo de isquemia [167]. Para la selección de la especie, cepa, edad y sexo; la principal característica para tener en cuenta es la anatomía neurovascular que difiere entre las diferentes cepas. El resultado en el tamaño de la lesión isquémica va a variar en gran medida dependiendo de la existencia del mayor o menor número de ramificaciones colaterales que irrigan el territorio de la arteria cerebral media. Las especies animales con una anatomía vascular cerebral y una fisiología aceptablemente similar al humano son rata y ratón, ya que la anatomía del polígono de Willis es similar al humano en el que existe comunicación entre el sistema carotídeo anterior y el vertebrobasilar posterior [168, 169]. Las cepas de rata más apropiadas para la realización de estos modelos son la cepa Wistar, no es conveniente utilizar ratas de la subcepa Wistar Kyoto, ya que desarrollan un tamaño de infarto muy pequeño, al igual que la cepa Sprague Dawley, ni la subcepa OFA, ya que se han detectado excesiva variabilidad en el tamaño del infarto [170-172]. En cuanto al sexo se utilizan exclusivamente ratas macho para limitar los posibles efectos neuroprotectores de los estrógenos presentes en ratas hembras [173-175]. Aunque existan diferencias a este respecto, generalmente utilizamos animales jóvenes adultos y sanos, con una capacidad de regeneración notablemente superior a la del humano viejo y enfermo; sin embargo, utilizamos animales jóvenes porque es vital cumplir una de las premisas de la investigación en general y su vertiente experimental en particular, la reproducibilidad [176]. Para esto es indispensable la medida de la perfusión cerebral en la región irrigada por la arteria cerebral media, a través de flujometría con láser-Doppler para asegurar la oclusión y reperfusión de la arteria y corroborar el éxito de la cirugía.

La introducción de un filamento de nylon intraluminal para ocluir el origen de la arteria cerebral media (ACM), produce una isquemia en todo el territorio de esta arteria, incluyendo los ganglios basales, que están irrigados por las arterias lenticuloestriadas. Estas ramas son arterias terminales que, a diferencia de las arterias corticales, no aportan colaterales a los territorios vasculares adyacentes. Sin embargo, la oclusión de la ACM distalmente a las arterias lenticuloestriadas producirá un infarto cortical [169], que simula una situación experimental similar a las condiciones observadas en la práctica clínica. La literatura refiere que es modelo con baja reproducibilidad, sin embargo, al realizar la técnica quirúrgica de manera precisa, logramos tener una alta reproducibilidad del modelo, con caídas de perfusión sanguínea cerebral entre 70 y 86%

en todos los animales incluidos en el estudio. También reportan que tiene una elevada mortalidad [46], lo que obliga a aumentar el número de animales utilizados en cada estudio. Sin embargo, con una técnica quirúrgica cuidadosa y poco invasiva y los adecuados cuidados posoperatorios a las ratas, nosotros logramos tener una sobrevivencia del 68% de los animales.

Para determinar la evolución de la patología y dar seguimiento al tratamiento experimental, utilizamos estudios de resonancia magnética (RM) que es una herramienta muy útil, ya que es sensible a la detección de infartos cerebrales de tamaño pequeño, que aporta información morfológica del cerebro a nivel macroscópico. A través de la RM es posible medir diferentes parámetros que permiten evaluar la integridad del tejido cerebral y cómo éste cambia estructuralmente a lo largo del tiempo, incluso aporta múltiples parámetros cuantificables.

La importancia de realizar estos estudios radica en mejorar el pronóstico del infarto cerebral en humanos, ya que puede analizarse desde aristas diferentes, y a la vez complementarias, como sería el pronóstico vital, neurológico y funcional. En un análisis multivariante de factores predictores de evolución clínica en fase aguda del infarto cerebral, observaron que el volumen de infarto se comporta como una variable predictora independiente del pronóstico clínico [177], en este trabajo identificamos de manera precisa la presencia y extensión de zonas estructuras anatómicas dañadas por el infarto cerebral, el estriado que corresponde al foco del infarto y la porción de la corteza motora primaria y somatosensorial que corresponde a la penumbra, en el seguimiento completo de la evolución de la recuperación del infarto cerebral en el mismo individuo.

A partir de información obtenida de las imágenes por difusión se obtiene el volumen del tejido cerebral afectado, que es un excelente predictor del pronóstico funcional, los Institutos de Salud de Estados Unidos de América (NIHSS) lo considera un método de evaluación válido, reproducible y con fuerte predicción de mortalidad y funcionalidad a corto y a largo plazo [178], en el presente estudio nosotros cuantificamos el volumen y al igual que lo reportado por Gaudinski, Henning *et al.* [179], identificamos mayor déficit motor en los animales que presentaron un mayor volumen de infarto. En el proceso de recuperación el volumen de infarto disminuye, al igual que el déficit motor; de manera importante el volumen de infarto disminuye en tiempo y tamaño a mayor velocidad en las ratas que se administraron con la suspensión de exosomas, al igual que mejora su motricidad.

A partir de imágenes ponderadas en difusión podemos obtener imágenes del tensor de difusión (DTI) para visualizar y cuantificar el daño estructural en los tractos de la materia blanca. Con esta

técnica podemos estudiar la difusión de las moléculas de agua en el cerebro y obtener diferentes índices, la mayoría de ellos de gran utilidad para la valoración de la materia blanca [180]. El más utilizado es la (FA) que proporciona información directa de la microestructura y de la microdinámica de los tejidos biológicos, pudiendo apreciar la dirección de movimiento de las moléculas de agua en cada estructura cerebral; incluso es considerado como un biomarcador de integridad axonal, ya que posee una alta sensibilidad en la valoración de patología de materia blanca, y se ve alterada (generalmente disminuida) prácticamente en cualquier proceso que la afecte [181].

Tras un infarto cerebral que afecte el tracto cortico-talámico, principal vía que controla los movimientos voluntarios, se produce una pérdida la coordinación motora y la integración de la percepción de los estímulos, codificados en los circuitos de la corteza somatosensorial y el tálamo [182]; el daño en esas estructuras se refleja en el déficit de la motricidad de las extremidades anteriores [183], tal y como lo reportamos en este estudio el valor disminuido de FA en la zona de la corteza cerebral y el estriado, se correlaciona con el déficit motor, posteriormente en el proceso de recuperación, la FA se incrementa paulatinamente, al igual que el déficit motor; de manera importante el incremento de la FA es mayor en las ratas que se administraron con la suspensión de exosomas.

También se obtuvieron otros índices de interés: MD que se asume como el coeficiente de difusión aparente, AD y RD que corresponden con los coeficientes de difusión en las direcciones del eje mayor y menor del movimiento de las moléculas de agua [184].

La difusión se expresa numéricamente en mm^2/s y refleja el movimiento de las moléculas de agua en un área y tiempo de observación determinado. Estos valores estarán disminuidos en un tejido, si las moléculas de agua tienen restricción en su movimiento al azar por la presencia de membranas, paredes y/o macromoléculas [185]. En los axones recubiertos de mielina, generan una dirección preferente para la difusión de las moléculas de agua a lo largo de la ruta de menor resistencia, preferiblemente a lo largo de las mismas la AD con un valor mayor y un valor menos en las direcciones perpendiculares a estos tractos RD [186]. Esta característica provoca que los protones difundan más rápidamente por las rutas de menor resistencia.

En este trabajo, también determinamos después del infarto isquémico los valores de la MD y el incremento puede ser debido a desmielinización y/o edema, observamos la disminución de la AD que puede indicar pérdida axonal y un aumento de la RD que se relaciona más con la desmielinización y la disminución de la densidad axonal; mostrando correlación con el déficit

motor. Y posteriormente en el proceso de recuperación espontánea, en el cual la reorganización axonal y los patrones histológicos en el cerebro implican recuperación, incluso crecimiento axonal que genera nuevas proyecciones locales o interhemisféricas [187] que han sido asociadas con la recuperación funcional [98], en la recuperación a lo largo del tiempo, estos valores se restablecieron moderadamente, al igual que el déficit motor; de manera muy evidente se potenció este proceso en las ratas que se administraron con la suspensión de exosomas.

Una de las aplicaciones clínicas del DTI, es la tractografía, representación en tres dimensiones del trayecto que siguen los tractos neurales a partir de los valores de FA, para visualización de la localización anatómica y la direccionalidad del mismo representada por colores.

Las direcciones de la difusión se representan mediante mapas de colores, por convención los tractos del eje "X" son color rojo, por ejemplo: las fibras del cuerpo caloso que cruzan de uno a otro hemisferio, los tractos del eje "Y" que representan fibras de conexión interlobular tienen tonalidad verde, por ejemplo: las vías ópticas que se proyectan desde la zona anterior a la posterior y los tractos del eje "Z", azules, estos son los tractos córticoespinales descendentes que van desde la corteza hasta una porción de la médula espinal [188].

En el infarto cerebral, las tractografías permiten visualizar la degeneración de los tractos dañados, así como las vías afectadas por la isquemia [189].

En este estudio después del infarto isquémico, generamos las tractografías de las fibras locales o interhemisféricas del cuerpo caloso, que es la estructura del cerebro que conecta y transfiere la información motora, sensorial y cognitiva entre los dos hemisferios. El infarto isquémico puede generar una lesión a nivel del cuerpo caloso, generando un déficit en la conexión de las funciones de ambos hemisferios para poder llevar a cabo acciones integradas y complejas, que correlacionan con las imágenes de tractografía que generamos. Las tractografías de las ratas que fueron administradas con la suspensión de exosomas mostraron un incremento del número de proyecciones que han sido asociadas con la recuperación funcional [98].

También generamos las imágenes de tractografías de las proyecciones talamocorticales que regulan las funciones sensitivo-motoras y cognitivas en los mamíferos [151], esta unidad funcional cerebral compuesta por fibras nerviosas aferentes y eferentes que conectan el tálamo con la corteza cerebral se encuentra comprometida en el infarto cerebral. Las tractografías de las ratas que fueron administradas con la suspensión de exosomas mostraron un incremento del número de las fibras nerviosas de las proyecciones aferentes y eferentes del núcleo (VPM) a la corteza prefrontal que está involucrada en recuperación motora en la rata [190].

Debido a que las funciones cognitivas involucran el procesamiento coordinado de información interhemisférica, la evaluación funcional del cuerpo calloso a través de la determinación de sus propiedades electrofisiológicas es de particular interés, al proporcionar datos sobre la función de los axones mielinizados y no mielinizados en diversas condiciones normales y patológicas, como daño y reparación de la mielina, particularmente en modelos de isquemia cerebral experimental. Recientemente se describió que de manera general los potenciales de acción compuestos (CAP) de todo el cuerpo calloso en roedores se caracterizan por tener una forma de onda bifásica con un componente temprano generado predominantemente por axones mielinizados de conducción rápida (N1) y un componente posterior que refleja axones no mielinizados más lentos (N2)[152-155]

En nuestros experimentos, determinamos amplitudes mayores del CAP en los animales administrados con la suspensión de exosomas, por tanto, los exosomas promueven la preservación de la función sináptica en áreas afectadas por el infarto cerebral, datos que correlacionan con los hallazgos obtenidos a través de RM.

Por otro lado, en nuestra investigación al realizar el análisis histológicos de la integridad de las fibras nerviosas del cerebro utilizando marcadores de inmunofluorescencia, proteína asociada a MAP-2 y TUJ-1, en general la recuperación de los procesos neurales + a MAP2 y TUJ 1 se correlaciona positivamente con los parámetros de RM descritos anteriormente y las determinaciones obtenidas de las mediciones del DTI, los cuales sugieren mayor integridad estructural de los axones y mejor organización en los grupos administrados con la suspensión de exosomas.

En correspondencia con lo reportado en la literatura, los procesos celulares y moleculares endógenos de reparación después del infarto incluyen la reorganización del citoesqueleto neuronal, en el cono de crecimiento, la actina se desestabiliza y se vuelve más dinámica en el muñón proximal de la neurita, donde inicia el proceso de regeneración del axón, permitiendo la protrusión de los microtúbulos y el consecuente crecimiento neurítico y del axón [99, 191], este crecimiento está regulado por factores extracelulares y moléculas de señalización intracelular [192].

Por lo anterior, nosotros sugerimos que los astrocitos liberan moléculas para activar mecanismos de regeneración dirigidas específicamente hacia las neuronas. Recientemente se ha demostrado que los exosomas derivados de astrocitos contribuyen al crecimiento axonal y a la recuperación

funcional después del infarto cerebral [193], proporcionando evidencia de que las vesículas extracelulares derivadas de astrocitos contribuye a la señalización para el crecimiento axonal.

También se ha indicado que los miRNAs son transportados por los exosomas y tienen un rol fundamental en enfermedades y tienen efectos terapéuticos importantes en el infarto cerebral [78]. Incluso algunas de las miRNAs dentro del axón distal de las neuronas que regulan y favorecen el crecimiento axonal como miR15b, miR195 y miR26b [79], miRNA130a, regula indirectamente la expresión de VEGFR2 [80], involucrado en la neuroadaptación posterior al evento isquémico [82]. Interesantemente los exosomas derivados de astrocitos sometidos a señales proinflamatorias, disminuyen otras moléculas que bloquean el proceso de crecimiento del axón como miR203 y miR29a [79]. Lo más probable es que el crecimiento y la guía axonal favorecido por los exosomas derivados de astrocitos, sea el resultado de la combinación de varias moléculas reguladoras contenidas en éstos.

Nosotros proponemos que en el evento isquémico, la administración de la suspensión de exosomas derivados de astrocitos, bajo condiciones de estrés (HxEV) y basales (NxEV), se favorece un ambiente permisivo para facilitar la señalización del crecimiento axonal, potenciando el proceso endógeno de crecimiento de neuritas y reorganización histológica de las estructuras del cerebro que conectan y transfieren la información motora, sensorial y cognitiva, facilitando la recuperación funcional. Además, al administrar la suspensión de exosomas 30 min después del inicio de la fase de reperfusión, es probable que estemos acortando el tiempo necesario para que se activen los mecanismos de reparación endógena, lo cual puede explicar la reducción en el tiempo de recuperación inducido por los exosomas.

7. Conclusión

El modelo experimental de la oclusión de la arteria cerebral media es una excelente herramienta para estudiar la fisiopatología de la isquemia cerebral, siempre y cuando la técnica quirúrgica sea precisa y se utilicen las especies animales con una anatomía vascular cerebral y una fisiología aceptablemente similar al humano como la rata y ratón pertenecientes a cepas específicas, para tener una alta reproducibilidad del modelo y simular una situación experimental similar a las condiciones observadas en la práctica clínica. Aunado a lo anterior, la correlación de los resultados entre la resonancia magnética, la electrofisiología y la histología validan dichos resultados y en un dado momento serían un pilar en la práctica médica.

Nosotros demostramos que los exosomas derivados de astrocitos promueven el proceso endógeno de recuperación funcional después del infarto isquémico y puede ser una alternativa viable para diseñar estrategias de intervención clínica basadas en la recuperación endógena. Sin embargo es indispensable continuar estudiando los mecanismos moleculares a través de los cuales los exosomas son capaces de inducir la organización histológica y por tanto la mejoría funcional tras un infarto cerebral isquémico.

8. Referencias

1. Kuklina, E.V., et al., *Epidemiology and prevention of stroke: a worldwide perspective*. Expert Rev Neurother, 2012. **12**(2): p. 199-208.
2. Ouriques Martins, S.C., et al., *Priorities to reduce the burden of stroke in Latin American countries*. Lancet Neurol, 2019. **18**(7): p. 674-683.
3. Thrift, A.G., et al., *Global stroke statistics: An update of mortality data from countries using a broad code of "cerebrovascular diseases"*. Int J Stroke, 2017. **12**(8): p. 796-801.
4. Saver, J.L., *Time is brain - Quantified*. Stroke, 2006. **37**(1): p. 263-266.
5. Kwakkel, G., et al., *Probability of regaining dexterity in the flaccid upper limb: impact of severity of paresis and time since onset in acute stroke*. Stroke, 2003. **34**(9): p. 2181-6.
6. Yu, T.S., P.M. Washington, and S.G. Kernie, *Injury-Induced Neurogenesis: Mechanisms and Relevance*. Neuroscientist, 2016. **22**(1): p. 61-71.
7. Tovar-y-Romo, L.B., A. Penagos-Puig, and J.O. Ramírez-Jarquín, *Endogenous recovery after brain damage: molecular mechanisms that balance neuronal life/death fate*. Journal of Neurochemistry, 2016. **136**(1): p. 13-27.
8. Mittal, S.H. and D. Goel, *Mortality in ischemic stroke score: A predictive score of mortality for acute ischemic stroke*. Brain Circ, 2017. **3**(1): p. 29-34.
9. Adams, H.P., Jr., et al., *Guidelines for the early management of adults with ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline as an educational tool for neurologists*. Stroke, 2007. **38**(5): p. 1655-711.
10. Dirnagl, U., C. Iadecola, and M.A. Moskowitz, *Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view*. Trends in Neurosciences, 1999. **22**(9): p. 391-397.
11. Obel, L.F., et al., *Brain glycogen-new perspectives on its metabolic function and regulation at the subcellular level*. Front Neuroenergetics, 2012. **4**: p. 3.
12. Thomas, D.L., et al., *Regional variation of cerebral blood flow and arterial transit time in the normal and hypoperfused rat brain measured using continuous arterial spin labeling MRI*. J Cereb Blood Flow Metab, 2006. **26**(2): p. 274-82.
13. Winn, H.R., R. Rubio, and R.M. Berne, *Brain adenosine production in the rat during 60 seconds of ischemia*. Circ Res, 1979. **45**(4): p. 486-92.

14. Weidinger, A. and A.V. Kozlov, *Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction*. Biomolecules, 2015. **5**(2): p. 472-84.
15. Fernandes, S.P., et al., *Inactivation of astrocytic glutamine synthetase by hydrogen peroxide requires iron*. Neurosci Lett, 2011. **490**(1): p. 27-30.
16. Anlauf, E. and A. Derouiche, *Glutamine synthetase as an astrocytic marker: its cell type and vesicle localization*. Front Endocrinol (Lausanne), 2013. **4**: p. 144.
17. Bak, L.K., A. Schousboe, and H.S. Waagepetersen, *The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer*. J Neurochem, 2006. **98**(3): p. 641-53.
18. Grewer, C., et al., *Glutamate forward and reverse transport: from molecular mechanism to transporter-mediated release after ischemia*. IUBMB Life, 2008. **60**(9): p. 609-19.
19. Palmer, A.M., P.J. Robichaud, and C.T. Reiter, *The release and uptake of excitatory amino acids in rat brain: effect of aging and oxidative stress*. Neurobiol Aging, 1994. **15**(1): p. 103-11.
20. Rossi, D.J., T. Oshima, and D. Attwell, *Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake*. Nature, 2000. **403**(6767): p. 316-321.
21. Lai, T.W., S. Zhang, and Y.T. Wang, *Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection*. Prog Neurobiol, 2014. **115**: p. 157-88.
22. Jeitner, T.M., K. Battaile, and A.J. Cooper, *Critical Evaluation of the Changes in Glutamine Synthetase Activity in Models of Cerebral Stroke*. Neurochem Res, 2015. **40**(12): p. 2544-56.
23. Moskowitz, M.A., E.H. Lo, and C. Iadecola, *The science of stroke: mechanisms in search of treatments*. Neuron, 2010. **67**(2): p. 181-98.
24. Lo, E.H., *A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke*. Nat Med, 2008. **14**(5): p. 497-500.
25. Gido, G., T. Kristian, and B.K. Siesjo, *Extracellular potassium in a neocortical core area after transient focal ischemia*. Stroke, 1997. **28**(1): p. 206-10.
26. Nedergaard, M. and A.J. Hansen, *Characterization of cortical depolarizations evoked in focal cerebral ischemia*. J Cereb Blood Flow Metab, 1993. **13**(4): p. 568-74.
27. Shah, N.H. and E. Aizenman, *Voltage-gated potassium channels at the crossroads of neuronal function, ischemic tolerance, and neurodegeneration*. Transl Stroke Res, 2014. **5**(1): p. 38-58.
28. Balestrino, M., *Pathophysiology of anoxic depolarization: new findings and a working hypothesis*. J Neurosci Methods, 1995. **59**(1): p. 99-103.

