



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“MECANISMOS MOLECULARES DE LA RESPUESTA A
HIPOXIA EN ASTROCITOS Y CÉLULAS ENDOTELIALES
DE LA MICROVASCULATURA CEREBRAL Y SU
PAPEL EN LA NEUROPROTECCIÓN”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ALBERTO RAMOS MORALES

TUTOR

DR. LUIS BERNARDO TOVAR Y ROMO

MÉXICO, D.F.

ABRIL 2016





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.

DEDICATORIA

Primeramente a DIOS, por haberme dado este sueño y los medios para lograrlo, por darme una segunda oportunidad siempre. Por la vida que me dio.

A mi Madre, por haber confiado en mí, por su apoyo incondicional y por todo su amor.

A mi hermano Rafael, por su cariño y comprensión, ya que para mí es también difícil la lejanía.

A mi tía Inés, por todo el apoyo que le ha dado a mi núcleo familiar y por su cariño.

A mis abuelos, Alberto y Juventina, por su ejemplo y cariño; aunque él ya no esté en la tierra sé que está orgulloso de la familia que dejó. A mi abuelita por su apoyo en mi niñez.

A toda mi familia, mis queridos tíos, tías, primos y primas; por su cariño y apoyo en los momentos más difíciles y felices.

Intenta no convertirte en un hombre de éxito sino en un hombre valioso.

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue realizado con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (219542) y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (IA201315).

Para la realización de este trabajo de tesis conté con una beca de 6 meses de PAPIIT-DGAPA (IA201315).

A mi tutor Dr. Luis Bernardo Tovar y Romo, por la confianza que depositó en mí, por el conocimiento teórico y práctico que me aportó, por sus consejos y comprensión, por la confianza que me dio con respecto a mi futuro en la ciencia. Fue un honor y gran fortuna haber formado parte de su laboratorio.

Agradezco al Instituto de Fisiología Celular, UNAM; por enseñarme un mejor y nuevo panorama de la ciencia en México, por su cobijo científico que me motiva a ser mejor para un día hacer ciencia de calidad aquí en mi nación.

A mi querida Facultad de Ciencias, por haberme abierto las puertas a la ciencia, por sus increíbles profesores y profesoras, por las alegrías y sueños que me hizo vivir.

Los experimentos hechos en el modelo de infarto isquémico in vivo fueron realizados por la M.V.Z. Berenice Bernal Vicente como parte de su trabajo de investigación en el programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas de la UNAM.

Agradezco al Q.F.B. Jesús Edgar Hernández Ponce, por su aportación a esta tesis del análisis histológico del infarto.

Al Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín por su asesoría y apoyo técnico en el western blot.

Al laboratorio de la Dra. Lourdes Massieu Trigo por su amabilidad en permitirnos trabajar en su cuarto de cultivo celular en la etapa inicial de esta tesis y por prestarnos el lector de placas.

Al laboratorio del Dr. Ricardo Tapia por la donación de alícuotas de anticuerpos y la amable disponibilidad de prestarnos su ultracentrífuga.

Al Dr. Fernando García Hernández por el apoyo brindado en el análisis de microscopía electrónica.

A nuestra laboratorista Marina Cristóbal Ortiz por su amable apoyo en la perfusión de las ratas para la realización del cultivo de células endoteliales y por su excelente servicio en el laboratorio.

Al Biólogo Eduardo Daniel Aguilar Solís por sus consejos y apoyo para la solución de dificultades surgidas en la técnica de western blot y por su increíble amistad.

A la Dra. Ruth Rincón Heredia por su amable apoyo en la toma de imágenes de epifluorescencia y microscopía confocal.

Al laboratorio de la Dra. López Colomé por su amable disposición en la donación de reactivos y por la amistad de varios de sus integrantes.

Al Dr. Genaro Vázquez Victorio por sus consejos en la solución de problemas en el western blot.

A mis estimados compañeros de laboratorio: Andrés, Edgar, Aura, Berenice, Isaac y Alfredo. Por la agradable amistad y convivencia que viví con ellos, por el aprendizaje y apoyo que me brindaron durante la tesis.

A mis queridos amigos y amigas que conocí a lo largo de la carrera: Héctor, Luis, mi novia Karla, Xochilt, Daniel, Tetsuya, Alfredo, Mariel Z., Yolanda y Mariel M. Por la increíble convivencia que tuve con ellos, por su apoyo brindado en los momentos difíciles y por las alegrías que compartimos.

Expreso mi agradecimiento por la revisión y comentarios hechos a esta tesis, al jurado de grado integrado por: Dr. Luis B. Tovar y Romo, Dra. Susana Castro Obregón, Dr. Julio Morán Andrade, Dr. Genaro Vázquez Victorio y al Dr. Josué Orlando Ramírez.

Y por último pero jamás menos importante, **a mi querida Universidad Nacional Autónoma de México**. Por permitirme cumplir mi sueño, por la excelente educación que me brindó y por haber sido mi segunda casa durante mi formación.

ÍNDICE

RESÚMEN.....	7
ABREVIATURAS.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
<i>El infarto cerebral</i>	9
<i>Enfermedad vascular cerebral en México y el mundo</i>	9
<i>Neuropatología del infarto cerebral isquémico</i>	10
<i>El glutamato y la excitotoxicidad en el infarto isquémico</i>	11
<i>Factores neurotróficos y factores de crecimiento celular en la neuroprotección ante un infarto cerebral</i>	12
<i>Papel neuroprotector del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en el infarto cerebral</i>	13
<i>La unidad neurovascular define la importancia de los astrocitos y las células endoteliales en los mecanismos de daño y de recuperación en el sistema nervioso central</i>	14
<i>Participación del factor inducido por hipoxia (HIF-1) en la isquemia cerebral</i>	17
<i>Exosomas como mecanismo de comunicación celular</i>	19
JUSTIFICACIÓN	28
HIPÓTESIS	29
OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS PARTICULARES	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
<i>Cultivo primario de células endoteliales de la microvasculatura cerebral de rata</i>	30
<i>Cultivo primario de astrocitos de corteza de rata</i>	30
<i>Inmunocitofluorescencia</i>	31
<i>Extracción de exosomas</i>	31
<i>Microscopía electrónica</i>	32
<i>Extracción de proteína</i>	32
<i>Tratamiento de hipoxia</i>	32
<i>Western blot</i>	33
<i>Modelo de infarto cerebral por la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO)</i>	33
<i>Tinción con cloruro de trifetil tetrazolio (TTC) para análisis del infarto cerebral</i>	33
RESULTADOS.....	34
<i>Caracterización del cultivo de células endoteliales de la microvasculatura cerebral</i>	34

<i>Caracterización de los cultivo de astrocitos de rata</i>	37
<i>Secreción de exosomas por las células endoteliales de la microvasculatura cerebral y astrocitos.....</i>	38
<i>La administración de exosomas secretados por astrocitos en condiciones fisiológicas, reducen el tamaño del infarto cerebral en ratas</i>	45
DISCUSIÓN.....	48
<i>Estandarización exitosa de un protocolo para el cultivo de células endoteliales de la microvasculatura cerebral</i>	48
<i>Estabilización de HIF-1α por el tratamiento de hipoxia de 6 h</i>	49
<i>La administración de exosomas extraídos de astrocitos en condiciones fisiológicas ejerce neuroprotección en el infarto cerebral isquémico, y la hipoxia elimina esta actividad neuroprotectora</i>	50
CONCLUSION.....	55
ANEXOS	56
<i>PROTOCOLO PARA EL CULTIVO DE CÉLULAS ENDOTELIALES DE LA MICROVASCULATURA CEREBRAL DE RATA.....</i>	56
<i>PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE EXOSOMAS</i>	58
REFERENCIAS	61

RESÚMEN

El infarto cerebral isquémico es producido por la obstrucción de un vaso o arteriola que impide el flujo sanguíneo a una zona del cerebro. El infarto cerebral es la segunda causa de muerte en el mundo. Actualmente se conocen muchos de los mecanismos celulares de daño que desencadena el infarto. Sin embargo, los mecanismos endógenos de recuperación que se activan después de un infarto, aún son poco conocidos. No existe un tratamiento eficiente para el infarto cerebral, siendo esta la causa de la alta letalidad y discapacidad asociada con esta patología. Existe evidencia de que muchos factores neurotróficos como factores de crecimiento celular y neurotrofinas tienen actividad neuroprotectora ante un infarto cerebral.

