



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

***DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS***  
*Instituto de Fisiología Celular*

**ACTIVACIÓN DIFERENCIAL DE LOS RECEPTORES PARA  
EL FACTOR DE CRECIMIENTO VASCULAR ENDOTELIAL  
COMO MECANISMO DE NEUROPROTECCIÓN EN EL INFARTO  
CEREBRAL ISQUÉMICO**

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

**PRESENTA:**  
Alfredo Cárdenas Rivera

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

**Comité tutor:**  
Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez  
*Instituto de Investigaciones Biomédicas*  
Dra. Paula Liconá Limón  
*Instituto de Fisiología Celular*

Ciudad Universitaria, Ciudad de México agosto del 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## CARTA BIBLIOTECA

CONTRAPORTADA

**OFICIO DE JURADO PARA EXAMEN DE GRADO**

## **AGRADECIMIENTOS OFICIALES**

Este proyecto fue realizado con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CB219542) y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (PAPIIT IA2011315 e IN226617) y se contó con la beca de doctorado del CONACYT (280986).

Agradezco las facilidades brindadas para la realización del trabajo experimental de la Q.F.B. Cristina Aranda Fraustro, de la Dra. Ruth Rincón Heredia de la Unidad de Imagenología, de los ingenieros Aurey Galván Lobato y Manuel Ortínez Benavides, de la Dra. Laura Ongay Larios de la unidad de Biología Molecular, y de las unidades de Histología y Bioterio del I.F.C.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los miembros de mi comité tutor:

- Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez.
- Dra. Paula Licon Limón.
- Dr. Luis B. Tovar y Romo.

Por sus consejos, dirección y apoyo a lo largo de la realización de este proyecto y mi crecimiento académico.

Agradezco el apoyo logístico y administrativo para la realización del presente trabajo al Q.F.B. Cristina Aranda Fraustro y al Dr. Josué Orlando Ramirez Jarquin. Por el asesoramiento y apoyo en el manejo de las imágenes de inmunofluorescencia a la Dra. Ruth Rincón Heredia de la Unidad de Imagenología. A la Dra. Yazmín Ramiro Cortés por su apoyo y asesoramiento en la microscopia multifotónica. A la Dra. Gabriela Meneses Ruiz por su apoyo en los ensayos milliplex. A los ingenieros Aurey Galván Lobato y Manuel Ortínez Benavides del taller de Mantenimiento electrónico, eléctrico y mecánico; por su asesoramiento y disposición para el desarrollo del concepto del bastidor móvil para los experimentos de dos fotones. A la Dra. Laura Ongay Larios de la unidad de Biología Molecular por su apoyo en los ensayos de amplificación en tiempo real. A Daniela Rodríguez y Teresa Cortes de la unidad de Histología por el apoyo en el procesamiento de las muestras. Y a la M.V.Z. Claudia V. Rivera Cerecedo del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular.

A mis padres, hermanos y sobrinos por su infinito amor, paciencia, apoyo y comprensión, por ser la luz de mi vida día a día.

A Tania por ser el pilar más fuerte en mi vida, el motor que me impulso para ser una mejor persona cada día, por todo el amor y cariño. Y a la familia Garrido-Garduño, por abrirme las puertas de su hogar y acogerme como un miembro de su familia.

A Julio E. Valdivia Silva, Nirk Quispe Calla, Rodney Macedo Cuba y todos los integrantes del GII, porque este sueño comenzó por ustedes.

A Yessica Heras Romero, Aura N. Campero Romero, Andrés Penagos Puig, Jaime Emiliano Rogerio Ríos, Marina Cristóbal Ortiz y Jesús Edgar Hernández Ponce del laboratorio AL-305, con los que quedo en deuda por todo el apoyo que me brindaron día a día en el trabajo del laboratorio, pero más aún por su calidad de personas y su amistad que considero invaluable.

A la Dra. Mara Alaide Guzmán Ruiz por sus comentarios y consejos en la elaboración del escrito.

Al equipo de la Dra. Yazmín, Gerardo Rodrigo Perera Murcia, Emiliano Jimenez Marquez, y Carlos Alberto Ortiz Cruz que siempre me brindaron su apoyo con la mejor disposición.

A Paola Molina, Dulce Soto, Carmen Velázquez, Guadalupe Prior, María Acosta, Lucy Landa, Isaí Martínez, Erik Álvarez por su amistad sincera.

A la Dra. Ana María Cevallos Gaos, Andrea Vizcaíno Castillo y Ernesto Guerrero Sánchez del Instituto de Investigaciones Biomédicas a quienes recuerdo con aprecio y cariño por ser mi primera familia académica.

Al Dr. Alejandro Casas del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad por su apoyo desinteresado que me abrió las puertas a esta gran universidad.



A mis queridos “macros”.

A Carl Sagan y Stephen J. Gould.

## Abreviaturas

- aa.:** aminoácidos.  
**AD:** despolarización anóxica.  
**Akt:** RAC-alfa serina/treonina proteína cinasa.  
**Arg1:** Arginasa 1.  
**ATP:** Adenosina trifosfato.  
**BDNF:** Factor neurotrófico derivado de cerebro.  
**BSA:** Albumina bovina sérica.  
**Cl<sup>-</sup>:** cloro iónico.  
**Ca<sup>2+</sup>:** calcio iónico.  
**CC:** arteria Carótida común.  
**cPTK:** Dominio catalítico tirosina cinasa.  
**CREB:** Proteína de unión a elementos de respuesta a AMP cíclico.  
**CSF:** líquido cefalorraquídeo.  
**CSFR1:** receptor del Factor estimulante de colonias 1.  
**CTD:** dominio carboxi-terminal.  
**DE:** desviaciones estándar.  
**DMSO:** Dimetilsulfóxido.  
**EAAT:** Transportadores de aminoácidos excitatorios.  
**ECA:** arteria Carótida externa.  
**eNOS:** Óxido nítrico sintasa endotelial.  
**H<sub>2</sub>O<sub>ad</sub>:** Agua bidestilada.  
**HIF-1 $\alpha$ :** Factor de crecimiento inducido por hipoxia 1 $\alpha$ .  
**HIF-1 $\beta$ :** Factor de crecimiento inducido por hipoxia 1 $\beta$ .  
**HRE:** Elemento de respuesta a hipoxia.  
**Iba1:** Molécula adaptadora 1 de unión al Calcio ionizado.  
**IC<sub>50</sub>:** concentración inhibitoria 50.  
**ICA:** arteria Carótida interna.  
**i.c.v.:** vía intracerebroventricular.  
**IF:** inmunofluorescencia.  
**IFN- $\gamma$ :** interferón gamma.  
**Ig:** dominio tipo inmunoglobulina.  
**IL-1 $\beta$ :** interleucina 1 beta.  
**IL-6:** interleucina 6.  
**IL-12p70:** interleucina 12 subunidad p70.  
**IL-17:** interleucina 17.  
**K<sup>+</sup>:** potasio iónico.  
**[K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>:** potasio iónico extracelular.  
**MCA:** arteria Cerebral media.  
**NMDA:** N-metil-D-aspartato.  
**Na<sup>+</sup>:** sodio iónico.  
**nt:** nucleótido.  
**OA:** arteria occipital.  
**PFA:** paraformaldehído al 4% en solución salina de buffer de fosfatos.  
**PHD:** HIF-  $\alpha$ -propil-4-hidroxilasa.  
**PI3K:** Fosfatidilinositol 3 cinasa.  
**PLG:** Factor de crecimiento placentario.  
**PPA:** arteria Pterigopalatina.  
**pVHL:** proteína von-Hippel-Lindau.  
**RONs:** radicales libres de oxígeno y nitrógeno.  
**RT-qPCR:** transcripción reversa de PCR cuantitativa.  
**SD:** despolarización expansiva.  
**STA:** arteria Tiroidea superior.  
**Src:** Src cinasa.  
**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa.  
**TTC:** Cloruro de trifeniltetrazolio.  
**t-MCAo:** oclusión transitoria de la MCA.  
**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante beta.  
**VEGF:** Factor de crecimiento vascular endotelial.  
**VEGF-A<sub>164</sub>:** Factor de crecimiento vascular endotelial isoforma A<sub>164</sub>.  
**VEGF-B:** Factor de crecimiento vascular endotelial isoforma B.  
**VEGFR-1:** Receptor 1 del factor de crecimiento vascular endotelial.  
**VEGFR-2:** Receptor 2 del factor de crecimiento vascular endotelial.

# ÍNDICE

Capítulo 1 : MARCO TEÓRICO .....	20
A. Introducción.....	21
B. Fisiopatología del núcleo del infarto cerebral .....	21
C. Expansión del núcleo isquémico y acoplamiento neurovascular vasoconstrictivo .....	23
D. El factor de crecimiento vascular endotelial en el infarto cerebral y la respuesta inflamatoria local.....	25
Capítulo 2 EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA ACTIVIDAD DE VEGFR-1 EN EL INFARTO CEREBRAL .....	36
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	37
2. HIPÓTESIS .....	37
3. OBJETIVO GENERAL.....	38
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	38
5. MÉTODOS .....	38
A. Oclusión transitoria de la arteria cerebral media.....	38
B. Cuantificación del volumen de infarto .....	41
C. Cuantificación del volumen de edema .....	41
D. Administración de VEGF-A164 e inhibidores farmacológicos .....	42
E. Evaluación de la viabilidad neuronal .....	42

F. Evaluación de la deficiencia neurofuncional.....	44
G. RT-qPCR.....	46
H. Milliplex .....	48
I. Inmunofluorescencia .....	49
6. RESULTADOS .....	50
A. La administración exógena VEGF-A164 en los primeros 30 minutos de reperfusión tiene actividad neuroprotectora en el t-MCAo.....	50
B. La activación temprana del VEGFR-1 potencia el efecto neuroprotector del VEGF en el infarto cerebral. ....	52
C. El volumen de edema se mantiene pese a la reducción del volumen de infarto. ....	55
D. La pérdida de peso es independiente del volumen de infarto a las 24 horas.....	55
E. La neuroprotección por activación preferencial de VEGFR-1 es independiente de la modulación de la respuesta neuroinflamatoria.....	56
F. El efecto neuroprotector de VEGFR-1 no está relacionado a la polarización de la microglía.....	58
7. DISCUSIÓN .....	60
8. CONCLUSIONES.....	62
Capítulo 3 LA VASOCONSTRICCIÓN COMO CRITERIO DE INCLUSIÓN EN EL MODELO DE INFARTO CEREBRAL POR OCLUSIÓN TRANSITORIA DE LA ARTERIA CEREBRAL MEDIA.....	63

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	64
2. HIPÓTESIS .....	64
3. OBJETIVO GENERAL.....	64
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	64
5. MÉTODOS .....	65
A. Microscopía intravital del árbol vascular cerebral .....	65
B. Oclusión transitoria de la arteria cerebral media.....	66
C. Cuantificación del diámetro de vasos.....	69
D. Análisis estadístico .....	70
6. RESULTADOS .....	70
A. Dos curvas estereotipadas de perfusión del tejido mediatas al retiro del filamento en el modelo de t-MCAo.....	70
B. Sólo el grupo drop presenta el volumen de infarto esperado para el tiempo de oclusión. ....	73
C. La supervivencia del grupo drop es significativamente menor .....	75
D. El infarto cerebral se asocia a una vasoconstricción inmediata a la reperusión.....	75
7. DISCUSIÓN .....	77
8. CONCLUSIONES.....	82
BIBLIOGRAFÍA .....	84

ANEXOS ..... 92

# Tabla de anexos

<i>Anexo I Algoritmo para el cálculo semi automatizado del volumen de infarto a partir de imágenes digitalizadas de secciones gruesas coronales de cerebros infartados.....</i>	<i>92</i>
<i>Anexo II: Rutina de macro implementada en Fiji para el conteo automatizado de núcleos de neuronas en secciones de cortes finos de 40 μm de cerebros teñidos con Violeta de cresilo al 0.1%.....</i>	<i>98</i>
<i>Anexo III: Algoritmo implementado en R para el cálculo del índice de supervivencia neuronal de los conteos de neuronas vivas de cortes coronales finos de 40μm de cerebros teñidos con violeta de Cresilo al 0.1%....</i>	<i>102</i>
<i>Anexo IV Análisis de amplificadores de marcadores inflamatorios periféricos .....</i>	<i>106</i>
<i>Anexo V Edema:.....</i>	<i>110</i>
<i>Anexo VI: Pérdida de peso a las 24 horas.....</i>	<i>111</i>
<i>Anexo VII: Algoritmo para el cálculo del diámetro de los vasos a partir de las imágenes de fluorescencia de la vasculatura cerebral generadas tomadas con el microscopio de 2 fotones durante el MCAo de ratones.....</i>	<i>112</i>
<i>Anexo VIII: Algoritmo para la importación, edición y procesamiento de los datos generados a partir de la medición del diámetro de los vasos de las imágenes de microscopia de 2 fotones de los experimentos ventana intracraneal (ejemplo de un experimento).....</i>	<i>115</i>
<i>Anexo IX: Funciones implementadas en R para analizar los datos de la dinámica de los diámetros de los vasos generados a partir de los ensayos de la ventana intracraneal in-vitro .....</i>	<i>126</i>
<i>Anexo X: Comparación de la dinámica del diámetro vascular de los ensayos de microscopia intravital.....</i>	<i>142</i>
<i>Anexo XI: Cálculo de la distancia del punto a la línea de tendencia.....</i>	<i>146</i>
<i>Anexo XII: Supervivencia a las 24 horas.....</i>	<i>147</i>
<i>Anexo XIII: Tiempo de oclusión de la arteria cerebral media.....</i>	<i>148</i>
<i>Anexo XIV: Bastidor móvil acoplable al microscopio de dos fotones para técnica de microscopia intra vital por ventana intracraneal. ....</i>	<i>149</i>

## **Tabla de figuras**

<i>Figura 1 Representación gráfica de la técnica de oclusión de la arteria cerebral media con un monofilamento de nylon.</i>	<i>40</i>
<i>Figura 2 Efecto neuroprotector de la administración exógena de VEGF-A164 en el modelo de t-MCAo</i>	<i>51</i>
<i>Figura 3 Efecto neuroprotector de la inhibición temprana del VEGFR-2</i>	<i>54</i>
<i>Figura 4 La inhibición de la activación de los receptores de VEGF no modula la respuesta neuroinflamatoria</i>	<i>57</i>
<i>Figura 5: Polarización de la microglía hacia el fenotipo M2 en la corteza de cerebros de ratas infartadas.</i>	<i>58</i>
<i>Figura 6: Representación gráfica de la microscopía intra vital del árbol vascular.</i>	<i>68</i>
<i>Figura 7 Curvas estereotipadas de perfusión en la fase inicial de la reperusión.</i>	<i>72</i>
<i>Figura 8: Cuantificación del volumen de infarto entre los grupos rise y drop</i>	<i>74</i>
<i>Figura 9: Vasoconstricción en el parénquima afectado por el infarto</i>	<i>77</i>
<i>Figura 10: La caída mayor de la perfusión es insuficiente para predecir el establecimiento de la lesión isquémica.</i>	<i>80</i>



## **RESUMEN**

El evento cerebrovascular es una enfermedad devastadora que afecta a millones de personas en todo el mundo. Se ha demostrado que el factor de crecimiento vascular endotelial tiene efectos neuroprotectores en el infarto cerebral, pero también efectos neurotóxicos. Esta dualidad puede ser dependiente de la activación diferencial de sus receptores. En este trabajo nosotros mostramos que la activación preferencial del receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular en un modelo de infarto isquémico transitorio confiere neuroprotección en las primeras fases posteriores al infarto. Usando un inhibidor farmacológico específico para el receptor 2, observamos que la activación del receptor 1 disminuye el volumen de infarto, aumenta el número de neuronas vivas en el parénquima lesionado y mejora significativamente el déficit neurofuncional producido por el infarto en ratas. Realizamos también determinaciones de los niveles de citocinas pro- y anti-inflamatorias en sangre y líquido cefalorraquídeo y encontramos que el efecto neuroprotector es independiente de la modulación de la respuesta neuroinflamatoria en las primeras 24 h, aunque la protección involucra parcialmente la polarización de la microglía al fenotipo anti-inflamatorio M2. Nuestros resultados sugieren que la activación del receptor 1 tiene un efecto neuroprotector independiente de la activación del receptor 2.

Por otro lado, en el modelo de infarto transitorio por oclusión de la arteria cerebral media estudiamos el fenómeno de hipoperfusión en el inicio de la reperfusión, que está relacionado a la exacerbación del daño inicial producido por la isquemia. Los ensayos de microscopía multifotónica muestran que la hipoperfusión es dependiente a la vasoconstricción de los capilares de primer orden. La intervención en la vasoconstricción en las primeras horas de reperfusión representa un blanco terapéutico clave que podría limitar la expansión del daño posterior a la isquemia. En este mismo punto temporal, la activación preferente de receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular por la inhibición farmacológica monodósica temprana del receptor 2 ejerce su efecto neuroprotector, ambos mecanismos podrían actuar sinérgicamente para disminuir el daño cerebral en el infarto.

# **ABSTRACT**

Stroke is a devastating disease that affect millions of people around the world. It has been shown that vascular endothelial growth factor has neuroprotective effects in cerebral infarction, but also has neurotoxic effects. This duality can be dependent on the differential activation of its receptors. In this work, we show that the preferential activation of the receptor 1 of the vascular endothelial growth factor in a model of transient ischemic infarction confers neuroprotection in the first phase after the infarction. Using a pharmacological inhibitor specific for receptor 2, we observed that the activation of receptor 1 decreased the infarct volume, increased the number of living neurons in the injured parenchyma and improved the neurofunctional deficit produced by infarction in rats. We also determined the levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in blood and cerebrospinal fluid. We found that the neuroprotective effect is independent of the modulation of the neuroinflammatory response in the first 24 h, although the protection involves the polarization of the microglia to the anti-inflammatory phenotype M2. Our results show that the activation of receptor 1 has a neuroprotective effect independent of receptor 2 activation. On the other hand, in the model of transient infarction due to occlusion of the cerebral media artery, we studied the phenomenon of hypoperfusion at the beginning of reperfusion, which is related to the exacerbation of the initial damage produced by ischemia. The

multiphoton microscopy assays show that hypoperfusion is dependent of the vasoconstriction of capillaries of first order. The intervention in vasoconstriction in the first hours of reperfusion represents a key therapeutic target that could limit the spread of damage after ischemia. At this same time point, the preferential activation of receptor 1 of vascular endothelial growth factor by the early single dose of pharmacological inhibitor of receptor 2 exerts its neuroprotective effect, both independent mechanisms could act synergistically to decrease brain damage in the infarction.

## **CAPÍTULO 1 : MARCO TEÓRICO**

## ***A. Introducción***

El evento cerebrovascular es una enfermedad devastadora que afecta a millones de personas; actualmente es la primera causa de enfermedad discapacitante en el mundo<sup>1</sup>. Su etiología es isquémica en más del 85% de los casos. La isquemia se produce por la oclusión transitoria o permanente, trombótica o embólica de uno de los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro<sup>1</sup>. Se estima que la tasa de muerte neuronal en el parénquima cerebral afectado por el infarto es de 1.9 millones de neuronas por minuto<sup>2</sup>. El manejo adecuado del paciente en las primeras horas mejora significativamente la supervivencia<sup>3</sup>. Actualmente, el único tratamiento aprobado para el manejo clínico del evento cerebrovascular es la administración del activador del plasminógeno tisular en las primeras 3-3.5 horas que resuelve la oclusión del vaso y restablece el flujo sanguíneo al parénquima afectado<sup>4</sup>. Sin embargo, la hipoperfusión descrita en la fase de reperfusión exagera el daño inicial producido por la isquemia<sup>5</sup>.

## ***B. Fisiopatología del núcleo del infarto cerebral***

El evento isquémico desencadena procesos fisiopatológicos complejos locales, como la muerte neuronal; y sistémicos, como la inmunosupresión periférica; que varían espacio-temporalmente de forma constante<sup>4</sup>. A nivel local, la disminución del flujo sanguíneo por oclusión de un vaso reduce el aporte de glucosa y oxígeno a niveles inferiores al 20% del basal en la profundidad del parénquima irrigado por dicha arteria; esta región del tejido lesionado se define como el núcleo del infarto<sup>6</sup>. En dicha zona, la producción de ATP disminuye abruptamente<sup>7</sup>. La elevada tasa metabólica del cerebro<sup>8</sup> y el rápido consumo de las escasas reservas de glucógeno en los astrocitos<sup>9</sup> inducen una

abrupta caída de las concentraciones de ATP en el núcleo del infarto, llegando a disminuir más del 60% en el primer minuto de isquemia, visto en un modelo de isquemia global<sup>10</sup>. La carencia de ATP junto con el estrés oxidante dependiente de la producción de radicales libres de oxígeno y nitrógeno (RONS) resultado de la hipoxia<sup>11</sup> regula negativamente la actividad de la glutamina sintetasa<sup>12</sup>, principalmente expresada en los astrocitos<sup>13</sup>. La glutamina sintetasa convierte el glutamato (principal neurotransmisor excitador y el más abundante en el cerebro) en glutamina con el consumo de ATP<sup>14</sup>. El glutamato es liberado por las neuronas excitadoras glutamatergicas a la hendidura sináptica y es rápidamente capturado por los astrocitos mediante los transportadores de aminoácidos excitatorios (EAAT) 1 y 2, que dependen del cotransporte de 3 Na<sup>+</sup> y 1 H<sup>+</sup>, y antiporte 1 K<sup>+</sup><sup>15</sup>. El desbalance iónico producido por la disminución de ATP induce la inversión del transporte de glutamato por los EAATs<sup>16,17</sup>, lo que incrementa las concentraciones de glutamato extracelular que junto con la disminución de la actividad de la glutamina sintetasa exagera el daño por excitotoxicidad<sup>18,19</sup>. Además, el glutamato no reciclado activa rápidamente los receptores de 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 negativamente de la expresión del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF)<sup>20</sup>. Asimismo, la activación de los receptores NMDA extrasinapticos promueven la pérdida del potencial de membrana mitocondrial que desacopla la fosforilación oxidativa induciendo la muerte neuronal<sup>20</sup>. La falla del ciclo glutamato-glutamina puede promover la acumulación de NH<sub>3</sub>, que a concentraciones elevadas es neurotóxico<sup>21</sup>. Estos mecanismos producto de la falla

energética inducen una muerte neuronal rápida de tipo necrótico característico del núcleo del infarto <sup>6</sup>.

### ***C. Expansión del núcleo isquémico y acoplamiento neurovascular vasoconstrictivo***

El glutamato extracelular, progresivamente acumulado por falla en su reciclamiento<sup>6</sup>, activa los receptores de NMDA promoviendo corrientes entrantes de sodio ( $\text{Na}^+$ ), calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y cloro ( $\text{Cl}^-$ ), y la salida de potasio ( $\text{K}^+$ ) que se acumula en el espacio extracelular ( $[\text{K}^+]_o$ )<sup>17</sup>, incrementando su concentración de 3-4 a 70 mM en menos de 3 minutos<sup>22,23</sup> que eleva el potencial de reposo cercano al umbral de potencial de acción<sup>24</sup>. La falla energética neuronal por desabastecimiento de ATP impacta negativamente en el funcionamiento de las bombas  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$  impidiendo el restablecimiento del potencial de membrana llevando a las neuronas a un estado de despolarización anóxica (AD), característico del núcleo de infarto<sup>17,25,26</sup>. La AD inducida por la falla energética por depleción de ATP es un iniciador del daño isquémico y de la pérdida irreversible de la actividad en el núcleo del infarto<sup>26</sup> que se expande a una velocidad constante de 2-3mm/min, en rebanadas de cerebro<sup>27</sup>. Circundante al núcleo del infarto se encuentra una zona de menor compromiso isquémico llamada penumbra. La perfusión sanguínea en la penumbra es el doble que la del núcleo del infarto, entre el 40-50% de la basal<sup>6</sup>. Las neuronas en la zona de penumbra, pese al compromiso energético por la hipoxia, logran mantener el potencial de reposo; sin embargo, el incremento de potasio extracelular que 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)<sup>28</sup>. La SD es una onda expansiva lenta de despolarización y cese de la actividad sináptica transitoria en el tejido afectado por la isquemia cuyo mecanismo fisiopatológico es aún poco entendido<sup>29</sup>, sin embargo, la SD se ha visto relacionado al edema citotóxico neuronal, a alteraciones estructurales de las dendritas y al incremento del consumo local de oxígeno<sup>29</sup>, que exacerba el daño hipóxico inducido por el infarto. Este fenómeno junto con la salida masiva de K<sup>+</sup><sup>30</sup> y la activación de las caspasas por aumento del Ca<sup>2+</sup> intracitoplasmático<sup>31</sup> induce la muerte neuronal por mecanismos apoptóticos<sup>30-32</sup>, que expande el núcleo del infarto a una razón del 19% después de cada onda de SD<sup>33</sup>. Tanto la AD como la SD se relacionan con una disminución abrupta permanente o transitoria, respectivamente, de la perfusión sanguínea del parénquima isquémico debido a la disminución del calibre vascular por vasoconstricción, lo que define el acoplamiento neurovascular constrictivo<sup>33</sup>. Interesantemente, se ha visto que la activación de los receptores NMDA exacerba la hipoperfusión acoplada a la SD<sup>33</sup>, lo que puede incrementar el daño producido por el evento isquémico.

La perfusión del parénquima cerebral está determinada por el flujo sanguíneo cerebral que es regulado principalmente por el tono del músculo liso de las arteriolas<sup>34</sup> y por la contracción de los pericitos<sup>35</sup> en condiciones fisiológicas. Sin embargo, la relevancia de estos procesos en la vasoconstricción vista en el evento isquémico es controversial<sup>36 37</sup>. Los RONS producidos principalmente por el endotelio hipóxico promueven la contracción de los pericitos durante el infarto en las primeras horas de reperfusión del parénquima lesionado<sup>36</sup>. Por otro lado, la vasoconstricción en el

músculo liso de las arteriolas cerebrales se relaciona a la producción de ácido 20 hidroxieicosanotetraenoico (20-HETE) a partir del ácido araquidónico que difunde desde los astrocitos y neuronas hipóxicas<sup>37</sup>. Además, el endotelio hipóxico incrementa la expresión de endotelina-1(ET-1), un poderoso vasoconstrictor<sup>36</sup>, en las primeras 24 horas después del infarto<sup>38</sup>.

#### ***D. El factor de crecimiento vascular endotelial en el infarto cerebral y la respuesta inflamatoria local.***

*El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) tiene un papel importante durante el desarrollo y el funcionamiento del sistema circulatorio y el sistema nervioso<sup>39</sup>, como factor neurotrófico en condiciones fisiológicas<sup>40</sup> y neuroprotector en diferentes condiciones patológicas<sup>41-43</sup>. La familia poligénica de VEGF está constituida por 5 miembros (ver*

**Tabla 1):** VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C VEGF-D y el factor de crecimiento placentario (PLG). El VEGF-A está codificado en la banda 21.1 del brazo corto del cromosoma 6 en el genoma del ser humano (Gen ID: 7422), presenta 9 exones y por splicing alternativo se expresan 13 isoformas (ver

**Tabla 2)**, de las cuales la más ampliamente estudiada es la isoforma VEGF165 de 191 aminoácidos (NCBI Ref. seq.: NP\_001165097.1), cuyas secuencias homólogos en *R. norvegicus* es VEGF-A<sub>164</sub> (NCBI Ref seq.: NP\_001274037.1) y en *M. musculus* es VEGF-1 (NCBI Ref seq.: NP\_001273986.1) con los cuales conserva una identidad del 90% y una similitud del 91% en una cobertura del 100% de secuencia (ver **Tabla 2**). La expresión de VEGF está principalmente regulada por el factor de transcripción inducido por hipoxia 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ). En condiciones de normoxia, los residuos prolina P<sub>402</sub> y P<sub>564</sub> de la HIF-1 $\alpha$  son hidroxilados por la encima HIF-  $\alpha$ -propil-4-hidroxilasa (PHD) lo que induce la ubiquitinización de HIF-1 $\alpha$  por la proteína von-Hippel-Lindau (pVHL) que marca para su degradación por vía proteosomal<sup>44,45</sup>. En condiciones de hipoxia, la actividad de PHD disminuye, esto permite la acumulación de HIF-1 $\alpha$  en el citoplasma, el cual se transloca a núcleo donde se dimeriza con HIF-1 $\beta$  mediante el dominio PAS

expresado en ambos factores de transcripción<sup>46</sup>. El dímero se une a la secuencia de elemento de respuesta a hipoxia (HRE), que es un motivo regulatorio *cys* con el segmento núcleo 5'-RCGTG-3' (donde R puede ser A o G)<sup>47</sup>, codificado a 2,000 bp río arriba del gen de VEGF, promoviendo la expresión de este<sup>46</sup>. En condiciones inflamatorias, la expresión de VEGF también puede ser inducida por la activación del factor de transcripción NF-κB por citoquinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α)<sup>48</sup>, que es expresado tempranamente en la respuesta neuroinflamatoria en la fase aguda del infarto cerebral<sup>49</sup>.

Símb.	Otros símb.	Nombre completo	Gen ID	Loc.	E	Long. (nt)	I	Genes ortólogos					
								<i>R. norvegicus</i>			<i>M. musculus</i>		
								Símb.	Gen ID	I	Símb.	Gen ID	I
<i>Ligandos</i>													
VEGFA	VPF; VEGF; MVCD1	Factor de crecimiento vascular endotelial A	7422	6p21.1	9	16279	20	Vegfa	83785	1/3	Vegfa	22339	10
VEGFB	VRP; VEGFL	Factor de crecimiento vascular endotelial B	7423	11q13.1	7	4681	2	Vegfb	89811	3	Vegfb	22340	2
VEGFC	VRP; Flt4-L; LMPH1D; LMPHM4	Factor de crecimiento vascular endotelial C	7424	4q34.3	7	109385	1	Vegfc	114111	1	Vegfc	22341	1
VEGFD	FIGF; VEGF-D	Factor de crecimiento vascular endotelial D	2277	Xp22.2	7	38818	1	Vegfd	360457	2	Vegfd	14205	2
PGF	PGFL; PIGF; PLGF; PIGF-2; D12S1900; SHGC-10760	Factor de crecimiento placentario	5228	14q24.3	7	13935	3	Pgf	94203	1	Pgf	18654	2
<i>Receptores</i>													
FLT1	FLT; FLT-1; VEGFR1; VEGFR-1	Tirosina cinasa relacionada a <i>fms</i> 1	2321	13q12.3	33	194782	4	Flt1	54251	2	Flt1	14254	4
KDR	FLK1; CD309; VEGFR; VEGFR2	Receptor de dominio de inserción de cinasa	3791	4q12	30	47114	1	Kdr	25589	1	Kdr	16542	2
FLT4	PCL; FLT-4; FLT41; LMPH1A; LMPHM1; VEGFR3; VEGFR-3	Tirosina cinasa relacionada a <i>fms</i> 4	2324	5q35.3	35	48792	3	Flt4	114110	1	Flt4	14257	1

Tabla 1: Genes que codifican la familia multigénica de ligandos de VEGF y sus receptores en *Homo sapiens*.

**Símb.**: símbolo oficial del gen anotado en NCBI; **Otros símb.**: otros símbolos del gen anotados en NCBI; **Gen ID**: Código de identificación en la base de datos NCBI; **Loc.**: localización cromosómica del gen; **Long.**: longitud de la secuencia; **nt**: nucleótidos; **E**: número de exones; **I**: número de isoformas.

La actividad biológica de VEGF está mediada por la activación de sus receptores tirosina cinasa<sup>50</sup>. En el genoma del ser humano están codificados tres receptores para VEGF (VEGFR): VEGFR-1, 2 y 3 (ver

**Tabla 1**). El VEGFR-1, anteriormente denominado FLT-1, es codificado en el brazo largo del cromosoma 13 (Gen ID: 2321), presenta 33 exones y por *splicing* alternativo puede expresarse en 4 isoformas distintas (ver **Tabla 4**), una de ellas es una proteína transmembranal, Flt1 (NCBI Ref. seq.: NP\_002010.2), que presenta el dominio tirosina cinasa en el extremo carboxi-terminal (CTD) intracitoplasmático (cd14207: PTKc\_VEGFR1) el cual traduce la cascada de señalización inducida por la activación de este receptor. Las otras tres isoformas del VEGFR-1 son solubles: sFlt1 (NCBI Ref. seq.: NP\_001153392.1), sFlt-14 (NCBI Ref. seq.: NP\_001153502.1) e isoforma 4 (NCBI Ref. seq.: NP\_001153503.1); carecen del dominio tirosina cinasa y por lo tanto no participan como traductores de señal en la cascada de señalización. El VEGFR-2, también conocido como KDR, está codificado en el brazo largo del cromosoma 4 (Gen ID: 3791), presenta 30 exones y se expresa como una isoforma única (NCBI Ref. seq.: NP\_002244.1) con el dominio tirosina cinasa en el CTD intracitoplasmático (cd05103: PTKc\_VEGFR2).

Símbolo	Isoforma	Ref. Seq. mRNA	Ref. Seq. Proteína	Uniprot ID	aa	MW (Da)	Smart 00141	unión recep.	n. cys	Di	Pfam 14554	Ident.
<i>Homo sapiens</i>												
VEGF111	Isoforma p precursor	NM_001171630.1	NP_001165101.1	P15692-10	137	15,981	50..131	50..53 87 89..92 107..110	52 83 87 94 128 130	77 86	NP	I: 133/136 (98%) P: 133/136 (97%) G: 0/136 (0%)
VEGF121	Isoforma n precursor	NM_001171628.1	NP_001165099.1	P15692-9	147	17,219	50..132	50..53 87 89..92 107..110	52 83 87 94 128 130	77 86	NP	I: 140/141 (99%) P: 140/141 (99%) G: 0/141 (0%)

*Activación diferencial de los receptores para el VEGF como mecanismo de neuro-protección en el infarto cerebral isquémico*

<b>ND</b>	Isoforma s	NM_001287044.2	NP_001273973.1	ND	163	18,867	22..104	22..25 59 61..64 79..82	24 55 59 66 100 102	49 58	115..163	I: 163/163 (100%) P: 163/163 (100%) G: 0/163 (0%)
<b>VEGF145</b>	Isoforma q precursor	NM_001204384.1	NP_001191313.1	P15692-6	171	20,064	50..132	50..53 87 89..92 107..110	52 83 87 94 128 130	77 86	NP	I: 140/141 (99%) P: 140/141 (99%) G: 0/141 (0%)
<b>VEGF148</b>	Isoforma m precursor	NM_001171627.1	NP_001165098.1	P15692-5	174	20,218	50..132	50..53 87 89..92 107..110	52 83 87 94 128 130	77 86	143..173	I: 173/173 (100%) P: 173/173 (100%) G: 0/173 (0%)
<b>VEGF165</b>	Isoforma VEGF-A precursor	NM_001171626.1	NP_001165097.1	A0A0Y0I MM4	191	22,314	50..132	50..53 87 89..92 107..110	52 83 87 94 128 130	77 86	143..191	***
<b>VEGF165B</b>	Isoforma o precursor	NM_001171629.1	NP_001165100.1	P15692-4	191	22,314	50..132	50..53 87 89..92 107..110	52 83 87 94 128 130	77 86	143..185	I: 185/185 (100%) P: 185/185 (100%) G: 185/185 (0%)
<b>VEGF183</b>	Isoforma k precursor	NM_001171625.1	NP_001165096.1	P15692-3	209	24,422	50..132	50..53 87 89..92 107..110	52 83 87 94 128 130	77 86	161..209	I: 190/209 (91%) P: 190/209 (90%) G: 18/209 (8%)
<b>ND</b>	Isoforma VEGF-Ax precursor	NM_001317010.1	NP_001303939.1	ND	213	21,454	50..132	50..53 87 89..92 107..110	52 83 87 94 128 130	77 86	140..191	I: 191/191 (100%) P: 191/191 (100%) G: 0/191 (0%)
<b>VEGF189</b>	Isoforma j precursor	NM_001171624.1	NP_001165095.1	A0A024R D37	215	25,173	50..132	50..53 87 89..92 107..110	52 83 87 94 128 130	77 86	167..215	I: 190/215 (88%) P: 190/215 (88%) G: 24/215 (11%)
<b>ND</b>	Isoforma i precursor	NM_001171623.1	NP_001165094.1	A0A024R D33	232	27,042	50..132	50..53 87 89..92 107..110	52 83 87 94 128 130	77 86	184..232	I: 190/232 (82%) P: 190/232 (81%) G: 41/232 (17%)
<b>ND</b>	Isoforma h	NM_001171622.2	NP_001165093.1	P15692-18	317	34,406	230..311	230..233 267 269..272 287..290	232 263 267 274 308 310	25 7 26 6	NP	I: 133/136 (98%) P: 133/136 (97%) G: 0/136 (0%)
<b>L-VEGF121</b>	Isoforma f	NM_001025370.3	NP_001020541.2	A0A087W TP4	327	35,643	230..312	230..233 267 269..272 287..290	232 263 267 274 308 310	25 72 26 6	NP	I: 140/141 (99%) P: 140/141 (99%) G: 0/141 (0%)

*Activación diferencial de los receptores para el VEGF como mecanismo de neuro-protección en el infarto cerebral isquémico*

<b>BD</b>	Isoforma r	NM_001204385.2	NP_001191314.1	ND	351	38,357	230..312	230..233 267 269..272 287..290	232 263 267 274 308 310	25 7 26 6	NP	I: 140/141 (99%) P: 140/141 (99%) G: 0/141 (0%)
<b>BD</b>	Isoforma e	NM_001025369.3	NP_001020540.2	P15692-17	354	38,642	230..312	230..233 267 269..272 287..290	232 263 267 274 308 310	25 7 26 6	318..353	I: 173/173 (100%) P: 173/173 (100%) G: 0/173 (0%)
<b>L-VEGF165</b>	Isoforma d	NM_001025368.3	NP_001020539.2	A0A087X 0B2	371	40,738	230..312	230..233 267 269..272 287..290	232 263 267 274 308 310	25 7 26 6	318..371	I: 191/191 (100%) P: 191/191 (100%) G: 0/191 (0%)
<b>BD</b>	Isoforma g	NM_001033756.3	NP_001028928.1	A0A087X 1L1	371	40,683	230..312	230..233 267 269..272 287..290	232 263 267 274 308 310	25 7 26 6	318..365	I: 185/185 (100%) P: 185/185 (100%) G: 185/185 (0%)
<b>BD</b>	Isoforma c	NM_001025367.3	NP_001020538.2	P15692-16	389	42,846	230..312	230..233 267 269..272 287..290	232 263 267 274 308 310	25 7 26 6	341..389	I: 190/209 (91%) P: 190/209 (90%) G: 18/209 (8%)
<b>L-VEGF198</b>	Isoforma b	NM_003376.6	NP_003367.4	P15692-13	395	43,597	230..312	230..233 267 269..272 287..290	232 263 267 274 308 310	25 7 26 6	347..395	I: 190/215 (88%) P: 190/215 (88%) G: 24/215 (11%)
<b>L-VEGF206</b>	Isoforma a	NM_001025366.3	NP_001020537.2	A0A087W UD8	412	45,467	230..312	230..233 267 269..272 287..290	232 263 267 274 308 310	25 7 26 6	364..412	I: 190/232 (82%) P: 190/232 (81%) G: 41/232 (17%)
<b><i>Ratus norvegicus</i></b>												
<b>VEGF-A164</b>	Isoforma Vegf-A precursor	NM_001287108.1	NP_001274037.1	P16612-2	190	22,396	49..131	49..52 86 88..91 106..109	51 82 86 93 127 129	76 85	137..190	I: 171/191 (90%) P: 175/191 (91%) G: 1/191 (0%)
<b><i>Mus musculus</i></b>												
<b>VEGF-1</b>	Isoforma Vegf-A precursor	NM_001287057.1	NP_001273986.1	Q00731-2	190	22,440	49..131	49..52 86 88..91 106..109	51 82 86 93 127 129	76 85	137..190	I: 171/191 (90%) P: 175/191 (91%) G: 1/191 (0%)

**Tabla 2: Isoformas generadas por splicing alternativo de los genes que codifican para VEGF en *H. sapiens* y sus homólogos en *R. norvegicus* y *M. musculus*.**

**Ref. Seq. mRNA:** Número de acceso de NCBI del RNA mensajero; **Ref. Seq. Proteína:** Número de acceso de NCBI de la proteína; **Uniprot ID:** Código de identificación de la proteína en la base de datos Uniprot (EMBL-EBI); **aa:** número de aminoácidos; **MW (da):** peso molecular expresado en daltons; **Smart00141:** Posiciones de los aminoácidos (aa.) correspondientes al dominio proteico conservado de la

*familia del factor de crecimiento vascular endotelial y derivado de plaquetas (Smart00141); **unión recep.**: Posiciones de los aa. correspondientes al sitio de interface para la unión del ligando al receptor; **n.cys**: Posiciones de los aa. correspondientes al motivo "knot cysteine"; **Di**: Posiciones de los aa. correspondientes a los sitios de dimerización; **Pfam14554**: Posiciones de los aa. correspondientes al dominio de unión a heparina. **Ident.**: Análisis de identidad y similitud de las secuencias, donde **I** es la identidad, **P** la similitud y **G** son los espacios en el alineamiento, todas las secuencias fueron alineadas a la secuencia VEGF-A (VEGF165) de *H. sapiens* (\*\*\*)*

Los tres receptores comparten una estructura tridimensional parecida, constituida por 7 dominios tipo inmunoglobulina (Ig) extracitoplasmáticos (Smart00140), un segmento transmembranal de 20 aminoácidos hidrofóbicos y un segmento intracitoplasmático CTD que contiene el dominio catalítico tirosina cinasa (cPTK)<sup>51</sup>. Dentro del cPTK se encuentra el sitio de unión a ATP, el cual está involucrado directamente en la traducción de señal y es el sitio más frecuentemente bloqueado por los inhibidores de VEGFRs (ver **Tabla 5**). La unión de los homodímeros de VEGF activa selectivamente los receptores (ver **Tabla 3**). El VEGF-A se une con mayor afinidad al VEGFR-1 que al VEGFR-2 (constante de disociación 15 pM y de 750 pM, respectivamente). El VEGFR-2 es reconocido clásicamente como el receptor canónico de VEGF-A<sup>50,52,53</sup>, y el VEGFR-1 es considerado como un regulador negativo de la activación de VEGFR-2<sup>50</sup>. La unión de los ligandos a su receptor permite la estabilización de la dimerización de los VEGFRs a través del dominio Ig-7 lo que expone el sitio de unión a ATP en el cPTK e induce la fosforilación de los residuos tirosina en el CTD (ver **Tabla 4**). Estas modificaciones postraduccionales permiten el reclutamiento de proteínas adaptadoras generalmente con un dominio de unión a SH2<sup>51</sup>. Las principales cascadas de señalización inducidas por la activación de los VEGFRs es la de MEK/ERK que promueve la proliferación celular, la de p38/MAPK que induce la remodelación del citoesqueleto y la migración celular, y la

vía de PI3K/AKT que promueve la supervivencia por inhibición de las caspasas y el aumento de la permeabilidad vascular<sup>51</sup>.

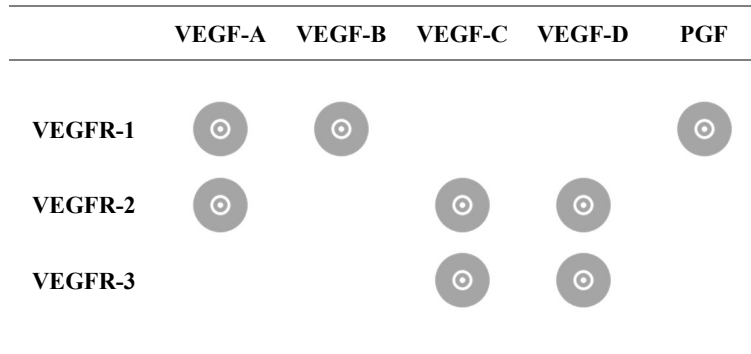


Tabla 3 Ligandos específicos para cada receptor de VEGF

En el infarto cerebral la expresión del VEGF-A<sub>164</sub> se incrementa tempranamente<sup>39</sup>. En las primeras horas luego del infarto, las neuronas incrementan la expresión de VEGF-A<sub>164</sub> llegando al pico de expresión a las 3 horas para luego retornar a los valores basales hacia las 24 horas<sup>54</sup>. Luego son los astrocitos y el endotelio vascular los principales productores de VEGF- A<sub>164</sub><sup>55</sup>. La aplicación exógena de VEGF-A<sub>164</sub> ha mostrado tener un efecto dual en este tipo de lesión, tanto neuroprotector<sup>56-58</sup> como neurotóxico<sup>59,60</sup>. Aún no están completamente entendidos los mecanismos moleculares involucrados en ambos efectos pero se ha propuesto que podrían estar ligados biológicamente por la activación diferencial de los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2<sup>50,61,62</sup>.

Símb.	Isoforma	Ref. Seq. Proteína (Uniprot ID)	aa. (da.)	Regiones	Ig	cPTK		ATP bind	Poli pet	Loop	PTM	
						CDD	Sec.				Gli.	Fos
Flt1	VEGFR-1 isoforma 1	NP_002010.2 (L7RSL3)	1338 (150,769)	E: 27..758 T: 759..780 I: 781..1338	32..107, 230..327, 349..404, 428..553, 556..654, 661..747, 827..1158	PTKc VEGFR2 (cd05103)	819.. 1157	833..834, 841..859, 861..878, 882..907, 909..912, 1013, 1020,	1022, 1026, 1058.. 1062, 1071, 1106	1039.. 1064	100, 164, 196, 251, 323, 402, 417, 474, 574, 597, 620, 625, 666	914, 1053, 1169, 1213, 1242, 1309,



Activación diferencial de los receptores para el VEGF como mecanismo de neuro-protección en el infarto cerebral isquémico

											1029, 1038..1041	1327, 1333
<b>sFlt1</b>	VEGFR-1 isoforma 2	NP_001153392.1 (P17948-2)	687 (77,474)	E: 27..687 T: NP I: NP	143..219, 245..327, 353..424, 427..539, 568..640,	NP	NP	NP	NP	NP	100, 164, 196, 251, 323, 402, 417, 474, 547, 597, 620, 625	NP
<b>sFlt1-14</b>	VEGFR-1 isoforma 3	NP_001153502.1 (P17948-3)	733 (82,124)	E: 27..733 T: NP I: NP	143..219, 237..328, 353..424, 447..544, 568..640, 671..708	NP	NP	NP	NP	NP	100, 164, 196, 251, 323, 402, 417, 474, 547, 597, 620, 625, 666	NP
	VEGFR-1 isoforma 4	NP_001153503.1 (P17948-4)	541 (60,917)	E: 27..541 T: NP I: NP	143..219, 245..327, 353..424, 439..466	NP	NP	NP	NP	NP	100, 164, 196, 251, 323, 402, 417, 474	NP
<b>KDR</b>	VEGFR-2	NP_002244.1 (P35968)	1356 (151,527)	E: 20..764 T: 765..785 I: 786..1356	46..110, 141..207, 224..320, 328..414, 421..458, 551..660, 667..753	PTKc VEGFR1 (cd14207)	826.. 1167	840..842, 848, 866..868, 885, 914, 916..920, 922..923, 1019, 1026, 1035, 1045..1047	1028, 1032, 1064.. 1068, 1077, 1112	1045.. 1070	46, 66, 96, 143, 158, 245, 318, 374, 395, 511, 523, 580, 613, 619, 631, 675, 704, 721	1054, 1059, 1175, 1214, 1231, 1235, 1238, 1305, 1309, 1319
<b>Long</b>	VEGFR-3 isoforma 1	NP_891555.2 (P35916-2)	1363 (152,757)	E: 25..775 T: 776..796 I: 797..1363	30..127, 151..213, 219..326, 331..415, 422..552, 555..671, 678..764	PTKc VEGFR3 (cd05102)	845.. 1173	851..853, 859, 877..879, 896, 925, 927..931, 933..934, 1028, 1035, 1044, 1054..1056	1037, 1041, 1073.. 1077, 1086, 1121	1054.. 1079	33, 104, 166, 251, 299, 411, 515, 527, 594, 683, 690, 758	830, 833, 1063, 1068, 1230, 1231, 1265, 1333, 1337, 1363
<b>Short</b>	VEGFR-3 isoforma 2	NP_002011.2 (P35916-1)	1298 (145,599)	E: 25..775 T: 776..796 I: 797..1298	138..224, 238..327, 245..329, 343..415, 567..657, 678..765, 693..755, 776..796, 837..1176,	PTKc VEGFR3 (cd05102)	837.. 1176	851..853, 859, 877..879, 896, 925, 927..931, 933..934, 1028, 1035, 1044, 1054..1056	1037, 1041, 1073.. 1077, 1086, 1121	1054.. 1079	33, 104, 166, 251, 299, 411, 515, 527, 594, 683, 690, 758, 830, 833	853, 1063, 1068, 1230, 1231, 1265,
<b>NP</b>	VEGFR-3 isoforma 3	NP_001341918.1	1306 (143,914)	E: 25..775 T: 776..796 I: 797..1306	137..224, 245..329, 245..329, 352..418, 564..657, 678..765, 693..755, 776..796,	PTKc VEGFR3 (cd05102)	837.. 1176	851..853, 859, 877..879, 896, 925, 927..931, 933..934, 1028, 1035, 1044, 1054..1056	1037, 1041, 1073.. 1077, 1086, 1121	1054.. 1079	33, 104, 166, 251, 299, 411, 515, 527, 594, 683, 690, 758, 830, 833, 853	853, 1063, 1068, 1230, 1231, 1265,

Tabla 4 Isoformas generadas por splicing alternativo de los genes que codifican para VEGF en *H. sapiens* y sus homólogos en *R. norvegicus* y *M. musculus*.

**Símb.:** símbolo de la proteína anotado en la base de datos Uniprot(EMBL-EBI); **Ref. Seq. Proteína:** Número de acceso de NCBI de la proteína; **Uniprot ID:** Código de identificación de la proteína en la base de datos Uniprot (EMBL-EBI); **aa:** número de aminoácidos de la proteína; **da.:** peso molecular de la proteína expresada en daltons; **Regiones:** segmento de la proteína extra citoplasmático (**E**), segmento transmembranal (**T**) y segmento intracelular (**I**); **Ig:** Posiciones en la secuencia de los aminoácidos correspondientes al dominio tipo inmunoglobulina de los VEGFR; **cPTK:** Posiciones de aminoácidos que corresponde al dominio catalítico de la tirosina cinasa de los VEGFR; **CCD:** Código de la familia de dominios protéicos conservados anotado en NCBI; **Sec.:** posiciones inicial y final de la secuencia que corresponde al dominio PTK; **ATP bind:** Secuencia de aminoácidos del VEGFR que corresponden al sitio de unión a ATP; **Loop:** Secuencia de aminoácidos del VEGFR que corresponden al asa de activación (A-loop) dentro del sitio de unión a ATP; **PTM:** Modificaciones postraduccionales de VEGFR; **Gli.:** Posiciones de los sitios de glicosilación del VEGFR; **Fos:** Posiciones de los sitios de fosforilación del VEGFR.

Por el lado de los receptores, las neuronas expresan constitutivamente el VEGFR-2 y luego del infarto incrementa su expresión en aquellas localizadas en el borde de la lesión<sup>63</sup>. VEGFR-2 media el soporte trófico neuronal, el crecimiento axonal y la neurogénesis<sup>58,64</sup>, y en condiciones experimentales de isquemia tiene un efecto neuroprotector, tanto *in vivo* como *in vitro*<sup>56</sup>. Sin embargo, la activación de VEGFR-2 también ha sido relacionada con un efecto neurotóxico atribuido principalmente a la alteración de la permeabilidad selectiva de la barrera hematoencefálica (BBB)<sup>62,65</sup> por regulación negativa de claudina-5 y ocludina en células endoteliales<sup>66</sup>. La alteración de la permeabilidad selectiva de la BBB es bifásica en el infarto cerebral, los picos de aumento de la permeabilidad se dan a las 6 y 72 horas después del infarto<sup>67</sup>. La alteración de la BBB favorece la entrada de proteínas séricas al parénquima cerebral<sup>49</sup>; y promueven la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y factores quimiotácticos como MIP-1 $\alpha$ , que favorecen la infiltración leucocitaria<sup>68,69</sup>, que pueden exacerbar la respuesta inflamatoria e incrementar el daño<sup>32,49,70,71</sup>. La respuesta inflamatoria, que tiene un componente tanto local como sistémico, está regulada inicialmente por la microglía<sup>32,49,70,72,73</sup>, macrófago residente del sistema nervioso central (SNC)<sup>74</sup>. Los

patrones moleculares de daño como proteína de alta movilidad del grupo caja 1 (HMGB1), ATP o proteína de shock térmico 60 (HSP60) liberados por las neuronas estresadas activan a la microglía hacia un fenotipo neurotóxico denominado M1<sup>49,70,71,75,76</sup>, que se caracteriza por la liberación de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-18, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ <sup>49,75</sup>. La microglía activada M1 puede exacerbar el daño fagocitando neuronas estresadas no apoptóticas en la penumbra<sup>77-79</sup>, liberando radicales libres que exacerban el estrés oxidante de la isquemia<sup>49</sup>, o liberando metaloproteinasas de matriz (MMP) como MMP-2 y 9, que degradan a las proteínas de unión estrecha del endotelio vascular cerebral<sup>32,49,76</sup>, favoreciendo la alteración de la permeabilidad selectiva de la BBB. La inhibición temprana del fenotipo neurotóxico microglía M1, tiene un efecto neuroprotector<sup>80</sup>. Sin embargo, una depleción completa de la microglía exacerba el daño producido por la isquemia<sup>73</sup>, que se ha visto relacionado a un aumento de la actividad pro-inflamatoria del astrocito reactivo<sup>81</sup>. La microglía también expresa VEGFR-1 constitutivamente, y su activación se ha visto relacionada a la migración y la proliferación en modelos *in vitro*<sup>82</sup>. La migración de microglía/macrófagos cumple un rol importante en la anastomosis de los vasos formados *de novo* en la fase tardía de revascularización del tejido lesionado<sup>83</sup>. La depleción de las microglías por la inhibición farmacológica del receptor para el factor estimulante de colonias 1 (CSFR1) exacerba la muerte neuronal por una falla en la regulación de los astrocitos reactivos que promueve sobreproducción de moléculas pro-inflamatorias como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 que exacerban el estrés oxidante producido por el evento isquémico<sup>81</sup>.

