



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

*REMIELINIZACIÓN EN RESPUESTA A ISQUEMIA POR VESÍCULAS
EXTRACELULARES DERIVADAS DE CÉLULAS ENDOTELIALES DE
MICROVASCULATURACEREBRAL*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN NEUROCIENCIAS

PRESENTA:

FERNANDO HERNÁNDEZ REAL

ASESOR:

DR. LUIS BERNARDO TOVAR Y ROMO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2022

Facultad de Medicina



NEUROCIENCIAS
UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

| | |
|---|----|
| Abreviaturas | 3 |
| Resumen | 5 |
| Introducción | 6 |
| El papel de la hipoxia en el desarrollo del daño neuronal en el infarto isquémico. | 10 |
| Angiogénesis tras la isquemia cerebral | 12 |
| Señalización mediada por Notch. | 14 |
| Papel de las células oligodendrogliales en la recuperación después de un evento isquémico. | 15 |
| Transferencia de factores celulares a través de vesículas extracelulares. | 19 |
| Antecedentes | 20 |
| Planteamiento del problema | 22 |
| Hipótesis | 23 |
| Objetivo | 23 |
| Materiales y Métodos | 24 |
| Cultivo primario de células endoteliales de microvasculatura cerebral. | 24 |
| Modelo de inducción de hipoxia en células endoteliales. | 24 |
| Aislamiento de exosomas. | 25 |
| Cuantificación de exosomas. | 25 |
| Cultivos de rebanadas organotípicas de cerebelo. | 25 |
| Modelo de inducción de privación de glucosa y oxígeno a las rebanadas organotípicas. | 26 |
| Inmunofluorescencia. | 26 |
| Resultados | 27 |
| La hipoxia reduce la secreción de vesículas extracelulares de células endoteliales de microvasculatura cerebral. | 27 |
| Las vesículas extracelulares aisladas de células endoteliales promueven la remielinización tras la isquemia. | 29 |
| Discusión | 32 |
| Conclusión y perspectivas | 36 |
| Referencias | 37 |

Abreviaturas

Albúmina de suero bovino (BSA)

Ataque isquémico transitorio (TIA)

Barrera hematoencefálica (BHE)

Buffer fosfato salino (PBS)

Buffer fosfato salino con tritón (PBS-T)

Células endoteliales de la microvasculatura cerebral (BMEC)

Células precursoras de oligodendrocitos (OPCs)

Complejo de transporte requerido de clasificación endosomal (ESCRT)

Día *in vitro* (DIV)

Dominio intercelular de Notch (NICD)

Factor inducible por hipoxia 1 (HIF1)

Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)

Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)

Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)

Factor regulador de mielina (MYRF)

Factor de transcripción de oligodendrocitos 2 (OLIG2)

Solución salina balanceada de Hank (HBSS)

Medio artificial de líquido cefalorraquídeo (ACSF)

Paraformaldehído (PFA)

Privación de glucosa y oxígeno (OGD)

Proteína básica de mielina (MBP)

Obstrucción de la arteria cerebral media (MCAO)

Oligodendrocitos maduros (OLs)

Receptor 2 de VEGF (VEGFR2)

Suero fetal bovino (FBS)

Suero normal de cabra (NGS)

Transportador de glucosa 1 (GLUT1)

Vesículas extracelulares (EVs)

Vesículas extracelulares de hipoxia (HxEVs)

Vesículas extracelulares de normoxia (NxEVs)

Zona sub ventricular (SVZ)

Resumen

El accidente cerebrovascular isquémico es una de las principales causas de muerte y discapacidad a nivel mundial. Entre los diversos mecanismos celulares y moleculares que se activan tras la isquemia, la disminución del metabolismo energético provoca un estado general de desmielinización axonal en el foco isquémico y el área de penumbra. La mielinización del axón es esencial en la conducción del potencial de acción y también es una fuente de factores tróficos para la supervivencia y el mantenimiento neuronal. Los oligodendrocitos maduros son las células responsables de la mielinización en el sistema nervioso central, un proceso que conlleva una alta demanda metabólica. Estudios recientes han evidenciado que la función de los oligodendrocitos está íntimamente relacionada con la fisiología vascular en el cerebro, que es llevada a cabo principalmente por las células endoteliales de la microvasculatura cerebral (BMEC). Hallazgos previos del laboratorio permitieron identificar que las vesículas extracelulares (EV) liberadas por BMEC contienen F3/contactina, un activador no canónico de la vía Notch, que está involucrado en la mielinización. En el presente trabajo evaluamos la influencia de las EVs derivadas de BMECs en la reconstitución de las estructuras de mielina afectadas por un accidente vascular cerebral en un modelo *in vitro* de desmielinización inducida por isquemia en cultivos de rebanadas organotípicas de cerebelo de rata sometidas a privación de oxígeno y glucosa. Encontramos que las EVs de BMECs producidas en condiciones de normoxia e hipoxia promueven la restauración de las fibras de mielina presentes en la sustancia blanca del cerebelo. Nuestros datos muestran que el endotelio cerebral es capaz de influir en la

mielinización del axón a través de la liberación de EVs. Actualmente se están investigando los mecanismos moleculares subyacentes.

Introducción

En el año 2017, el infarto isquémico tuvo una prevalencia de 101.3 (91-113.6) casos por cada 100,000 habitantes, siendo la segunda causa de morbilidad y de mortalidad a nivel mundial, causando alrededor de 4 millones de muertes (Saini et al., 2021). Por su parte, en México se presentó una incidencia de 53.8 casos por cada 100,000 habitantes (Virani et al., 2020).

El cerebro representa aproximadamente el 2% de la masa total del cuerpo humano, pero demanda el 15% del gasto cardíaco y el 20% de la disposición de oxígeno (Rosko et al., 2019a). Es un órgano que en términos de requerimientos energéticos y ambientales demanda muchos recursos, debido a los diversos procesos implicados en la comunicación neuronal (Tomasi et al., 2013). Esto se consigue gracias al metabolismo de la glucosa, la cual funge como principal fuente energética. La supervivencia neuronal depende de múltiples factores: las neuronas requieren estar energéticamente bien abastecidas, contar con un adecuado ambiente redox, la ausencia de sustancias tóxicas, la inhibición de vías apoptóticas y de mecanismos de muerte celular programada. Afectaciones en la homeostasis cerebral traen como consecuencia daños agudos o crónicos con el subsecuente deterioro de la función cognitiva debido a la muerte neuronal (Tovar-y-Romo et al., 2016). Dicho suministro de nutrientes es realizado a través del sistema circulatorio quien provee principalmente glucosa y oxígeno (Dienel, 2019).

El infarto cerebral se clasifica en dos tipos: el de tipo isquémico, que ocurre cuando un trombo o émbolo obstruye una de las arterias que irrigan el cerebro, mientras que el infarto de tipo hemorrágico se caracteriza por la ruptura de uno o más vasos sanguíneos (Campbell et al., 2019).

Se estima que el 80% de los casos del infarto cerebral de tipo isquémico ocurre debido a una obstrucción transitoria de la arteria cerebral media (MCAO), la cual irriga en gran medida regiones asociadas a funciones motoras, pudiendo resultar a su vez en lesiones cognitivas difusas, probablemente causando daños a largo plazo (Campbell, 2019). Estudios *post mortem* del daño cerebral hipóxico-isquémico muestran lesiones multifocales relativamente simétricas que afectan tanto a la corteza cerebral como a la sustancia blanca cerebral donde pueden verse implicados el núcleo caudado o el cerebelo (Kauw et al., 2018).

Los trombos o émbolos que causan el infarto isquémico se forman en el arco aórtico, el cuello, o en vasos craneales a partir de lípidos acumulados en placas arterioescleróticas que al estar en contacto con el torrente circulatorio comprometen el correcto flujo sanguíneo (Shaaban & Duerinckx, 2000). Cuando ocurre la oclusión de un vaso sanguíneo con una duración breve se conoce como ataque isquémico transitorio (TIA) y, pese a no generar un daño de la misma magnitud que un infarto isquémico, este también puede causar daños permanentes (Y. Wang et al., 2013). Al momento de obstruirse una de las principales arterias que irrigan el cerebro hay una interrupción del flujo sanguíneo, sin embargo, la red vascular cuenta con irrigación periférica que permite proveer de nutrientes al área de penumbra; no

obstante, esto ocurre por un tiempo limitado y el daño en esta área también se vuelve irreversible (Rocha & Jovin, 2017).

El polígono de Willis es una estructura anatómica que forma una red vascular, suministra el flujo sanguíneo al cerebro y estructuras circundantes a partir de una conexión anastomótica derivada de las arterias carótidas internas bilaterales y de las arterias vertebrales bilaterales, lo cual corresponde a la circulación anterior y posterior del cerebro, respectivamente (Doctoral School, Grigore T. Popa University of Medicine and Pharmacy, Iași, Romania et al., 2021). Tiene origen en la base del cráneo en la fosa interpeduncular y, gracias a su estructura circundante al cerebro, puede considerarse como un centro de distribución en términos del flujo sanguíneo (Oumer et al., 2021). Sin embargo, el suministro de sangre ocurre mediante las arterias que se ocluyen de forma más frecuente.

Para evaluar el flujo luego de un infarto cerebral se emplean técnicas de neuroimagen tales como la angiografía o la resonancia magnética de perfusión, donde se ha encontrado que aquellos pacientes con un mejor flujo colateral tienen un menor daño tras un infarto isquémico que aquellos donde dicho flujo es menor (Rocha & Jovin, 2017).

A nivel celular, la falta de oxígeno y glucosa altera las funciones de las células neurales (Tovar-y-Romo et al., 2016). Las neuronas reducen su actividad, y debido a la disminución en la recaptura de neurotransmisores excitadores como el glutamato, se induce sobreexcitación; ya que la despolarización neuronal consecuencia de la actividad de los receptores de glutamato, resulta en un incremento en el ingreso de calcio hacia el interior de las neuronas. Uno de los

efectos del aumento en la concentración de calcio intracelular, es la disfunción mitocondrial y liberación de radicales libres, y la activación de proteasas y fosfolipasas, generando muerte neuronal. La excitotoxicidad no sólo afecta a las neuronas, sino que también genera daño en astrocitos y oligodendrocitos, resultando principalmente en la incapacidad de mantener la homeostasis del medio, y en el caso de los oligodendrocitos, causa una reducción en la mielinización perdiendo gran parte de la materia blanca del cerebro. Estos procesos de daño activan a la microglía, que libera citocinas proinflamatorias que conducen a fallas en el plegamiento de proteínas, liberación de especies reactivas de oxígeno, daño mitocondrial, y la activación de las caspasas, lo cual genera muerte apoptótica. Aunado a los fenómenos que ocurren en el parénquima cerebral, en el endotelio vascular se pierde la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE) permitiendo así el paso de agentes ajenos al sistema nervioso (George & Steinberg, 2015).