Varios tipos celulares del parénquima cerebral como las células gliales, las células vasculares y las mismas neuronas; producen factores neurotróficos en condiciones normales. El mecanismo para el transporte de estos factores neurotróficos a su blanco, está poco estudiado.

La producción y secreción de exosomas y microvesículas derivadas de membrana, podría ser el principal mecanismo para el transporte de proteínas y RNAs en la comunicación celular. Un posible mecanismo endógeno de recuperación post-infarto podría ser la producción y secreción de factores neurotróficos en el cerebro por los distintos tipos celulares que lo componen. El transporte de estos factores neurotróficos, puede ser mediado por microvesículas como los exosomas.

En este trabajo se investigó el efecto de la administración de los exosomas que secretan los astrocitos después de un infarto cerebral. Se establecieron cultivos primarios de astrocitos de rata, para aislar los exosomas que secretan en condiciones fisiológicas y de los exosomas que secretan cuando son sometidos a hipoxia (principal condición asociada al infarto isquémico). También se estableció un protocolo para generar cultivos primarios de células endoteliales de la microvasculatura cerebral de rata, así como, de la extracción de los exosomas que secretan *in vitro*. Para posteriores estudios de la función de la microvasculatura cerebral en un infarto cerebral.

La administración de los exosomas secretados por astrocitos en condiciones fisiológicas, tuvo una actividad neuroprotectora después de un infarto cerebral isquémico, al reducir el tamaño del infarto cerebral. Se encontró que la hipoxia genera que los exosomas de astrocitos pierdan su capacidad de neuroprotección.

El hallazgo da un indicio de que la disfunción de los astrocitos, es una de las causas de que se potencie el daño post-infarto, y que la secreción de factores neurotróficos mediante exosomas sea un mecanismo endógeno de recuperación que se activa después de la etapa aguda post-infarto.

Palabras clave: Infarto cerebral, Exosoma, Neuroprotección, Factor neurotrófico, Hipoxia, Isquemia.

ABREVIATURAS

Akt: Proteína cinasa B.

Ang1: Angiopoyetina 1.

BBB: Barrera hematoencefálica.

BSA: Albúmina de suero bovino.

CD63: Antígeno-Cluster de diferenciación 63.

ERK: Cinasa reguladora de señalación extracelular.

ESCRT: Complejo selectivo endosomal necesario para el transporte.

FBS: Suero fetal bovino.

Flk-1: Cinasa de hígado fetal 1.

FIt-1: Tirosín cinasa relacionada con Fms 1.

GTP: Guanosín trifosfato.

HBSS: Amortiguador de solución salina de Hank.

HLH-PAS: Dominio proteico básico de hélice-asa-hélice PER/ARNT/SIM

Hsp70: Proteína de shock térmico de 70 KDa.

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B activadas.

NGF: Factor de crecimiento nervioso.

NT-3: Neurotrofina-3.

PBS: Amortiguador de sales de fosfato.

PECAM: Molécula de adhesión celular endotelial/plaqueta 1.

PFA: Paraformaldehído.

PKR: Proteína cinasa activada por RNA.

SDF1 α : Factor derivado del estroma celular 1 alfa.

SGZ: Zona subgranular.

SNAP: Proteína asociada al sinaptosoma

SNARE: Proteína receptora del factor soluble de anclaje, sensible a N-etilmaleimida.

TSG101: Proteína del gen de susceptibilidad al tumor 101.

UNV: Unidad neurovascular.

VEGFR1: Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 1.

VEGFR2: Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2.

VPS4: Proteína asociada a la clasificación proteica vacuolar 4.

Wnt: Sitio de integración relacionada con las alas de Drosophila (Wingless-related integration site, por sus siglas en inglés).

INTRODUCCIÓN

El infarto cerebral

El infarto o accidente vascular isquémico es producido por la obstrucción de un vaso o arteriola que bloquea parcial o totalmente el flujo sanguíneo en el cerebro. La isquemia cerebral como resultado de la insuficiencia del flujo sanguíneo imposibilita las actividades metabólicas y fisiológicas cerebrales conduciendo a la muerte del tejido (American Stroke Association, 2015). Existen dos tipos de infarto cerebral; el hemorrágico producido por la ruptura de una arteriola cerebral y el isquémico debido a la obstrucción de un vaso o arteriola por un émbolo o un trombo (American Stroke Association, 2015; Sacco et al., 2013). Las dos principales causas de infarto del tipo isquémico son el embolismo y la trombosis; el primero se da por la formación de un émbolo de origen graso, un coágulo sanguíneo en el corazón o un coágulo formado en una arteria grande. Al fragmentarse el coágulo, éste puede viajar en la circulación sanguínea hasta obstruir un vaso pequeño. La trombosis en cambio se da por la formación de un coágulo que al crecer bloquea localmente al vaso donde se origina (American Stroke Association, 2015; Sacco et al., 2013). En el caso del infarto hemorrágico existen dos tipos; el intracerebral, donde un vaso o arteriola sanguínea que se localiza dentro del cerebro se rompe y el infarto hemorrágico subaracnoideo, donde un vaso sanguíneo del espacio subaracnoide presenta la fisura. Las causas principales del infarto hemorrágico son la hipertensión arterial, la malformación arteriovenosa y el aneurisma (zona vascular dilatada que propicia su adelgazamiento) (Grysiewicz et al., 2008; National Heart Lung and Blood Institute, 2014).

Algunos de los principales síntomas de un infarto cerebral son: problemas en la visión, dificultad o imposibilidad para el movimiento corporal generalmente de extremidades, pérdida de la conciencia, dificultad para hablar y pérdida de coordinación; estos síntomas pueden aparecer a pocos segundos, minutos o incluso horas después del evento isquémico (Columbia University Medical Center Neurosurgery, 2015).

Enfermedad vascular cerebral en México y el mundo

La enfermedad vascular cerebral o infarto cerebral, incluye a todas las anomalías cerebrales causadas por una interrupción del flujo sanguíneo o una disminución del flujo en los vasos del cerebro (Columbia University Medical Center Neurosurgery, 2015). En el 2002 la Organización Mundial de la Salud reportó al infarto cerebral como la cuarta causa de muerte en el mundo, pero, en el 2012 ascendió a la segunda causa de muerte ((OMS), 2002; OMS, 2012). En nuestro país es la tercera causa de muerte en personas mayores de 60 años (Erwin, 2011; Secretaría de Salud, 2009) y la sexta

causa de muerte en la población total (INEGI, 2013). El infarto cerebral como parte de la enfermedad cerebral vascular es un problema serio de salud en México y el mundo; basta con mencionar que 15 millones de personas en el mundo tienen en promedio un infarto cerebral anualmente ((OMS), 2002). En México causó la muerte de 31,997 personas en 2013 (INEGI, 2013). Un estudio realizado en México en 2011, encontró que el tipo de infarto cerebral predominante en el país, es el de tipo isquémico (Carlos, 2011).