*Activación diferencial de los receptores para el VEGF como mecanismo de neuro-protección en el infarto cerebral isquémico*

Nombre genérico	Nombre comercial	Principio	Mecanismo	IC <sub>50</sub> VEGFR-1 (flt-1)	IC <sub>50</sub> VEGFR-2 (KDR)	Otros
ALL 993	--	Inhibidor químico	Inhibidor de la actividad tirosin quinasa de VEGFR-1/2, inhibidor competitivo del sitio de unión del ATP.	130 nM	23 nM	VEGFR-3: 18 nM c-KIT: 236 nM c-FMS: 380 nM PDGFR: 640 nM c-Abl: 2.8 μM
axitinib	Inlyta	Inhibidor químico	<b>Inhibidor de la actividad tirosin quinasa de VEGFR-1/2, inhibidor competitivo del sitio de unión del ATP.</b>	<b>0.1 nM</b>	<b>0.2 nM</b>	VEGFR-3: 0.3 nM PDGFR: 1.6 nM c-KIT: 1.7 nM RET: > 1 μM
bevacizumab	Mvasi /Avastin	Anticuerpo IgG <sub>1</sub> monoclonal contra VEGF humanizado	Se une a VEGF circulante e inhibe su unión al receptor	ND	ND	--
DMXA	ASA404/ Vadimezan	Inhibidor químico	Inhibidor de la actividad tirosin quinasa de VEGFR-1/2	119 μM	11 μM	--
cabozantinib	Cabometyx/ Cometriq	Inhibidor químico	Inhibidor de la actividad tirosin quinasa de VEGFR-1/2	ND	ND	ND
lenvatinib	Lenvima	Inhibidor químico	Inhibidor de la actividad tirosin quinasa de VEGFR-1/2	22 nM	4 nM	VEGFR-3: 5.2 nM PDGFR: 39 nM FGFR: 46 nM
pazopanib	Votrient			10 nM	30 nM	VEGFR-3: 47 nM PDGFR: 84 nM c-KIT: 74 nM RET: > 1 μM
ramucirumab	Cyramza	Anticuerpo IgG <sub>1</sub> monoclonal contra VEGFR-2 humanizado	Se une al segmento extracitoplasmático del VEGFR-2 e inhibe la unión de VEGF	--	2 nM	--
sorafenib	Nexavar	Inhibidor químico	Inhibidor de la actividad tirosin quinasa de VEGFR-1/2	ND	90 nM	VEGFR-3: 20 nM PDGFR: 60 nM c-KIT: 68 nM RET: 100 nM
SU-1498	--	Inhibidor químico	<b>Inhibidor de la actividad tirosin quinasa de VEGFR-2</b>	--	<b>700 nM</b>	PDGR: 50 μM
SU-4312	--	Inhibidor químico	Inhibidor de la actividad tirosin quinasa de VEGFR-1/2	800 nM	800 nM	PDGR: 1.4 μM
SU-5402	--	Inhibidor químico	Inhibidor de la actividad tirosin quinasa de VEGFR-1/2	30 nM	20 nM	EGFR: > 100 μM PDGR: > 100 μM
SU-5416	Semaxanib	Inhibidor químico	Inhibidor de la actividad tirosin quinasa de VEGFR-1/2, inhibidor competitivo del sitio de unión del ATP.	43 nM	220 nM	VEGFR-3: 54 nM PDGFR: 68 nM c-KIT: 660 nM RET: 944 nM
SU-6668	--	Inhibidor químico	Inhibidor de la actividad tirosin quinasa de VEGFR-1/2, inhibidor competitivo del sitio de unión del ATP.	15 nM	200 nM	VEGFR-3: 10 nM PDGFR: 60 nM c-KIT: 660 nM RET: 944 nM FGFR1: 3 μM
SU-10944	--	Inhibidor químico	Inhibidor de la actividad tirosin quinasa de VEGFR-1/2, inhibidor competitivo del sitio de unión del ATP.	6 nM	96 nM	PDGFR: 1 μM RET: 1.6 μM FGFR1: 1.6 μM
SU-11248	Sunitinib/Sutent	Inhibidor químico	Inhibidor de la actividad tirosin quinasa de VEGFR-1/2, inhibidor competitivo del sitio de unión del ATP.	15 nM	38 nM	VEGFR-3: 30 nM PDGFR: 55 nM c-KIT: 10 nM RET: 224 nM
Vandetanib	Caprelsa	Inhibidor químico	Inhibidor de la actividad tirosin quinasa de VEGFR-1/2	77 nM	37 nM	VEGFR-3: 660 nM PDGR: 580 nM c-KIT: 630 nM c-FMS: 1.4 μM
XL-880	Foretinib	Inhibidor químico	Inhibe VEGFR -2, bloque competitivo del sitio de unión a ATP	--	0.9 nM	MET: 0.4 nM
ZM306416 hydrochloride	--	Inhibidor químico	Inhibidor de la actividad tirosin quinasa de VEGFR-1/2	2 μM	100 nM	--

**Tabla 5 Lista de los principales inhibidores de los VEGFRs**

**CAPÍTULO 2 EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA  
ACTIVIDAD DE VEGFR-1 EN EL INFARTO  
CEREBRAL**

## **1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Se ha demostrado que el VEGF-A<sub>164</sub> tiene un efecto dual en el infarto cerebral tanto como un factor neurotóxico como neuroprotector y se piensa que este efecto ambivalente está relacionado a la activación diferencial de sus receptores VEGFR-1 y VEGFR-2, expresados constitutivamente en las células del parénquima cerebral. Ensayos *in vitro*<sup>41</sup> e *in vivo*<sup>84</sup>, sugieren que el efecto neuroprotector de VEGF-A<sub>164</sub> en el infarto cerebral es preferencialmente dependiente de la activación del VEGFR-2 expresado en neuronas<sup>85</sup>. El VEGFR-1, tradicionalmente considerado como un señuelo o un regulador negativo de la activación de VEGFR-2, ha sido poco estudiado en el infarto cerebral, sin embargo, evidencias recientes muestran que la activación de VEGFR-1 participa en el reclutamiento leucocitario a la zona de lesión<sup>86,87</sup>, la revascularización del tejido infartado<sup>88,89</sup> dependiente de la activación de los pericitos<sup>90</sup>, la inhibición de la apoptosis inducida por la isquemia en las neuronas del parénquima cerebral<sup>91</sup>, la regulación negativa de los *scavenger receptors* en las microglías activadas que se relaciona a una disminución del volumen de infarto<sup>92</sup> y el aumento de la permeabilidad de la BBB relacionado a la activación de semaforina 3A que exagera el daño producido por el infarto<sup>93</sup>. Sin embargo, aún no se ha determinado si el efecto de la activación de VEGFR-1 puede estar modulada por la activación simultánea del VEGFR-2.

## **2. HIPÓTESIS**

El efecto neuroprotector del VEGF-A<sub>164</sub> en el infarto cerebral es parcialmente dependiente de la activación de VEGFR-1.

### **3. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de la activación de VEGFR-1 en la fase aguda del infarto cerebral.

### **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar el efecto neuroprotector del VEGF-A<sub>164</sub> en el modelo de infarto cerebral por oclusión transitoria de la arteria cerebral media.
- Determinar si el efecto neuroprotector de VEGF-A<sub>164</sub> es dependiente de la activación diferencial de los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2.
- Determinar si el efecto neuroprotector de VEGFR-1 es dependiente de la viabilidad neuronal en el parénquima lesionado por el infarto.
- Determinar si el efecto neuroprotector de VEGFR-1 es dependiente del perfil inflamatorio local y sistémico en el infarto cerebral.
- Determinar si el efecto neuroprotector de VEGFR-1 es dependiente de la respuesta inmune temprana subsecuente a la polarización de la microglía.

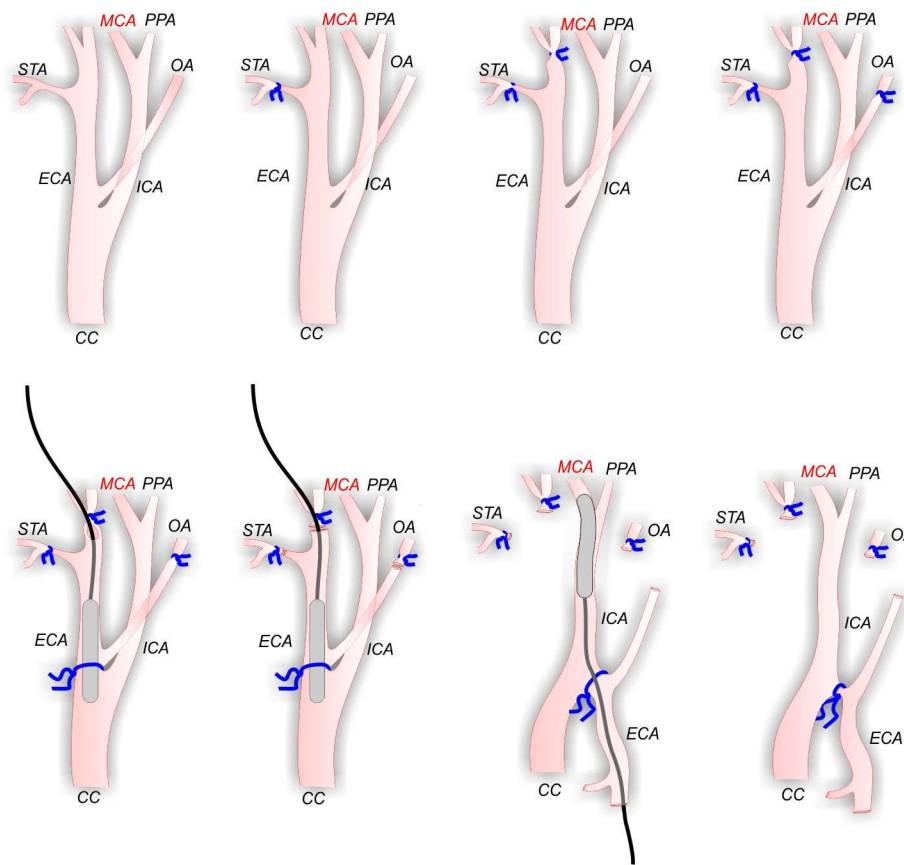
### **5. MÉTODOS**

#### ***A. Oclusión transitoria de la arteria cerebral media***

El modelo experimental de oclusión transitoria de la arteria cerebral media (t-MCAo) es el que mejor recapitula el mecanismo fisiopatológico del evento isquémico cerebral que ocurre en los seres humanos, puesto que consta de ambos componentes de daño, el isquémico seguido por el de reperfusión<sup>94</sup>. Para inducir

la t-MCAo se utilizó el método de Longa<sup>95</sup>, que se resume a continuación. Ratas Wistar machos (270-290 g) se anestesiaron con isofluorano (1.5% con oxígeno 0.5L/min), luego se registró la perfusión del parénquima cerebral irrigado por la arteria cerebral media en tiempo real mediante un láser Doppler colocado en el hueso parietal ipsilateral del cráneo en las coordenadas AP: -1.5, ML: +3.5. Posteriormente, se hizo una incisión paramedial en el tercio medio de la cara ventral del cuello y en el campo limitado por el músculo esternohioideo, esternocéfálico y el digástrico se disecó en planos hasta exponer la arteria carótida común y sus ramas, se ligó la porción distal de la arteria carótida externa, la arteria tiroidea superior y la arteria occipital, luego de colocar pinzas hemostáticas en la porción proximal de la carótida común y la distal de la carótida interna, se introdujo un monofilamento de nylon con cubierta de silicón (DOCCOL-403734) por una incisión en la carótida externa y se dirigió hacia la carótida interna hasta alcanzar el nacimiento de la arteria cerebral media en el polígono de Willis (Figura 1), momento en el que se registra una caída de la perfusión sanguínea. Los animales fueron retirados inmediatamente de la anestesia y puestos en una cama caliente. A los 90 min de oclusión se retiró el filamento, y se registró la reperfusión con el láser Doppler. Como criterio de inclusión sólo se consideraron los animales con una caída inferiores al 40% del nivel basal. En los ratones balb/c (27-29 g.) la oclusión fue de 60 min.





**Figura 1 Representación gráfica de la técnica de oclusión de la arteria cerebral media con un monofilamento de nylon.**

Luego de diseccionar la CC, se liga la porción distal de la STA, la ECA, y la OA; se hace una incisión en el extremo distal de la ECA por donde se introduce el monofilamento de nylon, luego se secciona la STA, la ECA y la OA lo más pegado a las suturas, de tal manera que el muñón libre de la ECA distal pueda traerse caudalmente hasta alinearla con la dirección de la MCA. Se sigue introduciendo el filamento hasta registrar la caída en la perfusión por oclusión del nacimiento de la MCA. MCA: arteria cerebral media; PPA: arteria Pterigopalatina; OA: Arteria occipital; STA: arteria Tiroidea superior; ICA: arteria Carótida interna; ECA: arteria Carótida externa; CC: Carótida común.

## **B. Cuantificación del volumen de infarto**

Para evaluar el volumen de infarto se utilizó la técnica de tinción con cloruro de trifeniltetrazolio (TTC), indicador redox que al reaccionar con la cadena respiratoria funcional de la mitocondria precipita a un compuesto que tiñe el tejido vivo de color rojo. Las cuantificaciones fueron hechas 24 h luego de la oclusión, los animales se perfundieron con 200 mL de NaCl al 0.9% frío, luego de lo cual se extrajo el cerebro y se colocó a -20 °C por 5 min para facilitar los cortes gruesos coronales de 2 mm realizados en una matriz cerebral. Los cortes fueron incubados en TTC al 2% por 10 min a 37 °C y las imágenes de las secciones digitalizadas se capturaron con un escáner (Lexmark X2650, Lexmark, Canadá) y el programa Imaging Studio (Lexmark, Canadá). El volumen de infarto se midió con un programa semiautomatizado personalizado (Anexo D) implementado en Fiji-ImageJ V2<sup>96</sup>. El volumen de infarto se corrigió con la siguiente fórmula

$$Infarct\ volume = t \times \sum_{i=1}^n \left( \frac{A_{cnt} \times A_{inf}}{A_{ips}} \right)$$

Donde  $t$  es el grosor de las secciones (2mm),  $n$  es el número de secciones,  $A_{cnt}$  es el área del hemisferio contralateral al infartado de la  $i$ ésima sección,  $A_{inf}$  es el área de infarto en la  $i$ ésima sección y  $A_{ips}$  es el área del hemisferio ipsilateral a la lesión de la  $i$ ésima sección

## **C. Cuantificación del volumen de edema**

Las cuantificaciones del volumen de edema fueron hechas a las 24 h de reperusión. para ello los animales se perfundieron con 200 mL de NaCl al 0.9% frío, se extrajo el

cerebro y se colocó a -20 °C por 5 min para facilitar los cortes gruesos coronales de 2 mm realizados en una matriz cerebral. Las secciones fueron digitalizadas con un escáner (Lexmark X2650, Lexmark, Canadá) y el programa Imaging Studio (Lexmark, Canadá). Con el programa Fiji-ImageJ V2<sup>96</sup> se midió las áreas correspondientes a los hemisferios en cada sección del cerebro y se multiplicó por el grosor del corte (2 mm). Los resultados fueron expresados como la proporción del volumen del hemisferio ipsilateral en comparación al contralateral.

#### ***D. Administración de VEGF-A<sub>164</sub> e inhibidores farmacológicos***

El VEGF-A<sub>164</sub> y sus inhibidores fueron administrados por vía intracerebroventricular (i.c.v.) con un capilar de vidrio graduado (diámetro de punta < 50 µm, velocidad de flujo 0.5 µL/min) en las coordenadas estereotáxicas AP: -0.8 mm, ML: -1.5 mm, DV: -4.0 mm; a los 30 minutos de reperfusión. El VEGF-A<sub>164</sub> recombinante de rata fue reconstituido en una solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 0.1% a una concentración final de 25 ng/µL; los inhibidores SU1498 y Axitinib, por su baja solubilidad en medios polares se resuspendieron en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final de 2.5 ng/µL. Para cada tratamiento se administró un volumen de 2 µL de cada solución de manera subsecuente, con un volumen final de 4 µL. En el caso de los controles, se administraron 2 µL de BSA 0.1% con 2 µL de DMSO.

#### ***E. Evaluación de la viabilidad neuronal***

Para evaluar la viabilidad de los tejidos se utilizó la tinción con violeta de cresilo, colorante básico que tiñe los ácidos nucleicos y permite ver su morfología. Para ello,

los cerebros de ratas fijados 24 h en paraformaldehído al 4% en solución salina amortiguada con fosfatos (PFA) y deshidratados en sacarosa al 30% fueron seccionados en cortes finos coronales de 40  $\mu\text{m}$  y almacenados en solución crioprotectora (etilenglicol al 30%, sacarosa al 30%, amortiguador de fosfatos al 0.1M) a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Luego de que las secciones fueron montadas en laminillas gelatinizadas y permeabilizadas en soluciones de alcohol etílico crecientes (0, 20, 75, 90, 100%), fueron teñidas con violeta de cresilo al 0.1% por 5 min a temperatura ambiente. Se tomaron microfotografías de 350 X 250  $\mu\text{m}$  en campo claro usando el programa Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics Inc., Buckinghamshire, UK) y la cámara Evolution UVF (Media Cybernetics, 12 megapixel) acoplada al microscopio Olympus IX71 con magnificación de 20X de tres secciones consecutivas separadas por 400  $\mu\text{m}$ . Para evaluar la viabilidad de las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza cerebral se consideraron dos características de los núcleos teñidos con violeta de cresilo: el diámetro y la circularidad. Las imágenes digitalizadas fueron analizadas por una rutina de macro personalizada (Anexo II y Anexo III) implementada en el programa Fiji (Fiji-ImageJ, versión 1.52i, NIH, USA)<sup>96</sup> tomando como parámetros una circularidad entre 0.47 y 0.88; y un área entre 30-250  $\mu\text{m}^2$ . Para calcular el índice de supervivencia, los conteos de neuronas vivas de cada sección fueron expresados como proporción de su lado contralateral respectivo, la media de los conteos proporcionales fue normalizada con el promedio proporcional del conteo de neuronas del grupo sham. Se implementó un algoritmo en el lenguaje de programación R para el cálculo automatizado de todos los conteos (Anexo III). La fórmula resultante fue:

$$survival\ index = \frac{p \times \left( \sum_1^t \left( \frac{\sum_{i=1}^n (C_i^{ips} / C_i^{cnt})}{n} \right) \right)}{t \times \left( \sum_1^p \left( \frac{\sum_{o=1}^m (S_o^{ips} / S_o^{cnt})}{m} \right) \right)}$$

Donde  $C^{ips}$  es el conteo ipsilateral de neuronas vivas,  $C^{cnt}$  es el conteo contralateral respectivo de neuronas vivas,  $n$  es el número de secciones coronales tomadas para cada cerebro infartado,  $t$  es el número de ratas infartadas por grupo,  $S^{ips}$  es el conteo ipsilateral de neuronas vivas del grupo de ratas sham,  $S^{cnt}$  es el conteo contralateral respectivo de neuronas vivas del grupo de ratas sham y  $m$  es el número de secciones coronales tomadas para cada cerebro del grupo de ratas sham,  $p$  es el número de ratas sham.

### F. Evaluación de la deficiencia neurofuncional

Para evaluar el deterioro neurofuncional de los animales sujetos a t-MCAo se les aplicó una batería de evaluaciones neurológicas 24 h después de producido el evento isquémico. La función neurológica fue evaluada con fundamento en reportes anteriores<sup>97,98</sup>, con ligeras modificaciones. La severidad de la deficiencia neurofuncional se evaluó en 8 parámetros:

Ítem	Actividad	Puntaje
Actividad espontánea	No se mueve y/o explora la caja incluso con estímulo externo.	0
	Se mueve y/o explora la caja de evaluación por menos de 10 s.	1
	Se mueve y/o explora la caja de evaluación al menos 10 s.	2

	Se mueve y/o explora por más de 20 s la caja de evaluación.	3
<b>Comportamiento circular levógiro</b>	No se mueve incluso con al estímulo	0
	Comportamiento circular al estímulo	1
	Comportamiento circular espontáneo	2
	No tiene comportamiento circular	3
<b>Estímulo doloroso</b> (aducción del miembro anterior después de presionar ligeramente las puntas de los dedos)	Movimiento asimétrico, aducción mínima del miembro contralateral a la lesión, permanece en el lugar.	0
	Movimiento asimétrico, aducción incompleta parética y bradicinética del miembro anterior afectado por la lesión, permanece en el lugar luego del estímulo.	1
	Movimiento asimétrico, aducción parética bradicinética del miembro anterior afectado por la lesión, permanece en el lugar luego del estímulo.	2
	Movimiento asimétrico, aducción parética bradicinética del miembro anterior afectado por la lesión pero se aleja del estímulo doloroso.	3
	Movimiento simétrico de los miembros y se aleja del estímulo doloroso.	4
<b>Tracción prensil</b> (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 anterior y posterior 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
	Uso asimétrico de los miembros, miembro no afectado preferentemente usado.	3
	Simétrica.	4
<b>Cola suspendida</b>	Queda suspendida inmóvil, sin intentar incorporarse.	0
	Se tuerce sin poder elevar el cuerpo.	1
	Incapaz de incorporarse, eleva el cuerpo solo hasta la horizontal.	2
	Eleva el cuerpo preferentemente por el lado ipsilateral.	3
	Eleva el cuerpo indistintamente por ambos lados.	4
<b>Postura</b>	Animal yace sobre la mesa.	0
	Miembro anterior y posterior contralateral incapaz de sostener el peso del cuerpo, el cuerpo descansa en la mesa sobre el lado afectado por la lesión.	1
	Miembro anterior afectado por la lesión incapaz de sostener el peso del cuerpo.	2
	Cuerpo ligeramente rotado al lado contralateral.	3

	Cabeza ladeada hacia al lado contralateral.	4
	Simétrica.	5
<b>Prueba del cilindro</b>	No se mueve.	0
	Comportamiento circular sin elevarse.	1
	Se eleva pero no apoya el miembro anterior afectado.	2
	Se eleva pero apoya preferentemente el miembro anterior no afectado.	3
	Se eleva y apoya los miembros anteriores en la pared simétricamente.	4
<b>Marcha</b>	No apoya la pata anterior afectada en la marcha, se apoya en el cuerpo del lado afectado.	0
	Arrastra el dorso de la pata anterior afectada durante la marcha.	1
	Arrastra el dorso de los dedos de la pata anterior afectada durante la marcha.	2
	Apoya el lado cubital de la pata anterior afectada durante la marcha.	3
	Dedos de la pata anterior afectada extendidos durante la marcha.	4
	Marcha simétrica.	5
<b>TOTAL</b>		<b>32</b>

La puntuación máxima alcanzada es de 32 (sin deficiencia neurofuncional) y la mínima es de 0 (deficiencia neurofuncional severa).

### ***G. RT-qPCR***

Para evaluar el componente sistémico de la respuesta neuroinflamatoria en el infarto cerebral se cuantificó la expresión de marcadores inflamatorios en leucocitos de sangre periférica. Para ello, 24 horas luego del infarto se tomó 1 mL de sangre de cada rata y se agregaron 50  $\mu$ L de EDTA 0.5M pH 8.0 como anticoagulante, luego se mezclaron suavemente con 10 mL de buffer de lisis de eritrocito (NH<sub>4</sub>Cl 155mM, NaCO<sub>3</sub> 12mM, EDTA 0.1M pH 8.0), se centrifugaron a 3500 rpm por 8 min a temperatura ambiente (Sorvall<sup>TM</sup> ST8, rotor 75005701, ThermoFisher Scientific,

Alemania). Para aislar el RNA total de los leucocitos precipitados, se homogenizaron en 1 mL de TRIzol (Ambion, Life technologies, Texas, EEUU), luego se agregaron 200  $\mu$ L de cloroformo y se separaron en 2 fases por centrifugación a 12,000 x g por 15 min a 4°C, se precipitó el RNA total de la fase acuosa con 500  $\mu$ L de isopropanol, luego se hicieron dos lavados con etanol al 75% y se solubilizó el RNA precipitado en agua bidestilada (H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>).

La pureza e integridad del RNA total se evaluaron por la relación de densidad óptica 260/280nm y en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, respectivamente. La reacción de retrotranscripción y amplificación se realizaron con el kit NZYspeed RT-qPCR Green Kit, ROX (nzyTECH, Portugal) en placas de 96 pozos, la fluorescencia fue cuantificada con el equipo Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR System (Thermo Fisher, Alemania), con el siguiente protocolo: 20 min de transcripción reversa a 50°C; 2 min de activación de la enzima a 95°C; 40 ciclos de 5 s de desnaturalización a 95°C, 30 s de alineación y amplificación a 61°C, usando los siguientes primers (Anexo IV):

<b>Gen</b>	<b>Número de acceso</b>	<b>Sentido</b>	<b>Secuencia</b>
<b>IL-1Beta</b>	NM_031512.2	Forward	CCCTGCAGCTGGAGAGTGTGG
		Reverse	TGTGCTCTGCTTGAGAGGTGCT
<b>IL-6</b>	NM_012589.2	Forward	CGAGCCCACCAGGAACGAAAGTC
		Reverse	CTGGCTGGAAGTCTCTTGCGGAG
<b>TGF-beta</b>	NM_021578.2	Forward	ACCTGCAAGACCATCGACAT
		Reverse	TGTTGTACAAAGCGAGCACC
<b>GAPDH</b>	NM_017008.4	Forward	GCATCTTCTTGTGCAGTGCC
		Reverse	GATCTCGCTCCTGGAAGATGG



La cuantificación de la expresión relativa de los mensajeros se realizaron usando el método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , usando la expresión del mensajero de gliceroaldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como gen de referencia. Análisis de la curva de fusión y de geles de acrilamida fueron realizados rutinariamente para evaluar las reacciones de RT-qPCR.

### ***H. Milliplex***

Para complementar la evaluación de marcadores inflamatorios periféricos y centrales se cuantificaron los niveles de expresión a proteica. Para ello se obtuvieron muestras de sangre y líquido cefalorraquídeo (CSF), respectivamente, a las 24 h pos-infarto. Las muestras de 1 mL de sangre se recolectaron por punción transcardiaca bajo anestesia, se agregó 50  $\mu$ L/mL de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 0.5M y luego se centrifugaron a 500 g por 8 min a temperatura ambiente, se extrajeron las fracciones plasmáticas de cada muestra y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Las muestras de CSF se obtuvieron por la punción de la cisterna magna con un capilar (VWR 53508-433 25  $\mu$ L), las muestras se mantuvieron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. La detección de citoquinas se realizó con el kit cytokine/chemokine magnetic bead Milliplex MAP panel (Millipore, Temecula, CA) para rata, de acuerdo a las especificaciones del fabricante. En una placa de 96 pozos se determinaron simultáneamente la presencia de IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17, TNF- $\alpha$ , CCL11, INF $\gamma$ , CX3CL1 y VEGF. Los anticuerpos se resuspendieron en 3 mL de diluyente y los estándares se prepararon con H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> en concentraciones finales de 200 a 16,000 pg/mL. Los controles positivos se resuspendieron en 250  $\mu$ L

de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>. Luego se lavaron los pozos con 200 µL de buffer de ensayo, se pusieron 25 µL de estándares, controles positivos y muestras a cada pozo. Luego se agregaron 25 µL de buffer de mezcla y se incubaron en agitación constante por 2 h a temperatura ambiente. Luego de los lavados, se agregaron 25 µL de buffer de detección de anticuerpos, y se incubaron por 1 h en agitación constante a temperatura ambiente. Luego se agregaron 25 µL de estreptavidina-ficoeritrina a cada pozo y se incubaron a temperatura ambiente por 30 min en agitación constante. Previo a la lectura del equipo se agregaron 125 µL de líquido de cubierta. La placa fue leída en el equipo MAGPIX system (EMD Millipore, Darmstadt, Alemania). Los resultados fueron analizados en el programa xPONENT (Luminex, Madison, WI). Los ensayos fueron hechos con duplicados técnicos y triplicados biológicos (n=3).

### ***I. Inmunofluorescencia***

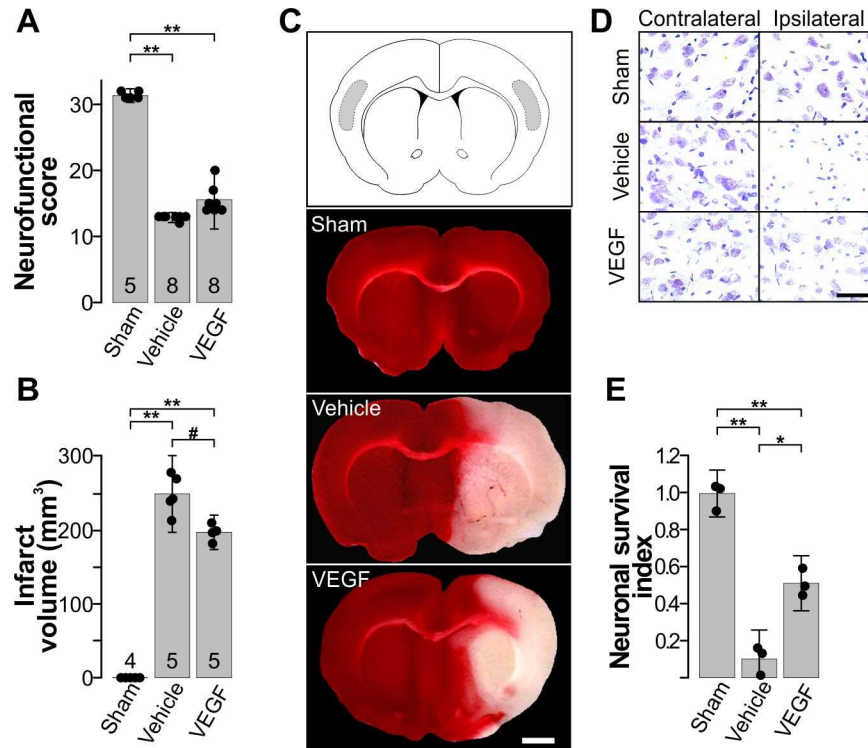
Los cortes finos coronales de 40 µm del cerebro de ratas infartadas fijados en PFA y deshidratados en gradiente de sacarosa fueron incubados con solución de bloqueo (PBS con Tritón x-100 al 0.5% y albumina de suero bovino al 5%) por 1 hora a temperatura ambiente. Luego las secciones fueron incubadas en flotación con los anticuerpos primarios contra Iba-1 (1:200; Waco; Richmond, VA, EEUU) y contra arginasa-1 (1:200; Invitrogen) por 48 horas a 4° centígrados. Se lavo tres veces con solución de lavado (PBS con Tritón X-100 al 0.5%), cada una por 10 minutos en agitación constante. Y finalmente, se incubó con los anticuerpos secundarios Alexa 546 contra conejo y Alexa 488 contra ratón (ambos a 1:2000; Invitrogen, Caslbad, CA, EEUU) en solución de lavado por 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Para la reconstrucción en z, se tomaron un

promedio de 45 microfotografías cada 0.5  $\mu\text{M}$  con el microscopio confocal Zeiss LSM 800 usando un objetivo de 63X. Un promedio de 45.

## **6. RESULTADOS**

### ***A. La administración exógena VEGF-A164 en los primeros 30 minutos de reperfusión tiene actividad neuroprotectora en el t-MCAo.***

En este modelo *in vivo*, la sobreexpresión de VEGF-A<sub>164</sub> ha mostrado tener un efecto ambivalente, tanto neuroprotector<sup>99</sup> como neurotóxico<sup>100</sup>, por lo que iniciamos por definir el efecto de la administración exógena VEGF-A<sub>164</sub>. La lesión producida por la t-MCAo afecta principalmente la región del estriado (foco del infarto) y la porción medial de la corteza cerebral (penumbra). La administración i.c.v. de 50 ng de VEGF-A<sub>164</sub>, no mostró una mejoría significativa de la actividad neurofuncional (Figura 2A) pero si mostró una disminución significativa ( $p = 0.01$ ) del 20% del volumen de infarto (media: 197.82 mm<sup>3</sup>, D.E.: 11.54 mm<sup>3</sup>) en comparación con el grupo infartado sin tratamiento (media: 250.14 mm<sup>3</sup>, D.E.: 26.14 mm<sup>3</sup>) (Figura 2B y Figura 2C), que se relacionó a un mayor número de neuronas viables (media de índice de supervivencia neuronal 0.5098, D.E.: 0.0743) visto en cortes coronales finos de cerebros de ratas infartadas teñidos con Nissl en comparación con las ratas infartadas administradas con vehículo (media de índice de supervivencia neuronal 0.1015, D.E.: 0.0779) (Figura 2D y Figura 2E). Los resultados mostraron que la administración exógena de 50 ng de VEGF-A<sub>164</sub> i.c.v. tiene un modesto efecto neuroprotector.



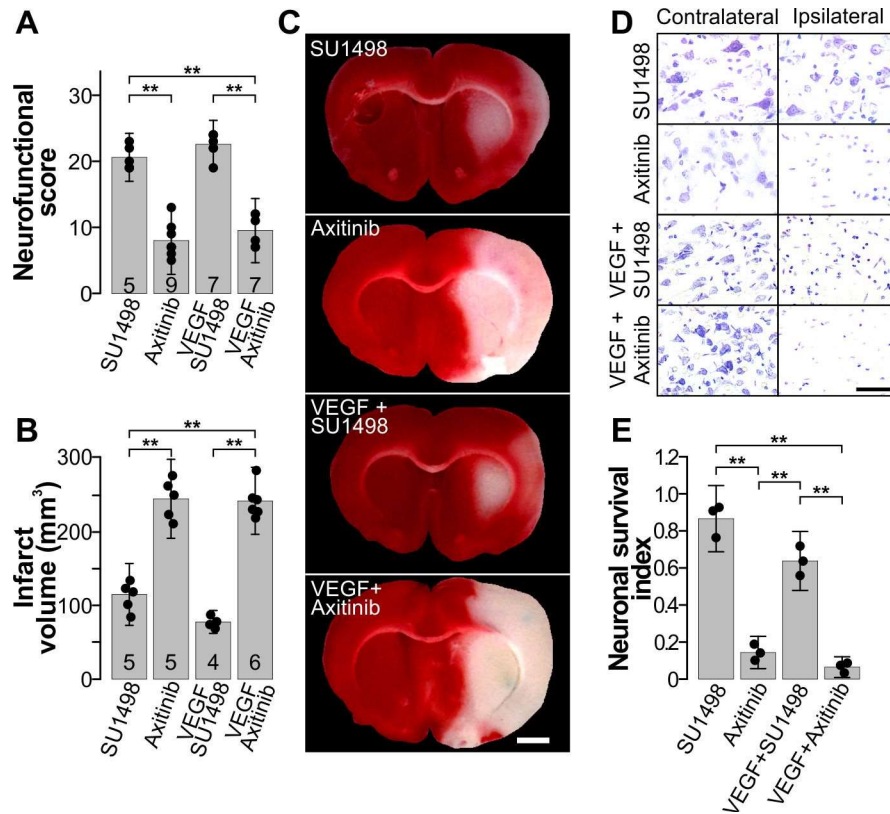
**Figura 2 Efecto neuroprotector de la administración exógena de VEGF-A164 en el modelo de t-MCAo**

(A) Comparación del desempeño neurofuncional tomado a las 24 h posteriores al infarto en el grupo sham, el vehículo (2  $\mu$ L de BSA + 2  $\mu$ L de DMSO i.c.v.) y el grupo de VEGF-A<sub>164</sub> (50 ng de VEGF-A<sub>164</sub> vía i.c.v.), con una n de 7 por cada grupo. (B) Comparación del volumen de infarto medido con la tinción de TTC a las 24 h posteriores a la isquemia, con una n de 5 por cada grupo. (C) Imágenes digitalizadas representativas de cada grupo de cortes coronales gruesos de 2 mm de ancho de cerebros de ratas teñidos con TTC, la lesión (representada por la región blanca del tejido) muestra una disminución en el grupo tratado con VEGF-A<sub>164</sub>, barra de calibración = 2 mm. (D) Microfotografías de cortes coronales finos de 40  $\mu$ m de grosor de cerebros de ratas infartadas teñidos con violeta de cresilo, en el lado correspondiente al infarto (ipsilateral) se observa una menor densidad de núcleos y una contracción e hipercomía de algunos los núcleos presentes, barra de calibración = 50  $\mu$ m. (E) Comparación del índice de supervivencia neuronal calculado a partir de las imágenes de microfotografía de cortes finos coronales de cerebros de ratas infartadas teñidos con Nissl, con una n de 3 por cada grupo. Las barras corresponden a  $\pm$  2 D.E. #:  $p < 0.05$ , \*:  $p < 0.01$  y \*\*:  $p < 0.001$ .

## ***B. La activación temprana del VEGFR-1 potencia el efecto neuroprotector del VEGF en el infarto cerebral.***

La actividad biológica del VEGF depende de la activación de los receptores tirosina cinasa; los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2, el canónico<sup>101</sup>. Dichos receptores están constitutivamente expresados en distintas células del parénquima cerebral. En ensayos *in vitro* se demostró que el efecto neuroprotector de VEGF, en condiciones de hipoxia, es dependiente de la activación del VEGFR-2<sup>41</sup>, pero la participación de VEGFR-1 ha sido poco estudiada. Para abordar esta pregunta utilizamos el inhibidor farmacológico de VEGFR-2 SU-1498 (IC<sub>50</sub> 700 nM), permitiendo así analizar la actividad aislada de VEGFR-1. La inhibición farmacológica temprana del VEGFR-2 con SU1498 mejora significativamente ( $p < 0.0001$ ) el desempeño neurofuncional (media: 20.43, D.E.: 1.62) en comparación con el grupo de ratas no tratadas y tratadas con VEGF. La administración de Axitinib, un inhibidor farmacológico no específico de los tres receptores para VEGF (IC<sub>50</sub> 0.1 nM para VEGFR-1, IC<sub>50</sub> 0.2 nM para VEGFR-2), suprime completamente el efecto neuroprotector visto con la administración temprana de SU-1498 (**Figura 3A**). La administración conjunta de los inhibidores con VEGF no altera los resultados antes vistos (**Figura 3A**) o en comparación con el grupo de ratas tratadas con VEGF exclusivamente (**Figura 2A**). Estos resultados correlacionan con el volumen de infarto cuantificado con las tinciones con TTC (**Figura 2B** y **Figura 2C**), el grupo de ratas tratadas con SU1498, con o sin administración conjunta con VEGF, muestran una reducción significativa del volumen de infarto a menos del 50% al observado a las

ratas tratadas con Axitinib, con o sin administración conjunta con VEGF (Figura 2B y Figura 2C). Asimismo, el índice de supervivencia neuronal es cuatro veces superior en el grupo de ratas tratadas con SU1498, en comparación con las ratas tratadas con Axitinib (Figura 2D y Figura 2E). Estos resultados demuestran que el bloqueo temprano de la activación de VEGFR-2 tiene un efecto neuroprotector en el infarto cerebral, lo que sugiere que VEGFR-1, que también es activado por VEGF, pueda estar teniendo un efecto neuroprotector.



**Figura 3 Efecto neuroprotector de la inhibición temprana del VEGFR-2**

(A) Comparación del desempeño neurofuncional tomado a las 24 h posteriores al infarto en el grupo tratado con SU1498 (50 ng de SU1498 en 2  $\mu$ L de DMSO + 2  $\mu$ L de BSA i.c.v.), el tratado con Axitinib (50 ng de Axitinib en 2  $\mu$ L de DMSO + 2  $\mu$ L de BSA i.c.v.), el tratado con SU1498-VEGF (50 ng de VEGF en 2  $\mu$ L de BSA + 50 ng de SU1498 en 2  $\mu$ L de DMSO i.c.v.) y el grupo tratado con Axitinib-VEGF (50 ng de VEGF en 2  $\mu$ L de BSA + 50 ng de Axitinib en 2  $\mu$ L de DMSO i.c.v.), con una n de 7 por grupo. (B) Comparación del volumen de infarto medido con la tinción de TTC a las 24 h posteriores a la isquemia, con una n de 5 por grupo. (C) Imágenes digitalizadas representativas de cada grupo de cortes coronales gruesos de 2 mm de ancho de cerebros de ratas teñidos con TTC, la lesión muestra una disminución significativa en los grupos tratados con SU1498 y SU1498-VEGF, barra de calibración = 2 mm. (D) Microfotografías de cortes coronales finos de 40  $\mu$ m de grosor de cerebros de ratas infartadas teñidos con violeta de cresilo, en el lado correspondiente al infarto (ipsilateral) se observa una menor densidad de núcleos y una contracción e hiper Cromía de algunos los núcleos presentes, barra de calibración = 50  $\mu$ m. (E) Comparación del índice de supervivencia neuronal calculado a partir de las imágenes de microfotografía de cortes finos coronales de cerebros de ratas infartadas teñidos con Nissl, con una n de 3 por grupo. Las barras corresponden a  $\pm$  2 D.E. #:  $p < 0.05$ , \*:  $p < 0.01$  y \*\*:  $p < 0.001$ .

### ***C. El volumen de edema se mantiene pese a la reducción del volumen de infarto.***

El edema es otro componente importante de la fisiopatología del infarto cerebral que puede exacerbar el daño producido por la isquemia inicial<sup>102</sup> y ha sido relacionado con el efecto neurotóxico mediado por VEGF<sup>103</sup>. Todos los grupos muestran un edema entre el 10-15% del volumen equivalente del hemisferio contralateral (edema = [volumen hemisferio ipsilateral – volumen hemisferio contralateral] / hemisferio contralateral), independientemente de la administración de VEGF o sus inhibidores, sin haber diferencias significativas entre ellos (Anexo V). Este resultado muestra que el parénquima irrigado por la arteria cerebral media fue homogéneamente comprometido en todos los grupos y que el efecto neuroprotector observado por reducción del volumen de infarto es independiente a este (Figura 2 y Figura 3). La tendencia a un menor volumen de edema en los grupos tratados con SU1498 (Anexo V) es consecuente con el menor volumen de infarto en estos grupos (**Figura 3B** y **Figura 3C**).

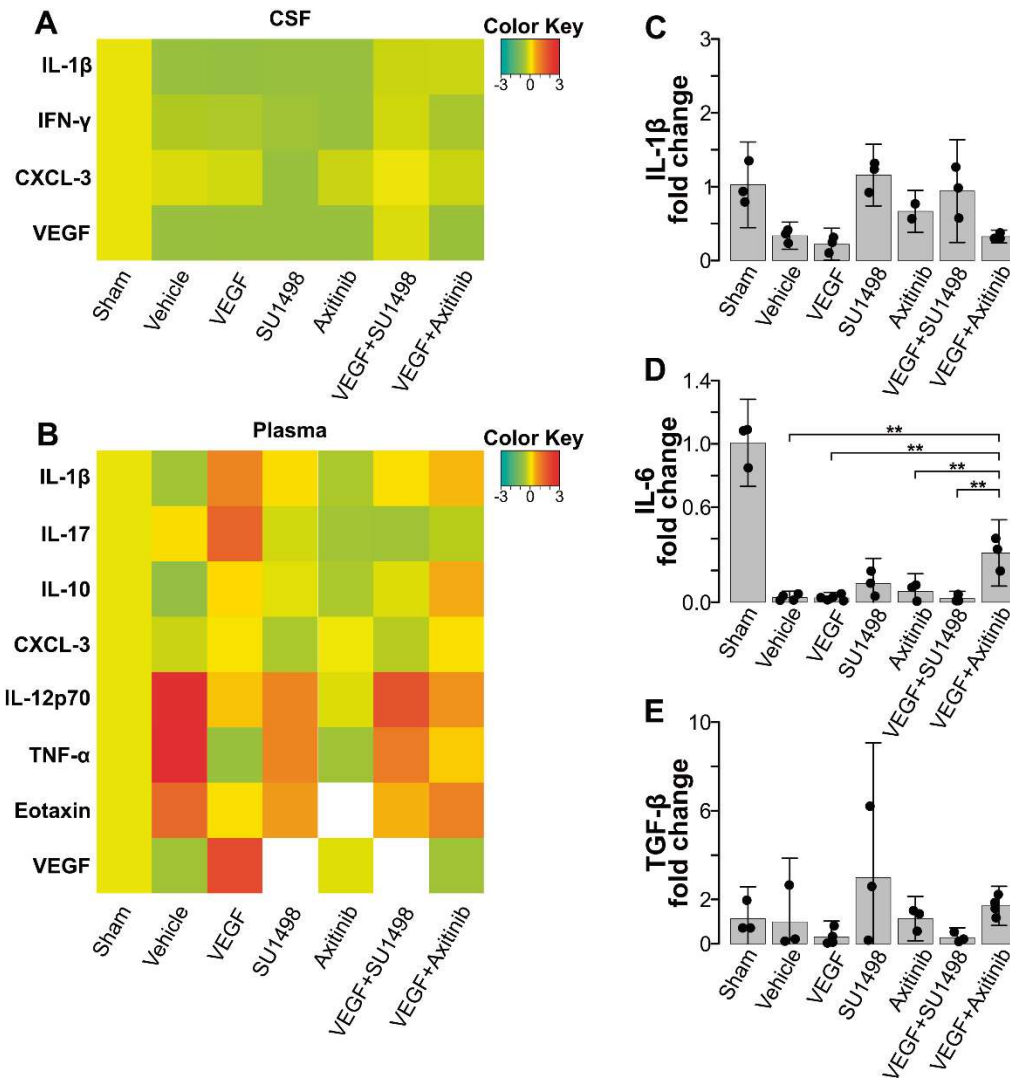
### ***D. La pérdida de peso es independiente del volumen de infarto a las 24 horas.***

Las ratas sometidas a t-MCAo muestran una pérdida de peso significativamente mayor ( $p > 0.05$ ) que las sham (Anexo VI). Aunque está bien establecido que la zona de penumbra del parénquima lesionado entra en un estado hipermetabólico<sup>104,105</sup>, luego de ocurrido el evento isquémico, la pérdida de peso no correlaciona con el volumen de infarto (Figura 2, **Figura 3** y Anexo VI).



***E. La neuroprotección por activación preferencial de VEGFR-1 es independiente de la modulación de la respuesta neuroinflamatoria***

Los ensayos de Milliplex se realizaron en muestras pareadas de suero (Figura 4<sup>a</sup>) y líquido cefalorraquídeo (Figura 4B) de ratas infartadas, a las 24 h de reperfusión, pese a las tendencias se logró observar cambios estadísticamente significativos o patrones entre los diferentes grupos. Los ensayos de RT-qPCR de RNA de leucocitos de sangre periférica para los genes IL-1beta (Figura 4C), IL-6 (Figura 4D) y TGF-beta (Figura 4E), no muestran diferencia significativa entre los grupos de ratas tratadas con VEGF y las tratadas con vehículo .



**Figura 4** La inhibición de la activación de los receptores de VEGF no modula la respuesta neuroinflamatoria

Heatmap de la expresión, a nivel protéico, de los principales marcadores inflamatorios en líquido cefalorraquídeo (A) y en el plasma sanguíneo (B), a las 24 h luego del evento isquémico. Nivel de expresión de mRNA de IL-1 $\beta$  (C), IL-6 (D) y TGF- $\beta$  (E), normalizado con la expresión en el grupo sham. Las barras corresponden a  $\pm 2$  DE. IL-1 $\beta$ : interleucina 1 beta, IL-6: interleucina 6, TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante beta. Las barras corresponden a  $\pm 2$  DE.

## ***F. El efecto neuroprotector de VEGFR-1 no está relacionado a la polarización de la microglía.***

La microglía/macrófagos marcados indistintamente con la molécula adaptadora 1 de unión a calcio ionizado (Iba1<sup>+</sup>) presentan una forma ameboide en la corteza ipsilateral a la lesión. La forma ameboide de la microglía es un indicador de activación, más no de polarización para lo cual se utilizó la marca de arginasa-1 (Arg1). Arg1 es un marcador de microglía polarizado al fenotipo anti-inflamatorio M2. La marca de Arg1 es expresada por la mayoría de las células Iba1<sup>+</sup> vistas en las microfotografías, en todos los grupos excepto en el grupo sin tratamiento (vehículo).

En el lado contralateral (Figura 5), la microglía conserva morfológicamente sus proyecciones típicas, cortas y múltiples; pero también, expresa Arg1, excepto en el grupo tratado con Axitinib, que muestra parcialmente la polarización de éstas hacia un fenotipo anti-inflamatorio M2.

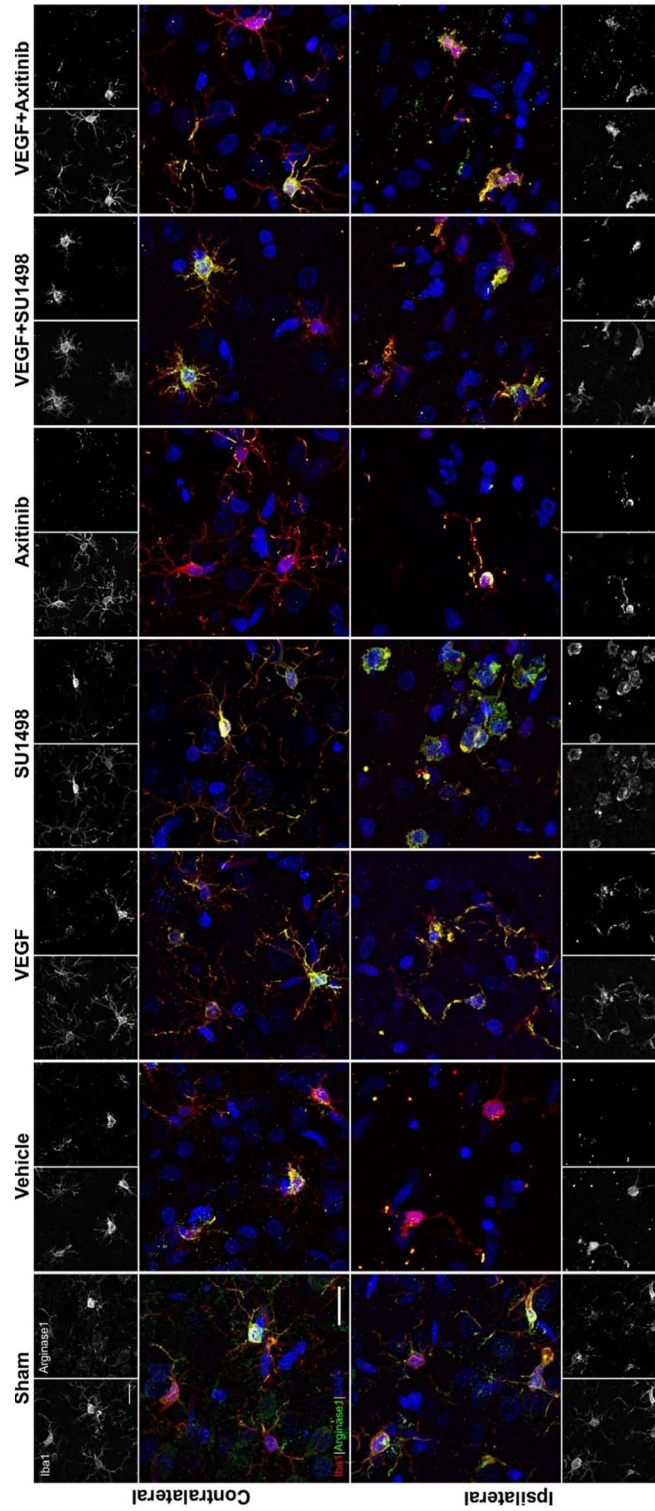
Estos resultados cualitativos muestran que la microglía está polarizado al fenotipo M2 en la corteza de ambos hemisferios a las 24 h luego del infarto, independientemente del tamaño de la lesión o el tratamiento. Además, el efecto neuroprotector dependiente de la activación preferencial de VEGFR-1 es independiente de la polarización de la microglía.

---

### ***Figura 5: Polarización de la microglía hacia el fenotipo M2 en la corteza de cerebros de ratas infartadas.***

*Microfotografías de inmunofluorescencia confocal de cortes coronales de cerebros de ratas infartadas, tomadas en la región periinfarto de la corteza entre las capas III y V. La microglía fue marcada con Iba1+ (rojo), la polarización hacia fenotipo M2 fue identificada por la presencia de la marca de Arg (verde), los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Barras de calibración 20µm.*

*Activación diferencial de los receptores para el VEGF como mecanismo de neuro-protección en el infarto cerebral isquémico*



## 7. DISCUSIÓN

Se ha demostrado que el VEGF-A<sub>164</sub> tiene un efecto dual en el infarto cerebral. La administración intravascular de VEGF-A<sub>164</sub> 1 h o 48 horas luego del infarto tiene un efecto neurotóxico por aumento de la permeabilidad de la BBB<sup>59</sup>. La alteración de la permeabilidad selectiva es dependiente de la activación de las vías Src y PI3-K/Akt/eNOS<sup>106</sup> de VEGFR-2<sup>62</sup>, que induce la regulación negativa de las uniones estrechas del endotelio vascular disminuyendo su expresión y promoviendo su degradación a nivel protéico<sup>66,107</sup>, exacerbando el daño producido por el infarto cerebral<sup>108,109</sup>. Por otro lado, la administración continua i.c.v. de VEGF-A<sub>164</sub> entre las 24 a 96 h posteriores al infarto tiene un efecto neuroprotector en la lesión isquémica<sup>56</sup>. Ensayos *in vitro*<sup>41</sup> e *in vivo*<sup>84</sup>, sugieren que el efecto neuroprotector de VEGF-A<sub>164</sub> es preferencialmente dependiente de la activación del VEGFR-2 expresado en neuronas<sup>85</sup>. Sin embargo, el efecto biológico de la activación de VEGFR-1 ha sido poco estudiado. Nuestro trabajo sugiere que la actividad de VEGFR-1 en las primeras 24 h tiene un efecto neuroprotector mayor e independiente de la activación o inactivación de VEGFR-2. En congruencia con nuestros resultados, el trabajo de Sun et al. (2004) muestra que la activación de VEGFR-1 por administración local de su ligando canónico VEGF-B tiene un efecto neuroprotector en modelos similares de infarto<sup>110</sup>. El trabajo de Guaiquil et al. (2014) muestra que el efecto neuroprotector de VEGF-B es mayor que el de VEGF-A en un modelo *in vitro* de lesión de neuronas del ganglio trigémino<sup>111</sup>; además, el trabajo de Li et al. (2008) muestra que la delección de VEGF-B en ratones transgénicos incrementa el volumen de infarto en el 40%<sup>112</sup>.