En un contexto histórico, se conoce que la progresión del estado del individuo tras sufrir un evento vascular cerebral ocurre a lo largo de varias etapas, que pueden tener como resultado la entrada del sujeto en un estado vegetativo permanente, durante el cual no se ha encontrado evidencia alguna de actividad cognitiva o de la conciencia, a pesar de la recuperación de las respuestas del tronco encefálico (Walton et al. 1962). Ocasionalmente, un deterioro neurológico secundario ocurre algunos días o pocas semanas después del ambiente cerebral anóxico-isquémico inicial. Donde se ha descrito que después de un periodo de recuperación, estos pacientes se vuelven irritables, apáticos y confundidos, al tiempo que presentan una

marcha con rigidez muscular; el conjunto de síntomas antes mencionados se manifiesta de manera abrupta (Walton et al., 1962).

Los procesos de recuperación tras un infarto cerebral no sólo implican el restablecimiento de las funciones en neuronas, sino que se debe tomar en conjunto la unidad neurovascular, donde el endotelio vascular cerebral no solo es el encargado de proveer los componentes energéticos para las funciones de los diversos tipos celulares en el parénquima cerebral, sino que recientemente se ha sugerido que, las células del endotelio vascular ante condiciones hipóxico-isquémicas secretan una serie de factores considerados como neuroprotectores (Guo et al., 2008).

El papel de la hipoxia en el desarrollo del daño neuronal en el infarto isquémico.

La hipoxia está definida como la ausencia parcial de oxígeno en un medio (Tirpe et al., 2019). En un modelo *in vivo* de isquemia cerebral en ratas, la presión parcial de oxígeno pO_2 bajo condiciones de normoxia es de 33.4 ± 6.0 mm Hg, mientras que al momento de la obstrucción de la arteria cerebral media cae a 1.2 ± 0.7 mm Hg en el foco isquémico, y 10.7 ± 7.8 mm Hg en el área de penumbra. Posterior a la reperusión, estos valores ascienden a 31.6 ± 16.5 en el foco isquémico, y el área de penumbra muestra una menor recuperación, alcanzando 19.1 ± 6.7 mm Hg (Liu et al., 2004).

Durante mucho tiempo se pensó que la detección de oxígeno era una propiedad restringida a un conjunto especializado de células, pero posteriormente se mostró que la actividad de unión al ADN de los factores de transcripción que regulan la

respuesta a hipoxia, se encuentra en todos los tipos de células (Maxwell et al., 1993).

El factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) se expresa prácticamente todas las células del cuerpo humano, su función consiste en la modulación de la respuesta a los niveles de oxígeno, tanto en condiciones fisiológicas como en aquellas que son patológicas. Se tiene caracterizado que regula la expresión de cerca de 70 genes blanco dependiendo la estirpe celular, que promueven la eritropoyesis, la angiogénesis y favorecen la glucólisis (Semenza, 2004). Esto sugiere que HIF-1 es parte de un sistema universal, siendo el mecanismo de respuesta celular a los cambios en la disponibilidad de oxígeno (Firth et al., 1994).

En condiciones de normoxia, se estima que tanto *in vivo*, como *in vitro*, el tiempo de vida media de HIF1 es de aproximadamente 5 minutos, mientras que en hipoxia su vida media aumenta considerablemente hasta 30 minutos (Semenza, 2004; Thompson, 2016). HIF-1 sufre hidroxilación a través de la actividad enzimática de las prolin hidroxilasas, conduciendo a su degradación (Thompson, 2016). Es marcada por ubiquitinación y posteriormente degradada por la subunidad 26s del proteosoma (Huang et al., 1998). Para que ocurra el proceso de degradación de HIF-1 es necesaria la integridad de la secuencia de aminoácidos que componen a HIF-1 α desde el residuo 400 al 600, específicamente en los residuos de prolina 402 y 564, región que funciona como sitio de reconocimiento para que la proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau, forme un complejo junto con la elonguina B, elonguina C, culina 2, y RBX1 para formar la proteína ligasa E3 ubiquitina, que

interactúa con las enzimas de conjugación de ubiquitina E2, y así conducirla al proteosoma (Semenza, 2004).

El dominio bHLH regula la dimerización del HIF-1, lo cual controla su unión al ADN, mientras que el dominio PAS participa en la selección de los genes blanco. Debido a que la expresión del HIF-1 β es constitutiva, la actividad del HIF-1 puede ser regulada exclusivamente por la expresión del HIF-1 α (Semenza, 2004).

En ausencia de HIF-1 α , se encontró que el desarrollo vascular y la capacidad de detección de oxígeno se ven severamente alterados, lo que conduce a un alto índice de mortalidad en los embriones de modelos murinos (Iyer et al., 1998.). Como se ha mencionado, HIF-1 α está en el centro de un mecanismo de detección de oxígeno importante, y que en el contexto del infarto cerebral de tipo isquémico, tiene funciones en el control tanto de la angiogénesis, así como de la producción de los glóbulos rojos para transportar oxígeno dentro del torrente sanguíneo (Cimmino et al., 2019).

Angiogénesis tras la isquemia cerebral.

La angiogénesis es el proceso por el cual se forman vasos sanguíneos a partir de una red ya existente de ellos (Yin et al., 2015). En regiones específicas, las células endoteliales de punta proliferan, rompen la pared del vaso y forman brotes que se conectan al circuito vascular. Para mantener la integridad del endotelio vascular, las células endoteliales de tallo son las encargadas de formar las uniones estrechas, estabilizando las formaciones de dichos brotes, constituyendo el lumen vascular (Blanco & Gerhardt, 2013).

Uno de los mecanismos por los cuales ocurre angiogénesis tras la isquemia cerebral, es mediante la actividad del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), uno de los genes blanco de HIF-1 α . La interacción de VEGF con su receptor induce la dimerización de este último, causando la autofosforilación de diversos residuos de tirosina desencadenando la activación de una serie de vías de señalización, dentro de las cuales se encuentran aquellas que promueven la migración, supervivencia y proliferación de las células que conforman el endotelio vascular. (Blanco & Gerhardt, 2013).

El receptor 2 de VEGF (VEGFR2) es de tipo tirosina-cinasa, y es principalmente activado por VEGFA; esta activación induce la proliferación, migración y supervivencia de las células endoteliales (Jakobsson et al., 2009). La respuesta de la actividad de VEGF no es suficiente por sí misma durante la angiogénesis, sino que recientemente se ha visto estrechamente vinculada con la vía de Notch (Hultgren et al., 2020).

El VEGF puede inducir la expresión tanto de ligandos como de receptores de Notch, dado que ambos son indispensables en la formación de las células endoteliales que conforman los vasos sanguíneos (Lawson et al., 2002). Los mecanismos moleculares por los cuales estas vías interactúan son desconocidos actualmente; a pesar de ello, estudios recientes sugieren que tras la activación de la vía de Notch, el VEGF comienza a actuar como una señal de diferenciación a través de Raf-MEK-Erk, efecto antagonizado por la vía de PI3K-Akt (Siekman et al., 2008).

Señalización mediada por Notch.

La vía de señalización de Notch está implicada en el desarrollo de la angiogénesis, que a su vez requiere del VEGF (Benedito et al., 2012). La vía de Notch participa en la determinación y diferenciación de células epiteliales, neuronales, sanguíneas, y endoteliales (Q. Hu et al., 2004). En vertebrados, esta vía tiene 4 receptores (Notch 1,2,3,4), y 5 ligandos (Jagged1,2, y los ligandos de tipo δ , Dll1,3,4). La unión receptor-ligando desata una serie de cortes proteolíticos en los receptores, concluyendo con el corte realizado por el complejo de γ -secretasa, el cual libera al dominio intercelular de Notch (NICD), que posteriormente se transloca al núcleo, donde funge como factor de transcripción. (Blanco & Gerhardt, 2013)

La activación de esta vía puede ocurrir de forma no canónica utilizando al ligando contactina a través de *deltex1*, que promueve la diferenciación de células precursoras de oligodendrocitos (OPCs) a oligodendrocitos maduros. Se llegó a esta conclusión a partir del bloqueo de la actividad de la contactina, donde se observó que las células a diferenciar no llegaban al estadio de oligodendrocitos maduros y morían por apoptosis (Cui et al., 2004).

La contactina 1, también conocida como F3, es una proteína perteneciente a la familia de las inmunoglobulinas con un peso de 130 kDa, cuya expresión ocurre en diversas regiones cerebrales, presentando una predominancia en el cerebelo, y que durante el desarrollo postnatal se ha observado principalmente en regiones de cerebelo, en las células granulares que migran, y se encuentra en mayor cantidad en los axones que en los cuerpos celulares (Chatterjee et al., 2019). Se sabe que en ratas hay un pico de expresión en el día postnatal 14, y después se mantiene

una expresión estable hasta cerca de los 30 meses de edad, donde se observa un decremento en la expresión en regiones hipocampales (Q.-D. Hu et al., 2006a). Conocer el perfil de expresión ha permitido entender su papel en diversos procesos: tal es el caso de relacionarse directamente con la mielinización (Q.-D. Hu et al., 2003).

En modelos murinos se ha descrito que existen 6 miembros de la familia de las contactinas, que conservan entre el 45 al 65% de identidad genética, todas relacionadas con el desarrollo y formación del sistema nervioso (Kalafatakis et al., 2021).

Las contactinas son expresadas tanto en oligodendrocitos como en OPCs; asimismo, se encuentran en las regiones pre y postsinápticas de las neuronas, de manera que entre estos dos tipos de células existe una comunicación mediada por la contactina 1 y 2, presentes en las uniones que establecen los axones con la mielina (Chatterjee et al., 2019).

