

## SECCIÓN ESPECIAL

# PROCEDIMIENTO PARA LA INFUSIÓN DE MITOCONDRIAS AUTÓLOGAS POR LA ARTERIA CARÓTIDA EN EL CEREBRO PORCINO

Miguel A. Orrego<sup>1,a</sup>, Samuel Levy<sup>2,b</sup>, Cory Kelly<sup>2,c</sup>, Gianfranco Arroyo<sup>1,d</sup>, Luz Toribio<sup>1,e</sup>, Hector H. García<sup>1,3,f</sup>, Melanie Walker<sup>2,g</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Inmunopatología en Neurocisticercosis, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

<sup>2</sup> Universidad de Washington, Escuela de Medicina, Departamento de Cirugía Neurológica y Centro de Neurociencia Aplicada, Seattle, Washington, Estados Unidos.

<sup>3</sup> Unidad de Cisticercosis, Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas, Lima, Perú.

<sup>a</sup> Biólogo, magíster en Bioquímica y Biología Molecular; <sup>b</sup> bachiller en Ciencias; <sup>c</sup> magíster en Ciencias; <sup>d</sup> médico veterinario, magíster en Ciencias Veterinarias; <sup>e</sup> bióloga, bachiller en Biología; <sup>f</sup> médico, doctor en Filosofía; <sup>g</sup> doctora en Medicina.

## RESUMEN

Las mitocondrias son organelas complejas que desempeñan un papel fundamental en la célula, la disfunción mitocondrial puede ocasionar daños celulares significativos o la muerte. Estudios previos han demostrado los prometedores efectos terapéuticos del trasplante de mitocondrias autólogas a un tejido cardíaco isquémico, sin embargo, pocos estudios han evaluado los efectos *in vivo* de la infusión de mitocondrias en el cerebro. El presente trabajo tiene como objetivo dar a conocer el procedimiento para la infusión vía carótida de mitocondrias autólogas en cerebros porcinos. Mediante esta técnica de infusión, proponemos que una administración selectiva y mínimamente invasiva es factible y puede proporcionar beneficios en el tratamiento de diversas patologías del sistema nervioso central.

**Palabras clave:** Mitocondria; Microcatéter; Infusión; Carótida; Cerebro; Cerdo (Fuente: DeCS BIREME).

## PROCEDURE FOR AUTOLOGOUS MITOCHONDRIA INFUSION VIA THE CAROTID ARTERY INTO PORCINE BRAIN

## ABSTRACT

Mitochondria are complex organelles that play a critical role within the cell; mitochondrial dysfunction can result in significant cell damage or death. Previous studies have demonstrated the promising therapeutic effects of autologous mitochondria transplantation into ischemic cardiac tissue; however, few studies have examined the *in vivo* effects of mitochondria infusion into the brain. The aim of this study is to report a procedure for carotid infusion of autologous mitochondria into porcine brains. By using this infusion technique, we propose that a selective and minimally invasive administration is feasible and may provide benefits in the treatment of various central nervous system disorders.

**Keywords:** Mitochondria; Microcatheter; Infusion; Carotid; Brain; Porcine (Source: MeSH NLM).

**Citar como:** Orrego MA, Levy S, Kelly C, Arroyo G, Toribio L, García HH, *et al.* Procedimiento para la infusión de mitocondrias autólogas por la arteria carótida en cerebro porcino. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2020;38(2):345-51. doi: <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2021.382.7768>

**Correspondencia:** Miguel A. Orrego; Laboratorio de Inmunopatología en Neurocisticercosis, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Av. Honorio Delgado 430, SMP, Lima, Perú; miguel.orrego@upch.pe.

**Recibido:** 30/03/2021  
**Aprobado:** 02/06/2021  
**En línea:** 01/07/2021

## INTRODUCCIÓN

El trasplante mitocondrial se ha realizado como tratamiento terapéutico en cuadros de isquemia cardíaca y lesiones de reperfusión tanto en animales <sup>(1)</sup> como en seres humanos <sup>(2)</sup>. Estos estudios demuestran que la infusión de mitocondrias autólogas, es decir, aisladas del propio tejido del paciente, compensa la disminución o pérdida de la función mitocondrial en células locales dañadas durante la isquemia y mejora la recuperación posisquemia. Estudios preclínicos <sup>(1)</sup> y ensayos de bioseguridad <sup>(3)</sup> han demostrado que el procedimiento es bien tolerado, sin que se reporte inmunorreactividad <sup>(4)</sup>, lesiones locales o efectos sistémicos adversos. Actualmente se continúan realizando estudios para comprender el o los mecanismos

implicados en la internalización de las mitocondrias extracelulares, su longevidad una vez trasplantados y la cuantificación de sus efectos, entre otros aspectos.

Estudios *in vitro* (5,6) y en modelo murino realizando infusión directa de mitocondrias autólogas en la médula espinal y en tejido cerebral han demostrado efectos igualmente positivos para una serie de diferentes afecciones neurológicas como traumatismos (7,8), esquizofrenia (9), enfermedad de Parkinson (10) e isquemia cerebral (11,12). El trasplante xenogénico también ha mostrado resultados prometedores tras la inyección local intracerebral o intraarterial en cerebros isquémicos de ratas (13) y en el modelo experimental de Parkinson en ratones (14).