Nuestros resultados muestran que el efecto neuroprotector de la activación de VEGFR-1 por VEGF-A<sub>164</sub> está asociado a una menor muerte neuronal en el parénquima lesionado que puede ser debida a la regulación negativa de la expresión de proteínas pro-apoptóticas de la familia de BH3, asociada a la activación de VEGFR-1<sup>112</sup>. Además, la expresión de ambos receptores, VEGFR-1 y 2, se incrementa desde las primeras horas del infarto en las neuronas del parénquima lesionado, llegando al pico de expresión a las 24 h después del evento isquémico<sup>113,114</sup>. El VEGFR-1 también es expresado por el endotelio y la microglía<sup>115</sup>. Nuestros resultados muestran que el efecto neuroprotector de VEGFR-1 no está relacionado a la regulación del edema por alteración del endotelio vascular. Interesantemente, el trabajo de Van Bruggen et al. (1999) muestra que la disminución de la activación de VEGFR-2 disminuye la formación del edema<sup>109</sup>. Nosotros no encontramos diferencias significativas del volumen de edema con la administración del inhibidor farmacológico de VEGFR-2 (SU1498). Esto parcialmente se explica por la ubicación polarizada de los receptores de VEGF en los lados luminal y abluminal del endotelio vascular que inducen diferentes respuestas biológicas<sup>65</sup>. Van Bruggen et al. (1999) inhiben la activación de los receptores expresados en el lado luminal, y en nuestro trabajo inhibimos los del lado abluminal, lo que sugiere que la activación de los receptores para VEGF en el lado luminal están más relacionados a la formación del edema en el infarto cerebral.

La respuesta inflamatoria es un elemento clave en la fisiopatología del infarto cerebral, participando tanto en los mecanismos de daño neuronal como de reparación y revascularización del tejido lesionado<sup>49</sup>. La respuesta inflamatoria se inicia y es modulada tempranamente por la microglía<sup>49,70</sup>. La microglía responde dinámicamente a la lesión

isquémica, polarizándose en las primeras 72 h a un fenotipo M2 neuroprotector seguido de una transición al fenotipo neurotóxico M1<sup>116</sup>. Consecuentemente, nuestros resultados muestran que la microglía en el borde peri-infarto expresa Arg1, marcador de fenotipo M2, 24 h después del evento isquémico y que la inhibición de los receptores de VEGF no altera dicha polarización. La microglía en la fase aguda disminuye la expresión de moléculas proinflamatorias en astrocitos reactivos como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, cuya sobreproducción se relaciona a mayor estrés oxidante y muerte neuronal<sup>81</sup>. Nosotros no encontramos diferencias significativas en la expresión de dichos marcadores inflamatorios a nivel de proteína ni mensajero, a nivel local o sistémico. Pese a que la microglía activada expresa VEGF y el VEGFR-1<sup>117</sup>, nuestros resultados muestran que el efecto neuroprotector de VEGFR-1 no está directamente relacionado a la modulación de la respuesta inmune en las primeras 24 horas después del infarto. En línea con estos resultados, el trabajo de Beck et al. (2010) demostraron que la inhibición de VEGFR-1 en fagocitos por delección del dominio TK no disminuye el volumen de infarto, pese a que se observó una disminución significativa de la infiltración de microglía/macrófago/monocito a la zona de lesión<sup>115</sup>.

## **8. CONCLUSIONES**

El efecto neuroprotector visto por la inhibición selectiva de VEGFR-2 para ser dependiente a la activación de VEGFR-1 por el ligando endógeno en el infarto cerebral.

**CAPÍTULO 3 LA VASOCONSTRICCIÓN COMO  
CRITERIO DE INCLUSIÓN EN EL MODELO DE  
INFARTO CEREBRAL POR OCLUSIÓN  
TRANSITORIA DE LA ARTERIA CEREBRAL  
MEDIA.**



## **1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La alta variabilidad en el volumen del infarto, característico del modelo t-MCAo, es explicada de manera insuficiente por la variación intrínseca atribuida a los modelos biológicos. La caída de la perfusión mayor al 60% del nivel basal como el principal criterio de inclusión es un marcador exiguo para discriminar infartos adecuadamente instalados de los no logrados. Por otro lado, nosotros hemos observado que en la fase inicial de la reperfusión se definen dos curvas estereotipadas de la perfusión del tejido (lecturas de perfusión del te), que son consecuencia del establecimiento de la lesión isquémica en el parénquima cerebral adyacente, y que podrían servir para discriminar la intensidad del infarto.

## **2. HIPÓTESIS**

Las curvas estereotipadas de perfusión en la fase inicial de la reperfusión determinan el grado de compromiso isquémico del parénquima cerebral.

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Determinar si las curvas estereotipadas de la reperfusión se relacionan con el compromiso parénquima cerebral en el modelo de infarto por t-MCAo.

## **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Implementar y estandarizar un modelo de microscopía intravital por ventana intracraneal para determinación de la irrigación sanguínea en la corteza cerebral *in vivo*.
- Caracterizar las curvas estereotipadas de la perfusión del parénquima cerebral lesionado por el infarto en el inicio de la reperfusión.

- Determinar si la caída de la perfusión se relaciona con un fenómeno de vasoconstricción por microscopía intravital.

## **5. MÉTODOS**

### ***A. Microscopía intravital del árbol vascular cerebral***

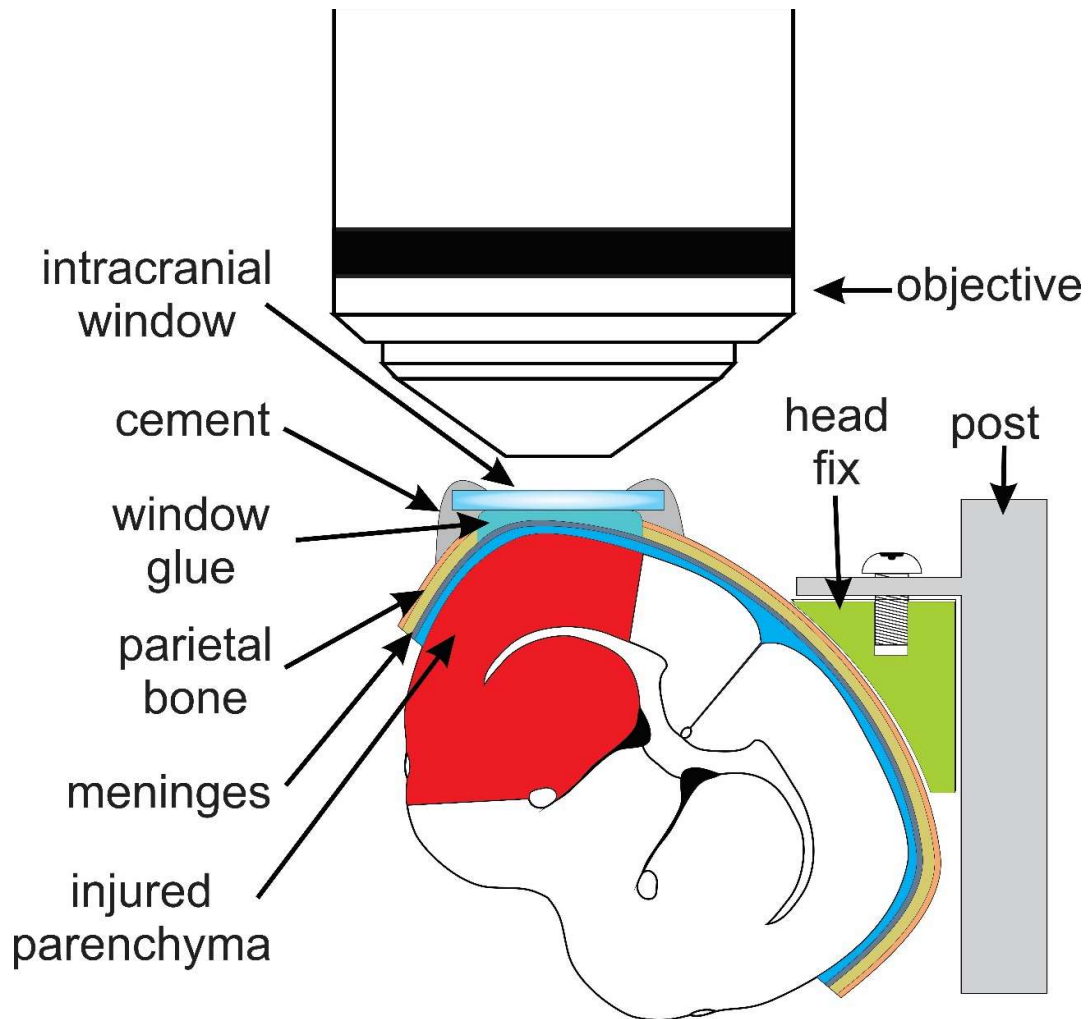
Para evaluar la hemodinámica de los vasos cerebrales se implementó una técnica de microscopía intravital que permite observar en tiempo real la vasculatura cerebral durante el infarto y la reperusión cuando se retira el filamento que se usa para ocluir la arteria cerebral media en el modelo de infarto isquémico. Veinticuatro h antes del infarto se implantó una ventana intracraneal, en ratones anestesiados con isoflurano (1.5% con oxígeno 0.5L/min) se les realizó una craneotomía de 3 mm de diámetro en la región medio lateral del hueso parietal ipsilateral al infarto, con el cuidado de mantener intacta la duramadre subyacente al hueso. Para evitar el trauma mecánico que pudiera producir la ventana rígida contra la superficie blanda de la corteza cerebral, se colocaron entre ambas superficies 20  $\mu$ L de CSF artificial (NaCl 127 mM, KCl 1 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2 mM,  $\text{NaHCO}_3$  26 mM, D-glucosa 10mM,  $\text{CaCl}_2$  2.4 mM,  $\text{MgCl}_2$  1.3 mM) en agarosa 2%, y luego encima la ventana (cubreobjetos circular de 5 mm de diámetro) que se fijó al cráneo con un pegamento de cianoacrilato (Resistol 911 - Henkel). Luego se dejaron a los animales en una cama caliente con acceso a agua y comida *ad libitum*. Veinticuatro h después y bajo anestesia (isoflurano 1.5% con oxígeno 0.5L/min) se les colocó un adaptador de acrílico diseñado específicamente para girar el cráneo 50° (en el plano coronal) y colocar la región de parénquima infartado en el área de trabajo del microscopio de dos fotones. Para marcar

fluorescentemente el árbol arterial se inyectó FITC-dextran 70KDa (50mg/mL, 0.3mg/g de peso corporal)<sup>118</sup> por la vena yugular ipsilateral. Luego se realizó el protocolo de MCAo por la técnica, descrita a continuación. Para obtener las imágenes de microscopía, se retiró la anestesia inhalada y se reemplazó por anestesia intramuscular (ketamina 65mg/kg, xilacina 13mg/kg, acepromazina 1.5mg/kg)<sup>119</sup>. En el microscopio Carl Zeiss LSM710 con el objetivo W Plan-Apochromat 20x/1.0 DIC VIS-IR (medio de inmersión agua) se obtuvieron imágenes de fluorescencia con el programa ZEN system (Carl Zeiss) en campos de 230 x 230  $\mu\text{m}$  (300 x 300 pixeles) a una profundidad de 180  $\mu\text{m}$  de la duramadre, con una excitación de 780 nm emitida por el láser “ti sapphire laser” -Coherent y se recolectó las señales emitidas a 519 nm a una velocidad de 180 ms/cuadro. Para la reconstrucción de la vasculatura de los empalmes de 150  $\mu\text{m}$  de grosor tomados, se aplicó un filtro de máxima proyección.

### ***B. Oclusión transitoria de la arteria cerebral media***

Para inducir la t-MCAo se utilizó el método de Longa<sup>95</sup>, que se resume a continuación. Ratones balb/c (27-29 g.) se anestesiaron con isoflurano (1.5% con oxígeno 0.5L/min). La ventana intracraneal puesta 24 horas en el sitio de registro de la perfusión impidió registró Doppler de la perfusión. Se hizo una incisión paramedial en el tercio medio de la cara ventral del cuello y en el campo limitado por el músculo esternohioideo, esternocéfálico y el digástrico se disecó en planos hasta exponer la arteria carótida común y sus ramas, se ligó la porción distal de la arteria carótida externa, la arteria tiroidea superior y la arteria occipital, luego de colocar pinzas hemostáticas en la porción proximal de la carótida común y la distal de la carótida interna, se

introdujo un monofilamento de nylon con cubierta de silicón (DOCCOL-602291) por una incisión en la carótida externa y se dirigió hacia la carótida interna hasta alcanzar el nacimiento de la arteria cerebral media en el polígono de Willis (Figura 1). A los 60 min de oclusión se retiró el filamento, y se registró la dinámica vascular por la técnica de microscopia *intra vital* antes descrita.



**Figura 6: Representación gráfica de la microscopía intra vital del árbol vascular.**

Se muestra un corte coronal de la cabeza del animal montado en el bastidor diseñado para ser acoplado al microscopio multifotónico. En rojo se representa la zona de parénquima cerebral lesionada por el infarto, en azul oscuro el líquido cefalorraquídeo, en amarillo el hueso parietal. Nótese que las meninges (de color gris) quedan intactas en esta técnica. La cabeza del animal se gira 50° en el eje longitudinal para poder colocar la zona lesión en el rango de trabajo del objetivo del microscopio, para ello se diseñó una prótesis que permite girar el cráneo y fijarlo al poste móvil del bastidor.

### ***C. Cuantificación del diámetro de vasos***

Para la cuantificación del diámetro de los vasos en las adquisiciones time lap de fluorescencia, primero se alinearon las imágenes con el plug-in “Template matching” (<https://sites.google.com/site/qingzongtseng/template-matching-ij-plugin>) y luego se corrió una rutina de macro personalizada (Anexo VII) implementada en el programa Fiji-ImageJ V2<sup>96</sup> que permite marcar entre 15 a 25 áreas de interés (ROIs de 1 x 20 pixeles) en un trayecto lineal de 10 µm por vaso, el diámetro de los vasos es calculado por el programa a partir de la imagen binaria de cada ROI en cada cuadro de forma automática (Anexo VII). Luego, los datos fueron importados a R con ayuda de un algoritmo específicamente desarrollado (Anexo VIII), y fueron alineadas manualmente con funciones desarrolladas en R (Anexo IX), la media de los diámetros de cada vaso tomados a partir de sus ROIs respectivos fue comparada en dos tiempos, durante la oclusión y en la fase temprana de la reperusión (Anexo X). La comparación de los diámetros se hizo a partir de la media de las distancias de los datos correlacionados de los diámetros durante la oclusión y en la fase temprana de la reperusión a la línea de tendencia (cuya pendiente está determinada por el ensayo control), esto se hizo de forma automática con la implementación de una rutina en R (Anexo X). Entonces la distancia queda definida con la siguiente función:

$$d_i = \cos \alpha (y_i - x_i \tan \alpha)$$

Donde  $d_i$  es la distancia,  $\alpha$  es el ángulo de la pendiente,  $y_i$  es el diámetro durante la fase temprana de reperusión y  $x_i$  es el diámetro del vaso durante el MCAo (Anexo XI).

#### ***D. Análisis estadístico***

Todos los análisis fueron realizados en R versión 3.5.1 (Feather Spray). Se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para probar la normalidad de los datos, luego se aplicaron las pruebas de t de Student o U de Mann-Whitney según correspondiera. Para los análisis de 3 o más grupos luego de probar la homocedasticidad y homogeneidad entre los grupos, se utilizó la prueba de ANOVA con la prueba pos hoc de Tukey. Se aplicó la prueba exacta de Fisher para comparar la supervivencia entre los grupos.

## **6. RESULTADOS**

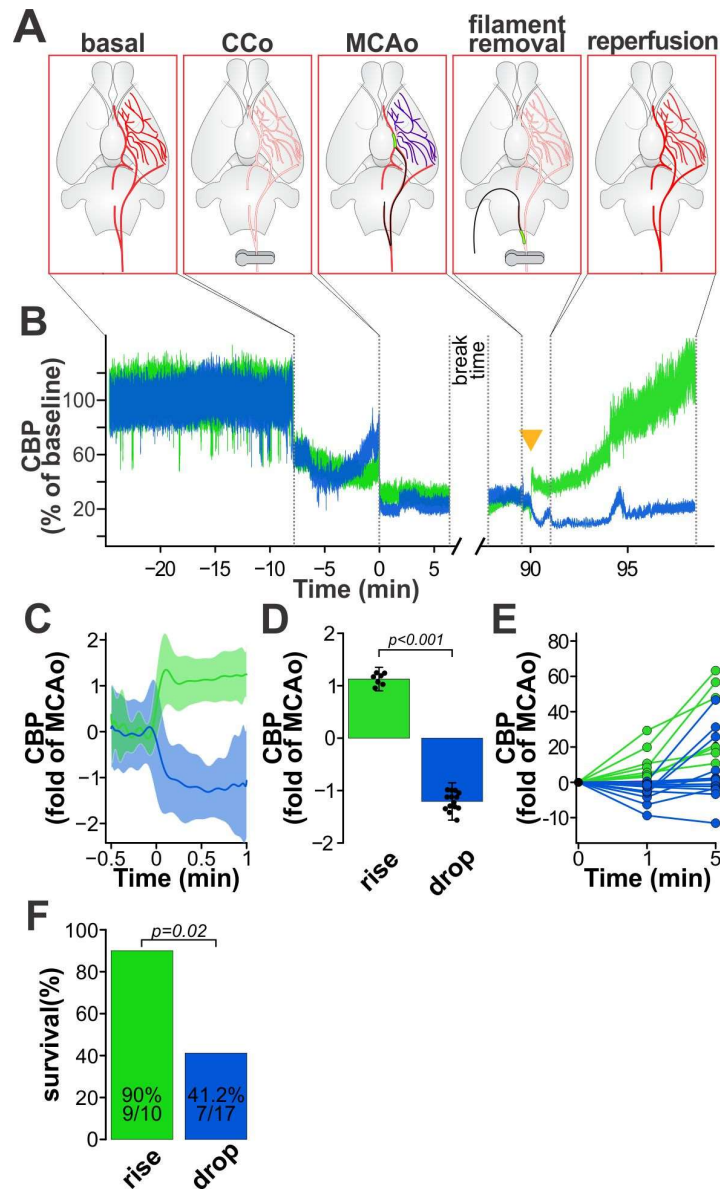
### ***A. Dos curvas estereotipadas de perfusión del tejido mediatas al retiro del filamento en el modelo de t-MCAo.***

En el modelo de t-MCAo por oclusión intraluminal, las caídas de la perfusión son ampliamente variables, usualmente se toma como criterio de inclusión animales cuyas caídas sean mayores al 60% del nivel basal. Sin embargo, este no es un marcador fidedigno para discriminar los experimentos en los cuales se haya establecido adecuadamente la lesión isquémica (volumen de infarto que abarque casi la totalidad del territorio irrigado por la MCA), de los infartados inadecuadamente realizados. En el presente trabajo se observó que en la fase inicial de la perfusión del parénquima infartado inmediatamente posterior al retiro del filamento, las lecturas medidas con el láser Doppler muestran dos curvas estereotipadas (Fig 3A y 3B). Un grupo cuya curva de perfusión asciende rápidamente, que representa una recuperación inmediata de la perfusión de ahora en adelante será denominado grupo “rise” y el otro grupo cuya curva de perfusión

desciende progresiva pero momentáneamente, caída transitoria de la perfusión de ahora en adelante será denominado grupo “drop”. Dicha caída es significativamente distinta a la del grupo “rise” ( $p < 0.001$ , Fig. 3D) y alcanza momentáneamente en el primer minuto niveles de perfusión menores a los registrados durante la oclusión de la arteria cerebral media en los 90 min de oclusión. A partir de los cinco min, la velocidad de recuperación de la perfusión se iguala en ambos grupos (Fig. 3F). Puesto que ningún tratamiento neuroprotector fue administrado, las variaciones en el volumen de infarto, perfusión del tejido y dinámica vascular, son consecuencia directa de los mecanismos moleculares fisiopatológicos del evento isquémico cerebral.

Los resultados muestran la distinción cuantitativa de las señales de perfusión de los tejidos infartados permite el agrupamiento de las ratas en dos grupos, “rise” y “drop”.



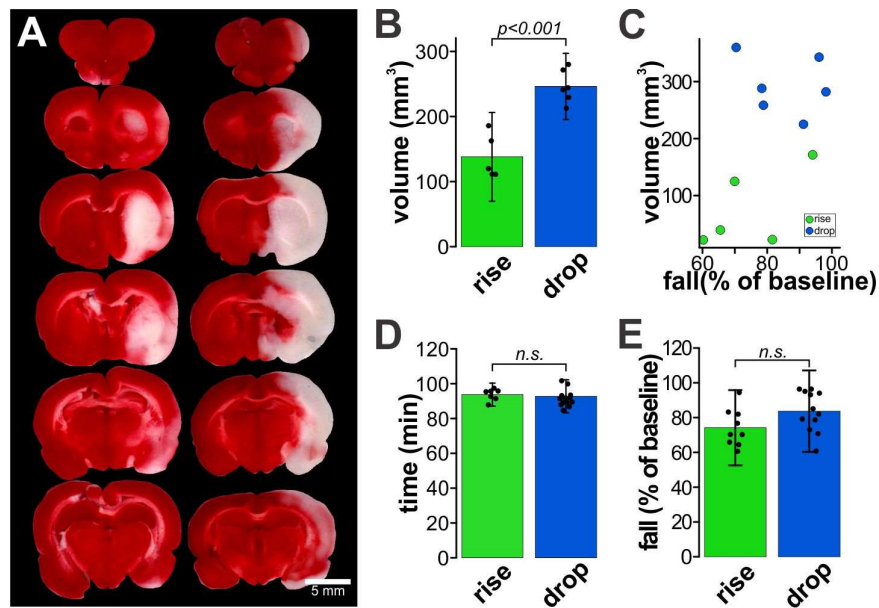


**Figura 7** Curvas estereotipadas de perfusión en la fase inicial de la reperusión.

(A) Representación esquemática de la MCA y su nacimiento en el polígono de Willis, en 5 momentos durante el procedimiento de t-MCAo. (B) Lecturas representativas superpuestas de la perfusión del tejido infarto medido con el láser Doppler expresados como porcentaje de la perfusión basal, entre los 7 a 80 min, los animales fueron desconectados de la anestesia y puestos en una cama caliente (break time). Punta de flecha amarilla muestra el punto de inflexión divergente entre las curvas de perfusión del tejido isquémico al momento de retirar la oclusión del nacimiento de la MCA, que separan los grupos en “drop” (cuando la curva cae) de color azul y en “rise” (cuando la curva sube) de color verde. (C) Curvas de perfusión superpuestas (n=5 por grupo), línea sólida es el promedio de la lectura para cada punto de tiempo, el área sombreada representa +/- 2D.E. para cada punto. (D) lectura de perfusión del parénquima infartado a los 30 s del retiro del filamento, representado como veces de cambio con respecto a la lectura de perfusión durante la oclusión. (E) lectura escalada de perfusión del parénquima infartado al minuto y a los cinco min posteriores al retiro del filamento, representado como veces de cambio con respecto a la lectura de perfusión durante la oclusión. (G) Porcentaje de sobrevivencia entre los grupos.

***B. Sólo el grupo drop presenta el volumen de infarto esperado para el tiempo de oclusión.***

El volumen de infarto en el grupo “drop” compromete la totalidad del parénquima irrigado por la MCA, estriado y corteza del hemisferio ipsilateral. Dicho volumen infartado es homogéneo intragrupo (media = 283.9 mm<sup>3</sup>) y significativamente mayor en comparación con el grupo “rise” (media = 138.0 mm<sup>3</sup>;  $p < 0.001$ ; Figura 8<sup>a</sup> y 7B). Sin embargo, no encontramos una correlación entre el volumen de infarto y la caída de la perfusión durante la oclusión de la MCA (Figura 8C), lo que muestra que la caída de la perfusión registrada por el láser Doppler no permite predecir la intensidad del compromiso del flujo vascular. Las diferencias observadas entre los grupos son independientes a la caída inicial de la perfusión de la MCA (Figura 8E) o diferencias en el tiempo de oclusión (Figura 8D). Estos resultados muestran que sólo el grupo “drop” con caída de la perfusión en los primeros minutos presentan un compromiso del parénquima irrigado por la MCA.



**Figura 8: Cuantificación del volumen de infarto entre los grupos rise y drop**

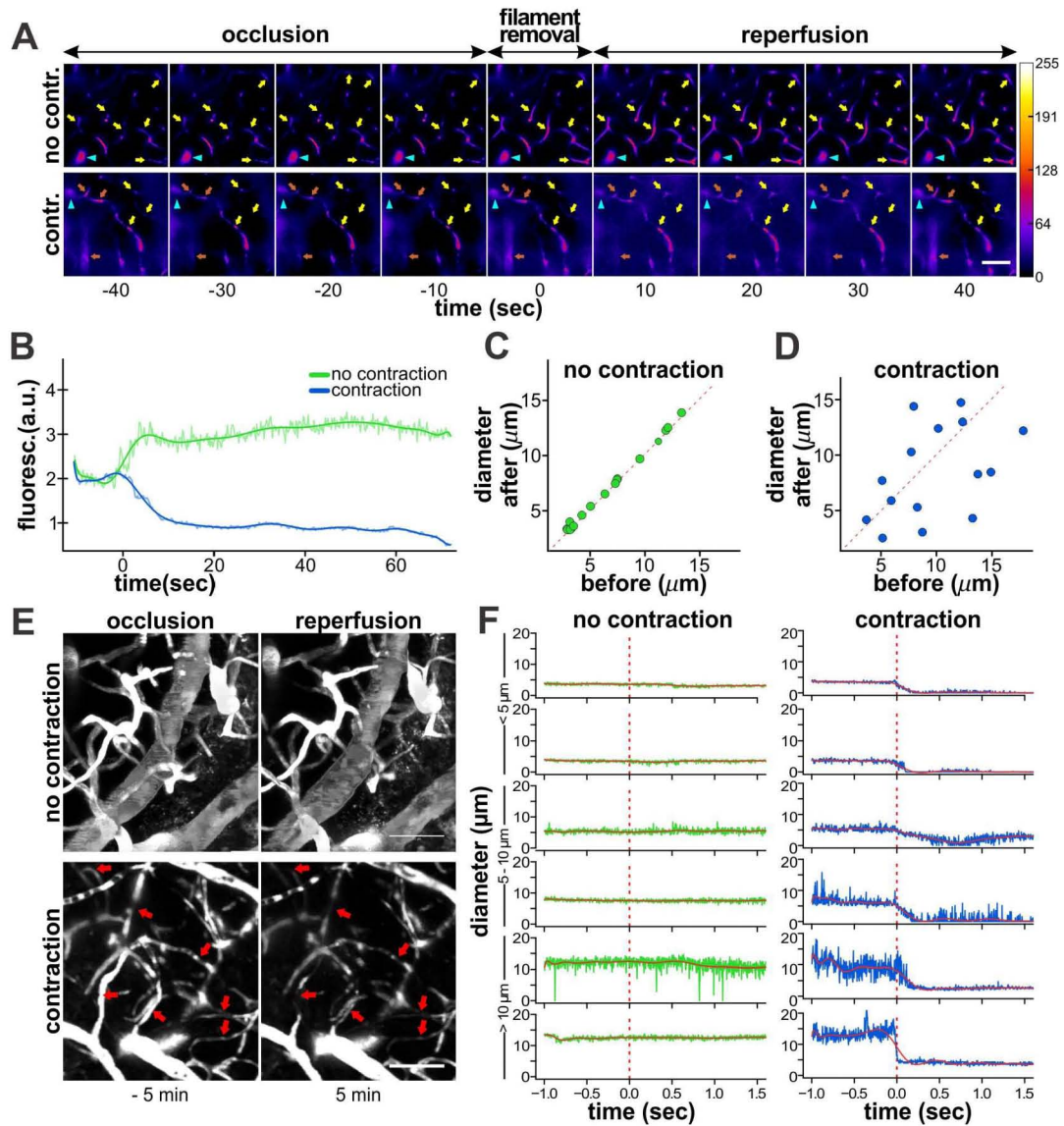
**A:** Series completas de cortes coronales (2 mm) representativos de cerebros de ratas infartadas teñidos con TTC, serie de la izquierda corresponde a un cerebro infartado del grupo “rise”, serie de la derecha corresponde a un cerebro infartado del grupo “drop”. **B:** cuantificación del volumen de infarto expresado en mm<sup>3</sup> de los cortes coronales teñidos con TTC. **C:** gráfica de dispersión del volumen de infarto expresado en vs el porcentaje de caída de la perfusión cuando se ocluye el nacimiento de la MCA, expresado como porcentaje de la perfusión basal. **D:** tiempo de infarto en ambos grupos. **E:** caída de la perfusión cuando se ocluye el nacimiento de la MCA. Grupo rise color verde, grupo drop color azul. Los datos se muestran con medias +/- 2 desviaciones estándar. Cada punto corresponde a una medición individual. #:  $p < 0.05$ , \*:  $p < 0.01$  y \*\*:  $p < 0.001$ .

### ***C. La supervivencia del grupo drop es significativamente menor***

La caída de la perfusión en el grupo “drop” presenta un porcentaje de supervivencia del 41.2% que es estrechamente cercano al reportado en seres humanos (44%)<sup>3,120</sup> y que es significativamente mayor ( $p = 0.02$ ) al observado en el grupo “rise”, cuyo porcentaje de supervivencia es del 90% (Fig. 3G).

### ***D. El infarto cerebral se asocia a una vasoconstricción inmediata a la reperusión.***

Para evaluar si la disminución de la perfusión vista en el grupo “drop”, descrita anteriormente, se relaciona con un fenómeno vascular activo, se hicieron ensayos de microscopía multifotónica en ratones infartados a través de una craneotomía del hueso parietal cubierta con una ventana intracraneal localizada sobre el parénquima comprometido por el infarto territorio de la MCA. El árbol vascular se marcó fluorescentemente con una inyección sistémica de FITC-Dextran 70 kDa, bajo el microscopio multifotónico se registró en tiempo real la dinámica vascular durante la oclusión, el retiro del filamento y la fase inicial de reperusión. Los vasos marcados con FITC-Dextran 70 kDa muestran que el flujo sanguíneo está detenido durante la oclusión y se restablece inmediatamente con el retiro del filamento; el calibre de los vasos, antes y después de la reperusión, no varía (Fig. 5A y 5C) en ratones sin lesión evidente en el parénquima cerebral evaluado por TTC. Por otro lado, cuando observamos la lesión en el parénquima ésta se asocia a un cambio en el calibre de los vasos (Fig. 5A y 5D), donde el 50% de los vasos se contrae (Fig. 5E y 5F). Consecuentemente con estos cambios, la perfusión del tejido cuantificada por la fluorescencia media de FITC en el campo aumenta en el grupo en el que no se observó vasoconstricción y disminuye en el que presentó vasoconstricción (Fig. 5B).



## 7. DISCUSIÓN

La alta variabilidad reportada en el volumen del infarto, característico del modelo t-MCAo, es explicada de forma limitada por la variación intrínseca atribuida a los modelos biológicos. Por consenso se toma una caída de la perfusión mayor al 60% del nivel basal como el principal criterio de inclusión; sin embargo, este argumento no es suficiente para discriminar los infartos logrados correctamente ya que en nuestro grupo de trabajo hemos observado caídas entre 75-95% sin lesión evidente del parénquima cerebral infartado, cuantificado a las 24 h (Figura 10), que pueden ser resultado de particularidades anatómicas como variaciones sutiles en el diámetro y configuración de los vasos que conforman el polígono de Willis<sup>121</sup>. Sin embargo, no existe una correlación estadísticamente significativa entre el volumen de infarto y la caída de la perfusión (Figura 8C). Lo anterior demuestra que la caída de la perfusión por si sola es un marcador insuficiente para discriminar infartos adecuadamente instalados<sup>122</sup>, que deberían tener un volumen entre 250-380 mm<sup>3</sup> para los 90 min de oclusión<sup>123</sup>, de los infartos que no se lograron de manera correcta. Por otro lado, las lecturas de perfusión en la fase de reperfusión muestran dos curvas estereotipadas

---

### **Figura 9: Vasoconstricción en el parénquima afectado por el infarto**

*A: Imágenes representativas obtenidas con el microscopio de dos fotones de 40 s antes y después del retiro del filamento que produce la oclusión de la MCA. Los vasos teñidos con FITC y la intensidad de fluorescencia expresada en pseudocolor, escala a la derecha. En la mayoría de vasos de la serie superior la marca fluorescente incrementa al retirar la oclusión de la MCA (flechas de color amarillo), por el contrario en la serie de abajo se observa que algunos vasos disminuyen la señal (flechas rojas) y otros no muestran cambios significativos (puntas de flecha celeste). B: perfusión del tejido infartado en los primeros 60 s de reperfusión, expresado como la fluorescencia media de FITC en todo el campo. C y D: Cuantificación del diámetro de los vasos antes y después de retirar la oclusión de la MCA y permitir la reperfusión. E: máxima proyección de 180 μm de grosor de la vasculatura cerebral teñida fluorescentemente con FITC, las flechas rojas muestran los vasos que pierden la señal de FITC al inicio de la perfusión del tejido luego de retirar la oclusión de la MCA. F: dinámica del diámetro de vasos individuales durante la maniobra de retiro del filamento y reperfusión del tejido infartado. Grupo rise color verde, grupo drop color azul. Cada punto corresponde a una medición individual.*

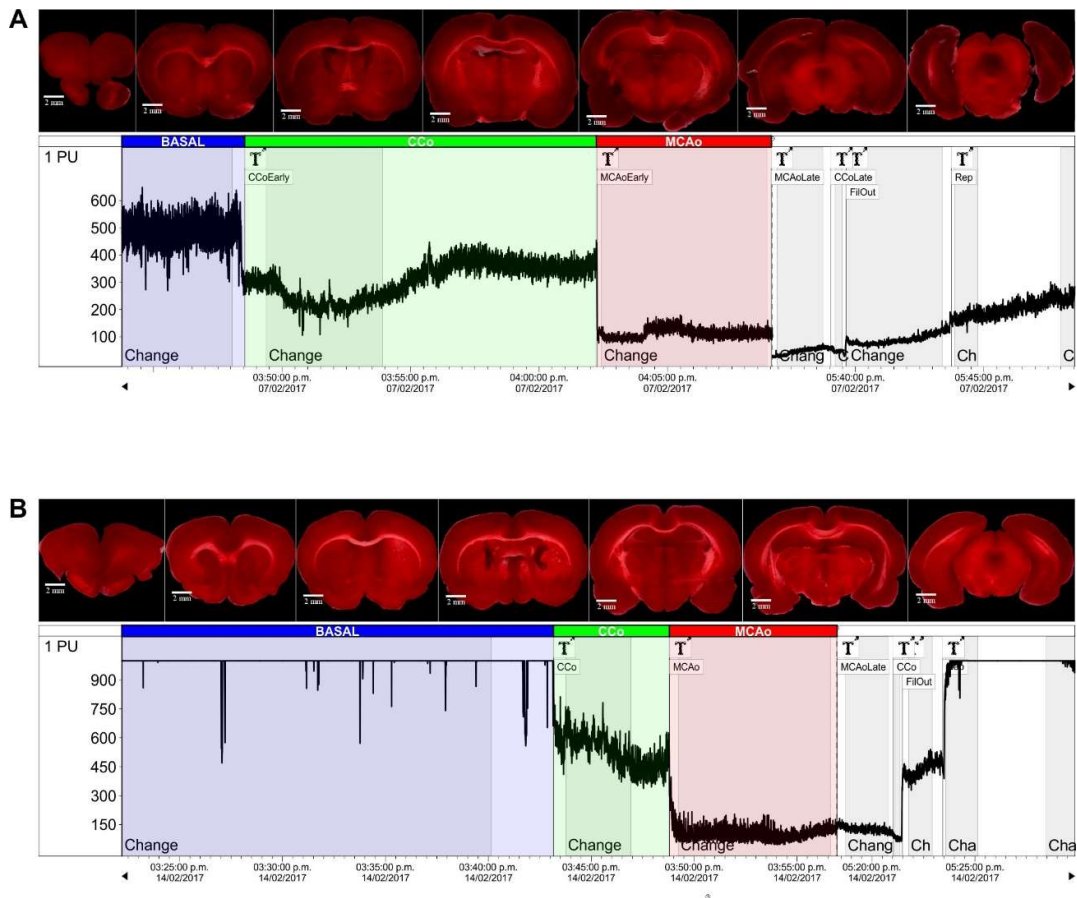
*no contr.: grupo que no presentó la vasoconstricción; contr: grupo que presentó la vasoconstricción; fluoresc.: fluorescencia media; a.u.: unidades arbitrarias.*

(Figura 7C) que son significativamente distintas (Figura 7D). El grupo de ratas catalogadas como “drop” muestra una caída transitoria de la perfusión mediata al retiro del filamento, que se relaciona a volúmenes de infarto homogéneos que comprometen la totalidad del parénquima irrigado por la MCA y que son significativamente mayores a los cuantificados en el grupo “rise”. La caída del flujo sanguíneo durante la reperfusión ha sido descrita anteriormente como el fenómeno del no-reflujo<sup>124</sup>. La aplicación de heparina no mejora o evita el fenómeno de no-reflujo por lo que se propuso que este fenómeno se relaciona a un proceso activo de vasoconstricción<sup>124</sup>. Nuestros resultados muestran que la disminución de la perfusión al inicio de la reperfusión está relacionada a la vasoconstricción de los capilares de primer orden en el parénquima lesionado por la isquemia.

El trabajo de Shin et al. (2006) muestra que la corrientes SD en la corteza del parénquima lesionado suceden de forma intermitente durante el infarto, en intervalos de 10-20 min y se asocian a una disminución transitoria del flujo sanguíneo por vasoconstricción, lo que conduce a la expansión progresiva del núcleo del infarto<sup>33</sup>. Sin embargo, en dicho trabajo no evalúan si este fenómeno continúa ocurriendo durante la fase de reperfusión. La caída de la perfusión que observamos en el grupo “drop” se asemeja a las reportadas en la AD por Shin et al. (2006) (Figura 7B y C), además, se observan caídas parciales intermitentes durante los primeros 30 min de reperfusión de forma y frecuencia similares a las reportadas para las SD. Estos resultados sugieren que este fenómeno de caídas parciales transitorias de la perfusión durante la fase inicial de la reperfusión se relaciona a corrientes despolarizantes, pero sería necesario un registro

electrofisiológico de la corteza parietal para corroborar dicha relación. Por otro lado, el trabajo de Yemisci et al. (2009) muestra que el estrés producido por los RONS liberados por el endotelio vascular del parénquima isquémico promueven la contracción de los pericitos que lleva a la oclusión de los capilares de primer orden, exacerbando la lesión isquémica<sup>36</sup>. En congruencia con estos resultados, el patrón de vasoconstricción que observamos a lo largo de los capilares de primer orden (Figura 9E) es similar al reportado por Yemisci et al. (2009), lo que sugiere que los pericitos serían los responsables de la vasoconstricción en la fase aguda de reperfusión del evento isquémico. Asimismo, el trabajo de Khennouf et al. (2018) muestra que la SD produce una contracción fuerte y prolongada de los pericitos ubicados en los capilares de primer orden por un incremento sostenido del calcio citoplasmático<sup>35</sup> que puede estar relacionado a la liberación progresiva y constante de calcio de los astrocitos en la zona lesionada por la hipoxia<sup>125</sup>.





**Figura 10: La caída mayor de la perfusión es insuficiente para predecir el establecimiento de la lesión isquémica.**

Se muestran cortes coronales gruesos de cerebros completos de ratas infartadas teñidos con TTC de dos experimentos independientes. No se observa lesión en ninguno de los cortes, pese a que las caídas de perfusión medidas con el equipo de laser Doppler son de 77% (para A) y del 90% (para el B).

*Activación diferencial de los receptores para el VEGF como mecanismo de neuro-protección en el infarto cerebral isquémico*

## **8. CONCLUSIONES**

La caída de la perfusión inmediata al retiro de la oclusión de la arteria cerebral media está relacionada a la vasoconstricción de la microvasculatura cerebral.

La caída de la perfusión mayor al 60% es un criterio de inclusión poco confiable para determinar si se estableció adecuadamente el infarto.

*Activación diferencial de los receptores para el VEGF como mecanismo de neuro-protección en el infarto cerebral isquémico*

## BIBLIOGRAFÍA

1. Kuklina, E. V., Tong, X., George, M. G. & Bansil, P. Epidemiology and prevention of stroke: A worldwide perspective. *Expert Rev. Neurother.* **12**, 199–208 (2012).
2. Saver, J. L. Time Is Brain--Quantified. *Stroke* **37**, 263–266 (2006).
3. Mittal, S. H. & Goel, D. Mortality in ischemic stroke score: A predictive score of mortality for acute ischemic stroke. *Brain Circ.* **3**, 29–34 (2017).
4. Adams. Guidelines for the Early Management of Adults With Ischemic Stroke. *Circulation* **116**, 478–534 (2007).
5. S.M., D. *et al.* Cerebral hypoperfusion in stroke prognosis and brain recovery. *Stroke* **24**, 1691–1696 (1993).
6. Dirnagl, U., Iadecola, C. & Moskowitz, M. a. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* **22**, 391–397 (1999).
7. Santos, M. S., Moreno, A. J. & Carvalho, A. P. Relationships between ATP depletion, membrane potential, and the release of neurotransmitters in rat nerve terminals: An in vitro study under conditions that mimic anoxia, hypoglycemia, and ischemia. *Stroke* (1996). doi:10.1161/01.STR.27.5.941
8. Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G. A. & Meisel, A. Sugar for the brain: The role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci.* **36**, 587–597 (2013).
9. Obel, L. F. *et al.* Brain glycogen - new perspectives on its metabolic function and regulation at the subcellular level. *Front. Neuroenergetics* **4**, 1–15 (2012).
10. Winn, H. R., Welsh, J. E., Bryner, C., Rubio, R. & Berne, R. M. Brain adenosine production during the initial 60 seconds of bicuculline seizures in rats. *Acta Neurol. Scand.* **60**, 536–537 (1979).
11. Weidinger, A. & Kozlov, A. V. Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: Oxidative stress versus signal transduction. *Biomolecules* **5**, 472–484 (2015).
12. Fernandes, S. P., Dringen, R., Lawen, A. & Robinson, S. R. Inactivation of astrocytic glutamine synthetase by hydrogen peroxide requires iron. *Neurosci. Lett.* **490**, 27–30 (2011).
13. Anlauf, E. & Derouiche, A. Glutamine Synthetase as an Astrocytic Marker: Its Cell Type and Vesicle Localization. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **4**, 1–5 (2013).
14. Bak, L. K., Schousboe, A. & Waagepetersen, H. S. The glutamate/GABA-glutamine cycle: Aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J. Neurochem.* **98**, 641–653 (2006).
15. Grewer, C. *et al.* Glutamate forward and reverse transport: From molecular mechanism to transporter-mediated release after ischemia. *IUBMB Life* **60**, 609–619 (2008).
16. Nicholls, D. & Attwell, D. The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**, 462–468 (1990).

17. Attwell, D., Rossi, D. J. & Oshima, T. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* **403**, 316–321 (2000).
18. Laubenbacher, R. *et al.* A systems biology view of cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1796**, 129–39 (2009).
19. Lai, T. W., Zhang, S. & Wang, Y. T. Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. *Prog. Neurobiol.* **115**, 157–188 (2014).
20. Hardingham, G. E., Fukunaga, Y. & Bading, H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat. Neurosci.* **5**, 405–414 (2002).
21. Oja, S. S., Saransaari, P. & Korpi, E. R. Neurotoxicity of Ammonia. *Neurochem. Res.* **42**, 713–720 (2017).
22. Gidö, G., Kristián, T. & Siesjö, B. K. Extracellular potassium in a neocortical core area after transient focal ischemia. *Stroke* (1997). doi:10.1161/01.STR.28.1.206
23. Hansen, J. & Nedergaard, M. Characterization of Cortical Depolarizations Evoked in Focal Cerebral Ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **13**, 568–574 (1993).
24. Shah, N. H. & Aizenman, E. Voltage-Gated Potassium Channels at the Crossroads of Neuronal Function, Ischemic Tolerance, and Neurodegeneration. *Transl. Stroke Res.* **5**, 38–58 (2014).
25. Balestrino, M. Pathophysiology of anoxic depolarization: new findings and a working hypothesis. *J. Neurosci. Methods* **59**, 99–103 (1995).
26. Juzekaeva, E. *et al.* Preferential Initiation and Spread of Anoxic Depolarization in Layer 4 of Rat Barrel Cortex. *Front. Cell. Neurosci.* **11**, 1–11 (2017).
27. Jarvis, C. R. Anoxic Depolarization Mediates Acute Damage Independent of Glutamate in Neocortical Brain Slices. *Cereb. Cortex* **11**, 249–259 (2001).
28. Ayata, C. & Lauritzen, M. Spreading Depression, Spreading Depolarizations, and the Cerebral Vasculature. *Physiol. Rev.* **95**, 953–993 (2015).
29. Takano, T. *et al.* Cortical spreading depression causes and coincides with tissue hypoxia. *Nat. Neurosci.* **10**, 754–762 (2007).
30. Wei, L. *et al.* Potassium channel blockers attenuate hypoxia- and ischemia-induced neuronal death in vitro and in vivo. *Stroke* **34**, 1281–1286 (2003).
31. Bano, D. & Nicotera, P. Ca<sup>2+</sup> signals and neuronal death in brain ischemia. *Stroke* **38**, 674–676 (2007).
32. Anrather, J. & Iadecola, C. Inflammation and Stroke: An Overview. *Neurotherapeutics* **13**, 661–670 (2016).
33. Shin, H. K. *et al.* Vasoconstrictive neurovascular coupling during focal ischemic depolarizations. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **26**, 1018–1030 (2006).
34. Hill, R. A. *et al.* Regional Blood Flow in the Normal and Ischemic Brain Is Controlled by Arteriolar Smooth Muscle Cell Contractility and Not by Capillary Pericytes. *Neuron* **87**, 95–110 (2015).
35. Khennouf, L. *et al.* Active role of capillary pericytes during stimulation-induced activity and spreading depolarization. *Brain* **141**, 2032–2046 (2018).
36. Yemisci, M. *et al.* Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs

- capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery. *Nat. Med.* **15**, 1031–1037 (2009).
37. Attwell, D. *et al.* Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* **468**, 232–243 (2010).
  38. Ziv, I. *et al.* Increased plasma endothelin-1 in acute ischemic stroke. *Stroke* **23**, 1014–1016 (1992).
  39. Greenberg, D. a & Jin, K. Vascular endothelial growth factors (VEGFs) and stroke. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 1753–61 (2013).
  40. Ogunshola, O. O. *et al.* Paracrine and autocrine functions of neuronal vascular endothelial growth factor (VEGF) in the central nervous system. *J. Biol. Chem.* **277**, 11410–11415 (2002).
  41. Jin, K. L., Mao, X. O. & Greenberg, D. a. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 10242–10247 (2000).
  42. Storkebaum, E. *et al.* Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. *Nat. Neurosci.* **8**, 85–92 (2005).
  43. van Marion, I. *et al.* VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat. Genet.* **34**, 383–394 (2003).
  44. MARXSEN, J. H. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes its degradation by induction of HIF- $\alpha$ -prolyl-4-hydroxylases. *Biochem. J.* **381**, 761–767 (2004).
  45. Salceda, S. & Caro, J. Hypoxia-inducible Factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) Protein Is Rapidly Degraded by the Ubiquitin-Proteasome System under Normoxic Conditions. *J. Biol. Chem.* **272**, 22642–22647 (2002).
  46. Chuang, C. S. *et al.* Functional pathway mapping analysis for hypoxia-inducible factors. *BMC Syst. Biol.* **5**, S3 (2011).
  47. Wenger, R. H., Stiehl, D. P. & Camenisch, G. Integration of Oxygen Signaling at the Consensus HRE. *Sci. Signal.* **2005**, re12–re12 (2005).
  48. Kiriakidis, S. VEGF expression in human macrophages is NF-kappaB-dependent: studies using adenoviruses expressing the endogenous NF-kappaB inhibitor IkappaB $\alpha$  and a kinase-defective form of the IkappaB kinase 2. *J. Cell Sci.* **116**, 665–674 (2003).
  49. Iadecola, C. & Anrather, J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat. Med.* **17**, 796–808 (2011).
  50. Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S. & Poltorak, Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* **13**, 9–22 (1999).
  51. Koch, S. & Claesson-Welsh, L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, (2012).
  52. Ferrara, N., Gerber, H.-P. & LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* **9**, 669–76 (2003).
  53. Dvorak, H. F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: A

- critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J. Clin. Oncol.* **20**, 4368–4380 (2002).
54. Hayashi, T., Abe, K., Suzuki, H. & Itoyama, Y. Rapid induction of vascular endothelial growth factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* (1997). doi:10.1161/01.STR.28.10.2039
  55. Cobbs, C. S., Chen, J., Greenberg, D. A. & Graham, S. H. Vascular endothelial growth factor expression in transient focal cerebral ischemia in the rat. *Neurosci. Lett.* **249**, 79–82 (1998).
  56. Sun, Y. *et al.* VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J. Clin. Invest.* **111**, 1843–1851 (2003).
  57. Wang, Y. *et al.* VEGF overexpression induces post-ischaemic neuroprotection, but facilitates haemodynamic steal phenomena. *Brain* **128**, 52–63 (2005).
  58. Wnag, Y. *et al.* VEGF-Overexpressing Transgenic Mice Show Enhanced Post-Ischemic Neurogenesis and Neuromigration. *J. Neurosci. Res.* **85**, 740–747 (2007).
  59. Zhang, Z. G. *et al.* VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J. Clin. Invest.* **106**, 829–838 (2000).
  60. Kimura, R., Nakase, H., Tamaki, R. & Sakaki, T. Vascular endothelial growth factor antagonist reduces brain edema formation and venous infarction. *Stroke* **17**, 1229–35 (2005).
  61. Shibuya, M. Vegf-vegfr signals in health and disease. *Biomol. Ther.* **22**, 1–9 (2014).
  62. Kilic, E. *et al.* The phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway mediates VEGF's neuroprotective activity and induces blood brain barrier permeability after focal cerebral ischemia. *FASEB J.* **20**, 1185–1187 (2006).
  63. Lafuente, J. V., Argandoña, E. G. & Mitre, B. VEGFR-2 expression in brain injury: Its distribution related to brain-blood barrier markers. *J. Neural Transm.* **113**, 487–496 (2006).
  64. Mackenzie, F. & Ruhrberg, C. Diverse roles for VEGF-A in the nervous system. **1380**, 1371–1380 (2012).
  65. Hudson, N. *et al.* Differential Apicobasal VEGF Signaling at Vascular Blood-Neural Barriers. *Dev. Cell* **30**, 541–552 (2014).
  66. Argaw, A. T., Gurfein, B. T., Zhang, Y., Zameer, A. & John, G. R. VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 1977–1982 (2009).
  67. Hone, E. A. *et al.* Biphasic Blood-Brain Barrier Openings after Stroke. *Neurol. Disord. Stroke Int.* **1**, 11–14 (2018).
  68. Croll, S. D. *et al.* VEGF-mediated inflammation precedes angiogenesis in adult brain. *Exp. Neurol.* **187**, 388–402 (2004).
  69. Proescholdt, M. A. *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Modulates Vascular Permeability and Inflammation in Rat Brain. *Journal Neuropathol. Exp. Neurol.* **58**, 613–627 (1999).
  70. Benakis, C., Garcia-Bonilla, L., Iadecola, C. & Anrather, J. The role of microglia and myeloid immune cells in acute cerebral ischemia. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 1–16