Papel de las células oligodendrogiales en la recuperación después de un evento isquémico.

Hace poco más de un siglo, los términos *oligodendroglía* y *oligodendrocito* fueron acuñados por Río Hortega para referirse a un conjunto de células que mediante una tinción de impregnación metálica mostraban una morfología similar a la de los astrocitos (Pérez-Cerdá et al., 2015); sin embargo, presentaban diferencias en tamaño, densidad, y componentes membranales. Los oligodendrocitos fueron definidos como aquellas células encargadas de producir la mielina que cubre los axones, clasificándolas en 4 tipos, dependiendo el tamaño de los axones que cubrían (Baumann & Pham-Dinh, 2001).

Durante el desarrollo y maduración se considera que los oligodendrocitos pasan por 5 etapas definidas así por la morfología, expresión de antígenos y respuesta funcional. Estas etapas comienzan con los preprogenitores de oligodendrocitos, para posteriormente ser precursores de oligodendrocitos, luego pre-oligodendroblastos, oligodendrocitos inmaduros, y finalmente oligodendrocitos maduros, aquellos capaces de mielinizar (Q.-D. Hu et al., 2006b).

El proceso de diferenciación de las células oligodendrogiales desde su origen hasta llegar a oligodendrocitos maduros (OLs) depende de diversos factores, entre ellos SOX10, conocido como el principal factor de transcripción en la maduración de estas células. La sobreexpresión de SOX10 no es capaz de generar OLs por sí misma a partir de células no diferenciadas, sino que requiere que estas provengan al menos de progenitoras neuronales. Tal sobreexpresión hace que puedan pasar de NPCs (células progenitoras neurales) a OLs sin presentar el estado intermedio de OPCs (García-León et al., 2018). Otros de los principales factores implicados en la proliferación, migración, supervivencia y diferenciación de los OPCs son el factor de crecimiento derivado de plaquetas α (PDGF α) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Estudios donde la actividad del PDGF α se ve comprometida sugieren que este factor es crucial en la diferenciación de los OPCs, mientras que el FGF parece estar implicado en la maduración morfológica a OLs (Baydyuk et al., 2020).

Las células oligodendrogiales tienen origen en el neuroepitelio en la SVZ, donde permanecen bajo un control transcripcional que regula su proliferación, migración y diferenciación (W. Huang et al., 2020). El factor de transcripción de oligodendrocitos

2 (OLIG2) es expresado en los OPCs, e induce de manera directa la expresión de SOX10, que como se ha mencionado previamente, es un componente esencial en la diferenciación de oligodendrocitos (Q. Zhou et al., 2000); y un activador directo del factor regulador de mielina (MYRF) (Aprato et al., 2020), por lo que la acción conjunta de SOX10 y MYRF promueve la diferenciación a OLs y la posterior mielinización axonal (Elbaz & Popko, 2019).

Los OLs tienen una gran demanda energética: Un solo oligodendrocito puede mielinizar un área de $2 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ distribuido en hasta 50 axones (Simons & Nave, 2016). Se estima que para la síntesis de 1 gramo de mielina son necesarios aproximadamente 0.5 moles de ATP (Harris & Attwell, 2012). Además del gasto energético propio de la célula, a lo largo de su vida pueden llegar a tener una membrana con un peso 100 veces mayor al del cuerpo celular (Bradl & Lassmann, 2010). Sin embargo, el gasto energético que suponen los oligodendrocitos es menor al necesario para mantener la transmisión de un potencial de acción comparado con células no mielinizadas y permite que dicha transmisión ocurra de forma más rápida (Rosko et al., 2019b).

La mielina que cubre los axones es la estructura membranal más abundante que se conoce en el sistema nervioso de los vertebrados (Baumann & Pham-Dinh, 2001). Está compuesta por una diversidad de lípidos de los que en mayor abundancia se encuentran el colesterol, fosfolípidos, y glicolípidos. Además de proteínas como proteína proteolípida de mielina (PLP), la glicoproteína asociada a mielina (MAG), la proteína básica de mielina (MBP), y la fosfodiesterasa 2', 3' de nucleótido cíclico (CNP) (Baumann & Pham-Dinh, 2001).

La mielinización del sistema nervioso central no ocurre de manera simultánea en todas las regiones que lo comprenden, sino que cumple un patrón espaciotemporal a lo largo de la vida del individuo. Se ha documentado que la primera etapa ocurre entre el nacimiento y los primeros años de vida, seguida por otra etapa durante la adolescencia, que es donde hay una mayor actividad mielinizante, y finalmente entre los 60 y 70 años, donde comienza a disminuir la mielina (de Faria et al., 2021).

En la actualidad se sabe que generalmente la mielinización comienza en las regiones posteriores y se dirige hacia las regiones anteriores del sistema nervioso central, mielinizando en primera instancia a los axones más pequeños y posteriormente a los de mayor tamaño. Se creía que la mielinización dependía de la actividad sináptica, pero se ha visto que al impedir la despolarización celular mediante el bloqueo de los canales de sodio empleando tetrodotoxina, los axones aún son mielinizados, e incluso es posible mielinizar axones de neuronas fijadas, o nanofibras de poliestireno que replican la morfología axonal, por lo que se desconoce el mecanismo a través del cual son seleccionados los axones a mielinizar (de Faria et al., 2021).

A lo largo de la vida de un individuo ocurre la proliferación de precursores neurales, incluyendo OPCs, los cuales pueden diferenciarse a oligodendrocitos o astrocitos. Se han establecido estrategias *in vitro* para la obtención de células oligodendrogiales mediante la adición de factores como el FGF y el PDGF, que permiten la diferenciación, proliferación, y maduración de este tipo de células (Goldman & Kuypers, 2015). Como he mencionado previamente, existe una estrecha relación entre las células del endotelio vascular cerebral y las células

oligodendrogiales. Dicha relación establece diversas estrategias de interacción, una de ellas ocurre mediante la secreción de vesículas celulares.

Transferencia de factores celulares a través de vesículas extracelulares.

Las vesículas extracelulares (EVs) son secretadas por diversos tipos de células, entre ellos las de tipo endotelial de microvasculatura cerebral (BMEC); estas microvesículas están compuestas principalmente por proteínas, algunos lípidos, y material genético. Por definición, tienen un tamaño de entre 30 a 100 nm de diámetro (Kowal et al., 2014). El concepto surge en el año 1987, cuando el término *exosoma* fue propuesto para denominar a las vesículas extracelulares de origen endosomal. Puesto que se asumía que los endosomas eran los secretores de los exosomas, se describió la maquinaria molecular por la cuál es posible la liberación de EVs (Katzmann et al., 2001). El complejo de transporte requerido de clasificación endosomal (ESCRT) se conforma a su vez por 4 complejos, ESCRT-0 empaqueta el contenido, ESCRT-I y ESCRT-II inducen su formación, mientras que ESCRT-III hace el corte que permite la liberación de la vesícula (Théry et al., 2001).

Existe un gran número de bases de datos que describen el contenido proteico, así como el material génico que acarrean, mientras que con los lípidos se ha hecho una especie de generalización, concluyendo que las EVs son ricas en colesterol, esfingomielina, ceramida, y fosfatidilserina (Kowal et al., 2014)

A pesar de que se desconocen las funciones exactas de las EVs, estudios recientes en algunas patologías asocian estas vesículas a efectos como la propagación de la inflamación, o a procesos de recuperación mediante el acarreo de factores tróficos que cumplen una función neuroprotectora tras un evento de estrés celular (Hill,

2019). Ante tales condiciones de estrés, las neuronas emiten señales de peligro que activan a la microglía como respuesta inmune del cerebro; esta secreta EVs que contienen la citocina proinflamatoria interleucina1 β (Bianco et al., 2005). Cabe destacar que estas vesículas extracelulares son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y, en la propagación de la inflamación, causar la respuesta aguda a citocinas. Dichas señales alcanzan a las células endoteliales y a los astrocitos, las que por su parte liberan exosomas descritos bajo un papel neuroprotector (Holm et al., 2018a)

Antecedentes

Estudios previos realizados tanto por parte de nuestro grupo de investigación como de trabajos publicados por otros laboratorios nos han permitido conocer la relación entre las células oligodendrogiales y las células de la vasculatura cerebral en la modulación del daño tras el infarto isquémico.

Gracias a los modelos de isquemia *in vitro* ha sido posible reproducir la respuesta celular que ocurre *in vivo*. El cultivo de tejidos proporciona un método controlado para estudiar las respuestas celulares consecuentes de la hipoxia (Boulton et al., 1991). De este modo, es posible regular la disponibilidad de oxígeno eliminándolo del medio o deteriorando la capacidad del tejido para utilizarlo.

Los diversos modelos de estudio han permitido caracterizar la patología del infarto cerebral, donde ocurren alteraciones a nivel axonal debido a la disrupción de los tractos de mielina que los envuelven (Marin & Carmichael, 2019). Los OPCs actúan

en respuesta a este fenómeno expandiendo la población celular en la zona sub ventricular (SVZ) presentando un pico de proliferación celular en un lapso de entre 3 y 7 días después de ocurrido el infarto (Sozmen et al., 2009).

En un modelo *in vitro* de isquemia, se detectó la proliferación de OPCs 48 h después de la inducción de OGD (Mao et al., 2013). Sin embargo, la diferenciación a OLs se ve comprometida, por lo que la remielinización es limitada (Mao et al., 2013). Además, pese a que la principal función de la mielina es conservar la propagación del potencial de acción, existe un papel metabólico asociado a los oligodendrocitos y a la mielina, el cual favorece la supervivencia neuronal (Marin & Carmichael, 2019). En la región anatómica afectada por la isquemia el daño afecta a todos los tipos celulares incluyendo a los oligodendrocitos, que al disminuir su población se genera daño a la mielina. Este fenómeno promueve la migración de OPCs desde sitios de proliferación hacia la región isquémica (Bonfanti et al., 2017).

Como se ha mencionado previamente, para la correcta función de las células oligodendrogiales es indispensable contar con un adecuado suministro energético y metabólico, mismo que se ve afectado tras la isquemia por las alteraciones del nicho vascular. Por su parte, las interacciones entre las BMECs y los OPCs en la fase posterior a la isquemia permiten que mediante la actividad de Wnt/ β Catenina promueva mejoría en las áreas afectadas (L. Wang et al., 2020).