Neuropatología del infarto cerebral isquémico

El daño ocasionado por el infarto isquémico se puede dividir en dos zonas; el foco isquémico y la penumbra. El primero se caracteriza por la muerte del tejido generalmente por necrosis debido a la caída total del flujo sanguíneo, mientras que la penumbra es una zona que rodea al foco isquémico que comienza a perder actividad metabólica por la disminución del flujo sanguíneo adyacente y la cual está sometida a estrés oxidativo y excitotoxicidad glutamatérgica (esto último como consecuencia de la muerte neuronal necrótica del foco isquémico). En la zona de penumbra predomina la muerte neuronal apoptótica. Ésta puede ser eliminada o atenuada por la actividad de factores neurotróficos que promueven la sobrevivencia celular (del Zoppo et al., 2011; Longo and Massa, 2013; Tovar et al., 2015).

El flujo sanguíneo cerebral en un humano sano es de (50-60) ml/100g/min. También posee una tasa metabólica de oxígeno normal de (120-175) $\mu\text{mol}/100\text{g}/\text{min}$ (Liu and Li, 2015). En cambio el foco isquémico tiene un flujo sanguíneo cerebral regional menor de 12ml/100g/min y una tasa metabólica cerebral de oxígeno menor de 65 $\mu\text{mol}/100\text{g}/\text{min}$. En el foco isquémico existe también un paro definitivo de la síntesis de proteínas y una muerte progresiva del tejido por necrosis.

La zona de penumbra que rodea al foco isquémico comienza a perder actividad eléctrica y posee un flujo sanguíneo cerebral regional de 12-22 ml/100g/min y una tasa metabólica cerebral de oxígeno arriba de 65 $\mu\text{mol}/100\text{g}/\text{min}$. La penumbra es una zona que está en riesgo de sufrir muerte por el decremento en el metabolismo, pero en las primeras etapas del infarto se mantiene viable y con posibilidades de ser rescatado (del Zoppo et al., 2011).

A nivel molecular la penumbra se caracteriza por un decremento en la síntesis proteica, un nivel estable de ATP (durante cierto período), síntesis exacerbada de chaperonas y un incremento de proteínas mal plegadas. La causa de la deficiencia en la síntesis proteica en la penumbra se debe a un paro en el inicio de la traducción, esta a su vez cauda por un incremento en la fosforilación del factor de iniciación en eucariontes (eIF2 α) mediada por la sobreactividad de la proteína cinasa activada por RNA (PKR) (del Zoppo et al., 2011). La causa del mal plegamiento de proteínas en la penumbra

todavía es desconocida, pero se piensa que se debe al incremento de Ca^{+2} en el retículo endoplásmico y la deficiencia de glucosa que impide la glicosilación de proteínas. Hay sobre expresión de chaperonas como la Hsp70 como una respuesta para mitigar el mal plegamiento proteico. Hsp70 se expresa y traduce exclusivamente en neuronas de la zona de penumbra donde aún hay ATP. El aumento en la expresión de ésta chaperona es asociada con neuroprotección (del Zoppo et al., 2011).

Otra característica importante del infarto cerebral isquémico es que no existe uniformidad y una clara delimitación entre el foco isquémico y la penumbra. Puede existir más de un foco isquémico (minifocos) con variación en tamaño e inmersos en zonas de penumbra. Sólo hasta etapas avanzadas del infarto estas zonas se delimitan mejor. La heterogeneidad de las zonas de penumbra puede ser el resultado de la dinámica vascular efectuada como respuesta ante el daño, que incluye la modulación en la irrigación sanguínea y la secreción de factores de crecimiento que median protección a la muerte celular como se verá más adelante (del Zoppo et al., 2011).

El glutamato y la excitotoxicidad en el infarto isquémico

El glutamato es el neurotransmisor excitador más abundante del sistema nervioso, tanto de vertebrados como de invertebrados. Su función es esencial para regular la sinaptogénesis, neurogénesis, sobrevivencia neuronal, crecimiento de neuritas y la muerte neuronal (Mattson, 2008). Incluso se ha observado una conexión muy estrecha entre la actividad neurotransmisora glutamatérgica y la modulación en la producción de factores neurotróficos que desencadenan la neuroplasticidad durante el desarrollo y en el adulto (Mattson, 2008).

Existen dos familias de receptores glutamatérgicos; ionotrópicos y metabotrópicos. Los primeros a su vez se dividen en receptores α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA), kainato y N-metil-D-aspartato (NMDA). Cuando el glutamato activa a los receptores tipo AMPA, genera una despolarización de membrana por la entrada de sodio al interior celular que activa a canales de calcio dependientes de voltaje y a canales receptores de NMDA. Esto induce un alto influjo intracelular de calcio y sodio en la neurona. El receptor de kainato al igual que los dos anteriores es un canal no selectivo a cationes, transporta Na^+ , K^+ y en menor medida Ca^{2+} al interior celular. La actividad de este receptor se ha asociado a la neuroplasticidad y en un evento de infarto cerebral tiene un papel similar que el receptor AMPA.

Los receptores metabotrópicos glutamatérgicos activos se acoplan a proteínas de unión a GTP que activan a la fosfolipasa C, luego ésta induce la producción de inositol trifosfato que promueve la liberación del calcio almacenado en el retículo endoplásmico. El incremento del calcio intracelular activa a la proteína cinasa C (PKC), a las proteasas: calmodulina y calpaínas y a factores de

transcripción como CREB (Cyclic AMP response element-binding protein) y NF- κ B. Esta cascada de señalización celular genera la remodelación de la arquitectura del citoesqueleto, de la excitabilidad de la membrana neuronal y de la expresión de genes como los codificantes para factores neurotróficos (Mattson, 2008).

En un evento isquémico hay un alto incremento en la concentración extracelular de glutamato que sobrepasa la capacidad de su recaptura por la glía, generando que se sobre activen los receptores glutamatérgicos como el de NMDA. Este suceso provoca la entrada masiva de calcio dentro de las neuronas de la zona de penumbra. Este incremento del calcio intracelular puede inducir la muerte neuronal por necrosis si el estado energético de la neurona es muy deficiente, o se puede inducir la muerte neuronal por apoptosis si el estado energético de la célula aún es preservado. Este fenómeno que se acaba de describir se le conoce como excitotoxicidad mediado por glutamato. La muerte por apoptosis es la predominante en la zona de penumbra del infarto porque las neuronas aún mantienen un estado energético no tan bajo (Ishitsuka et al., 2012; Mattson, 2008).

Factores neurotróficos y factores de crecimiento celular en la neuroprotección ante un infarto cerebral

Las funciones de los factores neurotróficos son regular la supervivencia de neuronas y células gliales, del mantenimiento axonal y de dendritas y la plasticidad neuronal. Las principales vías de señalización celular activadas para estas funciones son la vía de la cinasa de inositol-3-fosfato (PI3K)/Akt, la vía de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), la vía de la proteína cinasa dependiente de AMP cíclico y la vía de Rho A (Longo and Massa, 2013). Muchos factores de crecimiento como el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), el factor de crecimiento epidermal (EGF) y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) junto con los factores neurotróficos pueden modular estas vías de señalización y por tanto poseer una actividad similar a la de los factores neurotróficos. Cuando el sistema nervioso está bajo condiciones patológicas, estos factores de crecimiento celular poseen actividad neuroprotectora (Mattson, 2008; Wang et al., 2000a).