29. Juzekaeva, E., et al., *Preferential Initiation and Spread of Anoxic Depolarization in Layer 4 of Rat Barrel Cortex*. Front Cell Neurosci, 2017. **11**: p. 390.
30. Jarvis, C.R., T.R. Anderson, and R.D. Andrew, *Anoxic depolarization mediates acute damage independent of glutamate in neocortical brain slices*. Cereb Cortex, 2001. **11**(3): p. 249-59.
31. Ayata, C. and M. Lauritzen, *Spreading Depression, Spreading Depolarizations, and the Cerebral Vasculature*. Physiol Rev, 2015. **95**(3): p. 953-93.
32. Takano, T., et al., *Cortical spreading depression causes and coincides with tissue hypoxia*. Nat Neurosci, 2007. **10**(6): p. 754-62.
33. Wei, L., et al., *Potassium channel blockers attenuate hypoxia- and ischemia-induced neuronal death in vitro and in vivo*. Stroke, 2003. **34**(5): p. 1281-6.
34. Bano, D. and P. Nicotera, *Ca²⁺ signals and neuronal death in brain ischemia*. Stroke, 2007. **38**(2 Suppl): p. 674-6.
35. Anrather, J. and C. Iadecola, *Inflammation and Stroke: An Overview*. Neurotherapeutics, 2016. **13**(4): p. 661-670.
36. Shin, H.K., et al., *Vasoconstrictive neurovascular coupling during focal ischemic depolarizations*. J Cereb Blood Flow Metab, 2006. **26**(8): p. 1018-30.
37. Carmichael, S.T., et al., *Molecular, cellular and functional events in axonal sprouting after stroke*. Exp Neurol, 2017. **287**(Pt 3): p. 384-394.
38. Almeida, A., et al., *Oxygen and glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurons but not in astrocytes in primary culture*. J Neurochem, 2002. **81**(2): p. 207-17.
39. Gurer, G., et al., *Astrocytes are more resistant to focal cerebral ischemia than neurons and die by a delayed necrosis*. Brain Pathol, 2009. **19**(4): p. 630-41.
40. Li, L., et al., *Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia*. J Cereb Blood Flow Metab, 2008. **28**(3): p. 468-81.
41. Thoren, A.E., et al., *Astrocytic function assessed from 1-¹⁴C-acetate metabolism after temporary focal cerebral ischemia in rats*. J Cereb Blood Flow Metab, 2005. **25**(4): p. 440-50.
42. Xia, C.F., et al., *Adrenomedullin gene delivery protects against cerebral ischemic injury by promoting astrocyte migration and survival*. Hum Gene Ther, 2004. **15**(12): p. 1243-54.
43. Basic Kes, V., et al., *Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in acute ischemic stroke and their relation to early neurological deficit and stroke outcome*. Clin Biochem, 2008. **41**(16-17): p. 1330-4.

44. Nayak, A.R., et al., *Time course of inflammatory cytokines in acute ischemic stroke patients and their relation to inter-alfa trypsin inhibitor heavy chain 4 and outcome*. Ann Indian Acad Neurol, 2012. **15**(3): p. 181-5.
45. Tuttolomondo, A., et al., *Inflammatory cytokines in acute ischemic stroke*. Curr Pharm Des, 2008. **14**(33): p. 3574-89.
46. Venters, H.D., R. Dantzer, and K.W. Kelley, *Tumor necrosis factor-alpha induces neuronal death by silencing survival signals generated by the type I insulin-like growth factor receptor*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **917**: p. 210-20.
47. Mattson, M.P., *NF-kappaB in the survival and plasticity of neurons*. Neurochem Res, 2005. **30**(6-7): p. 883-93.
48. Dvorientchikova, G., et al., *Inactivation of astroglial NF-kappa B promotes survival of retinal neurons following ischemic injury*. Eur J Neurosci, 2009. **30**(2): p. 175-85.
49. Silver, J. and J.H. Miller, *Regeneration beyond the glial scar*. Nat Rev Neurosci, 2004. **5**(2): p. 146-56.
50. Bush, T.G., et al., *Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice*. Neuron, 1999. **23**(2): p. 297-308.
51. Faulkner, J.R., et al., *Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury*. J Neurosci, 2004. **24**(9): p. 2143-55.
52. Sofroniew, M.V., *Reactive astrocytes in neural repair and protection*. Neuroscientist, 2005. **11**(5): p. 400-7.
53. Rosenberg, P.A. and E. Aizenman, *Hundred-fold increase in neuronal vulnerability to glutamate toxicity in astrocyte-poor cultures of rat cerebral cortex*. Neurosci Lett, 1989. **103**(2): p. 162-8.
54. Hansson, E. and L. Ronnback, *Glial neuronal signaling in the central nervous system*. FASEB J, 2003. **17**(3): p. 341-8.
55. Swanson, R.A., W. Ying, and T.M. Kauppinen, *Astrocyte influences on ischemic neuronal death*. Curr Mol Med, 2004. **4**(2): p. 193-205.
56. Markiewicz, I. and B. Lukomska, *The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system*. Acta Neurobiol Exp (Wars), 2006. **66**(4): p. 343-58.
57. Liu, Z. and M. Chopp, *Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke*. Prog Neurobiol, 2016. **144**: p. 103-20.
58. Xu, S., et al., *Glial Cells: Role of the Immune Response in Ischemic Stroke*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 294.

59. Lee, T.H., et al., *Expression of nerve growth factor and trkA after transient focal cerebral ischemia in rats*. Stroke, 1998. **29**(8): p. 1687-96; discussion 1697.
60. Lindholm, D., et al., *Differential Regulation of Nerve Growth Factor (NGF) Synthesis in Neurons and Astrocytes by Glucocorticoid Hormones*. Eur J Neurosci, 1992. **4**(5): p. 404-410.
61. Frautschy, S.A., P.A. Walicke, and A. Baird, *Localization of basic fibroblast growth factor and its mRNA after CNS injury*. Brain Res, 1991. **553**(2): p. 291-9.
62. Ho, A. and M. Blum, *Regulation of astroglial-derived dopaminergic neurotrophic factors by interleukin-1 beta in the striatum of young and middle-aged mice*. Exp Neurol, 1997. **148**(1): p. 348-59.
63. Yuan, L., et al., *14,15-epoxyeicosatrienoic acid promotes production of brain derived neurotrophic factor from astrocytes and exerts neuroprotective effects during ischaemic injury*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2016. **42**(7): p. 607-620.
64. Grade, S., et al., *Brain-derived neurotrophic factor promotes vasculature-associated migration of neuronal precursors toward the ischemic striatum*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e55039.
65. Nicole, O., et al., *Neuroprotection mediated by glial cell line-derived neurotrophic factor: involvement of a reduction of NMDA-induced calcium influx by the mitogen-activated protein kinase pathway*. J Neurosci, 2001. **21**(9): p. 3024-33.
66. Yamagata, K., et al., *Differential regulation of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA expression during hypoxia and reoxygenation in astrocytes isolated from stroke-prone spontaneously hypertensive rats*. Glia, 2002. **37**(1): p. 1-7.
67. Chisholm, N.C. and F. Sohrabji, *Astrocytic response to cerebral ischemia is influenced by sex differences and impaired by aging*. Neurobiol Dis, 2016. **85**: p. 245-253.
68. Shindo, A., et al., *Astrocyte-Derived Pentraxin 3 Supports Blood-Brain Barrier Integrity Under Acute Phase of Stroke*. Stroke, 2016. **47**(4): p. 1094-100.
69. Bernaudin, M., et al., *Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain*. Glia, 2000. **30**(3): p. 271-8.
70. Poyhonen, S., et al., *Effects of Neurotrophic Factors in Glial Cells in the Central Nervous System: Expression and Properties in Neurodegeneration and Injury*. Front Physiol, 2019. **10**: p. 486.
71. Kinoshita, A., et al., *Effect of astrocyte-derived factors on ischemic brain edema induced by rat MCA occlusion*. APMIS, 1990. **98**(9): p. 851-7.
72. Wu, X., et al., *Ginkgolide B preconditioning on astrocytes promotes neuronal survival in ischemic injury via up-regulating erythropoietin secretion*. Neurochem Int, 2013. **62**(2): p. 157-64.

73. Lu, Y., et al., *Neuron-Derived Estrogen Is Critical for Astrocyte Activation and Neuroprotection of the Ischemic Brain*. J Neurosci, 2020. **40**(38): p. 7355-7374.
74. Bembenek, J.P., et al., *Prediction of Recovery and Outcome Using Motor Evoked Potentials and Brain Derived Neurotrophic Factor in Subacute Stroke*. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2020. **29**(11): p. 105202.
75. Eyiletten, C., et al., *The Relation of the Brain-Derived Neurotrophic Factor with MicroRNAs in Neurodegenerative Diseases and Ischemic Stroke*. Mol Neurobiol, 2021. **58**(1): p. 329-347.
76. Li, W., et al., *Protective Mechanism and Treatment of Neurogenesis in Cerebral Ischemia*. Neurochem Res, 2020. **45**(10): p. 2258-2277.
77. Ikeda, N., et al., *Bone marrow stromal cells that enhanced fibroblast growth factor-2 secretion by herpes simplex virus vector improve neurological outcome after transient focal cerebral ischemia in rats*. Stroke, 2005. **36**(12): p. 2725-30.
78. Liu, X.S., et al., *MicroRNAs in cerebral ischemia-induced neurogenesis*. J Neuropathol Exp Neurol, 2013. **72**(8): p. 718-22.
79. Li, C., et al., *Distal Axonal Proteins and Their Related MiRNAs in Cultured Cortical Neurons*. Mol Neurobiol, 2019. **56**(4): p. 2703-2713.
80. Glaesel, K., et al., *miR-129-5p and miR-130a-3p Regulate VEGFR-2 Expression in Sensory and Motor Neurons during Development*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(11).
81. Greenberg, D.A. and K. Jin, *Vascular endothelial growth factors (VEGFs) and stroke*. Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(10): p. 1753-61.
82. Cardenas-Rivera, A., et al., *Early Post-stroke Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Hinders the Receptor 1-Dependent Neuroprotection Afforded by the Endogenous Ligand*. Front Cell Neurosci, 2019. **13**: p. 270.
83. Hu, H.J. and M. Song, *Disrupted Ionic Homeostasis in Ischemic Stroke and New Therapeutic Targets*. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2017. **26**(12): p. 2706-2719.
84. Cramer, S.C. and M. Chopp, *Recovery recapitulates ontogeny*. Trends Neurosci, 2000. **23**(6): p. 265-71.
85. Zhang, Z.G. and M. Chopp, *Neurorestorative therapies for stroke: underlying mechanisms and translation to the clinic*. Lancet Neurol, 2009. **8**(5): p. 491-500.
86. Carmichael, S.T., *Cellular and molecular mechanisms of neural repair after stroke: making waves*. Ann Neurol, 2006. **59**(5): p. 735-42.
87. Egawa, N., et al., *Mechanisms of Axonal Damage and Repair after Central Nervous System Injury*. Transl Stroke Res, 2017. **8**(1): p. 14-21.

88. Ueno, Y., et al., *Axonal outgrowth and dendritic plasticity in the cortical peri-infarct area after experimental stroke*. *Stroke*, 2012. **43**(8): p. 2221-8.
89. Chaudhry, N. and M.T. Filbin, *Myelin-associated inhibitory signaling and strategies to overcome inhibition*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007. **27**(6): p. 1096-107.
90. Fitch, M.T. and J. Silver, *CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure*. *Exp Neurol*, 2008. **209**(2): p. 294-301.
91. Singh, P., et al., *Levels of phosphorylated axonal neurofilament subunit H (pNfH) are increased in acute ischemic stroke*. *J Neurol Sci*, 2011. **304**(1-2): p. 117-21.
92. Hu, X., et al., *Microglial and macrophage polarization-new prospects for brain repair*. *Nat Rev Neurol*, 2015. **11**(1): p. 56-64.
93. Hinman, J.D., *The back and forth of axonal injury and repair after stroke*. *Curr Opin Neurol*, 2014. **27**(6): p. 615-23.
94. Deng, B., et al., *TAT-PEP Enhanced Neurobehavioral Functional Recovery by Facilitating Axonal Regeneration and Corticospinal Tract Projection After Stroke*. *Mol Neurobiol*, 2018. **55**(1): p. 652-667.
95. O'Donovan, K.J., *Intrinsic Axonal Growth and the Drive for Regeneration*. *Front Neurosci*, 2016. **10**: p. 486.
96. Yong, H.Y.F., et al., *The benefits of neuroinflammation for the repair of the injured central nervous system*. *Cell Mol Immunol*, 2019. **16**(6): p. 540-546.
97. Sinke, M.R., et al., *Modified structural network backbone in the contralesional hemisphere chronically after stroke in rat brain*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2017: p. 271678X17713901.
98. Hur, E.M., Saijilafu, and F.Q. Zhou, *Growing the growth cone: remodeling the cytoskeleton to promote axon regeneration*. *Trends Neurosci*, 2012. **35**(3): p. 164-74.
99. Bradke, F., J.W. Fawcett, and M.E. Spira, *Assembly of a new growth cone after axotomy: the precursor to axon regeneration*. *Nat Rev Neurosci*, 2012. **13**(3): p. 183-93.
100. Nishimura, T., et al., *CRMP-2 regulates polarized Numb-mediated endocytosis for axon growth*. *Nat Cell Biol*, 2003. **5**(9): p. 819-26.
101. Blizzard, C.A., et al., *Axonal shearing in mature cortical neurons induces attempted regeneration and the reestablishment of neurite polarity*. *Brain Res*, 2009. **1300**: p. 24-36.
102. Schaefer, A.W., N. Kabir, and P. Forscher, *Filopodia and actin arcs guide the assembly and transport of two populations of microtubules with unique dynamic parameters in neuronal growth cones*. *J Cell Biol*, 2002. **158**(1): p. 139-52.
103. Lowery, L.A. and D. Van Vactor, *The trip of the tip: understanding the growth cone machinery*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. **10**(5): p. 332-43.

104. Avwenagha, O., G. Campbell, and M.M. Bird, *Distribution of GAP-43, beta-III tubulin and F-actin in developing and regenerating axons and their growth cones in vitro, following neurotrophin treatment*. J Neurocytol, 2003. **32**(9): p. 1077-89.
105. Rao, A.N. and P.W. Baas, *Polarity Sorting of Microtubules in the Axon*. Trends Neurosci, 2018. **41**(2): p. 77-88.
106. Gleichman, A.J. and S.T. Carmichael, *Astrocytic therapies for neuronal repair in stroke*. Neurosci Lett, 2014. **565**: p. 47-52.
107. Lai, C.P. and X.O. Breakefield, *Role of exosomes/microvesicles in the nervous system and use in emerging therapies*. Front Physiol, 2012. **3**: p. 228.
108. Raposo, G. and W. Stoorvogel, *Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends*. J Cell Biol, 2013. **200**(4): p. 373-83.
109. Skotland, T., et al., *Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology*. J Lipid Res, 2019. **60**(1): p. 9-18.
110. Thery, C., M. Ostrowski, and E. Segura, *Membrane vesicles as conveyors of immune responses*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(8): p. 581-93.
111. Chaput, N., et al., *Dendritic cell derived-exosomes: biology and clinical implementations*. J Leukoc Biol, 2006. **80**(3): p. 471-8.
112. Mathivanan, S. and R.J. Simpson, *ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA*. Proteomics, 2009. **9**(21): p. 4997-5000.
113. Mathivanan, S., et al., *Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature*. Mol Cell Proteomics, 2010. **9**(2): p. 197-208.
114. Colombo, M., G. Raposo, and C. Thery, *Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2014. **30**: p. 255-89.
115. Kowal, J., M. Tkach, and C. Thery, *Biogenesis and secretion of exosomes*. Curr Opin Cell Biol, 2014. **29**: p. 116-25.
116. Hessvik, N.P. and A. Llorente, *Current knowledge on exosome biogenesis and release*. Cell Mol Life Sci, 2018. **75**(2): p. 193-208.
117. Trajkovic, K., et al., *Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes*. Science, 2008. **319**(5867): p. 1244-7.
118. Fevrier, B., et al., *Cells release prions in association with exosomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(26): p. 9683-8.
119. Potoicchio, I., et al., *Proteomic analysis of microglia-derived exosomes: metabolic role of the aminopeptidase CD13 in neuropeptide catabolism*. J Immunol, 2005. **175**(4): p. 2237-43.

120. Faure, J., et al., *Exosomes are released by cultured cortical neurones*. Mol Cell Neurosci, 2006. **31**(4): p. 642-8.
121. Graner, M.W., et al., *Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes*. FASEB J, 2009. **23**(5): p. 1541-57.
122. Mathivanan, S., H. Ji, and R.J. Simpson, *Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication*. J Proteomics, 2010. **73**(10): p. 1907-20.
123. Dickens, A.M., et al., *Astrocyte-shed extracellular vesicles regulate the peripheral leukocyte response to inflammatory brain lesions*. Sci Signal, 2017. **10**(473).
124. Paschon, V., et al., *Interplay Between Exosomes, microRNAs and Toll-Like Receptors in Brain Disorders*. Mol Neurobiol, 2016. **53**(3): p. 2016-2028.
125. Zhang, Y., et al., *Exosomes Derived from Mesenchymal Stromal Cells Promote Axonal Growth of Cortical Neurons*. Mol Neurobiol, 2017. **54**(4): p. 2659-2673.
126. Lopez-Verrilli, M.A., F. Picou, and F.A. Court, *Schwann cell-derived exosomes enhance axonal regeneration in the peripheral nervous system*. Glia, 2013. **61**(11): p. 1795-806.
127. Otero-Ortega, L., et al., *Exosomes promote restoration after an experimental animal model of intracerebral hemorrhage*. J Cereb Blood Flow Metab, 2018. **38**(5): p. 767-779.
128. Azizi, F., et al., *Potential role of exosome in post-stroke reorganization and/or neurodegeneration*. EXCLI J, 2020. **19**: p. 1590-1606.
129. Karve, I.P., J.M. Taylor, and P.J. Crack, *The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury*. Br J Pharmacol, 2016. **173**(4): p. 692-702.
130. Williamson, M.R., et al., *Reactive astrocytes facilitate vascular repair and remodeling after stroke*. Cell Rep, 2021. **35**(4): p. 109048.
131. Yang, M. and D.B. Teplow, *Amyloid beta-protein monomer folding: free-energy surfaces reveal alloform-specific differences*. J Mol Biol, 2008. **384**(2): p. 450-64.
132. Song, H., C.F. Stevens, and F.H. Gage, *Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells*. Nature, 2002. **417**(6884): p. 39-44.
133. Bernabeu-Zornoza, A., et al., *Effects of Amyloid-beta Peptide on the Biology of Human Neural Stem Cells*. Methods Mol Biol, 2018. **1779**: p. 381-398.
134. Haines, J.D., et al., *p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Regulates Genes during Proliferation and Differentiation in Oligodendrocytes*. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0145843.
135. Ruan, J., et al., *Extracellular vesicles in neuroinflammation: Pathogenesis, diagnosis, and therapy*. Mol Ther, 2021. **29**(6): p. 1946-1957.