Una de las estrategias de interacción entre las BMECs y los OPCs ocurre a través de la secreción de EVs. Durante un periodo de hipoxia HIF-1a promueve la biogénesis y secreción de EVs mediante la regulación de diversos receptores de membrana, como son el transportador de glucosa 1 (GLUT1), el receptor de

transferrina, y el receptor del factor de crecimiento epidermal (Choudhry & Harris, 2018).

En el estudio realizado por Zeng y colaboradores (2020) se encontró que, ante condiciones de OGD, las células progenitoras endoteliales secretan más EVs en comparación con aquellas que se encuentran en normoxia, y que dichas vesículas promueven la angiogénesis, así como la atenuación del daño por circunstancias adversas, como lo es la isquemia (Zeng et al., 2020).

Por lo anteriormente expuesto, nuestro grupo de investigación llevó a cabo análisis proteómicos de EVs aisladas de BMECs por medio de espectrometría de masas, donde se encontró que estas vesículas contienen, entre otras proteínas, a F3/contactina.

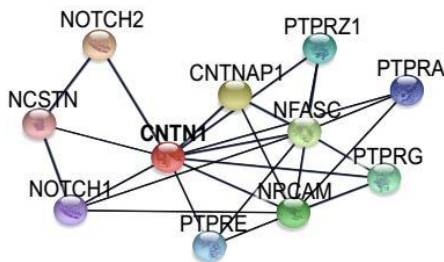


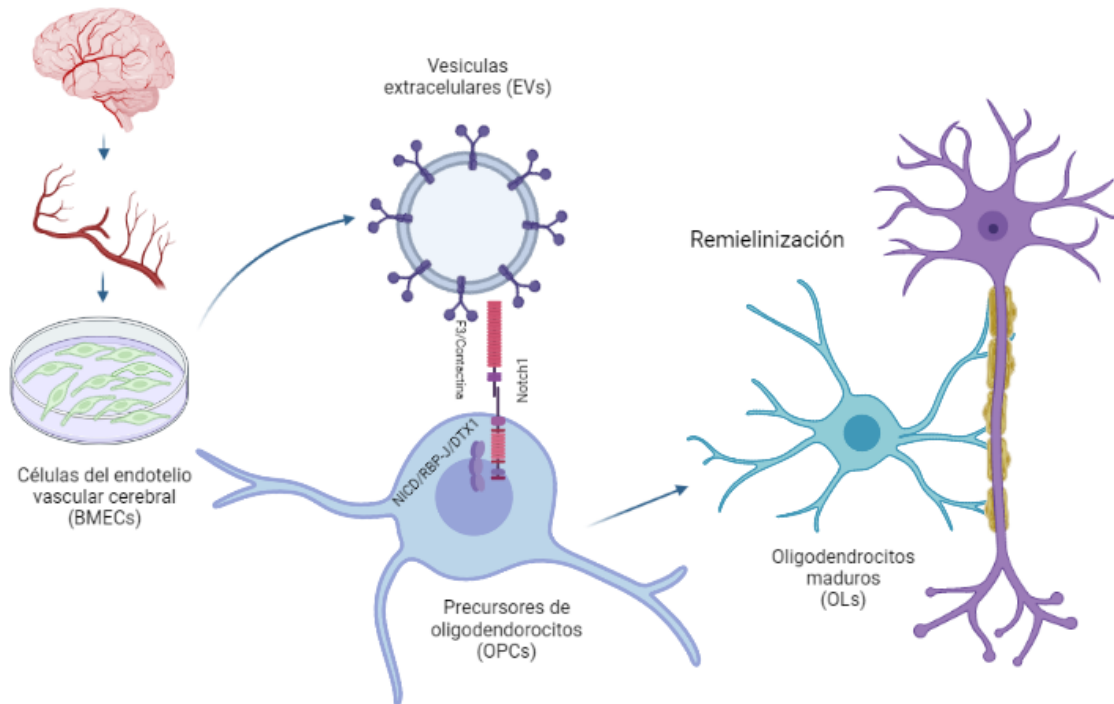
Figura1. Representación mediante análisis de redes del componente proteico de EVs aisladas de BMECs. (Campero, en preparación).

Planteamiento del problema

Dentro de los factores contenidos en EVs liberadas por BMECs se encuentran proteínas que participan en la remielinización neuronal; sin embargo, se desconoce el efecto de las EVs en la remielinización tras el daño isquémico.

Hipótesis

Las EVs derivadas de BMECs promueven la remielinización de la materia blanca mediante su efecto en las células oligodendrogliales, permitiendo reducir el daño generado por una lesión isquémica (Figura 2).



Objetivo

Mediante un análisis cualitativo se plantea hacer una descripción del papel de las EVs producidas por BMECs aisladas de la corteza cerebral de rata en los procesos de remielinización y recuperación tras la isquemia.

Materiales y Métodos

Cultivo primario de células endoteliales de microvasculatura cerebral.

En la preparación de este cultivo se requieren 4 ratas adultas de 270 a 300 g (permiso CICUAL-IFC-LTR93-16). Estas ratas son anestesiadas con pentobarbital y posteriormente perfundidas transcardialmente suministrando 250 ml de *Hanks balanced salt solution* (HBSS) con un flujo de 0.3 ml/s con ayuda de una bomba peristáltica. Se extrae el cerebro y dentro de la campana de flujo laminar las cortezas son homogenizadas con una jeringa de 20 ml en un medio de HBSS adicionado con suero fetal bovino (FBS) al 5%. Esta suspensión se centrifuga a 1000 x g por 3 min, se retira el sobrenadante y se resuspenden en 5 ml de DNAsa, dispasa, papaína al 0.1% incubándose por 15 min a 37 °C. Nuevamente se centrifuga a 1000 x g por 3 min, posteriormente son resuspendidas en 15 ml de dextrán sulfato de sodio al 15% saturado con buffer fosfato salino (PBS). Esta suspensión se centrifuga a 10,000 x g durante 15 min a 4 °C. El pellet se incuba con 10 ml de HBSS y se centrifuga a 1000 x g por 5 min, posteriormente se resuspenden en una mezcla de dispasa, papaína al 0.1% saturada en PBS. Se incuba durante 1 h a 37 °C y se realiza un lavado con HBSS, y una última centrifugación a 1000 x g. Las células aisladas se resuspenden en medio 131 (Gibco, Nueva York, Estados Unidos) con el suplemento de crecimiento microvascular MVGS (Gibco, Nueva York, Estados Unidos).

Modelo de inducción de hipoxia en células endoteliales.

Los cultivos de BMEC con una confluencia de 90-100% en cajas de cultivo T75, se introducen en una cámara de hipoxia de incubación modular que limita el intercambio de gases con el exterior, la cual es saturada con 100% N₂ y sellada herméticamente. Luego de 6 h en hipoxia, las células son incubadas nuevamente

bajo condiciones de normoxia por 18 h, para posteriormente colectar el medio y aislar EVs.

Aislamiento de exosomas.

Se colecta el medio condicionado de los cultivos de BMEC y se centrifuga a 1500 x g durante 10 min. Se transfiere a un tubo estéril y con ayuda de un filtro de 25 µm se filtra la solución obtenida para remover residuos celulares. Se realiza ultracentrifugación a 50,000 x g por 30 min. La suspensión resultante es recuperada para posteriormente llevar a cabo una ultracentrifugación a 100,000 x g por 1 h . Se decanta el contenido y se re suspende el pellet en 200 µl de PBS.

Cuantificación de exosomas.

Dado el alto contenido proteico de las EVs, una estrategia para el conteo de éstas es realizada mediante una curva de cuantificación proteínas por colorimetría con el kit DC protein Assay (Biorad, California, Estados Unidos) utilizando una curva patrón de albúmina de suero bovino (BSA).

Cultivos de rebanadas organotípicas de cerebelo.

Para estos cultivos, se extrae el cerebro cuidando la integridad del cerebelo, se retiran las meninges y se procede a cortarlo con un tissue chopper que de manera continua realiza 70 cortes por minuto, obteniendo rebanadas sagitales de 300 µm, se seleccionan aquellas de la región del *vermis cerebelli*, y se cultivan en medio artificial de líquido cefalorraquídeo (ACSF): (nmetil-D-glucamina 93 mM, cloruro de potasio 2.5 mM, fosfato de sodio monobásico 1.2 mM, bicarbonato de sodio 30 mM,

hepes 20 mM, glucosa 25 mM, ascorbato de sodio 5 mM, tiourea 2 mM, piruvato de sodio 3 mM, sulfato de magnesio 10 mM, cloruro de calcio 0.5 mM. pH 7.3).

Modelo de inducción de privación de glucosa y oxígeno a las rebanadas organotípicas.

En el día *in vitro* (DIV) 5 los cultivos organotípicos son sometidos a 6 h de OGD en la cámara de hipoxia de incubación modular, en medio ACSF sin glucosa (ACSF OGD): (nmetil-D-Glucamina 93 mM, cloruro de potasio 2.5 mM, fosfato de sodio monobásico 1.2 mM, hepes 25 mM, tiourea 2 mM. pH 7.3). Posteriormente se permite la recuperación de los tejidos por un periodo de 18 h bajo condiciones de normoxia y el medio de cultivo ACSF con glucosa. Los tratamientos son administrados al inicio de este periodo, que involucran la adición de una suspensión de exosomas aislados de BMEC en una concentración de 800 ng/ml.

Inmunofluorescencia.

Al finalizar el experimento, las rebanadas organotípicas se fijan con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS 1X por 20 min, después de 3 lavados con PBS se incuban en etanol 100% por 20 min a -20 °C. Luego se hacen 2 lavados con PBS y se bloquean durante 1 h en solución de bloqueo (suero de cabra normal (NGS) 10% en PBS con detergente tritón (PBS-T) al 0.3%). Posteriormente, con la solución de bloqueo se añade el anticuerpo monoclonal antimouse para MBP (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas) 1:200 y se incuba a 4° C durante 3 d. Después de 3 lavados se adiciona el anticuerpo secundario Alexa 488 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas) en la solución de bloqueo en proporción 1:500 por 3

h. Se añade DAPI por 10 min para marcar los núcleos y se monta con Flourmont G (Electron microscopy Sciences, Hatfield, Pensilvania).