Algunos de los mecanismos por los que ejercen neuroprotección los factores de crecimiento son: por el bloqueo de la excitotoxicidad mediada por glutamato; por ejemplo, el bFGF actúa en este mecanismo regulando a la baja la expresión de los receptores de glutamato como el NMDA e incrementando la expresión de enzimas antioxidantes (Mattson et al., 1993; Mattson et al., 1995). Otro mecanismo es por promover la sobrevivencia neuronal. El factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y el factor de necrosis tumoral (TNF) potencian la expresión del factor de

transcripción NF- κ B que a su vez induce la expresión de proteínas anti-apoptóticas y enzimas antioxidantes. Un tercer mecanismo de acción de los factores de crecimiento que les confiere capacidad neuroprotectora es por estimular la neurogénesis. Como sucede con los factores de crecimiento epidermal (EGF), bFGF y BDNF que estimulan la proliferación de las células progenitoras neuronales durante el desarrollo y en el adulto (Baldauf and Reymann, 2005; Waterhouse et al., 2012). Un último mecanismo es a través de la activación de las vías de señalización de supervivencia celular como la vía de PI3K-Akt, el VEGF y el IGF-1 que ejercen neuroprotección. (Kilic et al., 2006; Nakao et al., 2001; Nitta et al., 2004; Wang et al., 2002).

El blanco celular donde actúan estos factores neurotróficos incluye a todos los tipos celulares en el parénquima cerebral. Un estudio encontró que en condiciones de hipoxia los pericitos de la microvasculatura cerebral incrementan la producción de neurotrofina-3 (NT-3), cuyo blanco celular son los astrocitos donde se activa la vía ERK1/2 que induce el incremento en la producción de NGF. Esto promueve la supervivencia neuronal en la zona de penumbra (Ishitsuka et al., 2012). Como se verá más adelante, lo anterior apoya la hipótesis de que la neuroprotección originada por el restablecimiento de la unidad neurovascular y la secreción de factores neurotróficos son indispensables para la recuperación cerebral ante daño o en enfermedades neurodegenerativas (Hawkins, 2005; Hermann and Zechariah, 2009).

Papel neuroprotector del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) en el infarto cerebral

La familia de VEGF consta de cinco miembros que forman homodímeros; VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y el factor de crecimiento derivado de placenta (Hermann and Zechariah, 2009; Vempati et al., 2014). Esta familia posee tres receptores primarios de tipo tirosín cinasa (RTKs); uno de estos es VEGFR1 o también conocido como (Flt-1), el otro receptor es el VEGFR2 o también llamado Flk-1 y el tercero es VEGFR3 también conocido como Flt-4. Éste último es exclusivo de la linfangiogénesis. Además de los receptores existen correceptores para el receptor VEGFR2 como neuropilin-1 (NRP1), neuropilin-2 (NRP2) y glucosaminoglicanos de superficie celular (GAGs y heparina) (Gera Neufeld, 1999; Vempati et al., 2014).

Dentro de los miembros de la familia de VEGF, VEGF-A es el que posee mayor actividad mitogénica y es el principal implicado en la migración celular durante la angiogénesis. Su principal receptor para estas funciones es el VEGFR2 a cuya unión se ve favorecida por el correceptor NRP-1.

El VEGF-A humano tiene varias formas de splicing alternativo; VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₂, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆. Éstas isoformas se distinguen por poseer diferentes afinidades para unirse a los receptores 1 y 2, así como en la posesión o carencia de los sitios de unión

a proteoglicanos heparán sulfato y al correceptor neuropilin-1 (NRP-1) (Vempati et al., 2014). VEGF-A₁₆₅ a diferencia de las otras isoformas de VEGF carece del exón 6 y tiene el exón 7. El exón 6 posee actividad intrínseca inhibitoria por codificar una secuencia de localización nuclear que interfiere con la unión a VEGFR2 y el exón 7 codifica el sitio de unión a NRP1 y heparina que facilitan la unión de VEGF-A₁₆₅ con VEGFR2. Esta es la razón de porque VEGF-A₁₆₅ es la isoforma de VEGF con mayor actividad mitogénica, angiogénica y de migración celular, al activar de forma eficiente a VEGFR2 (Jia et al., 2001; Lee et al., 2010; Vempati et al., 2014).

Se ha reportado que VEGF-A tiene actividad neuroprotectora ante el daño producido por un infarto cerebral (Kilic et al., 2006). La administración *in vivo* de VEGF vía intraventricular reduce el daño en la etapa aguda, rescata la zona de penumbra de la muerte celular y favorece la recuperación neurológica después del evento isquémico (Kaya et al., 2005; Sun et al., 2003). Los tipos celulares involucrados en la producción de VEGF durante y después del infarto son las neuronas, glía, y células vasculares (Hermann and Zechariah, 2009). La expresión del VEGF sucede de forma basal, pero se incrementa después del infarto cerebral. También se conoce que las diferentes células que expresan VEGF también incrementan la expresión de los receptores para éste factor de crecimiento después del infarto (Hermann and Zechariah, 2009).

A pesar de que se conoce que el VEGF tiene actividad neuroprotectora es necesario mencionar que también se ha visto un efecto contraproducente en el infarto cerebral cuando se administra VEGF. El mecanismo que se cree está implicado en este efecto, es por la promoción de la neuroinflamación ya que VEGF induce el rompimiento de la barrera hematoencefálica (Argaw et al., 2012). Hace falta dilucidar porque existe este efecto dual del VEGF en el infarto cerebral y en qué condiciones es totalmente benéfica la actividad del VEGF. Este aspecto es muy importante a responder si consideramos que el VEGF puede participar de forma importante en los mecanismos endógenos de recuperación post-infarto (Tovar et al., 2015).

La unidad neurovascular define la importancia de los astrocitos y las células endoteliales en los mecanismos de daño y de recuperación en el sistema nervioso central

La unidad neurovascular (UNV) es la estrecha asociación e interacción tanto a nivel estructural como funcional de los diferentes tipos celulares que conforman el sistema nervioso central. La UNV está conformada por las células vasculares, la glía y las neuronas. Gracias a la UNV procesos cerebrales como: la perfusión sanguínea, la neurogénesis, el desecho de toxinas, la respuesta neuroinflamatoria, el mantenimiento de la barrera hematoencefálica (BBB, por sus siglas en inglés blood-brain barrier) y la actividad neuronal son finamente controlados para la correcta función del sistema nervioso central (Stanimirovic, 2012). La importancia de esta alta regulación puede apreciarse mejor en las

alteraciones en la unidad neurovascular que desencadenan las principales enfermedades neurodegenerativas (Zlokovic, 2011).

Durante el infarto cerebral y posterior a éste, también existen alteraciones en la unidad neurovascular; como el rompimiento de la barrera hematoencefálica, neuroinflamación, inducción de la neurogénesis y cambios en la perfusión sanguínea cerebral. De aquí la importancia de que en estudios que buscan comprender algún mecanismo de recuperación endógena cerebral post-infarto se tome en cuenta en el estudio a más de un tipo celular constituyente de la UNV.