- (2015).
71. Moskowitz, M. A., Lo, E. H. & Iadecola, C. The science of stroke: Mechanisms in search of treatments. *Neuron* **67**, 181–198 (2010).
  72. Gelderblom, M. *et al.* Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke* **40**, 1849–1857 (2009).
  73. Lalancette-Hérbert, M., Gowing, G., Simard, A., Cheng-Weng, Y. & Kriz, J. Selective Ablation of Proliferating Microglial Cells Exacerbates Ischemic Injury in the Brain. *Neurobiol. Dis.* **27**, 2596–2605 (2007).
  74. Cherry, J. D., Olschowka, J. A. & O'Banion, M. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J. Neuroinflammation* **11**, 98 (2014).
  75. Tobin, M. K. *et al.* Neurogenesis and inflammation after ischemic stroke: what is known and where we go from here. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **06**, 1–12 (2014).
  76. da Fonseca, A. C. C. *et al.* The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 1–13 (2014).
  77. Neher, J. J. *et al.* Phagocytosis executes delayed neuronal death after focal brain ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E4098-107 (2013).
  78. Neher, J. J. *et al.* Inhibition of Microglial Phagocytosis Is Sufficient To Prevent Inflammatory Neuronal Death. *J. Immunol.* **186**, 4973–4983 (2011).
  79. Brown, G. C. & Neher, J. J. Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat. Publ. Gr.* **15**, 209–216 (2014).
  80. Yang, Y. *et al.* Attenuation of acute stroke injury in rat brain by minocycline promotes blood–brain barrier remodeling and alternative microglia/macrophage activation during recovery. *J. Neuroinflammation* **12**, 1–15 (2015).
  81. Jin, W.-N. *et al.* Depletion of microglia exacerbates postischemic inflammation and brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **37**, 2224–2236 (2017).
  82. Ryu, J. K., Cho, T., Choi, H. B., Wang, Y. T. & McLarnon, J. G. Microglial VEGF Receptor Response Is an Integral Chemotactic Component in Alzheimer's Disease Pathology. *J. Neurosci.* **29**, 3–13 (2009).
  83. Fantin, A. *et al.* Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood* **116**, 829–840 (2010).
  84. Wang, J. M. *et al.* Reduction of ischemic damage by application of insulin-like growth factor-1 in rat brain after transient ischemia. *Acta Med. Okayama* **55**, 25–30 (2001).
  85. Nishijima, K. *et al.* Vascular endothelial growth factor-A is a survival factor for retinal neurons and a critical neuroprotectant during the adaptive response to ischemic injury. *Am. J. Pathol.* **171**, 53–67 (2007).
  86. Beck, H. *et al.* VEGFR-1 signaling regulates the homing of bone marrow-derived cells in a mouse stroke model. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **69**, 168–175 (2010).
  87. Du, R. *et al.* HIF1 $\alpha$  Induces the Recruitment of Bone Marrow-Derived Vascular Modulatory Cells to Regulate Tumor Angiogenesis and Invasion. *Cancer Cell* **13**, 206–220 (2008).
  88. Petit, I., Jin, D. & Rafii, S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub

- modulating neo-angiogenesis. *Trends Immunol.* **28**, 299–307 (2007).
89. Clayton, J. A., Chalothorn, D. & Faber, J. E. Vascular endothelial growth factor- $\alpha$  specifies formation of native collaterals and regulates collateral growth in ischemia. *Circ. Res.* **103**, 1027–1036 (2008).
  90. Jean LeBlanc, N., Guruswamy, R. & ElAli, A. Vascular Endothelial Growth Factor Isoform-B Stimulates Neurovascular Repair After Ischemic Stroke by Promoting the Function of Pericytes via Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1. *Mol. Neurobiol.* **55**, 3611–3626 (2018).
  91. Li, Y. *et al.* VEGF-B inhibits apoptosis via VEGFR-1-mediated suppression of the expression of BH3-only protein genes in mice and rats. *J. Clin. Invest.* **118**, 913–923 (2008).
  92. Xu, Z. *et al.* Vascular endothelial growth factor is neuroprotective against ischemic brain injury by inhibiting scavenger receptor A expression on microglia. *J. Neurochem.* **142**, 700–709 (2017).
  93. Hou, S. T. *et al.* Semaphorin3A elevates vascular permeability and contributes to cerebral ischemia-induced brain damage. *Sci. Rep.* **5**, (2015).
  94. Weinstein, P. R., Hong, S. & Sharp, F. R. Molecular identification of the ischemic penumbra. *Stroke* **35**, 2666–2670 (2004).
  95. Longa, E. Z., Weinstein, P. R., Carlson, S. & Cummins, R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* **20**, 84–91 (1989).
  96. Schindelin, J. *et al.* Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
  97. Burguete, M. C. *et al.* Dietary phytoestrogens improve stroke outcome after transient focal cerebral ischemia in rats. *Eur. J. Neurosci.* **23**, 703–710 (2006).
  98. Zhang, H., Shen, Y., Wang, W. & Gao, H. Rat model of focal cerebral ischemia in the dominant hemisphere. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 504–511 (2015).
  99. Shen, F. *et al.* Adeno-associated viral vector-mediated hypoxia-inducible vascular endothelial growth factor gene expression attenuates ischemic brain injury after focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* **37**, 2601–2606 (2006).
  100. Li, Z. *et al.* Intraventricular pre-treatment with rAAV-VEGF induces intracranial hypertension and aggravates ischemic injury at the early stage of transient focal cerebral ischemia in rats. *Neurol. Res.* **30**, 868–875 (2008).
  101. Ferrara, N., Gerber, H. P. & LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* **9**, 669–676 (2003).
  102. Dostovic, Z., Dostovic, E., Smajlovic, D. & Avdic, O. Brain Edema After Ischaemic Stroke. *Med. Arch.* **70**, 339 (2016).
  103. Lange, C., Storkebaum, E., De Almodóvar, C. R., Dewerchin, M. & Carmeliet, P. Vascular endothelial growth factor: A neurovascular target in neurological diseases. *Nat. Rev. Neurol.* **12**, 439–454 (2016).
  104. Levy, D. E. & Duffy, T. E. Cerebral Energy Metabolism During Transient Ischemia and Recovery in the Gerbil. *J. Neurochem.* **28**, 63–70 (1977).
  105. Arnberg, F. *et al.* Imaging of a clinically relevant stroke model glucose

- hypermetabolism revisited. *Stroke* **46**, 835–842 (2015).
106. Pedram, A., Razandi, M. & Levin, E. R. Deciphering vascular endothelial cell growth factor/vascular permeability factor signaling to vascular permeability inhibition by atrial natriuretic peptide. *J. Biol. Chem.* **277**, 44385–44398 (2002).
  107. Valable, S. *et al.* VEGF-induced BBB permeability is associated with an MMP-9 activity increase in cerebral ischemia: both effects decreased by Ang-1. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **25**, 1491–1504 (2005).
  108. Lorberboym, M., Lampl, Y. & Sadeh, M. Correlation of 99m Tc-DTPA SPECT of the. *J. Nucl. Med.* **44**, 1898–1905 (2017).
  109. Van Bruggen, N. *et al.* VEGF antagonism reduces edema formation and tissue damage after ischemia/reperfusion injury in the mouse brain. *J. Clin. Invest.* **104**, 1613–1620 (1999).
  110. Sun, Y. *et al.* Increased Severity of Cerebral Ischemic Injury in Vascular Endothelial Growth Factor-B–Deficient Mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **24**, 1146–1152 (2004).
  111. Guaiquil, V. H. *et al.* VEGF-B selectively regenerates injured peripheral neurons and restores sensory and trophic functions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 17272–17277 (2014).
  112. Li, Y. *et al.* VEGF-B inhibits apoptosis via VEGFR-1–mediated suppression of the expression of BH3-only protein genes in mice and rats. *J. Clin. Invest.* **118**, 913–923 (2008).
  113. Plate, K. H., Beck, H., Danner, S., Allegrini, P. R. & Christoph, W. Cell type Specific Upregulation of Vascular Endothelial Growth Factor in an MCA-occlusion Model of Cerebral Infarct. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **58**, 654–666 (1999).
  114. Choi, J.-S. *et al.* Upregulation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors Flt-1 And Flk-1 in Rat Hippocampus after Transient Forebrain Ischemia. *J. Neurotrauma* **24**, 521–531 (2007).
  115. Beck, H. *et al.* VEGFR-1 signaling regulates the homing of bone marrow-derived cells in a mouse stroke model. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **69**, 168–175 (2010).
  116. Hu, X. *et al.* Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke* **43**, 3063–3070 (2012).
  117. Forstreuter, F., Lucius, R. & Mentlein, R. Vascular endothelial growth factor induces chemotaxis and proliferation of microglial cells. *J. Neuroimmunol.* **132**, 93–98 (2002).
  118. Yuan, H. *et al.* Radiation-induced permeability and leukocyte adhesion in the rat blood-brain barrier: Modulation with anti-ICAM-1 antibodies. *Brain Res.* **969**, 59–69 (2003).
  119. He, S., Atkison, C., Qiao, F., Chen, X. & Tomlison, S. Ketamine–Xylazine–Acepromazine Compared with Isoflurane for Anesthesia during Liver Transplantation in Rodents Songqing. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **49**, 45–51 (2010).
  120. Henrik, B.-H., Michael, D. & Per, T. Long-Term Survival and Causes of Death After Stroke. *Stroke* **32**, 2131–2136 (2001).
  121. Qian, B., Rudy, R. F., Cai, T. & Du, R. Cerebral Artery Diameter in Inbred Mice Varies as a Function of Strain. *Front. Neuroanat.* **12**, (2018).

122. Memezawa, H., Minamisawa, H., Smith, M. L. & Siesjö, B. K. Ischemic penumbra in a model of reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *Exp. Brain Res.* (1992). doi:10.1007/BF00229002
123. Liu, S., Levine, S. R. & Winn, H. R. Targeting ischemic penumbra: part I - from pathophysiology to therapeutic strategy. *J. Exp. Stroke Transl. Med.* **3**, 47–55 (2010).
124. Ames, A., Wright, R. L., Kowada, M., Thurston, J. M. & Majno, G. Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am. J. Pathol.* **52**, 437–53 (1968).
125. Dong, Q. P., He, J. Q. & Chai, Z. Astrocytic Ca<sup>2+</sup> waves mediate activation of extrasynaptic NMDA receptors in hippocampal neurons to aggravate brain damage during ischemia. *Neurobiol. Dis.* **58**, 68–75 (2013).

## ANEXOS

### ***Anexo I Algoritmo para el cálculo semi automaatzado del volumen de infarto a partir de imágenes digitalizadas de secciones gruesas coronales de cerebros infartados***

```
run("Set Scale...");
    //pidiendo medida de escala
imageName=getTitle;
    // El nombre de la aplicacion se asigna a la variable
baseName=substring(imageName,0,6);
    // baseName primeras SEIS LETRAS
run("Set Measurements...", "area redirect=None decimal=4");
Dir0="C:\\Users\\acard\\CloudStation\\Neuroinflammation\\Experimentos\\
TTC_edit\\"; // Creacion de todos los nombres de directorio
Dir1="C:\\Users\\acard\\CloudStation\\Neuroinflammation\\Experimentos\\
TTC_edit\\TTC_Complet\\"; // Foto editada de todas las secciones
juntas DESPUES del TTC
Dir2="C:\\Users\\acard\\CloudStation\\Neuroinflammation\\Experimentos\\
TTC_edit\\EvImage\\"; // Foto editada de todas las secciones
juntas ANTES del TTC
Dir3="C:\\Users\\acard\\CloudStation\\Neuroinflammation\\Experimentos\\
TTC_edit\\TTC_Image\\"; //Fotos de TTC editadas por seccion y con
escala
Dir4="C:\\Users\\acard\\CloudStation\\Neuroinflammation\\Experimentos\\
TTC_edit\\TTC_Sec\\"; //Cartoon por sección de area total,
contralateral e infarto
Dir5="C:\\Users\\acard\\CloudStation\\Neuroinflammation\\Experimentos\\
TTC_edit\\TTC_Montage-Cartoon\\"; // Cartoon de todas las secciones
en una sola imagen
Dir6="C:\\Users\\acard\\CloudStation\\Neuroinflammation\\Experimentos\\
TTC_edit\\TTC_Measure\\"; // Archivo xml de las medidas de las
secciones
Dir7="C:\\Users\\acard\\CloudStation\\Neuroinflammation\\Experimentos\\
TTC_edit\\TTC_Montage_Sec\\"; // Montage de las fotos con los cartoons
montados
Dir8="C:\\Users\\acard\\CloudStation\\Neuroinflammation\\Experimentos\\
TTC_edit\\TTC_ROI\\"; // ROIs de cada sección
File.makeDirectory(Dir0);
    // Creacion de todos las carpetas
File.makeDirectory(Dir1);
File.makeDirectory(Dir2);
File.makeDirectory(Dir3);
File.makeDirectory(Dir4);
File.makeDirectory(Dir5);
File.makeDirectory(Dir6);
File.makeDirectory(Dir7);
File.makeDirectory(Dir8);
TTC_name= baseName + "-TTC.tif";
    //Creacion de nombre base TTC_name
TTC_name2= baseName + "-TTC";
run("Duplicate...", TTC_name);
//Duplicado de la imagen original para editar la imagen copiada
```

```
run("Enhance Contrast", "saturated=0.35");
run("Unsharp Mask...", "radius=1 mask=0.70");
run("Despeckle");
run("Gamma...", "value=1.20");
run("RGB Color");
saveAs("Tiff", Dir1+TTC_name);
    //Guardando la imagen completa editada en el directorio externo
close();
    // Cierre de la imagen editada
selectWindow(imageName);
close(); // Cierre de la imagen original
Sec="";
Cntr=0;
Dialog.create("Que desea hacer?");
// Creacion de la ventana de dialogo
Dialog.addChoice("          Deseo:          ", newArray("Seleccionar nueva
area", "Salir de edicion"));
Dialog.show();
Action_Selection=Dialog.getChoice();
do{
    open(Dir1+TTC_name);
    // Apertura de la imagen editada guardada
    selectWindow(TTC_name);
    setTool(0);
    waitForUser("Accion del Usuario", "PRIMERO: \n \n ENCUADRE la
seccion \n con la que se va a trabajar \n y luego presione OK para
continuar");
    Dialog.create("A que seccion corresponde?");
    Dialog.addChoice("          Section          ", newArray("A", "B", "C",
"D", "E", "F", "G"));
    Dialog.show();
    Section=Dialog.getChoice();
    roiManager("Add");
    // PRIMERO ROI, es el recorte rectangular de la seccion en la imagen
original
    pl=Cntr;
    // Contador Ctr=1
    NameSec=TTC_name2+"_Sec-"+Section+"-Area"; //
p ej: R014_SecA-Area
    roiManager("Select", Cntr);
    roiManager("Rename", NameSec); // Se
cambia el nombre de la primer ROI
    Sec=Section;
    run("Duplicate...", TTC_name+"_Sec"+Section+".tif"); //
Se crea un duplicado del ROI de la imagen, y se le asigna el nombbre de
la seccion
    run("Maximize");
    run("Rotate... ");
    setTool(2);
    run("Maximize");
    waitForUser("Accion del Usuario", "Seleccione el area TOTAL del corte \n
y luego presione OK para continuar");
    run("Maximize");
    run("Fit Spline");
```

```
run("Crop");
run("Clear Outside");
    saveAs("Tiff", Dir3+TTC_name2+"_Sec-"+Section+".tif");
    // Se limpia la parte externa, se guarda la imagen en el directorio
3
    selectWindow(TTC_name2+"_Sec-"+Section+".tif");
    run("Duplicate...", "title=borrador1.tif");
    roiManager("Add");
    Cntr=Cntr+1;
    p2= Cntr;
    // Se duplica bajo el nombre de "borrador1.tif" la imagen
editada, hay dos imagenes abiertas
    selectWindow(TTC_name2+"_Sec-"+Section+".tif");
    // Se selecciona la primera imagen
//run("Scale Bar...", "width=2 height=5 font=20 color=White
background=None location=[Lower Left] serif");
roiManager("Show All");
roiManager("Show None");
run("Save");
    close();
    // Se agrega la escala, se guarda y se cierra la primera imagen,
solo queda abierto "borrador1.tif"
    selectWindow("borrador1.tif");
    NameSec=TTC_name2+"_Sec-"+Section+"-AreaTotal";
    roiManager("Select", Cntr);
    roiManager("Rename",NameSec);
    run("In [+]");
    setTool(2);
    waitForUser("Accion del Usuario","SELECCIONE el lado contralateral
\n y luego presione OK para continuar");
    roiManager("Add");
    Cntr=Cntr+1;
    p3=Cntr;
    roiManager("Select", newArray(p2,p3));
    roiManager("AND");
    roiManager("Add");
    Cntr=Cntr+1;
    p4=Cntr;
    NameSec2=TTC_name2+"_Sec-"+Section+"-AreaContralateral";
    roiManager("Select", Cntr);
    roiManager("Rename",NameSec2);
    selectWindow("borrador1.tif");
    roiManager("Show All");
    roiManager("Show None");
    run("Duplicate...", "title=borrador2.tif");
    run("Duplicate...", "title=borrador3.tif");
    selectWindow("borrador1.tif");
    run("8-bit");
    run("Multiply...", "value=50.000");
    run("Make Binary");
    run("Invert");
    run("Analyze Particles...", "size=0.20-Infinity circularity=0.05-
1.00 show=Outlines display add title=Ventanal.tif");
    saveAs("Tiff", Dir4+TTC_name2+"_Sec-"+Section+"-AreaTotal.tif");
```

```
selectWindow("borrador1.tif");
close();

selectWindow("borrador2.tif");
roiManager("Select", 3);
setBackground(0, 0, 0);
run("Clear", "slice");
roiManager("Show All");
roiManager("Show None");
run("8-bit");
run("Enhance Contrast...", "saturated=0.8 normalize");
run("Gamma...", "value=2.40");
run("Make Binary");
run("Analyze Particles...", "size=0.2-Infinity circularity=0.05-
1.00 show=Outlines display add title=Ventana2.tif");
saveAs("Tiff", Dir4+TTC_name2+"_Sec-"+Section+"-AreaInfarto.tif");
selectWindow("borrador2.tif");
close();
selectWindow("borrador3.tif");
run("8-bit");
run("Divide...", "value=5");
roiManager("Select", p4);
run("Add...", "value=200");
setOption("BlackBackground", false);
run("Make Binary");
run("Analyze Particles...", "size=0.50-Infinity circularity=0.20-
1.00 show=Outlines display add title=Ventana3.tif");
saveAs("Tiff", Dir4+TTC_name2+"_Sec-"+Section+"-AreaContra.tif");
selectWindow("borrador3.tif");
close();
//TTC_name2+"_Sec"+Section+".tif"
selectWindow(TTC_name);
close();
run("Duplicate...", "title=borrador4.tif");
//generando Cartoon, primero duplicamos la ultima
imagen, porque sobre ella se trabajara y se destruira
roiManager("Select", 4);
setColor(150);
fill();
roiManager("Select", 3);
setColor(180);
fill();
if((roiManager("Count")>5)==true){
M2 = Dir3+TTC_name2+"_Sec-"+Section+".tif";
open(M2);
waitForUser("Accion del Usuario","SELECCIONE los ROIs \n
correspondientes al infarto \n y cree un nuevo, ROI \n luego presione
OK para continuar");
close();
selectWindow("borrador4.tif");
n1=roiManager("Count")-1;
roiManager("Select", n1);
setColor(1);
fill();
```



```
    }
run("Flatten");
roiManager("Select", 4);
setBackground(0, 0, 0);
run("Clear Outside");
//run("Scale Bar...", "width=2 height=5 font=20 color=White
background=None location=[Lower Left] serif");
saveAs("Tiff", Dir4+TTC_name2+"_Sec-"+Section+"-Cartoon.tif");
selectWindow("borrador4.tif");
close();

selectWindow(TTC_name2+"_Sec-"+Section+"-AreaTotal.tif");
//Montage
close();
if((roiManager("Count")>5)==true){
selectWindow(TTC_name2+"_Sec-"+Section+"-AreaInfarto.tif");
close();
}
selectWindow(TTC_name2+"_Sec-"+Section+"-AreaContra.tif");
close();
MontageName=TTC_name2+"_Sec-"+Section+"-Monage.tif";
M1="method=[Copy (center)] name="+MontageName+" title=[] use";
M2 = Dir3+TTC_name2+"_Sec-"+Section+".tif";
open(M2);
// Esta imagen se abre para montar sobre ella las otras, se destruira
finalmente
run("Images to Stack", M1);
//run("Make Montage...", "columns=2 rows=1 scale=1");
saveAs("Tiff", Dir7+TTC_name2+"_Sec-"+Section+"-Montage.tif");
close();
close();

//cerrandao ventana de results que me sale
selectWindow("Results");
run("Close");

    open(Dir3+TTC_name2+"_Sec-"+Section+".tif");
                                                                    //
Haciendo las mediciones, primero abrimos una imagen para hacer los
calculos
selectWindow("ROI Manager");

// Seleccionamos la ventana del ROI
roiManager("Select",0);

// Eliminamos la primera medida, que corresponde a la grafica
inicial
roiManager("Delete");

roiManager("Select",1);

//Eliminamos la segunda que es repeticion de la primera
roiManager("Delete");
nameMeasure=TTC_name2+"_Sec-"+Section+"-measure";
```

*Activación diferencial de los receptores para el VEGF como mecanismo de neuro-protección en el infarto cerebral isquémico*

```
roiManager("deselect");
roiManager("measure");
selectWindow("Results");
saveAs("text", Dir6+nameMeasure+".xls");
                                                                    //
Guardamos los resultados en una carpeta XLS en el dir6 (Measure)
selectWindow("Results");
run("Close");

// Cerramos la ventana de resultados

roiManager("deselect");

// Deseleccionamos todo en el ROI
roiManager("save", Dir8+TTC_name+"_Sec-"+Section+"-ROI.zip");
                                                                    // Guardamos
el ROI
selectWindow("ROI Manager");
run("Close");

// Cerramos el ROI
selectWindow(TTC_name2+"_Sec-"+Section+".tif");
close();

Cntr=0;
Dialog.create("Desea seleccionar otra area?");
Dialog.addChoice("Deseo", newArray("Seleccionar nueva
area", "Continuar edicion"));
Dialog.show();
Action_Selection=Dialog.getChoice();

}while(Action_Selection=="Seleccionar nueva area");
```

***Anexo II: Rutina de macro implementada en Fiji para el conteo automatizado de núcleos de neuronas en secciones de cortes finos de 40 µm de cerebros teñidos con Violeta de cresilo al 0.1%***

```
//Creando variables
alive="NeuronAlive.tif";
CntLive=1;
dead="NeruoDead.tif";
CntDead=1;
type="";
CntSt=1;
CntCt=1;
Name3="";
ROIkey="";
CntROI=0;
CntCell=0;
sp=" ";
//Configurando las variables de las mediciones
run("Set Measurements...", "area perimeter shape feret's redirect=None
decimal=6");
//Creando lista
waitForUser("===== A V I S O =====", "Hola !:\nAhora
aparecera una ventana emergente\nsolicientandote la ubicacion de\nla
CARPETA donde estan las fotos");
dir=getDirectory("Choose a Directory");
list=getFileList(dir);
L1=list.length;
//Creando directorios
dir1=dir+"Brightfield-NeuronV7"+File.separator;
dir2=dir1+"ROI"+File.separator;
dir3=dir1+"Tablas"+File.separator;
dir4=dir1+"Image"+File.separator;
dir5=dir1+"Resume"+File.separator;
dir6=dir1+"Particle"+File.separator;
dir7=dir1+"Montage"+File.separator;
File.makeDirectory(dir1);
File.makeDirectory(dir2);
File.makeDirectory(dir3);
File.makeDirectory(dir4);
File.makeDirectory(dir5);
File.makeDirectory(dir6);
File.makeDirectory(dir7);
//Cerrando ventanas abiertas
if (isOpen("ROI Manager")) {
selectWindow("ROI Manager");
run("Close");
}
if (isOpen("Results")){
selectWindow("Results");
run("Close");
}
```

```
if(isOpen("Log")){
selectWindow("Log");
run("Close");
}
//Poniendo títulos a la ventana log
Head="CodExp"+sp+"Type"+sp+"Serie"+sp+"N.Slide"+sp+"Side"+sp+"State"+sp
+"n";
print(Head);
//Opción para calibrar el aumento
Dialog.create("Selecciona el objetivo del microscopio usado");
Dialog.addChoice("Objetivo y aumento:", newArray("20X,
1X", "20X, 1.6X"));
Dialog.show();
SScale=Dialog.getChoice();
//Calibrando escala
if(SScale=="20x, 1x"){
showMessage("===== ATENCIÓN =====", "Calibrando
escala:\n\tCalibrando a objetivo 20X,\n\tSIN aumento adicional\n\µm
equivale a 2.2093 pixeles");
} else if (SScale=="20x, 1.6x"){
showMessage("===== ATENCIÓN =====", "Calibrando
escala:\n\tCalibrando a objetivo 20X,\n\tCON aumento adicional\n\µm
equivale a 3.4551 pixeles");
}
for(i=0;i<list.length;i++) {
//Abriendo imagen
open(dir+list[i]);

//Calibrando escala
if(SScale=="20x, 1x"){
run("Set Scale...", "distance=1104.5 known=500 pixel=1 unit=µm
global");
} else if (SScale=="20x, 1.6x"){
run("Set Scale...", "distance=691 known=200 pixel=1 unit=µm global");
}
//Generando nombre
Name1=getTitle;
NameMain=substring(Name1,0,lengthOf(Name1)-4);
Name2=substring(Name1,lengthOf(Name1)-5,lengthOf(Name1)-4);
NameSer=substring(Name1,lengthOf(Name1)-11,lengthOf(Name1)-9);
if (Name2=="S"){
type="St";
Name3=NameMain+"_"+CntSt+".tif";
CntRe=CntSt;
CntSt=CntSt+1;
}
else if (Name2=="C"){
type="Ct";
Name3=NameMain+"_"+CntCt+".tif";
CntRe=CntCt;
CntCt=CntCt+1;
}
else {
print("mal codificado");
}
```

```
    }
//Editando imagen - CAMPO CLARO
if(SScale=="20x, 1x"){
makeRectangle(309, 244, 773.15, 552.25);
}
else if (SScale=="20x, 1.6x"){
makeRectangle(91, 88, 1209.25, 863.75);
}
run("Duplicate...", "borrador.tif");
selectWindow(list[i]);
close();
run("Duplicate...", "borradorT1.tif");
run("Unsharp Mask...", "radius=2 mask=0.75");
run("Despeckle");
run("Remove Outliers...", "radius=2 threshold=50 which=Bright");
run("Subtract Background...", "rolling=50 light");
//run("Scale Bar...", "width=50 height=12 font=40 color=Black
background=None location=[Lower Right] bold serif");
//Guardando imagen
saveAs(".tif", dir4+NameMain+"-Brightfield");
close();
//Editando imagenes para conteo de particulas
run("Enhance Contrast...", "saturated=0.3");
run("Gaussian Blur...", "sigma=2");
run("Subtract Background...", "rolling=50 light");
run("Make Binary");
run("Close-");
run("Fill Holes");
run("Watershed");
//Duplicando images para conteo de particulas
saveAs(".tif", dir6+NameMain+"-particle.tif");
run("Duplicate...", "borrador2");
saveAs(".tif", substring(Name3,0,lengthOf(Name3)-4) + "-" + dead);
//Analizando celulas vivas
selectWindow(NameMain+"-particle.tif");
if(Name2=="S"){
run("Analyze Particles...", "size=21.0-80.0 circularity=0.35-0.75
show=[Overlay Masks] exclude add");
}
else if (Name2=="C"){
run("Analyze Particles...", "size=29-250.0 circularity=0.47-0.88
show=[Overlay Masks] exclude add");
}
if (isOpen("ROI Manager")) {
selectWindow("ROI Manager");
n=roiManager("count");
sub1=substring(Name1,lengthOf(Name1)-6,lengthOf(Name1)-4);
a=1;
for (il=0; il<n; il++) {
sub3=substring(Name1,lengthOf(Name1)-8,lengthOf(Name1)-6);
roiManager("select", il);
roiManager("Rename", sub1+sub3+"-aliv_"+a);
a=a+1;
}
}
```

```
msg1=substring(Name1,0,4)+sp+type+sp+NameSer+sp+substring(Name1,
lengthOf(Name1)-8,lengthOf(Name1)-6)+sp+substring(Name1,
lengthOf(Name1)-6,lengthOf(Name1)-5)+sp+"live"+sp+n;
print(msg1);
CntROI=n;
    }

//Analizando celulas muertas
selectWindow(substring(Name3,0,lengthOf(Name3)-4) + "-" + dead);
run("Analyze Particles...", "size=11.0-30.0 circularity=0.76-1.0
show=[Overlay Masks] exclude add");
selectWindow("ROI Manager");
n=roiManager("count");
a=1;
for (v=CntROI; v<n; v++) {
sub3=substring(Name1,lengthOf(Name1)-8,lengthOf(Name1)-6);
roiManager("select", v);
roiManager("Rename", sub1+sub3+"-dead_"+a);
a=a+1;
    }
R1=n-CntROI;
msg2=substring(Name1,0,4)+sp+type+sp+NameSer+sp+substring(Name1,
lengthOf(Name1)-8,lengthOf(Name1)-6)+sp+substring(Name1,
lengthOf(Name1)-6,lengthOf(Name1)-5)+sp+"dead"+sp+R1;
print(msg2);
CntROI=0;
//Guardando ROI y resultados
roiManager("deselect");
selectWindow("ROI Manager");
roiManager("save", dir2+NameMain+".zip");
roiManager("Measure");
selectWindow("Results");
saveAs("results", dir3+NameMain+"-results.txt");
//Cerrando Ventanas
selectWindow(substring(Name3,0,lengthOf(Name3)-4) + "-" + dead);
close();
selectWindow(NameMain+"-particle.tif");
close();
selectWindow("Results");
run("Close");
selectWindow("ROI Manager");
run("Close");
//Importante para reiniciar el ROIkey
ROIkey=substring(Name1,lengthOf(Name1)-7,lengthOf(Name1)-6);
}
//Guardando log
sub3=substring(Name1,0,4);
selectWindow("Log");
saveAs("text", dir5+sub3+"-log.txt");
run("Close");
//Mensaje de salida
showMessage("ANALISIS COMPLETO","Buen dia Chris, \n ya terminamos,
descansa");
```

**Anexo III: Algoritmo implementado en R para el cálculo del índice de supervivencia neuronal de los conteos de neuronas vivas de cortes coronales finos de 40µm de cerebros teñidos con violeta de Cresilo al 0.1%.**

```
# 3. Importando tabla de Nissl "Nissl_log.txt"
Nissl <- read.table(file = paste(getwd(),"R192-log.txt", sep =
"/data/"),
sep = "\t",
header = TRUE)
tmp <- Nissl
# EDITANDO DE BASE DE DATOS =====
tmp$CodExp <- gsub("R", "Rt-", tmp$CodExp) # Corrigiendo la columna
CodExp
tmp$N.Slide <- gsub("-", "", tmp$N.Slide) # Corregir N.Slide y Serie
tmp$Serie <- gsub("-", "", tmp$Serie)
# Fusiono con DB de DbQx para obtener tratamientos
=====
tmp <- merge(tmp, DbQx[,1:3], by = "CodExp")
levels(tmp$Tto) <- c(levels(tmp$Tto), "SHAM") # creo la categoria
SHAM
tmp[tmp$UtilityQx == "sham",8] <- "SHAM" # Cambio SHAM en
tratamiento
tmp$Tto <- droplevels(tmp$Tto) # Elimino los
tratamientos no usados

# Filtro todos los vivos
=====
live <- subset(x = tmp, subset = State == "live")
live$cod2 <- paste(live$Serie,live$N.Slide,sep = "")

# Reordenando las columnas
=====
live <- subset(x = live, select = c("CodExp","Tto","cod2", "Side",
"n"))
head(live,12)
live.por <- data.frame(CodExp = factor(levels =
levels(as.factor(live$CodExp))),
Tto = factor(levels = levels(live$Tto)),
cod2 = factor(levels = levels(live$cod2)),
por = numeric())
for(i in levels(as.factor(live$CodExp))){
p0 <- subset(x = live,
subset = CodExp == i)
fac1 <- as.factor(p0$cod2)
loop.tto <- p0$Tto[1]
for(t in levels(fac1)){
p1 <- subset(p0, subset = cod2 == t)
right <- p1$n[p1$Side == "D"]
if((p1$n[p1$Side == "I"]) >0){
left <- p1$n[p1$Side == "I"]
}else{
left <- 0
}
}
if(live$Tto!="SHAM"){
if(right > left){
```

```
p.right <- right/right
p.left <- left/right
}else{
p.right <- left/left
p.left <- right/left
}
}else{
p.right <- right/right
p.left <- left/right
}

p3 <- data.frame(CodExp = i,
Tto = loop.tto,
Cod2 = t,
p.left = p.left)
live.por <- rbind(live.por,
p3)
}
}

live.por
fac.ord <- factor(live.por$Tto, c("SHAM", "Vehicle", "VEGF.DMSO",
"BSA.SU1498", "BSA.Axitinib", "VEGF.SU1498", "VEGF.Axitinib"))
boxplot(live.por$p.left~fac.ord)
# stripchart(live.por$p.left~fac.ord, add = TRUE, vertical = TRUE, pch
= 16)
text(live.por$p.left~fac.ord, labels = paste(live.por$CodExp,
live.por$Cod2, sep = "_"))
# Retirando OUTLIERS
live.por$Cod3 <- paste(live.por$CodExp, live.por$Cod2, sep = "_")
live.por <- live.por[live.por$Cod3!="Rt-179_12",]
live.por <- live.por[live.por$Cod3!="Rt-182_11",]
live.por <- live.por[live.por$Cod3!="Rt-188_11",]
live.por <- live.por[live.por$Cod3!="Rt-188_12",]
live.por <- live.por[live.por$Cod3!="Rt-235_11",]
live.por <- live.por[live.por$Cod3!="Rt-130_13",]
live.por <- live.por[live.por$Cod3!="Rt-129_13",]
live.por <- live.por[live.por$Cod3!="Rt-187_12",]
live.por <- live.por[live.por$Cod3!="Rt-192_11",]
live.por <- live.por[live.por$Cod3!="Rt-083_12",]

#live.por[live.por$Tto=="SHAM",]
tmp <- aggregate(live.por$p.left~live.por$CodExp, FUN = mean )
names(tmp) <- c("CodExp", "media")
tmp <- merge(tmp, DbQx[,1:3], by = "CodExp")
levels(tmp$Tto) <- c(levels(tmp$Tto), "SHAM")
tmp$Tto[tmp$UtilityQx == "sham"] <- "SHAM"
tmp$Tto <- droplevels(tmp$Tto)
fac.ord <- factor(tmp$Tto, c("SHAM", "Vehicle", "VEGF.DMSO",
"BSA.SU1498", "BSA.Axitinib", "VEGF.SU1498", "VEGF.Axitinib"))
boxplot(tmp$media~fac.ord, las = 2)
text(tmp$media~fac.ord, labels = tmp$CodExp)
```



```
tmp

# Graficando =====
pdf(file = paste(getwd(),"nissl_barras.pdf", sep = "/graphics/"), paper
= "US")
medias <- tapply(tmp$media, fac.ord, mean, na.rm = T)
desvi <- tapply(tmp$media, fac.ord, sd, na.rm = T)
barcenter <- barplot(medias, names.arg = names(medias), ylim = c(0,1),
main = "EDEMA" , ylab = "% of contralateral", las = 1)
arrows(barcenter, medias - (desvi *2),
barcenter, medias + (desvi *2),angle=90,code=3)
stripchart(tmp$media~fac.ord, at = barcenter, pch = 16, add = TRUE,
vertical = TRUE, method = "stack")
dev.off()
fit <- aov(tmp$media~fac.ord)
TukeyHSD(fit)
capture.output(TukeyHSD(fit), file = paste(getwd(), "nissl_TUKEY.txt",
sep = "/result/"))

# INDICE DE SUPERVIVENCIA
=====
# Vamos a normalizar todos los valroes con los de control
nor.fac <- mean(live.por$p.left[live.por$Tto == "SHAM"])
live.por$norm <- live.por$p.left/nor.fac
tmp <- aggregate(live.por$norm~live.por$CodExp,FUN = mean )
names(tmp) <- c("CodExp", "media")
tmp <- merge(tmp, DbQx[,1:3], by = "CodExp")
levels(tmp$Tto) <- c(levels(tmp$Tto), "SHAM")
tmp$Tto[tmp$UtilityQx == "sham"] <- "SHAM"
tmp$Tto <- droplevels(tmp$Tto)
fac.ord <- factor(tmp$Tto, c("SHAM", "Vehicle", "VEGF.DMSO",
"BSA.SU1498", "BSA.Axitinib","VEGF.SU1498", "VEGF.Axitinib"))
boxplot(tmp$media~fac.ord, las = 2)
text(tmp$media~fac.ord, labels = tmp$CodExp)
tmp

# Graficando =====
pdf(file = paste(getwd(),"nissl_barras.pdf", sep = "/graphics/"), paper
= "US")
medias <- tapply(tmp$media, fac.ord, mean, na.rm = T)
desvi <- tapply(tmp$media, fac.ord, sd, na.rm = T)
par(mar = c(10,4,2,2))
barcenter <- barplot(medias,names.arg = names(medias), ylim = c(0,1.2),
main = "SURVIVAL INDEX" , ylab = "% of contralateral", las = 2)
arrows(barcenter, medias - (desvi *2),
barcenter, medias + (desvi *2),angle=90,code=3)
stripchart(tmp$media~fac.ord, at = barcenter, pch = 16, add = TRUE,
vertical = TRUE, method = "stack")
dev.off()
fit <- aov(tmp$media~fac.ord)
TukeyHSD(fit)
capture.output(TukeyHSD(fit), file = paste(getwd(), "nissl_TUKEY.txt",
sep = "/result/"))
tmp2 <- TukeyHSD(fit)
```

*Activación diferencial de los receptores para el VEGF como mecanismo de neuro-protección en el infarto cerebral isquémico*

tmp2\$fac.ord[tmp2\$fac.ord[,4] < 0.5,]

## Anexo IV Análisis de amplificadores de marcadores inflamatorios periféricos

### Interleuquina 1 beta



## Interleuquina 6

**Input PCR template** [NM\\_012589.2](#) Rattus norvegicus interleukin 6 (Il6), mRNA  
**Range** 1 - 1045  
**Specificity of primers** Primer pairs are specific to input template as no other targets were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Rattus norvegicus)  
**Other reports** [Search Summary](#)

**Graphical view of primer pairs**

**Detailed primer reports**

Primer pair 1										
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity	
Forward primer	CGAGCCCACCAGGAACGAAAGTC	Plus	23	15	37	65.62	60.87	3.00	1.00	
Reverse primer	CTGGCTGGAAGTCTCTTGCGGAG	Minus	23	98	76	65.16	60.87	3.00	2.00	
Product length	84									
<b>Products on intended target</b>										
> <a href="#">NM_012589.2</a> Rattus norvegicus interleukin 6 (Il6), mRNA										
product length = 84										
Forward primer	1	CGAGCCCACCAGGAACGAAAGTC	23							
Template	15	.....	37							
Reverse primer	1	CTGGCTGGAAGTCTCTTGCGGAG	23							
Template	98	.....	76							

## Interleuquina TGF beta

**Input PCR template** NM\_021578.2 Rattus norvegicus transforming growth factor, beta 1 (Tgfb1), mRNA  
**Range** 1 - 1482  
**Specificity of primers** Primer pairs are specific to input template as no other targets were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Rattus norvegicus)  
**Other reports** [Search Summary](#)

### Graphical view of primer pairs

**Detailed primer reports**

Primer pair 1	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
<b>Forward primer</b>	ACCTGCAAGACCATCGACAT	Plus	20	239	258	59.38	50.00	4.00	2.00
<b>Reverse primer</b>	TGTTGTACAAAGCGAGCACC	Minus	20	392	373	59.06	50.00	8.00	0.00
<b>Product length</b>	154								

**Products on intended target**  
 >NM\_021578.2 Rattus norvegicus transforming growth factor, beta 1 (Tgfb1), mRNA

```

product length = 154
Forward primer 1 ACCTGCAAGACCATCGACAT 20
Template       239 ..... 258
Reverse primer 1 TGTTGTACAAAGCGAGCACC 20
Template       392 ..... 373
  
```

## GAPDH:

**Input PCR template** [NM\\_017008.4](#) Rattus norvegicus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh), mRNA  
**Range** 1 - 1306  
**Specificity of primers** primers may **not** be specific to the input PCR template as targets were found in selected database:Refseq mRNA (Organism limited to Rattus norvegicus)...[help on specific primers](#)  
**Other reports** [Search Summary](#)

### Graphical view of primer pairs

(U) Primer pairs for job EBrP9FocV7RvjseLyuvjubDv8oud4-mRNA  
 Primer 1  
 NM\_017008.4: 1..1.3K (1.3Kbp)

### Detailed primer reports

**Primer pair 1**

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
<b>Forward primer</b>	GCATCTTCTGTGCAGTGCC	Plus	20	36	55	60.11	55.00	5.00	3.00
<b>Reverse primer</b>	GATCTCGTCTGGAAGATGG	Minus	21	313	293	60.00	57.14	5.00	0.00
<b>Product length</b>			278						

**Products on intended target**  
 >[NM\\_017008.4](#) Rattus norvegicus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh), mRNA

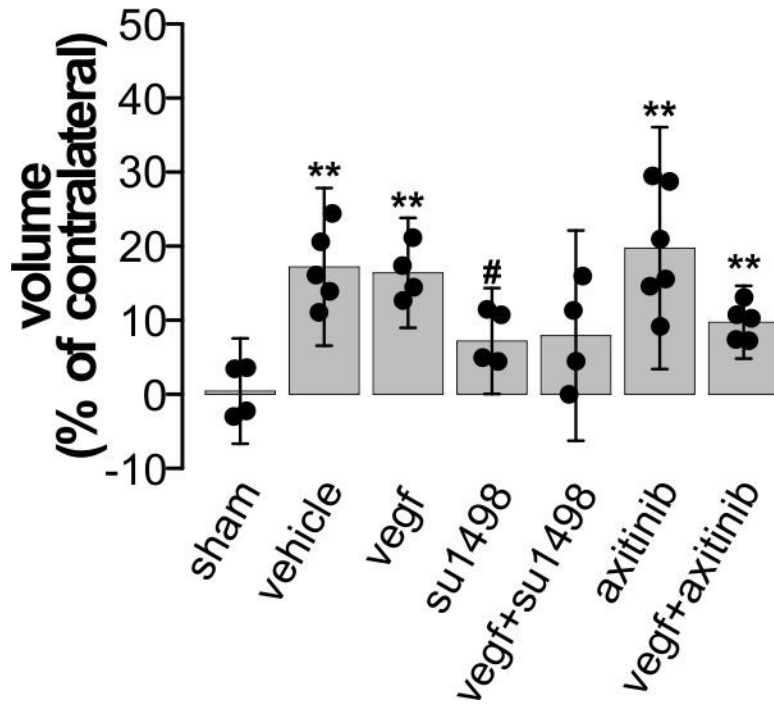
```

product length = 278
Forward primer 1  GCATCTTCTGTGCAGTGCC  20
Template        36  .....  55
Reverse primer 1  GATCTCGTCTGGAAGATGG  21
Template       313  .....  293
    
```

**Products on potentially unintended templates**  
 >[XM\\_017593963.1](#) PREDICTED: Rattus norvegicus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (LOC108351137), mRNA

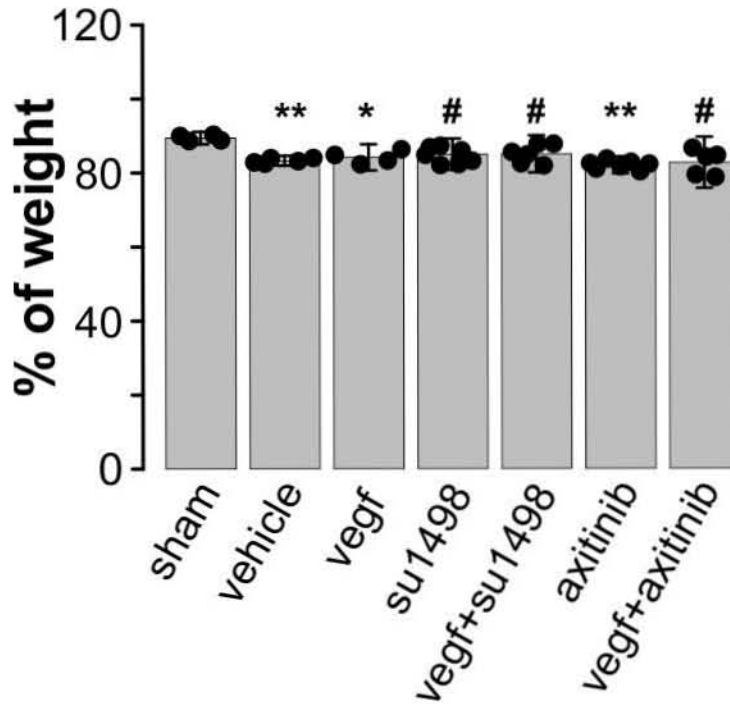
**Anexo V Edema:**

Comparación del volumen de edema en el hemisferio ipsilateral, expresado como porcentaje del volumen del hemisferio contralateral



**Anexo VI: Pérdida de peso a las 24 horas**

Comparación de los pesos de las ratas en los diferentes grupos de tratamiento, expresados como el porcentaje en comparación al peso antes de la operación.





***Anexo VII: Algoritmo para el cálculo del diámetro de los vasos a partir de las imágenes de fluorescencia de la vasculatura cerebral generadas tomadas con el microscopio de 2 fotones durante el MCAo de ratones***

```
// MEASURE VESSEL DIAMETER
// Este script necesita tener abierta la imagen stack para procesarla.
// Inialmente pedira que definas la CARPETA donde se van a guardar las
imagenes editadas,
// luego aplicara los filtros y hara la maxima proyeccion, poniendole
una escala de 50 micrometros
// finalmente cierra todas las ventanas abiertas
// Autor: Alfredo Cardenas Rivera
// Version: 1.0
// Date: 09-Oct-2018

baseName=getTitle();
baseName=substring(baseName, 0, indexOf(baseName, "."));
// Creando directorios
waitForUser("==== C A U T I O N =====", "Please, select the
directory to save edit images");
dir=getDirectory("Choose a Directory");
dir=dir+baseName+File.separator;
File.makeDirectory(dir);

//Editando imagen
run("Enhance Contrast...", "saturated=0.3 normalize process_all");
run("Subtract Background...", "rolling=50 stack");
run("Despeckle", "stack");
run("Remove Outliers...", "radius=2 threshold=50 which=Bright stack");
run("AVI... ", "compression=JPEG frame=15
save="+dir+baseName+"_video.avi");

// Seleccionando vasos
run("Z Project...", "projection=[Max Intensity]");
//primero generamos una proyeccion Z para seleccionar los ROI de los
vasos
makeRectangle(20, 20, 120, 160);
waitForUser("==== C A U T I O N =====", "Please, select ROI of
vessel");
roiManager("Show All with labels");
run("Flatten");
run("Save", "save="+dir+baseName+"_Flaten.tif");
close();
//cierro el flaten
close();
cierro la maxima proyeccion

// Corte videos ROI de cada vaso
n = roiManager("count");
for (i=0; i<n; i++) {
p1=i+1;
roiManager("select", i);
run("Duplicate...", "title=Vaso_"+p1+" duplicate");
```

```
run("Maximize");
run("Z Project...", "projection=[Max Intensity]");
run("Maximize");
run("Rotate... ");
close();
run("Rotate... ");
run("Save", "save="+dir+baseName+"Vaso_"+p1+".tif");
close();
}

// Cerramos todas las ventanas abiertas
while (nImages>0) {
selectImage(nImages);
close();
}
selectWindow("ROI Manager");
roiManager("Save", dir+"RoiSet.zip");
run("Close");

// Midiendo cada vaso
for (i=0; i<n; i++) {
p1=i+1;
open(dir+baseName+"Vaso_"+p1+".tif");
run("Maximize");
run("Z Project...", "projection=[Max Intensity]");
run("Maximize");
makeRectangle(20, 20, 1, 40);
waitForUser("==== C A U T I O N =====", "Please, select ROI of
vessel");
roiManager("Show All with labels");
run("Flatten");
run("Save", "save="+dir+baseName+"Vaso_"+p1+"_Flaten.tif");
close();
//cierro el flaten
close();
// cierro la maxima proyeccion

// Generando imagenes binarias en video
setOption("BlackBackground", false);
run("Make Binary", "method=Default background=Default calculate");

// Cierro ventana original

run("Set Measurements...", "area mean area_fraction stack redirect=None
decimal=4");
p = nSlices;
k = roiManager("count");
for (l=1; l<p; l++) {
setSlice(l);
for (t=0; t<k; t++) {
roiManager("select", t);
roiManager("Measure");
}
}
}
```

```
saveAs("Results", dir+baseName+"Vaso_"+p1+"Result.csv");  
run("Close");  
selectWindow("ROI Manager");  
run("Close");  
close();  
  
}
```

**Anexo VIII: Algoritmo para la importación, edición y procesamiento de los datos generados a partir de la medición del diámetro de los vasos de las imágenes de microscopia de 2 fotones de los experimentos ventana intracraneal (ejemplo de un experimento)**

```
# EXPERIMENTO: 22-02-2018
=====
dir1 <- dirname(dirname(getwd()))
dir1 <- paste(dir1,"22-02-2018/FilOut/FilOut-1/", sep =
"/Neuroinflammation/Microscopia/2PTMTTC_edit/") # definimos la
direccion
nombre <- "FilOut-1Vaso_" #
definimos el nombre inicial de los archivos result.csv
# n <- 1:18
# par(mfrow = c(5,2), #
Damos el formato de dos columnas (datos brutos y escalados del mismo
vaso) y cinco filas (mas facil de ver)
# mar = c(2,2,2,0))
# for (i in n){ #
un loop para graficar todos los vasos
# nameVas <- paste(paste(nombre, n[i], sep = ""),"Result.csv", sep =
"") # definimos el nombre de cada vaso
# vas <- read.table(file = paste(dir1, nameVas, sep = ""),
# IMPORTAMOS los archivos result.csv por cada vaso
# sep = ",",
# header = TRUE)
# lineplot(vas.1 = vas, # Base de datos del archivo
result.csv importado
# suave = 10, # cuantas muestras se usan
para promediar la actual y suavizar la grafica
# constante = 0.7872, # tamaño en micrometro de
1 pixel
# filOut = 300) # Cuantas valores iniciales
se toman para sacar la media, sobre la cual se escalan los datos
#
# }

list_22Feb2018 <- list()
c.suave <- 5 # Genero estas constantes para no estar
cambiando cada variable en cada funcion
t.RetiroFil <- 113 # Genero estas constantes para no estar
cambiando cada variable en cada funcion

# Los vasos 15 y 18 muestran patrones erraticos, probablemente porque
la
# no es tan fuerte.
# Midiendo el vaso 1
nameVas <- paste(paste(nombre, "1", sep = ""),"Result.csv", sep = "")
# definimos el nombre de cada vaso
vas <- read.table(file = paste(dir1, nameVas, sep = ""),
# IMPORTAMOS los archivos result.csv por cada vaso
sep = ",",
header = TRUE)
vaso01 <- examina(vas = vas, # Base de datos,
archivo result.csv importado
```

```

    suave = c.suave,                                # Cuantos
valores arriba y abajo se toman para promediar y suavizar la grafica
    constante = 0.7872,                              # Micrometros que
equivale un pixel
    filOut = 300)                                    # Cuantos valores
iniciales se tomara para usarlo de centro cuando se escalan los datos
vaso01 <-selectVaso(DB = vaso01,                      # Lista de
dos data.base generada por examina()
    select = c(1:10),                                # Los cortes
del vaso que se van a tomar, en este caso de C-8 a C-11
    filOut = t.RetiroFil,                            #
Numero de tomas que se toman para centrar la escala
    limit = 350)                                     # Hasta que
punto de tiempo se desea graficar la lectura
list_22Feb2018$vaso01 <- vaso01
# Midiendo el vaso 2
nameVas <- paste(paste(nombre, "2", sep = ""),"Result.csv", sep = "")
# definimos el nombre de cada vaso
vas <- read.table(file = paste(dirl1, nameVas, sep = ""),
# IMPORTAMOS los archivos result.csv por cada vaso
sep = ",",
header = TRUE)
vaso02 <- examina(vas = vas,                          # Base de datos,
archivo result.csv importado
    suave = c.suave,                                # Cuantos
valores arriba y abajo se toman para promediar y suavizar la grafica
    constante = 0.7872,                              # Micrometros que
equivale un pixel
    filOut = 300)                                    # Cuantos valores
iniciales se tomara para usarlo de centro cuando se escalan los datos
vaso02 <- selectVaso(DB = vaso02,                    # Lista de
dos data.base generada por examina()
    select = 2:4,                                    # Los cortes del
vaso que se van a tomar, en este caso de C-8 a C-11
    filOut = t.RetiroFil,                            #
Numero de tomas que se toman para centrar la escala
    limit = 350)                                     # Hasta que
punto de tiempo se desea graficar la lectura
list_22Feb2018$vaso02 <- vaso02
# Midiendo el vaso 4
nameVas <- paste(paste(nombre, "4", sep = ""),"Result.csv", sep = "")
# definimos el nombre de cada vaso
vas <- read.table(file = paste(dirl1, nameVas, sep = ""),
# IMPORTAMOS los archivos result.csv por cada vaso
sep = ",",
header = TRUE)
vaso04 <- examina(vas = vas,                          # Base de datos,
archivo result.csv importado
    suave = c.suave,                                # Cuantos
valores arriba y abajo se toman para promediar y suavizar la grafica
    constante = 0.7872,                              # Micrometros que
equivale un pixel
    filOut = 300)                                    # Cuantos valores
iniciales se tomara para usarlo de centro cuando se escalan los datos
```