A diferencia del tejido cardíaco, el sistema nervioso central presenta un desafío para el tratamiento de muchas patologías que es lograr el paso de agentes terapéuticos a través de la barrera hematoencefálica (BHE) que limita la entrada y absorción de diversas moléculas (15), sin embargo, diversos cuadros neuropatológicos están asociados a una disrupción de la BHE y a daño tisular (16). El aumento de la permeabilidad de la BHE puede lograrse mediante el uso de soluciones hiperosmóticas como el manitol (17), poliol de 6 carbonos con actividad diurética, ampliamente utilizado en ensayos clínicos y aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamento (FDA) de los Estados Unidos.

En el presente trabajo, desarrollamos una metodología para la infusión mitocondrial vía carótida al cerebro porcino. Adicionalmente, aumentamos la permeabilidad de la BHE para garantizar el ingreso de las mitocondrias. Concluimos que la infusión con microcatéter es una opción factible para estudiar a futuro el potencial uso terapéutico de la infusión mitocondrial en diversas patologías.

## DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Se emplearon tres cerdos hembra cuyas edades oscilaron entre los dos y seis meses. Dos fueron empleados para evaluar la infusión de mitocondrias y uno como control. En todos los animales se accedió bilateralmente a la arteria carótida; la arteria izquierda para la inyección de manitol con el objetivo de generar disrupción en la BHE; en la arteria contralateral no se inyectó manitol, de esta forma cada cerebro contó con su propio hemisferio control sin disrupción de la BHE. Esto permitió reducir al mínimo el número de animales requeridos para el presente estudio.

### Aspectos éticos

Los animales fueron alimentados y mantenidos con libre acceso a agua hasta un día antes de la intervención. El manejo de los animales se realizó cumpliendo las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Animales

del Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS). El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética Institucional para el uso y manejo de animales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (SIDISI 201478). Los animales fueron sedados empleando una inyección intramuscular de ketamina (10 mg/kg) y xilacina (2 mg/kg). Se afeitaron los lugares de intervención seguido de lavado con jabón. Posteriormente, se procedió con la intubación endotraqueal de los animales y se mantuvieron sedados con dosis intravenosas de ketamina (5 mg/kg) cada 20 minutos. Todo el procedimiento quirúrgico cerebrovascular con microcatéteres se ejecutó en un ambiente estéril.

### Colecta de biopsias de músculo esquelético

En los dos cerdos elegidos para la infusión de mitocondrias, la zona seleccionada para la toma de biopsias fue la pierna posterior. El área fue desinfectada con una solución de yodo povidona (10%) y se realizó una pequeña incisión con una hoja de bisturí n.º 11 (USA Medical, St. Louis, MO; EE. UU). Se colectaron tres muestras del músculo grácil por cada cerdo empleando un punzón para biopsias n.º 6 (Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU). Se transportaron las muestras en tubos estériles de 50 mL con 20 mL de tampón fosfato salino (PBS pH 7,4) dentro de un contenedor con hielo. Finalmente se aplicó presión en la zona de la biopsia y se suturó.

### Aislamiento y purificación de las mitocondrias

Se aislaron las mitocondrias en una cabina de flujo laminar, siguiendo el protocolo de Preble (18). Se transfirió cada muestra a un tubo de 15 mL con 10 mL de tampón de homogeneización (sucrosa 300 mM; HEPES 10 mM; EDTA 1 mM; todos de la marca Sigma-Aldrich, ST. Louis, EE. UU) y se disgregó empleando un homogeneizador (Omni International, Kennesaw, GA, EE. UU) en 4 ciclos de 60 segundos. Luego se agregaron 250 µL de una solución de tripsina (4 mg de tripsina disueltos en 1 mL de tampón de homogeneización) y se incubó por 10 minutos en frío. Cada muestra se pasó a un nuevo tubo de 15 mL a través de un filtro celular de 40 µm (Falcon) humedecido con tampón de homogeneización frío. Luego se agregaron 250 µL de una solución de BSA (20 mg de BSA disueltos en 1 mL de tampón de homogeneización). Las muestras se pasaron por filtros de 40 y 10 µm humedecidos con tampón de homogeneización. Se centrifugaron a 9000 G (9000 × g) por 10 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en tampón de respiración (sucrosa 250 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; HEPES 20 mM, EDTA 0,5 mM; todos de la marca Sigma-Aldrich, ST. Louis, EE. UU).

### Viabilidad y marcado de mitocondrias

Se procedió a tomar una alícuota de 1 ml de la suspensión de mitocondrias y se incubó con MitoView Green (Biotium,

Fremont, CA, EE. UU.) (200 nM) por 30 minutos para determinar el número total de mitocondrias obtenidas, luego se incubaron con Mitotracker Red CM-H<sub>2</sub>Xros (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) (500 nM) por 30 minutos para determinar el número de mitocondrias viables. Se realizó el conteo utilizando un hemocitómetro y las imágenes fueron tomadas con microscopia confocal (Zeiss, LSM880, Oberkochen, Alemania). Se obtuvo el promedio y desviación estándar del conteo de mitocondrias totales y viables a partir de las tres muestras de músculo colectadas por cada cerdo. Antes de proceder con la infusión, el resto de las mitocondrias reconstituidas se incubaron con un anticuerpo monoclonal antimitocondria hecho en ratón (ABcam ab14730, Cambridge, Reino Unido) a una concentración de 1 µg/mL por 30 minutos a 4 °C.