Resultados

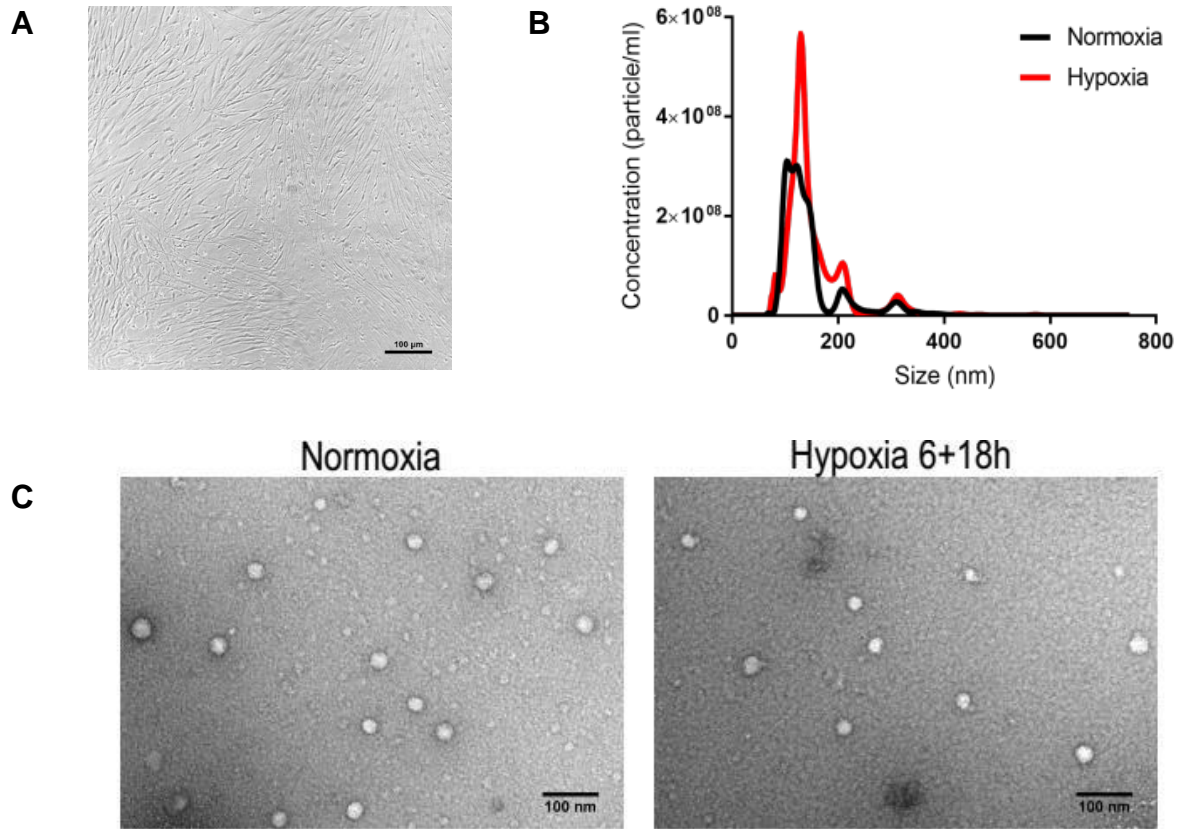
La hipoxia reduce la secreción de EVs de BMECs.

Se conoce que tanto el contenido de las EVs como la cantidad que es secretada varían dependiendo el tipo celular y las condiciones a partir de las cuales las EVs fueron aisladas. En el caso de la hipoxia se asume que mediante la actividad de HIF-1 α la secreción de EVs aumenta (Holm et al., 2018^a; Kumar & Deep, 2020).

Por lo anterior, para este estudio se caracterizó el contenido proteico de EVs aisladas de BMECs en condiciones de normoxia e hipoxia (Figura 1). En el modelo utilizado se emplea un cultivo primario de BMECs (Figura 3a). Se encontró una menor concentración de EVs aisladas a partir de hipoxia comparada con aquellas de normoxia (Figura 3b). Como otra estrategia para confirmar que se han obtenido EVs se tomaron micrografías por microscopía electrónica de transmisión de las EVs aisladas en condiciones de normoxia y de hipoxia (Figura 3c).

Posteriormente, para la administración de EVs se estableció una estrategia para cuantificarlas y tener una concentración de trabajo igual a 800 ng/ml. Gracias al alto contenido proteico de las EVs, se empleó la curva de cuantificación de proteínas donde las EVs colectadas en condiciones de normoxia (NxEVs) tuvieron una concentración de 1203 μ g/ml y en condiciones de hipoxia (HxEVs) la concentración

fue de 530 $\mu\text{g/ml}$. Estos datos concuerdan con la caracterización previamente realizada en el laboratorio.



(Campero et al., en preparación)

Figura 3. La hipoxia reduce la secreción de EVs en BMECs

(A) Micrografía de un cultivo primario de BMECs. (B) Caracterización por tamaño y concentración de NxEVs y de HxEVs. (C) Micrografías por microscopía electrónica de transmisión de las EVs aisladas en condiciones de normoxia e hipoxia. .

Las EVs aisladas de BMECs promueven la remielinización tras la isquemia.

Para determinar el efecto de las EVs en la remielinización se implementó un modelo de desmielinización isquémica en rebanadas cerebelares sometidas a OGD, ya que el cerebelo es una región altamente mielinizada, y que como se ha mencionado previamente, es en esta región anatómica donde la F3/contactina tiene mayor nivel de expresión en el sistema nervioso central.

Este modelo permite evaluar el efecto de remielinización, y posteriormente describir el mecanismo subyacente. En el DIV 5 después de la obtención de las rebanadas cerebelares se sometieron los cultivos a OGD por 6 h, posteriormente los cultivos son devueltos a condiciones de normoxia para iniciar un periodo de recuperación de 18 h. En algunas condiciones se administraron EVs. Concluida la recuperación, el tejido es sometido a la inmunotinción para MBP (marca verde) (Figura 4a). El grupo control no fue sometido a OGD ni recibió EVs(n=6). En la micrografía del cultivo organotípico en condiciones control (Figura 4c), se aprecia la continuidad de las fibras mielinizadas y el marcaje de algunos cuerpos celulares. En la condición experimental del daño máximo en el modelo utilizado tras la inducción de OGD sin tratamiento de EVs, se aprecia la interrupción de las estructuras de mielina que recubren los axones (Figura 4d). En el cultivo organotípico bajo condiciones control, la administración de NxEVs no altera la mielinización del tejido (n=6), por lo que en este caso no tienen un papel perjudicial a la mielina (Figura 4e). Por su parte, luego de la inducción de OGD y el posterior tratamiento con NxEVs (n=6), encontramos nuevamente estructuras fibrosas de mielina (Figura 4f). El cultivo de normoxia tratado con HxEVs (n=6), presenta integridad en la mielina, por lo que estas EVs no suponen un daño al tejido (Figura 4g). En el grupo sometido a OGD y tratado con

HxEvs (n=6) nuevamente apreciamos la reestructuración de la mielina, y el marcaje positivo en los cuerpos celulares con MBP (Figura 4h). Los datos obtenidos en este experimento muestran de manera cualitativa el efecto de las EVs en la remielinización tras la isquemia cerebral.

Día *in vitro* (DIV)

Verde: MBP

Azul: DAPI

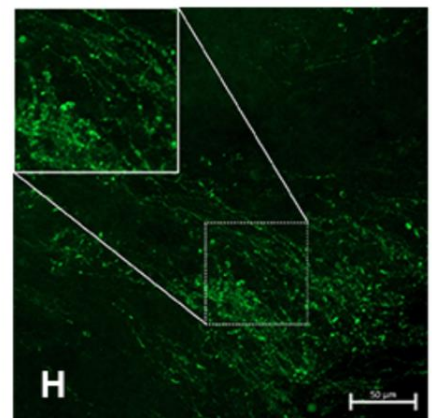
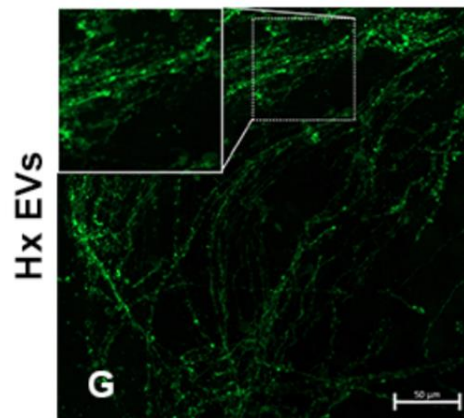
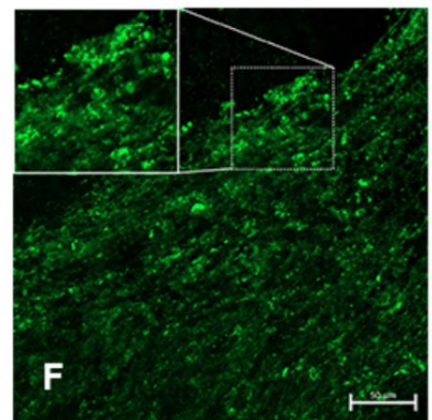
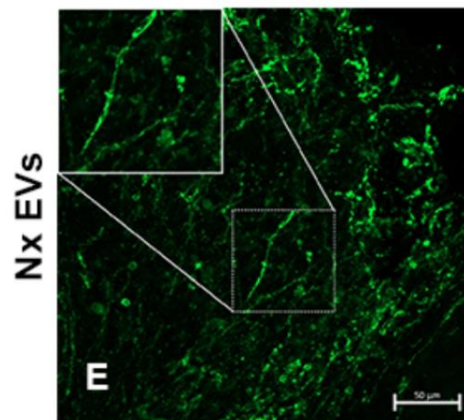
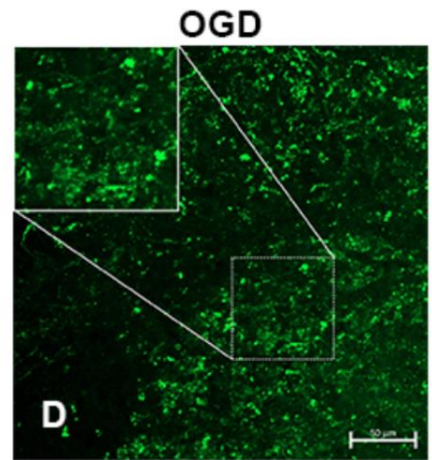
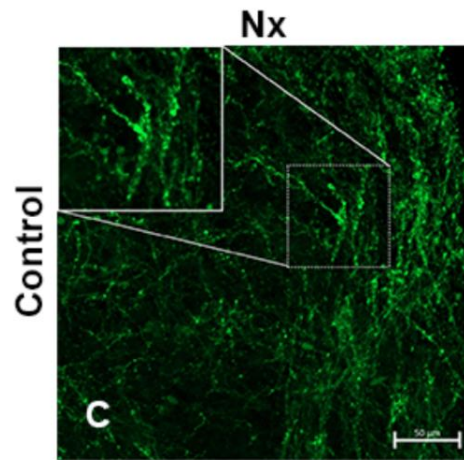
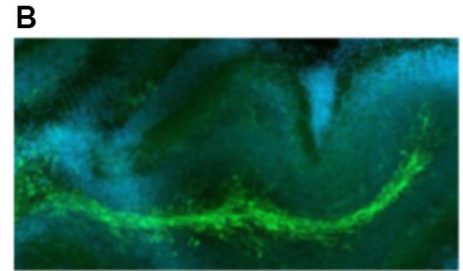
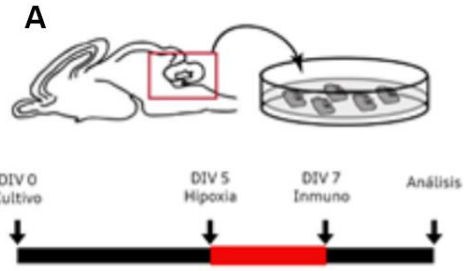