136. Xin, H., et al., *Secondary Release of Exosomes From Astrocytes Contributes to the Increase in Neural Plasticity and Improvement of Functional Recovery After Stroke in Rats Treated With Exosomes Harvested From MicroRNA 133b-Overexpressing Multipotent Mesenchymal Stromal Cells*. *Cell Transplant*, 2017. **26**(2): p. 243-257.
137. Tkach, M. and C. Thery, *Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go*. *Cell*, 2016. **164**(6): p. 1226-1232.
138. Pegtel, D.M., et al., *Functional delivery of viral miRNAs via exosomes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(14): p. 6328-33.
139. Haraszti, R.A., et al., *High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources*. *J Extracell Vesicles*, 2016. **5**: p. 32570.
140. Villarroya-Beltri, C., et al., *ISGylation controls exosome secretion by promoting lysosomal degradation of MVB proteins*. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 13588.
141. van Niel, G., G. D'Angelo, and G. Raposo, *Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018. **19**(4): p. 213-228.
142. Beretta, S., et al., *Optimized system for cerebral perfusion monitoring in the rat stroke model of intraluminal middle cerebral artery occlusion*. *J Vis Exp*, 2013(72).
143. Yeh, F.C., et al., *Deterministic diffusion fiber tracking improved by quantitative anisotropy*. *PLoS One*, 2013. **8**(11): p. e80713.
144. Tanaka, K., [*Basic principles of magnetic resonance imaging*]. *Rinsho Byori*, 2000. **48**(7): p. 614-20.
145. Hagmann, P., et al., *Understanding diffusion MR imaging techniques: from scalar diffusion-weighted imaging to diffusion tensor imaging and beyond*. *Radiographics*, 2006. **26 Suppl 1**: p. S205-23.
146. Bammer, R., *Basic principles of diffusion-weighted imaging*. *Eur J Radiol*, 2003. **45**(3): p. 169-84.
147. Burguete, M.C., et al., *Dietary phytoestrogens improve stroke outcome after transient focal cerebral ischemia in rats*. *Eur J Neurosci*, 2006. **23**(3): p. 703-10.
148. Zhang, H., et al., *Rat model of focal cerebral ischemia in the dominant hemisphere*. *Int J Clin Exp Med*, 2015. **8**(1): p. 504-11.
149. Franklin, K.B.J. and G. Paxinos, *Paxinos and Franklin's The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Fourth edition. ed. 2013, Amsterdam: Academic Press, an imprint of Elsevier. 1 volume (unpaged).
150. Rivera-Olvera, A., L.F. Rodriguez-Duran, and M.L. Escobar, *Conditioned taste aversion prevents the long-lasting BDNF-induced enhancement of synaptic transmission in the insular cortex: A metaplastic effect*. *Neurobiol Learn Mem*, 2016. **130**: p. 71-6.

151. Llinas, R.R. and M. Steriade, *Bursting of thalamic neurons and states of vigilance*. J Neurophysiol, 2006. **95**(6): p. 3297-308.
152. Colley, B.S., L.L. Phillips, and T.M. Reeves, *The effects of cyclosporin-A on axonal conduction deficits following traumatic brain injury in adult rats*. Exp Neurol, 2010. **224**(1): p. 241-51.
153. Mu, H.F., et al., *Distinctive functional deficiencies in axonal conduction associated with two forms of cerebral white matter injury*. CNS Neurosci Ther, 2019. **25**(9): p. 1018-1029.
154. Li, L., et al., *A Novel Approach for Studying the Physiology and Pathophysiology of Myelinated and Non-Myelinated Axons in the CNS White Matter*. PLoS One, 2016. **11**(11): p. e0165637.
155. Rumajogee, P., et al., *Exogenous Neural Precursor Cell Transplantation Results in Structural and Functional Recovery in a Hypoxic-Ischemic Hemiplegic Mouse Model*. eNeuro, 2018. **5**(5).
156. Scott, A., et al., *Astrocyte-derived vascular endothelial growth factor stabilizes vessels in the developing retinal vasculature*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11863.
157. O'Sullivan, M.L., et al., *Astrocytes follow ganglion cell axons to establish an angiogenic template during retinal development*. Glia, 2017. **65**(10): p. 1697-1716.
158. Argaw, A.T., et al., *Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease*. J Clin Invest, 2012. **122**(7): p. 2454-68.
159. Liddelow, S.A. and M.V. Sofroniew, *Astrocytes usurp neurons as a disease focus*. Nat Neurosci, 2019. **22**(4): p. 512-513.
160. Iadecola, C., *The pathobiology of vascular dementia*. Neuron, 2013. **80**(4): p. 844-66.
161. Gurunathan, S., et al., *Biogenesis, Membrane Trafficking, Functions, and Next Generation Nanotherapeutics Medicine of Extracellular Vesicles*. Int J Nanomedicine, 2021. **16**: p. 3357-3383.
162. Ali, M., et al., *Extracellular vesicles for treatment of solid organ ischemia-reperfusion injury*. Am J Transplant, 2020. **20**(12): p. 3294-3307.
163. Bang, O.Y. and E.H. Kim, *Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicle Therapy for Stroke: Challenges and Progress*. Front Neurol, 2019. **10**: p. 211.
164. Godlewski, J., J. Lenart, and E. Salinska, *MicroRNA in Brain pathology: Neurodegeneration the Other Side of the Brain Cancer*. Noncoding RNA, 2019. **5**(1).
165. Muhl-Benninghaus, R., et al., *[Influence of the "distance to thrombus" in acute middle cerebral artery occlusion : A predictor for the clinical outcome after endovascular treatment]*. Radiologe, 2020. **60**(12): p. 1172-1176.

166. Medrano-Martorell, S., et al., *A review of the anatomy of the middle cerebral artery for the era of thrombectomy: a radiologic tool based on CT angiography and perfusion CT*. Radiologia, 2021.
167. Sommer, C.J., *Ischemic stroke: experimental models and reality*. Acta Neuropathol, 2017. **133**(2): p. 245-261.
168. Hur, J.C., R. Blaise, and I. Limon, *Protocol for Isolating the Mouse Circle of Willis*. J Vis Exp, 2016(116).
169. Canazza, A., et al., *Experimental models of brain ischemia: a review of techniques, magnetic resonance imaging, and investigational cell-based therapies*. Front Neurol, 2014. **5**: p. 19.
170. Fox, G., et al., *Anatomic variation of the middle cerebral artery in the Sprague-Dawley rat*. Stroke, 1993. **24**(12): p. 2087-92; discussion 2092-3.
171. Walberer, M., et al., *Experimental stroke: ischaemic lesion volume and oedema formation differ among rat strains (a comparison between Wistar and Sprague-Dawley rats using MRI)*. Lab Anim, 2006. **40**(1): p. 1-8.
172. Kim, S.K., K.O. Cho, and S.Y. Kim, *The plasticity of posterior communicating artery influences on the outcome of white matter injury induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats*. Neurol Res, 2009. **31**(3): p. 245-50.
173. Murphy, S.J., L.D. McCullough, and J.M. Smith, *Stroke in the female: role of biological sex and estrogen*. ILAR J, 2004. **45**(2): p. 147-59.
174. Hurn, P.D. and L.M. Brass, *Estrogen and stroke: a balanced analysis*. Stroke, 2003. **34**(2): p. 338-41.
175. Yankova, G., et al., *Cerebral arterial architectonics and CFD simulation in mice with type 1 diabetes mellitus of different duration*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 3969.
176. Manolagas, S.C. and H.M. Kronenberg, *Reproducibility of results in preclinical studies: a perspective from the bone field*. J Bone Miner Res, 2014. **29**(10): p. 2131-40.
177. Zaidi, S.F., et al., *Final infarct volume is a stronger predictor of outcome than recanalization in patients with proximal middle cerebral artery occlusion treated with endovascular therapy*. Stroke, 2012. **43**(12): p. 3238-44.
178. Lyden, P., *Using the National Institutes of Health Stroke Scale: A Cautionary Tale*. Stroke, 2017. **48**(2): p. 513-519.
179. Gaudinski, M.R., et al., *Establishing final infarct volume: stroke lesion evolution past 30 days is insignificant*. Stroke, 2008. **39**(10): p. 2765-8.
180. Choudhri, A.F., et al., *Diffusion tensor imaging of cerebral white matter: technique, anatomy, and pathologic patterns*. Radiol Clin North Am, 2014. **52**(2): p. 413-25.

181. Oida, T., S. Nagahara, and T. Kobayashi, *Acquisition parameters for diffusion tensor imaging to emphasize fractional anisotropy: phantom study*. Magn Reson Med Sci, 2011. **10**(2): p. 121-8.
182. Rossi-Pool, R., et al., *A continuum of invariant sensory and behavioral-context perceptual coding in secondary somatosensory cortex*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 2000.
183. Bauer, A.Q., et al., *Optical imaging of disrupted functional connectivity following ischemic stroke in mice*. Neuroimage, 2014. **99**: p. 388-401.
184. Westin, C.F., et al., *Processing and visualization for diffusion tensor MRI*. Med Image Anal, 2002. **6**(2): p. 93-108.
185. Ranzenberger, L.R. and T. Snyder, *Diffusion Tensor Imaging*, in StatPearls. 2021: Treasure Island (FL).
186. Pinter, D., et al., *Early Progressive Changes in White Matter Integrity Are Associated with Stroke Recovery*. Transl Stroke Res, 2020. **11**(6): p. 1264-1272.
187. Sinke, M.R., et al., *Modified structural network backbone in the contralesional hemisphere chronically after stroke in rat brain*. J Cereb Blood Flow Metab, 2018. **38**(9): p. 1642-1653.
188. Basser, P.J., et al., *In vivo fiber tractography using DT-MRI data*. Magn Reson Med, 2000. **44**(4): p. 625-32.
189. Mukherjee, P., *Diffusion tensor imaging and fiber tractography in acute stroke*. Neuroimaging Clin N Am, 2005. **15**(3): p. 655-65, xii.
190. Gharbawie, O.A., J.M. Karl, and I.Q. Whishaw, *Recovery of skilled reaching following motor cortex stroke: do residual corticofugal fibers mediate compensatory recovery?* Eur J Neurosci, 2007. **26**(11): p. 3309-27.
191. Da Silva, J.S., et al., *RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin Ila-mediated control of actin stability*. J Cell Biol, 2003. **162**(7): p. 1267-79.
192. Robinson, R.A., et al., *Simultaneous binding of Guidance Cues NET1 and RGM blocks extracellular NEO1 signaling*. Cell, 2021. **184**(8): p. 2103-2120 e31.
193. Hira, K., et al., *Astrocyte-Derived Exosomes Treated With a Semaphorin 3A Inhibitor Enhance Stroke Recovery via Prostaglandin D2 Synthase*. Stroke, 2018. **49**(10): p. 2483-2494.

9. Anexos

Please cite this article in press as: Heras-Romero et al., Improved post-stroke spontaneous recovery by astrocytic extracellular vesicles, *Molecular Therapy* (2021), <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.09.023>

Molecular Therapy

Original Article



Improved post-stroke spontaneous recovery by astrocytic extracellular vesicles

Yessica Heras-Romero,¹ Axayacatl Morales-Guadarrama,^{2,3} Ricardo Santana-Martínez,¹ Isaac Ponce,¹ Ruth Rincón-Heredia,⁴ Augusto César Poot-Hernández,⁵ Araceli Martínez-Moreno,⁶ Esteban Urrieta,⁶ Berenice N. Bernal-Vicente,¹ Aura N. Campero-Romero,¹ Perla Moreno-Castilla,⁷ Nigel H. Greig,⁸ Martha L. Escobar,⁶ Luis Concha,⁹ and Luis B. Tovar-y-Romo¹

¹Department of Molecular Neuropathology, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico; ²Departamento de Ingeniería Eléctrica, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Mexico City, Mexico; ³National Center for Medical Imaging and Instrumentation Research, Mexico City, Mexico; ⁴Microscopy Core Unit, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico; ⁵Bioinformatics Core Unit, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico; ⁶Division de Investigación y Estudios de Posgrado, Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico; ⁷Laboratory of Neurocognitive Aging, National Institute on Aging, National Institutes of Health, Baltimore, MD, USA; ⁸Drug Design & Development Section, National Institute on Aging, National Institutes of Health, Baltimore, MD, USA; ⁹Department of Behavioral and Cognitive Neurobiology, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Juriquilla, Querétaro, Mexico

Spontaneous recovery after a stroke accounts for a significant part of the neurological recovery in patients. However limited, the spontaneous recovery is mechanistically driven by axonal restorative processes for which several molecular cues have been previously described. We report the acceleration of spontaneous recovery in a preclinical model of ischemia/reperfusion in rats via a single intracerebroventricular administration of extracellular vesicles released from primary cortical astrocytes. We used magnetic resonance imaging and confocal and multiphoton microscopy to correlate the structural remodeling of the corpus callosum and striatocortical circuits with neurological performance during 21 days. We also evaluated the functionality of the corpus callosum by repetitive recordings of compound action potentials to show that the recovery facilitated by astrocytic extracellular vesicles was both anatomical and functional. Our data provide compelling evidence that astrocytes can hasten the basal recovery that naturally occurs post-stroke through the release of cellular mediators contained in extracellular vesicles.

INTRODUCTION

The epidemiology of stroke has dynamically changed over recent decades. A constant improvement in clinical care and increased preventive measures, acute treatment, and timely neurorehabilitation have reduced the fatality rate and transformed stroke into a prevailing cause of chronically disabling disease across the developed world¹ and several developing nations, particularly in Latin America.^{2,3} Acute ischemic stroke impacts cognition, sensation, vision, language, and motor performance, with prominent signs of hemianopsia (loss of sight in half of the visual field), diplopia (double vision of the same object), speech deficits, paresis (muscular weakness), paresthesia (abnormal sensations of the skin), and other motor and sensory deficits.⁴

Despite impactful neurological impairment, most patients regain some of their lost neurological functions without intervention via a phenomenon of spontaneous recovery, which is determined exclusively by the passage of time.⁵ Such spontaneous recovery occurs rapidly, at the level of impairment, and is driven by plasticity mechanisms initiated by the stroke.⁶ Functional motor gains related to spontaneous recovery are considered to be due to increased connectivity of motor network areas that were initially disjointed by the ischemic attack.⁷ However, the extent of recovery varies among patients, and the level of neurological regain is considered to be proportional to the initial deficit.⁸ Rehabilitation during a narrow time window can enhance functional recovery, primarily through compensation. However, most clinical trials have failed to show differences in outcome endpoints between experimental and control interventions.⁹

Studies in animal models have attempted to elucidate a time-limited period of heightened plasticity after focal brain injury and the mechanisms behind spontaneous recovery.^{6,10} Cumulative data indicate that axonal repair, neurogenesis, and inflammation resolution mechanistically intervene in this recovery.^{11,12} Particularly, axonal remodeling is a principal mechanism in which surviving neurons in the peri-infarct cortex establish new connections within the motor, somatosensory, and premotor areas within the ipsilesional hemisphere, with some reaching contralesional sites,^{13,14} while others even innervate the frontal motor regions to the brainstem or spinal cord.¹⁵ However, these new projections alter the topography of cortical

Received 13 May 2021; accepted 20 September 2021;
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.09.023>

Correspondence: Luis B. Tovar-y-Romo, PhD, Department of Molecular Neuropathology, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico City, Mexico.
E-mail: ltovar@fc.unam.mx

projections in the somatosensory system and change the aggregate map of projections.^{16,17}

Astrocytes and astrocytic gliosis are known to impede the recovery of injured tissue by blocking axonal sprouting through the production of structural astrocytic proteins such as glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin,¹⁸ as well as neurite-inhibiting signaling molecules such as Nogo-A¹⁹. Nonetheless, astrocytes have multiple essential support functions whose loss can precipitate or contribute to neurodegeneration.²⁰ Astrocytes are more resilient against ischemia than neurons;^{21,22} therefore, astrocyte survival holds the potential to restore neuronal integrity and promote a functional improvement, especially in the ischemic penumbra.²³

In this study, we evaluated in a preclinical stroke model caused by the transient occlusion of the middle cerebral artery (MCAO) in rats whether astrocytes might influence spontaneous recovery through signaling mechanisms mediated by the release of extracellular vesicles (EVs), which are known to contribute to the modulation of CNS physiology and pathology.²⁴

RESULTS

EV release from astrocytes after hypoxia

We isolated EVs released from primary astrocytes cultured under normoxic conditions to characterize their effects on stroke evolution. We also subjected astrocytes to a hypoxic challenge to assess whether EVs would retain their molecular activities in response to ischemia (Figure 1A). The 6-h hypoxic stimulus produces an ~30% reduction of cell viability (Figures 1B and 1C; Figure S1).

We ran a physical and molecular characterization of the EVs released from cultured primary cortical astrocytes obtained from P2 newborn rats. The isolation method used in this study, which involves differential centrifugation, produces a homogeneous EV population with a size consistent with exosomes, as analyzed by transmission electron microscopy (Figure 1C) and nanoparticle tracking analysis (Figures 1E and 1F). The isolated EVs also expressed the canonical exosomal marker CD63 (Figure 1D). When we subjected the astrocytic cultures to hypoxia for 6 h, the number of exosomes collected in 48 h-conditioned media was significantly lower than in the normoxic conditions (Figures 1E and 1F), so that a physiological outcome to ischemic stress would be reducing the release of EVs.

Administration of astrocyte-derived EVs in the rat brain

In a pilot experiment, using a pulled glass microcapillary pipette, we administered stereotaxic injections of EVs collected from astrocyte-conditioned media resuspended in 0.1 mM PBS into the lateral ventricle of the rat brain. We evaluated EV boluses with total protein concentrations of 200 and 400 ng determined by a bicinchoninic acid protein assay in a volume of 4 μ L. The higher concentration (400 ng) yielded a larger difference in infarct volume respective to vehicle-injected controls and was therefore used for the rest of the study. On average, we injected approximately 8.5×10^7 vesicles in each administration. Subsequently, we explored the distribution of EVs

in the rat brain. We noted that exogenous EVs reached the striatum (Figure 1G) and motor cortex (Figure 1H) within 2 h (Figure S2) and remained identifiable 24 h post-injection. Furthermore, we found that EVs became internalized in neurons and astrocytes (Figure 1I; Figure S2; Video S1) and were preferentially localized in the perinuclear region. Using these experimental parameters, we studied the effects of EVs produced by astrocytes cultured under normoxic conditions for 48 h (NxEV) and those released by astrocytes during the same period after culturing under hypoxic conditions for 6 h (HxEV) to determine whether hypoxia modifies the neuroprotective potential of astrocyte EVs.