*Activación diferencial de los receptores para el VEGF como mecanismo de neuro-protección en el infarto cerebral isquémico*

```
vaso04 <- selectVaso(DB = vaso04, # Lista de
dos data.base generada por examina()
      select = 6:15, # Los cortes
del vaso que se van a tomar, en este caso de C-8 a C-11
      filOut = t.RetiroFil, #
Numero de tomas que se toman para centrar la escala
      limit = 350) # Hasta que
punto de tiempo se desea graficar la lectura
list_22Feb2018$vaso04 <- vaso04
# Midiendo el vaso 5
nameVas <- paste(paste(nombre, "5", sep = ""), "Result.csv", sep = "")
# definimos el nombre de cada vaso
vas <- read.table(file = paste(dirl1, nameVas, sep = ""),
# IMPORTAMOS los archivos result.csv por cada vaso
sep = ",",
header = TRUE)
vaso05 <- examina(vas = vas, # Base de datos,
archivo result.csv importado
      suave = c.suave, # Cuantos
valores arriba y abajo se toman para promediar y suavizar la grafica
      constante = 0.7872, # Micrometros que
equivale un pixel
      filOut = 300) # Cuantos valores
iniciales se tomara para usarlo de centro cuando se escalan los datos
vaso05 <- selectVaso(DB = vaso05, # Lista de
dos data.base generada por examina()
      select = 1:24, # Los cortes
del vaso que se van a tomar, en este caso de C-8 a C-11
      filOut = t.RetiroFil, #
Numero de tomas que se toman para centrar la escala
      limit = 350) # Hasta que
punto de tiempo se desea graficar la lectura
list_22Feb2018$vaso05 <- vaso05
# Midiendo el vaso 6
nameVas <- paste(paste(nombre, "6", sep = ""), "Result.csv", sep = "")
# definimos el nombre de cada vaso
vas <- read.table(file = paste(dirl1, nameVas, sep = ""),
# IMPORTAMOS los archivos result.csv por cada vaso
sep = ",",
header = TRUE)
vaso06 <- examina(vas = vas, # Base de datos,
archivo result.csv importado
      suave = c.suave, # Cuantos
valores arriba y abajo se toman para promediar y suavizar la grafica
      constante = 0.7872, # Micrometros que
equivale un pixel
      filOut = 300) # Cuantos valores
iniciales se tomara para usarlo de centro cuando se escalan los datos
vaso06 <- selectVaso(DB = vaso06, # Lista de
dos data.base generada por examina()
      select = 11:24, # Los cortes
del vaso que se van a tomar, en este caso de C-8 a C-11
      filOut = t.RetiroFil, #
Numero de tomas que se toman para centrar la escala
```

```
limit = 350) # Hasta que
punto de tiempo se desea graficar la lectura
list_22Feb2018$vaso06 <- vaso06
# Midiendo el vaso 7
nameVas <- paste(paste(nombre, "7", sep = ""), "Result.csv", sep = "")
# definimos el nombre de cada vaso
vas <- read.table(file = paste(dirl1, nameVas, sep = ""),
# IMPORTAMOS los archivos result.csv por cada vaso
sep = ",",
header = TRUE)
vaso07 <- examina(vas = vas, # Base de datos,
archivo result.csv importado
suave = c.suave, # Cuantos
valores arriba y abajo se toman para promediar y suavizar la grafica
constante = 0.7872, # Micrometros que
equivale un pixel
filOut = 300) # Cuantos valores
iniciales se tomara para usarlo de centro cuando se escalan los datos
vaso07 <- selectVaso(DB = vaso07, # Lista de
dos data.base generada por examina()
select = 1:8, # Los cortes
del vaso que se van a tomar, en este caso de C-8 a C-11
filOut = t.RetiroFil, #
Numero de tomas que se toman para centrar la escala
limit = 350) # Hasta que
punto de tiempo se desea graficar la lectura
list_22Feb2018$vaso07 <- vaso07
# Midiendo el vaso 8
nameVas <- paste(paste(nombre, "8", sep = ""), "Result.csv", sep = "")
# definimos el nombre de cada vaso
vas <- read.table(file = paste(dirl1, nameVas, sep = ""),
# IMPORTAMOS los archivos result.csv por cada vaso
sep = ",",
header = TRUE)
vaso08 <- examina(vas = vas, # Base de datos,
archivo result.csv importado
suave = c.suave, # Cuantos
valores arriba y abajo se toman para promediar y suavizar la grafica
constante = 0.7872, # Micrometros que
equivale un pixel
filOut = 300) # Cuantos valores
iniciales se tomara para usarlo de centro cuando se escalan los datos
vaso08 <- selectVaso(DB = vaso08, # Lista de
dos data.base generada por examina()
select = (1:4), # Los cortes
del vaso que se van a tomar, en este caso de C-8 a C-11
filOut = t.RetiroFil, #
Numero de tomas que se toman para centrar la escala
limit = 350) # Hasta que
punto de tiempo se desea graficar la lectura
list_22Feb2018$vaso08 <- vaso08
# Midiendo el vaso 9
nameVas <- paste(paste(nombre, "9", sep = ""), "Result.csv", sep = "")
# definimos el nombre de cada vaso
```

```
vas <- read.table(file = paste(dirl, nameVas, sep = ""),
# IMPORTAMOS los archivos result.csv por cada vaso
sep = ",",
header = TRUE)
vaso09 <- examina(vas = vas, # Base de datos,
archivo result.csv importado
suave = c.suave, # Cuantos
valores arriba y abajo se toman para promediar y suavizar la grafica
constante = 0.7872, # Micrometros que
equivale un pixel
filOut = 300) # Cuantos valores
iniciales se tomana para usarlo de centro cuando se escalan los datos
vaso09 <- selectVaso(DB = vaso09, # Lista de
dos data.base generada por examina()
select = (1:8), # Los cortes
del vaso que se van a tomar, en este caso de C-8 a C-11
filOut = t.RetiroFil, #
Numero de tomas que se toman para centrar la escala
limit = 350) # Hasta que
punto de tiempo se desea graficar la lectura
list_22Feb2018$vaso09 <- vaso09
# Midiendo el vaso 11
nameVas <- paste(paste(nombre, "11", sep = ""), "Result.csv", sep = "")
# definimos el nombre de cada vaso
vas <- read.table(file = paste(dirl, nameVas, sep = ""),
# IMPORTAMOS los archivos result.csv por cada vaso
sep = ",",
header = TRUE)
vaso11 <- examina(vas = vas, # Base de datos,
archivo result.csv importado
suave = c.suave, # Cuantos
valores arriba y abajo se toman para promediar y suavizar la grafica
constante = 0.7872, # Micrometros que
equivale un pixel
filOut = 300) # Cuantos valores
iniciales se tomana para usarlo de centro cuando se escalan los datos
vaso11 <- selectVaso(DB = vaso11, # Lista de
dos data.base generada por examina()
select = (1:12), # Los cortes
del vaso que se van a tomar, en este caso de C-8 a C-11
filOut = t.RetiroFil, #
Numero de tomas que se toman para centrar la escala
limit = 350) # Hasta que
punto de tiempo se desea graficar la lectura
list_22Feb2018$vaso11 <- vaso11
# Midiendo el vaso 12
nameVas <- paste(paste(nombre, "12", sep = ""), "Result.csv", sep = "")
# definimos el nombre de cada vaso
vas <- read.table(file = paste(dirl, nameVas, sep = ""),
# IMPORTAMOS los archivos result.csv por cada vaso
sep = ",",
header = TRUE)
vaso12 <- examina(vas = vas, # Base de datos,
archivo result.csv importado
```



```

    suave = c.suave,                                # Cuantos
valores arriba y abajo se toman para promediar y suavizar la grafica
    constante = 0.7872,                             # Micrometros que
equivale un pixel
    filOut = 300)                                  # Cuantos valores
iniciales se tomara para usarlo de centro cuando se escalan los datos
vasol2 <- selectVaso(DB = vasol2,                   # Lista de
dos data.base generada por examina()
    select = (10:18),                               # Los
cortes del vaso que se van a tomar, en este caso de C-8 a C-11
    filOut = t.RetiroFil,                           #
Numero de tomas que se toman para centrar la escala
    limit = 350)                                    # Hasta que
punto de tiempo se desea graficar la lectura
list_22Feb2018$vasol2 <- vasol2
# Midiendo el vaso 13
nameVas <- paste(paste(nombre, "13", sep = ""), "Result.csv", sep = "")
# definimos el nombre de cada vaso
vas <- read.table(file = paste(dirl, nameVas, sep = ""),
# IMPORTAMOS los archivos result.csv por cada vaso
sep = ",",
header = TRUE)
vasol3 <- examina(vas = vas,                         # Base de datos,
archivo result.csv importado
    suave = c.suave,                                # Cuantos
valores arriba y abajo se toman para promediar y suavizar la grafica
    constante = 0.7872,                             # Micrometros que
equivale un pixel
    filOut = 300)                                  # Cuantos valores
iniciales se tomara para usarlo de centro cuando se escalan los datos
vasol3 <- selectVaso(DB = vasol3,                   # Lista de
dos data.base generada por examina()
    select = (15:19),                               # Los
cortes del vaso que se van a tomar, en este caso de C-8 a C-11
    filOut = t.RetiroFil,                           #
Numero de tomas que se toman para centrar la escala
    limit = 350)                                    # Hasta que
punto de tiempo se desea graficar la lectura
list_22Feb2018$vasol3 <- vasol3
# Midiendo el vaso 14
nameVas <- paste(paste(nombre, "14", sep = ""), "Result.csv", sep = "")
# definimos el nombre de cada vaso
vas <- read.table(file = paste(dirl, nameVas, sep = ""),
# IMPORTAMOS los archivos result.csv por cada vaso
sep = ",",
header = TRUE)
vasol4 <- examina(vas = vas,                         # Base de datos,
archivo result.csv importado
    suave = c.suave,                                # Cuantos
valores arriba y abajo se toman para promediar y suavizar la grafica
    constante = 0.7872,                             # Micrometros que
equivale un pixel
    filOut = 300)                                  # Cuantos valores
iniciales se tomara para usarlo de centro cuando se escalan los datos
```

```
vaso14 <- selectVaso(DB = vaso14, # Lista de
dos data.base generada por examina()
          select = (15:18), # Los
cortes del vaso que se van a tomar, en este caso de C-8 a C-11
          filOut = t.RetiroFil, #
Numero de tomas que se toman para centrar la escala
          limit = 350) # Hasta que
punto de tiempo se desea graficar la lectura
list_22Feb2018$vaso14 <- vaso14
# Midiendo el vaso 16
nameVas <- paste(paste(nombre, "16", sep = ""), "Result.csv", sep = "")
# definimos el nombre de cada vaso
vas <- read.table(file = paste(dirl1, nameVas, sep = ""),
# IMPORTAMOS los archivos result.csv por cada vaso
sep = ",",
header = TRUE)
vaso16 <- examina(vas = vas, # Base de datos,
archivo result.csv importado
          suave = c.suave, # Cuantos
valores arriba y abajo se toman para promediar y suavizar la grafica
          constante = 0.7872, # Micrometros que
equivale un pixel
          filOut = 300) # Cuantos valores
iniciales se tomara para usarlo de centro cuando se escalan los datos
vaso16 <- selectVaso(DB = vaso16, # Lista de
dos data.base generada por examina()
          select = 8:11, # Los cortes
del vaso que se van a tomar, en este caso de C-8 a C-11
          filOut = t.RetiroFil, #
Numero de tomas que se toman para centrar la escala
          limit = 350) # Hasta que
punto de tiempo se desea graficar la lectura
list_22Feb2018$vaso16 <- vaso16
# Midiendo el vaso 17
nameVas <- paste(paste(nombre, "17", sep = ""), "Result.csv", sep = "")
# definimos el nombre de cada vaso
vas <- read.table(file = paste(dirl1, nameVas, sep = ""),
# IMPORTAMOS los archivos result.csv por cada vaso
sep = ",",
header = TRUE)
vaso17 <- examina(vas = vas, # Base de datos,
archivo result.csv importado
          suave = c.suave, # Cuantos
valores arriba y abajo se toman para promediar y suavizar la grafica
          constante = 0.7872, # Micrometros que
equivale un pixel
          filOut = 300) # Cuantos valores
iniciales se tomara para usarlo de centro cuando se escalan los datos
vaso17 <- selectVaso(DB = vaso17, # Lista de
dos data.base generada por examina()
          select = 1:17, # Los cortes
del vaso que se van a tomar, en este caso de C-8 a C-11
          filOut = t.RetiroFil, #
Numero de tomas que se toman para centrar la escala
```

```
limit = 350) # Hasta que
punto de tiempo se desea graficar la lectura
list_22Feb2018$vaso17 <- vaso17

# Midiendo el vaso 18
nameVas <- paste(paste(nombre, "18", sep = ""), "Result.csv", sep = "")
# definimos el nombre de cada vaso
vas <- read.table(file = paste(dirl1, nameVas, sep = ""),
# IMPORTAMOS los archivos result.csv por cada vaso
sep = ",",
header = TRUE)
vaso18 <- examina(vas = vas, # Base de datos,
archivo result.csv importado
suave = c.suave, # Cuantos
valores arriba y abajo se toman para promediar y suavizar la grafica
constante = 0.7872, # Micrometros que
equivale un pixel
filOut = 300) # Cuantos valores
iniciales se tomara para usarlo de centro cuando se escalan los datos
vaso18 <- selectVaso(DB = vaso18, # Lista de
dos data.base generada por examina()
select = 1:5, # Los cortes
del vaso que se van a tomar, en este caso de C-8 a C-11
filOut = t.RetiroFil, #
Numero de tomas que se toman para centrar la escala
limit = 350) # Hasta que
punto de tiempo se desea graficar la lectura
list_22Feb2018$vaso18 <- vaso18

# Midiendo el vaso 19
nameVas <- paste(paste(nombre, "19", sep = ""), "Result.csv", sep = "")
# definimos el nombre de cada vaso
vas <- read.table(file = paste(dirl1, nameVas, sep = ""),
# IMPORTAMOS los archivos result.csv por cada vaso
sep = ",",
header = TRUE)
vaso19 <- examina(vas = vas, # Base de datos,
archivo result.csv importado
suave = c.suave, # Cuantos
valores arriba y abajo se toman para promediar y suavizar la grafica
constante = 0.7872, # Micrometros que
equivale un pixel
filOut = 300) # Cuantos valores
iniciales se tomara para usarlo de centro cuando se escalan los datos
vaso19 <- selectVaso(DB = vaso19, # Lista de
dos data.base generada por examina()
select = 1:21, # Los cortes
del vaso que se van a tomar, en este caso de C-8 a C-11
filOut = t.RetiroFil, #
Numero de tomas que se toman para centrar la escala
limit = 350) # Hasta que
punto de tiempo se desea graficar la lectura
list_22Feb2018$vaso19 <- vaso19
```

*Activación diferencial de los receptores para el VEGF como mecanismo de neuro-protección en el infarto cerebral isquémico*

```
# Midiendo el vaso 20
nameVas <- paste(paste(nombre, "20", sep = ""), "Result.csv", sep = "")
# definimos el nombre de cada vaso
vas <- read.table(file = paste(dir1, nameVas, sep = ""),
# IMPORTAMOS los archivos result.csv por cada vaso
sep = ",",
header = TRUE)
vaso20 <- examina(vas = vas, # Base de datos,
archivo result.csv importado
suave = c.suave, # Cuantos
valores arriba y abajo se toman para promediar y suavizar la grafica
constante = 0.7872, # Micrometros que
equivale un pixel
filOut = 300) # Cuantos valores
iniciales se tomara para usarlo de centro cuando se escalan los datos
vaso20 <- selectVaso(DB = vaso20, # Lista de
dos data.base generada por examina()
select = 1:28, # Los cortes
del vaso que se van a tomar, en este caso de C-8 a C-11
filOut = t.RetiroFil, #
Numero de tomas que se toman para centrar la escala
limit = 350) # Hasta que
punto de tiempo se desea graficar la lectura
list_22Feb2018$vaso20 <- vaso20
# Midiendo el vaso 21
nameVas <- paste(paste(nombre, "21", sep = ""), "Result.csv", sep = "")
# definimos el nombre de cada vaso
vas <- read.table(file = paste(dir1, nameVas, sep = ""),
# IMPORTAMOS los archivos result.csv por cada vaso
sep = ",",
header = TRUE)
vaso21 <- examina(vas = vas, # Base de datos,
archivo result.csv importado
suave = c.suave, # Cuantos
valores arriba y abajo se toman para promediar y suavizar la grafica
constante = 0.7872, # Micrometros que
equivale un pixel
filOut = 300) # Cuantos valores
iniciales se tomara para usarlo de centro cuando se escalan los datos
vaso21 <- selectVaso(DB = vaso21, # Lista de
dos data.base generada por examina()
select = 1:7, # Los cortes
del vaso que se van a tomar, en este caso de C-8 a C-11
filOut = t.RetiroFil, #
Numero de tomas que se toman para centrar la escala
limit = 350) # Hasta que
punto de tiempo se desea graficar la lectura
list_22Feb2018$vaso21 <- vaso21
# Midiendo el vaso 22
nameVas <- paste(paste(nombre, "22", sep = ""), "Result.csv", sep = "")
# definimos el nombre de cada vaso
vas <- read.table(file = paste(dir1, nameVas, sep = ""),
# IMPORTAMOS los archivos result.csv por cada vaso
sep = ",",
```

```
header = TRUE)
vaso22 <- examina(vas = vas, # Base de datos,
archivo result.csv importado
                 suave = c.suave, # Cuantos
valores arriba y abajo se toman para promediar y suavizar la grafica
                 constante = 0.7872, # Micrometros que
equivale un pixel
                 filOut = 300) # Cuantos valores
iniciales se tomara para usarlo de centro cuando se escalan los datos
vaso22 <- selectVaso(DB = vaso22, # Lista de
dos data.base generada por examina()
                 select = 13:16, # Los cortes
del vaso que se van a tomar, en este caso de C-8 a C-11
                 filOut = t.RetiroFil, #
Numero de tomas que se toman para centrar la escala
                 limit = 350) # Hasta que
punto de tiempo se desea graficar la lectura
list_22Feb2018$vaso22 <- vaso22
# Midiendo el vaso 23
nameVas <- paste(paste(nombre, "23", sep = ""), "Result.csv", sep = "")
# definimos el nombre de cada vaso

vas <- read.table(file = paste(dirl1, nameVas, sep = ""),
# IMPORTAMOS los archivos result.csv por cada vaso
sep = ",",
header = TRUE)
vaso23 <- examina(vas = vas, # Base de datos,
archivo result.csv importado
                 suave = c.suave, # Cuantos
valores arriba y abajo se toman para promediar y suavizar la grafica
                 constante = 0.7872, # Micrometros que
equivale un pixel
                 filOut = 300) # Cuantos valores
iniciales se tomara para usarlo de centro cuando se escalan los datos
vaso23 <- selectVaso(DB = vaso23, # Lista de
dos data.base generada por examina()
                 select = 1:20, # Los cortes
del vaso que se van a tomar, en este caso de C-8 a C-11
                 filOut = t.RetiroFil, #
Numero de tomas que se toman para centrar la escala
                 limit = 350) # Hasta que
punto de tiempo se desea graficar la lectura
list_22Feb2018$vaso23 <- vaso23

# removiendo vasos
rm(list = ls()[grep(pattern = "vaso", x = ls())])
rm(dirl1, nameVas, nombre, vas, c.suave, t.RetiroFil)

pdf(file = paste(getwd(), "22Feb2018_Original.pdf", sep = "/graphic/"),
paper = "US")
```

```
DB_22Feb2018 <- line2vas(listDB = list_22Feb2018,type =
"Original",escalado = FALSE,filOut = 113)
dev.off()
pdf(file = paste(getwd(), "22Feb2018_Original_Scaled.pdf", sep =
"/graphic/"),
paper = "US")
DB_22Feb2018 <- line2vas(listDB = list_22Feb2018,type =
"Original",escalado = TRUE,filOut = 113)
dev.off()
pdf(file = paste(getwd(), "22Feb2018_Smooth.pdf", sep = "/graphic/"),
paper = "US")
DB_22Feb2018 <- line2vas(listDB = list_22Feb2018,type =
"Smooth",escalado = FALSE,filOut = 113)
dev.off()
pdf(file = paste(getwd(), "22Feb2018_Smooth_Scaled.pdf", sep =
"/graphic/"),
paper = "US")
DB_22Feb2018 <- line2vas(listDB = list_22Feb2018,type =
"Smooth",escalado = TRUE,filOut = 113)
dev.off()
DB_22Feb2018 <- line2vas(listDB = list_22Feb2018,type =
"Original",escalado = FALSE,filOut = 113)
```

### **Anexo IX: Funciones implementadas en R para analizar los datos de la dinámica de los diámetros de los vasos generados a partir de los ensayos de la ventana intracraneal in-vitro**

```
# Esta función sirve para calcular la relación entre las lecturas de
perfusión
# en porcentaje, medidas a partir del punto de FilOut.
# Presenta dos atributos:
# data = la base de datos en formato "hipoperfusion"
# t = que equivale al número de tomas antes o despues del punto FilOut

# data <- tab132      # base de datos
# t <- 200           # tomas antes o despues que se van a tomar

hipoperfusion <- function(CodExp) {
  name1 <- paste("/data/", "-MCAo-raw.txt", sep = CodExp)
  name2 <- paste("/data/", "-MCAo-markers.txt", sep = CodExp)
  DB1 <- read.table(paste(getwd(), name1, sep = ""), header = FALSE, sep =
"\t")
  markers <- read.table(paste(getwd(), name2, sep = ""), header = TRUE, sep =
"\t")
  DB1 <- DB1[,1:4]
  colnames(DB1) <- c("Sample", "Date", "Time", "PU")
  for (i in 1:ncol(DB1)) {
    DB1[,i] <- as.character(DB1[,i])
  }
  #summary(DB1)
  #head(DB1)
  p1 <- which(DB1$Sample == "MARKERS")
  p1 <- c((p1 - 1), (p1 + 8))
  p1 <- sort(p1)
  p1 <- c(3,p1,nrow(DB1))

  # p0 <- which(DB1$Sample == "Sample")
  # p00 <- c(p0-7,p0-6,p0-5,p0-4,p0-3,p0-2,p0-
1,p0,p0+2,p0+3,p0+4,p0+5,p0+6,p0+7)
  # p00 <- sort(p00)
  # p00 <- p00[7:length(p00)]
  # DB1[p00,]
  #
  # for (i in 1:length(p1)) {
  # Si imprimo DB1[p2]
  aqui, todos deben ser posiciones de MARKERS
  # print(DB1[p1[i],])
  # }
  #
  rawList <- list()
  for (i in 1:(length(p1)/2)) {
    a <- 2*i - 1
    b <- 2*i
    temp <- data.frame(DB1[p1[a]:p1[b],])
    rawList[[i]] <- temp
  }
}
```

```
if (length(which(DB1$Sample == "MARKERS")) == 8) {
listNames <- c("raw", "basal", "CCoEarly", "MCAoEarly", "MCAoLate",
"CCoLate", "FilOut", "Rep1", "Rep2")
} else if (length(which(DB1$Sample == "MARKERS")) == 7) {
listNames <- c("raw", "basal", "CCoEarly", "MCAoEarly", "MCAoLate",
"CCoLate", "FilOut", "Rep")
} else {
print("Numero de areas fuera de rango aceptado (7-8)")
break
}
names(rawList) <- listNames

# summary(rawList$CCoEarly)
#sapply(rawList, function(ls) nrow(ls))
#sort(sapply(rawList, function(ls) nrow(ls)))
# Agregamos data.frame de inicio y final de lectura, que la tomamos de
data.frame rawList$raw
p2 <- which(rawList$raw$Date == "<Segment break>") # El corte
de grabación está marcado por "<Segment break>"
p2 <- c(1,p2 - 1, p2 + 2, nrow(rawList$raw))
rawList$Inicio <- rawList$raw[p2[1]:p2[2],]
rawList$Fin <- rawList$raw[p2[3]:p2[4],]

# Edición de la df markers
markers$Date <- as.character(markers$Date)
markers$Time <- as.character(markers$Time)
markers$Time <- gsub(x = markers$Time,pattern = "p.m.",replacement =
"PM")
markers$Time <- gsub(x = markers$Time,pattern = "a.m.",replacement =
"AM")
markers$Date <- paste(markers$Date, markers$Time, sep = " ")
markers$Date <- as.POSIXlt(markers$Date, "%d/%m/%Y %I:%M:%OS %p", tz =
'UTC')
markers$Time <- format(markers$Date, "%H:%M:%OS3")

# format(markers$Date[2], "%Y-%m-%d %H:%M:%OS6") # Podemos verificar
que los datos guardados en $date conservan los milisegundos con esta
función
# format(markers$Date[1], "%H:%M:%OS3")
if(("MCAoEarly" %in% markers$Comment & "FilOut" %in% markers$Comment)
== FALSE){
print("Marcador MCAoEarly o FilOut no encontrado en los marcadores")
break
}
}
# Marcadores
MCAo.star <- markers$Date[markers$Comment == "MCAoEarly"]
# Inicio del infarto
MCAo.fin <- markers$Date[markers$Comment == "FilOut"]
# fin del infarto
v.markers <- difftime(markers$Date, MCAo.star, units = "mins") #
Marcas verticales de los momentos de basal, MCAo, rep y otros
```



```
# Edicion =====

# head(rawList[[i]])
# Edición de las columnas de rawList()

for (i in 2:length(rawList)) {
rawList[[i]]$Sample <- as.numeric(as.character(rawList[[i]]$Sample))
rawList[[i]]$Date <- as.character(rawList[[i]]$Date)
rawList[[i]]$Time <- as.character(rawList[[i]]$Time)
rawList[[i]]$PU <- as.numeric(as.character(rawList[[i]]$PU), digits =
3)
rawList[[i]]$Time <- gsub(x = rawList[[i]]$Time, pattern =
"p.m.",replacement = "PM")
rawList[[i]]$Time <- gsub(x = rawList[[i]]$Time, pattern =
"a.m.",replacement = "AM")
rawList[[i]]$Date <- paste(rawList[[i]]$Date, rawList[[i]]$Time, sep =
" ")
rawList[[i]]$Date <- as.POSIXlt(rawList[[i]]$Date, "%d/%m/%Y %I:%M:%OS
%p", tz = 'UTC')
rawList[[i]]$Time <- difftime(rawList[[i]]$Date,MCAo.star, units =
"secs")
rawList[[i]] <- cbind(rawList[[i]], difMin =
difftime(rawList[[i]]$Date,MCAo.star, units = "mins"))
}

# sapply(rawList, head)
# ESCALANDO DATOS
=====
promBasal <- mean(rawList$basal$PU, trim = 0.3) # Promedio de
las lecturas basales
facCorr <- mean(rawList$MCAoEarly$PU, trim =
0.3)/mean(rawList$MCAoLate$PU, trim = 0.3)
for (i in 5:(length(rawList) - 2)){
rawList[[i]]$PUcor <- rawList[[i]]$PU*facCorr
}
rawList$Fin$PUcor <- rawList$Fin$PU*facCorr # Aplico el factor de
corrección en las lecturas finales
# Reescalado de PU (% de la linea basal)
for (i in 2:4) {
rawList[[i]]$PU.porc <- (rawList[[i]]$PU/promBasal)*100
}

rawList$Inicio$PU.porc <- (rawList$Inicio$PU/promBasal)*100
for (i in 5:(length(rawList)-2)) {
rawList[[i]]$PU.porc <- (rawList[[i]]$PUcor/promBasal)*100
}

rawList$Fin$PU.porc <- (rawList$Fin$PUcor/promBasal)*100

# sapply(rawList, head)
# Marcadores horizontales
h.markers <- c(mean(rawList$basal$PU, trim = 0.3),
```

```
mean(rawList$CCoEarly$PU, trim = 0.3),
mean(rawList$MCAoEarly$PU, trim = 0.3),
mean(rawList$MCAoLate$PUcor, trim = 0.3),
mean(rawList$CCoLate$PUcor, trim = 0.3),
mean(rawList$FilOut$PUcor, trim = 0.3),
mean(rawList$Rep1$PUcor, trim = 0.3),
mean(rawList$Rep2$PUcor, trim = 0.3))

# GRAFICANDO
=====
# Constantes gráficas
nomXlab <- "time (min)"
nomYlab <- "CBP(% of baseline)"
namePerfusion <- "Perfusion (A.U.)"
h.colors <- c("Red4","Red3", "Blue", "Dark green", "Purple", "Orange",
"Light green", "mediumorchid3", "sienna3")
lin.col <- "black"
v.names <- c("basal", "CCoEarly", "MCAoEarly", "MCAoLate",
"CCoLate","FilOut", "Rep")
h.names <- c("Basal", "CCo", "MCAo", "Rep")
t1 <- numeric()
for (i in 1:length(v.markers)) {
t1 <- c(t1,which.min(abs(v.markers[i] -
c(rawList$Inicio$difMin,rawList$Fin$difMin))))
}

p.ini <- which(abs(rawList$Inicio$Date -
markers$Date[markers$Comment=="MCAoEarly"]) ==
min(abs(rawList$Inicio$Date -
markers$Date[markers$Comment=="MCAoEarly"])))
p.fin <- which(abs(rawList$Fin$Date -
markers$Date[markers$Comment=="FilOut"]) == min(abs(rawList$Fin$Date -
markers$Date[markers$Comment=="FilOut"])))
time.ini <- rawList$Inicio$difMin[p.ini]
time.fin <- rawList$Fin$difMin[p.fin]

# EXPORTANDO DATOS
=====
#dev.new()
par(mar = c(4,4,4,1), mfrow = c(3,2), bty = "l")

# Gráfico 1 - RAW DATA original data
plot(rawList$raw$PU,
type = "n",
ylab = namePerfusion,
xlab = "# of lecture",
bty = "l",
main = "RAW DATA\noriginal data",
las = 1)
grid(col = "lightgray",
lty = "dotted",
```

```
lwd = par("lwd"),
equilogs = TRUE)

lines(rawList$raw$PU,
col = lin.col)
abline(v = t1,
lty = "dotted",
col = h.colors[2])
text(x = t1,
y = max(rawList$Inicio$PU),
labels = v.names,
pos = 2,
col = h.colors[1],
srt = 90)
mtext(side = 4,
text = CodExp,
cex = 0.7)

# Gráfico 2 - RAW DATA
plot(c(rawList$Inicio$PU,rawList$Fin$PU),
type = "n",
ylab = namePerfusion,
xlab = "# of lecture",
bty = "l",
main = "RAW DATA\nprocessed data",
las = 1)
grid(col = "lightgray",
lty = "dotted",
lwd = par("lwd"),
equilogs = TRUE)

lines(c(rawList$Inicio$PU,rawList$Fin$PU),
col = lin.col)
t1 <- numeric()
for (i in 1:length(v.markers)) {
t1 <- c(t1,which.min(abs(v.markers[i] -
c(rawList$Inicio$difMin,rawList$Fin$difMin))))
}
abline(v = t1,
lty = "dotted",
col = h.colors[2])
text(x = t1,
y = max(rawList$Inicio$PU),
labels = v.names,
pos = 2,
col = h.colors[1],
srt = 90)
mtext(side = 4,
text = CodExp,
cex = 0.7)

# Grafico 3 ====
library(plotrix)
gap <- c(tail(rawList$Inicio$difMin,1),head(rawList$Fin$difMin))
```

```
gap.plot(y = c(rawList$Inicio$PU,rawList$Fin$PUcor),
x = c(rawList$Inicio$difMin,rawList$Fin$difMin),
type = "l",
ylab = namePerfusion,
xlab = nomXlab,
bty = "l",
main = "ADJUST DATA",
las = 1,gap = gap, gap.axis = "x")
grid(col = "lightgray",
lty = "dotted",
lwd = par("lwd"),
equilogs = TRUE)

lines(c(rawList$Inicio$PU,rawList$Fin$PUcor)~c(rawList$Inicio$difMin,rawList$Fin$difMin),
col = lin.col)
abline(v = v.markers,
lty = "dotted",
col = h.colors[2])
text(x = v.markers,
y = max(rawList$Fin$PU),
labels = v.names,
pos = 2,
col = h.colors[1],
srt = 90)
mtext(side = 4,
text = CodExp,
cex = 0.7)
# Grafico 4 ====
gap.plot(y = c(rawList$Inicio$PU.porc,rawList$Fin$PU.porc),
x = c(rawList$Inicio$difMin,rawList$Fin$difMin),
type = "l",
ylab = "CBP (% of baseline)",
xlab = nomXlab,
bty = "l",
main = "ADJUST DATA (%)",
las = 1,gap = gap, gap.axis = "x")
grid(col = "lightgray",
lty = "dotted",
lwd = par("lwd"),
equilogs = TRUE)

abline(v = v.markers,
lty = "dotted",
col = h.colors[2])
text(x = v.markers,
y = max(rawList$Fin$PU),
labels = v.names,
pos = 2,
col = h.colors[1],
srt = 90)
mtext(side = 4,
text = CodExp,
```

```
cex = 0.7)

# Grafico 5 ZOOM ====
center <- which.min(abs(rawList$Fin$Date - MCAo.fin))
if (center < 3000) {
  zoom.fac <- center
} else {
  zoom.fac <- 3000
}
zoom.data <- rawList$Fin[((center - zoom.fac):(center + zoom.fac)),]
plot(zoom.data$PU.porc~zoom.data$difMin,
     type = "n",
     ylab = "CBP (% of baseline)",
     xlab = nomXlab,
     bty = "l",
     main = "ZOOM % DATA",
     las = 1)
grid(col = "lightgray",
     lty = "dotted",
     lwd = par("lwd"),
     equilogs = TRUE)
lines(zoom.data$PU.porc~zoom.data$difMin,
      col = "black")
abline(v = v.markers,
       lty = "dotted",
       col = h.colors[2])
text(x = v.markers,
     y = max(zoom.data$PU.porc),
     labels = v.names,
     pos = 2,
     col = h.colors[1],
     srt = 90)
mtext(side = 4,
      text = CodExp,
      cex = 0.7)

# Grafica 4 - NORMALIZADA
zoom.data <- cbind(zoom.data,
                  escalado = scale(zoom.data$PU.porc, center =
mean(zoom.data$PU.porc[1500:zoom.fac], trim = 0.3), scale = TRUE))
plot(zoom.data$escalado~zoom.data$difMin,
     type = "n",
     ylim = c(-3,3),
     ylab = "CBP (scaled of % of baseline)",
     xlab = "time (mins)",
     bty = "l",
     las = 1,
     cex.main = 3,
     main = "NORMALIZED")
grid(col = "lightgray",
     lty = "dotted",
     lwd = par("lwd"),
     equilogs = TRUE)
lines(zoom.data$escalado~zoom.data$difMin,
```

```
col = "black")
abline(v = v.markers,
lty = "dotted",
col = h.colors[2])
text(x = v.markers,
y = 2,
labels = v.names,
pos = 3,
col = h.colors[1],
srt = 90,
cex = 0.7)
mtext(side = 4,
text = CodExp,
cex = 0.7)
rawList$markers <- markers
return(rawList)

}

revCurl <- function(data, t){
MCAo.fin <- data$times[6,3]
ini <- which(abs(data$Fin$difMin - MCAo.fin) == min(abs(data$Fin$difMin
- MCAo.fin))) - t
fin <- which(abs(data$Fin$difMin - MCAo.fin) == min(abs(data$Fin$difMin
- MCAo.fin))) + t
t1 <- t + 1
exo <- mean(data$Fin$PUcor[(fin - t1):fin]/data$Fin$PUcor[ini:(ini +
t1)])
return(exo)

}

revCurlMin <- function(data, t){
MCAo.fin <- data$times[6,3]
ini <- which(abs(data$Fin$difMin - MCAo.fin) == min(abs(data$Fin$difMin
- MCAo.fin))) - t
fin <- which(abs(data$Fin$difMin - MCAo.fin) == min(abs(data$Fin$difMin
- MCAo.fin))) + t + 1
p1 <- min(unlist(data$Fin$PUcor[(fin - t):fin]))
p2 <- mean(unlist(data$Fin$PUcor[ini:(ini + t)]))
exo <- c(p1,p2)
names(exo) <- c("MinFilOut", "MeanCCo")
return(exo)

}

# RevCurvMin data
=====
revCurlMin.Data <- function(data, t){
MCAo.fin <- data$times[6,3]
ini <- which(abs(data$Fin$difMin - MCAo.fin) == min(abs(data$Fin$difMin
- MCAo.fin))) - t
fin <- which(abs(data$Fin$difMin - MCAo.fin) == min(abs(data$Fin$difMin
- MCAo.fin))) + t + 1
```

```
resu <- data$Fin[ini:fin,]
return(resu)

}

# FUNCION PARA EXPORTAR LOS DATOS EN BRUTO PROCESADOS Y DIVIDIDOS
# exportTB : Exporta datos procesados y divididos =====
exportTB <- function(db, name) {
name <- paste(name, ".txt", sep = "")
direc <- paste(getwd(), "/result/", sep = "")
resi <- db[[2]]
resi <- resi[0,]

for(i in 2:9){
temp <- db[[i]]
type <- rep(names(db)[i], nrow(temp))
temp <- cbind(type, temp)
resi <- rbind(resi, temp)
}

write.table(x = resi, file = paste(direc, name, sep = ""),
col.names = TRUE, row.names = FALSE,
sep = "\t")

}

# funAnaVas
# Lista de funciones para importar, ordenar, seleccionar y graficar
# los datos generados por el script en ImageJ, que mide el diametro
# de los vasos, de imagenes obtenidas por el microscopio de dos fotones
# a traves de la ventana intracraneal en vasos marcados con FITC-
# asociado
# a dextran
# @autor: Alfredo Cardenas-Rivera
# @date: 15-Oct-2018
# @Version: V.1.0

# constante <- 0.3542 # (medida en micrometros de un pixel)
# suave <- 5
# Funcion para generar graficos
=====
# LINEPLOT()
=====
lineplot <- function(vas.1, suave, constante, filOut){
n <- length(vas.1$Slice[vas.1$Slice == "1"])
tmp <- paste("C", 1:n, sep = "-")
colores <- c(rgb(232/255,213/255,183/255,alpha = 1),
rgb(249/255,178/255,72/255,alpha = 1),
rgb(252/255,58/255,82/255,alpha = 1),
rgb(55/255,33/255,84/255,alpha = 1),
rgb(14/255,36/255,49/255,alpha = 1))
lineas <- 1:6
colores <- rep(colores, length.out = n)
```

```
lineas <- rep(lineas, length.out = n)

vas.1.edit <- data.frame(sec = rep(tmp, length.out = nrow(vas.1)),
tiempo = (vas.1$Slice*180)/1000,
value = (vas.1$X.Area/2.5)*constante
)
plot(0,
xlim = range(vas.1.edit$tiempo),
ylim = c(-3,3),
type = "n",
xlab = "Time (second)",
ylab = "Diameter (normalized)",
main = "Vessel dynamic",
las = 1)
for(i in 1:length(tmp)){
DBtmp <- data.frame(x = vas.1.edit$tiempo[vas.1.edit$sec==tmp[i]],
y = vas.1.edit$value[vas.1.edit$sec==tmp[i]])
scalaTemp <- mean(DBtmp$y[1:filOut])
DBtmp$y <- scale(DBtmp$y, center = scalaTemp)
for( j in (suave+1):(nrow(DBtmp)-suave-1)){
DBtmp$y[j] <- mean(DBtmp$y[(j-suave):(j+suave)])
}
lines(x = DBtmp$x,
y = DBtmp$y,
col = colores[i],
lty = lineas[i])
}

plot(0,
xlim = range(vas.1.edit$tiempo),
ylim = c(0,max(vas.1.edit$value)),
type = "n",
xlab = "Time (second)",
ylab = "Diameter (micrometer)",
main = "Vessel dynamic",
las = 1)
for( i in 1:length(tmp)){
DBtmp <- data.frame(x = vas.1.edit$tiempo[vas.1.edit$sec==tmp[i]],
y = vas.1.edit$value[vas.1.edit$sec==tmp[i]])
for( j in (suave+1):(nrow(DBtmp)-suave-1)){
DBtmp$y[j] <- mean(DBtmp$y[(j-suave):(j+suave)])
}
lines(x = DBtmp$x,
y = DBtmp$y,
col = colores[i])

}

}

# EXAMINA()
=====
```



```
examina <- function(vas, suave, constante, filOut){
nCort <- length(vas$Slice[vas$Slice == "1"]) #numero de cortes por
ese vaso
tmp <- paste("C", 1:nCort, sep = ".")
colores <- c(rgb(232/255,213/255,183/255,alpha = 1),
rgb(249/255,178/255,72/255,alpha = 1),
rgb(252/255,58/255,82/255,alpha = 1),
rgb(55/255,33/255,84/255,alpha = 1),
rgb(14/255,36/255,49/255,alpha = 1))
lineas <- 1:6
colores <- rep(colores, length.out = nCort)
lineas <- rep(lineas, length.out = nCort)

if (("X.Area" %in% (colnames(vas))) == TRUE){
vas.edit <- data.frame(sec = rep(tmp, length.out = nrow(vas)),
tiempo = (vas$Slice*180)/1000,
value = (vas$X.Area/2.5)*constante
)
} else {
vas.edit <- data.frame(sec = rep(tmp, length.out = nrow(vas)),
tiempo = (vas$Slice*180)/1000,
value = (vas$Area/2.5)*constante
)
}

tmpDB <- subset(x = vas.edit,
subset = sec == "C.1")
names(tmpDB)[3] <- "C.1"
for ( i in 2:length(tmp)) {
tmpDB <- cbind(tmpDB, vas.edit$value[vas.edit$sec == tmp[i]])
names(tmpDB)[(i+2)] <- tmp[i]
}
valMax <- max(tmpDB[,3:(3+length(nCort))])
valMin <- min(tmpDB[,3:(3+length(nCort))])

# Para datos SIN escalar
DBsuave <- tmpDB
for(i in 3:ncol(tmpDB)){
for( j in (suave+1):(nrow(tmpDB)-suave-1)){
DBsuave[j,i] <- mean(tmpDB[(j-suave):(j+suave),i])
}
}

par(mfrow = c(3,4))
for(i in 3:ncol(DBsuave)){
plot(0,
xlim = range(DBsuave$tiempo),
ylim = c(0,max(as.vector(DBsuave[,3:ncol(DBsuave)]))),
type = "n",
xlab = "Time (second)",
ylab = "Diameter (micrometer)",
main = colnames(DBsuave)[i],
las = 1)
lines(x = DBsuave$tiempo,
```

```
y = DBsuave[,i],
col = colores[i-2],
lty = lineas[i-2])
}
return(list(dato.bruto = tmpDB,
DBsuave = DBsuave))

}

selectVaso <- function(DB, select, filOut, limit){
select <- select+2
if ( limit != "all"){
pl <- which(abs(limit-DB$dato.bruto$tiempo)==min(abs(limit-
DB$dato.bruto$tiempo)))
DB$dato.bruto <- DB$dato.bruto[1:pl,]
DB$DBsuave <- DB$DBsuave[1:pl,]
}

DB$dato.bruto <- DB$dato.bruto[,c(1,2,select)]
DB$DBsuave <- DB$DBsuave[,c(1,2,select)]

DB$dato.bruto <- cbind(DB$dato.bruto,
PROM = rowMeans(DB$dato.bruto[,3:(length(select)+2)]))
DB$DBsuave <- cbind(DB$DBsuave,
PROM = rowMeans(DB$DBsuave[,3:(length(select)+2)]))
# Escalando los datos
av1 <- which.min(abs(DB$dato.bruto$tiempo - filOut))
scaleMedia <- mean(DB$dato.bruto$PROM[(av1-30):(av1+30)])
DB$dato.bruto <- cbind(DB$dato.bruto,
escalado = scale(x = DB$dato.bruto$PROM,center = scaleMedia)
)
scaleMedia <- mean(DB$DBsuave$PROM[1:filOut])
DB$DBsuave <- cbind(DB$DBsuave,
escalado = scale(x = DB$DBsuave$PROM,center = scaleMedia)
)

par(mfrow = c(2,2))
plot(0,
type = "l",
ylim = c(0, max(DB$dato.bruto$PROM)),
xlim = c(20,max(DB$dato.bruto$tiempo)),
col = "gray60",
ylab = "Diameter (micrometer)",
xlab = "Time (second)",
main = "Original data")
grid()
lines(x = DB$dato.bruto$tiempo,
y = DB$dato.bruto$PROM,
col = "gray60")

plot(0,
type = "l",
```

```
ylim = c(0, max(DB$DBsuave$PROM)),
xlim = c(20,max(DB$DBsuave$tiempo)),
col = "gray60",
ylab = "Diameter (micrometer)",
xlab = "Time (second)",
main = "Smooth data")
grid()
lines(x = DB$DBsuave$tiempo,
y = DB$DBsuave$PROM,
col = "gray60")

plot(0,
type = "l",
ylim = c(-3.5,3.5),
xlim = c(0,max(DB$dato.bruto$tiempo)),
col = "gray60",
ylab = "Diameter (micrometer)",
xlab = "Time (second)",
main = "Escalado dato bruto")
grid()
lines(x = DB$dato.bruto$tiempo,
y = DB$dato.bruto$escalado,
col = "gray60")
abline(h = 0,lty = 2)

plot(0,
type = "l",
ylim = c(-3.5,3.5),
xlim = c(0,max(DB$dato.bruto$tiempo)),
col = "gray60",
ylab = "Diameter (micrometer)",
xlab = "Time (second)",
main = "Escalado smooth data")
grid()
lines(x = DB$DBsuave$tiempo,
y = DB$DBsuave$escalado,
col = "gray60")
abline(h = 0,lty = 2)
return(DB)

}

line2vas <- function(listDB, type, escalado, filOut){
nombres <- names(listDB)
n1 <- length(nombres) # Numero de vasos en la
lista

DB1 <- data.frame(tiempo = listDB[[1]]$dato.bruto$tiempo)
for( i in 1:n1){
n2 <- length(names(listDB[[i]][[1]])) # definimos en numero de
columnas para el vaso "i"
# definimos las columnas a tomar
if(type == "Original" & escalado == FALSE){
```

```
p1 <- 1
p2 <- n2-1
texto1 <- "ORIGINAL DATA"
texto2 <- "Diameter (micrometer)"
} else if(type == "Original" & escalado == TRUE){
p1 <- 1
p2 <- n2
texto1 <- "ORIGINAL DATA"
texto2 <- "Diameter (normalized)"
} else if(type == "Smooth" & escalado == FALSE){
p1 <- 2
p2 <- n2-1
texto1 <- "SMOOTH DATA"
texto2 <- "Diameter (micrometer)"
} else if(type == "Smooth" & escalado == TRUE){
p1 <- 2
p2 <- n2
texto1 <- "SMOOTH DATA"
texto2 <- "Diameter (normalized)"
} else{
cat("Type of data didn't specify, them Original_data was taken as
default.")
p1 <- 1
p2 <- n2-1
texto1 <- "ORIGINAL DATA"
texto2 <- "Diameter (micrometer)"
}
DB1 <- cbind(DB1,
nuevo = listDB[[i]][[p1]][,p2])
names(DB1)[i+1] <- nombres[i]

}

par(mfrow = c(4,2),
mar = c(2,4,2,0))

for(i in 2:ncol(DB1)){
if (escalado == FALSE){
limiteY <- c(0, 30)
} else if(escalado == TRUE){
limiteY <- c(-3,3)
}
plot(0,
type = "l",
ylim = limiteY,
xlim = c(20,max(DB1$tiempo)),
col = "gray60",
ylab = texto2,
xlab = "Time (second)",
main = nombres[i-1])
grid()
mtext(side = 3,
adj = 1,
```

```
text = textol,
cex = 0.5)
lines(x = DB1$tiempo,
y = DB1[,i]
)
abline(v = DB1$tiempo[which.min(abs(DB1$tiempo - filOut))],
col = "red",
lty = 3)
}
return(DB1)
}

# SUAVE2() funcion
=====
# esta fucion sirve para alisar las curvas de los datos de signal,
# tiene dos variables:
# x = vector numerico de las lecturas
# y = punto de tiempo donde se tomo cada valor
# el parametro de "orden" determina el orden del poligono al cual se va
a ajustar
# la curva
suave2 <- function(val,time,orden){
  model <- lm(val ~ poly(time,orden))
  tmp <- predict(model,
data.frame(x = time),
interval = 'confidence',
level = 0.99)
DB1 <- cbind(id = time,
tmp)
return(DB1)
}

# mediaBYvas()
=====
# esta funcion sirve para sacar los valores promedios de un rango de
vasos
# de las listas generadas
# tiene 3 parametros
# + listDB = lista con los vasos (datos brutos y escalados por cada
vaso)
# + rango = tipo vector numerico, de dos numeros, desde donde a
donde se tomaran los datos
# + redondeo = redondeado a cuantos decimales
mediaBYvas <- function(listDB, rango, redondeo){
  tmp <- data.frame(vaso = character(),
media = numeric())
for ( i in 1:length(listDB)){
p1 <- names(listDB)[i]
```

```
p2 <- round(mean(listDB[[i]]$dato.bruto$PROM[rango]),redondeo)
p3 <- data.frame(vaso = p1,
media = p2)
tmp <- rbind(tmp,p3)
}
names(tmp) <- c("vaso", "media")
return(tmp)
}

# calMedias() =====
# calcula el valor medio de un data frame, se especifica los limites
# iniciales
# y finales de la serie de datos a tomar.
# Parametros
# - DB1 = data.frame con la primera columna de tiempo en segundos
# - time = vector numerico, con dos numeros, inicio y fin de los
# datos a muestrear
# en segundos. Acepta valores negativos.
calMedias <- function(DB1, time){
p1 <- time[1]
p2 <- time[2]
nVas <- ncol(DB1) - 1
rNames <- colnames(DB1)
resu <- data.frame(media = colMeans(DB1[p1:p2,-1]),
upper = colMeans(DB1[p1:p2,-1]) + 2*apply(DB1[p1:p2,-1], 2, sd),
lower = colMeans(DB1[p1:p2,-1]) + 2*apply(DB1[p1:p2,-1], 2, sd)
)
return(resu)
}
```