### **Acceso vascular y disrupción de la barrera hemoencefálica**

Empleando como referencia el manubrio del esternón y la asistencia por ultrasonido, se realizaron incisiones con una hoja de bisturí n.º 11 y se accedió bilateralmente a la arteria carótida. Se introdujo en la arteria izquierda una aguja ecogénica calibre 21 × 7 mm con guía de mandril de 0,018 × 40 cm del kit de microintroducción (Braun, Bethlehem, PA, EE. UU.) y se avanzó hasta observar un flujo pulsátil. Empleando la técnica de Seldinger<sup>(19)</sup>, se reemplazó la aguja con un microcatéter con dilatador y, luego de una aspiración, se colocó una vía para goteo intraarterial de solución salina al 0,9%. Para proceder con la disrupción osmótica de la BHE<sup>(17)</sup> se aplicó manitol a 0,25 mL/s por kg durante 20 segundos.

### **Infusión cerebral de mitocondrias autólogas por microcatéter**

Luego de transcurridos cinco minutos de iniciada la disrupción osmótica de la BHE<sup>(21)</sup>, se retiró la vía con solución salina y se utilizó una jeringa estéril de 10 mL para administrar 5 mL de la resuspensión de mitocondrias marcadas seguido de 10 mL de tampón de respiración. Se retiró el microcatéter de la arteria carótida izquierda, se aplicó presión manual por 15 minutos y se suturaron tejidos profundos y superficiales. Este procedimiento se repitió con la sección contralateral, con la excepción de que no se realizó la disrupción osmótica de la BHE. En el caso del cerdo control, se infundió solo con tampón de respiración.

### **Inmunofluorescencia en biopsias de cerebro**

Luego de 4 horas, los animales fueron sacrificados con una dosis letal de pentobarbital (120 mg/kg), se colectaron los tres cerebros, se analizó cada hemisferio por separado y se lo cortó en secciones de 10 mm. Las muestras fueron fijadas en formalina tamponada neutra al 10% por 24 ho-

ras, transferidas a etanol del 70% y embebidas en parafina. Se realizaron cortes de 4 µm y se colocaron en láminas portaobjetos tratadas con poli-L-lisina. Las secciones fueron desparafinadas a 56 °C, rehidratadas en una batería decreciente de alcoholes (100% a 70%) y permeabilizadas en *buffer* citrato (10 mM de ácido cítrico 0,05% de Tween 20, pH 6,0) a 95 °C por 30 minutos. Luego las secciones fueron incubadas por 30 minutos con solución de bloqueo (PBS pH 7,2; 0,05% de Tween 20; 0,1% de Triton X-100; 2% de suero de cabra; 2% de BSA) a temperatura ambiente en cámara húmeda, luego incubadas a 4 °C por toda la noche con un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con fluoresceína hecho en cabra (ABcam, Cambridge, Reino Unido) diluido 1/800 en PBS, lavadas tres veces por dos minutos con solución de lavado (PBS pH 7,2; 0,05% de Tween 20) y cubiertas con solución de montaje con DAPI (VectaShield, Vector, Laboratories, Burlingame, Ca, EE. UU.). Se tomaron las imágenes con microscopio confocal, con un objetivo de 10X (Zeiss, LSM880, Oberkochen, Alemania).