Spontaneous recovery in the preclinical model of stroke

We began by determining the temporal evolution of infarct assessed with magnetic resonance imaging (MRI). Figure 2B shows coronal slices from a T2-weighted MRI sequence of stroke-challenged animals at 24 h with NxEV or HxEV administration compared to control animals injected with vehicle alone. Evident at 24 h, there was a significant reduction in the average infarct volume in animals that received either type of EVs compared to the control group ($p = 0.0157$ for NxEV and $p = 0.0163$ for HxEV by two-way ANOVA with Tukey's post hoc test, Figures 2B and 2D). At this time, there was no difference between NxEV and HxEV ($p = 0.9997$), but a difference became apparent over time. Specifically, by day 21 after stroke, p values were 0.0144 for NxEV and <0.0001 for HxEV compared to the control and 0.002 between NxEV and HxEV (Figures 2C and 2D), demonstrating that a single injection of EVs at the beginning of the reperfusion phase contributed to the gradual reduction of the infarct volume. These observations correlated with the natural occurrence of spontaneous recovery in the rat after MCAO. We assessed the neurological performance of subjects on a series of tests that assess the integrity of sensory, motor, and sensorimotor circuits (Table 1). Control stroke-challenged rats that received vehicle alone demonstrated a significant recovery ($p = 0.0374$, $t = 3.576$, degrees of freedom [df] = 3 in paired t test) during 21 days in the neurological parameters examined, as compared to the values obtained by each rat at 24 h after stroke (Figures 2E and 2F; Figure S3). Neurological recovery was enhanced in the groups that received EVs (NxEV, $p = 0.0046$, $t = 7.667$, $df = 3$; HxEV, $p = 0.0032$, $t = 8.66$, $df = 3$; Figures 2E and 2F; Figure S3). Video S2 shows an improved response to the stimulation of the vibrissae in a rat that received HxEV 14 days post-stroke.

Hastened recovery of structural alterations by the administration of astrocyte-derived EVs

Using MRI, we studied the impact of EVs from cultured astrocytes on the evolution of the brain's physical recovery from stroke in a longitudinal study. We measured mean diffusivity (MD), which is a quantitative measure that reflects cellular and membrane density, wherein an increase of mean diffusivity results from edema and necrosis. The basal values of mean diffusivity ranged around 6×10^{-4} mm^2/ms in the corpus callosum, 3×10^{-4} mm^2/ms in the striatum, and 4×10^{-4} mm^2/ms in the cortex. The values almost doubled in stroke-challenged rats at 24 h after the infarction,

Please cite this article in press as: Heras-Romero et al., Improved post-stroke spontaneous recovery by astrocytic extracellular vesicles, Molecular Therapy (2021), <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.09.023>

www.moleculartherapy.org

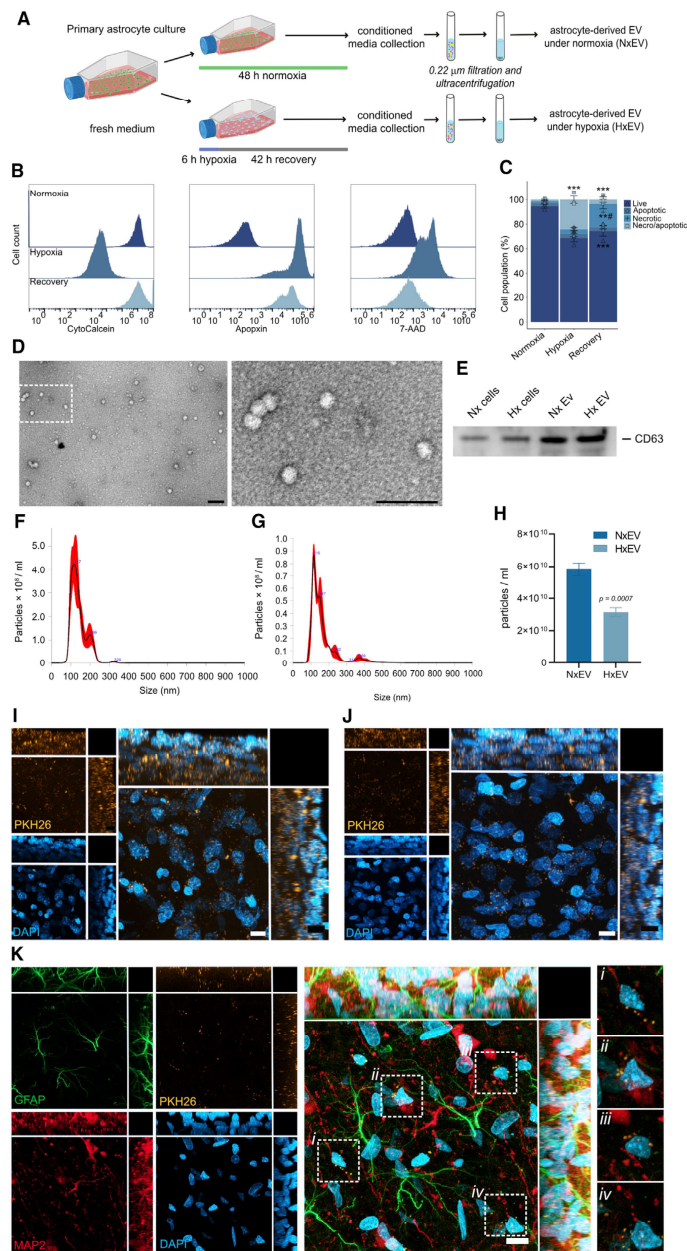
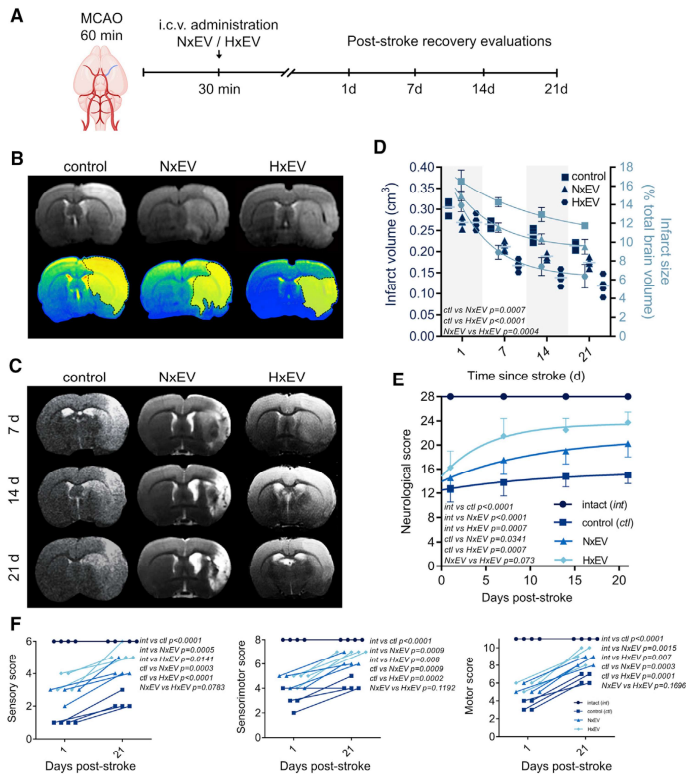


Figure 1. Characterization of exosomes produced by astrocytes

(A) Experimental design for collection of EVs. (B) Distribution of fluorescence intensity of markers for live (CytoCalcein), apoptotic (Apoptin), and necrotic (7-AAD) cells under normoxia, hypoxia, and recovery. (C) Distribution of live and dead (apoptotic, necrotic, and necrotic/apoptotic) cells under each experimental condition. Graph shows the mean \pm SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$ versus hypoxia; ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$ versus normoxia. (D) Transmission electron microscopy micrographs of EVs isolated from astrocyte cultures for 24 h. Vesicles were visualized by negative staining with uranyl formate on copper/carbon-coated grids; scale bars, 100 nm. (E) Immunoblot showing the exosome canonical marker CD63 in protein lysates from EVs and astrocytes cultured under normoxia (Nx) and exposed to 6 h hypoxia and 42 h of recovery (Hx). (F and G) Size distribution of particles in suspensions by nanoparticle tracking analysis of EVs isolated under normoxia for 48 h (F) and after a 6-h hypoxic stimulus and 42-h recovery (G). (H) Graph shows the difference in the number of EVs released from astrocytes subjected to hypoxia (HxEV) and controls (NxEV) for 48 h. Data represent the mean \pm standard deviation of three independent measurements. (I and J) Distribution of EVs stained with PKH26 (orange) injected i.c.v. into the brain of rats within the striatum (I) and motor cortex (J). (K) EVs internalized in neurons (MAP2; red) and astrocytes (GFAP; green) and preferentially localized to perinuclear (DAPI; blue) regions. Dotted squares demark regions where EVs localize; images on the left are magnifications of those regions. Images in (I), (J), and (K) are maximum projections of a z stack of 20 optical slices showing the orthogonal planes, and nuclei are stained with DAPI (blue); scale bars, 10 μ m.

Please cite this article in press as: Heras-Romero et al., Improved post-stroke spontaneous recovery by astrocytic extracellular vesicles, Molecular Therapy (2021), <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.09.023>



values; the overall recovery trend of the HxEV group was significantly different from that of the control group ($p = 0.0001$ for striatum and $p < 0.0001$ for cortex), while the group with NxEV showed only significant differences in the cortex ($p = 0.4259$ for striatum and $p < 0.0001$ for cortex).

irrespective of treatment (Figure 3A), across all brain structures analyzed. Notably, these values declined gradually and were decisively lower at 7 days post-stroke in the animals that received EVs. This was particularly evident in the group that received HxEV, which showed baseline mean diffusivity values by day 21. The corpus callosum and striatum exhibited the most robust recovery rates in this parameter, coincidentally with structures with a lower cellular density than in the cortex.

As noted above, the underlying processes of spontaneous recovery are firmly bound to axonal damage recovery. Axial diffusivity (AD) results from the structural integrity of axons, and a decrease of this value mirrors axonal damage. At 24 h post stroke, we found that all animals displayed a significant reduction in axial diffusivity that was more severe in the striatum > cortex > corpus callosum, which corresponds to the hierarchical structural damage produced by MCAO (Figure 3B). Values in this parameter indicate a time-dependent recovery across all of the groups. However, such recovery was more robust in HxEV, followed by the NxEV group. By day 21 post-stroke, the axial diffusivities of HxEV in the striatum and cortex reached the baseline

Radial diffusivity (RD) is another diffusion tensor imaging (DTI) parameter that evaluates axonal integrity, which is increased with demyelination and reduced axonal density. We found this value to be doubled in the corpus callosum, almost quadrupled in the striatum, and tripled in the cortex 24 h post-stroke (Figure 3C).

The last parameter we assessed with DTI is fractional anisotropy (FA), which is related to how freely water molecules move along axons and reflect their structural integrity. A reduction in FA levels indicates axonal damage. Due to the fibrous nature of the corpus callosum, the baseline values of FA in this structure are higher than those of the striatum and cortex. The FA baseline level in the corpus callosum (about 0.6) drastically dropped to a third in all experimental groups by 24 h post-stroke (Figure 3D). Notably, the administration of HxEV resulted in a substantial but slightly lesser effect than the untreated control group. Whereas FA in the control group slightly recovered by day 21 post-stroke, a very evident recovery occurred

Please cite this article in press as: Heras-Romero et al., Improved post-stroke spontaneous recovery by astrocytic extracellular vesicles, *Molecular Therapy* (2021), <https://doi.org/10.1016/j.jymthe.2021.09.023>

www.moleculartherapy.org

Table 1. Items evaluated in neurofunctional assessments

Neurological assessment	Reflex	Score
Spontaneous activity	exploring an open arena for more than 20 s	3
	exploring between 10 and 20 s	2
	exploring less than 10 s	1
Body proprioception (S)	not exploring or moving, only when stimulated	0
	symmetric response when poked on each side	3
	no response in the thoracic lesioned hemibody	2
	no response in the lesioned hemibody	1
Vibrissae stimulation (S)	no bilateral responses	0
	symmetric response	3
	attenuated response on the lesioned side	2
Cylinder test (SM)	no response on the lesioned side	1
	no response on any side	0
	standing with both forelimbs at even height	2
Protective retraction of forelimbs after poking (SM)	unable to support body weight on lesioned forelimb	1
	Unresponsive	0
	symmetrical flex and moving from the site	3
Body posture (SM)	asymmetrical flex of the ipsilateral forelimb but stays on-site	2
	slight movement of ipsilateral forelimb and stays on site	1
	does not flex forelimb and stays on site	0
March coordination (M)	Balanced	3
	head tilted to the right and forearm extended	2
	body tilted to the right	1
Contra-lesioned-wise circling (M)	unable to keep posture with lesioned hindlimb	0
	symmetrical movement	3
	support on the ulnar side of the lesioned forelimb	2
Prehensile grip of forepaws to a wire (M)	dragging fingers during the march	1
	does not stand on lesioned forelimb	0
	none	3
Ability to rise while suspended from the tail (M)	spontaneous circling	2
	stimulus-induced circling	1
	not moving	0
March coordination (M)	symmetrical grip	3
	asymmetrical, unable to hold body weight	2
	unable to hold the grip with lesioned forelimb	1
Contra-lesioned-wise circling (M)	falling from wire	0
	unskewed side to rise	2
	able to rise only until reaching the horizontal plane	1
Prehensile grip of forepaws to a wire (M)	unresponsive while suspended	0

Every subject's neurological performance was assessed at 1, 7, 14, and 21 days after stroke in 10 items, and for each one, a corresponding value was assigned. S, somatosensory evaluation; M, motor evaluation; SM, evaluation of the integration of somatosensory/motor coordination. Behavioral evaluations were cross-validated by a trained analyst blinded to the experimental conditions.

with the administration of either NxEV or HxEV. The latter, in particular, demonstrated a more considerable effect and a clear time-dependent trend toward recovery (Figure 3D). The more severely affected striatum exhibited an even more substantial FA decrease 24 h after infarction, and NxEV did not impact the overall recovery trend.

In contrast, HxEV did promote a significant improvement that evolved rapidly at 7 days post-stroke and exhibited almost normal values by day 14. Finally, in the cortex, with a more heterogeneous architecture than the corpus callosum and the striatum, the stroke-induced changes were of lesser magnitude by day 7. HxEV almost fully mitigated them at this early time point (Figure 3D), whereas NxEV did not affect the spontaneous recovery.

Stroke notably impacts the brain as a whole, and structural damage appears not to be restricted to the only sites where blood supply was impeded. Our MRI study shows that the brain hemisphere contralateral to the lesion had structural changes that resolved over time, and the administration of EVs hastened the recovery. EVs induced a full recovery of the mean diffusivity in the corpus callosum by day 21 (Figure S4A). The contralateral cortex and striatum showed subtler changes that were normalized by 14 days with HxEV and 21 days with NxEV (Figure S4A). Similarly, the axial diffusivities of the corpus callosum and contralateral cortex were fully recovered by day 21 with the administration of EVs (Figure S4B). In the striatum, the trend toward full recovery was more marked with HxEV. As in the ipsilateral side, the radial diffusivity was minimally affected by the stroke in the contralateral hemisphere, and the administration of HxEV provided full recovery as early as day 7 post-stroke for the striatum and cortex (Figure S4C). Finally, the FA of the contralateral structures showed a similar recovery pattern as that of the ipsilateral hemisphere, with the striatum and cortex showing full recovery with the aid of HxEV (Figure S4D).

We used vector scalar values from DTI to produce tensor tract reconstructions to provide a graphical visualization of the extent of the recovery of white matter bundles facilitated by EV administration (Figure S5 shows the regions of interest where seeds were placed for the tractography). Figure 3E shows DTI-derived tracts across the corpus callosum, and Figure 3F shows a portion of the corticostriatal tract impacted by MCAO. The tractography of intact brains shows a complete reconstruction of the tract segments (Video S3). In contrast, the number of fibers that could be reconstructed in the control group was significantly limited, and the shape of reconstructed tracts is highly disorganized and atrophied. In the reconstructions of NxEV and HxEV groups, the length of assembled tracts was longer than that of their respective controls, and the number of fibers was also significantly increased.

Structural correlations of anatomical fibers with MRI

We evaluated the integrity of brain neuronal structural fibers by immunolabeling microtubule-associated protein 2 (MAP2) and

Please cite this article in press as: Heras-Romero et al., Improved post-stroke spontaneous recovery by astrocytic extracellular vesicles, Molecular Therapy (2021), <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.09.023>

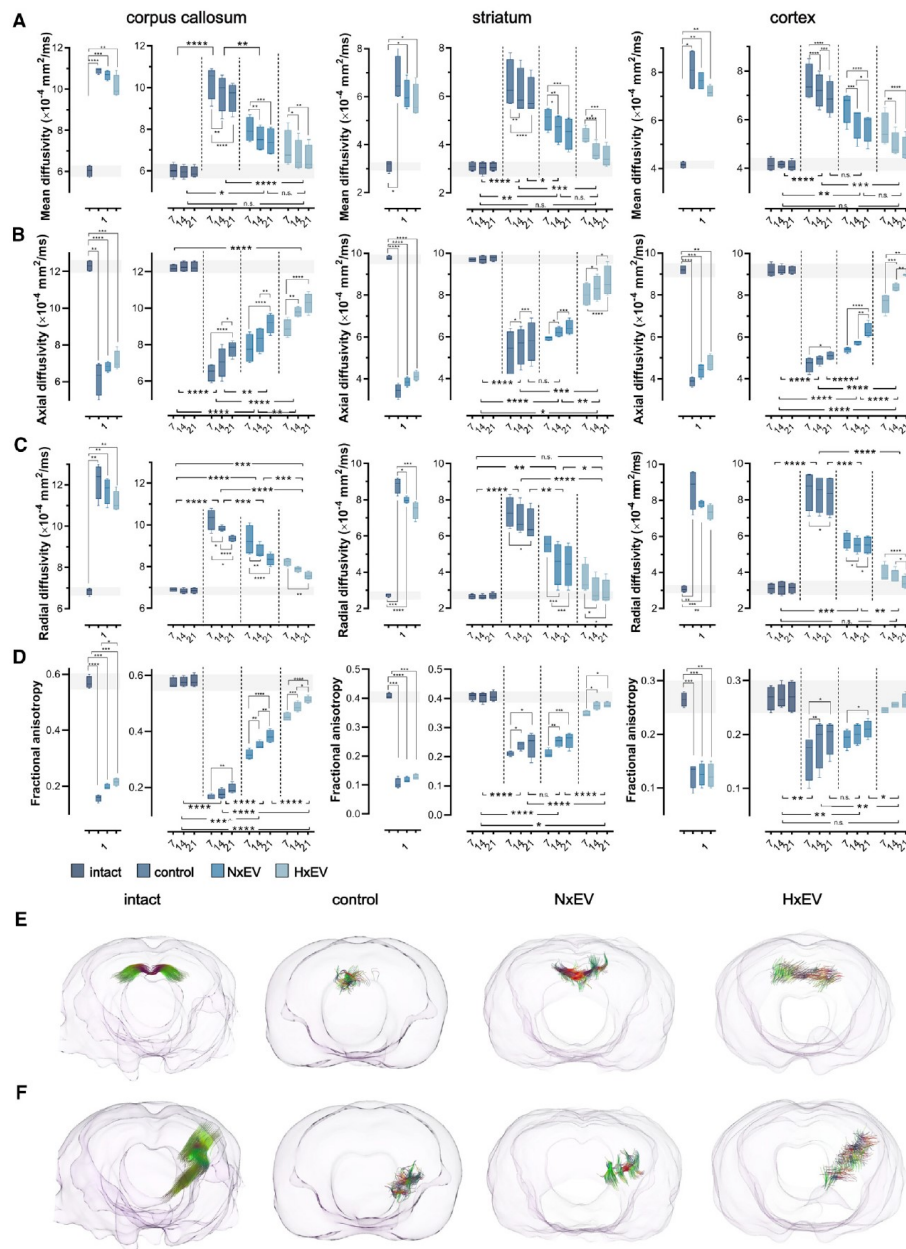


Figure 3. Administration of astrocyte-derived exosomes preserves the structural integrity of neuronal tracts