En las funciones normales de la UNV como en la vasculogénesis durante el desarrollo cerebral, que se lleva a cabo en el plexo vascular neural que rodea al tubo neural. La sobreexpresión y secreción de VEGF y Wnt (7a,7b) por el neuroepitelio activan a VEGFR2 y a los complejos de receptores (Frizzled (Fzd/Lrp5/6)) en las células endoteliales. Esto induce la ramificación vascular hacia el neuroepitelio y por tanto la correcta vasculogénesis. En la angiogénesis estos ligandos pueden ser liberados tanto por células de origen neural como vascular (Quaegbeur et al., 2011).

Otra papel de la UNV donde participan crucialmente las células endoteliales y los astrocitos es en la barrera hematoencefálica (BBB). La BBB evita que los componentes moleculares y celulares de la sangre tengan contacto directo con las células neurales del sistema nervioso central (SNC). La BBB se forma durante el desarrollo cuando el neuroepitelio activa la vía de señalización Wnt/ β -catenina. Ésta señalización induce en las células endoteliales la expresión de los genes involucrados en la formación de la BBB, como las proteínas para las uniones intercelulares estrechas y adherentes (claudinas 1/3, 5, ocludinas y VE-cadherinas) que restringen la permeabilidad paracelular (Abbott et al., 2006).

La BBB cumple la función del transporte de nutrientes, iones y de desechos celulares de la sangre al parénquima cerebral y viceversa. De esta forma la BBB protege al SNC del potencial daño que causarían las toxinas, patógenos y las fluctuaciones de los componentes sanguíneos. Sólo pueden atravesar la BBB pequeñas moléculas lipofílicas, oxígeno y dióxido de carbono (Quaegbeur et al., 2011; Stanimirovic and Friedman, 2012). Las células endoteliales son las primeras en regular la entrada y salida de moléculas en el parénquima cerebral y lo hacen mediante diversos transportadores de membrana dependientes de ATP. Como bombas de sodio-potasio ($\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$), transportadores dependientes de sodio de aminoácidos excitadores (EAAT (1, 2 y 3)) y mediante los casettes de transportadores con unión a ATP (transportadores ABC). Gracias a estos transportadores el endotelio realiza una función de limpieza de desechos metabólicos y de neurotransmisores producidos por las células neurales: Como el glutamato, especies reactivas de oxígeno e incluso

péptidos β -amiloide cuya acumulación desencadena neurodegeneración. Finalmente el transporte de proteínas y péptidos es mediado por receptores asociados a caveolina 1 (CAV1) y por transcitosis celular endotelial (Stanimirovic and Friedman, 2012; Zlokovic, 2011).

Los astrocitos son parte fundamental en la formación de la BBB al generar contacto sobre toda la superficie vascular que origina una estrecha comunicación celular con pericitos y células endoteliales. Estos puntos de contacto en el endotelio por los pies de astrocitos, es la clave de la alta regulación del paso de moléculas sanguíneas que pueden o no atravesar hacia el parénquima cerebral. Estos puntos de contacto se caracterizan por ser arreglos ortogonales intramembranosos enriquecidos en aquaporinas, canales iónicos, conexinas, transportadores glutamatérgicos y receptores purinérgicos (Quaegebeur et al., 2011; Stanimirovic and Friedman, 2012).

Otra función de la UNV es la regulación de la respuesta neuroinmune. Cuando existe daño o la infiltración de un patógeno al sistema nervioso central, la producción de citocinas, quimiocinas y eicosanoides por las células gliales y vasculares (células endoteliales y pericitos) inicia la respuesta acelular inmunitaria. Luego se desencadena la respuesta celular con la activación de la microglía y el reclutamiento de leucocitos. El endotelio hace posible el reclutamiento de los leucocitos al parénquima cerebral mediante moléculas de adhesión celular en las membranas lumenales que facilitan la extravasación de los leucocitos al parénquima cerebral (Greenwood et al., 2011; Stanimirovic and Satoh, 2000).

Un aspecto que resalta la estrecha interrelación del SNC con el vascular es la existencia de muchas moléculas con actividad tanto neural como vascular. Por ejemplo; varias familias de proteínas que guían el crecimiento axonal como las proteínas de hendidura, efrinas, semaforinas y netrinas también regulan la ramificación vascular con el mismo mecanismo como si se tratara de axones. Las células endoteliales poseen receptores para neuropilin-1 (Nrp1) que es a la vez un receptor para semaforinas y un correceptor para VEGF (Zlokovic, 2011). El VEGF es muy conocido por su papel en la angiogénesis e interesantemente es producido por todos los tipos celulares que conforman la unidad neurovascular. Este factor de crecimiento cumple funciones en el sistema nervioso central como: la regulación del crecimiento axonal, la migración neuronal, la neurogénesis y la dendritogénesis (Quaegebeur et al., 2011; Zlokovic, 2011).

Se ha reportado que las arterias atraen su inervación con neuronas simpáticas mediante la secreción de VEGF, NT-3 y endothelin-3 (Quaegebeur et al., 2011).

La regulación de la neurogénesis es mediada por procesos de vascularización. El nicho neurogénico que favorece las condiciones de pluripotencia de las células progenitoras basales (durante el

desarrollo) se caracteriza por ser una zona avascular. Cuando se activa la neurogénesis las células progenitoras migran hacia una zona vascularizada para que ésta, mediante la secreción de factores tróficos induzca la diferenciación de las células progenitoras neurales. La neurogénesis en la zona subgranular (SGZ) también está acoplada directamente con la angiogénesis del nicho neurogénico. La neurogénesis en la SGZ es regulada por el VEGF secretado por las células vasculares cercanas al nicho neurogénico (Quaegebeur et al., 2011).

La hipoxia después del infarto cerebral activa la neurogénesis. Se sabe que los neuroblastos son atraídos a la vasculatura creciente de la zona de penumbra y que este proceso inicia con la secreción de SDF1 α y Ang1 por la microvasculatura. La angiogénesis que se activa en la zona de penumbra incrementa la microvasculatura y esta sirve como un sustrato-guía de los neuroblastos a la zona del infarto (Quaegebeur et al., 2011). La vasculatura participa de forma crucial en la remodelación estructural neural en el cerebro y por otra parte la actividad neural también modifica de forma directa la densidad y ramificación vascular en la corteza cerebral (Lacoste et al., 2014).

Participación del factor inducido por hipoxia (HIF-1) en la isquemia cerebral

HIF-1 es un factor de transcripción heterodimérico con una subunidad sensible a oxígeno (subunidad α) y una subunidad β (también conocida como the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)). Las dos subunidades son miembros de la familia de factores de transcripción (HLH-PAS) porque poseen el dominio básico de hélice-asa-hélice PER/ARNT/SIM (Giaccia et al., 2003). La estabilidad del heterodímero HIF-1 y su correcta activación para la actividad transcripcional sólo se logra en condiciones de hipoxia. Cuando HIF-1 se transloca al núcleo, une a los genes que poseen el elemento de respuesta a hipoxia (HRE) de secuencia ACGTG. Esto le permite regular la expresión de más de 100 genes involucrados en la angiogénesis, metabolismo energético, homeostasis del hierro y del pH, en la proliferación y la sobrevivencia celular, eritropoyesis, metabolismo de nucleótidos, transporte de metales y en el control vasomotor (Semenza, 2007; Tekin et al., 2010; Weidemann and Johnson, 2008). HIF-1 se expresa en casi todos los tejidos. La subunidad α y β se expresan constitutivamente en la célula; sin embargo, en normoxia, la subunidad α se degrada constantemente por el proteosoma y sólo en condiciones de hipoxia logra su estabilización en la célula para unirse a la subunidad β y translocarse al núcleo como el heterodímero HIF-1 (Giaccia et al., 2003; Semenza, 2007; Tekin et al., 2010; Weidemann and Johnson, 2008).