Figura 4. La administración de vesículas extracelulares promueve la remielinización tras la isquemia.

(A) representación esquemática del diseño experimental. (B) Micrografía panorámica de un cultivo en condiciones control. (C) Cultivo en condiciones control, sin tratamiento. (D) Cultivo sometido a 6h de OGD, sin tratamiento. (E) Cultivo en normoxia, con 18h tras la administración de NxEVs. (F) Cultivo sometido a 6h de OGD, y 18 horas de recuperación con el tratamiento de NxEVs. (G) Cultivo control, con 18h tras la administración de HxEVs. (H) Cultivo sometido a 6h de OGD, con 18h de recuperación tratadas con HxEVs. Todas las micrografías fueron marcadas para MBP en verde en las regiones corticales de las rebanadas del *vermis* cerebelar. Barra de escala representa 50 μ m. Cada grupo n=6.

Discusión

Tras la isquemia cerebral se conoce que ocurren eventos de proliferación y migración celular a partir de nichos neurogénicos como el giro dentado y la SVZ, donde las células originadas pueden actuar en la recuperación del tejido afectado (Zhang et al., 2014). Se ha observado en un modelo murino de MCAO, que la proliferación celular principalmente forma nuevos vasos sanguíneos, además que se sugiere que las células endoteliales tienen un papel trófico en la reparación del daño causado a través de la secreción de factores tróficos (Zhou et al., 2020).

Luego de un evento vascular de tipo isquémico, la hipoxia hace posible que HIF-1 α cumpla su función como factor de transcripción, donde Wnt, uno de sus blancos no canónicos promueve en los OPCs una regulación a la baja de Sox10, efecto que al acumularse favorece el progreso patológico (Allan et al., 2021).

Diversos estudios muestran una proliferación de OPCs durante la fase aguda del infarto isquémico. De hecho, se considera que estos cumplen una función que favorece la recuperación posterior a la isquemia no sólo a través de la secreción de factores pro-angiogénicos, sino que la activación de la activación de Wnt7 se ha

propuesto como uno de los candidatos en la reducción del volumen del tejido afectado (Chavali et al., 2020).

Como se ha mencionado, la vía de Wnt está relacionada con el proceso de recuperación tras la isquemia cerebral. Se ha reportado que Wnt4 y Wnt7 se encuentran altamente activas en OPCs, estado que se asocia a la hipovascularización, por lo que la actividad de HIF-1 α es aquella que promueve procesos angiogénicos, y al ocurrir este fenómeno, tanto Wnt como HIF son reguladas a la baja y los OPCs progresan al estado de OL. Sin embargo, la proporción de células que llegan al estadio de OL es considerablemente baja (Yuen et al., 2014).

En el proceso de recuperación endógena tras un evento vascular, la remielinización está comprometida debido a la baja tasa de maduración de los OPCs a OLs, pese a que se conoce que luego de ocurrido un evento vascular cerebral, los OPCs proliferan y migran desde los nichos neurogénicos hacia las regiones afectadas, pero son incapaces de remielinizar de forma óptima, limitando dicha recuperación (Petersen et al., 2017).

Estos datos sugieren que la vía de Wnt está implicada en un eje coordinado junto con HIF en el desarrollo de las células oligodendrogiales y en la regulación de la formación de los vasos sanguíneos que componen la BHE (Mao et al., 2013; Yuen et al., 2014).

Uno de los primeros acercamientos al papel de las BMECs en la recuperación tras la isquemia es el trabajo de Kurachi y colaboradores, quienes demostraron que el medio condicionado de las células endoteliales promueve la migración de los OPCs y reduce la muerte por apoptosis; además, destacaron el papel del FGF, PDGF α y VEGF como los principales factores que participan en los procesos de recuperación, mostrando un efecto neuroprotector por parte del medio condicionado. No obstante, se desconoce el mecanismo de transferencia de factores tróficos a las células dañadas. Además, encontraron que el medio condicionado por sí solo no aumenta la proliferación de los OPCs, mientras que la administración de EVs obtenidas a partir del medio condicionado dio como resultado un mayor número de OPCs (Kurachi et al., 2016).

La secreción de EVs es una de las estrategias del sistema nervioso central para la transferencia de factores neurotróficos. Nuestros resultados indicaron que la concentración de EVs aisladas de BMECs en hipoxia es menor, comparada con la de BMECs en normoxia. Encontrando una diferencia con datos publicados por otros autores, ya que existen reportes donde se afirma que la hipoxia aumenta la secreción de EVs. Sin embargo, las condiciones y células empleadas en dichos estudios son distintas a las empleadas en nuestro modelo.

Las EVs participan en diversos procesos en el sistema nervioso central, que van desde funciones en la plasticidad sináptica, mielinización, mantenimiento del medio extracelular, hasta en la regulación de la dinámica de formación y retracción de las neuritas (Holm et al., 2018b; Onesto et al., 2021).

En el contexto de la isquemia cerebral, Betzer y colaboradores reportaron en un modelo *in vivo* de MCAO, que al administrar EVs por vía intranasal, y hacer un seguimiento de su trayectoria mediante un marcaje con nanopartículas de oro, las EVs se dirigen a las regiones afectadas por el infarto (Betzer et al., 2017).

En nuestro modelo de isquemia fueron administradas de manera directa las EVs al tejido afectado, lo que resultó en un restablecimiento de las fibras de mielina que recubren los axones, siendo F3/contactina a través de la activación de Notch, el posible mecanismo por el cual se indujo este efecto. A pesar de ello, se precisa realizar una evaluación cuantitativa para determinar las diferencias en el efecto mediado por las NxEVs, y las HxEVs, así como evaluar específicamente la contribución de F3/contactina a la maduración de los OPCs.

Conclusión y perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan la hipótesis sobre el efecto remielinizante de las EVs aisladas a partir de BMECs en los cultivos organotípicos de cerebelo. En este trabajo se planteó establecer el modelo por el cual pudiéramos evaluar este mecanismo de recuperación tras la lesión isquémica. Los efectos observados concuerdan con los estudios publicados sobre el papel de la F3/contactina como activador de la vía de Notch, promoviendo remielinización. Entre dichos efectos encontramos que las EVs no afectan a las capas de mielina que recubren los axones en condiciones de hipoxia, mientras que en los grupos de OGD se aprecia la disrupción de las fibras que recubren los axones, y que la administración de EVs promueve el restablecimiento de las estructuras de mielina.

En la siguiente etapa del proyecto evaluaremos este fenómeno cuantitativamente, de igual manera, estudiaremos la contribución de las EVs en los procesos de proliferación, migración y diferenciación de las células oligodendrogiales. Conocer los mecanismos moleculares que subyacen dichos procesos hará posible determinar la ventana temporal en la que los OPCs cumplen un papel neuroprotector mediante la secreción de factores tróficos, para posteriormente inducir su maduración a OLs y estos remielinicen los axones del tejido afectado, optimizando la recuperación después de haber sufrido un evento vascular cerebral de tipo isquémico.

Referencias

- Allan, K. C., Hu, L. R., Scavuzzo, M. A., Morton, A. R., Gevorgyan, A. S., Cohn, E. F., Clayton, B. L. L., Bederman, I. R., Hung, S., Bartels, C. F., Madhavan, M., & Tesar, P. J. (2021). Non-canonical Targets of HIF1a Impair Oligodendrocyte Progenitor Cell Function. *Cell Stem Cell*, 28(2), 257-272.e11. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.09.019>
- Baumann, N., & Pham-Dinh, D. (2001). Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System. *Physiological Reviews*, 81(2), 871-927. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.871>
- Baydyuk, M., Morrison, V. E., Gross, P. S., & Huang, J. K. (2020). Extrinsic Factors Driving Oligodendrocyte Lineage Cell Progression in CNS Development and Injury. *Neurochemical Research*, 45(3), 630-642. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-02967-7>
- Benedito, R., Rocha, S. F., Woeste, M., Zamykal, M., Radtke, F., Casanovas, O., Duarte, A., Pytowski, B., & Adams, R. H. (2012). Notch-dependent VEGFR3 upregulation allows angiogenesis without VEGF–VEGFR2 signalling. *Nature*, 484(7392), 110-114. <https://doi.org/10.1038/nature10908>
- Betzer, O., Perets, N., Angel, A., Motiei, M., Sadan, T., Yadid, G., Offen, D., & Popovtzer, R. (2017). *In Vivo* Neuroimaging of Exosomes Using Gold Nanoparticles. *ACS Nano*, 11(11), 10883-10893. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b04495>
- Bianco, F., Pravettoni, E., Colombo, A., Schenk, U., Möller, T., Matteoli, M., & Verderio, C. (2005). Astrocyte-Derived ATP Induces Vesicle Shedding and IL-1 β Release from Microglia. *The Journal of Immunology*, 174(11), 7268-7277. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.11.7268>