(A–D) Mean diffusivity (A), axial diffusivity (B), radial diffusivity (C), and fractional anisotropy (D) were determined from diffusion tensor imaging (DTI) of the ipsilateral corpus callosum (left column), striatum (middle column), and motor cortex (right column) at 1, 7, 14, and 21 days post-stroke. Boxplots on day 1 show the alterations caused by the (legend continued on next page)

Please cite this article in press as: Heras-Romero et al., Improved post-stroke spontaneous recovery by astrocytic extracellular vesicles, *Molecular Therapy* (2021), <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.09.023>

www.moleculartherapy.org

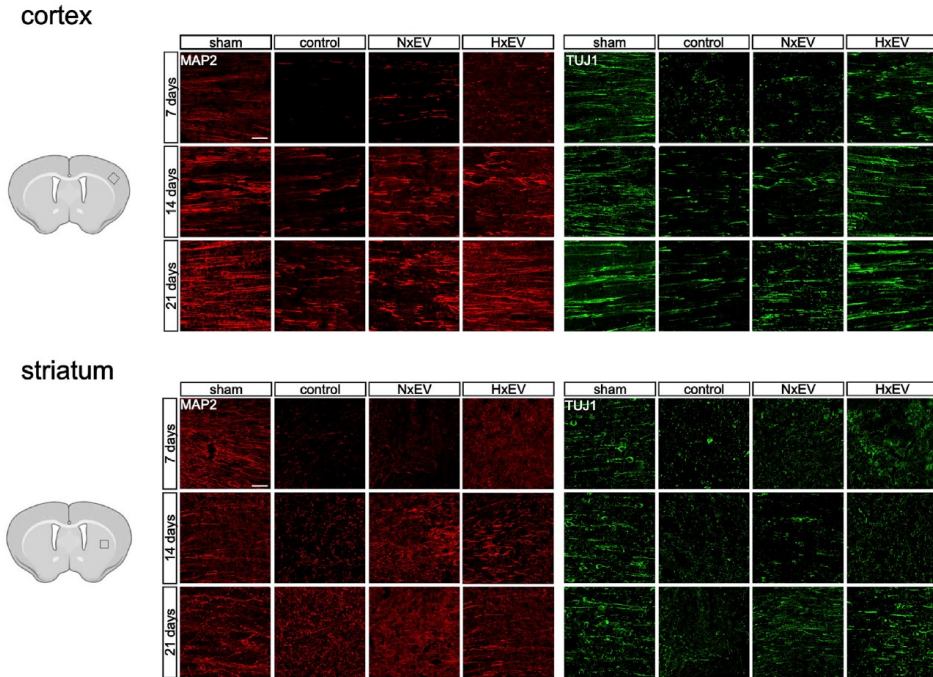


Figure 4. The administration of astrocyte-derived exosomes promotes the recovery of the neuronal processes' integrity affected by stroke

Representative micrographs of 40- μm -thick immunostained sections with MAP2 (red) and TUJ1 (green) of each experimental group. Images show the evolution of the recovery of the processes in the affected motor cortex and dorsal striatum at 7, 14, and 21 days post-stroke. Microphotographs are z stack confocal projections of 10–15 optical slices. Scale bars, 50 μm .

β III-tubulin (Tuj1). In control animals, there was a near total loss of dendritic staining with MAP2 and all neuronal processes with TUJ1 at 7 days post-stroke (Figure 4). A gradual time-dependent recovery from this loss occurred across all groups, but only to a decidedly limited extent under control conditions. This limit was surpassed with the aid of astrocyte EVs, especially in the cortex (Figure 4). Also illustrated in Figure 4, the recovery of dendritic arborizations was greatly disorganized in the striatum of the control group animals. EVs did not help shape a better organization of the fibers by day 21, as indicated by the directionality of the tracts (Figure S6). Overall, the appearance of the neuronal processes labeled with MAP2 and Tuj1 positively correlates with the MRI parameters described above, providing a histological grounding to the determinations made by indirect measurements of DTI.

Although the administration of EVs facilitated the recovery of the gross neuronal architectural conformation of the brain, we intended to discover whether this treatment also enabled the outgrowth of axons from the lesion core in the striatum toward the innervated cortical areas. Hence, at day 14 post-stroke we injected the cholera toxin subunit B (Figure S7), which is retrogradely transported by the axons, and the fluorescent dye Dil (1,1'-diiodoacetyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) (Figure 5), carried in an anterograde and retrograde fashion through the axonal transport system, and followed the localization of the fluorescent label in the innervated cortical regions at day 21 post-stroke.

Next, we determined how the innervation of the ipsilateral cortex from the dorsal striatum was modified by stroke, using two-photon

stroke in all four DTI parameters; no statistical differences exist between stroke-challenged animals treated with vehicle (control) and those that received EVs 30 min after the beginning of reperfusion. From day 7 onward, boxplots show the evolution of the recovery hastened by the administration of NxEV or HxEV. Boxplots show the minimum and maximum values within each group, the dispersion span from Q1 to Q3, and the mean; $n = 4$. The shaded horizontal bar in each plot marks the span of ± 1 SD of the intact group baseline values. Statistical differences of the recovery trend are indicated among groups with two-way repeated-measures ANOVA followed by Tukey's post hoc test, and changes over time within each group are also indicated with two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. (E and F) Fiber tractography produced from DTI of the corpus callosum (E) and a striatocortical tract of the ipsilesional hemisphere (F) of a representative rat of each experimental group 21 days after stroke. Colors in the tracts indicate the orientation of the fiber: transverse fibers (red), anteroposterior fibers (green), and craniocaudal fibers (blue).

Please cite this article in press as: Heras-Romero et al., Improved post-stroke spontaneous recovery by astrocytic extracellular vesicles, Molecular Therapy (2021), <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.09.023>

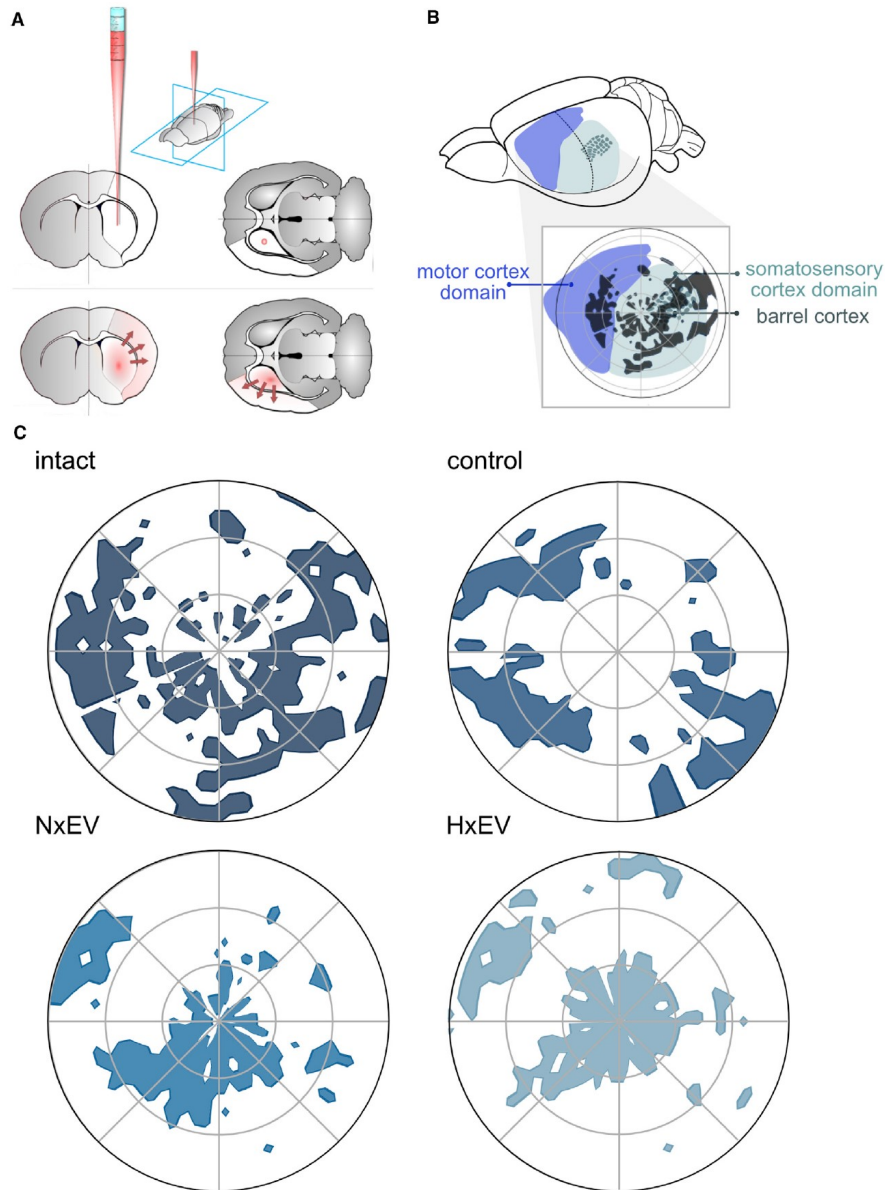


Figure 5. Astrocyte-derived exosomes promote axonal regrowth and the reorganization of cortical innervation maps in the somatosensory cortex
(A) Schematic representation of the administration of the fluorescent colorant Dil at 21 days post-stroke and diffusion through axonal transport during 7 days. (B) Schematic indication of the localization of polar plots shown in (C) over the cortical territories of the motor and somatosensory cortex of the rat, indicated by the

(legend continued on next page)

Please cite this article in press as: Heras-Romero et al., Improved post-stroke spontaneous recovery by astrocytic extracellular vesicles, Molecular Therapy (2021), <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.09.023>

www.moleculartherapy.org

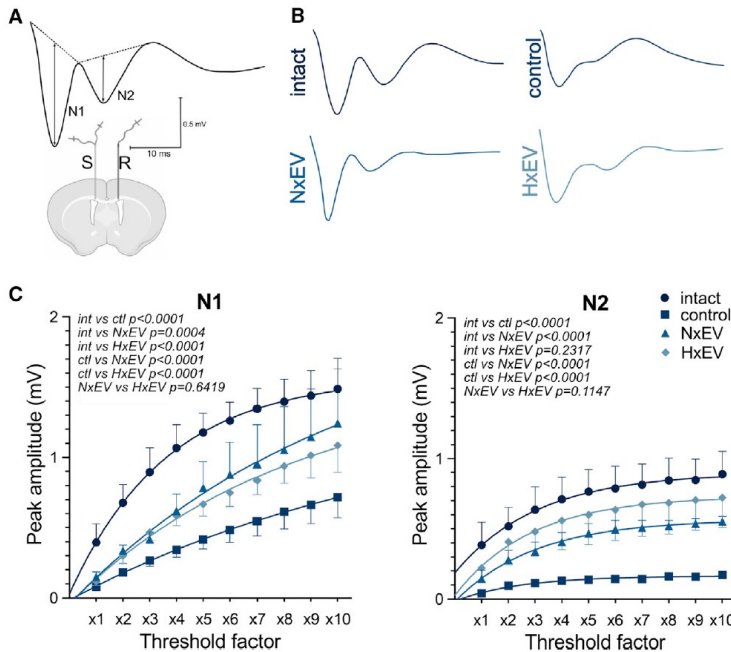


Figure 6. Administration of astrocyte-derived exosomes augments compound action potential recovery of stroke-challenged rats

(A) Schematic representation of electrode placement showing the stimulated (S) and recorded (R) sites in a coronal plane. CAP waveforms display early (N1) and late (N2) negative peaks generated by myelinated and unmyelinated axons, respectively. Dashed lines on CAPs explain the measurements of peak amplitudes from their projected bases. (B) Representative CAPs evoked at the maximum stimulus level under each experimental condition. (C) Plots for N1 and N2 I/O curves for intact, control, NxEV, and HxEV groups.

measurement of field potentials in fiber populations. The compound action potentials (CAPs) of the corpus callosum have a two-phase trace with two negative peaks, with the first one (N1) representing the myelinated fibers and the second one (N2) representing the unmyelinated fibers²⁵ (Figures 6A and 6B). The amplitude of CAPs evoked in the corpus callosum reflect the number of contributing axons. The input-output (I/O) relationship of CAPs evoked in the corpus callosum of the animals showed that administration of EVs at 30 min post-injury resulted in

laser scanning confocal microscopy of the entire ipsilateral hemisphere. To achieve this, 20×20 binned images were converted to single pixels and mapped to the cortex in a polar plot with the center located at an anatomical point identifiable by the first major split of the M4 segment of the superior MCA trunk. Overlapping the image of a slice of the corresponding preparation of the contralateral side (corrected for anatomical symmetry) stained with cytochrome *c* oxidase to distinguish the barrel cortex allowed us to map the general territories of the motor and somatosensory cortices (Figure S8). As expected, we found that the stroke caused a drastic loss of striatal projections to the somatosensory and motor cortices. Whereas the administration of EVs did not necessarily rescue the lost innervations, it promoted the reorganization of innervated cortical areas that instead preferentially targeted the parietal somatosensory cortex (Figure 5). The patterns reorganized by EVs were notably similar between normoxia and hypoxia. The motor cortex was predominantly spared in our experiments, possibly owing to the small infarct size on days 14 and 21 (Figure 2).

Functional axonal regeneration of the corpus callosum

The corpus callosum is the most prominent white matter tract in the mammalian brain, making this structure suitable for the

significant recovery of CAP amplitude, and this effect was more pronounced in the N2 than the N1 CAP component (Figure 6C), thus revealing a greater susceptibility of myelinated fibers to injury. The I/O curves for N1 and N2 amplitudes in the control group were significantly shifted downward relative to all other groups, indicating an injury-induced reduction of evoked action potentials in the myelinated and unmyelinated axon populations, respectively. In rats from the NxEV and HxEV groups, the N1 and N2 CAP amplitudes were significantly elevated above those of the control group, indicating a favorable degree of neurorestoration of myelinated and unmyelinated fibers. This was more prominent in non-myelinated fibers, revealing a greater susceptibility of myelinated axons.

The results obtained through the I/O curve measurements reveal a similar recovery pattern to that observed in FA analysis of samples from the corpus callosum (21 days, i). Likewise, there was a remarkable correspondence between electrophysiological results (CAPs for N1 at $10\times$, ii) and the functional recovery (combined neurological score at 21 days, iii) reported in the present study. Pearson correlation values were as follows: $r_{i,iii} = 0.992$, $p = 0.04$; $r_{ii,iii} = -0.991$, $p = 0.043$; and $r_{i,ii} = -1$, $p = 0.003$.

localization of the barrel cortex (see Figure S8). Polar plots of the striatal innervation to the cortex in a representative rat of each group. Each two-photon-captured stack's maximum projection was converted to the pixels' Cartesian coordinates meeting the threshold set (percentile 90–95 of positive signal). Origin (0,0) was set to the first branch split of the M4 segment in the MCA's superior trunk. Notice the stroke impact of the somatosensory cortex and the reorganization of the cortical maps produced by EVs.

Identification of molecular mediators of axonal remapping within astrocyte-derived EV cargo

For the last part of this study, we set out to identify the possible molecular mediators of axonal regeneration contained in EVs released from astrocytes. To determine this, we performed a meta-analysis of three protein datasets from previously published astrocyte exosome-derived proteomes with $n = 19$,²⁶ $n = 107$,²⁷ and $n = 219$ ²⁸ identified proteins (Figure 7A). We also performed a Gene Ontology (GO) over-representation test with R (3.6.3) package clusterProfiler.²⁹ Subsequently, we selected eight biological process (BP) GO terms related to axonal growth and synaptogenesis, including synapse organization, response to axon injury, regulation of synapse structure or activity, postsynaptic cytoskeleton organization, postsynapse organization, neuron projection extension, modification of synaptic structure, and axonogenesis (Figure 7B). Unique proteins belonging to these eight BP GO terms ($n = 39$) were analyzed using STRING with a minimum interaction score of 0.900 and k-means clustering of 3 (Figure 7C). Astrocyte exosome-derived proteomic datasets and all GO overrepresentation terms can be found in [Data S1](#).

DISCUSSION

How astrocytes react to ischemic damage after stroke is a complex biological process that involves a coordinated response from a heterogeneous cell population across multiple phases. In this study, we report that astrocytes produce and release EVs loaded with chemical cues that prompt the axonal remapping of cortical areas damaged by stroke. Importantly, we determined that astrocytes subjected to hypoxic stress release EVs with an increased capacity for repair. Lastly, we found that this mechanism of intercellular communication accelerated the spontaneous recovery of experimental subjects in the subacute phase following stroke. The molecular link between astrocyte-produced biomolecules transmitted in EVs and functional recovery from stroke has not been established before.

The MCAO procedure used in the present study primarily affects motor coordination and stimuli perceptual integration, coded in the circuits of the somatosensory cortex and thalamus.³⁰ The subcortical damage affects functional connectivity in the somatosensory cortex, which correlates with cortical activations after electrical stimulation of the affected forelimbs.³¹ Previous work shows that distinct sensorimotor pathways have a significant loss of connectivity 2 weeks after stroke in the rat.³²

During spontaneous recovery, the reorganization of axonal connections and the overall histological patterns of the brain involve either compensation or repair, and the latter is considered to reflect functional recovery.³³ With work performed on stroke preclinical models, we know that the mechanisms for spontaneous recovery include promoting new brain cortical maps through axon sprouting, remyelination, and blockade of extracellular inhibitory signals.^{34,35} After a stroke, axonal growth and repair mechanisms establish new projections in the contralesional hemisphere. The axonal sprouting triggered by stroke generates new local intracortical projections as well as long inter-hemispheric projections,³⁶ which have been associated

with functional recovery.³⁷ By engaging both the ipsilateral and contralateral hemispheres, the rostral and caudal portions of the motor cortex are involved in coordinating the skilled reaching performance in the rat.³⁸ In humans, the contralesional motor cortex plays a central role in the recovery of motor function,³⁹ but acute cortical reorganization following focal ischemia appears to occur less rapidly than in rodents.⁴⁰

Regarding the activators of these repair processes, endogenous cellular and molecular processes occurring during a limited time window promote a regenerative microenvironment in the post-acute ischemic phase. Physiologically, the axon growth cone that covers the terminal zone of neuritic processes is assembled, and, along with the reorganization of the cytoskeleton in the proximal axon stump, initiates the regeneration process.⁴¹ Growth cone formation and axon growth progression are regulated by extracellular factors and intracellular signaling molecules.^{42,43} In addition, it is known that neurons endure profound changes in their transcriptional profile in the subacute phase after stroke, which enables them to undergo plasticity changes,⁴⁴ and astrocytes activate a transcriptional profile that favors the expression of repairing genes.⁴⁵ We hypothesize that astrocytes signal neurons to activate the regenerative mechanisms through intercellular signaling driven by EVs. This type of communication mechanism has recently been shown to be capable of directing these processes. Astrocyte-derived exosomes with prostaglandin D2 synthase expression contribute to axonal outgrowth and functional recovery in stroke by inhibiting the axon growth blocker semaphorin 3A,⁴⁶ providing evidence that the release of EVs from astrocyte does contribute to axonal growth signaling.