La subunidad HIF-1 α posee dos dominios que regulan su estabilidad y función en base a la cantidad de oxígeno en la célula; el dominio para la degradación dependiente de oxígeno (ODD, oxygen-dependent degradation) localizado entre los residuos 531-575 y el dominio de transactivación en su carboxilo terminal (C-TAD). En normoxia HIF-1 α es hidroxilizado en la prolina 564 del dominio

ODD y en la prolina 402, por la familia de prolin-hidroxilasas dependientes de oxígeno (PHDs 1,2,3) para cuya reacción se necesita también 2-oxo-glutarato e hierro (Weidemann and Johnson, 2008). La hidroxilación en la prolina 564 es indispensable y suficiente para la detección y unión de la proteína von Hippel-Lindau (VHL) con HIF-1 α , pero es necesaria la acetilación de la lisina 532 del dominio ODD para facilitar dicha interacción. La unión de VHL permite el reclutamiento del complejo ubiquitina ligasa E3 que marca a HIF-1 α para su degradación en proteosoma 26S (Tekin et al., 2010). Otro mecanismo para la regulación de la actividad de HIF-1 es la inhibición de su actividad transcripcional por la hidroxilación de la asparagina 803 del dominio C-TAD de HIF-1 α por el factor inhibidor de HIF-1 (FIH-1). Esta hidroxilación impide la unión del dominio C-TAD con el coactivador transcripcional p300/CBP en condiciones de normoxia. Para la unión de HIF-1 con p300 es necesario la reducción de las cisteínas del dominio C-TAD por la tioredoxina y el factor redox 1 (Giaccia et al., 2003; Semenza, 2007; Tekin et al., 2010; Weidemann and Johnson, 2008).

La hipoxia permite la estabilización de la subunidad HIF-1 α y la activación del complejo HIF-1. Sin embargo, no es el único mecanismo para la activación de HIF-1. Otros factores no hipóxicos como interleucina 1, prostaglandinas E₂, trombina, angiotensina II, serotonina, factores de crecimiento (como el factor derivado de plaquetas), acetilcolina, lipopolisacáridos, donadores de óxido nítrico, el incremento de estrés oxidativo y la privación de glucosa activan a HIF-1 (Giaccia et al., 2003; Tekin et al., 2010; Ziello et al., 2007). Es interesante notar que algunos de los factores mencionados tienen su sobreexpresión en procesos inflamatorios o cuando sucede una alteración de la unidad neurovascular, como la hiperpermeabilidad de la barrera hematoencefálica (Basu et al., 2004; Boje et al., 2003; Lochhead et al., 2010; Shafiq et al., 2008).

Un mecanismo de protección vinculado con HIF-1 es la activación de dos principales vías de señalización río abajo de HIF-1; PI3K/Akt y de las MAPK (mitogen-activated protein kinase) que promueven supervivencia y proliferación celular. La activación de la vía PI3K/Akt se debe principalmente por la acción de VEGF cuya expresión es inducida por HIF-1. VEGF genera un asa de retroalimentación positiva al inducir la estabilización y expresión de HIF-1 (Deudero et al., 2008). La inducción de VEGF ha sido reportada como neuroprotectora y su inhibición es la causa de la pérdida de neuroprotección asociada con HIF-1, pues el bloqueo de la vía PI3K/Akt activada por VEGF mediante inhibición de mTOR o por la sobreexpresión de la fosfatasa PTEN; eliminan la protección mediada por HIF-1 (Giaccia et al., 2003; Semenza, 2000a; Ziello et al., 2007).

Debido a que HIF-1 se estabiliza por la hipoxia, así como por la privación de glucosa. Éste es un buen marcador de isquemia. Además la actividad transcripcional de HIF-1 permite la expresión de más de

100 genes blancos. Genes que son relevantes en los mecanismos celulares desencadenados después de un infarto cerebral que llevan a la recuperación neural.

Exosomas como mecanismo de comunicación celular

Las vesículas extracelulares han tomado gran importancia actualmente gracias a la determinación de su papel fundamental en la comunicación intercelular. Desde la década de los 60's se reportó en numerosos estudios la presencia de microvesículas en diferentes tipos de fluidos corporales, tejidos y especialmente en tumores. Hasta entonces se atribuía un origen único para todas éstas microvesículas, que derivaban de la membrana plasmática (Anderson, 1969; Crawford, 1971; Dvorak et al., 1981; Stegmayr and Ronquist, 1982). Sin embargo, en la década de los 80's se describió en reticulocitos la secreción de un tipo de vesícula extracelular que se forma a partir de los endosomas multivesiculares. A estas microvesículas se les llamó exosomas (Harding et al., 1983; Johnstone et al., 1987; Pan and Johnstone, 1983).

Los exosomas son microvesículas extracelulares que miden entre (30-100) nm de diámetro. Contienen una gran diversidad de proteínas, lípidos, mRNAs, miRNAs e incluso fragmentos de DNA. Se diferencian de las microvesículas propiamente llamadas, por el origen y el tamaño; los exosomas tienen un origen endosomal mientras que las microvesículas son derivadas por gemación de la membrana plasmática y miden entre (150-1,000) nm (Lai and Breakefield, 2012; Mathivanan et al., 2010; Raposo and Stoorvogel, 2013). En la última década se realizó un consorcio para resolver la definición de las microvesículas, principalmente de exosomas, debido a que había comúnmente un mal uso del nombre exosoma para vesículas derivadas de membrana plasmática. Existía una gran diversidad de métodos, pero también de errores para aislar y purificar exosomas. Fue a raíz del consorcio que se dio una definición de cada tipo de microvesícula basada en el origen y se crearon asociaciones internacionales para la investigación y para la creación de bases de datos mundiales respecto a los exosomas. Como la International Society for Extracellular Vesicles y la base de datos mundial sobre exosomas Exocarta (Colombo et al., 2014; Mathivanan et al., 2010).

La composición bioquímica de los exosomas es todavía investigada, sin embargo, se sabe que las biomoléculas que portan los exosomas varía según el tipo celular que la secreta; así como del estado celular, es decir un mismo tipo celular libera cierto contenido en los exosomas en condiciones fisiológicas y otro diferente en condiciones patológicas (incluso ante algún cambio en el microambiente celular). La composición de las membranas de exosomas es enriquecida en colesterol, ceramidas, esfingomiélin y ácidos grasos saturados (Colombo et al., 2014).

Gracias a la creación de la base de datos sobre exosomas, Exocarta, se pudo determinar que existen proteínas y lípidos generales en exosomas. Algunos de los cuales son estructurales o participan en la biogénesis de exosomas. La presencia de éstas proteínas comunes en exosomas como las tetraspaninas (CD63, CD9, CD81) y Alix, sirve como un marcador para exosomas junto con el tamaño específico de exosomas (30-100) nm (Lai and Breakefield, 2012; Mathivanan et al., 2010).

Los estudios con las bases de datos de exosomas revelan que el cargo del mRNA en exosomas no sucede de forma azarosa. Existen secuencias de mRNA preferidas para la secreción mediada por exosomas. De forma similar ocurre con los miRNAs, algunas de éstas secuencias se han descrito como exclusivas de exosomas (Batagov et al., 2011; Colombo et al., 2014; Montecalvo et al., 2012).