- Blanco, R., & Gerhardt, H. (2013). VEGF and Notch in Tip and Stalk Cell Selection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(1), a006569-a006569.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006569>
- Bonfanti, E., Gelosa, P., Fumagalli, M., Dimou, L., Viganò, F., Tremoli, E., Cimino, M., Sironi, L., & Abbracchio, M. P. (2017). The role of oligodendrocyte precursor cells expressing the GPR17 receptor in brain remodeling after stroke. *Cell Death & Disease*, 8(6), e2871-e2871.
<https://doi.org/10.1038/cddis.2017.256>
- Bradl, M., & Lassmann, H. (2010). Oligodendrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 37-53. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0601-5>
- Campbell, B. C. V. (2019). *Ischaemic stroke*. 22.
- Campbell, B. C. V., De Silva, D. A., Macleod, M. R., Coutts, S. B., Schwamm, L. H., Davis, S. M., & Donnan, G. A. (2019). Ischaemic stroke. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 70.
<https://doi.org/10.1038/s41572-019-0118-8>
- Chatterjee, M., Schild, D., & Teunissen, C. (2019). Contactins in the central nervous system: Role in health and disease. *Neural Regeneration Research*, 14(2), 206.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.244776>
- Chavali, M., Ulloa-Navas, M. J., Pérez-Borredá, P., Garcia-Verdugo, J. M., McQuillen, P. S., Huang, E. J., & Rowitch, D. H. (2020). Wnt-Dependent Oligodendroglial-Endothelial Interactions Regulate White Matter Vascularization and Attenuate Injury. *Neuron*, 108(6), 1130-1145.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.09.033>
- Choudhry, H., & Harris, A. L. (2018). Advances in Hypoxia-Inducible Factor Biology. *Cell Metabolism*, 27(2), 281-298. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.10.005>
- Cimmino, F., Avitabile, M., Lasorsa, V. A., Montella, A., Pezone, L., Cantalupo, S., Visconte, F., Corrias, M. V., Iolascon, A., & Capasso, M. (2019). HIF-1 transcription activity: HIF1A driven

response in normoxia and in hypoxia. *BMC Medical Genetics*, 20(1), 37.

<https://doi.org/10.1186/s12881-019-0767-1>

Cui, X.-Y., Hu, Q.-D., Tekaya, M., Shimoda, Y., Ang, B.-T., Nie, D.-Y., Sun, L., Hu, W.-P., Karsak, M., Duka, T., Takeda, Y., Ou, L.-Y., Dawe, G. S., Yu, F.-G., Ahmed, S., Jin, L.-H., Schachner, M., Watanabe, K., Arsenijevic, Y., & Xiao, Z.-C. (2004). NB-3/Notch1 Pathway via Deltex1 Promotes Neural Progenitor Cell Differentiation into Oligodendrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25858-25865. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313505200>

de Faria, O., Pivonkova, H., Varga, B., Timmler, S., Evans, K. A., & Káradóttir, R. T. (2021). Periods of synchronized myelin changes shape brain function and plasticity. *Nature Neuroscience*, 24(11), 1508-1521. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00917-2>

Dienel, G. A. (2019). Brain Glucose Metabolism: Integration of Energetics with Function.

Physiological Reviews, 99(1), 949-1045. <https://doi.org/10.1152/physrev.00062.2017>

Doctoral School, Grigore T. Popa University of Medicine and Pharmacy, Iași, Romania, Dumitrescu, A. M., Costea, C. F., Discipline of Ophthalmology, Department of Surgery II, Grigore T. Popa University of Medicine and Pharmacy, Iași, Romania; 2nd Ophthalmology Clinic, Prof. dr. Nicolae Oblu Emergency Clinical Hospital, Iași, Romania, Furnică, C., Department of Anatomy and Embryology, Grigore T. Popa University of Medicine and Pharmacy, Iași, Romania, Turliuc, M. D., Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Grigore T. Popa University of Medicine and Pharmacy, Iași, Romania; 2nd Neurosurgery Clinic, Prof. dr. Nicolae Oblu Emergency Clinical Hospital, Iași, Romania, Cucu, A. I., 2nd Neurosurgery Clinic, Prof. dr. Nicolae Oblu Emergency Clinical Hospital, Iași, Romania, Bogdănici, C. M., Discipline of Ophthalmology, Department of Surgery II, Grigore T. Popa University of Medicine and Pharmacy, Iași, Romania; 1st Ophthalmology Clinic, Sf. Spiridon Emergency Clinical Hospital, Iași, Romania, Turliuc, Ș., Department of Psychiatry, Grigore T. Popa

- University of Medicine and Pharmacy, Iași, Romania, Dumitrescu, G. F., Department of Pathology, Prof. dr. Nicolae Oblu Emergency Clinical Hospital, Iași, Romania, Sava, A., & Department of Anatomy and Embryology, Grigore T. Popa University of Medicine and Pharmacy, Iași, Romania; Department of Pathology, Prof. dr. Nicolae Oblu Emergency Clinical Hospital, Iași, Romania. (2021). Morphological aspects of the vasculogenesis and angiogenesis during prenatal edification of the circle of Willis: A review. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 62(3), 679-687. <https://doi.org/10.47162/RJME.62.3.04>
- Firth, J. D., Ebert, B. L., Pugh, C. W., & Ratcliffe, P. J. (1994). Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: Similarities with the erythropoietin 3' enhancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(14), 6496-6500. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.14.6496>
- García-León, J. A., Kumar, M., Boon, R., Chau, D., One, J., Wolfs, E., Eggermont, K., Berckmans, P., Gunhanlar, N., de Vrij, F., Lendemeijer, B., Pavie, B., Corthout, N., Kushner, S. A., Dávila, J. C., Lambrichts, I., Hu, W.-S., & Verfaillie, C. M. (2018). SOX10 Single Transcription Factor-Based Fast and Efficient Generation of Oligodendrocytes from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 10(2), 655-672. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.12.014>
- George, P. M., & Steinberg, G. K. (2015). Novel Stroke Therapeutics: Unraveling Stroke Pathophysiology and Its Impact on Clinical Treatments. *Neuron*, 87(2), 297-309. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.05.041>
- Goldman, S. A., & Kuypers, N. J. (2015). How to make an oligodendrocyte. *Development*, 142(23), 3983-3995. <https://doi.org/10.1242/dev.126409>
- Guo, S., Kim, W. J., Lok, J., Lee, S.-R., Besancon, E., Luo, B.-H., Stins, M. F., Wang, X., Dedhar, S., & Lo, E. H. (2008). Neuroprotection via matrix-trophic coupling between cerebral endothelial

cells and neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(21), 7582-7587.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0801105105>

Harris, J. J., & Attwell, D. (2012). The Energetics of CNS White Matter. *Journal of Neuroscience*,

32(1), 356-371. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3430-11.2012>

Hill, A. F. (2019). Extracellular Vesicles and Neurodegenerative Diseases. *The Journal of*

Neuroscience, 39(47), 9269-9273. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0147-18.2019>

Holm, M. M., Kaiser, J., & Schwab, M. E. (2018a). Extracellular Vesicles: Multimodal Envoys in

Neural Maintenance and Repair. *Trends in Neurosciences*, 41(6), 360-372.

<https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.03.006>

Holm, M. M., Kaiser, J., & Schwab, M. E. (2018b). Extracellular Vesicles: Multimodal Envoys in

Neural Maintenance and Repair. *Trends in Neurosciences*, 41(6), 360-372.

<https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.03.006>

Hu, Q., Cui, X., Ng, Y., & Xiao, Z. (2004). Axoglial Interaction via the Notch Receptor in

Oligodendrocyte Differentiation. 33(5), 8.

Hu, Q.-D., Ang, B.-T., Karsak, M., Hu, W.-P., Cui, X.-Y., Duka, T., Takeda, Y., Chia, W., Sankar, N., Ng,

Y.-K., Ling, E.-A., Maciag, T., Small, D., Trifonova, R., Kopan, R., Okano, H., Nakafuku, M.,

Chiba, S., Hirai, H., ... Xiao, Z.-C. (2003). F3/Contactin Acts as a Functional Ligand for Notch

during Oligodendrocyte Maturation. *Cell*, 115(2), 163-175. <https://doi.org/10.1016/S0092->

8674(03)00810-9

Hu, Q.-D., Ma, Q.-H., Gennarini, G., & Xiao, Z.-C. (2006a). Cross-Talk between F3/Contactin and

Notch at Axoglial Interface: A Role in Oligodendrocyte Development. *Developmental*

Neuroscience, 28(1-2), 25-33. <https://doi.org/10.1159/000090750>

- Hu, Q.-D., Ma, Q.-H., Gennarini, G., & Xiao, Z.-C. (2006b). Cross-Talk between F3/Contactin and Notch at Axoglial Interface: A Role in Oligodendrocyte Development. *Developmental Neuroscience*, 28(1-2), 25-33. <https://doi.org/10.1159/000090750>
- Huang, L. E., Gu, J., Schau, M., & Bunn, H. F. (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(14), 7987-7992. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.14.7987>
- Hultgren, N. W., Fang, J. S., Ziegler, M. E., Ramirez, R. N., Phan, D. T. T., Hatch, M. M. S., Welch-Reardon, K. M., Paniagua, A. E., Kim, L. S., Shon, N. N., Williams, D. S., Mortazavi, A., & Hughes, C. C. W. (2020). Slug regulates the Dll4-Notch-VEGFR2 axis to control endothelial cell activation and angiogenesis. *Nature Communications*, 11(1), 5400. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18633-z>
- Iyer, N. V., Kotch, L. E., Agani, F., Leung, S. W., Laughner, E., Wenger, R. H., Gassmann, M., Gearhart, J. D., Lawler, A. M., Yu, A. Y., & Semenza, G. L. (s. f.). Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . 1998, 15.
- Jakobsson, L., Bentley, K., & Gerhardt, H. (2009). VEGFRs and Notch: A dynamic collaboration in vascular patterning. *Biochemical Society Transactions*, 37(6), 1233-1236. <https://doi.org/10.1042/BST0371233>
- Kalafatakis, I., Savvaki, M., Velona, T., & Karagogeos, D. (2021). Implication of Contactins in Demyelinating Pathologies. *Life*, 11(1), 51. <https://doi.org/10.3390/life11010051>
- Katzmann, D. J., Babst, M., & Emr, S. D. (2001). Ubiquitin-Dependent Sorting into the Multivesicular Body Pathway Requires the Function of a Conserved Endosomal Protein Sorting Complex, ESCRT-I. *Cell*, 106(2), 145-155. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00434-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00434-2)