### ***Anexo X: Comparación de la dinámica del diámetro vascular de los ensayos de microscopia intravital***

```
# COMPARACION DE DIAMETROS DE VASOS DE RATON INFARTADO Y NO INFARTADO
# tomo los registros de los vasos procesados con las funciones de
"funAnaVas",
# generados de los archivos del script de ImageJ VasoQuanti
(C:\Users\acard\CloudStation\Neuroinflammation\Microscopia\scr)
# Ahora generaremos las graficas en dos columnas, no infartadas
(22Feb2018)
# a la izquierda y la si infartadas (02Feb2018) a la derecha, de tres
vasos
# con diametro menor a 10 micrometros y 3 con diametros > 10
micrometros.
# Usare el indicador p1 para usar los datos en bruto o los suavizados,
# ya que la linea de tendencia generada a partir de los datos en bruto
# no sale tan bien.
# @autor: Alfredo Cardenas-Rivera
# @date: 3-Apr-2019
# @version: 2.0

# ejecutando las funciones
source(file = paste(getwd(),"funAnaVas.R", sep = "\scr/function/"))
source(file = paste(getwd(),"Fun_10secAround.R", sep =
"\scr/function/"))
# especificando colores
colores <- c(rgb(232/255,213/255,183/255,alpha = 1),
rgb(249/255,178/255,72/255,alpha = 1),
rgb(252/255,58/255,82/255,alpha = 1),
rgb(55/255,33/255,84/255,alpha = 1),
rgb(14/255,36/255,49/255,alpha = 1),
rgb(36/255,68/255,93/255,alpha = 1))

# Cargando bases de datos de los vasos
tmp11 <- list.files(path = paste(getwd(), "AnalisisDeVasos/", sep =
"\scr/"))
pb <- txtProgressBar(min = 0, max = length(tmp11), initial = 0)
for (i in 1:length(tmp11)){
source(file = paste(getwd(),tmp11[i], sep = "\scr/AnalisisDeVasos/"))
setTxtProgressBar(pb, i)
}
rm(tmp11,i, pb)
# Primero examinamos los vasos procesados con la funcion line2vas
line2vas(listDB = list_04Oct2018,type = "Original",escalado =
FALSE,filOut = 100)
line2vas(listDB = list_09Feb2018,type = "Original",escalado =
FALSE,filOut = 60)
line2vas(listDB = list_16Mar2018,type = "Original",escalado =
FALSE,filOut = 90)
line2vas(listDB = list_17Nov2017,type = "Original",escalado =
FALSE,filOut = 78)
line2vas(listDB = list_20Sep2018,type = "Original",escalado =
FALSE,filOut = 70)
```

```
line2vas(listDB = list_22Feb2018,type = "Original",escalado =
FALSE,filOut = 110)
# analizamos los valores medios por cada una de las listas
mediaBYvas(listDB = list_04Oct2018,rango = c(350:500) ,redondeo = 2)
mediaBYvas(listDB = list_09Feb2018,rango = c(350:500) ,redondeo = 2)
mediaBYvas(listDB = list_09Feb2018,rango = c(100:300) ,redondeo = 2)
mediaBYvas(listDB = list_22Feb2018,rango = c(100:300) ,redondeo = 2)
# para poderlos comparar todos haremos una tabla y luego la ordenaremos
por
# tamaño
mediaDB <- rbind(cbind(date = "04Oct2018",mediaBYvas(listDB =
list_04Oct2018,rango = c(350:550) ,redondeo = 2)),
cbind(date = "09Feb2018",mediaBYvas(listDB = list_09Feb2018,rango =
c(100:330) ,redondeo = 2)),
cbind(date = "16Mar2018",mediaBYvas(listDB = list_16Mar2018,rango =
c(300:500) ,redondeo = 2)),
cbind(date = "17Nov2017",mediaBYvas(listDB = list_17Nov2017,rango =
c(220:420) ,redondeo = 2)),
cbind(date = "20Sep2018",mediaBYvas(listDB = list_20Sep2018,rango =
c(180:380) ,redondeo = 2)),
cbind(date = "22Feb2018",mediaBYvas(listDB = list_22Feb2018,rango =
c(410:610) ,redondeo = 2)))
mediaDB2 <- rbind(cbind(date = "04Oct2018",mediaBYvas(listDB =
list_04Oct2018,rango = c(600:800) ,redondeo = 2)),
cbind(date = "09Feb2018",mediaBYvas(listDB = list_09Feb2018,rango =
c(430:550) ,redondeo = 2)),
cbind(date = "16Mar2018",mediaBYvas(listDB = list_16Mar2018,rango =
c(550:750) ,redondeo = 2)),
cbind(date = "17Nov2017",mediaBYvas(listDB = list_17Nov2017,rango =
c(470:621) ,redondeo = 2)),
cbind(date = "20Sep2018",mediaBYvas(listDB = list_20Sep2018,rango =
c(430:630) ,redondeo = 2)),
cbind(date = "22Feb2018",mediaBYvas(listDB = list_22Feb2018,rango =
c(710:910) ,redondeo = 2)))
mediaDB <- cbind(mediaDB, after = mediaDB2$media)
colnames(mediaDB) <- c("date", "vaso", "before", "after")
mediaDB$dif <- mediaDB$after - mediaDB$before
mediaDB$dif.escal <- mediaDB$dif/mediaDB$before
mediaDB$sen.45 <- mediaDB$dif*0.7071 # pendiente de la recta de 45°
mediaDB$sen.45.escal <- mediaDB$dif.escal*0.7071 # pendiente de la
recta de 45°
mediaDB <- mediaDB[which(mediaDB$dif.escal != Inf),]
fac <- character(length = nrow(mediaDB))
for(i in 1:nrow(mediaDB)){
if(mediaDB$dif[i] > 0){
fac[i] <- "UP"
} else {
fac[i] <- "DOWN"
}
}
}
mediaDB <- cbind(mediaDB, fac)
plot(x = mediaDB$before,
y = mediaDB$after,
ylim = c(0,20),
```



```
xlim = c(0,20))
points(x = mediaDB$before[mediaDB$date == "09Feb2018"], y =
mediaDB$after[mediaDB$date == "09Feb2018"], col = "purple", pch = 13)
points(x = mediaDB$before[mediaDB$date == "22Feb2018"], y =
mediaDB$after[mediaDB$date == "22Feb2018"], col = "orange", pch = 11)
# angulo de linea de tendencia de control
+++++
control <- subset(x = mediaDB,
subset = date == "22Feb2018" & dif.escal < 0.5 & dif.escal > -0.5)
fit <- lm(control$after~control$before)
summary(fit)
# a <- (3*seq(1,10,0.1))
# b <- (4*(seq(1,10,0.1)))
# fit <- lm(a~b)
angulo <- fit$coefficients[2]
angulo <- atan(angulo)*180/pi
#
+++++
++

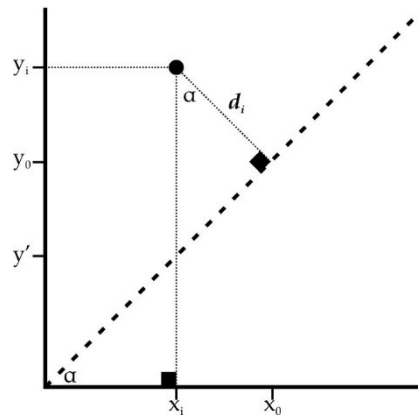
mediaDB.sele <- subset(x = mediaDB,
subset = (date == "09Feb2018" | date == "22Feb2018") & dif.escal != Inf
& dif.escal < 0.5 & dif.escal > -0.5 )
mediaDB.sele$date <- droplevels(mediaDB.sele$date)
mediaDB.sele$sen.45.sq <- (mediaDB.sele$sen.45)^2
mediaDB.sele$sen.45.root <- (mediaDB.sele$sen.45.sq)^(1/2)
mediaDB.sele$dif.escal.abs <- abs(mediaDB.sele$dif.escal)
mediaDB.sele$d <- cos(angulo*pi/180) * (mediaDB.sele$after -
(mediaDB.sele$before * tan(angulo*pi/180)))
mediaDB.sele$d.escal <- mediaDB.sele$d/mediaDB.sele$before
myData <- aggregate(mediaDB.sele$sen.45.root,
by = list(date = mediaDB.sele$date, fac = mediaDB.sele$fac),
FUN = function(x) c(mean = mean(x), sd = sd(x),
n = length(x)))
myData <- aggregate(mediaDB.sele$dif.escal.abs,
by = list(date = mediaDB.sele$date, fac = mediaDB.sele$fac),
FUN = function(x) c(mean = mean(x), sd = sd(x), n = length(x)))
myData <- aggregate(mediaDB.sele$d.escal,
by = list(date = mediaDB.sele$date, fac = mediaDB.sele$fac),
FUN = function(x) c(mean = mean(x), sd = sd(x), n = length(x)))
myData <- do.call(data.frame, myData)
myData$se <- myData$x.sd / sqrt(myData$x.n)

colnames(myData) <- c("date", "fac", "mean", "sd", "n", "se")
pdf(file = paste(getwd(), "vasodinamic.pdf", sep = "/graphic/"),
paper = "USr")
barCenters <- barplot(height = myData$mean,
names.arg = paste0(myData$date,myData$fac),
beside = TRUE,
las = 2,
ylim = c(-0.3,0.25),
cex.names = 0.75,
xaxt = "n",
main = "Vasondinamic",
```

```
ylab = "|(before-after)|",
border = "black", axes = TRUE)

# Specify the groupings. We use srt = 45 for a
# 45 degree string rotation
text(x = barCenters, y = par("usr")[3], srt = 45,
adj = 1, labels = paste0(myData$date,myData$fac), xpd = TRUE)
segments(barCenters, myData$mean - myData$se * 2, barCenters,
myData$mean + myData$se * 2, lwd = 1.5)
arrows(barCenters, myData$mean - myData$se * 2, barCenters,
myData$mean + myData$se * 2, lwd = 1.5, angle = 90,
code = 3, length = 0.05)
stripchart(mediaDB.sele$d.escal~mediaDB.sele$date+mediaDB.sele$fac,
add = TRUE, pch = 16, method = "jitter", vertical = TRUE)
dev.off()
# Pruebas de normalidad de la muestra
shapiro.test(unlist(subset(x = mediaDB.sele, subset = date ==
"22Feb2018" & fac == "UP", select = d.escal))) # p>0.05 entonces se
acepta normalidad
shapiro.test(unlist(subset(x = mediaDB.sele, subset = date ==
"22Feb2018" & fac == "DOWN", select = d.escal))) # p>0.05 entonces se
acepta normalidad
shapiro.test(unlist(subset(x = mediaDB.sele, subset = date ==
"09Feb2018" & fac == "UP", select = d.escal))) # p>0.05 entonces se
acepta normalidad
shapiro.test(unlist(subset(x = mediaDB.sele, subset = date ==
"09Feb2018" & fac == "DOWN", select = d.escal))) # p>0.05 entonces se
acepta normalidad
tapply(mediaDB.sele$sen.45.root, mediaDB.sele$date, mean)
t.test((mediaDB.sele$d.escal[mediaDB.sele$fac ==
"UP"])~(mediaDB.sele$date[mediaDB.sele$fac == "UP"]))
t.test((mediaDB.sele$d.escal[mediaDB.sele$fac ==
"DOWN"])~(mediaDB.sele$date[mediaDB.sele$fac == "DOWN"]))
```

**Anexo XI: Cálculo de la distancia del punto a la línea de tendencia**



$$z_i = \cos \alpha (y_i - y') \quad (1)$$

$$\text{Si } y' = \tan \alpha (x_i) \quad (2)$$

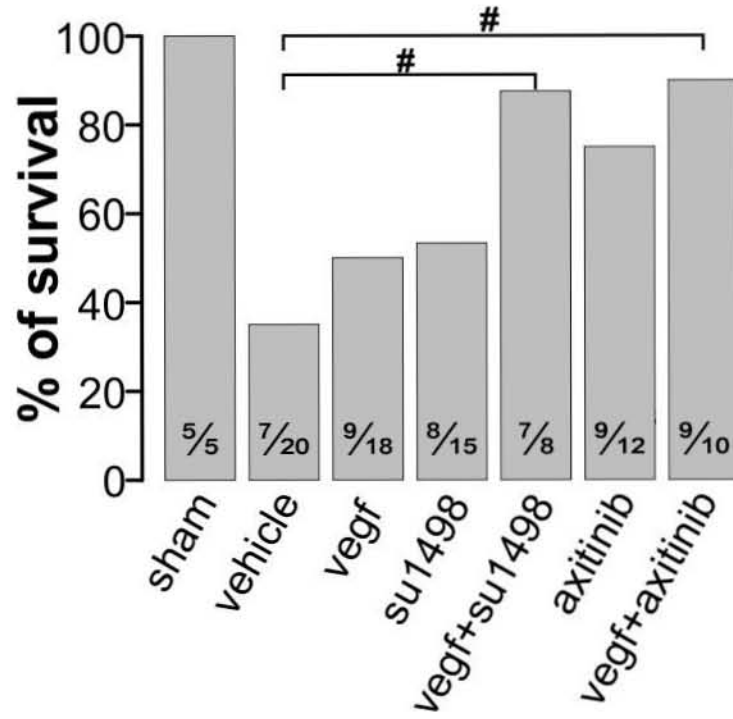
Entonces reemplazando (2) en (1):

$$z_i = \cos \alpha (y_i - \tan \alpha (x_i))$$

Donde:

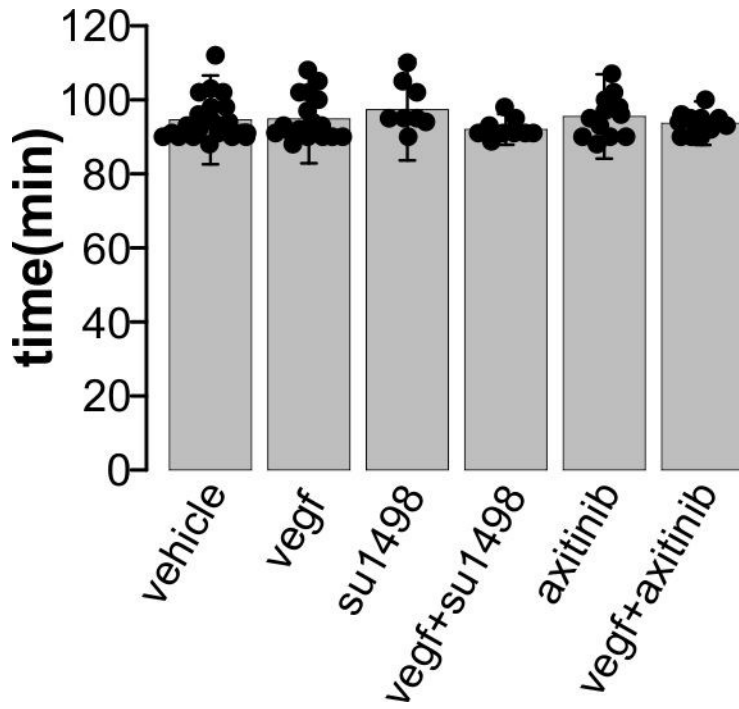
- $z_i$  = la distancia del punto definido por  $(x_i, y_i)$  a un punto en la línea de tendencia definido por  $(x_0, y_0)$ .
- $x_i$  = es el diámetro del vaso  $i$  durante la oclusión.
- $y_i$  = es el diámetro del vaso  $i$  durante la reperusión.
- $\alpha$  = es el ángulo de la línea de tendencia, calculado a partir del arco tangente de la pendiente de la regresión lineal de la correlación del diámetro de los vasos en el experimento control.

Anexo XII: Supervivencia a las 24 horas

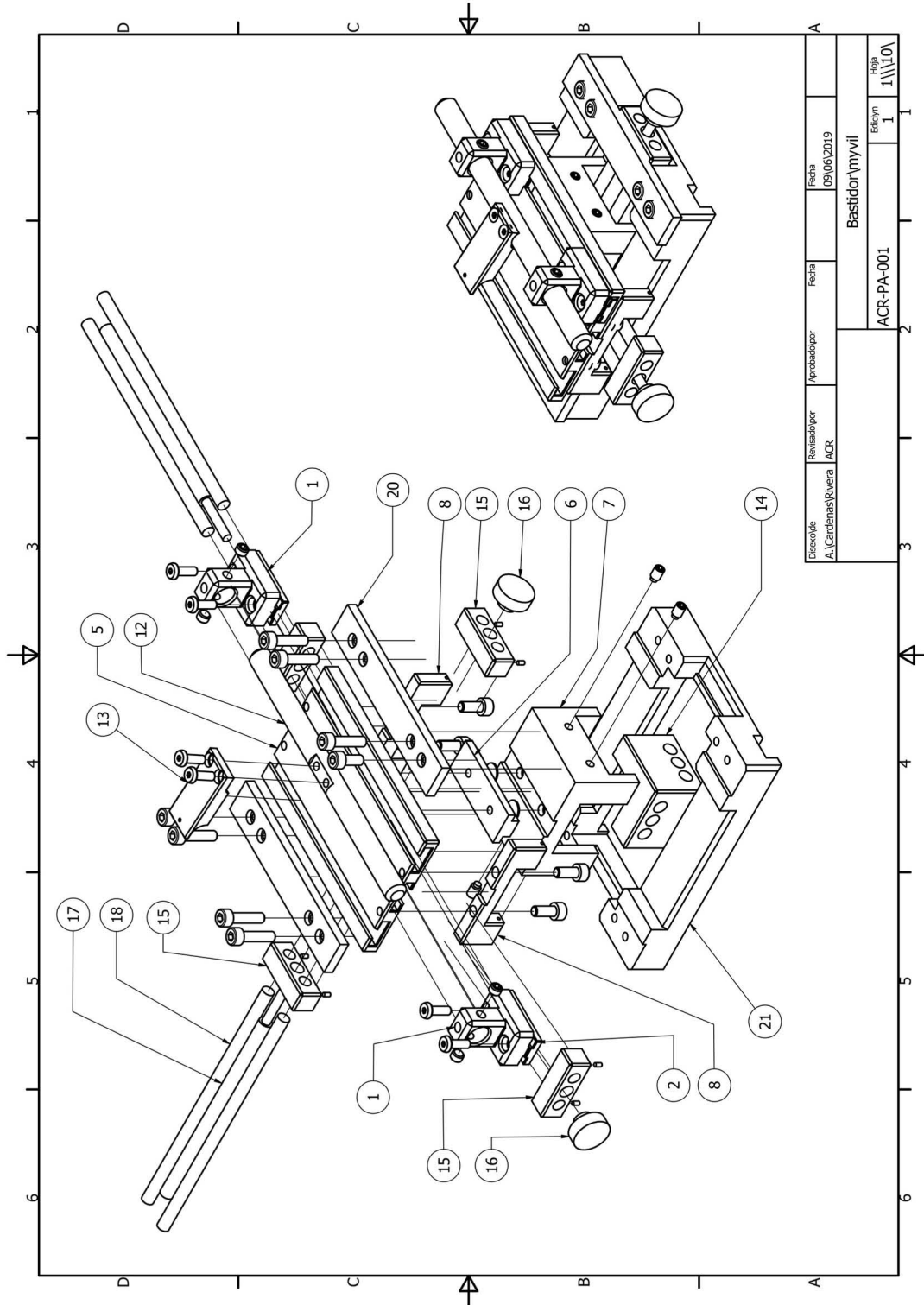


**Anexo XIII: Tiempo de oclusión de la arteria cerebral media**

Comparación de los tiempos de oclusión de la arteria cerebral media entre los diferentes grupos de tratamiento.

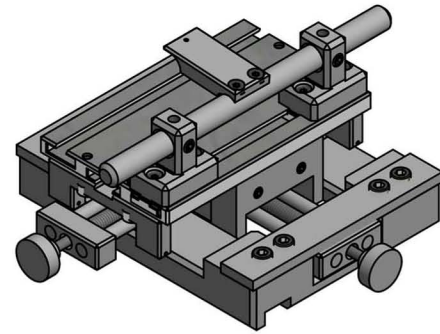


**Anexo XIV: Bastidor móvil acoplable al microscopio de dos fotones para técnica de microscopia intra vital por ventana intracraneal.**

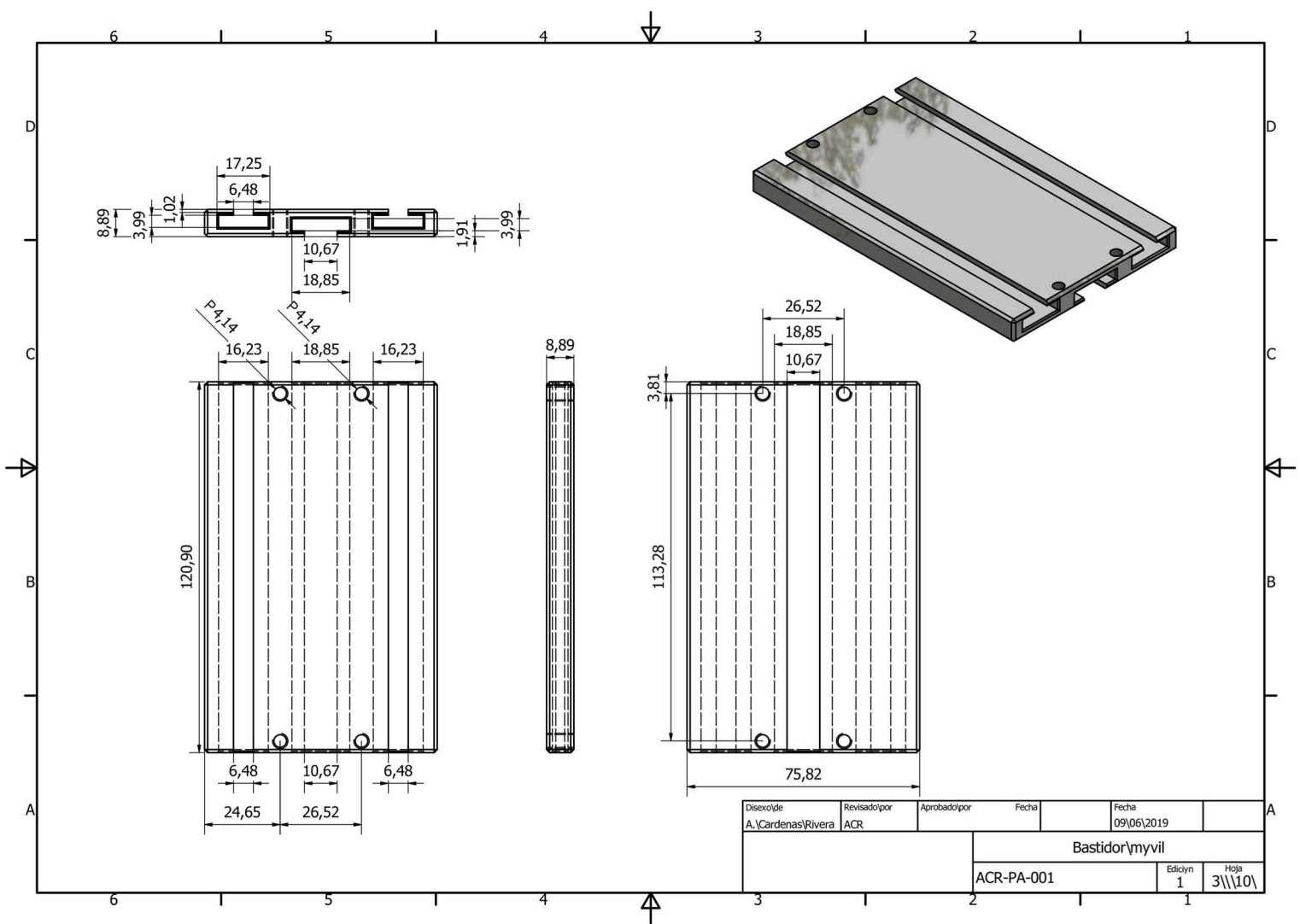


Desarrollado	Revisado por	Aprobado por	Fecha
A. Cardenas/Rivera	ACR		09/06/2019
ACR-PA-001			Edición
			1
Bastidor móvil			Hoja
			1/10

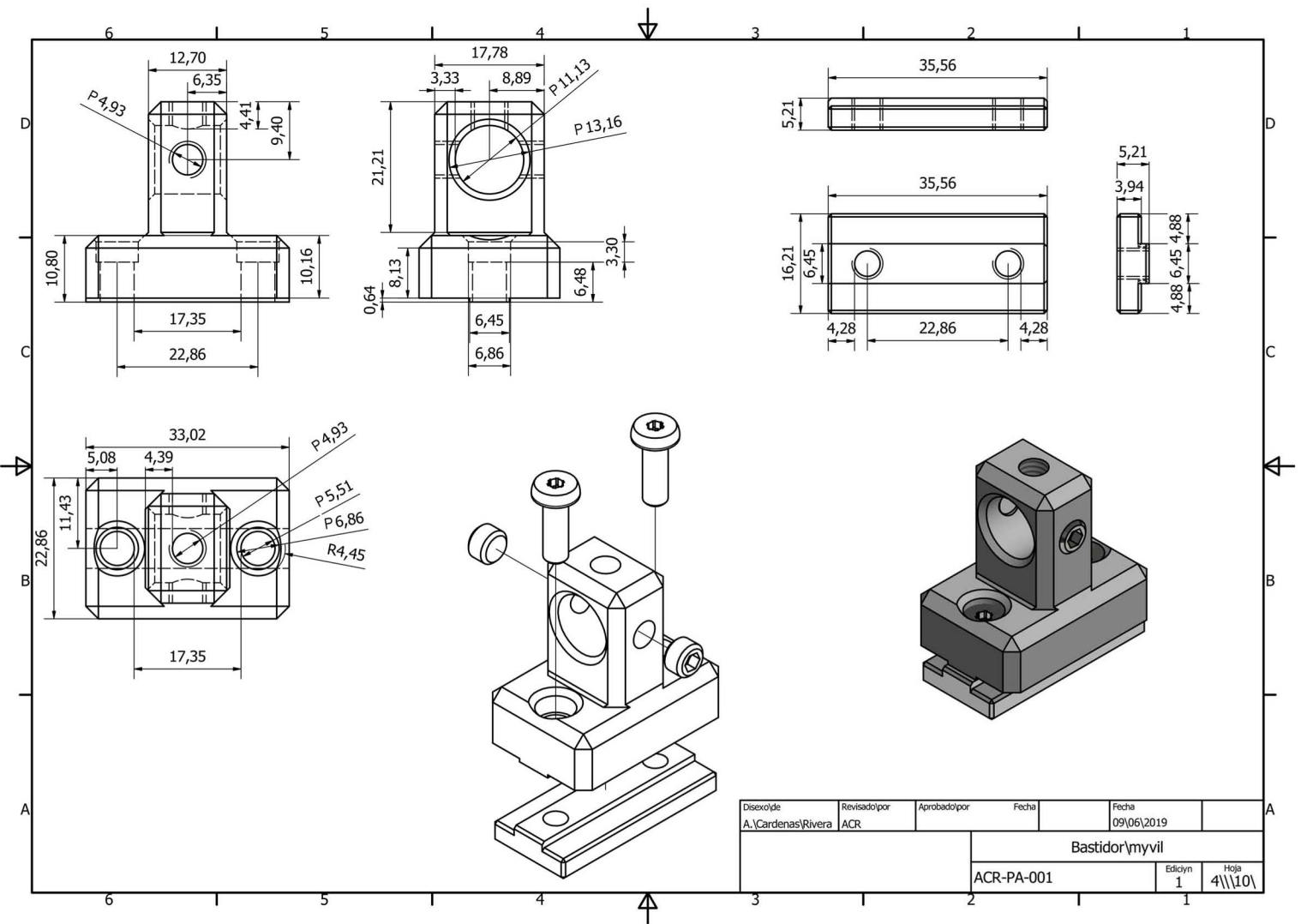
LISTA DE PIEZAS			
ELEMENTO	CTDAD	NOMBRE PIEZA	DESCRIPCIÓN
1	2	Poste	Poste para la barra de sujeción
2	2	Seguro_Poste	Acople del poste para ser sujetado a la mesa
3	6	ANSI B18.3-18-32 UNC-10.5	Tornillo de cabeza cilíndrica con hueco hexagonal
4	4	ANSI B18.3.6M-16x1x1/4	Tornillo sin cabeza con hueco hexagonal forjado y punta plana
5	1	mesa_plancha	Plancha con rieles paralelos
6	1	Union_plancha_mesas	Pieza de unión entre la plancha y la mesa
7	1	Acople_Plancha_Estero	
8	2	PlanchaExtremos	Adaptadores laterales de la plancha
9	2	ASME ANSI B18.3.5M-1/2 M5x14(2)	Tornillos de cabeza plana avellanada con hueco hexagonal escariado y mprico
10	4	ANSI B18.3.6M-15x0.8x1/8	Tornillo sin cabeza con hueco hexagonal forjado y extremo con pivote medio y mprico
11	6	ANSI B18.3.1M-15x0.8x1/2	Tornillo brochado de cabeza hueca y mprico
12	1	Parante_horizontal	Eje para sujeción de la cabeza
13	1	Adaptdor_FixHead	Adaptor del fixhead y el eje de sujeción
14	1	cruz_estereo	Adaptador de las guías de movimiento a la mesa
15	4	separador_de_guias	Separador de guías de movimiento de la plancha
16	2	Cabeza_tornillo	Cabeza de tornillo para las guías de movimiento
17	2	tornillo_central	Tornillo con hilo de cuerda doble
18	4	guia_1	Varilla de acero para restringir movimiento
19	8	ANSI B18.3.6M-12x0.4x1/4	Tornillo sin cabeza con hueco hexagonal forjado y punta abombada y mprico
20	2	Sujetador_base	Sujetadores del adaptador de la base del microscopio
21	1	Acople_microscopio	Adaptador de la base del microscopio
22	6	ANSI B18.3.1M-15x0.8x1/20	Tornillo brochado de cabeza hueca y mprico

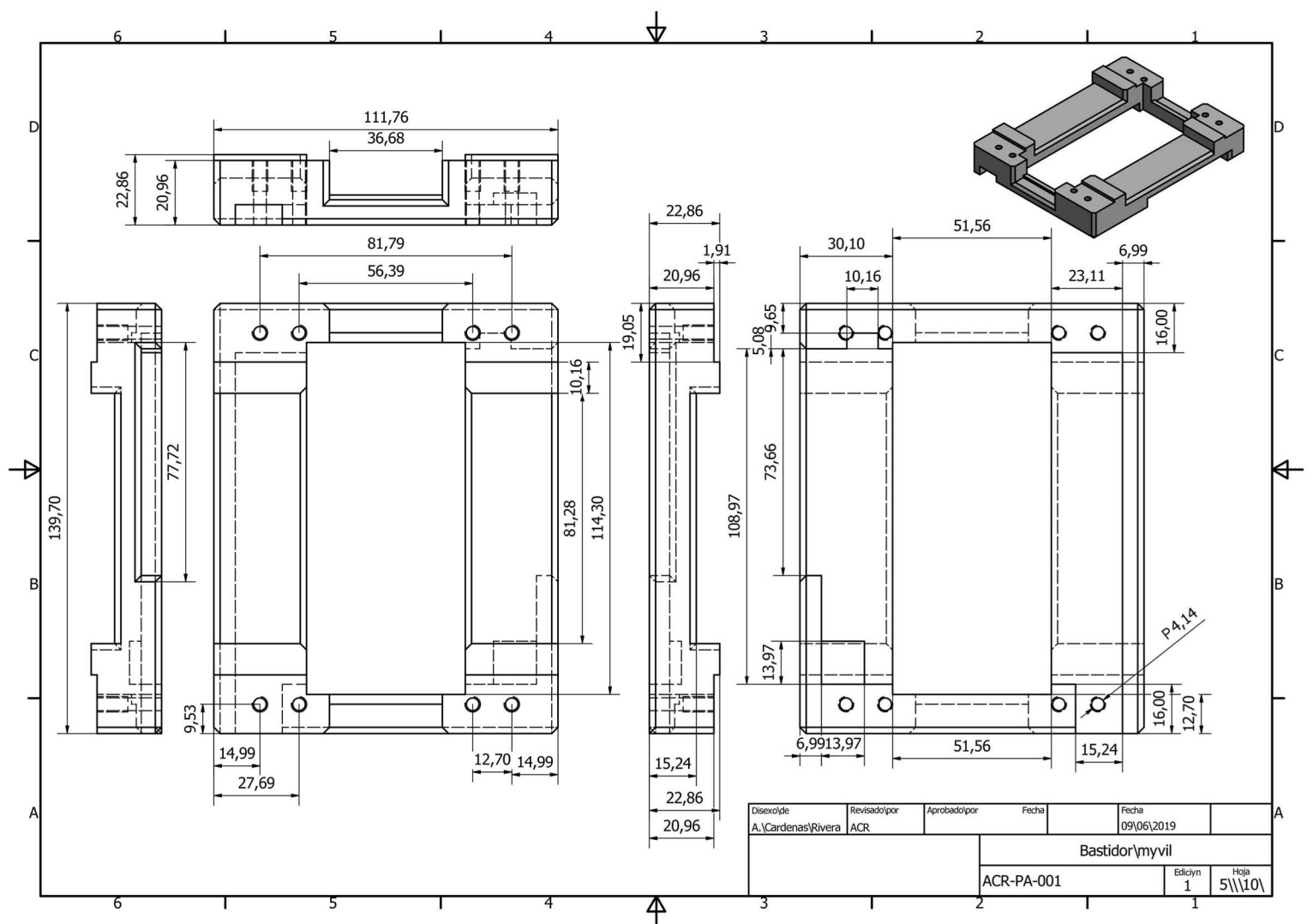


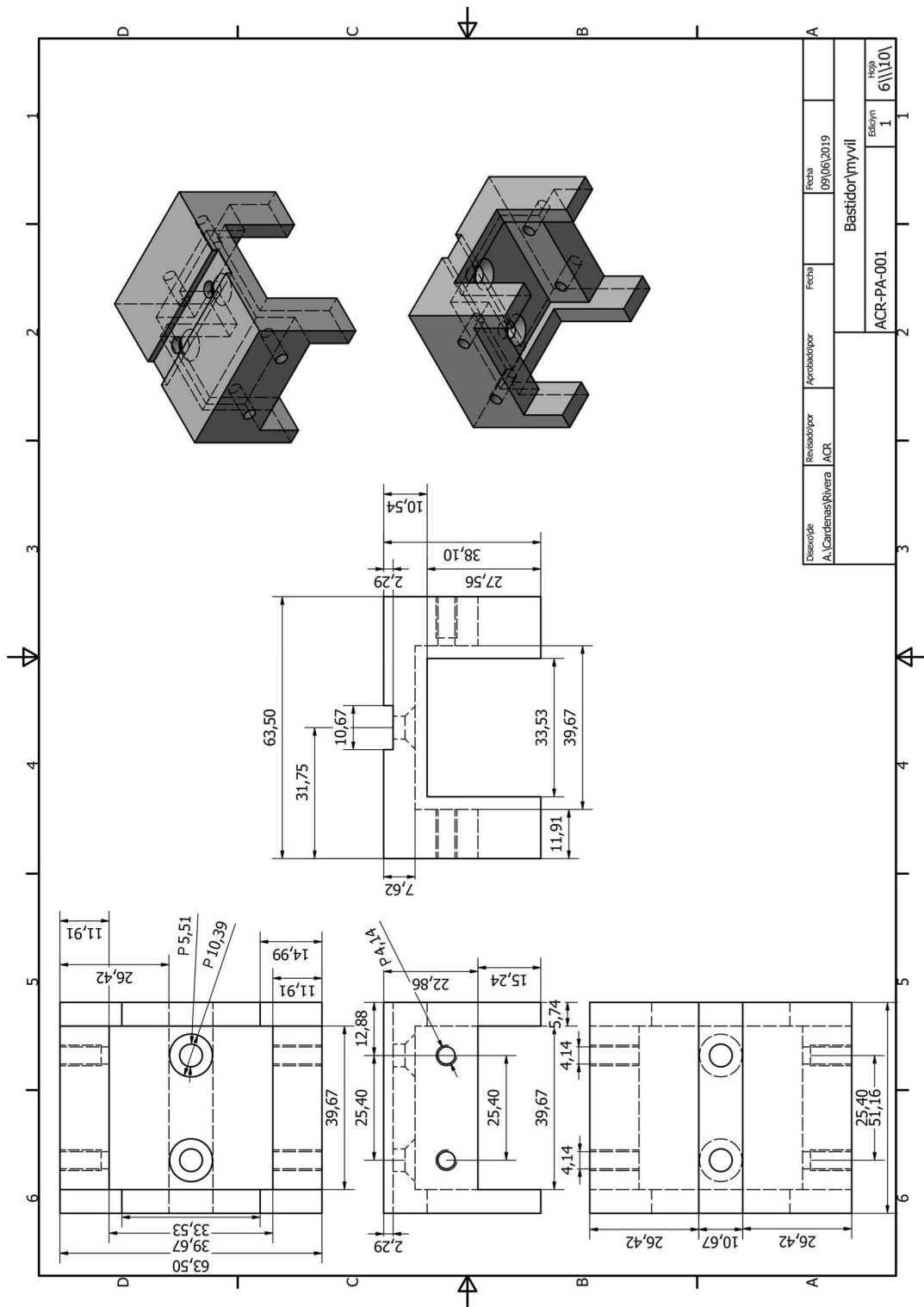
Diseno de A. Cardenas/Rivera	Revisado por ACR	Aprobado por	Fecha	Fecha 09/06/2019
			Bastidor myvil	
			ACR-PA-001	Edición 1
			Hoja 2	2010



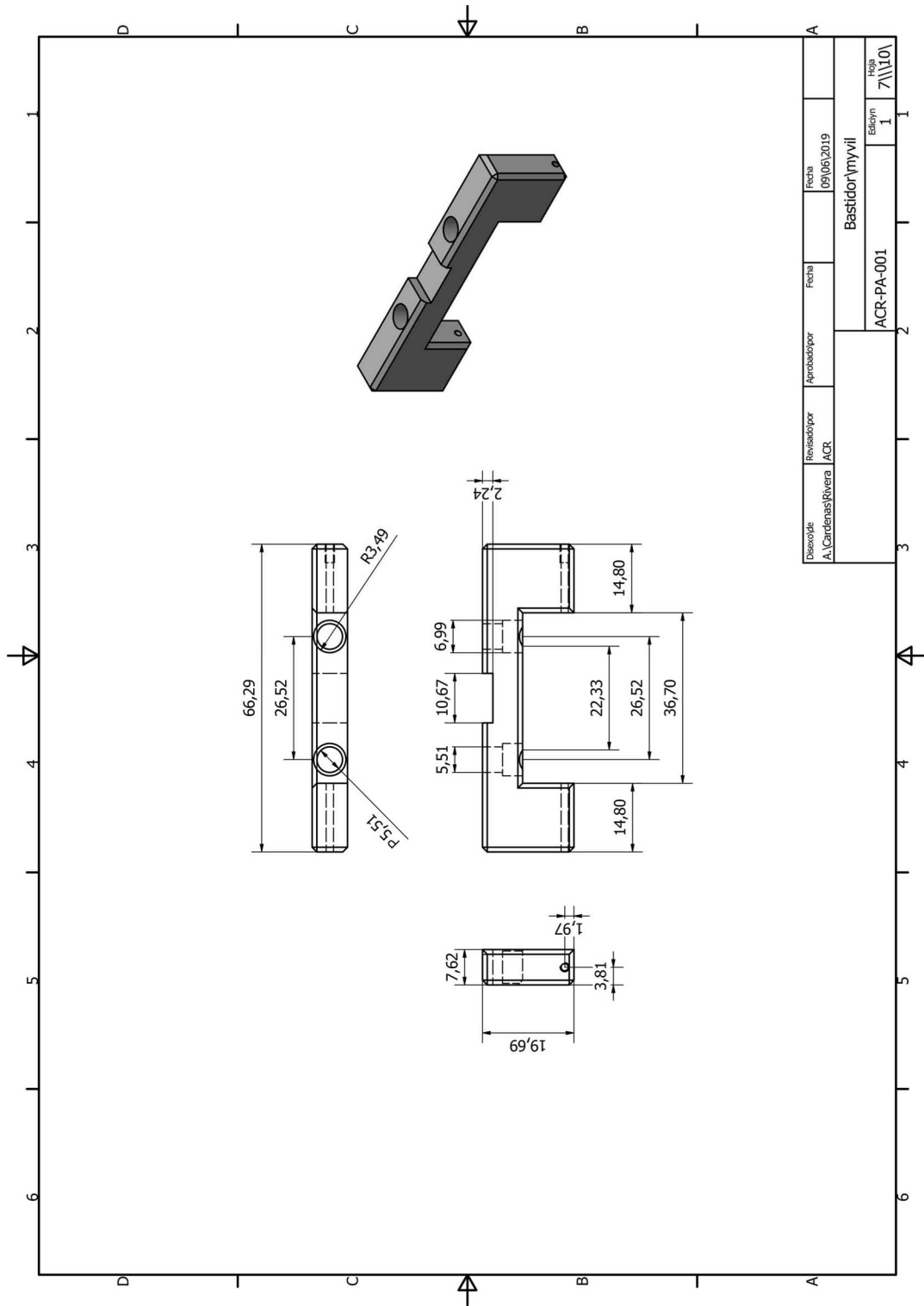


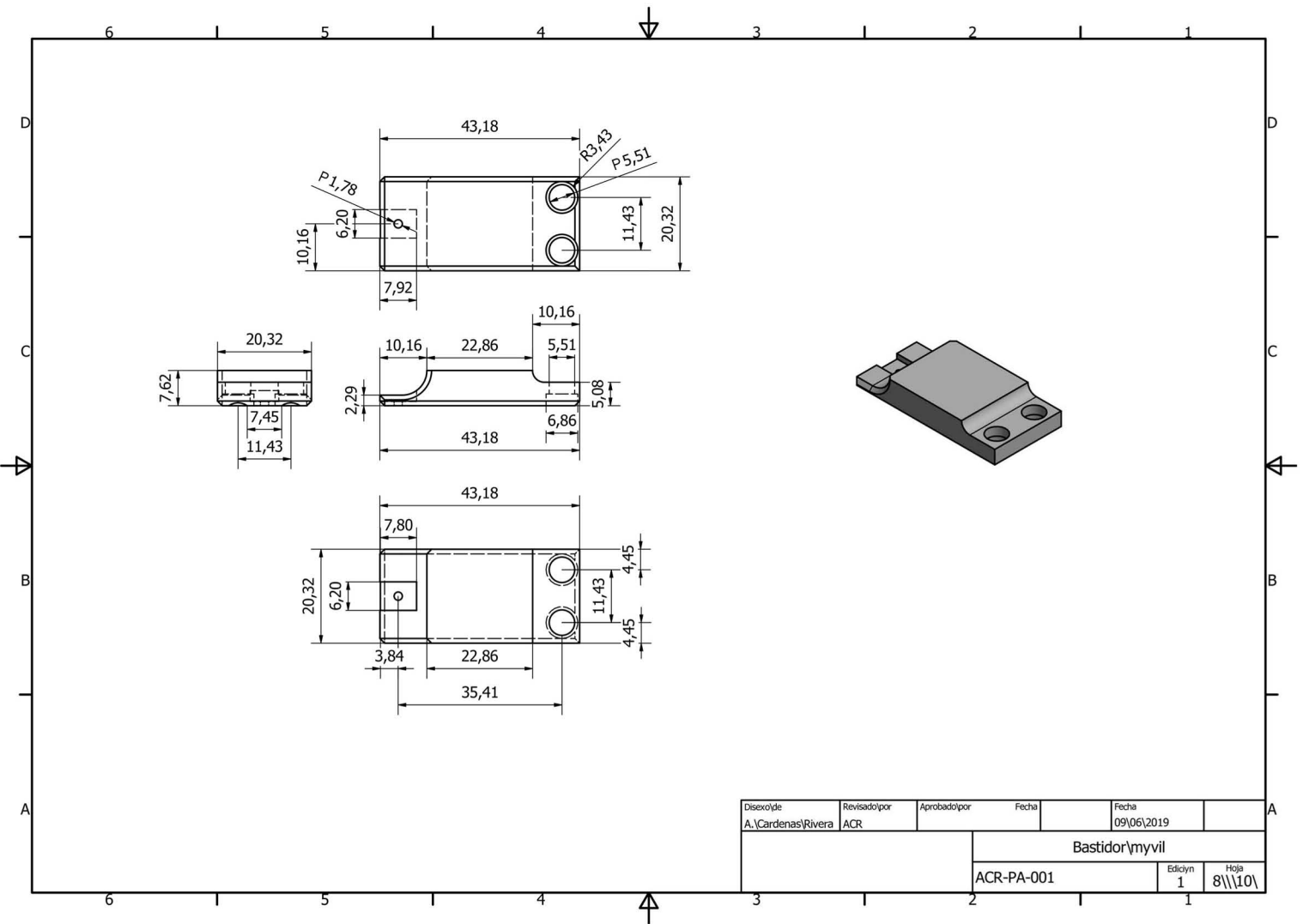


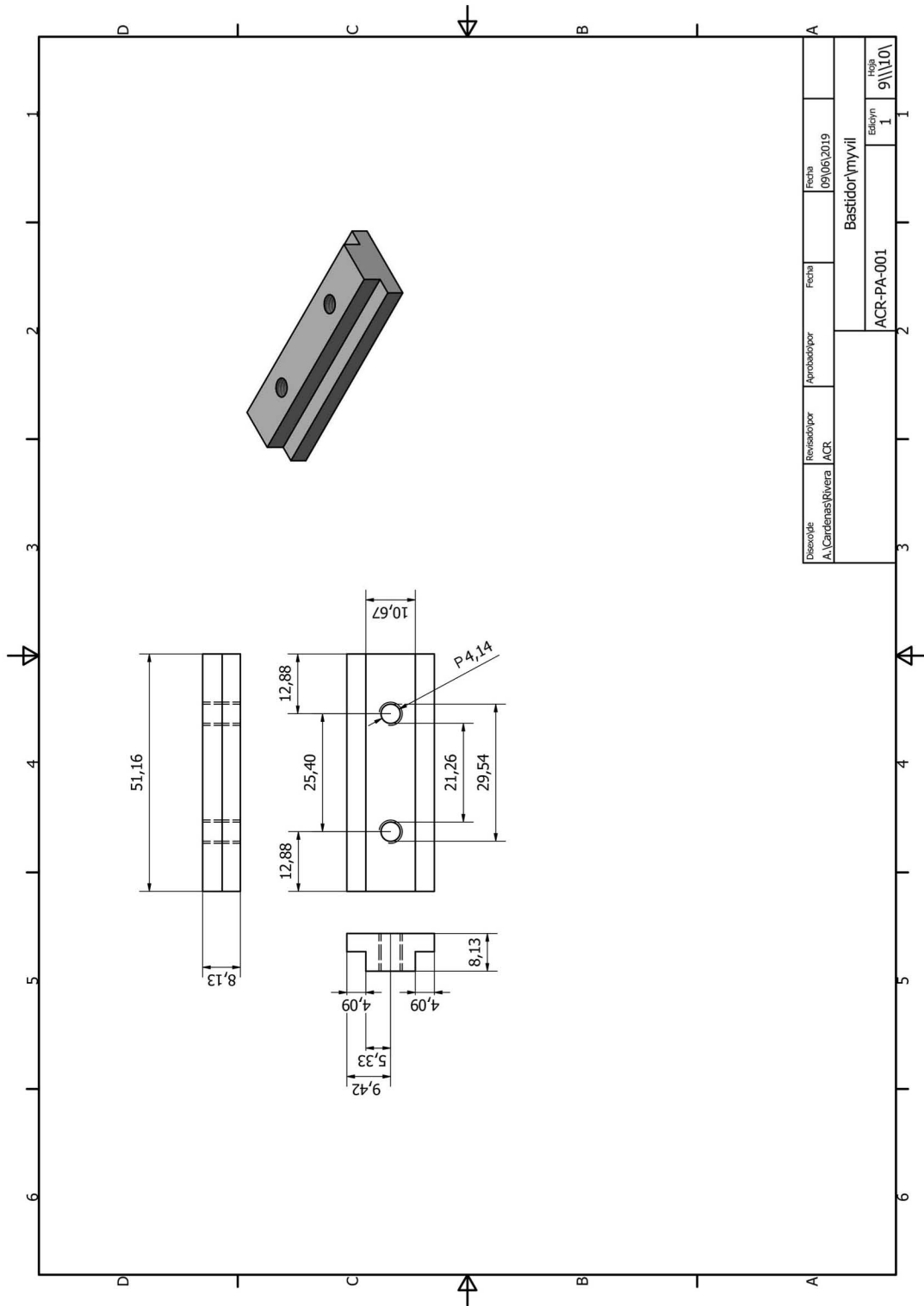


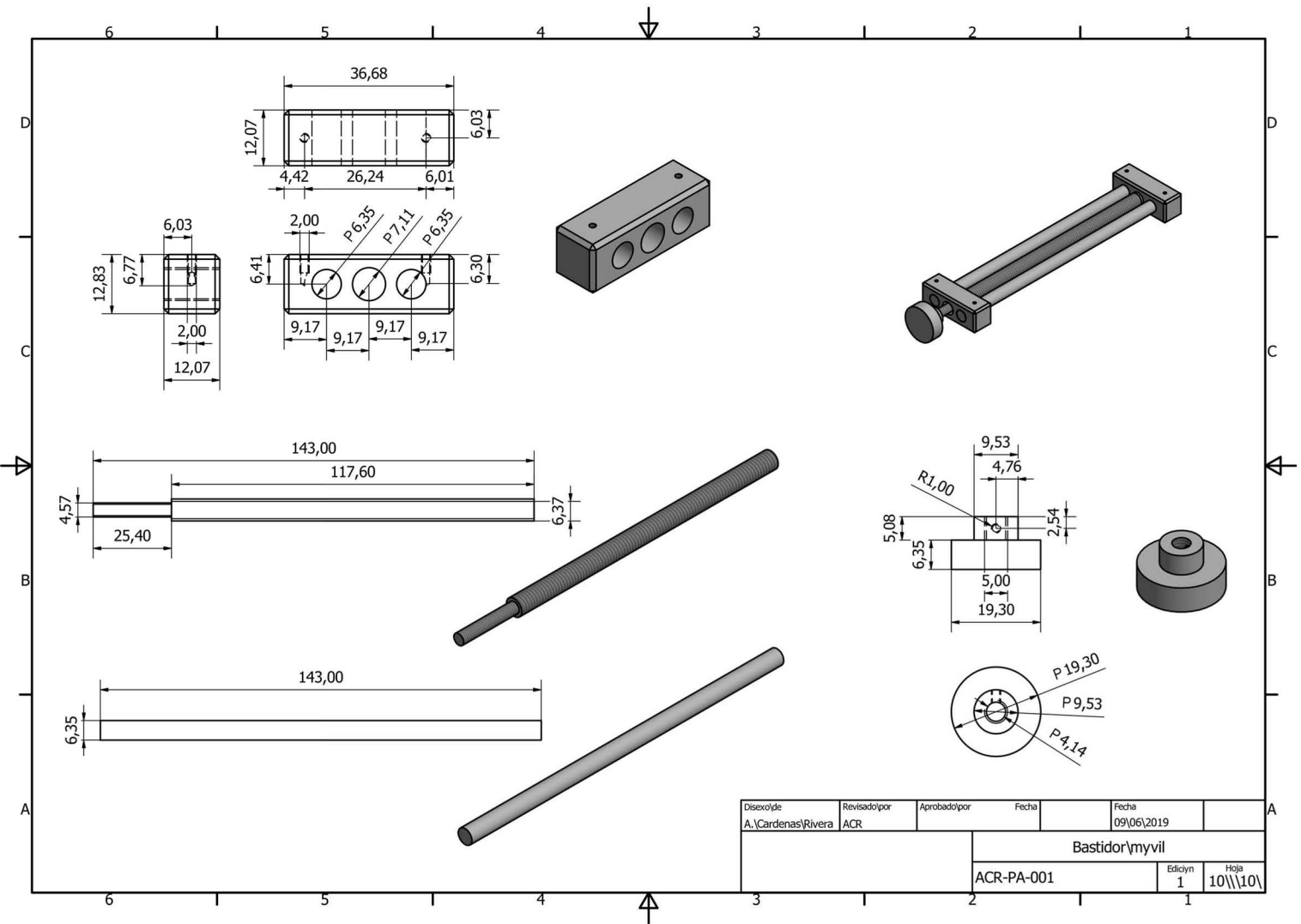


Activación diferencial de los receptores para el VEGF como mecanismo de neuro-protección en el infarto cerebral isquémico











# Early Post-stroke Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Hinders the Receptor 1-Dependent Neuroprotection Afforded by the Endogenous Ligand

Alfredo Cárdenas-Rivera<sup>1</sup>, Aura N. Campero-Romero<sup>1</sup>, Yessica Heras-Romero<sup>1</sup>, Andrés Penagos-Puig<sup>1</sup>, Ruth Rincón-Heredia<sup>2</sup> and Luis B. Tovar-y-Romo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Division of Neuroscience, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, <sup>2</sup> Microscopy Core Unit, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Victoria Campos-Peña,  
National Institute of Neurology  
and Neurosurgery (INNN), Mexico

### Reviewed by:

Sharon DeMorrow,  
The University of Texas at Austin,  
United States  
Ertugrul Kılıc,  
Istanbul Medipol University, Turkey

### \*Correspondence:

Luis B. Tovar-y-Romo  
ltovar@ic.unam.mx

### Specialty section:

This article was submitted to  
Cellular Neuropathology,  
a section of the journal  
Frontiers in Cellular Neuroscience

Received: 21 March 2019

Accepted: 03 June 2019

Published: 02 July 2019

### Citation:

Cárdenas-Rivera A,  
Campero-Romero AN,  
Heras-Romero Y, Penagos-Puig A,  
Rincón-Heredia R and  
Tovar-y-Romo LB (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.  
doi: 10.3389/fncel.2019.00270

Vascular endothelial growth factor (VEGF) has long been connected to the development of tissue lesion following ischemic stroke. Contradictory findings either situate VEGF as a promoter of large infarct volumes or as a potential attenuator of damage due to its well documented neuroprotective capability. The core of this discrepancy mostly lies on the substantial number of pleiotropic functions driven by VEGF. Mechanistically, these effects are activated through several VEGF receptors for which various closely related ligands exist. Here, we tested in an experimental model of stroke how the differential activation of VEGF receptors 1 and 2 would modify functional and histological outcomes in the acute phase post-ischemia. We also assessed whether VEGF-mediated responses would involve the modulation of inflammatory mechanisms and how this trophic factor acted specifically on neuronal receptors. We produced ischemic infarcts in adult rats by transiently occluding the middle cerebral artery and induced the pharmacological inhibition of VEGF receptors by i.c.v. administration of the specific VEGFR2 inhibitor SU1498 and the pan-VEGFR blocker Axitinib. We evaluated the neurological performance of animals at 24 h following stroke and the occurrence of brain infarctions analyzed at the gross metabolic and neuronal viability levels. We also assessed the induction of peripheral pro- and anti-inflammatory cytokines in the cerebrospinal fluid and blood and assessed the polarization of activated microglia. Finally, we studied the direct involvement of cortical neuronal receptors for VEGF with *in vitro* assays of excitotoxic damage. Preferential VEGFR1 activation by the endogenous ligand promotes neuronal protection and prevents the presentation of large volume infarcts that highly correlate with neurological performance, while the concomitant activation of VEGFR2 reduces this effect, even in the presence of exogenous ligand. This process partially involves the polarization of microglia to the state M2. At the cellular level, neurons also responded better to the preferential activation of VEGFR1 when challenged to *N*-methyl-D-aspartate-induced excitotoxicity.



Endogenous activation of VEGFR2 hinders the neuroprotective mechanisms mediated by the activation of VEGFR1. The selective modulation of these concurrent processes might enable the development of therapeutic approaches that target specific VEGFR1-mediated signaling during the acute phase post-stroke.

**Keywords:** Axitinib, ischemia, MCAO, stroke, SU1498, VEGF, VEGFR1, VEGFR2

## INTRODUCTION

The neuroprotective molecular mechanisms that drive endogenous adaptive responses to injury in the central nervous system (CNS) are mostly unknown, and their elucidation would ideally open new avenues for rehabilitation. A very promising process to target therapeutically is driven by vascular endothelial growth factor A (VEGF), which has long been implicated in the regulation of several events that take place following ischemic stroke, the leading cause of acquired disability in the developed world.

VEGF regulates a series of molecular processes that allow tissue to adapt to the conditions that prevail after stroke, such as neurovascular remodeling and repair, neuroprotection, brain plasticity and the recruitment and proliferation of neuronal precursors (Zhang et al., 2000; Ma et al., 2012; Dzierko et al., 2013; Greenberg and Jin, 2013). However, VEGF is also responsible for some damaging processes, such as cerebral edema and exacerbated blood-brain barrier leakage (Eliceiri et al., 1999; van Bruggen et al., 1999; Paul et al., 2001; Weis and Cheresh, 2005; Kim et al., 2018; Wu et al., 2018). Such opposing findings have, thus far, impeded the utilization of VEGF in a clinical setting aimed at alleviating the sequels of ischemic stroke.

VEGF acts by activating tyrosine kinase receptors 1 (VEGFR1, also known as FMS-like tyrosine kinase; Flt1) and 2 (VEGFR2, also known as kinase domain receptor; KR2, and fetal liver kinase 1; Flk-1). Both receptors are structurally closely related, each composed with seven immunoglobulin-like domains on the extracellular portion, a transmembrane motif, and an intracellular tyrosine kinase domain with conserved tyrosine phosphorylation sites (Grassot et al., 2006; Rahimi, 2006; Simons et al., 2016), although the ultimate biological actions driven by these receptors individually are somewhat different. Traditionally, VEGFR2 has been considered the canonical receptor for VEGF (Geiseler and Morland, 2018), and for a very long time, VEGFR1 has been thought to function as a decoy signal that counter-regulates VEGFR2 actions by sequestering the ligand, thus reducing its availability to binding VEGFR2 (Park et al., 1994; Meyer et al., 2006). Also, VEGFR1 is preferably activated by other members of the VEGF family, such as VEGF-B (Olsson et al., 2006).