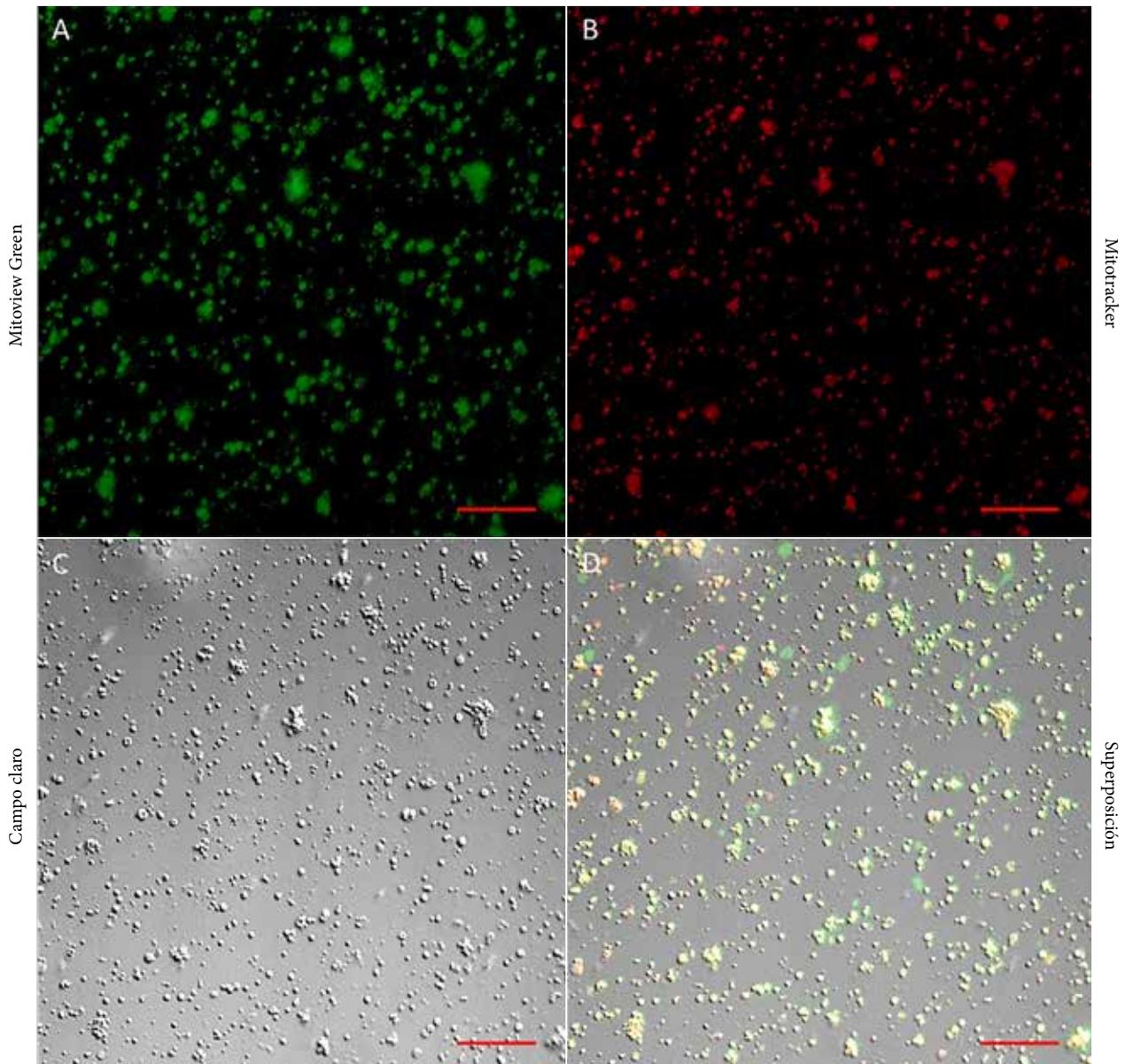
## **RESULTADOS DE LA APLICACIÓN DEL PROCEDIMIENTO**

### **Viabilidad y cuantificación mitocondrial**

La cuantificación de mitocondrias totales aisladas de tejido muscular empleando hemocitómetro y la señal verde producto de la tinción con Mitoview Green (Figura 1A) determinó una concentración total promedio de  $1,05 \times 10^7 \pm 7,20 \times 10^5$  mitocondrias por mL. Sin embargo, la cuantificación basada en la señal roja del Mitotracker (Figura 1B), correspondiente a las mitocondrias con un potencial de membrana intacto, determinó una concentración aproximada del 63% de mitocondrias viables ( $6,61 \times 10^6 \pm 9,90 \times 10^5$  mitocondrias por mL).

### **Acceso arterial e infusión**

Se realizó con éxito el acceso y microcateterización a las arterias carótidas, y se logró así la infusión de  $5,24 \times 10^7 \pm 3,59 \times 10^6$  mitocondrias autólogas marcadas y reconstituidas en 5 mL de tampón de respiración. El tiempo del procedimiento, incluyendo la colecta de las muestras de músculo, acceso vascular, aislamiento e infusión mitocondrial en los dos cerdos experimentales fue de 48 y 42 minutos; 40 minutos aproximadamente dedicados al aislamiento, cuantificación y marcaje de las mitocondrias. El tiempo desde el inicio de la sedación hasta el retiro de tubos en los animales fue de aproximadamente 90 minutos. No se presentaron dificultades en la microcateterización, tampoco se presentaron otras complicaciones como inestabilidad hemodinámica, neumotórax, perforación vascular, accidentes cerebrovasculares o hematomas en las zonas de incisión.



**Figura 1.** Rendimiento y viabilidad mitocondrial. Imágenes representativas de la doble tinción en mitocondrias aisladas a partir de biopsias de músculo esquelético. El conteo de mitocondrias totales se realizó empleando la señal verde del Mitoview Green (1A), el porcentaje de mitocondrias viables se obtuvo empleando la señal roja del Mitotracker (1B), las mitocondrias también se observaron a campo claro (1C), la colocalización de las señales verde y roja se muestra en (1D). Las imágenes se capturaron con microscopio confocal empleando el objetivo 20X. Barra de escala: 20  $\mu$ m.