- Kauw, F., Takx, R. A. P., de Jong, H. W. A. M., Velthuis, B. K., Kappelle, L. J., & Dankbaar, Jan. W. (2018). Clinical and Imaging Predictors of Recurrent Ischemic Stroke: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cerebrovascular Diseases*, 45(5-6), 279-287. <https://doi.org/10.1159/000490422>
- Kowal, J., Tkach, M., & Théry, C. (2014). Biogenesis and secretion of exosomes. *Current Opinion in Cell Biology*, 29, 116-125. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.05.004>
- Kumar, A., & Deep, G. (2020). Exosomes in hypoxia-induced remodeling of the tumor microenvironment. *Cancer Letters*, 488, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.05.018>
- Kurachi, M., Mikuni, M., & Ishizaki, Y. (2016). Extracellular Vesicles from Vascular Endothelial Cells Promote Survival, Proliferation and Motility of Oligodendrocyte Precursor Cells. *PLOS ONE*, 11(7), e0159158. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159158>
- Lawson, N. D., Vogel, A. M., & Weinstein, B. M. (2002). Sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor Act Upstream of the Notch Pathway during Arterial Endothelial Differentiation. *Developmental Cell*, 3(1), 127-136. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00198-3](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00198-3)
- Liu, S., Shi, H., Liu, W., Furuichi, T., Timmins, G. S., & Liu, K. J. (2004). Interstitial pO₂ in Ischemic Penumbra and Core are Differentially Affected following Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 24(3), 343-349. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000110047.43905.01>
- Mao, F., Li, W., Chen, H., Qian, L., & Buzby, J. S. (2013). White matter and SVZ serve as endogenous sources of glial progenitor cells for self-repair in neonatal rats with ischemic PVL. *Brain Research*, 1535, 38-51. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.08.006>

Marin, M. A., & Carmichael, S. T. (2019). Mechanisms of demyelination and remyelination in the young and aged brain following white matter stroke. *Neurobiology of Disease*, *126*, 5-12.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.07.023>

Maxwell, P. H., Pugh, C. W., & Ratcliffe, P. J. (1993). Inducible operation of the erythropoietin 3' enhancer in multiple cell lines: Evidence for a widespread oxygen-sensing mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*(6), 2423-2427.
<https://doi.org/10.1073/pnas.90.6.2423>

Onesto, M. M., Short, C. A., Rempel, S. K., Catlett, T. S., & Gomez, T. M. (2021). Growth Factors as Axon Guidance Molecules: Lessons From in vitro Studies. *Frontiers in Neuroscience*, *15*, 678454. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.678454>

Oumer, M., Alemayehu, M., & Muche, A. (2021). Association between circle of Willis and ischemic stroke: A systematic review and meta-analysis. *BMC Neuroscience*, *22*(1), 3.
<https://doi.org/10.1186/s12868-021-00609-4>

Pérez-Cerdá, F., Sánchez-Gómez, M. V., & Matute, C. (2015). Pío del Río Hortega and the discovery of the oligodendrocytes. *Frontiers in Neuroanatomy*, *9*.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00092>

Petersen, M. A., Ryu, J. K., Chang, K.-J., Etxeberria, A., Bardehle, S., Mendiola, A. S., Kamau-Devers, W., Fancy, S. P. J., Thor, A., Bushong, E. A., Baeza-Raja, B., Syme, C. A., Wu, M. D., Rios Coronado, P. E., Meyer-Franke, A., Yahn, S., Pous, L., Lee, J. K., Schachtrup, C., ... Akassoglou, K. (2017). Fibrinogen Activates BMP Signaling in Oligodendrocyte Progenitor Cells and Inhibits Remyelination after Vascular Damage. *Neuron*, *96*(5), 1003-1012.e7.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.10.008>

- Rocha, M., & Jovin, T. G. (2017). Fast Versus Slow Progressors of Infarct Growth in Large Vessel Occlusion Stroke: Clinical and Research Implications. *Stroke*, *48*(9), 2621-2627.
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.017673>
- Rosko, L., Smith, V. N., Yamazaki, R., & Huang, J. K. (2019a). Oligodendrocyte Bioenergetics in Health and Disease. *The Neuroscientist*, *25*(4), 334-343.
<https://doi.org/10.1177/1073858418793077>
- Rosko, L., Smith, V. N., Yamazaki, R., & Huang, J. K. (2019b). Oligodendrocyte Bioenergetics in Health and Disease. *The Neuroscientist*, *25*(4), 334-343.
<https://doi.org/10.1177/1073858418793077>
- Saini, V., Guada, L., & Yavagal, D. R. (2021). Global Epidemiology of Stroke and Access to Acute Ischemic Stroke Interventions. *Neurology*, *97*(20 Supplement 2), S6-S16.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000012781>
- Semenza, G. L. (2004). Hydroxylation of HIF-1: Oxygen Sensing at the Molecular Level. *Physiology*, *19*(4), 176-182. <https://doi.org/10.1152/physiol.00001.2004>
- Shaaban, A. M., & Duerinckx, A. J. (2000). Wall Shear Stress and Early Atherosclerosis: A Review. *American Journal of Roentgenology*, *174*(6), 1657-1665.
<https://doi.org/10.2214/ajr.174.6.1741657>
- Siekman, A. F., Covassin, L., & Lawson, N. D. (2008). Modulation of VEGF signalling output by the Notch pathway. *BioEssays*, *30*(4), 303-313. <https://doi.org/10.1002/bies.20736>
- Simons, M., & Nave, K.-A. (2016). Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *8*(1), a020479.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020479>

- Sozmen, E. G., Kolekar, A., Havton, L. A., & Carmichael, S. T. (2009). A white matter stroke model in the mouse: Axonal damage, progenitor responses and MRI correlates. *Journal of Neuroscience Methods*, *180*(2), 261-272. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.03.017>
- Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., & Amigorena, S. (2001). Proteomic Analysis of Dendritic Cell-Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles. *The Journal of Immunology*, *166*(12), 7309-7318. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.12.7309>
- Thompson, C. B. (2016). Into Thin Air: How We Sense and Respond to Hypoxia. *Cell*, *167*(1), 9-11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.036>
- Tirpe, A. A., Gulei, D., Ciortea, S. M., Crivii, C., & Berindan-Neagoe, I. (2019). Hypoxia: Overview on Hypoxia-Mediated Mechanisms with a Focus on the Role of HIF Genes. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(24), 6140. <https://doi.org/10.3390/ijms20246140>
- Tomasi, D., Wang, G.-J., & Volkow, N. D. (2013). Energetic cost of brain functional connectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(33), 13642-13647. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303346110>
- Tovar-y-Romo, L. B., Penagos-Puig, A., & Ramírez-Jarquín, J. O. (2016). Endogenous recovery after brain damage: Molecular mechanisms that balance neuronal life/death fate. *Journal of Neurochemistry*, *136*(1), 13-27. <https://doi.org/10.1111/jnc.13362>
- Virani, S. S., Alonso, A., Benjamin, E. J., Bittencourt, M. S., Callaway, C. W., Carson, A. P., Chamberlain, A. M., Chang, A. R., Cheng, S., Delling, F. N., Djousse, L., Elkind, M. S. V., Ferguson, J. F., Fornage, M., Khan, S. S., Kissela, B. M., Knutson, K. L., Kwan, T. W., Lackland, D. T., ... On behalf of the American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. (2020). Heart

- Disease and Stroke Statistics—2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 141(9). <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000757>
- Wang, L., Geng, J., Qu, M., Yuan, F., Wang, Y., Pan, J., Li, Y., Ma, Y., Zhou, P., Zhang, Z., & Yang, G.-Y. (2020). Oligodendrocyte precursor cells transplantation protects blood–brain barrier in a mouse model of brain ischemia via Wnt/ β -catenin signaling. *Cell Death & Disease*, 11(1), 9. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2206-9>
- Wang, Y., Wang, Y., Zhao, X., Liu, L., Wang, D., Wang, C., Wang, C., Li, H., Meng, X., Cui, L., Jia, J., Dong, Q., Xu, A., Zeng, J., Li, Y., Wang, Z., Xia, H., & Johnston, S. C. (2013). Clopidogrel with Aspirin in Acute Minor Stroke or Transient Ischemic Attack. *New England Journal of Medicine*, 369(1), 11-19. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1215340>
- Yin, K.-J., Hamblin, M., & Chen, Y. (2015). Angiogenesis-regulating microRNAs and Ischemic Stroke. *Current Vascular Pharmacology*, 13(3), 352-365. <https://doi.org/10.2174/15701611113119990016>
- Yuen, T. J., Silbereis, J. C., Griveau, A., Chang, S. M., Daneman, R., Fancy, S. P. J., Zahed, H., Maltepe, E., & Rowitch, D. H. (2014). Oligodendrocyte-Encoded HIF Function Couples Postnatal Myelination and White Matter Angiogenesis. *Cell*, 158(2), 383-396. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.052>
- Zeng, W., Lei, Q., Ma, J., & Ju, R. (2020). Effects of hypoxic-ischemic pre-treatment on microvesicles derived from endothelial progenitor cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8468>
- Zhang, R. L., Chopp, M., Roberts, C., Liu, X., Wei, M., Nejad-Davarani, S. P., Wang, X., & Zhang, Z. G. (2014). Stroke Increases Neural Stem Cells and Angiogenesis in the Neurogenic Niche of the Adult Mouse. *PLoS ONE*, 9(12), e113972. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113972>

Zhou, S., Gao, B., Sun, C., Bai, Y., Cheng, D., Zhang, Y., Li, X., Zhao, J., & Xu, D. (2020). Vascular Endothelial Cell-derived Exosomes Protect Neural Stem Cells Against Ischemia/reperfusion Injury. *Neuroscience*, 441, 184-196. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.05.046>