La biogénesis de exosomas está aún en estudio, se desconoce a detalle el mecanismo molecular implicado. Sin embargo, los últimos estudios revelan que primero ocurre la formación del endosoma por la invaginación de la membrana plasmática al citosol y que puede ser facilitado por microdominios cubiertos de clatrina en la membrana plasmática, formándose el endosoma temprano. Luego, durante la maduración del endosoma, ocurre la fusión de vesículas secretadas por el aparato de Golgi con el endosoma y el inicio de la formación de microvesículas que geman a partir de la membrana limitante del endosoma hacia el lumen llevando al endosoma temprano a convertirse en un endosoma tardío o cuerpo multivesicular (MVB, por sus siglas en inglés) (Cullen, 2008; Denzer et al., 2000; Johnstone et al., 1987; Le Roy and Wrana, 2005; Stoorvogel et al., 1991). Los MVBs pueden ir hacia lisosoma para su degradación o fusionarse con la membrana celular liberando las vesículas intraluminales al exterior (Jaiswal et al., 2002; Luzio et al., 2007; Pryor and Luzio, 2009; Raposo et al., 1997). Al formarse las vesículas intraluminales secuestran proteínas y lípidos de la membrana endosomal, pero también proteínas citoplásmicas.

A nivel molecular se han descrito recientemente cuatro mecanismos implicados en la formación de las vesículas intraluminales en el endosoma que origina los exosomas. Uno depende del endosomal sorting complex required for transport (ESCRT), compuesto aproximadamente de 30 proteínas que se ensamblan en 4 complejos (ESCRT-0,-I-II y III), los cuales se asocian con las proteínas VPS4 y Alix (Colombo et al., 2013; Hanson and Cashikar, 2012; Tamai et al., 2010).

El complejo ESCRT-0 es el encargado de reconocer y secuestrar las proteínas transmembranales ubiquitinadas de la membrana endosomal (Colombo et al., 2013). Después los complejos ESCRT -I y -II inician la invaginación de la membrana endosomal para originar cada vesícula intraluminal y finalmente el complejo ESCRT III dirige la escisión de la vesícula intraluminal de la membrana endosomal (Hanson and Cashikar, 2012; Wollert et al., 2009). El complejo ESCRT-0 selecciona las

proteínas que estarán contenidas en los exosomas mediante proteínas como HRS (hepatocyte growth factor- regulated tyrosine kinase substrate) y STAM (signal transducing adaptor molecule). Las proteínas monoubiquitinadas son reclutadas mediante la proteína HRS, las demás pueden ser seleccionadas por STAM (Colombo et al., 2014; Hasdemir et al., 2007; Mizuno et al., 2003).

El reclutamiento de la proteína TSG101 del complejo ESCRT-I por la proteína HRS, induce el reclutamiento del complejo ESCRT-III con la participación de componentes del complejo ESCRT-II o a través de Alix. Al final de la actividad de los complejos ESCRT, la AAA-ATPasa (VPS4) permite la disociación y reciclamiento de ésta maquinaria, ver figura 1 (Azmi et al., 2006; Colombo et al., 2013; Colombo et al., 2014; Kowal et al., 2014).

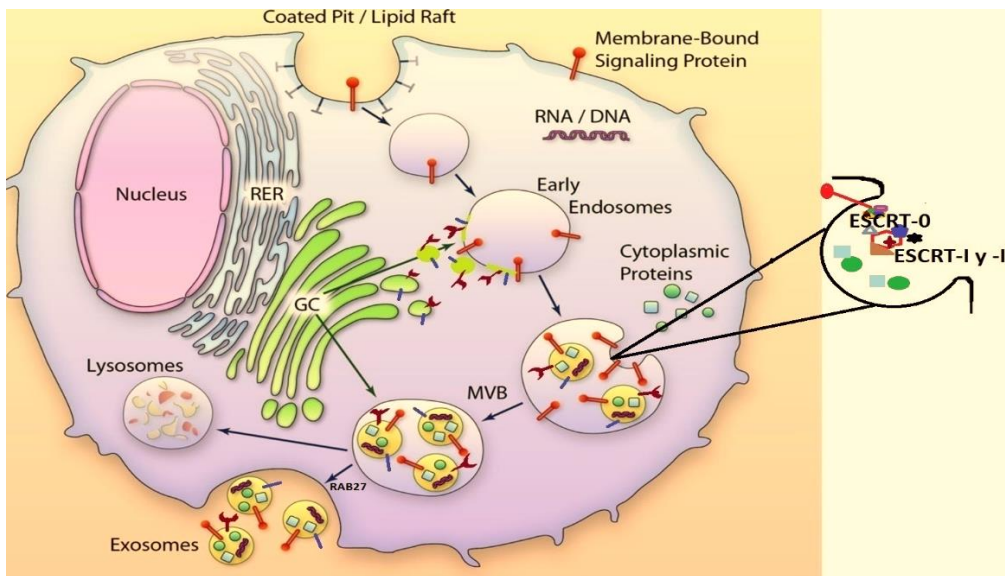


Figura 1. Biogénesis del endosoma y el cuerpo multivesicular (MVB). La invaginación del endosoma a partir de la membrana plasmática recluta proteínas y dominios lipídicos, algunos de los cuales se integraran en la membrana del exosoma. La fusión de vesículas provenientes del aparato de Golgi con el endosoma temprano agrega otro grupo de proteínas que pueden formar parte de los exosomas. El complejo ESCRT-0 y las tetraspaninas son quienes clasifican las proteínas que formarán parte del exosoma. El mecanismo de carga en los exosomas de ácidos nucleicos aún está bajo estudio. Los complejos ESCRT-I, II, son reclutados por el complejo cero para mediar la invaginación de la membrana endosomal y originar las vesículas intraluminales. La familia de proteínas RABs clasifican que endosomas multivesiculares liberaran su contenido por fusionarse con la membrana celular y cuáles serán degradados al fusionarse con lisosomas. Al final los exosomas pueden llevar proteínas de la membrana plasmática, citosólicas o de secreción sintetizados en el aparato de Golgi. *Figura modificada de (Waldenstrom and Ronquist, 2014).*

No se conoce a detalle el mecanismo de inclusión de las proteínas citosólicas en las vesículas intraluminales (exosomas), pero se ha observado que la chaperona HSC70 se une a las proteínas citosólicas que contienen el motivo de aminoácidos “KFERQ” (Dice, 1990; Sahu et al., 2011) y luego a su vez las une a la cara externa de la membrana endosomal mediante su interacción con la fosfatidil

serina contenida en la membrana endosomal. Tras la invaginación de la microvesícula intraluminal las proteínas citosólicas unidas a la membrana de las vesículas intraluminales quedan dentro del lumen exosomal. Este proceso es dependiente de TSG101 y VPS4, pero se desconoce a detalle el mecanismo (Colombo et al., 2014; Sahu et al., 2011; Yeung et al., 2008). Otra proteína crucial en la clasificación de las proteínas que serán cargadas en las microvesículas intraluminales es Alix. Fue caracterizada en la biogénesis de exosomas de reticulocitos, Alix se une a sus proteínas blanco para cargarlas en los exosomas mediante su unión a los dominios syndecan de proteínas transmembranales a través de su interacción con syntenin (Baietti et al., 2012).