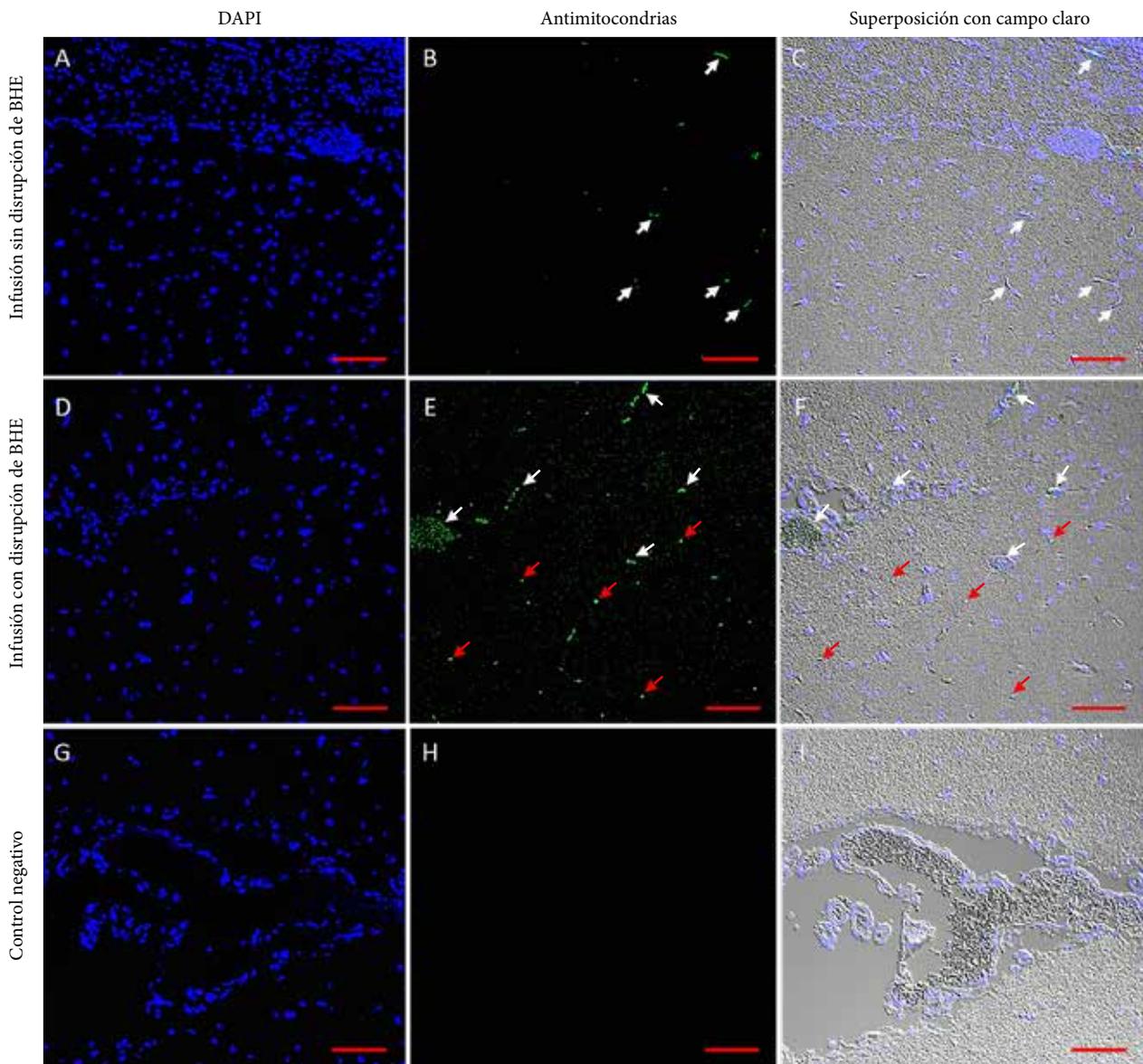
### Evaluaciones posinfusión

Muestras de diversas regiones corticales en cada uno de los cerebros se colectaron y evaluaron por triplicado mediante inmunofluorescencia. En la Figura 2 se muestran imágenes representativas de secciones del lóbulo frontal con y sin disrupción de la BHE. En ausencia de disrupción osmótica se observaron pocas mitocondrias marcadas y solo dentro del lumen de los capilares (Figura 2B-C). No se observaron cúmulos o áreas focales de agregación y fueron completamente ausentes en el parénquima cerebral. Luego de ocasionar la disrupción de la BHE, empleando una solución hiperosmótica de manitol, se observó una mayor concentración de

mitocondrias marcadas en todas las regiones de la corteza y a través del parénquima en pequeños cúmulos de forma difusa y en patrones lineales (Figura 2D-F). La muestra control a la que se infundió solo tampón de respiración no dio señal con ni sin disrupción de la BHE (Figura 2G-I).

### DISCUSIÓN

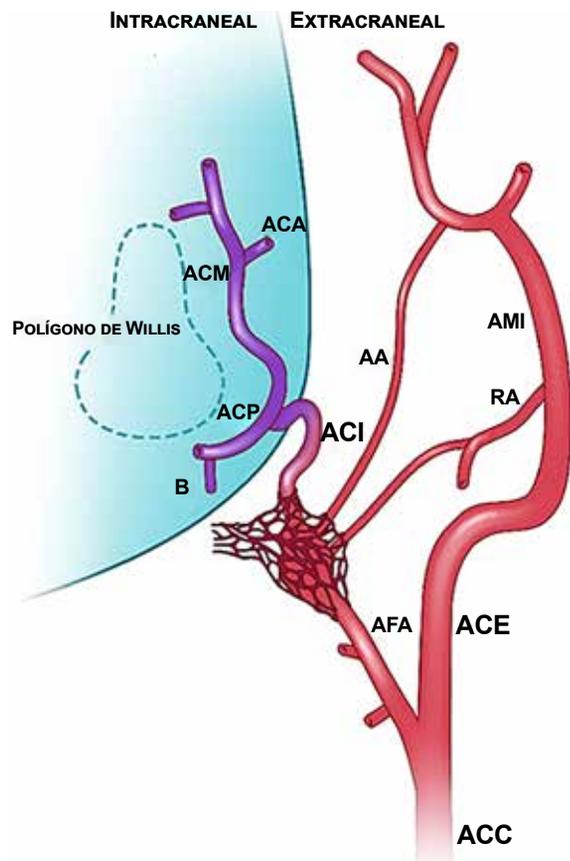
Este estudio constituye el primer reporte exitoso de infusión vía carótida de mitocondrias autólogas en el cerebro porcino, en el que se observa el ingreso de mitocondrias extracelulares al parénquima cerebral luego de alterar la permeabi-