An open question in all these molecular events is whether VEGF can also modulate the neuroinflammation elicited by ischemia (Geiseler and Morland, 2018). Neuroinflammation is an important component of the pathophysiology of stroke and other neurodegenerative processes where microglia, the resident macrophages of the CNS, play a central role.

Here we studied the mechanisms of VEGF-mediated neuroprotection in the acute phase of stroke using an *in vivo*

model produced by the transitory occlusion of the middle cerebral artery in the rat (MCAO). The i.c.v. administration of VEGF in the early phase after stroke results in a significant reduction of infarct volume and increased neuronal survival. We found that if VEGFR1 gets preferably activated when VEGFR2 is inhibited, there is a reduction of infarct volume and edema, and an increase of neuronal survival and neurological outcome. Given the role of VEGFR1 on microglial responses to altered brain homeostasis, the underlying mechanisms of the VEGFR1-mediated protection partially involve also the modulation of the inflammatory response and microglial polarization to a neuroprotector phenotype. These results point toward VEGFR1 as an attractive therapeutic target for stroke.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

In this study, we used young (1.5 months old; 270–290 g) Wistar rats that were subjected to MCAO as described below. Animals were housed in individual cages in a 12 h light/dark cycle with food and water *ad libitum*. All rats were killed at 24 h during the acute phase 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 Committee (CICUAL-IFC-LTR93-16).

### Study Design

Animals were randomly divided into seven groups with an  $n = 10–13$  for MCAO groups and 7 shams. The sample size was calculated *a priori* to detect a medium Cohen's  $d$  effect size  $> 0.3$ ,  $\beta$  power of 0.8 and significance of 0.05. Mortality rate was assumed to be 0.4 based on pilot experiments. These parameters were chosen to reduce the number of animals used. Inclusion criteria in analyzes considered the reduction of blood perfusion below 50% of basal values, which roughly corresponds to the effect of occluding the common carotid artery, no immediate recovery of reperfusion (above 50% baseline values within 3 min), total occlusion time between 90–95 min, absence of subarachnoid or intraparenchymal hemorrhages and survival at 24 h after stroke. This study is limited to assess effects on males.

### MCAO

Rats were put under isoflurane anesthesia (5% for induction followed by  $\leq 1.5\%$  during surgery) with oxygen as the carrier. Normal ventilation was autonomously maintained. Focal cerebral ischemia was induced with the Longa method (Longa et al., 1989) using a nylon monofilament with a silicone-dipped tip

(403734, Doccol, Sharon, MA, United States) that was inserted in a stump created by cutting the ligated left external carotid artery and intraluminally advanced through the internal carotid artery until it reached and occluded the MCA at its inception in the Circle of Willis. MCA occlusion was kept for 90 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 skin of the neck was sutured, and rats were returned to their cages. During the entire experimental procedure, the cerebral blood flow (CBF) was monitored in the territory irrigated by MCA with laser-Doppler flowmetry. For this, the parietal skull bone was thinned using a small mototool drill bit (Dremel, Racine, WI, United States) and a probe holder was glued onto it at stereotaxic coordinates (AP -1.5 L +3.5 from Bregma). A laser-Doppler probe (model 407, Perimed, Järfälla, Sweden) was inserted into the holder and connected to a Periflux System 5010 (Perimed). CBF was continuously monitored with an acquisition interval of 0.3 s using the Perisoft software (Perimed).

### Administration of VEGF and Pharmacological Inhibitors

VEGF and the VEGFRs inhibitors were administered by intracerebroventricular (i.c.v.) injections in the corresponding animal groups 30 min after intraluminal filament removal, which marked the beginning of reperfusion, with the following stereotaxic coordinates: AP -0.8 and L -1.5 from Bregma and V -4 from dura matter. Injections were performed with graduated glass microcapillary pipettes that were pulled to produce a tip < 50 μm in diameter (McCluskey et al., 2008) at a flux rate of 0.8 μL/min. Because of the non-polar nature of the inhibitors used in this study, we injected a corresponding volume of DMSO in all experimental groups to control for DMSO possible effects. Control sham- and MCAO-operated animals were injected with vehicle solutions consisting of 2 μL DMSO followed by 2 μL 0.1% BSA (4 μL final volume). Recombinant rat VEGF-A<sub>164</sub> (Sigma) was prepared in a 0.1% BSA at a final concentration of 25 ng/μL, 2 μL VEGF were injected followed by 2 μL DMSO. SU1498 and Axitinib (both from Sigma) were prepared in DMSO at a concentration of 6.4 mM. Two μL of each inhibitor were administered in the corresponding groups followed by 2 μL 0.1% BSA or 25 ng/μL VEGF depending on the experimental condition.

### Infarct Volume Calculation

Animals were sedated with sodium pentobarbital and transcardially perfused with 200 mL 0.9% NaCl at 4°C, after which brains were collected and immediately sectioned into seven coronal slices (2 mm thick) that were incubated in 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) at 37°C for 10 min. Images of sections were digitally acquired with a Lexmark scanner (Lexmark X2650, Lexmark, Canada) using Imaging Studio software (Lexmark, Canada). The infarcted and individual hemisphere areas of each section were measured with a semi-automatized macro routine executed in Fiji (Fiji-ImageJ, version 1.52i, NIH, United States) (Schindelin et al., 2012).

Infarct volume was then calculated and corrected for edema with the following formula:

$$IV = \sum_{i=1}^n \left[ \left( \frac{cIHA_i \times IA_i}{iIHA_i} \right) t \right]$$

Where IV is the volume of infarct in mm<sup>3</sup>, *n* is the number of sections, *cIHA* is the area of the contralateral hemisphere in mm<sup>2</sup>, *IA* is the area of the damaged tissue in mm<sup>2</sup>, *iIHA* is the area of ipsilateral hemisphere in mm<sup>2</sup>, and *t* is the thickness of each section in mm.

### Post-stroke Neuronal Viability Evaluation

For histological analyses, three rats per group were transcardially perfused with 200 mL ice-cold 0.9% NaCl followed by 250 mL ice-cold 4% paraformaldehyde (PFA). Brains were collected and post-fixed in 4% PFA for 24 h and 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. An entire series was mounted on gelatin-coated slides and stained with 1% cresyl violet. Digital images of a section series were acquired in an Olympus IX71 microscope with a 20X magnification using a 12 Megapixel Evolution UVF camera (Media Cybernetics, Buckinghamshire, United Kingdom). Images were processed in Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics). Soma diameters and shapes of pyramidal neurons within an area of 250 × 350 μm in layers IV and V of the somatosensory cortex in 3 consecutive sections were analyzed with an automatized macro routine executed in Fiji. Healthy cells were defined by circularity values of 0.47 - 0.88 and area of 30 - 250 μm<sup>2</sup>. Neuronal viability is reported as a survival index, which was calculated from each count of ipsilateral live neurons expressed as a proportion of the count in the respective contralateral area. The resulting values were normalized to the pooled indexes of the sham group. This algorithm is calculated with the following formula:

$$SI = p \left( \sum_{i=1}^t \left( \frac{\sum_{j=1}^n (C_i^j / C_i^{cl})}{n} \right) \right) / t \left( \sum_{i=1}^p \left( \frac{\sum_{o=1}^m (S_o^d / S_o^{cl})}{m} \right) \right)$$

Where SI is the survival index, *C<sup>i</sup>* is the number of live neurons in the ipsilateral side, *C<sup>cl</sup>* is the number of live neurons in the respective contralateral side, *n* is the number of coronal sections analyzed for each brain, *t* is the number of animals analyzed per experimental group, *S<sup>d</sup>* is the number of neurons in the left side of the sham group, *S<sup>cl</sup>* is the number of neurons in the right side of the sham group and, *m* is the number of sections analyzed for each sham brain and *p* is the number of sham rats. No statistical differences were detected in absolute numbers of live neurons among contralateral sides across experimental groups.

## Behavioral Testing

Animals were evaluated with a battery of neurological tests to assess sensorimotor deficits 24 h after stroke. The severity of functional deficits was scored by assessing eight items described in **Table 1** with slight modifications from previous reports (Mattsson et al., 1997; Schallert et al., 2000; Burguete et al., 2006; Zhang et al., 2015). Maximum score (32 total) was assigned to animals without neurological deficits. All evaluations were cross-validated by a trained observer blinded to the experimental treatment that analyzed recorded videos of the tests.

## Peripheral Cytokines Determination

Blood samples were obtained by cardiac puncture right before transcardial perfusion to determine circulating cytokine levels 24 h after stroke. Plasma was prepared from blood by adding 50  $\mu$ L/mL 0.5 M EDTA and samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used. Cytokine detection was carried out with a custom-made rat cytokine/chemokine magnetic bead Milliplex MAP panel (Millipore, Temecula, CA, United States) following the manufacturer instructions. A 96-well plate was used to simultaneously determine the concentrations of IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17, TNF- $\alpha$ , CCL11, INF $\gamma$ , CX3CL1, MIP-1 $\alpha$ , and VEGF. The plate was read on a MAGPIX system (EMD Millipore, Darmstadt, Germany). Results were analyzed using the xPONENT software (Luminex, Madison, WI, United States). Standards of 200–16,000 pg/mL were used for generating the corresponding concentration curve of each analyte. Determinations were done in duplicates per biological replicate ( $n = 3$ ).

## Cytokine mRNA Expression

Cytokine mRNA levels were determined 24 h after stroke by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). For this, 1 mL of blood was combined with 50  $\mu$ L 0.5 M EDTA and 10 mL of red blood cells lysis buffer (155 mM NH $_4$ Cl, 12 mM NaCO $_3$ , 0.1M EDTA, pH 7). Samples were centrifuged at  $1,900 \times g$  for 8 min at RT in a Sorvall ST8 centrifuge (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany) to obtain white blood cells pellet. Total RNA was isolated with 5:1 TRIzol (Ambion Life Technologies, Austin, TX, United States)-chloroform by phase separation centrifugation at  $12,000 \times g$  for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . RNA was precipitated in 500  $\mu$ L isopropanol and washed in 75% ethanol. After air-drying, the pellet was reconstituted in RNase and DNase free ultrapure water (Thermo Scientific). RNA concentration and purity were assessed using OD 260/280 ratios and gel electrophoresis. RT-qPCR was performed with One-step NZYSpeed RT-qPCR Green kit, ROX (nzyTECH, Lisbon, Portugal) according to the manufacturer directions. RT-qPCRs were run in 96-well plates in an Applied Biosystems StepOne RT-qPCR System (Thermo Fisher) with the following parameters: 20 min reverse transcription at  $50^{\circ}\text{C}$ , 2 min cDNA denaturing at  $95^{\circ}\text{C}$ , 40 cycles of 5 s denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$ , 30 s annealing/amplification at  $61^{\circ}\text{C}$ . Relative quantification of gene expression was performed using the  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  method, with glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase as a reference gene. Melting curve analyzes and gel electrophoresis evaluation of the RT-qPCR products were

routinely performed to determine the specificity of the RT-qPCR reaction. Primer information for each gene is contained in **Table 2**.

## Immunohistochemistry and Confocal Microscopy

PFA-fixed brain sections containing infarct core and penumbra were blocked with 5% bovine serum albumin in Tris-buffered saline with 0.5% v/v Triton X-100 (TBS-T) and incubated with anti-Iba-1 (1:200; Wako, Richmond, VA, United States) and anti-arginase-1 antibodies (1:200; Invitrogen) for 48 h. Sections were washed three times with TBS followed by 2 h incubation at RT with Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse and Alexa 546-conjugated anti-rabbit antibodies (1:2000 each; Invitrogen, Carlsbad, CA, United States) in TBS. Images were obtained in a Zeiss LSM 800 confocal microscope using a 63X objective. An average of 45 optical slices was obtained every 0.5  $\mu$ m for each Z-stack.

## Cortical Neuronal Cultures

Cortical neuronal cultures were prepared from embryonic day 17 Wistar rats as previously described (Tovar- $\gamma$ -Romo et al., 2012). Briefly, cortices were isolated and trypsinized, and cells were dissociated by trituration in a Ca $^{2+}$  and Mg $^{2+}$  free Hanks' balanced salt solution (Gibco, Carlsbad, CA, United States). Neurons were plated at a density of  $1.3 \times 10^5$  cells/cm $^2$  in polyethyleneimine-coated 24-well plates in Neurobasal medium supplemented with B-27 (Gibco) and 1% antibiotic/antimycotic solution (104 U of penicillin G/ml, 10 mg of streptomycin/ml, and 25  $\mu$ g of amphotericin B/ml) (Sigma). Ten  $\mu$ M cytosine  $\beta$ -D-arabinofuranoside (Sigma) was added on DIV 3 to prevent the proliferation of astrocytes.

Immunofluorescent staining was performed in cells plated on glass coverslips and fixed with 100% methanol for 10 min at  $-20^{\circ}\text{C}$  on DIV 7. Neurons were incubated with anti-VEGFR1 or anti-VEGFR2 (1:100 each, LifeSpan Biosciences, Seattle, WA, United States) and anti-microtubule-associated protein 2 (MAP2; 1:100, Sigma) overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . Labeled cells were incubated with Alexa Fluor 546- and Alexa Fluor 488-conjugated antibodies (1:200 each, Life Technologies), for 1 h at RT, after three washes, neurons were incubated with DAPI for 5 min and mounted on glass slides. Cells were imaged with confocal microscopy as described above with a 40X objective. An average of 30 optical slices was obtained every 0.5  $\mu$ m for each Z-stack.

## Cortical Neurons Excitotoxicity Assays

Neuronal cultures were challenged on DIV 11 with 1, 10, or 100  $\mu$ M NMDA + 1  $\mu$ M glycine for 24 h to induce excitotoxic damage or neuronal death. Rat recombinant VEGF-A $_{164}$  was added to some experimental wells at a concentration of 10 ng/mL for 24 h. In some experiments, we added, 2  $\mu$ M SU1498 or 2  $\mu$ M Axitinib for the same time. Neuronal viability was inferred from metabolic activity determined by standard 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. For this, neurons were incubated with 0.1 mg/mL

TABLE 1 | Items evaluated in neurofunctional assessments.

Neurological assessment	Reflex	Score	Previously reported
Spontaneous activity	Exploring an open arena more than 20 s	3	Burguete et al., 2006
	Exploring between 10 and 20 s	2	
	Exploring less than 10 s	1	
	Not exploring or moving only when stimulated	0	
	None	3	Burguete et al., 2006
Contralateral - wisk circling	Spontaneous circling	2	
	Stimulus-induced circling	1	
	Not moving	0	
Prhensile grip of forepaws to a wire	Symmetrical grip	4	Mattsson et al., 1997
	Asymmetrical, preferably use of non-lesioned forelimb	3	
	Asymmetrical, unable to hold body weight	2	
	Unable to hold grip with lesioned forelimb	1	
	Fall from wire	0	
Ability to rise while suspended from the tail	Unskewed side to rise	4	Zhang et al., 2015
	Rise preferably to the non-lesioned side	3	
	Able to rise only until reached the horizontal plane	2	
	Unable to rise	1	
	Unresponsive while suspended	0	
Cylinder test	Steading with both forelimbs at even height	4	
	Unable to bring lesioned forelimb to equal height of contralesioned forelimb	3	Schallert et al., 2000
	Does not support body weight on lesioned forelimb	2	
	Unable to rear	1	
	Unresponsive	0	
Protective retraction of forelimbs after poking	Symmetrical flex and move from the site	4	NA
	Asymmetrical flex of the ipsilateral forelimb and move from the site	3	
	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	
Body posture	Balanced	5	NA
	Head tilted to the right (lesioned flank)	4	
	Head tilted to the right and forearm extended	3	
	Body tilted to the right	2	
	Unable to keep posture with lesioned hindlimb	1	
March coordination	Unable to stand from lay down position	0	
	Symmetrical movement	5	NA
	Forepaws extended during march	4	
	Support on ulnar side of lesioned forelimb	3	
	Dragging fingers during march	2	
	Dragging lesioned forelimb on dorsal side	1	
	Does not stand on lesioned forelimb	0	

The neurological performance of every individual was assessed 24 h after stroke in eight items, and for each one, a corresponding value was assigned. Behavioral evaluations were cross-validated by a trained analyst blind to the experimental conditions.

TABLE 2 | Primer sequences for RT-PCR analyses of cytokine transcripts.

Gene	Primer sequence	Amplicon length (bp)	Accession number
IL-1b	F: 5'-COCTGCAGCTGAGAGTGTGG-3'	153	NM_031512.2
	R: 5'-TGTGCTCTGCTTGAGAGGTGCT-3'		
IL-6	F: 5'-CGAGCCCAACGAAAGTC-3'	84	M26744.1
	R: 5'-CTGGCTGGAAGTCTTTGGGAG-3'		
TGfb	F: 5'-ACCTGCACACCATGGACAT-3'	154	NM_021578.2
	R: 5'-TGTTGTACAAAGCGGCAAC-3'		
GAPDH	F: 5'-GCATCTCTTGTGCAGTGCC-3'	278	NM_017008.4
	R: 5'-GATCTCGCTCTCGAAGATGG-3'		

MTT for 2 h at 37°C at the end of the analyzed period. Media was removed, and formazan precipitations were dissolved in a 4 mM HCl isopropanol solution. The absorbance of cell debris-free supernatants was read in a spectrophotometer (Beckman Coulter) with a 570 nm wavelength. Data are presented as percentage relative to the absorbance of control conditions. In some experimental conditions we corroborated neuronal viability with the life/dead fluorescence assay (Thermo Fisher Scientific) that stain live cells with calcein AM (green) and dead cells with ethidium homodimer-1 (red), following manufacturers directions.

In an independent series of experiments, neurons were subjected to the same conditions and dendritic spines were stained with the Neurite Outgrowth Staining kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, United States) following the manufacturer directions. Briefly, neurons plated on glass coverslips were fixed with 3.7% PFA for 30 min at RT, and 1X bright orange-fluorescent dye was added to stain the outer cell membrane surfaces. After incubation with a background suppression solution, coverslips were mounted on glass slides with a permanent mounting medium with antifading agents (DAKO, Santa Clara, CA, United States). Dendritic branches were visualized using a Leica DM1000 microscope under epifluorescence illumination (568-nm excitation and 580-nm emission) with a 40X objective. A minimum of 10 neurons from 3 independent experiments was analyzed for each condition. The number of dendritic spines, defined as thin protrusions emerging from dendritic processes, extending from two to five primary dendrites/neuron was quantified for a distance of approximately 20  $\mu$ m from the cell soma. Neurite lengths and spine numbers were quantified with ImageJ (NIH, United States). Spine density across all measured dendritic segments was normalized to the length of the primary dendrite.

## Statistics

R- Feather Spray version 3.5.1, (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) was used to analyze all data from *in vivo* experiments. Normal distribution in each data set was corroborated using the Shapiro-Wilk normality test. Data were tested by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey *post hoc* test. Data were considered significant at  $\alpha \leq 0.05$  level. All data are shown as mean  $\pm$  2SD. For *in vitro* experiments without normal distribution we did a Kruskal-Wallis, followed by Dunn *post hoc* test. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM.

## RESULTS

### VEGF Mediates Neuroprotection in the Acute Phase of Stroke

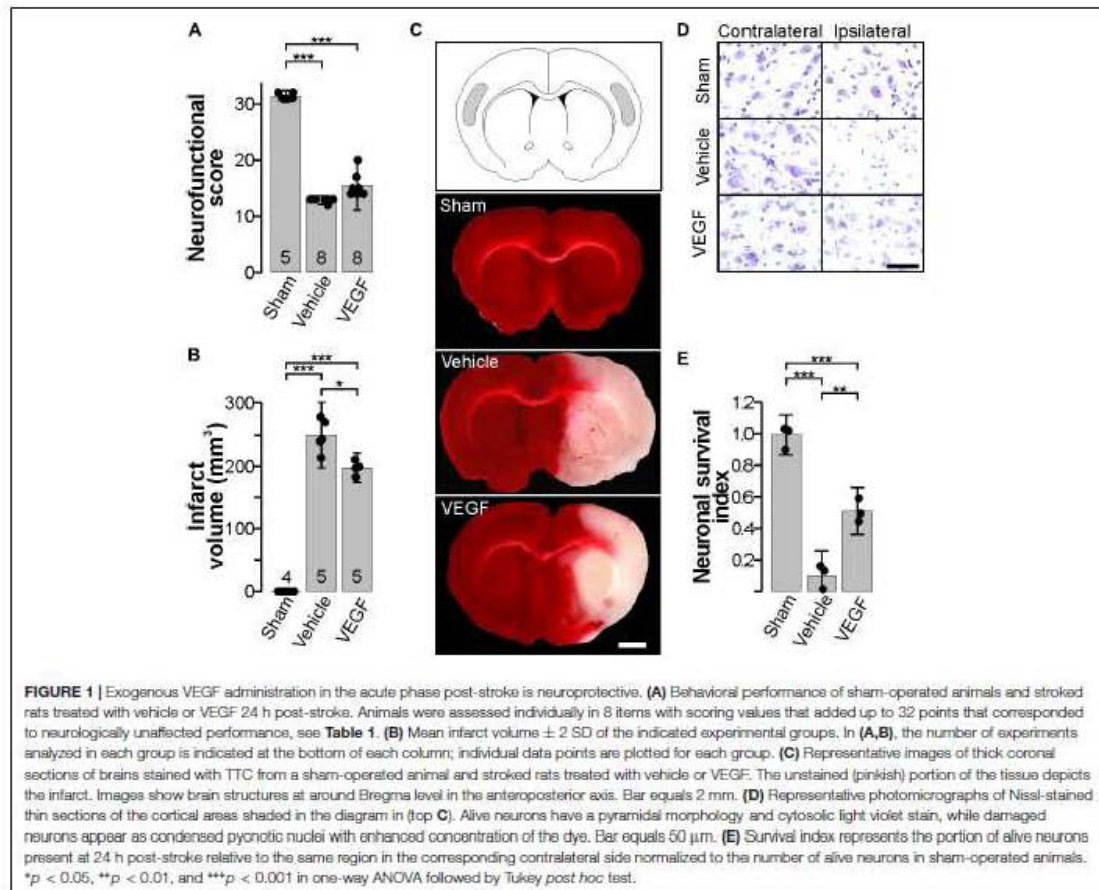
There are contradictory findings on the neuroprotective effects of VEGF in stroke. Most of the reported discrepancies can be grounded on time, dose and route of administration of exogenous VEGF in several models of stroke (Ma et al., 2012; Tovar-y-Romo et al., 2016). Because of this, we first tested the effect of administering a single bolus of 50 ng rat recombinant

VEGF-A<sub>164</sub> by i.c.v. injection 30 min after the beginning of reperfusion (Figure 1), the dose was chosen based on pilot experiments, and also on a previous study showing that this dose and method of administration is protective in other models of neurodegeneration (Tovar-y-Romo and Tapia, 2012). This protocol was carried out using a pulled glass microcapillary pipette to minimize mechanical damage in order to prevent the activation of inflammatory processes merely associated with the injection procedure. Twenty four hours after stroke, animals were evaluated in a series of neurobehavioral and motor tasks to determine the level of neurological alterations produced by the stroke (Figure 1A). Animals that were injected with vehicle only (DMSO + 0.1% BSA; 4  $\mu$ l) showed a noticeable weakness and impaired movement of the lesioned side forelimb. These animals were unable to climb a grid and support their body weight and had a noticeable difficulty rising when placed on their sides, plus ~60% of animals had epileptiform seizures, mostly represented by tonic-clonic convulsions, barrel rolls and running fits. Stroked rats also displayed signs of neuropathic pain when stimulated by slightly poking the affected flank. Administration of 50 ng recombinant VEGF at the beginning of reperfusion did not improve significantly the neurological deficits presented after stroke and also failed to prevent seizures.

Nonetheless, VEGF did reduce infarct volumes by about 20% in comparison to the group that received vehicle only (Figures 1B,C). Moreover, neuronal viability was also preserved as revealed by analyzing the somatosensory region of the parietal cortex, in which ~50% neurons remain alive at 24 h post-stroke (Figures 1D,E). Therefore, with this experimental settings, we found a condition in which exogenous VEGF did produce a protective impact on brain tissue without translating into a better neurobehavioral outcome at this short time point after stroke.

### VEGFR2 Activation Hinders VEGFR1-Driven Neuroprotection Elicited by Endogenous Ligand in the Acute Phase Post-stroke

It has been known for a long time that VEGF synthesis is upregulated by ischemia immediately after an experimental stroke (Hayashi et al., 1997; Plate et al., 1999; Hai et al., 2003), and this phenomenon has also been reported to occur in human patients (Issa et al., 1999). It is suspected that such VEGF increase is mechanistically involved in neuroprotection. Considering the large body of evidence that involves VEGFR2 participation in neuroprotection (Olsson et al., 2006; Tovar-y-Romo et al., 2016; Geiseler and Morland, 2018), we set out to determine whether VEGFR2 would be primordially responsible for the protection seen here. For this, we administered i.c.v. 13 nmoles of SU1498, a selective VEGFR2 inhibitor (Strawn et al., 1996), 30 min after the beginning of reperfusion and analyzed the overall effects of this procedure 24 h after stroke. Animals in this group displayed signs of neurological deficits mainly characterized by paresis of the lesioned forelimb. However, all animals in this group performed better in the neurological tests and showed significantly fewer alterations than rats that were

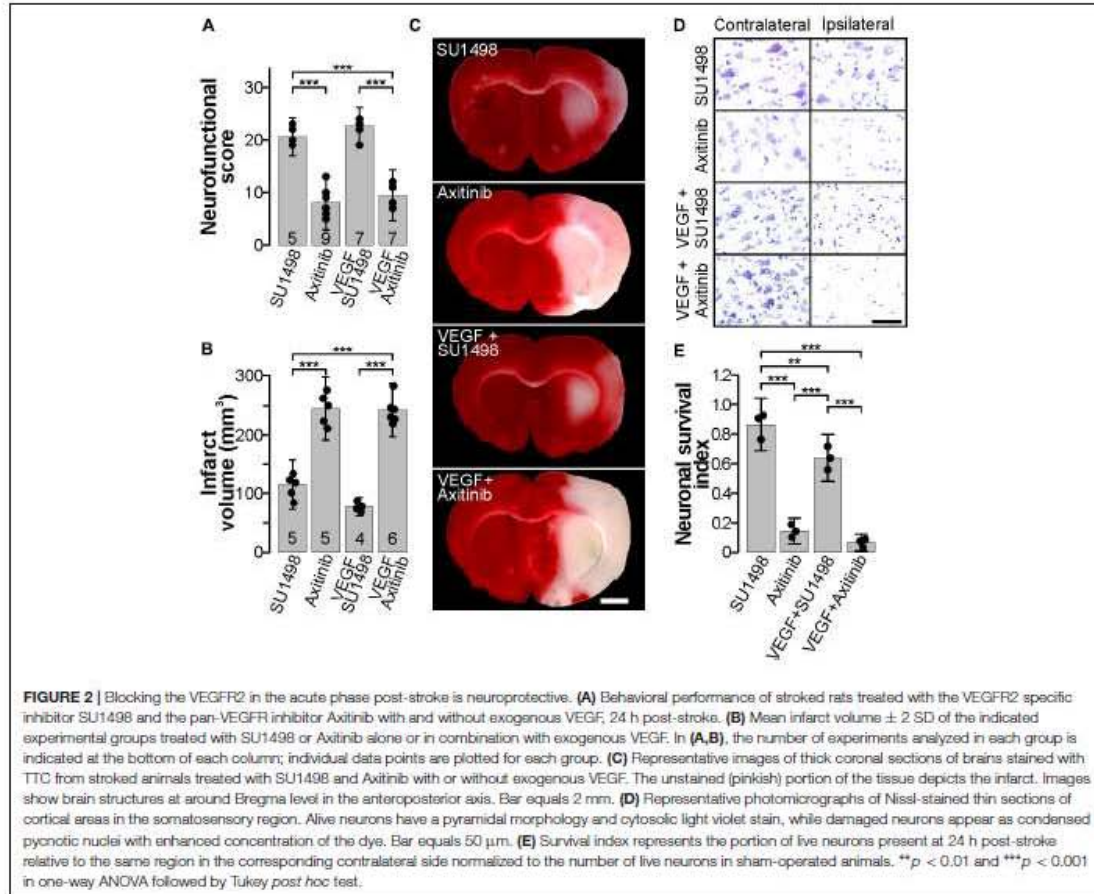


administered with vehicle alone (**Figures 2A, 3**). Furthermore, co-administration of VEGFR2 antagonist together with a bolus of 50 ng exogenous agonist also resulted in a noticeable improvement in neurological function as compared to animals that received vehicle alone but also to the group that was administered with VEGF, which displayed better recoveries (**Figures 2A, 3**) – thus pointing to a VEGFR2-independent effect driven by the endogenous ligand.

Given the lack of a specific pharmacological inhibitor of VEGFR1, we employed the general VEGFR inhibitor Axitinib that blocks all VEGF receptors (Inai et al., 2004). The MCAO group that received 13 nmoles of Axitinib at 30 min of the beginning of reperfusion presented exacerbated neurological symptoms described above that were followed by a lethargic state in which animals laid on their right side. As expected, infarct volumes in this group were large and comparable to the vehicle group (**Figures 1B,C, 2B,C**). Finally, blocking all VEGFRs prevented any protection mediated by the i.c.v. administration of exogenous VEGF and animals displayed

neurological impairments characteristic of large infarctions (**Figures 2A–C**). Brain damage seen in TTC stainings in this group was of proportions similar to the ones seen in the control untreated group (**Figures 2B,C**). Accordingly, neuronal death was reduced in the animals that received SU1498 alone or in combination with VEGF and was increased in animals treated with Axitinib (**Figures 2D,E**).

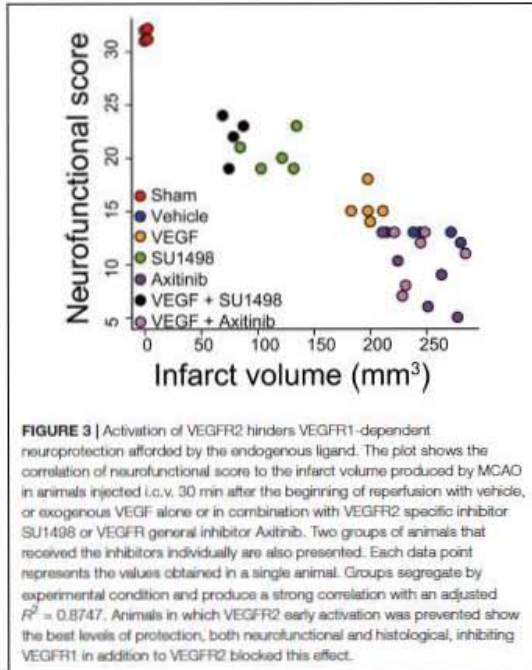
Correlating the neurological performance of animals 24 h after stroke to the extent of brain tissue damage allowed us to clearly segregate groups by experimental treatment and show that blocking VEGFR2 and potentiating the activation of VEGFR1 by the administration of exogenous ligand, afforded the best level of neuroprotection, closely followed by only blocking VEGFR2 (**Figure 3**). This analysis shows a strong correlation of  $R^2 = 0.8747$  with a  $p = 3.33 \times 10^{-16}$ . The sole administration of the exogenous ligand, while still protective, does not result in a very different outcome as compared to all the non-protected experimental conditions, in which we either not treated animals or inhibited all VEGFRs (**Figure 3**).



### VEGFR1-Mediated Neuroprotection Partially Involves M2 Polarization of Microglia With a Minimal Discernible Impact on Systemic Markers of Inflammation

VEGF drives the migration of macrophages and microglia to the damaged CNS through VEGFR1-mediated signaling (Forstreuter et al., 2002; Huang et al., 2013; Lelli et al., 2013). Therefore, we decided to study whether the neuroprotection exerted by the preferential activation of VEGFR1 would also involve the modulation of neuroinflammatory processes. We first assessed changes in inflammatory markers, both in CSF and in plasma, at 24 h post-stroke. We analyzed the content of IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17, TNF- $\alpha$ , CCL11, INF $\gamma$ , CX3CL1, and MIP-1 $\alpha$  with a multiplex array for these cytokines in samples collected prior transcatheter perfusion. None of the detected cytokines in CSF (IL-1 $\beta$ , INF $\gamma$ , CXCL-3) showed a significant change compared to the values seen in the vehicle-treated

group (Figure 4A). Likewise, for most of the peripheral markers of inflammation that produced a readable measurement in plasma, we did not find differences among experimental groups. However, we detected with this array that the inhibition of all VEGFRs with Axitinib blunted the release of peripheral markers of inflammation IL-12, TNF $\alpha$ , and CCL11. This blockade did not happen to the same degree when we selectively inhibited VEGFR2 (Figure 4B). Since under our experimental conditions we were not able to have reliable measurements of peripheral IL-1 $\beta$ , IL-6, and TGF $\beta$ , which have been previously identified as central players of the neuroinflammatory processes that happen after stroke, we decided to evaluate the levels of transcriptional expression of these cytokines in white blood cells collected 24 h after stroke. With RT-qPCR analyses, we determined that there are no significant changes in the level of transcription for neither of these molecules at the time point of our investigations and that VEGF or its receptors are not modifiers of these molecular responses (Figures 4C–E).



Next, we looked into the polarization of microglial cells to the anti-inflammatory phenotype M2, which is known to occur in the first 24 h after stroke (Hu et al., 2012). For this, we co-stained brain sections for the microglial marker Iba-1 and the M2 marker arginase-1. Strikingly, resting state morphologically looking microglia were found to express arginase-1 in sham animals at 24 h of transiently occluding the common carotid artery (Figure 5). In the control MCAO group, microglia in the lesioned cortical region looked morphologically activated, mainly with shortened cellular processes and rounded somas but cells in these regions lacked the expression of arginase-1. VEGF-treated animals, however, showed activated microglia expressing the M2 polarization marker and this was also the scenario in the groups treated with the VEGFR2 inhibitor SU1498 with and without VEGF. In the case of animals injected with Axitinib, we found fewer activated microglia expressing arginase-1, suggesting that VEGFR1 blockade also reduced the polarization of microglia to the anti-inflammatory phenotype.

### VEGF Acts Directly on Neurons Through the Activation of VEGFR1

In the last part of our study, we analyzed whether the effects of preferentially activating VEGFR1 and the neuroprotection seen in the *in vivo* model of ischemic stroke were derived from the direct stimulation of neuronal receptors. Using an *in vitro* model of cultured cortical neurons we first determined the expression of both, VEGFR1 and VEGFR2 in these cells. Figure 6A shows

the expression of both TRKs at 7 DIV, specifically in neurons. Expression of both receptors is clear in neuronal somas as well as in neurites. Then, we tested whether the addition of VEGF to neuronal cultures could rescue neurons from excitotoxicity, one of the primary mechanisms underlying neuronal death after ischemia. For this, we incubated the neurons with different concentrations of the glutamatergic agonist NMDA for 24 h in the same culture media in which cells were grown for 11 days. At the lowest concentration assayed (1  $\mu$ M), neuronal death is not apparent and increasing the concentration of NMDA to 10, and 100  $\mu$ M gradually increased the level of neuronal death (Figures 6B,C). Addition of 10 ng/mL recombinant VEGF reduced in about 20% the loss of metabolic activity in the neuronal cultures, which relates to the overall health of the cells and their survivability.

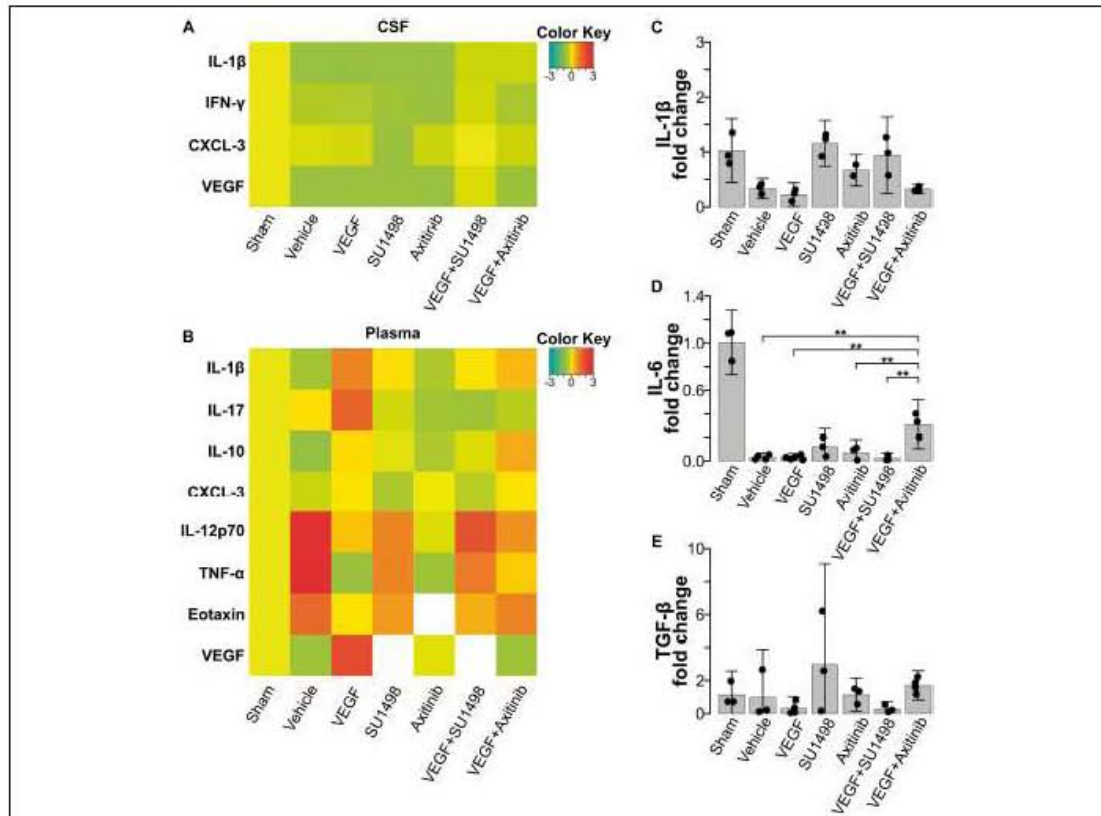
Even though the lower concentrations of NMDA tested here did not produce a substantial decrease of neuronal viability, neurons exposed to these conditions developed morphological signs of structural damage, mainly characterized by dendritic spine loss. Addition of VEGF to the culture media also prevented this morphological change and preserved spine structures although it did not modify the length of primary neurites (Figures 6D-F). With these experiments, we showed that VEGF executes trophic effects on cortical neurons to allow them to grow healthy in culture and make them less susceptible to excitotoxic death.

Finally, in an independent set of experiments, we tested the role of VEGFR1 and VEGFR2 in driving the pro-survival effects. Strikingly, blocking VEGFR2 activation by addition of SU1498 also resulted in a significant increase in neuronal protection, which was further potentiated by the co-administration of VEGF (Figure 6G). By contrast, inhibiting the activation of both receptors with Axitinib prevented entirely the neuroprotection exerted by VEGF (Figure 6G). These results replicated well the effects that we described first with the *in vivo* model, therefore, proving that the mechanisms of protection seen partially encompassed a direct involvement of neuronal receptors.

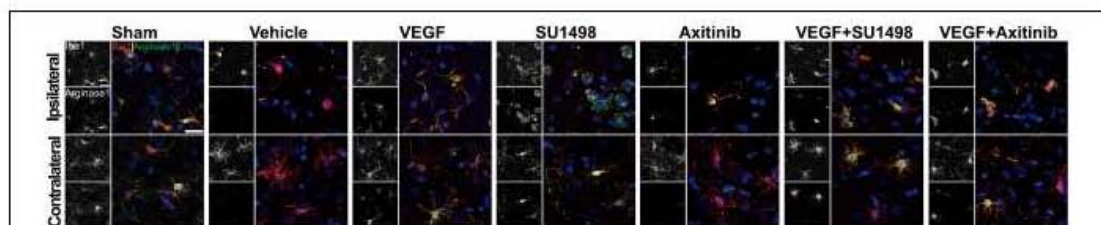
## DISCUSSION

Since VEGF is a molecule with pleiotropic actions that can execute its functions by binding a number of different receptors, the exact role of VEGF increased expression after stroke in neuroprotective mechanisms has been the core of a controversy. The prevailing idea on the dual effects exerted by VEGF states that the dominant actions of this trophic factor, whether neuroprotective or detrimental, are chiefly dictated by the timing, dosage, and route of administration in experimental models of stroke (Wittko-Schneider et al., 2013; Geiseler and Morland, 2018). Moreover, it has been amply described that excessive levels of VEGF in the early phase following stroke promote BBB alterations and a general state that favors neurodegeneration. Interestingly, delayed administration of VEGF is more likely to result in neuroprotection (Sun et al., 2003; Dziejko et al., 2013), even though, others have also reported the protective effect of an early VEGF i.c.v. administration (Kaya et al., 2005).





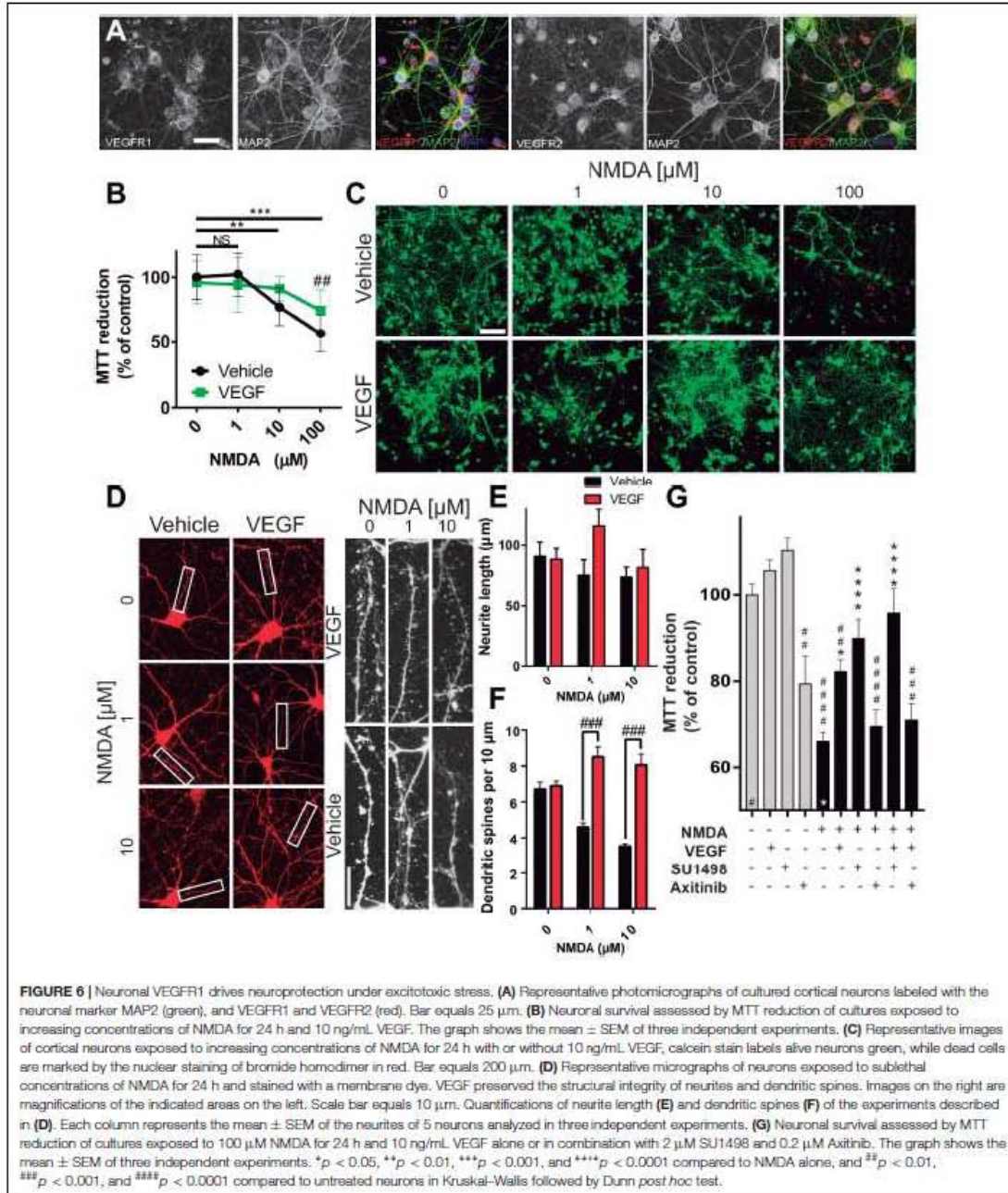
**FIGURE 4 |** VEGFR1-dependent neuroprotection does not reflect on changes in peripheral inflammatory markers. **(A)** Heatmap of cytokines and VEGF detected in CSF 24 h after stroke. **(B)** Heatmap of peripheral cytokines and VEGF detected in plasma 24 h after stroke. No significant differences were detected in these markers in the acute phase following stroke. White colored areas are from groups with undetectable readings. Changes in transcriptional expression of **(C)** IL-1 $\beta$ , **(D)** IL-6, and **(E)** TGF- $\beta$ , determined by RT-qPCR relative to GAPDH in blood 24 h following stroke. No differences were found among experimental groups.



**FIGURE 5 |** Blockade of VEGFR1 impedes the polarization of microglia to the M2 phenotype. Representative images of brain sections co-labeled with the microglia marker Iba-1 (red) and the M2 phenotype indicator arginase-1 (green). Images were taken from the somatosensory cortex adjacent to infarct core. Amoeboid-like activated morphology is present under all MCAO conditions in the ipsilateral side. M2 polarizations are evident in most of the Iba-1 positive cells in the MCAO groups treated with vehicle, VEGF, SU1498 and the combination of VEGF and SU1498. Animals injected with the pan-VEGFR blocker Axitinib do not show labeling of M2 polarization in the activated microglia on the ipsilateral side. Bar equals 20  $\mu$ m.

In the brain, VEGFR1 and VEGFR2 are the most expressed receptors, with VEGFR1 showing a higher density in neurons (Yang et al., 2003; Du et al., 2010). Several reports have

been published over the years indicating that VEGFR2 is the receptor predominantly responsible for neuroprotective actions, mainly by driving pro-survival signaling mediated by



PI-3K/PKB and MEK/Erk pathways (Greenberg and Jin, 2013). Here, we found that the preferential activation of VEGFR1 by the endogenous ligand promotes neuronal protection and

prevents the presentation of large volume infarcts; this is highly correlated with neurological performance. Of note, the concurrent activation of VEGFR2 prevents this effect, even in the

presence of excess ligand. Strikingly, such protection still happens at the cellular level, where neurons are better protected when challenged to NMDA-induced excitotoxicity by the activation of VEGFR1 if VEGFR2 is blocked.

VEGF along with its receptors 1 and 2 are transcriptionally upregulated following stroke (Hayashi et al., 1997; Issa et al., 1999; Plate et al., 1999; Marti et al., 2000; Hai et al., 2003; Stowe et al., 2007, 2008) in a long-lasting fashion (Zhang et al., 2002), through the stabilization and subsequent binding of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) to the hypoxia response element sequence in their promoters (Forsythe et al., 1996). Also, it has been shown that exogenous administration of VEGF causes the upregulation of VEGFR1 and VEGFR2 (Krum et al., 2008). Cellular distribution of VEGFRs might be key in understanding the temporal regulation of vasculature adaptations in the acute phase post-stroke. In this regard, the apicobasal localization of VEGFR1 and VEGFR2 is different, where VEGFR2 is predominantly expressed in the basal side and VEGFR1 in the apical pole that produces a differential response when the ligand acts at the circulation or the parenchymal sides of endothelial cells (Hudson et al., 2014). It has also been reported that the expression of VEGFR1 is upregulated while VEGFR2 is downregulated in endothelial cells following hypoxia, which changes the VEGFR1:VEGFR2 ratio altering the ultimate responses on cell viability and recovery (Ulyatt et al., 2011). It is also important to point out that the affinity of VEGFR1 for VEGF is about 1 order of magnitude higher than the one for VEGFR2 ( $K_d$  2–10 pM for VEGFR1 and 75–250 pM for VEGFR2) (de Vries et al., 1992; Ferrara, 2004; Shibuya, 2006). Although VEGFR3 is expressed in the adult rat brain (Hou et al., 2011), we ruled out the participation of this receptor in the neuroprotection seen here, even when it can also be inhibited by Axitinib, because it does not get activated by VEGF-A (Olsson et al., 2006; Leppänen et al., 2013) and its expression is primarily restricted to lymphatic endothelial cells (Iljin et al., 2001), which have a very low relative abundance in the brain (Louveau et al., 2015).

Our observations lead to reaffirm the critical role of VEGFR1 in the endogenous neuroprotective mechanisms elicited after ischemic insults to the brain. In this regard, it is known that the deletion of VEGF-B, a specific ligand for VEGFR1, produces 50% larger infarcts in mice when subjected to the permanent occlusion of the MCA in comparison to WT animals, by inhibition of apoptotic executioner molecules (Li et al., 2008). Protein analysis identified a significant increase of VEGF-B in CSF and the ischemic hemispheres, with increased VEGFR1 activation that also correlated with an increase in Akt phosphorylation, whereas an increase in VEGF in the contralateral hemisphere correlates with a significant increase in vascular density 7 days post-stroke (Guan et al., 2011). VEGFR1 activation in pericytes promotes the formation of stable new vessels in a mechanistic way independent of endothelial cells, and also slightly attenuated inflammation when administered in the sub-acute phase post-stroke (Jean LeBlanc et al., 2018). In this sense, it has also been shown that PlGF, a specific ligand for VEGFR1, is the most efficient promoter of angiogenesis, which produces mature non-leaky new vessels (Luttun et al., 2002; Gaál et al., 2013).

The direct VEGFR1 activation in neurons might be a mechanism more relevant than promoting healthy angiogenesis (Poesen et al., 2008; Dhondt et al., 2011; Ishrat et al., 2018). In this regard, it is noteworthy that VEGF associates to neurons in infarct and peri-infarct brain regions in a non-human primate model of stroke (Stowe et al., 2007), and interestingly, such association can even be more relevant than the interaction of this growth factor with astrocytes (Shen et al., 2018). Our results, however, indicate that all these neuroprotective mechanisms driven by VEGFR1 are suppressed in the first hours following stroke by the activation of VEGFR2. The exact mechanisms underlying this phenomenon are not fully elucidated, but they might involve the suppression of endoplasmic reticulum stress and apoptosis (Feng et al., 2019).

VEGF has some interesting roles in regulating neuroinflammation. It has been shown that macrophages express more VEGF in response to disturbances in brain metabolic homeostasis, especially responding to decreased glucose incorporation (Jais et al., 2016), and microglia in chronically affected regions of CNS upregulate their expression of VEGF (Nikodemova et al., 2014). However, not much is known about the involvement of VEGF, or its receptors, in the polarization of macrophages/microglia under inflammation. Interestingly, very recent evidence indicates that the antiangiogenic VEGF isoform VEGF<sub>164b</sub> is capable of blocking VEGFR1 prompting the M1 polarization of peripheral macrophages (Ganta et al., 2019), although it is known that this form of VEGF has neuroprotective effects in the CNS (Beazley-Long et al., 2013). Also, M2-polarized peripheral macrophages in culture are known to upregulate their VEGFR1 mRNA expression (Melton et al., 2015), which in microglial cells could lead to the inhibition of the expression of the scavenger receptor A following stroke (Xu et al., 2017). With the determinations carried out in the present study, we were unable to obtain reliable readings of the levels of soluble mediators of inflammation poured on CSF and plasma, however, many of these markers, like IL-6, have been disregarded as important predictors of the outcome (Clark Wayne et al., 2000; Worthmann et al., 2010). Nonetheless, we could characterize the overall response of microglia polarizing to the anti-inflammatory phenotype under the experimental conditions that allow the activation of VEGFR1. More detailed analyses are required to characterize these responses at the molecular and cellular levels.

## CONCLUSION

We found that the activation of VEGFR2 in the first hours post-stroke obstructs endogenously-coded mechanisms of adaptation to injury in the brain. We propose here the existence of a VEGFR2-mediated antagonism of VEGFR1, which has not been reported previously. This process would constitute a fundamental mechanism of endogenous operations that drive adaptive responses in the brain after stroke that is worthy of further exploration. Our results also strengthen the notion that VEGFR1 has a critical role in neuroprotection, and that targeting this receptor would be useful at developing restorative therapies for stroke.