In our meta-analysis of astrocytic EV proteomes, we identified several proteins that regulate axon outgrowth and guidance, for instance: TUBB, a β -tubulin protein involved in axon guidance;⁴⁷ ACTG1, a critical protein for axogenesis, axon guidance, and synaptogenesis;⁴⁸ RhoA, which has been shown to restrict the initiation of neuronal polarization and axon outgrowth during development,⁴⁹ and whose knockdown promotes axon regeneration;⁵⁰ RTN4, a myelin-associated axon growth inhibitor that impairs axon regeneration in the adult mammalian CNS;⁵¹ Cdc42, which targets the cytoskeleton, cell adhesion, and polarity regulators⁵² and is involved in axon guidance;⁵³ TUBA4A and PFN1, which regulate cytoskeletal dynamics;⁵⁴ SPARC, a secreted protein involved in synapse pruning during development;⁵⁵ Rab11A, involved in axon outgrowth;⁵⁶ and Ephrin, whose signaling is known to modulate axon guidance and synaptic plasticity and promote long-term potentiation,^{57,58} and whose inhibition has been targeted to augment recovery after stroke,⁵⁹ among others.

EVs also regulate several physiological processes by delivering microRNAs (miRNAs) to their target cells. Numerous species of these molecules, previously found in astrocyte-shed EVs,²⁸ regulate axon growth and guidance. miRNAs in distal axons of cortical neurons, such as miR15b, miR195, and miR26b, are known to integrate network regulatory systems that promote axonal growth,⁶⁰ Other species that block these processes, such as miR203a and miR29a,^{60,61} are

Please cite this article in press as: Heras-Romero et al., Improved post-stroke spontaneous recovery by astrocytic extracellular vesicles, Molecular Therapy (2021), <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.09.023>

www.moleculartherapy.org

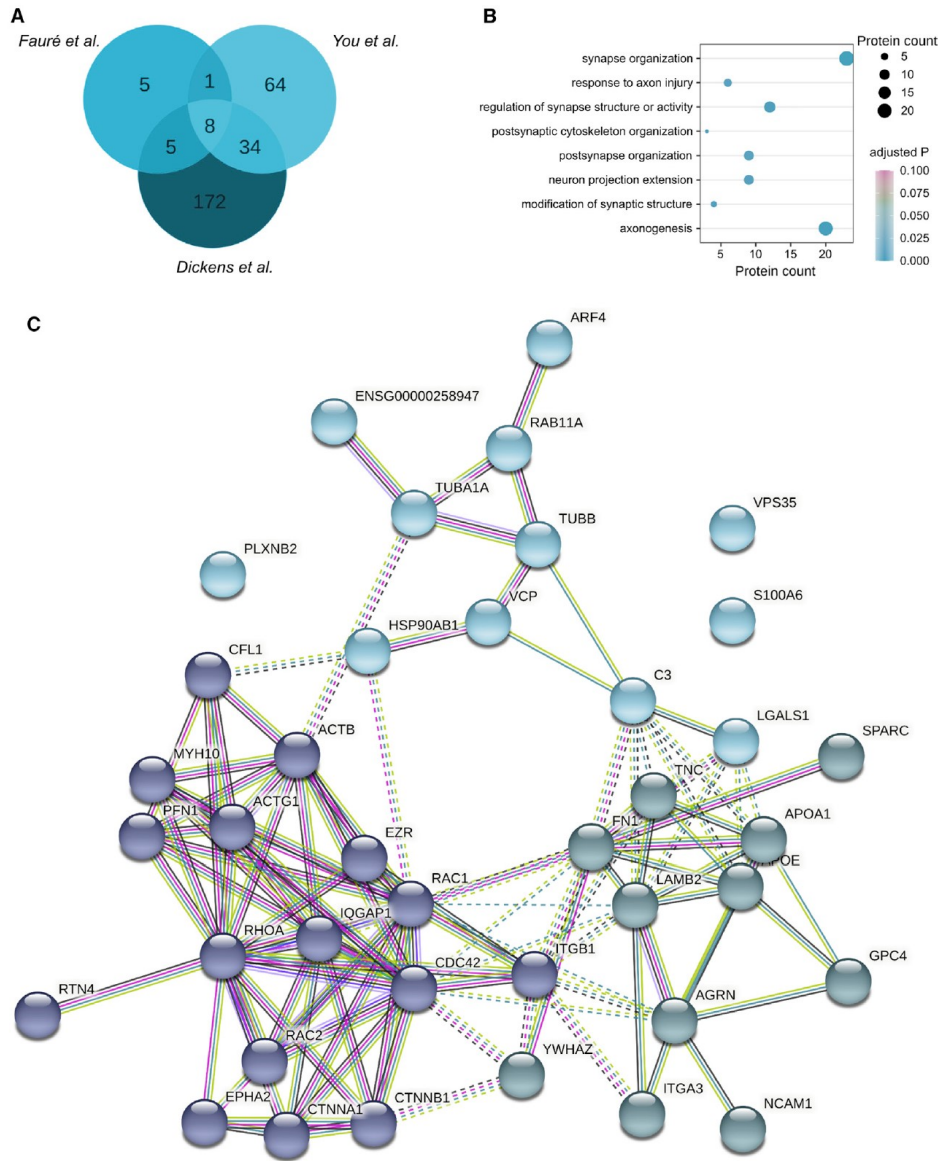


Figure 7. Meta-analysis of astrocytic EV proteomes

(A) Venn diagram of the three databases used for the meta-analysis.^{26–28} (B) Biological process (BP) Gene Ontology (GO) analysis of proteins related to neuronal, axonal, and synaptic biological processes. (C) STRING analysis of the 39 proteins represented in the BP GO terms in (B), with a minimum interaction score of 0.900 and k-means clustering of 3.

decreased in EVs released from astrocytes subjected to proinflammatory signals. Nevertheless, other miRNA species, such as miR130a, indirectly regulate VEGFR2 expression,⁶² which is also involved in

neuroadaptation following stroke.⁶³ The axon growth and guidance prompted by EVs most likely result from combining all of these different regulatory molecules within the same vesicle. The exact

Please cite this article in press as: Heras-Romero et al., Improved post-stroke spontaneous recovery by astrocytic extracellular vesicles, *Molecular Therapy* (2021), <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.09.023>

mechanism of action of each miRNA contained within astrocytic EVs requires elucidation.

In response to ischemia, astrocytes also modulate the production of trophic factors with essential roles in the neuromodulation of recovery after damage,^{64,65} mainly by regulating hypoxia-inducible factor (HIF)-1 and HIF-2^{66,67} and nuclear erythroid related factor 2 (Nrf2).⁶⁸ Trophic factors such as erythropoietin,^{66,69} vascular endothelial growth factor,^{70,71} neurotrophin-3,^{72,73} and nerve growth factor⁷⁴ not only contribute to maintaining neuronal survival but also have profound effects on axonal outgrowth. In addition, they influence axonal fibers' length and tortuosity in sensory pathways.⁷⁵⁻⁷⁷ Molecular mediators that drive all of these mechanisms can, in principle, be packed and released in EVs,⁷⁸ increasing the potency for recovery.

We enhanced input signals for axonal growth from astrocytes under stress (HxEV) and basal conditions (NxEV), which allowed us, under a permissive environment generated by the stroke, to potentiate the endogenous process of neurite growth and cortical remapping that underlies functional recovery. The endogenous production of EV content within the brain-resident astrocytes changes dynamically throughout recovery after the ischemic insult. By delivering these vesicles 30 min after initiation of the reperfusion phase, we are likely shortening the time taken for the endogenous reparative mechanisms to commence, which is a plausible explanation for the recovery accelerating effect induced by administering astrocytic EVs. The astrocytes in culture were free from the influence of classically activated microglia, which is known to induce A1 reactive astrocytes that promote the death of neurons and oligodendrocytes.²⁰

It is well established that the brain produces neurochemical signals that drive adaptive changes at the molecular level conferring tolerance to hypoxic stress.⁷⁹ In this sense, the greater efficacy of HxEV over NxEV could be attributed to preconditioning, where the exposure to a potentially deleterious stimulus at a subthreshold level increases the resistance to a repeated presentation of the challenge even at a higher magnitude. Astrocytes are oxygen level sensors in the CNS⁸⁰ and can thus trigger physiological responses for adaptation to environmental challenges. For this, astrocytes use diverse molecular mechanisms, for instance, switching molecular responses to increase tolerance by sensitization of P2X₇ receptors,^{67,81} which are closely associated with regulating excitotoxic neuronal death.⁸² Other mechanisms involved in the astrocyte-driven preconditioning are the blockade of astrogliosis and induction of antioxidant capacities in these cells.⁶⁹ Given that HxEV had higher efficacy than did NxEV in promoting functional recovery, our results support the notion that EV-mediated release of molecular cues that facilitate axonal growth and neuronal survival serves as a mechanism of intercellular communication in hypoxic preconditioning.^{74,83}

Most astrocytes are resistant to hypoxic death;⁸⁴ still, in our experimental setting, the hypoxic challenge for 6 h decreases cell viability by about 30%. Thus, it is important to consider that dead and injured

cells in the culture contribute to EV yield, possibly sending molecular signals that act as damage-associated molecular patterns.^{85,86} The proportion of cells with apoptotic markers (Figure S1) is significantly high to consider that they can potentially influence tissue recovery. Finally, it is also relevant to consider that in addition to inducing cellular death, hypoxia also changes the physiology of EV production and release.⁸⁷

One of the most important findings of the present study is that astrocytes convey signals that directly reshape the innervation of affected cortical brain areas and potentiate axonal communication in impaired neuronal tracts through EVs. These effects are accompanied by neurological improvement after stroke. Previous studies have shown that astrocytes are highly heterogeneous cells, with typical types accounting for ~70% of astrocytes in culture,⁸⁸ promoting neuron adhesion and neurite growth, while atypical astrocytes inhibit such processes.⁸⁹ Reactive astrocytes, such as those that form glial scars after brain damage, potentially limit axonal growth after stroke, mainly by producing an extrinsic inhibitory environment. Our results might also reflect the enhancement of soluble signals released by repair-promoting astrocytes, and by the external administration of these EVs, we could surpass the physical inhibitory barriers promoted by reactive gliosis.

Given the dire need for suitable biomarkers for post-stroke plasticity mechanisms, we propose that astrocyte-derived particles, which can be isolated from human plasma,^{90,91} may serve as functional markers for brain plasticity, especially in the chronic phase after stroke when neurological restoration is minimal and can only possibly be obtained by proper neurorehabilitative interventions.

In conclusion, understanding the biological basis of neurological function restoration after stroke is critical for designing intervention therapies by the exploitation of endogenously coded mechanisms for the repair of the damaged brain. The use of isolated EVs from cultured astrocytes, even if unmodified, may shorten the time required for neurological recuperation or, even more so, extend the very limited time window of spontaneous recovery and increase the proportion of functional gains in patients. Additional studies are warranted to explore the optimal time point for astrocyte-derived EV administrations and the optimally effective and safe way to deliver them to the damaged brain.

MATERIALS AND METHODS

Animals

This study used young 6-week-old (270–290 g) wild-type Wistar rats subjected to MCAO as described below. Rats were bred at the Animal Facility of IFC-UNAM certified by the Secretariat of Agriculture and Rural Development (SADER-Mexico). Animals were housed in individual cages in a 12-h light/12-h dark cycle with food and water *ad libitum*. Rats were killed at 1, 7, 14, and 21 days post-stroke. All experimental procedures were conducted under the current Mexican law for the use and care of laboratory animals (NOM-062-ZOO-1999) with the approval of the Institutional Animal Care and Use

Please cite this article in press as: Heras-Romero et al., Improved post-stroke spontaneous recovery by astrocytic extracellular vesicles, Molecular Therapy (2021), <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.09.023>

www.moleculartherapy.org

Committee (CICUAL-IFC-LTR93-16). Experiments are reported in compliance with the Updated Animal Research: Reporting *In Vivo* Experiments (ARRIVE 2.0) guidelines.⁹²

Study design

We conducted this study in the setting of ischemia/reperfusion-induced damage to the brain in the absence of hemorrhagic conversion. The sample size used was determined *a priori* based on pilot experiments. Considering a medium Cohen's *d* effect size >0.3, statistical β power of 0.8, and significance of 0.05, we determined that $n = 4$ would allow us to reject the null hypothesis (no effect) with 95% confidence. The mortality rate was assumed to be 0.4 based on pilot experiments. The inclusion criteria consider the analysis of experiments that recapitulate full ischemia/reperfusion without brain hemorrhage. An experiment met the inclusion criteria when there was a reduction of blood perfusion below 50% of baseline, which roughly corresponds to the effect of occluding the common carotid artery, reperfusion above 50% baseline within 10 min, total occlusion time of 60 min, absence of subarachnoid or intraparenchymal hemorrhages, and survival for 24 h after stroke. For humane reasons, experiments were terminated when animals presented with hemiplegia or generalized weakness that made them unable to eat or drink autonomously within 24 h of stroke; those animals were considered dead before 24 h.

We used a total of 140 rats in this study, of which 21 died before 24 h (19 control, 1 NxEV, and 1 HxEV). Because survival at 24 h was an inclusion criterion, none of these rats was considered in any analyses. Thirty-six other animals were excluded from the study (22 control, 9 NxEV, 5 HxEV) because they did not show reperfusion above 50% of baseline within 10 min or presented brain hemorrhage. All of the observations (i.e., MRI, histology, and electrophysiological CAP recordings) were run in independent experiments, except for the longitudinal MRI assessments at 7, 14, and 21 days that followed the same individuals across time. The characterization of axonal growth and construction of polar maps was performed in a single experiment per condition. This study is limited to assess effects on male rats to prevent potential confounds of estrogen-mediated neuroprotective actions present in female rodents.⁹³

MCAO

Ischemic stroke was performed as previously reported with slight modifications.⁶³ Briefly, rats were subjected to isoflurane anesthesia (5% for induction followed by $\leq 1.5\%$ during surgery) with oxygen as the carrier. Normal ventilation was autonomously maintained. A nylon monofilament with a silicone-covered tip (403734, Doccol, Sharon, MA, USA) was inserted through the ligated left external carotid artery, and intraluminally advanced through the internal carotid artery until it occluded the MCA. The occlusion was maintained for 60 min, after which the monofilament was removed. Body temperature was maintained at 37°C with a heating pad for the duration of surgery. At the end of the procedure, the neck's skin was sutured, and rats were returned to their cages. During the entire experimental procedure, the cerebral blood flow (CBF) was moni-

tored in the territory irrigated by the MCA with laser-Doppler flowmetry at the following stereotaxic coordinates: anterior-posterior (AP) $-1.5 \text{ L} +3.5$ from bregma, with a laser-Doppler probe (model 407, Perimed, Järfälla, Sweden) connected to a Periflux system 5010 (Perimed). CBF was continuously monitored with an acquisition interval of 0.3 s using Perisoft software (Perimed).

Primary astrocyte cell culture

Primary cortical astrocyte cell cultures were prepared and maintained using methods similar to those described previously.²⁸ Briefly, astrocytes were isolated from the cerebral cortices of postnatal day 1–2 Wistar rats. The tissue was digested with trypsin and subsequently mechanically dissociated in Hanks' balanced salt solution. The cell suspension was plated in poly-D-lysine culture flasks containing Dulbecco's modified Eagle's medium/F-12 medium (Gibco-BRL) and 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco-BRL). 24 h after plating, the cultures were shaken at 200 rpm at 37°C overnight to remove less-adherent cells, with the remaining cells determined to be $\sim 98\%$ GFAP⁺ astrocytes. Experiments were performed between three to five passages.

Cell viability was determined with an apoptosis/necrosis assay kit (ab176749, Abcam, Cambridge, UK) under normoxic, hypoxic (6 h), and recovery (6 h hypoxia followed by 42 h recovery) conditions. Cultured astrocytes were incubated with 2 μL of each marker (CytoCalcein, 7-aminoactinomycin D [7-AAD], and Apopxin PS sensor) for 60 min. After incubation, cells were harvested with a cell scraper, centrifuged, and resuspended in 1.5 mL of culture medium, then loaded and analyzed in an Attune acoustic focusing cytometer (Thermo Fisher Scientific) with a 530/30 band for Apopxin, a 640LP band for 7-AAD, and a 450/40 band for CytoCalcein. In three independent experiments, standard singlet forward scatter area (FSC-A)/forward scatter height (FSC-H) and size and granularity FSC-A/side scatter area (SSC-A) gates were placed, and cell populations were analyzed for each of the three compensated fluorescent markers with at least 10,000 cells per experiment in FlowJo 10.8. The CytoCalcein⁺ cells were considered "live" regardless of the presence of the other cell markers (Figure S1). Cells were classified as apoptotic (Apopxin⁺), necrotic (7-AAD⁺), or necrotic/apoptotic (Apopxin⁺/7-AAD⁺) in the absence of CytoCalcein.

EV isolation and characterization

EVs were purified from astrocyte cell culture supernatants under two experimental conditions: incubated for 48 h under normoxic conditions (NxEV) or for 6 h under hypoxia, followed by 42 h for recovery in normoxia (HxEV). For hypoxia, cultures were incubated inside a hypoxic chamber (STEMCELL Technologies, Canada) with a 100% N₂ atmosphere for 6 h at 37°C. For the collection of exosomes secreted exclusively by astrocytes, a conditioned medium was prepared with exosome-free FBS. The conditioned medium was recovered and filtered with a 220-nm-pore membrane to remove large cell debris, microvesicles derived from plasma membrane with a diameter greater than 220 nm, and large apoptotic bodies. The supernatant was collected and sequentially ultracentrifuged at 50,000 $\times g$

Please cite this article in press as: Heras-Romero et al., Improved post-stroke spontaneous recovery by astrocytic extracellular vesicles, *Molecular Therapy* (2021), <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.09.023>

Molecular Therapy

for 30 min, followed by $100,000 \times g$ for 70 min. The purified vesicles were resuspended in 100 μ L of PBS.

A fraction of the resuspended vesicles was diluted 1:50 for nanoparticle tracking analysis (NTA) measurement by NanoSight (NS300, Malvern Panalytical, UK) at the National Laboratory of Flow Cytometry (IIB-UNAM, Mexico). Vesicle size was determined by estimating the diffusion coefficient calculated from the Brownian motion direct observation using the Stokes-Einstein equation and depicted as a size histogram. Both acquisition and analysis settings were kept constant for control and hypoxic samples.

For the characterization by transmission electron microscopy, 2 μ L of EV suspension was loaded onto glow-discharged 400-mesh copper/carbon-coated grids and left to settle for 5 min. After a brief wash with drops of distilled water, the grids were stained in 2% uranyl formate for 1 min and blow-dried on Whatman filter paper. Exosomes were examined with a JEOL-JEM-1200 transmission electron microscope at an accelerating voltage of 80 keV.