**Figura 2.** Mitocondrias autólogas infundidas en el cerebro porcino. Imágenes representativas de tejido cerebral luego de infundirse las mitocondrias. Muestras de cerebro con integridad de la BHE (2A-C), se observan pocas mitocondrias en el lumen de los capilares (flechas blancas). El parénquima no presentó señal positiva para mitocondrias. Muestras con disrupción osmótica de la BHE (2D-F), se observa una gran cantidad de mitocondrias presentes en capilares (Flechas blancas) y en forma de cúmulos dentro del parénquima (Flechas rojas). Muestra control a la que se le infundió tampón de respiración (2G-I), no se observó señal positiva para mitocondrias. Secciones histológicas de 4  $\mu\text{m}$  fueron teñidas con DAPI (2A, D, G), tratadas con un anticuerpo anti-IgG (2B, E, H). La superposición de ambas señales en campo claro se observa en (2C, F, I). Las imágenes fueron captadas con microscopio confocal empleando el objetivo 10X. Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ .

lidad de la BHE con manitol. En mamíferos sanos, el paso de iones, moléculas y células está limitado por la BHE, interfaz estructural y química entre el cerebro y el sistema circulatorio<sup>(15)</sup>. La permeabilidad de la BHE puede aumentar durante determinadas condiciones patológicas<sup>(15,16,21)</sup> pero también puede modularse temporalmente con agentes osmóticos<sup>(19)</sup>. Adicionalmente, se han establecido la dosis y el tiempo para la disrupción con manitol, y se han observado sus efectos temporales, por lo que se requiere de una apropiada sincronización entre disrupción de la BHE y la infusión de mitocondrias para aprovechar las alteraciones osmóticas.

Un desafío adicional en la adaptación de métodos experimentales con cerdos es su particular anatomía. Este procedimiento requiere un conocimiento detallado de las estructuras vasculares porcinas<sup>(26,27)</sup> para el posicionamiento cuidadoso del microcatéter y la técnica de infusión que permitan el ingreso de las mitocondrias infundidas al cerebro y no a tejidos extracraniales. La *rete mirabile* suele considerarse una barrera estructural adicional para los procedimientos cerebro vasculares porcinos, sin embargo, el diámetro de las microarterias de la *rete mirabile* oscilan entre los 50 y 250  $\mu\text{m}$ <sup>(28)</sup>, lo que permite el paso de las mitocon-



**Figura 3.** Vasculatura cervical e intracraneal porcina. La *rete mirabile* es una estructura en forma de malla situada en el extremo terminal de la arteria faríngea ascendente. En cerdos, la arteria carótida interna sirve para conectar la *rete* con el polígono de Willis. AA: arteria anastomótica; ACA: arteria cerebral anterior; AFA: arteria faríngea ascendente; B: arteria basilar; ACC: arteria carótida común; ACE: arteria carótida externa; ACI: arteria carótida interna; AMI: arteria maxilar interna; ACM: arteria cerebral media; ACP: arteria comunicante posterior; RA: rama anastomótica suministrada por la arteria meníngea media. Ilustración realizada por Emma C. Vought por encargo de la Dra. Melanie Walker.

drias cuyo diámetro es menor a  $1 \mu\text{m}$  <sup>(29)</sup>. Se ha demostrado el ingreso y localización en el cerebro de partículas de hasta  $30 \mu\text{m}$  de tamaño después de la inyección vía carótida <sup>(16)</sup>, lo que sugiere que el paso más allá de la *rete* es posible. Dada la extensa red colateral, es posible que algunas mitocondrias infundidas se hayan desviado a otros tejidos, sin embargo, nosotros nos centramos en evaluar su ingreso al cerebro y no evaluamos otros tejidos.

Empleando metodologías validadas <sup>(1, 3, 17, 22)</sup> y técnicas estándares de administración arteriográfica cerebrovascular <sup>(18, 23, 24)</sup>, el procedimiento pudo completarse en 45 minutos aproximadamente. Por otra parte, no se ha establecido una dosis de mitocondrias para el cerebro, pero en estudios de isquemia cardíaca determinan una dosis adecuada de  $1 \times 10^9$  mitocondrias <sup>(3, 1)</sup>. Los estudios cardíacos se encuentran más avanzados y solo existen modelos murinos de infusión cerebral. En todos los estudios publicados, en los que se

ha empleado el modelo murino, varían las dosis y los métodos de infusión. En esta evaluación, empleamos el rendimiento obtenido con 0,1 g de músculo esquelético y un número máximo de  $1 \times 10^9$  mitocondrias. Sin embargo, considerando la técnica de administración vascular, el flujo sanguíneo cerebral en el cerdo, el volumen de sangre en el cerebro <sup>(30)</sup> y la posible desviación por la anatomía de la *rete mirabile* de la arteria carótida en los cerdos <sup>(26)</sup>, la dosis establecida para la infusión de mitocondrias fue de  $5 \times 10^7$ . Las muestras permitieron obtener un total de  $1,1 \times 10^7 - 2,4 \times 10^{10}$  mitocondrias, asegurando la cuantificación y la administración en la dosis establecida. Nuestros hallazgos en el rendimiento y la viabilidad de las mitocondrias aisladas de tejido muscular esquelético concuerdan con experimentos realizados en otros animales <sup>(1, 3, 17, 22, 25)</sup> y seres humanos <sup>(2)</sup>.