## DATA AVAILABILITY

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

## ETHICS STATEMENT

This study was carried out 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).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

AC-R and LT-y-R conceived the project and designed the experiments. AC-R conducted the *in vivo* experiments, wrote the R-based scripts to process data, and carried out statistical analyses. YH-R cross-validated the neurological assessments. ANC-R and AP-P conducted the *in vitro* experiments. RR-H was responsible for confocal microscopy acquisition and analyses. AC-R, ANC-R, YH-R, and LT-y-R analyzed the data. LT-y-R wrote the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

## REFERENCES

Beazley-Long, N., Hua, J., Jehle, T., Hulse, R. P., Dersch, R., Lehrling, C., et al. (2013). VEGF-A165b is an endogenous neuroprotective splice isoform of vascular endothelial growth factor A *in vivo* and *in vitro*. *Am. J. Pathol.* 183, 918–929. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.05.031

Burguete, M. C., Torregrosa, G., Pérez-Asensio, F. J., Castelló-Ruiz, M., Salom, J. B., Gil, J. V., et al. (2006). Dietary phytoestrogens improve stroke outcome after transient focal cerebral ischemia in rats. *Eur. J. Neurosci.* 23, 703–710. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04599.x

Clark Wayne, M., Rinker Lisa, G., Lessov Nikola, S., Hazel, K., Hill, J. K., Stenzel-Poore, M., et al. (2000). Lack of interleukin-6 expression is not protective against focal central nervous system ischemia. *Stroke* 31, 1715–1720. doi: 10.1161/01.STR.31.7.1715

de Vries, C., Escobedo, J. A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N., and Williams, L. T. (1992). The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255, 989–991. doi: 10.1126/science.1312256

Dhondt, J., Peeraer, E., Verheyen, A., Nuydens, R., Buyschaert, I., Poesen, K., et al. (2011). Neuronal FLT1 receptor and its selective ligand VEGF-B protect against retrograde degeneration of sensory neurons. *FASEB J.* 25, 1461–1473. doi: 10.1096/fj.10-170944

Du, H., Li, P., Pan, Y., Li, W., Hou, J., Chen, H., et al. (2010). Vascular endothelial growth factor signaling implicated in neuroprotective effects of placental growth factor in an *in vitro* ischemic model. *Brain Res.* 1357, 1–8. doi: 10.1016/j.brainres.2010.07.015

Dzietko, M., Derugin, N., Wendland, M. F., Vexler, Z. S., and Ferriero, D. M. (2013). Delayed VEGF treatment enhances angiogenesis and recovery after neonatal focal rodent stroke. *Transl. Stroke Res.* 4, 189–200. doi: 10.1007/s12975-012-0221-6

Eliceiri, B. P., Paul, R., Schwartzberg, P. L., Hood, J. D., Leng, J., and Chesh, D. A. (1999). Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol. Cell* 4, 915–924. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80221-X

Feng, S.-Q., Zong, S.-Y., Liu, J.-X., Chen, Y., Xu, R., Yin, X., et al. (2019). VEGF antagonism attenuates cerebral ischemia/reperfusion-induced injury via inhibiting endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Biol. Pharm. Bull.* 42, 692–702. doi: 10.1248/bpb.18-00628

## FUNDING

This work was supported by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN226617), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT; CB219542/13219), and the Committee for Aid and Education in Neurochemistry of the International Society for Neurochemistry and the International Brain Research Organization Return Home Program (2014) grants to LT-y-R. AC-R, ANC-R, and YH-R are recipients of doctoral scholarships from the CONACYT (280986/277660/428473).

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jaime Rogerio Rios for his contribution with microglia immunofluorescence stainings, Cristina Aranda Fraustro for administrative assistance, Dr. Laura Ongay-Larios for her expert aid with RT-qPCR, and Gabriela Meneses and Dr. Edda Sciutto for their helpful assistance with the MAGPIX system. AC-R conducted this study in partial fulfillment of the requirements of the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas of Universidad Nacional Autónoma de México.

Ferrara, N. (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr. Rev.* 25, 581–611. doi: 10.1210/er.2003-0027

Forstreuter, F., Lucius, R., and Mentlein, R. (2002). Vascular endothelial growth factor induces chemotaxis and proliferation of microglial cells. *J. Neuroimmunol.* 132, 93–98. doi: 10.1016/s0165-5728(02)00315-6

Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D., et al. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell Biol.* 16, 4604–4613. doi: 10.1128/mcb.16.9.4604

Gaal, E. I., Tammela, T., Anisimov, A., Marbacher, S., Honkanen, P., Zarkada, G., et al. (2013). Comparison of vascular growth factors in the murine brain reveals placenta growth factor as prime candidate for CNS revascularization. *Blood* 122, 658–665. doi: 10.1182/blood-2012-07-441527

Ganta, V. C., Choi, M., Farber, C. R., and Annex, B. H. (2019). Antiangiogenic VEGF165b regulates macrophage polarization via S100A8/S100A9 in peripheral artery disease. *Circulation* 139, 226–242. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034165

Geiseler, S. J., and Morland, C. (2018). The janus face of VEGF in stroke. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1362. doi: 10.3390/ijms19051362

Grassot, J., Gouy, M., Perrière, G., and Mouchiroud, G. (2006). Origin and molecular evolution of receptor tyrosine kinases with immunoglobulin-like domains. *Mol. Biol. Evol.* 23, 1232–1241. doi: 10.1093/molbev/msk007

Greenberg, D. A., and Jin, K. (2013). Vascular endothelial growth factors (VEGFs) and stroke. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 1753–1761. doi: 10.1007/s00018-013-1282-8

Guan, W., Somanath, P. R., Kozak, A., Goc, A., El-Remessy, A. B., Ergul, A., et al. (2011). Vascular protection by angiotensin receptor antagonism involves differential VEGF expression in both hemispheres after experimental stroke. *PLoS One* 6:e24551. doi: 10.1371/journal.pone.0024551

Hai, J., Li, S.-T., Lin, Q., Pan, Q.-G., Gao, F., and Ding, M.-X. (2003). Vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis induced by chronic cerebral hypoperfusion in rat brain. *Neurosurgery* 53, 963–970; discussion 970–972.

Hayashi, T., Abe, K., Suzuki, H., and Itoyama, Y. (1997). Rapid induction of vascular endothelial growth factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 28, 2039–2044. doi: 10.1161/01.str.28.10.2039

- Hou, Y., Shin, Y.-J., Han, E. J., Choi, I.-S., Park, J.-M., Cha, J.-H., et al. (2011). Distribution of vascular endothelial growth factor receptor-3/Flt4 mRNA in adult rat central nervous system. *J. Chem. Neuroanat.* 42, 56–64. doi: 10.1016/j.jchemneu.2011.06.001
- Hu, X., Li, P., Guo, Y., Wang, H., Leak, R. K., Chen, S., et al. (2012). Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke* 43, 3063–3070. doi: 10.1161/STROKEAHA.112.659656
- Huang, H., Parlier, R., Shen, J.-K., Lütty, G. A., and Vinorel, S. A. (2013). VEGF receptor blockade markedly reduces retinal microglia/macrophage infiltration into laser-induced CNV. *PLoS One* 8:e71808. doi: 10.1371/journal.pone.0071808
- Hudson, N., Powner, M. B., Sarker, M. H., Burgoyne, T., Campbell, M., Ockrim, Z. K., et al. (2014). Differential apicobasal VEGF signaling at vascular blood-neural barriers. *Dev. Cell* 30, 541–552. doi: 10.1016/j.devcel.2014.06.027
- Ilijin, K., Karkkainen, M. J., Lawrence, E. C., Kimak, M. A., Uutela, M., Taipale, J., et al. (2001). VEGFR3 gene structure, regulatory region, and sequence polymorphisms. *FASEB J.* 15, 1028–1036. doi: 10.1096/fj.00-0383.com
- Inai, T., Mancuso, M., Hashizume, H., Baffert, F., Haskell, A., Baluk, P., et al. (2004). Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts. *Am. J. Pathol.* 165, 35–52. doi: 10.1016/s0002-9440(10)63273-7
- Ishrat, T., Soliman, S., Eldahshan, W., Pillai, B., Ergül, A., and Fagan, S. C. (2018). Silencing VEGF-B diminishes the neuroprotective effect of candesartan treatment after experimental focal cerebral ischemia. *Neurochem. Res.* 43, 1869–1878. doi: 10.1007/s11064-018-2604-x
- Issa, R., Krupinski, J., Bujny, T., Kumar, S., Kaluza, J., and Kumar, P. (1999). Vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, in human brain tissue after ischemic stroke. *Lab. Invest.* 79, 417–425.
- Jais, A., Solas, M., Backes, H., Chaurasia, B., Kleinriders, A., Theurich, S., et al. (2016). Myeloid-cell-derived VEGF maintains brain glucose uptake and limits cognitive impairment in obesity. *Cell* 165, 882–895. doi: 10.1016/j.cell.2016.03.033
- Jean LeBlanc, N., Guruswamy, R., and ElAli, A. (2018). Vascular endothelial growth factor isoform-B stimulates neurovascular repair after ischemic stroke by promoting the function of pericytes via vascular endothelial growth factor receptor-1. *Mol. Neurobiol.* 55, 3611–3626. doi: 10.1007/s12035-017-0478-6
- Kaya, D., Gürsoy-Ozdemir, Y., Yemisci, M., Tuncer, N., Aktan, S., and Dalkara, T. (2005). VEGF protects brain against focal ischemia without increasing blood-brain permeability when administered intracerebroventricularly. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 25, 1111–1118. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600109
- Kim, E., Yang, J., Park, K. W., and Cho, S. (2018). Inhibition of VEGF signaling reduces diabetes-exacerbated brain swelling, but not infarct size, in large cerebral infarction in mice. *Transl. Stroke Res.* 9, 540–548. doi: 10.1007/s12975-017-0601-z
- Krum, J. M., Mani, N., and Rosenstein, J. M. (2008). Roles of the endogenous VEGF receptors flt-1 and flk-1 in astroglial and vascular remodeling after brain injury. *Exp. Neurol.* 212, 108–117. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.03.019
- Lelli, A., Gervais, A., Colin, C., Chéret, C., Ruiz de Almodovar, C., Carmeliet, P., et al. (2013). The NADPH oxidase Nox2 regulates VEGFR1/CSF-1R-mediated microglial chemotaxis and promotes early postnatal infiltration of phagocytes in the subventricular zone of the mouse cerebral cortex. *Glia* 61, 1542–1555. doi: 10.1002/glia.22540
- Leppänen, V.-M., Tvorogov, D., Kisko, K., Prota, A. E., Jeltsch, M., Anisimov, A., et al. (2013). Structural and mechanistic insights into VEGF receptor 3 ligand binding and activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 12960–12965. doi: 10.1073/pnas.1301415110
- Li, Y., Zhang, F., Nagai, N., Tang, Z., Zhang, S., Scotney, P., et al. (2008). VEGF-B inhibits apoptosis via VEGFR-1-mediated suppression of the expression of BH3-only protein genes in mice and rats. *J. Clin. Invest.* 118, 913–923. doi: 10.1172/JCI33673
- Longa, E. Z., Weinstein, P. R., Carlson, S., and Cummins, R. (1989). Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20, 84–91. doi: 10.1161/01.str.20.1.84
- Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T. J., Eccles, J. D., Rouhani, S. J., Peske, J. D., et al. (2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* 523, 337–341. doi: 10.1038/nature14432
- Luttun, A., Tjwa, M., and Carmeliet, P. (2002). Placental growth factor (PGF) and its receptor Flt-1 (VEGFR-1): novel therapeutic targets for angiogenic disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 979, 80–93. doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04870.x
- Ma, Y., Zechariah, A., Qu, Y., and Hermann, D. M. (2012). Effects of vascular endothelial growth factor in ischemic stroke. *J. Neurosci. Res.* 90, 1873–1882. doi: 10.1002/jnr.23088
- Marti, H. J. H., Bernaudin, M., Bellail, A., Schoch, H., Euler, M., Petit, E., et al. (2000). Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am. J. Pathol.* 156, 965–976. doi: 10.1016/s0002-9440(10)64964-4
- Mattsson, B., Sørensen, J. C., Zimmer, J., and Johansson, B. B. (1997). Neural grafting to experimental neocortical infarcts improves behavioral outcome and reduces thalamic atrophy in rats housed in enriched but not in standard environments. *Stroke* 28, 1225–1231; discussion 1231–1232.
- McCluskey, L., Campbell, S., Anthony, D., and Allan, S. M. (2008). Inflammatory responses in the rat brain in response to different methods of intra-cerebral administration. *J. Neuroimmunol.* 194, 27–33. doi: 10.1016/j.jneuroim.2007.11.009
- Melton, D. W., McManus, L. M., Gelfond, J. A. L., and Shireman, P. K. (2015). Temporal phenotypic features distinguish polarized macrophages in vitro. *Autoimmunity* 48, 161–176. doi: 10.3109/08916934.2015.1027816
- Meyer, R. D., Mohammadi, M., and Rahimi, N. (2006). A single amino acid substitution in the activation loop defines the decoy characteristic of VEGFR-1/FLT-1. *J. Biol. Chem.* 281, 867–875. doi: 10.1074/jbc.M506454200
- Nikodemova, M., Small, A. L., Smith, S. M. C., Mitchell, G. S., and Watters, J. J. (2014). Spinal but not cortical microglia acquire an atypical phenotype with high VEGF, galectin-3 and osteopontin, and blunted inflammatory responses in ALS rats. *Neurobiol. Dis.* 69, 43–53. doi: 10.1016/j.nbd.2013.11.009
- Olsson, A.-K., Dimberg, A., Kreuger, J., and Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling: in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 359–371. doi: 10.1038/nrm1911
- Park, J. E., Chen, H. H., Winer, J., Houck, K. A., and Ferrara, N. (1994). Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J. Biol. Chem.* 269, 25646–25654.
- Paul, R., Zhang, Z. G., Eliceiri, B. P., Jiang, Q., Bocchia, A. D., Zhang, R. L., et al. (2001). Src deficiency or blockade of Src activity in mice provides cerebral protection following stroke. *Nat. Med.* 7, 222–227. doi: 10.1038/84675
- Plate, K. H., Beck, H., Danner, S., Allegrini, P. R., and Wiessner, C. (1999). Cell type specific upregulation of vascular endothelial growth factor in an MCA-occlusion model of cerebral infarct. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 654–666. doi: 10.1097/00005072-199906000-00010
- Poesen, K., Lambrechts, D., Van Damme, P., Dhondt, J., Bender, F., Frank, N., et al. (2008). Novel role for vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 and its ligand VEGF-B in motor neuron degeneration. *J. Neurosci.* 28, 10451–10459. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1092-08.2008
- Rahimi, N. (2006). VEGFR-1 and VEGFR-2: two non-identical twins with a unique physiognomy. *Front. Biosci.* 11, 818–829.
- Schallert, T., Fleming, S. M., Leasure, J. L., Tillerson, J. L., and Bland, S. T. (2000). CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology* 39, 777–787. doi: 10.1016/s0028-3908(00)00005-8
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682. doi: 10.1038/nmeth.2019
- Shen, Y., Gu, J., Liu, Z., Xu, C., Qian, S., Zhang, X., et al. (2018). Inhibition of HIF-1 $\alpha$  reduced blood brain barrier damage by regulating MMP-2 and VEGF during acute cerebral ischemia. *Front. Cell. Neurosci.* 12:288. doi: 10.3389/fncel.2018.00288
- Shibuya, M. (2006). Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis* 9, 225–230; discussion 231.
- Simons, M., Gordon, E., and Claesson-Welsh, L. (2016). Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 611–625. doi: 10.1038/nrm.2016.87
- Stowe, A. M., Plautz, E. J., Eisner-Janowicz, I., Frost, S. B., Barbay, S., Zoubina, E. V., et al. (2007). VEGF protein associates to neurons in remote regions following cortical infarct. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 76–85. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600320

- Stowe, A. M., Plautz, E. J., Nguyen, P., Frost, S. B., Eisner-Janowicz, I., Barbay, S., et al. (2008). Neuronal HIF-1 alpha protein and VEGFR-2 immunoreactivity in functionally related motor areas following a focal MI infarct. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 612–620. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600560
- Strawn, L. M., McMahon, G., App, H., Schreck, R., Kuchler, W. R., Longhi, M. P., et al. (1996). Flk-1 as a target for tumor growth inhibition. *Cancer Res.* 56, 3540–3545.
- Sun, Y., Jin, K., Xie, L., Childs, J., Mao, X. O., Logvinova, A., et al. (2003). VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J. Clin. Invest.* 111, 1843–1851. doi: 10.1172/JCI17977
- Tovar-y-Romo, L. B., Bumpus, N. N., Pomerantz, D., Avery, L. B., Sacktor, N., McArthur, J. C., et al. (2012). Dendritic spine injury induced by the 8-hydroxy metabolite of efavirenz. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 343, 696–703. doi: 10.1124/jpet.112.195701
- Tovar-y-Romo, L. B., Penagos-Puig, A., and Ramírez-Jarquín, J. O. (2016). Endogenous recovery after brain damage: molecular mechanisms that balance neuronal life/death fate. *J. Neurochem.* 136, 13–27. doi: 10.1111/jnc.13362
- Tovar-y-Romo, L. B., and Tapia, R. (2012). Delayed administration of VEGF rescues spinal motor neurons from death with a short effective time frame in excitotoxic experimental models in vivo. *ASN Neuro* 4:e00081. doi: 10.1042/AN20110057
- Ulfyatt, C., Walker, J., and Ponnambalam, S. (2011). Hypoxia differentially regulates VEGFR1 and VEGFR2 levels and alters intracellular signaling and cell migration in endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404, 774–779. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.12.057
- van Bruggen, N., Thibodeaux, H., Palmer, J. T., Lee, W. P., Fu, L., Cairns, B., et al. (1999). VEGF antagonism reduces edema formation and tissue damage after ischemia/reperfusion injury in the mouse brain. *J. Clin. Invest.* 104, 1613–1620. doi: 10.1172/JCI8218
- Weis, S. M., and Chersesh, D. A. (2005). Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature* 437, 497–504. doi: 10.1038/nature03987
- Wittko-Schneider, I. M., Schneider, F. T., and Plate, K. H. (2013). Brain homeostasis: VEGF receptor 1 and 2—two unequal brothers in mind. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 1705–1725. doi: 10.1007/s00018-013-1279-3
- Worthmann, H., Tryc, A. B., Goldbecker, A., Ma, Y. T., Tountopoulou, A., Hahn, A., et al. (2010). The temporal profile of inflammatory markers and mediators in blood after acute ischemic stroke differs depending on stroke outcome. *Cerebrovasc. Dis.* 30, 85–92. doi: 10.1159/000314624
- Wu, L., Ye, Z., Pan, Y., Li, X., Fu, X., Zhang, B., et al. (2018). Vascular endothelial growth factor aggravates cerebral ischemia and reperfusion-induced blood-brain-barrier disruption through regulating LOC102640519/HOXC13/ZO-1 signaling. *Exp. Cell Res.* 369, 275–283. doi: 10.1016/j.yexcr.2018.05.029
- Xu, Z., Han, K., Chen, J., Wang, C., Dong, Y., Yu, M., et al. (2017). Vascular endothelial growth factor is neuroprotective against ischemic brain injury by inhibiting scavenger receptor A expression on microglia. *J. Neurochem.* 142, 700–709. doi: 10.1111/jnc.14108
- Yang, S.-Z., Zhang, L.-M., Huang, Y.-L., and Sun, F.-Y. (2003). Distribution of Flk-1 and Flt-1 receptors in neonatal and adult rat brains. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 274, 851–856. doi: 10.1002/ar.a.10103
- Zhang, H., Shen, Y., Wang, W., and Gao, H. (2015). Rat model of focal cerebral ischemia in the dominant hemisphere. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8, 504–511.
- Zhang, Z. G., Zhang, L., Jiang, Q., Zhang, R., Davies, K., Powers, C., et al. (2000). VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J. Clin. Invest.* 106, 829–838. doi: 10.1172/JCI9369
- Zhang, Z. G., Zhang, L., Tsang, W., Soltanian-Zadeh, H., Morris, D., Zhang, R., et al. (2002). Correlation of VEGF and angiopoietin expression with disruption of blood-brain barrier and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22, 379–392. doi: 10.1097/00004647-200204000-00002

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Cárdenas-Rivera, Campero-Romero, Heras-Romero, Penagos-Puig, Rincón-Heredia and Tovar-y-Romo. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## PAPEL DE IL-17 EN LA RESPUESTA NEUROINFLAMATORIA EN EL INFARTO CEREBRAL

Alfredo Cárdenas-Rivera\*

\*Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

La interleucina 17A es una citocina pro-inflamatoria expresada principalmente por los linfocitos T. Durante el proceso neuroinflamatorio que ocurre en el infarto cerebral en el Sistema Nervioso Central (SNC), se presentan elevados niveles de IL-17A. Recientemente se ha demostrado que la microglia y astrocitos activados en estas condiciones, sintetizan y expresan importantes cantidades de IL-17 al microambiente inflamatorio en la fase aguda, así como también células infiltrantes como los linfocitos  $\gamma\delta$ . Sin embargo, sus efectos a nivel del parénquima cerebral y en la modulación de la respuesta neuroinflamatoria en el infarto cerebral aún no son completamente entendidos. En esta revisión, mostramos los efectos de IL17A en los componentes principales de la respuesta neuroinflamatoria.

### Introducción

El infarto cerebral es una enfermedad devastadora que afecta a millones de personas cada año, es una de las primeras causas de muerte a nivel mundial<sup>1</sup> y es la primera causa de enfermedad discapacitante en el ser humano<sup>2</sup>. En la lesión producida por el infarto cerebral isquémico se han caracterizado tres zonas, una central donde la disminución del flujo sanguíneo fue severa llamada foco, una circundante a esta donde la circulación es parcialmente recuperada por la circulación colateral llamada penumbra y

una zona de transición entre el tejido lesionado por la isquemia y el tejido sano llamado zona peri-infarto<sup>3-5</sup>. Las neuronas afectadas por el estrés metabólico producido por el déficit de oxígeno y nutrientes en el infarto isquémico cerebral, liberan señales de daño (DAMPs) como HMGB1, proteína amiloide  $\beta$ , HSP60, ATP o UTP<sup>6</sup>. Estas señales moleculares, también llamadas alarminas, activan rápidamente a los centinelas del SNC, las microglías<sup>4,5</sup>. Las microglías son los equivalentes tisulares de los macrófagos y son la primera línea de defensa en el SNC, las microglías inician y modulan la respuesta neuroinflamatoria en las primeras horas pos isquemia, llamada fase aguda<sup>7</sup>. Estas microglías activadas liberan citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IFN- $\gamma$  que activan a los astrocitos<sup>8</sup>, los cuales también participan en la regulación del microambiente inflamatorio<sup>8,9</sup>. Teóricamente este microambiente favorecería la polarización de las microglías/macrófagos a un fenotipo M1 pro-inflamatorio neurotóxico caracterizado por la expresión de IFN- $\gamma$ <sup>6</sup>. Sin embargo, trabajos recientes muestran que el principal fenotipo presente en la fase aguda es el M2 que tiene un perfil anti-inflamatorio<sup>10</sup>, además el volumen de infarto producido por oclusión transitoria de la arteria cerebral media (t-MCAo) en ratones transgénicos *Knock out* para IFN- $\gamma$  no muestra diferencia estadísticamente significativa con el daño producido en ratones *wild type*<sup>11</sup>. Estos resultados sugieren un segundo eje inflamatorio

paralelo e independiente a  $IFN-\gamma$ , que ha sido asociado a la expresión de interleucina pro-inflamatoria IL-17A<sup>12-14</sup>. En esta revisión abarcaremos la distribución temporo-espacial de la expresión de IL-17A y los principales efectos de esta sobre los componentes celulares de la respuesta neuroinflamatoria en el infarto cerebral.

## IL-17 y su receptor

La interleuquina 17A, también llamada IL-17 o CTLA-8; es una proteína pro-inflamatoria, relacionada a la respuesta inmune frente a bacterias extracelulares, hongos<sup>15</sup>, protozoarios<sup>16</sup>; así como también en enfermedades autoinmunes<sup>17</sup> y cáncer<sup>18</sup>. IL-17A es el miembro más estudiado de una familia

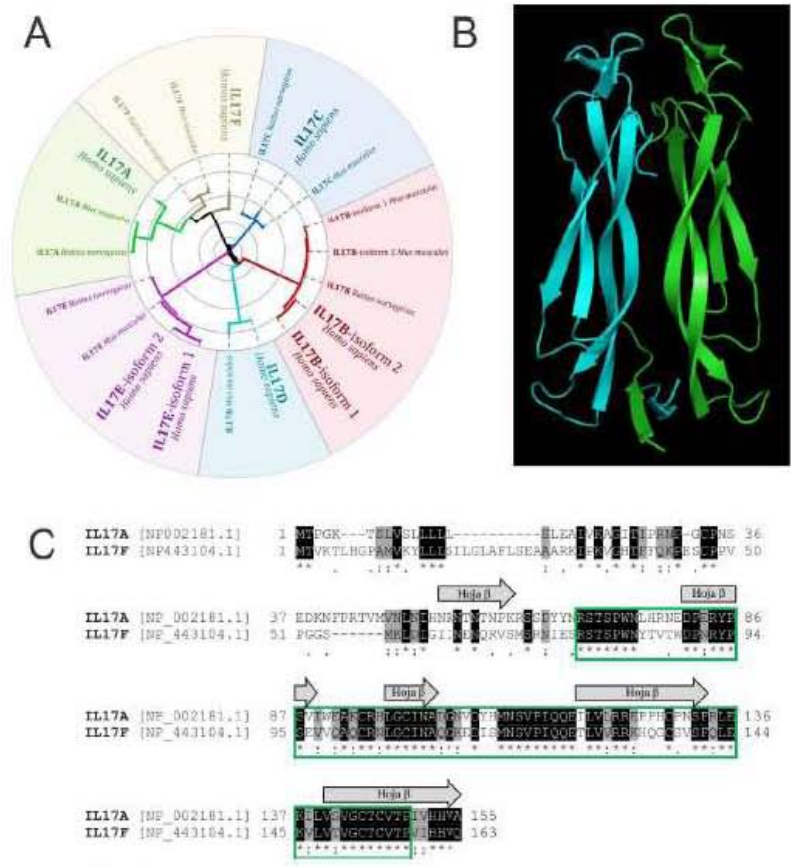


Figura 1 IL-17A

(A) Abrol de neighbor joining de la familia IL-17 de Homo sapiens y sus ortólogos en mus musculus y rattus norvegicus. Se resalta en colores los 6 miembros de la familia. (B) Proyección tridimensional de un homodímero de IL-17A (turquesa y verde), se aprecia las 6 hojas  $\beta$  plegadas en cada monómero (PDB ID: 4HR9)<sup>21</sup>. (C) Alineamiento de la secuencia proteínica de IL-17A e IL-17F de Homo sapiens, las cajas negras representan los sitios conservados, las cajas plomas los sitios similares, la hojas  $\beta$  plegadas se representan como flechas paralelas a las secuencias, y la caja verde señala el dominio pfam06083 de la familia de IL-17.



multigénica llamada familia IL-17<sup>19,20</sup>, que está formada por seis miembros: IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (también llamado IL25) e IL-17F<sup>21-24</sup> (Fig.1A). IL-17A está codificado por un solo gen en el cromosoma 6p12.2 en seres humanos (Gene ID: 3605), existen secuencias ortólogas únicas tanto en ratón (Gene ID: 16171) como en rata (Gene ID: 301289). Este gen codifica para un producto proteínico de 155 aa. llamado interleucina 17A (NP002181.1), con una conformación tridimensional de 6 hojas  $\beta$  plegada (Fig.1B). IL-17A está estrechamente relacionado con IL-17F, con el que tiene una identidad del 56% y similitud del 70% (Fig. 1C), que es la más alta en comparación al resto de miembros de la familia (Tabla 1). IL-17A e IL-17F se han asociado a procesos de activación y reclutamiento de neutrófilos hacia el sitio de inflamación<sup>23,25</sup>. La expresión de IL-17A está usualmente asociada a Linfocitos CD4<sup>+</sup> T helper (Th17), pero también se ha descrito que es expresada por otras células del sistema inmunológico como: CD8<sup>+</sup> T cell (LT- CD8<sup>+</sup>), linfocitos T  $\gamma\delta$  (LT- $\gamma\delta$ ), células *Natural Killers* invariantes (iNKT), células parecidas a las inducidas en tejido linfoide (LTi-like), células linfoides inatas tipo 3 (ILC3s), macrófagos y neutrófilos<sup>12,20,25-28</sup>. Recientemente, se ha demostrado células como astrocitos<sup>29</sup> y microglías<sup>14</sup> también expresan IL-17A en condiciones de hipoxia que en el SNC. IL-17A, como homodímero o como heterodímero con IL-17F<sup>25</sup>, activa el receptor IL-17R, que a su vez es un heterodímero de dos subunidades, IL-17RA e IL-17RC<sup>19,25</sup>. El heterodímero de IL-17R está expresado ubicuamente en la mayoría de tejidos<sup>20,22</sup>, incluido el SNC<sup>12,14,30-34</sup> (ver Tabla 2), aunque no todas las neuronas expresan dicho receptor; ensayos de western blot y PCR muestran que cultivos primarios de neuronas

corticales no expresan constitutivamente el IL-17R<sup>14</sup>.

## Expresión de IL-17A en el infarto

La expresión de IL-17A se eleva rápidamente en el infarto cerebral. Estudios en seres humanos muestran que el número de células que expresan IL-17A, a las 48 horas, se incrementa 15 veces, en comparación del lado contralateral, manteniéndose elevado a lo largo de la primera semana<sup>35</sup>. La expresión de mRNA de IL-17 a nivel periférico, medido en células mononucleares de sangre periférica, correlaciona positivamente con el volumen del daño producido por el infarto cerebral en seres humanos<sup>36</sup>. El pico de expresión de IL-17A se da en el 3er día pos infarto, incrementando cuatro veces su valor basal<sup>36</sup>, este evento coincide con el pico de migración leucocitaria al parénquima lesionado<sup>34,37</sup>. La expresión de IL-17A a nivel periférico, se mantiene elevado a lo largo de las dos primeras semanas, para regresar a sus valor basal luego de la tercer semana<sup>36</sup>.

Estos resultados correlacionan con los obtenidos en modelos de infarto cerebral producido en ratones por oclusión transitoria de la arteria cerebral media (t-MCAo). La expresión de IL-17A se eleva desde el primer día luego de la isquemia, vista por ensayos western blot de homogenizado completo del hemisferio ipsilateral de ratones sometidos a t-MCAo, llegando a su pico el día 3 (5 veces su valor basal), luego disminuye parcialmente hacia el día 7, regresando a sus valores basales luego de la tercera semana<sup>29</sup>. Sin embargo, la expresión de IL-17 no es homogénea en el parénquima cerebral del hemisferio afectado por el infarto. En la zona peri-infarto de la corteza la expresión

Símbolo Oficial	Nombre	Otros nombres	Especie	Cromo.	GeneID	E	Isoforma 1		Isoforma 2		I	S
							RefSeq	Len	RefSeq	Len		
IL17A	interleukin 17A	IL17; CTLA8; IL-17; CTLA-8; IL-17A	<i>Homo sapiens</i>	6p12.2	3605	3	NP_002188.1	155			100%	100%
			<i>Mus musculus</i>	1A4	16171	3	NP_034602.1	158			62%	74%
			<i>Rattus norvegicus</i>	9q13	301289	3	NP_001100567.1	158			61%	76%
IL17B	interleukin 17B	NIRF; IL-20; IL-17B; ZCYTO7	<i>Homo sapiens</i>	5q32	27190	7	NP_055253.1	180	NP_001304916	128	40	51%
			<i>Mus musculus</i>	18E1	56069	4	XP_006526169.1	182	XP_006526171.1	122	40%	54%
			<i>Rattus norvegicus</i>	18q12.1	116472	4	NP_446248.1	180			40%	53%
IL17C	interleukin 17C	CX2; IL-17C	<i>Homo sapiens</i>	16q24.2	27189	3	NP_037413.1	197			40%	51%
			<i>Mus musculus</i>	8E1	234836	2	NP_665833.3	194			43%	52%
			<i>Rattus norvegicus</i>	19q12	691516	3	NP_001178644.1	203			33%	42%
IL17D	interleukin 17D	IL-17D	<i>Homo sapiens</i>	13q12.11	53342	5	NP_612141.1	202			37%	46%
			<i>Mus musculus</i>	14C3	239114	3	NP_665835.2	205			36%	46%
			<i>Homo sapiens</i>	14q11.2	64806	2	NP_073625.1	177	NP_758525.1	161	25%	41%
IL25	interleukin 25	IL17E	<i>Mus musculus</i>	14C2	140806	4	NP_542767.1	169			32%	46%
			<i>Rattus norvegicus</i>	15p13	501996	4	NP_001178936.1	169			31%	46%
			<i>Homo sapiens</i>	6p12.2	112744	4	NP_443104.1	163			56%	70%
IL17F	interleukin 17F	ML1; ML-1; CANDF6; IL-17F	<i>Mus musculus</i>	1A4	257630	4	NP_665855.2	161			56%	66%
			<i>Rattus norvegicus</i>	9q13	301291	5	NP_001015011.2	161			53%	64%
			<i>Homo sapiens</i>	6p12.2	112744	4	NP_443104.1	163			56%	70%

Tabla 1 Familia IL-17 de *Homo sapiens* y sus ortólogos en *Mus musculus* y *Rattus norvegicus*

de IL-17A se eleva rápidamente, llegando a quintuplicar su nivel basal en las primeras 12 horas, luego de lo cual comienza a disminuir<sup>30</sup>. Mientras que en otras regiones del cerebro, como el giro dentado (DG) y zona subventricular (SVZ), la elevación de L-17A es más tardía, llegando a sus picos de expresión en los días 14 y 21, respectivamente<sup>29</sup>. La expresión de IL-17A en líquido cefalorraquídeo (CSF) también se incrementa de forma aguda; ensayos de ELISA mostraron que IL-17A duplica su nivel basal a las 6 horas y a las 12 horas llega a su pico de expresión, cuadruplicando su nivel basal; en los siguientes días disminuye ligeramente pero se mantiene elevado incluso 7 días después del infarto, consecuentemente a lo visto en el parénquima cerebral<sup>30</sup>. Sin embargo la cuantificación de IL-17A en suero vista por

ensayos de ELISA no correlaciona con la expresión de IL-17A vista en parénquima y LCR, siendo esta más tardía, llegando a su pico en el tercer día pos infarto<sup>30</sup>.

### Efecto de IL-17A en las neuronas del parénquima lesionado y en la regulación de la neurogénesis

Las neuronas corticales expresan constitutivamente el receptor para IL-17A (IL-17R)<sup>31,30</sup>. In vitro, condiciones de privación de oxígeno y glucosa (OGD) aumentan significativamente la expresión de IL-17R<sup>30</sup>. La activación de este receptor por IL-17A potencia el efecto neurotóxico producido por el OGD<sup>30</sup>. Consecuentemente, el bloque del IL-17R

aumenta la viabilidad de dichos cultivos sometidos a OGD<sup>33</sup>. En condiciones fisiológicas, IL-17A es un regulador negativo de la neurogenesis en DG, visto por incorporación de BrdU<sup>+</sup> en ratones KO para IL-17<sup>31</sup>, que correlaciona con los resultados *in vitro*<sup>32</sup>, interesantemente los ensayos de RT-qPCR para Ngn2 e Inmunofluorescencia para DCX y NeuN muestran que IL-17 favorece la diferenciación de las células progenitoras neurales (NPCs) hacia neuronas. En modelos de infarto producido por t-MCAo en ratones IL-17KO la tasa de proliferación de NPCs no aumenta, medida por incorporación de BrdU<sup>+</sup> e inmunofluorescencias para Ki67 y PH3 al día 28 pos infarto, a pesar de haber una disminución significativa del volumen de infarto<sup>29</sup>. Por otro lado, la aplicación exógena de IL-17A recombinante (rIL-17A) en ratones sometidos a t-MCAo favorece la supervivencia, por aumento de la expresión de SNAP-25 y sinapsina que promueve la sinaptogénesis, y diferenciación de las NPCs a neuronas por inhibición de calpaína 1 dependiente de la vía de p38, además promueve la migración de estas a la zona de lesión<sup>29</sup>.

### Modulación de la microglia/macrófago por IL-17

La población global de microglia (CD45<sup>low</sup> CD11b<sup>+</sup>) permanece constante a lo largo de la primera semana pos-infarto<sup>11</sup>, sin embargo, los macrófagos (CD45<sup>high</sup> CD11b<sup>+</sup>) infiltran el parénquima lesionado desde el primer día, llegando a duplicar la población de microglías en el día 3, correspondiente al pico de infiltración leucocitaria<sup>11</sup>. La migración de macrófagos infiltrantes y microglías a la zona de lesión<sup>40</sup> no se altera por la ausencia de linfocitos T (Rag1<sup>-/-</sup>)

o la ausencia de LT- $\gamma\delta$ <sup>13</sup>, pero si disminuye el volumen de infarto<sup>11</sup>, lo que demuestra que el efecto neuroprotector no es dependiente de la migración de los macrófagos/microglías, sino de la regulación de su actividad o fenotipo.

Los macrófagos infiltrantes expresan la citocina pro-inflamatoria IL-23<sup>11</sup>. Tanto IL-23 como IL-1 $\beta$  promueven la expresión de IL-17 por la microglía, en cultivos *in vitro*<sup>14</sup>. La microglía expresa constitutivamente el IL-17R<sup>14</sup>; en cultivos primarios de microglía, IL-17 promueve la expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-6, quimiocinas como CCL-2, CXCL-2; factores neurotróficos como NGF, BDNF y GDNF, así como la expresión de iNOS, vistos por ensayos de ELISA y WB<sup>14,30</sup>; la co-estimulación de estos cultivos con IL-17A e IFN- $\gamma$ , muestra un efecto potenciado en la inducción de la expresión de marcadores pro-inflamatorios de microglía activada a fenotipo M1, como son MHC-II, ICAM-1 e VCAM-1, vistos a nivel de mRNA<sup>14</sup>. La estimulación exclusiva con IL-17 falla en inducir la expresión de estos marcadores en los cultivos de microglía<sup>14</sup>.

IL-17A promueve la expresión de TNF- $\alpha$ <sup>20</sup>. Tanto macrófagos infiltrantes como microglías producen TNF- $\alpha$  en proporciones similares en la zona de lesión<sup>13</sup>. TNF- $\alpha$  tiene efectos neurotóxicos en la fase aguda del infarto cerebral<sup>41</sup>. La ausencia de LT (Rag1<sup>-/-</sup>) disminuye significativamente la producción de TNF- $\alpha$  por los macrófagos mas no en microglías<sup>13</sup>, esto sugiere que los LT $\alpha\beta$  son importantes inductores de TNF- $\alpha$  en macrófagos en el infarto cerebral<sup>13</sup> pero también sugeriría que TNF- $\alpha$  no estaría relacionado directamente con el daño en el infarto cerebral. La ausencia de LT  $\gamma\delta$  no altera la producción de TNF- $\alpha$  en macrófagos ni

Type Celular	Localización	Detalle	Referencia
Neurona	Parafloquina prefrontal Neuronas hipocámpales	Parafloquina cerebral lesionada por la isquemia de rabin somada a p-MCAo. Juego de 24 horas. Visto por histofluorescencia. Cultivos primarios de neuronas hipocámpales obtenidos de ratones C57BL/6 sometidos a OCD por 10 minutos. Fijados a las 2 horas. Visto por histofluorescencia	Wang et al. 2009 Wang et al. 2009
Astrocyto	In vitro Global	Cultivo primario de astrocytos obtenido de ratón recién nacido. Ensayos de inmunohistoquímica. Cultivos obtenidos por MACG de cultivos de ratón. L a cuantifico la expresión del mRNA de IL17RA por RT-PCR y WB	Sarna et al. 2009 Liu et al. 2014
Microglia	In vitro Global	Cultivo primario de microglia obtenido de ratón recién nacido. Visto por ensayos de FACS e inmunofluorescencia. Cultivos obtenidos por MACG de cultivos de ratón. L a cuantifico la expresión del mRNA de IL17RA por RT-PCR y WB	Sarna et al. 2009 Liu et al. 2014
Endotelio	Parafloquina cerebral	Parafloquina cerebral en condiciones basales y aumento en procesos inflamatorios. Visto por histofluorescencia y FACS.	Köcher et al.
Oligodendrocito NSC	Global Global	Cultivos obtenidos por MACG de cultivos de ratón. L a cuantifico la expresión del mRNA de IL17RA por RT-PCR y WB NSCs obtenidas de cultivos embrionarios de ratones E14. Visto por ensayos de inmunofluorescencia.	Liu et al. 2014 Li et al. 2013

Tabla 2 Expresión de IL-17R en las células del SNC

microglías<sup>15</sup> pero si disminuye 6 veces el reclutamiento de neutrófilos CD11b<sup>+</sup>-Ly6G<sup>+</sup><sup>15</sup>.

Un estudio de transcripciónica de macrófagos derivados de monocitos incubados con IL-17A, in vitro, polariza el macrófago a un fenotipo distinto a los clásicamente caracterizado M1 o M2<sup>42</sup>, dicho fenotipo se caracteriza por la expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-1a o IL-6, factores quimiotácticos como CCL2, CCL8, CCL20, CXCL1, CXCL2 y CXCL6, así como genes involucrados en estrés oxidativo como MTM1 y MTE, y receptores de superficie CD14, CD163 y TLR8; y regulación negativa de CD40 y CD83<sup>42</sup>.

## IL-17A y astrocyto

En modelos de infarto por t-MCAo, los ensayos de histomunofluorescencia a las 24 horas<sup>38</sup> y a los 28 días pos infarto<sup>39</sup>, muestran que los astrocytos son productores importantes de IL-17A en la zona del peri-infarto, sin una contribución importante de neuronas o microglia<sup>39,38</sup>. Cultivos primarios de astrocytos, extraídos de la zona peri-infarto 14 días después

del infarto, estimulados con LPS promueve la expresión de IL-17A, relacionado a la activación de p38<sup>39</sup>. El astrocyto expresa más L-17R que microglías o macrófagos<sup>14</sup>, la estimulación de cultivos primarios de astrocytos con IL-17A promueve la expresión de las quimiocinas CCL-2 y CXCL2, que promueven la infiltración leucocitaria en zonas de inflamación<sup>30</sup>. En cambio, la expresión de la quimiocina CXCL-1 in vitro por astrocytos solo se induce bajo la co-estimulación de IL-17RA y TNF- $\alpha$ . La estimulación con estas citocinas por separado no promueve la expresión de CXCL-1<sup>15</sup>.

## LT $\gamma\delta$ , la principal fuente de IL-17A en el infarto cerebral

Los LT $\gamma\delta$  son una subpoblación de LT (<4%) y es un componente celular importante de la inmunidad innata, se caracteriza por presentar un TCR formado por las cadenas  $\gamma$  y  $\delta$ , aunque no se ha determinado cuales son antígenos específicos, parece reconocer productos lipídicos que no necesitan procesamiento antigénico ni presentación por MHC para su reconocimiento<sup>45</sup>.

Los linfocitos infiltran el parénquima cerebral desde el primer día pos infarto, incrementando su número rápidamente hasta el día 3, aumentando casi 17 veces su número basal<sup>15</sup>. La proporción de CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se mantiene constante a lo largo de los primeros 7 días, pero la población de LT $\gamma\delta$  incrementa rápida y significativamente desde 6% para el primer día hasta 14% (25 veces su nivel basal) el tercer día<sup>15</sup>. Los LT $\gamma\delta$  infiltrantes migran preferentemente a la zona de penumbra/peri-infarto<sup>11,37</sup>, sugiriendo que los microambientes inflamatorios son distintos en la penumbra y en el foco. Los LT $\gamma\delta$  son la principal población infiltrante que expresa IL-17A en el parénquima lesionado por la isquemia en los primeros días pos infarto<sup>15</sup>. Ensayos de t-MCAo en ratones TCR $\gamma\delta$ KO, es decir Knock out para LT  $\gamma\delta$ , o tratados con anti-TCR $\gamma\delta$  muestran una disminución significativa del volumen de infarto desde el primer día<sup>11</sup>. Lo que demuestra que el efecto neurotóxico de los LT  $\gamma\delta$  es agudo en el infarto isquémico.

La expresión de IL-17A en LT  $\gamma\delta$  puede ser estimulada por IL-1 $\beta$ <sup>44</sup> o por INF- $\gamma$  por una vía dependiente de JAK/STAT<sup>45</sup>. Por otro lado, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> T son los principales productores de INF- $\gamma$  en este tiempo<sup>13</sup>.

Gelderblom et al. muestran que la IL-17A liberada por LT  $\gamma\delta$  infiltrantes mediante la activación del receptor IL-17R, posiblemente expresado las células estromales cerebrales, promueve la expresión de factores pro-inflamatorios quimiotácticos de neutrófilos como CXCL-1<sup>13</sup>. El pico de expresión de CXCL-1 se alcanza a las 6 h.p.i.<sup>13</sup>.

## Alteración de la permeabilidad selectiva de la BBB por la IL-17

La expresión de IL-17R e IL-22R en EC se induce en procesos inflamatorios<sup>45</sup>. Ensayos in vitro, demuestran que la activación de IL-17R por su ligando altera la permeabilidad selectiva de la monocapa de células endoteliales (ECs) por dos vías distintas, el aumento de la transitosi (visto indirectamente por el pasaje de BSA marcado fluorescentemente) y la disminución de la expresión de las proteínas de unión estrecha Occludin y Zonula occludens-1 componentes importante de la BBB<sup>46</sup>, lo que favorece el pasaje por vía paracelular<sup>34,45</sup>. Ambas vías han sido recientemente descritas como los principales mecanismos de disrupción de la permeabilidad selectiva de la barrera hematoencefálica (BBB) en el infarto cerebral<sup>47</sup>. La BBB es una estructura importante de SNC, cuya función es restringir la entrada de células y moléculas ajenas al SNC, la alteración de la permeabilidad selectiva de la BBB es un mecanismo de daño común en las enfermedades neurodegenerativas<sup>48,49</sup>. Las ECs son un componente de la BBB<sup>49</sup>. Además, la activación de IL-17R, en cultivos de células ECs-BBB humanas, promueve la expresión de CCL2, IL-6 y CXCL8 (IL-8), pero no afectan la expresión de TGF- $\beta$ , ICAM-1, VCAM-1 o CCL5 (RANTES)<sup>45</sup>. En cambio la estimulación simultánea de ECs de cerebro de ratón bEnd.3 con IL-17A y TNF- $\alpha$  potencia la expresión de moléculas pro-inflamatorias como CCL2y CXCL1, moléculas quimiotácticas como CCL2, CCL5, CCL20 que favorecen la migración leucocitaria a través de la monocapa de ECs, y la producción de IL-17 generando una retroalimentación positiva<sup>50</sup>.

## Cascada de señalización

En cartilago sinovial, IL17A promueve la expresión de las citocinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-620; y de quimionas como: IL-8(CXCL8), CXCL1 (KC/Gro $\alpha$ ), CXCL2, CCL20, CCL2, y CCL720; metaloproteinasas de matriz MMP-1,2,3,9 y 1320.

## Bibliografía

1. WHO. WHO | Top 10 causes of death. *Global Health Observatory (GHO) data* (2015). Available at: [http://www.who.int/gho/mortality\\_burden\\_disease/causes\\_death/top\\_10/en/](http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death/top_10/en/). (Accessed: 31st March 2017)
2. Brambilla, R., Couch, Y. & Lambertsen, K. L. The effect of stroke on immune function. *Mol. Cell. Neurosci.* 53, 26–33 (2013).
3. Moskowitz, M. A., Lo, E. H. & Iadecola, C. The science of stroke: Mechanisms in search of treatments. *Neuron* 67, 181–198 (2010).
4. Anrather, J. & Iadecola, C. Inflammation and Stroke: An Overview. *Neurotherapeutics* 13, 661–670 (2016).
5. da Fonseca, A. C. C. *et al.* The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 1–13 (2014).
6. Iadecola, C. & Anrather, J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat. Med.* 17, 796–808 (2011).
7. Huang, Y. & Feng, Z. The good and bad of microglia/macrophages: new hope in stroke therapeutics. *Acta Pharmacol. Sin.* 34, 6–7 (2013).
8. Barreto, G., E. White, R., Ouyang, Y., Xu, L. & G. Giffard, R. Astrocytes: Targets for Neuroprotection in Stroke. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* 11, 164–173 (2011).
9. Dong, Y. & Benveniste, E. N. Immune function of astrocytes. *Glia* 36, 180–190 (2001).
10. Benakis, C., Garcia-Bonilla, L., Iadecola, C. & Anrather, J. The role of microglia and myeloid immune cells in acute cerebral ischemia. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 461 (2014).
11. Shichita, T. *et al.* Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing  $\gamma\delta$ T cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat. Med.* 15, 946–950 (2009).
12. Hu, M. H. *et al.* Neuroprotection effect of interleukin (IL)-17 secreted by reactive astrocytes is emerged from a high-level IL-17-containing environment during acute neuroinflammation. *Clin. Exp. Immunol.* 175, 268–284 (2014).
13. Gelderblom, M., Arunachalam, P. & Magnus, T.  $\gamma\delta$  T cells as early sensors of tissue damage and mediators of secondary neurodegeneration. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 368 (2014).
14. Kawanokuchi, J. *et al.* Production and functions of IL-17 in microglia. *J. Neuroimmunol.* 194, 54–61 (2008).
15. Jin, W. & Dong, C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerg. Microbes Infect.* 2, e60 (2013).
16. Ding, Y. *et al.* Establishment of a murine model of cerebral malaria in KunMing mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA. *Parasitology* 143, 1672–1680 (2016).
17. Yamada, H. Current perspectives on the role of IL-17 in autoimmune disease. *J. Inflamm. Res.* 3, 33–44 (2010).
18. Murugaiyan, G. & Saha, B. Protumor vs Antitumor Functions of IL-17. *J. Immunol.* 183, 4169–4175 (2009).
19. Chen, K. & Kolls, J. K. Interleukin-17A (IL17A). *Gene* 614, 8–14 (2017).
20. Onishi, R. M. & Gaffen, S. L. Interleukin-17 and its target genes: Mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology* 129, 311–321 (2010).
21. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 485–517 (2009).
22. Moseley, T. A., Haudenschild, D. R., Rose, L. & Reddi, A. H. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14, 155–174 (2003).
23. Kawaguchi, M., Adachi, M., Oda, N., Kokubu, F. & Huang, S. K. IL-17 cytokine family. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114, 1265–1273 (2004).
24. Huppert, J. *et al.* Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J.* 24, 1023–1034 (2010).
25. Waisman, A., Hauptmann, J. & Regen, T. The role of IL-17 in CNS diseases. *Acta Neuropathol.* 129, 625–637 (2015).
26. Cua, D. J. & Tato, C. M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 611–611 (2010).
27. Taylor, P. R. *et al.* Activation of neutrophils by autocrine IL-17A-IL-17RC interactions during fungal infection is regulated by IL-6, IL-23, ROR $\gamma$ t and dectin-2. *Nat. Immunol.* 15, 143–151 (2014).
28. Artis, D. & Spits, H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature* 517, 293–301 (2015).
29. Lin, Y. *et al.* Critical role of astrocytic interleukin-17 A in post-stroke survival and neuronal differentiation of neural precursor

- cells in adult mice. *Cell Death Dis.* 7, e2273 (2016).
30. Sarma, J. *et al.* Functional interleukin-17 receptor A is expressed in central nervous system glia and upregulated in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroinflammation* 6, 14 (2009).
  31. Liu, Q. *et al.* Interleukin-17 inhibits Adult Hippocampal Neurogenesis. *Sci. Rep.* 4, 7554 (2014).
  32. Li, Z. *et al.* Inhibitory effect of IL-17 on neural stem cell proliferation and neural cell differentiation. *BMC Immunol.* 14, 20 (2013).
  33. Wang, D. dan *et al.* IL-17 potentiates neuronal injury induced by oxygen-glucose deprivation and affects neuronal IL-17 receptor expression. *J. Neuroimmunol.* 212, 17–25 (2009).
  34. Gan, Y. *et al.* Ischemic neurons recruit natural killer cells that accelerate brain infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 2704–9 (2014).
  35. Li, G. Z. *et al.* Expression of interleukin-17 in ischemic brain tissue. *Scand. J. Immunol.* 62, 481–486 (2005).
  36. Kostulas, N., Pelidou, S. H., Kivisakk, P., Kostulas, V. & Link, H. Increased IL-1, IL-8, and IL-17 mRNA Expression in Blood Mononuclear Cells Observed in a Prospective Ischemic Stroke Study. *Stroke* 30, 2174–2179 (1999).
  37. Gelderblom, M. *et al.* Neutralization of the IL-17 axis diminishes neutrophil invasion and protects from ischemic stroke. *Blood* 120, 3793–3802 (2012).
  38. Li, S. *et al.* Identification of IL-17A-derived neural cell type and dynamic changes of IL-17A in serum/CSF of mice with ischemic stroke. *Neurol. Res.* 6412, 1–7 (2017).
  39. Santos, D. M., Xavier, J. M., Morgado, A. L., Solá, S. & Rodrigues, C. M. P. Distinct regulatory functions of calpain 1 and 2 during neural stem cell self-renewal and differentiation. *PLoS One* 7, (2012).
  40. Gelderblom, M. *et al.* Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke* 40, 1849–1857 (2009).
  41. Doll, D. N., Barr, T. L. & Simpkins, J. W. Cytokines: their role in stroke and potential use as biomarkers and therapeutic targets. *Aging Dis.* 5, 291–306 (2014).
  42. Erbel, C. *et al.* IL-17A Influences Essential Functions of the Monocyte/Macrophage Lineage and Is Involved in Advanced Murine and Human Atherosclerosis. *J. Immunol.* 193, 4344–4355 (2014).
  43. Chien, Y., Meyer, C. & Bonneville, M.  $\gamma\delta$  T Cells: First Line of Defense and Beyond. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 121–155 (2014).
  44. McCandless, E. E. *et al.* IL-1R Signaling within the Central Nervous System Regulates CXCL12 Expression at the Blood-Brain Barrier and Disease Severity during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* 183, 613–620 (2009).
  45. Kebir, H. *et al.* Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat. Med.* 13, 1173–1175 (2007).
  46. Lopes Pinheiro, M. A. *et al.* Immune cell trafficking across the barriers of the central nervous system in multiple sclerosis and stroke. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1862, 461–471 (2016).
  47. Knowland, D. *et al.* Stepwise Recruitment of Transcellular and Paracellular Pathways Underlies Blood-Brain Barrier Breakdown in Stroke. *Neuron* 82, 603–617 (2014).
  48. Badaut, J., Fukuda, A. M., Jullienne, A. & Petry, K. G. Aquaporin and brain diseases. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1840, 1554–1565 (2014).
  49. Obermeier, B., Daneman, R. & Ransohoff, R. M. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat. Med.* 19, 1584–96 (2013).
  50. Wojkowska, D., Szpakowski, P. & Glabinski, A. Interleukin 17A Promotes Lymphocytes Adhesion and Induces CCL2 and CXCL1 Release from Brain Endothelial Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1000 (2017).
  51. Liu, S. *et al.* Crystal structures of interleukin 17A and its complex with IL-17 receptor A. *Nat. Commun.* 4, 1888 (2013).