The expression of the exosome canonical marker CD63 was determined by western blot. The quantification of protein content in exosome suspensions and whole-cell lysates was undertaken by a modified Lowry assay (detergent-compatible [DC] protein assay, Bio-Rad). For immunoblotting, sample preparation was performed in Laemmli buffer, and 5 μ g of each protein was resolved by 7.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene fluoride membranes. Membranes were blocked with 5% bovine serum albumin (BSA) in Tris-buffered saline (TBS) containing 0.1% Tween 20. After blocking, the membrane was incubated overnight with the primary polyclonal antibody anti-CD63 (1:200; Santa Cruz Biotechnology, sc-15363), followed by a 2-h incubation with the secondary horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:200; GeneTex, GTX213110). Following incubation with the Immobilon forte substrate (EMD Millipore), the blot was scanned on a C-DiGit apparatus (LI-COR Biosciences).

Administration of astrocyte-derived EVs in the brain

A 4- μ L vol of an exosome suspension in phosphate buffer was administered by intracerebroventricular (i.c.v.) injection in the corresponding animal groups 30 min after removing the intraluminal filament in the MCAO procedure, which marked the beginning of reperfusion. The injection was performed at the following stereotaxic coordinates: AP -0.8 and L -1.5 from bregma and V -4 from dura matter at a flux rate of 0.8 μ L/min using a graduated glass microcapillary pipette pulled to produce a tip $<50 \mu$ m in diameter. The number of exosomes administered in each experiment contained equal quantities of total protein in the range of 400 ng.

For the characterization of the distribution and bioavailability of EVs injected in the brain, we stained them with PKH26 (Sigma-Aldrich), per the manufacturer's directions, and proceeded to i.c.v. injection. We determined the presence of labeled EVs in the brain at 2 and 24 h after their administration by evaluating 40- μ m paraformaldehyde (PFA)-fixed coronal brain slices. Sections were blocked and permeabilized with 0.5% TBS with Tween 20 (TBS-T) and 5% BSA and incubated overnight at 4°C with primary antibodies anti-MAP2 (1:500; Abcam, ab32454) and anti-GFAP (1:500; Sigma, G3893), and, after three washes, secondary Alexa Fluor 647-conjugated goat anti-rabbit and Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse antibodies (1:500 each), as well as DAPI (1:10,000; Thermo Fisher Scientific). The preparations were examined by confocal microscopy with an LSM 800 microscope (Zeiss, Jena, Germany) using a $\times 63$ oil immersion objective.

Behavioral testing

Behavioral testing

Animals were evaluated with a battery of neurological tests to assess sensorimotor deficits at 24 h and 7, 14, and 21 days after stroke. The severity of functional deficits was scored by assessing eight items described in Table 1. All evaluations were cross-validated by a trained observer blinded to the experimental treatment that analyzed the tests' recorded videos.

MRI

MRI scans were acquired at 7, 14, and 21 days after MCAO with a 7-T MRI system (Varian), and assessments made at 24 h were performed with a 7-T MRI system (Pharmascan 70/16; Bruker, Ettlingen, Germany) on animals anesthetized with isoflurane (5% for induction followed by $\leq 2\%$ during image acquisition). T2-weighted images were obtained with a fast spin-echo sequence: echo time (TE)/repetition time (TR), 35.47/3714 ms; field of view (FOV), 64×64 mm; matrix, 256×256 ; voxel resolution, 250 μ m per side; slice thickness, 0.5 mm. T1-weighted images were acquired with a 3D gradient-echo sequence with the same orientation and resolution (TE/TR, 2.3/4 ms). Diffusion-weighted images were acquired using a spin-echo echo-planar imaging sequence: TE/TR, 30.5/2,500 ms; FOV, 64×64 mm; matrix, 64×64 ; slice thickness, 1 mm, yielding isometric voxel resolution of 1 mm per side; diffusion gradient directions, 6; diffusion gradient duration (δ), 5 ms; and b-value, 800 s/mm^2 . An additional b = 0 s/mm^2 image was acquired with the same parameters.

DTI

The diffusion tensor was fitted at each voxel for DTI analysis using DSI Studio (<http://dsi-studio.labsolver.org/Manual/diffusion-mri-indices>; December 6, 2015). Next, tractography was performed using a deterministic fiber-tracking algorithm.⁹⁴ Seed regions were placed at the striatum and corpus callosum. The anisotropy threshold was 0.21, and the angular threshold was 30°. The step size was 0.7 mm; averaging the propagation direction with 30% of the previous direction smoothed the fiber trajectories. A total of reconstructed streamlines (tracts), axial diffusivity, mean diffusivity, and radial diffusivity, were calculated by area.

Immunofluorescence and confocal microscopy

For immunohistological analyses, three rats per group were anesthetized with pentobarbital (100 mg/kg) and transcardially perfused with 200 mL of ice-cold 0.9% NaCl followed by 250 mL of ice-cold 4% PFA. Brains were collected and post-fixed in 4% PFA for 24 h and

Please cite this article in press as: Heras-Romero et al., Improved post-stroke spontaneous recovery by astrocytic extracellular vesicles, *Molecular Therapy* (2021), <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.09.023>

www.moleculartherapy.org

then cryoprotected in 30% sucrose. Whole PFA-fixed brains were cut into 40- μm -thick sections in a cryostat to produce 10 series of consecutive sections that were 400 μm apart. Brain sections containing infarct core and penumbra were blocked with 5% BSA in TBS with 0.5% (v/v) Triton X-100 (TBS-T) and incubated with anti-MAP2 (1:200; Invitrogen, PAS-17646) and anti-TUJ-1 antibodies (1:200; Merck Millipore, MAB380) for 48 h. Sections were washed three times with TBS followed by a 2-h incubation at room temperature (RT) with Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse and Alexa Fluor 546-conjugated anti-rabbit antibodies (1:300 each; Thermo Fisher Scientific, A32723, A11035) in TBS. Images were obtained in a Zeiss LSM 800 confocal microscope using a $\times 20$ objective. An average of 40 μm for each z stack was obtained, every 0.5 μm of optical sectioning.

Axonal mapping

To determine the effect of EVs in neuronal projections recovered over time, we injected 2 μL of 1% (w/v) fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated cholera toxin B subunit (Sigma, C1655) in rats subjected to MCAO on day 14 post-stroke and analyzed the distribution of the labeling by confocal microscopy at 21 days post-stroke. In a separate series of experiments, one rat of each group subjected to MCAO was administered 0.5 μL of 0.02% Dil in 0.1% DMSO in the striatal core of the infarction (AP -0.1 , medial-lateral [ML] 2.0, and dorsal-ventral [DV] -4.2) on day 14 after MCAO. On day 21, the animals were intracardially perfused as indicated above with 4% PFA. The cortical hemispheres were collected, and the ipsilateral hemicortex was flattened as previously described.⁹⁵ The flattened cortices were clarified in a sucrose gradient (15%, 30%, 45%, 60%, and 75%) with Triton X-100 (0.4%, 0.6%, 0.8%, and 1%) for 15 days per stage. For two-photon microscopy, the flattened cortices were immersed in 2% agarose between glass slides and scanned with a Zeiss LSM 710 microscope to acquire a series of images in a stack of the whole cortex using a C-Apochromat 10 \times /0.45 W M27 objective with a pixel dwell of 6.3 ms at a wavelength of 860 nm.

Stack maximum intensity projections for each image were binned in a 20 \times 20 square calculating the pixels' median intensity inside each bin to create a new pixel. The images were processed for noise reduction using a scikit-image median filter,⁹⁶ calculating the median pixel value in a 2-pixel-radius disk. We set a threshold filter at percentile 90–95 of the pixel values for establishing the positive signal intensity and kept only the pixels with the highest values. The pixel Cartesian coordinates were then obtained, setting the center (0,0) at the first branch split of the M4 segment in the MCA's superior trunk in the barrel cortex, identified by cytochrome oxidase staining (Figure S8). This point was considered as the origin of the polar transformation. All of the processing and plotting were undertaken with *ad hoc* Python scripts available at https://github.com/TYR-LAB-MX/PolarPlot_HerasRomero_2021.

In vivo electrophysiological recording

I/O curves were assessed 21 days after stroke. For this, animals (n = 4 per group) were anesthetized with 5% isoflurane for induction, followed by $\leq 2\%$ during surgery. Body temperature was maintained at 35°C with

heating pads. Rats were placed on a stereotaxic frame, and the skull was exposed. A constant current was delivered by direct and unilateral stimulation of the corpus callosum using a bipolar stainless-steel electrode placed at the stereotaxic coordinates AP +0.2, ML -1.0 , DV -3.7 from bregma, with a Grass S48 stimulator and a photoelectric stimulus isolation unit Grass PSIU6 (Grass Instrument Co., Quincy, MS, USA). Corpus callosal responses were recorded unilaterally with a monopolar stainless-steel electrode (127 μm in diameter) placed at the stereotaxic coordinates AP +0.2, ML +1.0, DV -3.7 from bregma. The evoked responses were measured with the CAP amplitude, measured in negative peak 1 (N1) and peak 2 (N2). I/O curves were built with threshold folding of intensity (1–10 \times) to determine the axonal conduction for a range of stimulation intensities. The threshold was defined at the stimulation intensity required to produce a 0.10 mV amplitude response in N1. The electric signal was digitalized, stored, and analyzed using DataWave SciWorks (Broomfield, CO, USA).

Statistical analysis

GraphPad Prism 8 was used to analyze all *in vivo* data. The normal distribution in each dataset was corroborated using the Shapiro-Wilk normality test. Neurological scores and DTI parameter changes among experimental groups and over time within each group were tested on a two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures based on a general linear model, followed by Tukey's post hoc test. Data were considered significant at $\alpha \leq 0.05$. For the cell viability assays, two-way ANOVA was performed in R 3.6.3 with treatment and condition as independent variables, and the adjusted p value was calculated with a pairwise Tukey's honestly significant difference (HSD) post hoc test.

Data availability

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics statement

All of the animal experimentation was carried out at the Universidad Nacional Autónoma de México in Mexico City and Juriquilla Qro., Mexico, in accordance with the Mexican law for the use and care of laboratory animals (NOM-062-ZOO-1999) with the approval of the Institutional Animal Care and Use Committee (CICUAL-IFC-LTR93-16), and is in compliance with the guidelines for animal experimentation of the National Research Council (Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011) and the National Institutes of Health of the United States (US Department of Health, Education, and Welfare [DHEW] publication 85-23, revised 1995).

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.09.023>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Cristina Aranda Fraustro and Dr. Alfredo Cárdenas for assistance with experimental procedures, Dr. Alicia Güemez-Gamboa

Please cite this article in press as: Heras-Romero et al., Improved post-stroke spontaneous recovery by astrocytic extracellular vesicles, *Molecular Therapy* (2021), <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.09.023>

(Northwestern University) and Elliot Grotfelty (NIA/NIH, Karolinska Universitat) for critically reviewing the manuscript, Dr. Abraham Rosas-Arellano for assistance with the acquisition of confocal images and post-processing, Dr. Yazmín Ramiro-Cortés and Gerardo Perera for expert assistance with two-photon image acquisition, Dr. Laura Ongay-Larios for assistance with flow cytometry, Claudia Rivera-Cerecedo for animal care, Daniela Rodríguez-Montaño for assistance with histological sample preparations, the National Laboratory for Magnetic Resonance Imaging, particularly Dr. Juan Ortiz-Retana, for technical assistance, and Dr. Gloria Soldevila and Dr. Cynthia López Pacheco of the Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo (IIB-UNAM) for helpful assistance with NTA. L.B.T.y.R. is deeply grateful to Pilar Martínez, Mario Arredondo, Claudia Islas, Pablo Montiel, and Angel Cedillo for outstanding assistance with the administrative burden that kept the laboratory running during the difficulties that arose through the COVID-19 pandemic shutdown. Y.H.-R. conducted this study in partial fulfillment of the requirements of the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de Universidad Nacional Autónoma de México. This work was supported by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Dirección General de Asuntos del Personal Académico (PAPIIT-DGAPA grants IN226617 and IN207020 to L.B.T.y.R., and IN215719 to M.L.E.), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT; grants CB219542 and A1-S-13219) administered through the “Fondo Sectorial para la Investigación en Educación SEP-CONACYT” trust fund, the Committee for Aid and Education in Neurochemistry of the International Society for Neurochemistry (category 1B grant [2019]), and by International Brain Research Organization Return Home Program (2014) grants to L.B.T.-y.-R. Y.H.-R., B.B.-V., and A.C.-R. were recipients of doctoral scholarships from CONACYT (428473, 290915, and 277660), and R.S.-M. received a postdoctoral stipend from DGAPA. P.M.-C. and N.H.G. are supported by the Intramural Research Program of NIA/NIH (USA).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Y.H.-R. and L.B.T.y.R. conceived the project and designed the experiments. Y.H.-R. performed the MCAO surgeries. Y.H.-R., A.M.-G., and L.C. performed MRI assessments, and A.M.-G. produced the tractography. R.S.-M. made two-photon sample preparation and acquisition, and A.C.P.-H. and R.R.-H. analyzed the images and produced polar plots. I.P. carried out the proteomic meta-analysis and the astrocyte viability assays. Y.H.-R. and R.R.-H. made histological sample preparations and image acquisition. A.N.C.-R. performed the exosome characterization, and B.N.B.-V. analyzed the distribution of EVs in the brain. Electrophysiological experiments were performed by Y.H.-R., A.M.-M., E.U., and M.L.E. Y.H.-R., A.M.-G., R.R.-H., A.C.P.-H., P.M.-C., N.H.G., M.L.E., L.C., and L.B.T.y.R. analyzed the data. L.B.T.y.R. wrote the manuscript with input from Y.H.-R., P.M.-C., N.H.G., M.L.E., and L.C. All authors read and approved the final version of the manuscript.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

REFERENCES

- Virani, S.S., Alonso, A., Benjamin, E.J., Bittencourt, M.S., Callaway, C.W., Carson, A.P., Chamberlain, A.M., Chang, A.R., Cheng, S., Delling, F.N., et al.; American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee (2020). Heart Disease and Stroke Statistics—2020 update: A report from the American Heart Association. *Circulation* *141*, e139–e596.
- Ourique Martins, S.C., Sacks, C., Hacke, W., Brainin, M., de Assis Figueiredo, F., Marques Pontes-Neto, O., Lavados Germain, P.M., Marinho, M.F., Hoppe Wiegner, A., Vaca McGhie, D., et al. (2019). Priorities to reduce the burden of stroke in Latin American countries. *Lancet Neurol.* *18*, 674–683.
- Arauz, A., Marquez-Romero, J.M., Barboza, M.A., Serrano, F., Artigas, C., Murillo-Bonilla, L.M., Cantú-Brito, C., Ruiz-Sandoval, J.L., and Baringarrementeria, F. (2018). Mexican-National Institute of Neurology and Neurosurgery-Stroke Registry: Results of a 25-year hospital-based study. *Front. Neurol.* *9*, 207.
- Rathore, S.S., Hinn, A.R., Cooper, L.S., Tyroler, H.A., and Rosamond, W.D. (2002). Characterization of incident stroke signs and symptoms: findings from the atherosclerosis risk in communities study. *Stroke* *33*, 2718–2721.
- Cassidy, J.M., and Cramer, S.C. (2017). Spontaneous and therapeutic-induced mechanisms of functional recovery after stroke. *Transl. Stroke Res.* *8*, 33–46.
- Ward, N.S. (2017). Restoring brain function after stroke—Bridging the gap between animals and humans. *Nat. Rev. Neurol.* *13*, 244–255.
- Desowska, A., and Turner, D.L. (2019). Dynamics of brain connectivity after stroke. *Rev. Neurosci.* *30*, 605–623.
- Bonkhoff, A.K., Hope, T., Bzdok, D., Guggisberg, A.G., Hawe, R.L., Dukelow, S.P., Rehme, A.K., Fink, G.R., Grefkes, C., and Bowman, H. (2020). Bringing proportional recovery into proportion: Bayesian modelling of post-stroke motor impairment. *Brain* *143*, 2189–2206.
- Stinear, C.M., Lang, C.E., Zeiler, S., and Byblow, W.D. (2020). Advances and challenges in stroke rehabilitation. *Lancet Neurol.* *19*, 348–360.
- Chamorro, Á., Lo, E.H., Renú, A., van Leyen, K., and Lyden, P.D. (2021). The future of neuroprotection in stroke. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *92*, 129–135.
- Tovar-y-Romo, L.B., Penagos-Puig, A., and Ramirez-Jarquín, J.O. (2016). Endogenous recovery after brain damage: Molecular mechanisms that balance neuronal life/death fate. *J. Neurochem.* *136*, 13–27.
- Yu, T.-S., Washington, P.M., and Kernie, S.G. (2016). Injury-induced neurogenesis: Mechanisms and relevance. *Neuroscientist* *22*, 61–71.
- Ding, G., Jiang, Q., Li, L., Zhang, L., Zhang, Z.G., Ledbetter, K.A., Panda, S., Davarani, S.P.N., Athiraman, H., Li, Q., et al. (2008). Magnetic resonance imaging investigation of axonal remodeling and angiogenesis after embolic stroke in sildenafil-treated rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *28*, 1440–1448.
- Li, S., and Carmichael, S.T. (2006). Growth-associated gene and protein expression in the region of axonal sprouting in the aged brain after stroke. *Neurobiol. Dis.* *23*, 362–373.
- Carmichael, S.T., Kathirvelu, B., Schweppe, C.A., and Nie, E.H. (2017). Molecular, cellular and functional events in axonal sprouting after stroke. *Exp. Neurol.* *287*, 384–394.
- Li, S., Nie, E.H., Yin, Y., Benowitz, L.L., Tung, S., Vinters, H.V., Bahjat, F.R., Stenzel-Poore, M.P., Kawaguchi, R., Coppola, G., and Carmichael, S.T. (2015). GDF10 is a signal for axonal sprouting and functional recovery after stroke. *Nat. Neurosci.* *18*, 1737–1745.
- Clarkson, A.N., López-Valdés, H.E., Overman, J.J., Charles, A.C., Brennan, K.C., and Thomas Carmichael, S. (2013). Multimodal examination of structural and functional remapping in the mouse photothrombotic stroke model. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *33*, 716–723.
- Privat, A. (2003). Astrocytes as support for axonal regeneration in the central nervous system of mammals. *Glia* *43*, 91–93.
- Boghdadí, A.G., Spurrier, J., Teo, L., Li, M., Skarica, M., Cao, B., Kwan, W., Merson, T.D., Nilsson, S.K., Sestan, N., et al. (2020). Primate-specific response of astrocytes to stroke limits peripheral macrophage infiltration. <https://doi.org/10.1101/2020.05.08.083501>.