Inicialmente, consideramos la coinfusión del colorante vital azul de Evans para lograr una fácil interpretación macroscópica de la permeabilidad de la BHE, sin embargo, al no haberse realizado estudios que confirmen si existe o no una toxicidad directa sobre las mitocondrias aisladas al emplear este colorante <sup>(20)</sup>, decidimos no incluirlo.

En conclusión, en este trabajo experimental se detallan los procedimientos empleados para el aislamiento e infusión de mitocondrias autólogas en el cerebro porcino de una forma segura utilizando equipos estándares y protocolos validados. Este estudio demuestra el ingreso de mitocondrias en el tejido cerebral luego de la infusión vía carótida en cerdos cuya BHE ha sido alterada osmóticamente. Se requieren mayores estudios para determinar la distribución específica de las mitocondrias infundidas y los mecanismos involucrados en la internalización de mitocondrias autólogas en los diversos tipos de células nerviosas (neuronas o glías).

El potencial beneficio de la infusión de mitocondrias puede aplicarse a todo un espectro de enfermedades neurológicas y la inyección vía carótida en un modelo porcino constituye una herramienta útil para su evaluación.

**Agradecimientos:** Los autores desean agradecer a los doctores Juan F. Calcina, Ana Vargas Calla y Elton Sánchez por su experiencia y apoyo. Al Dr. James McCully por su asesoría, Al Dr. Yashar Kalani por las sugerencias experimentales, a Emma Vought por la ilustración de la vasculatura cerebral porcina y a Kris Oshiro por su apoyo en la redacción de los protocolos de buenas prácticas para la infusión de mitocondrias empleando microcatéteres.

**Contribuciones de los autores:** MW y HHG participaron en la concepción del estudio; MW, SL y CK, en el diseño experimental; MW, SL, CK, MAO, GA, LT y HHG, en la obtención y análisis de datos; SL, en la redacción del primer borrador del manuscrito; MW, SL, CK, MAO y HHG, en la revisión crítica del artículo. Todos los autores han leído y aprobado la versión final.

**Financiamiento:** MAO, GA y LT recibieron el apoyo parcial de la beca de capacitación del Centro Internacional Fogarty-NIH (TW001140).