Please cite this article in press as: Heras-Romero et al., Improved post-stroke spontaneous recovery by astrocytic extracellular vesicles, Molecular Therapy (2021), <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.09.023>

www.moleculartherapy.org

20. Liddelow, S.A., and Sofroniew, M.V. (2019). Astrocytes usurp neurons as a disease focus. *Nat. Neurosci.* 22, 512–513.
21. Güler, G., Gursay-Ozdemir, Y., Erdemli, E., Can, A., and Dalkara, T. (2009). Astrocytes are more resistant to focal cerebral ischemia than neurons and die by a delayed necrosis. *Brain Pathol.* 19, 630–641.
22. Almeida, A., Delgado-Esteban, M., Bolaños, J.P., and Medina, J.M. (2002). Oxygen and glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurons but not in astrocytes in primary culture. *J. Neurochem.* 81, 207–217.
23. Liu, Z., and Chopp, M. (2016). Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke. *Prog. Neurobiol.* 144, 103–120.
24. Nieland, L., Morsett, L.M., Broekman, M.L.D., Breakefield, X.O., and Abels, E.R. (2021). Extracellular vesicle-mediated bilateral communication between glioblastoma and astrocytes. *Trends Neurosci.* 44, 215–226.
25. Li, L., Velumian, A.A., Samoilova, M., and Fehlings, M.G. (2016). A novel approach for studying the physiology and pathophysiology of myelinated and non-myelinated axons in the CNS white matter. *PLoS ONE* 11, e0165637.
26. Fauré, J., Lachenal, G., Court, M., Hirrlinger, J., Chatellard-Causse, C., Blot, B., Grange, J., Schoehn, G., Goldberg, Y., Boyer, V., et al. (2006). Exosomes are released by cultured cortical neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 31, 642–648.
27. You, Y., Borgmann, K., Edara, V.V., Stacy, S., Ghorpade, A., and Ikezu, T. (2019). Activated human astrocyte-derived extracellular vesicles modulate neuronal uptake, differentiation and firing. *J. Extracell. Vesicles* 9, 1706801.
28. 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., et al. (2017). Astrocyte-shed extracellular vesicles regulate the peripheral leukocyte response to inflammatory brain lesions. *Sci. Signal.* 10, eaa17696.
29. Yu, G., Wang, L.-G., Han, Y., and He, Q.-Y. (2012). clusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS* 16, 284–287.
30. Romo, R., and Rossi-Pool, R. (2020). Turning touch into perception. *Neuron* 105, 16–33.
31. Bauer, A.Q., Kraft, A.W., Wright, P.W., Snyder, A.Z., Lee, J.-M., and Culver, J.P. (2014). Optical imaging of disrupted functional connectivity following ischemic stroke in mice. *Neuroimage* 99, 388–401.
32. van der Zijden, J.P., Wu, O., van der Toorn, A., Roeling, T.P., Bleys, R.L.A.W., and Dijkhuizen, R.M. (2007). Changes in neuronal connectivity after stroke in rats as studied by serial manganese-enhanced MRI. *Neuroimage* 34, 1650–1657.
33. Regehardt, R.W., Takase, H., Lo, E.H., and Lin, D.J. (2020). Translating concepts of neural repair after stroke: Structural and functional targets for recovery. *Restor. Neurol. Neurosci.* 38, 67–92.
34. Joy, M.T., and Carmichael, S.T. (2021). Encouraging an excitable brain state: Mechanisms of brain repair in stroke. *Nat. Rev. Neurosci.* 22, 38–53.
35. Deng, B., Li, L., Gou, X., Xu, H., Zhao, Z., Wang, Q., and Xu, L. (2018). TAT-PEP enhanced neurobehavioral functional recovery by facilitating axonal regeneration and corticospinal tract projection after stroke. *Mol. Neurobiol.* 55, 652–667.
36. Sinke, M.R., Otte, W.M., van Meer, M.P., van der Toorn, A., and Dijkhuizen, R.M. (2018). Modified structural network backbone in the contralesional hemisphere chronically after stroke in rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 38, 1642–1653.
37. Hur, E.-M., Saijilafu, and Zhou, F.Q. (2012). Growing the growth cone: Remodeling the cytoskeleton to promote axon regeneration. *Trends Neurosci.* 35, 164–174.
38. Gharbawie, O.A., Karl, J.M., and Whishaw, I.Q. (2007). Recovery of skilled reaching following motor cortex stroke: Do residual corticofugal fibers mediate compensatory recovery? *Eur. J. Neurosci.* 26, 3309–3327.
39. Rehme, A.K., Fink, G.R., von Cramon, D.Y., and Grefkes, C. (2011). The role of the contralesional motor cortex for motor recovery in the early days after stroke assessed with longitudinal fMRI. *Cereb. Cortex* 21, 756–768.
40. Corbett, D., Carmichael, S.T., Murphy, T.H., Jones, T.A., Schwab, M.E., Jolkonen, J., Clarkson, A.N., Dancause, N., Weiloch, T., Johansen-Berg, H., et al. (2017). Enhancing the alignment of the preclinical and clinical stroke recovery research pipeline: Consensus-based core recommendations from the Stroke Recovery and Rehabilitation Roundtable translational working group. *Neurorehabil. Neural Repair* 31, 699–707.
41. Bradke, F., Fawcett, J.W., and Spira, M.E. (2012). Assembly of a new growth cone after axotomy: The precursor to axon regeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 183–193.
42. Robinson, R.A., Griffiths, S.C., van de Haar, L.L., Malinauskas, T., van Batum, E.Y., Zelina, P., Schwab, R.A., Karia, D., Malinauskaitė, L., Brignani, S., et al. (2021). Simultaneous binding of guidance cues NET1 and RGM blocks extracellular NEO1 signaling. *Cell* 184, 2103–2120.e31.
43. Nichol, R.H., IV, Hagen, K.M., Lombard, D.C., Dent, E.W., and Gómez, T.M. (2016). Guidance of axons by local coupling of retrograde flow to point contact adhesions. *J. Neurosci.* 36, 2267–2282.
44. Li, S., Overman, J.J., Katsman, D., Kozlov, S.V., Donnelly, C.J., Twiss, J.L., Giger, R.J., Coppola, G., Geschwind, D.H., and Carmichael, S.T. (2010). An age-related sprouting transcriptome provides molecular control of axonal sprouting after stroke. *Nat. Neurosci.* 13, 1496–1504.
45. Zamanian, J.L., Xu, L., Foo, L.C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R.G., and Barres, B.A. (2012). Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J. Neurosci.* 32, 6391–6410.
46. Hira, K., Ueno, Y., Tanaka, R., Miyamoto, N., Yamashiro, K., Inaba, T., Urabe, T., Okano, H., and Hattori, N. (2018). Astrocyte-derived exosomes treated with a semaphorin 3A inhibitor enhance stroke recovery via prostaglandin D₂ synthase. *Stroke* 49, 2483–2494.
47. Sferra, A., Petrini, S., Bellacchio, E., Nicita, F., Scibelli, F., Dentici, M.L., Alfieri, P., Cestra, G., Bertini, E.S., and Zanni, G. (2020). TUBB variants underlying different phenotypes result in altered vesicle trafficking and microtubule dynamics. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1385.
48. Wang, Y.-Y., Wu, H.-I., Hsu, W.-L., Chung, H.-W., Yang, P.-H., Chang, Y.-C., and Chow, W.-Y. (2014). In vitro growth conditions and development affect differential distributions of RNA in axonal growth cones and shafts of cultured rat hippocampal neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 61, 141–151.
49. Dupraz, S., Hilton, B.J., Husch, A., Santos, T.E., Coles, C.H., Stern, S., Brakebusch, C., and Bradke, F. (2019). RhoA controls axon extension independent of specification in the developing brain. *Curr. Biol.* 29, 3874–3886.e9.
50. Hu, J., and Selzer, M.E. (2017). RhoA as a target to promote neuronal survival and axon regeneration. *Neural Regen. Res.* 12, 525–528.
51. Klinger, M., Diekmann, H., Heinz, D., Hirsch, C., Hannbeck von Hanwehr, S., Petrusch, B., Oertle, T., Schwab, M.E., and Stuermer, C.A.O. (2004). Identification of two *nogo/rtn4* genes and analysis of Nogo-A expression in *Xenopus laevis*. *Mol. Cell. Neurosci.* 25, 205–216.
52. Govek, E.-E., Wu, Z., Acehan, D., Molina, H., Rivera, K., Zhu, X., Fang, Y., Tessier-Lavigne, M., and Hatten, M.E. (2018). Cdc42 regulates neuronal polarity during cerebellar axon formation and glial-guided migration. *iScience* 1, 35–48.
53. Matsuura, R., Tanaka, H., and Go, M.J. (2004). Distinct functions of Rac1 and Cdc42 during axon guidance and growth cone morphogenesis in *Drosophila*. *Eur. J. Neurosci.* 19, 21–31.
54. Castellanos-Montiel, M.J., Chaineau, M., and Durcan, T.M. (2020). The neglected genes of ALS: Cytoskeletal dynamics impact synaptic degeneration in ALS. *Front. Cell. Neurosci.* 14, 594975.
55. López-Murcia, F.J., Terni, B., and Llobet, A. (2015). SPARC triggers a cell-autonomous program of synapse elimination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, 13366–13371.
56. Furusawa, K., Asada, A., Urrutia, P., Gonzalez-Billault, C., Fukuda, M., and Hisanaga, S.-I. (2017). Cdk5 regulation of the GRAB-mediated Rab8-Rab11 cascade in axon outgrowth. *J. Neurosci.* 37, 790–806.
57. Van Batum, E.Y., Brignani, S., and Pasterkamp, R.J. (2015). Axon guidance proteins in neurological disorders. *Lancet Neurol.* 14, 532–546.
58. Overman, J.J., Clarkson, A.N., Wanner, I.B., Overman, W.T., Eckstein, I., Maguire, J.L., Dinov, I.D., Toga, A.W., and Carmichael, S.T. (2012). A role for ephrin-A5 in axonal sprouting, recovery, and activity-dependent plasticity after stroke. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, E2230–E2239.
59. Gleichman, A.J., and Carmichael, S.T. (2014). Astrocytic therapies for neuronal repair in stroke. *Neurosci. Lett.* 565, 47–52.
60. Li, C., Zhang, Y., Levin, A.M., Fan, B.Y., Teng, H., Ghannam, M.M., Chopp, M., and Zhang, Z.G. (2019). Distal axonal proteins and their related miRNAs in cultured cortical neurons. *Mol. Neurobiol.* 56, 2703–2713.

Please cite this article in press as: Heras-Romero et al., Improved post-stroke spontaneous recovery by astrocytic extracellular vesicles, Molecular Therapy (2021), <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.09.023>

61. Wang, T., Li, B., Yuan, X., Cui, L., Wang, Z., Zhang, Y., Yu, M., Xiu, Y., Zhang, Z., Li, W., et al. (2019). miR-20a plays a key regulatory role in the repair of spinal cord dorsal column lesion via PDZ-RhoGEF/RhoA/GAP43 axis in rat. *Cell. Mol. Neurobiol.* 39, 87–98.
62. Glaesel, K., May, C., Marcus, K., Matschke, V., Theiss, C., and Theis, V. (2020). miR-129-5p and miR-130a-3p regulate VEGFR-2 expression in sensory and motor neurons during development. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 3839.
63. Cárdenas-Rivera, A., Campero-Romero, A.N., Heras-Romero, Y., Penagos-Puig, A., Rincón-Heredia, R., and Tovar-Y-Romo, L.B. (2019). Early post-stroke activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 hinders the receptor 1-dependent neuroprotection afforded by the endogenous ligand. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 270.
64. Tovar-Y-Romo, L.B., Ramírez-Jarquín, U.N., Lazo-Gómez, R., and Tapia, R. (2014). Trophic factors as modulators of motor neuron physiology and survival: Implications for ALS therapy. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 61.
65. Iadecola, C. (2013). The pathobiology of vascular dementia. *Neuron* 80, 844–866.
66. Guo, M., Ma, X., Feng, Y., Han, S., Dong, Q., Cui, M., and Zhao, Y. (2019). In chronic hypoxia, glucose availability and hypoxic severity dictate the balance between HIF-1 and HIF-2 in astrocytes. *FASEB J.* 33, 11123–11136.
67. Hirayama, Y., and Koizumi, S. (2017). Hypoxia-independent mechanisms of HIF-1 α expression in astrocytes after ischemic preconditioning. *Glia* 65, 523–530.
68. Narayanan, S.V., Dave, K.R., and Perez-Pinzon, M.A. (2018). Ischemic preconditioning protects astrocytes against oxygen glucose deprivation via the nuclear erythroid 2-related factor 2 pathway. *Transl. Stroke Res.* 9, 99–109.
69. Coimbra-Costa, D., Garzón, F., Alva, N., Pinto, T.C.C., Aguado, F., Torrella, J.R., Carbonell, T., and Rama, R. (2021). Intermittent hypobaric hypoxic preconditioning provides neuroprotection by increasing antioxidant activity, erythropoietin expression and preventing apoptosis and astrogliosis in the brain of adult rats exposed to acute severe hypoxia. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 5272.
70. Ijichi, A., Sakuma, S., and Tofilon, P.J. (1995). Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression in normal rat astrocyte cultures. *Glia* 14, 87–93.
71. Chu, P.W.Y., Beart, P.M., and Jones, N.M. (2010). Preconditioning protects against oxidative injury involving hypoxia-inducible factor-1 and vascular endothelial growth factor in cultured astrocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 633, 24–32.
72. Mimura, J., Kosaka, K., Maruyama, A., Satoh, T., Harada, N., Yoshida, H., Satoh, K., Yamamoto, M., and Itoh, K. (2011). Nrf2 regulates NGF mRNA induction by carnosic acid in T98G glioblastoma cells and normal human astrocytes. *J. Biochem.* 150, 209–217.
73. Koyama, Y., Baba, A., and Matsuda, T. (2005). Endothelins stimulate the expression of neurotrophin-3 in rat brain and rat cultured astrocytes. *Neuroscience* 136, 425–433.
74. Lin, C.-H., Cheng, F.-C., Lu, Y.-Z., Chu, L.-F., Wang, C.-H., and Hsueh, C.-M. (2006). Protection of ischemic brain cells is dependent on astrocyte-derived growth factors and their receptors. *Exp. Neurol.* 201, 225–233.
75. Fornaro, M., Giovannelli, A., Foggetti, A., Muratori, L., Geuna, S., Novajra, G., and Perroteau, I. (2020). Role of neurotrophic factors in enhancing linear axonal growth of ganglionic sensory neurons *in vitro*. *Neural Regen. Res.* 15, 1732–1739.
76. Turney, S.G., Ahmed, M., Chandrasekar, I., Wysolmerski, R.B., Goeckeler, Z.M., Rioux, R.M., Whitesides, G.M., and Bridgman, P.C. (2016). Nerve growth factor stimulates axon outgrowth through negative regulation of growth cone actomyosin restraint of microtubule advance. *Mol. Biol. Cell* 27, 500–517.
77. Logan, A., Ahmed, Z., Baird, A., Gonzalez, A.M., and Berry, M. (2006). Neurotrophic factor synergy is required for neuronal survival and disinhibited axon regeneration after CNS injury. *Brain* 129, 490–502.
78. Bonsergent, E., Grisard, E., Buchrieser, J., Schwartz, O., Théry, C., and Lavieu, G. (2021). Quantitative characterization of extracellular vesicle uptake and content delivery within mammalian cells. *Nat. Commun.* 12, 1864.
79. Li, S., Hafeez, A., Noorulla, F., Geng, X., Shao, G., Ren, C., Lu, G., Zhao, H., Ding, Y., and Ji, X. (2017). Preconditioning in neuroprotection: From hypoxia to ischemia. *Prog. Neurobiol.* 157, 79–91.
80. Angelova, P.R., Kasymov, V., Christie, I., Sheikhbahaei, S., Turovsky, E., Marina, N., Korsak, A., Zwicker, J., Teschemacher, A.G., Ackland, G.L., et al. (2015). Functional oxygen sensitivity of astrocytes. *J. Neurosci.* 35, 10460–10473.
81. Hirayama, Y., Anzai, N., and Koizumi, S. (2021). Mechanisms underlying sensitization of P2X7 receptors in astrocytes for induction of ischemic tolerance. *Glia* 69, 2100–2110.
82. Tovar-Y-Romo, L.B., Kolson, D.L., Bandaru, V.V.R., Drewes, J.L., Graham, D.R., and Haughey, N.J. (2013). Adenosine triphosphate released from HIV-infected macrophages regulates glutamatergic tone and dendritic spine density on neurons. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 8, 998–1009.
83. Guitart, K., Loers, G., Buck, F., Bork, U., Schachner, M., and Kleene, R. (2016). Improvement of neuronal cell survival by astrocyte-derived exosomes under hypoxic and ischemic conditions depends on prion protein. *Glia* 64, 896–910.
84. Bondarenko, A., Svichar, N., and Chesler, M. (2005). Role of Na⁺-H⁺ and Na⁺-Ca²⁺ exchange in hypoxia-related acute astrocyte death. *Glia* 49, 143–152.
85. Park, S.J., Kim, J.M., Kim, J., Hur, J., Park, S., Kim, K., Shin, H.-J., and Chwae, Y.-J. (2018). Molecular mechanisms of biogenesis of apoptotic exosome-like vesicles and their roles as damage-associated molecular patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115, E11721–E11730.
86. Kakarla, R., Hur, J., Kim, Y.J., Kim, J., and Chwae, Y.-J. (2020). Apoptotic cell-derived exosomes: Messages from dying cells. *Exp. Mol. Med.* 52, 1–6.
87. Yaghoubi, S., Najminejad, H., Dabaghian, M., Karimi, M.H., Abdollahpour-Alitappeh, M., Rad, F., Mahi-Birjand, M., Mohammadi, S., Mohseni, F., Sobhani Lari, M., et al. (2020). How hypoxia regulate exosomes in ischemic diseases and cancer microenvironment? *IUBMB Life* 72, 1286–1305.
88. Liu, R., Wang, Z., Gou, L., and Xu, H. (2015). A cortical astrocyte subpopulation inhibits axon growth *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Med. Rep.* 12, 2598–2606.
89. Rigby, M.J., Gomez, T.M., and Puglielli, L. (2020). Glial cell-axonal growth cone interactions in neurodevelopment and regeneration. *Front. Neurosci.* 14, 203.
90. Li, Z., Moniruzzaman, M., Dastgheyb, R.M., Yoo, S.-W., Wang, M., Hao, H., Liu, J., Alaccia, P., Noguera-Ortiz, C., Kapogiannis, D., et al. (2020). Astrocytes deliver CK1 to neurons via extracellular vesicles in response to inflammation promoting the translation and amyloidogenic processing of APP. *J. Extracell. Vesicles* 10, e12035.
91. Goetzl, E.J., Yaffe, K., Peltz, C.B., Ledreux, A., Gorgens, K., Davidson, B., Granholm, A.-C., Mustapic, M., Kapogiannis, D., Tweedie, D., and Greig, N.H. (2020). Traumatic brain injury increases plasma astrocyte-derived exosome levels of neurotoxic complement proteins. *FASEB J.* 34, 3359–3366.
92. Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M.T., Baker, M., Browne, W.J., Clark, A., Cuthill, I.C., Dirnagl, U., et al. (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 18, e3000410.
93. Suzuki, S., Brown, C.M., and Wise, P.M. (2009). Neuroprotective effects of estrogens following ischemic stroke. *Front. Neuroendocrinol.* 30, 201–211.
94. Yeh, F.-C., Verstynen, T.D., Wang, Y., Fernández-Miranda, J.C., and Tseng, W.-Y.I. (2013). Deterministic diffusion fiber tracking improved by quantitative anisotropy. *PLoS ONE* 8, e80713.
95. Lauer, S.M., Schneeweiß, U., Brecht, M., and Ray, S. (2018). Visualization of cortical modules in flattened mammalian cortices. *J. Vis. Exp.* (131).
96. van der Walt, S., Schönberger, J.L., Nunez-Iglesias, J., Boulogne, F., Warner, J.D., Yager, N., Goullart, E., and Yu, T.; scikit-image contributors (2014). scikit-image: Image processing in Python. *PeerJ* 2, e453.