**Conflictos de intereses:** Los autores declaran no presentar conflictos de interés en la publicación del artículo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- McCully JD, Cowan DB, Emani SM, Del Nido PJ. Mitochondrial transplantation: From animal models to clinical use in humans. *Mitochondrion*. 2017; 34: 127-34. doi: 10.1016/j.mito.2017.03.004.
- Emani SM, Piekarski BL, Harrild D, Del Nido PJ, McCully JD. Autologous mitochondrial transplantation for dysfunction after ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2017; 154: 286-289. doi: 10.1016/j.jtcvs.2017.02.018.
- Shin B, Saeed MY, Esch JJ, Guariento A, Blitzer D, Moskowitzova K, *et al.* A Novel Biological Strategy for Myocardial Protection by Intracoronary Delivery of Mitochondria: Safety and Efficacy. *JACC Basic Transl Sci*. 2019; 4: 871-888. doi: 10.1016/j.jacbs.2019.08.007.
- Ramirez-Barbieri G, Moskowitzova K, Shin B, Blitzer D, Orfany A, Guariento A, *et al.* Alloreactivity and allorecognition of syngeneic and allogeneic mitochondria. *Mitochondrion*. 2019; 46: 103-115. doi: 10.1016/j.mito.2018.03.002.
- Hayakawa K, Esposito E, Wang X, Terasaki Y, Liu Y, Xing C, *et al.* Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature*. 2016; 535: 551-555. doi: 10.1038/nature18928
- Liu K, Guo L, Zhou Z, Pan M, Yan C. Mesenchymal stem cells transfer mitochondria into cerebral microvasculature and promote recovery from ischemic stroke. *Microvasc Res*. 2019; 123: 74-80. doi: 10.1016/j.mvr.2019.01.001.
- Fang SY, Roan JN, Lee JS, Chiu MH, Lin MW, Liu CC, *et al.* Transplantation of viable mitochondria attenuates neurologic injury after spinal cord ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2019; 14: 32775-8. doi: 10.1016/j.jtcvs.2019.10.151.
- Gollihue JL, Patel SP, Eldahan KC, Cox DH, Donahue RR, Taylor BK, *et al.* Effects of mitochondrial transplantation on bioenergetics, cellular incorporation, and functional recovery after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2018; 35: 1800-1818. doi: 10.1089/neu.2017.5605.
- Robicsek O, Ene HM, Karry R, Ytzhaki O, Asor E, McPhie D, *et al.* Isolated mitochondria transfer improves neuronal differentiation of schizophrenia-derived induced pluripotent stem cells and rescues deficits in a rat model of the disorder. *Schizophr Bull*. 2018; 44: 432-442. doi: 10.1093/schbul/sbx077.
- Chang JC, Wu SL, Liu KH, Chen YH, Chuang CS, Cheng FC, *et al.* Allogeneic/xenogeneic transplantation of peptide-labeled mitochondria in Parkinson's disease: restoration of mitochondria functions and attenuation of 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Transl Res*. 2016; 170: 40-56. doi: 10.1016/j.trsi.2015.12.003.
- Heyck M, Bonsack B, Zhang H, Sadanandan N, Cozene B, Kingsbury C, *et al.* The brain and eye: treating cerebral and retinal ischemia through mitochondrial transfer. *Exp Biol Med Exp Biol Med (Maywood)*. 2019; 244: 1485-1492. doi: 10.1177/1535370219881623.
- Zhang Z, Ma Z, Yan C, Pu K, Wu M, Bai J, *et al.* Muscle-derived autologous mitochondrial transplantation: a novel strategy for treating cerebral ischemic injury. *Behav Brain Res*. 2019; 356: 322-331. doi: 10.1016/j.bbr.2018.09.005
- Huang PJ, Kuo CC, Lee HC, Shen CI, Cheng FC, Wu SF, *et al.* Transferring Xenogenic Mitochondria Provides Neural Protection Against Ischemic Stress in Ischemic Rat Brains. *Cell Transplant*. 2016; 25: 913-27. doi: 10.3727/096368915X689785.
- Shi X, Zhao M, Fu C, Fu A. Intravenous administration of mitochondria for treating experimental Parkinson's disease. *Mitochondrion*. 2017; 34: 91-100. doi: 10.1016/j.mito.2017.02.005.
- Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev*. 2005; 57: 173-185. doi: 10.1124/pr.57.2.4.
- Alroy KA, Arroyo G, Gilman RH, Gonzales-Gustavson E, Gallegos L, Gavidia CM, *et al.* Carotid Taenia solium Oncosphere Infection: A Novel Porcine Neurocysticercosis Model. *Am J Trop Med Hyg*. 2018; 99: 380-387. doi: 10.4269/ajtmh.17-0912.
- Cosolo WC, Martinello P, Louis WJ, Christophidis N. Blood-brain barrier disruption using mannitol: time course and electron microscopy studies. *Am J Physiol*. 1989; 256: R443-R447. doi: 10.1152/ajpregu.1989.256.2.R443.
- Preble JM, Pacak CA, Kondo H, MacKay AA, Cowan DB, McCully JD. Rapid isolation and purification of mitochondria for transplantation by tissue dissociation and differential filtration. *JoVE*. 2014; 91: e51682. doi: 10.3791/51682.
- Seldinger SI. Catheter replacement of the needle in percutaneous arteriography; a new technique. *Acta Radiol*. 1953; 39: 368-376. doi: 10.3109/00016925309136722.
- Saunders NR, Dziegielewska KM, Møllgård K, Habgood MD. Markers for blood-brain barrier integrity: how appropriate is Evans blue in the twenty-first century and what are the alternatives?. *Front Neurosci*. 2015; 385: 1-16. doi: 10.3389/fnins.2015.00385.
- Bellavance MA, Blanchette M, Fortin D. Recent advances in blood-brain barrier disruption as a CNS delivery strategy. *AAPS J*. 2008; 10: 166-177. doi: 10.1208/s12248-008-9018-7.
- Rasmussen HN, Andersen AJ, Rasmussen UF. Optimization of preparation of mitochondria from 25-100 mg skeletal muscle. *Anal Biochem*. 1997; 252: 153-9. doi: 10.1006/abio.1997.2304.
- Blanc R, Piotin M, Mounayer C, Spelle L, Moret J. Direct cervical arterial access for intracranial endovascular treatment. *Neuroradiology*. 2006; 48: 925-929. doi: 10.1007/s00234-006-0157-1.
- Dorfer C, Standhardt H, Gruber A, Ferraz-Leite H, Knosp E, Bavinszki G. Direct percutaneous puncture approach versus surgical cutdown technique for intracranial neuroendovascular procedures: technical aspects. *World Neurosurg*. 2012; 77: 192-200. doi: 10.1016/j.wneu.2010.11.007.
- Frezza C, Cipolat S, Scorrano L. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle, and cultured fibroblasts. *Nat Protoc*. 2007; 2: 287-295. doi: 10.1038/nprot.2006.478
- Dondelinger RF, Ghysels MP, Brisbois D, Donkers E, Snaps FR, Saunders J, *et al.* Relevant radiological anatomy of the pig as a training model in interventional radiology. *Eur Radiol*. 1998; 8: 1254-1273. doi: 10.1007/s003300050545.
- Kagetsu NJ, Berenstein A, Choi IS. Interventional radiology of the extracranial head and neck. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 1991; 14: 325-333. doi: 10.1007/BF02577890.
- Massoud TF, Vinters HV, Chao KH, Viñuela F, Jahan R. Histopathologic characteristics of a chronic arteriovenous malformation in a swine model: preliminary study. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2000; 21: 1268-1276. PMID: 10954279.
- Miettinen TP, Björklund M. Mitochondrial Function and Cell Size: An Allometric Relationship. *Trends Cell Biol*. 2017; 27: 393-402. doi: 10.1016/j.tcb.2017.02.006.
- Sakoh M, Röhl L, Gyldensted C, Gjedde A, Ostergaard L. Cerebral blood flow and blood volume measured by magnetic resonance imaging bolus tracking after acute stroke in pigs: comparison with [(15)O]H(2)O positron emission tomography. *Stroke*. 2000; 31: 1958-64. doi: 10.1161/01.str.31.8.1958.