Los otros mecanismos involucrados en la biogénesis de las vesículas intraluminales son independientes de ESCRT y fueron descubiertos tras inactivar proteínas claves de la maquinaria ESCRT y encontrar que no abolía totalmente la formación de cuerpos multivesiculares. La clasificación de proteínas que se cargan en las vesículas intraluminales en uno de estos mecanismos independientes de ESCRT; es dependiente de la tetraspanina CD63. Proteína que facilita la formación de las microvesículas intraluminales y enriquecida principalmente en exosomas menores de 40nm (Colombo et al., 2013; Edgar et al., 2014; van Niel et al., 2011). Otro mecanismo, independiente de ESCRT, es promovido por dos enzimas metabólicas de lípidos, la esfingomielinasa neutral (nSMase) que cataliza la hidrólisis de esfingomielina en ceramida, y la fosfolipasa D2, para la hidrólisis de fosfatidil colina en ácido fosfatídico. Éstos productos lipídicos al acumularse generan la invaginación de la membrana endosomal y por tanto la formación de las microvesículas intraluminales (Trajkovic et al., 2008). En el cuarto mecanismo para la biogénesis de vesículas intraluminales participa parte de la maquinaria ESCRT, pero es necesaria la función de CD63 y la producción de ceramida y ácido fosfatídico para la invaginación de la membrana endosomal, ver figura 2 (Carayon et al., 2011).

Debido a la diversidad de mecanismos para la formación de las microvesículas intraluminales (futuros exosomas), la selección del contenido exosomal es muy compleja de estudiar y de predecir. Existe una diversidad de exosomas y faltan más estudios que comprueben certeramente si en la formación de las vesículas intraluminales pueden participar al mismo tiempo varios mecanismos de biogénesis o si predomina un solo mecanismo en ciertas condiciones celulares o en dependencia del tipo celular (Colombo et al., 2014; Kowal et al., 2014).

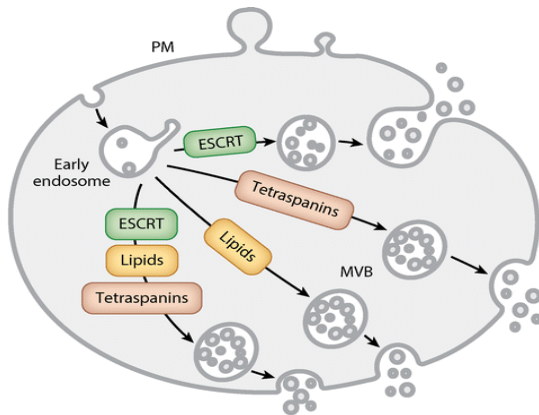


Figura 2. Mecanismos biogénicos de exosomas. Para la biogénesis de las vesículas intraluminales en el endosoma (futuros exosomas) varios mecanismos se han descrito: uno que es dependiente de ESCRT. Un segundo mediado por tetraspaninas, otro cuya invaginación de las vesículas intraluminales requiere dominios membranales endosomales enriquecidos por ceramida y/o ác. fosfatídico, y un último mecanismo donde participa la combinación de los anteriores. *Imagen tomada de (Colombo et al., 2014).*

En la secreción de exosomas participan las GTPasas de la familia RAB. Algunas como RAB5, RAB7, RAB11, RAB27 y RAB35 están involucradas en la clasificación de los endosomas que se reciclarán vía lisosoma o se secretarán por su fusión con la membrana plasmática (Hsu et al., 2010; Savina et al., 2002; Stenmark, 2009; Wang et al., 2000b). RAB27A/B es la principal GTPasa involucrada en el transporte de endosomas tardíos (cuerpos multivesiculares) hacia la membrana plasmática. Los exosomas secretados por acción de estas proteínas RAB poseen enriquecimiento en CD63 y TSG101 (Ostrowski et al., 2010; Zheng et al., 2013). Sin embargo, en la secreción de exosomas no siempre participan todas estas GTPasas, ya que algunos endosomas que no llegan a la etapa de endosomas tardíos (cuerpos multivesiculares, que reciben vesículas del aparato de Golgi mediante fusión) pueden fusionarse rápidamente con la membrana plasmática. En este proceso participan las RABs (5 y 7); los exosomas secretados por este mecanismo son enriquecidos de la proteína Alix y en proteínas con dominio syndecan (Baietti et al., 2012; Colombo et al., 2014; Rink et al., 2005).

Las proteínas SNAREs (SNAP receptors), al formar complejos con las proteínas SNAPs permiten la fusión de las membranas entre dos organelos o, en este caso, del endosoma con la membrana plasmática. Este proceso puede ser dependiente de Ca^{2+} dependiendo de la SNAP involucrada (Colombo et al., 2014; Puri and Roche, 2008). En la secreción de microvesículas derivadas de la membrana plasmática se han caracterizado las SNAPs/SNAREs participantes; sin embargo, aún no se conocen a detalle las que intervienen en la fusión de los endosomas multivesiculares con la membrana plasmática. Sólo VAMP7 ha sido reportada que promueve exocitosis de los endosomas multivesiculares (Fader et al., 2009; Kowal et al., 2014).

Se cree que diferentes complejos SNAREs participan en la fusión de los endosomas multivesiculares con la membrana plasmática y que varía según el tipo celular. En *C. elegans* la mutación de la subunidad V_0 de la V-ATPasa genera la acumulación de endosomas multivesiculares en la membrana

plasmática. La correcta función de la V-ATPasa es necesaria para la fusión de estos endosomas con la membrana plasmática (Liegeois et al., 2006). En mamíferos existen varias isoformas de esta V-ATPasa, pero no se ha corroborado dicha función (Colombo et al., 2014).

El destino extracelular de los exosomas está bajo estudio; los exosomas al igual que las microvesículas derivadas de membrana plasmática poseen receptores y otras proteínas transmembranales en su membrana limitante que pueden participar en la clasificación de su blanco (Colombo et al., 2014; S et al., 2013). Por ejemplo, se ha visto una cierta afinidad a un blanco por el enriquecimiento de receptores en su membrana y esta unión receptor-ligando entre el exosoma y la célula diana permite su función fisiológica (Morelli et al., 2004; Segura et al., 2005). Otro posible mecanismo es mediar la internalización del exosoma en la célula (Colombo et al., 2014; S et al., 2013). Un estudio demostró la internalización de luciferina en células dendríticas después de ser incubadas con exosomas portadores de luciferina (Montecalvo et al., 2012).

La portabilidad de balsas lipídicas en la membrana de exosomas puede permitir un mecanismo de transferencia de proteínas transmembranales. Mediante la fusión de la membrana del exosoma con su célula diana o por el reciclamiento de la membrana exosomal para constituir la membrana plasmática de la célula blanco (transferencia de receptores y balsas lipídicas) (Calzolari et al., 2006; Tan et al., 2013; Valapala and Vishwanatha, 2011). La fagocitosis es un mecanismo para la internalización de microvesículas derivadas de membrana en la célula blanco. En el caso de exosomas, esto puede ser también posible (Feng et al., 2010; Tian et al., 2013).

En conjunto los estudios del contenido de microvesículas (derivadas de membrana plasmática) y el de exosomas en diversos tipos celulares reveló que la secreción de microvesículas no sólo es importante en la fisiología celular sino también en el desarrollo patológico (Bellingham et al., 2012; Hannafon and Ding, 2013; S et al., 2013). Por ejemplo, los exosomas de células tumorales portan oncoproteínas y oncomiRNAs que favorece la invasividad y la metástasis de las células tumorales (Peinado et al., 2012; Valencia et al., 2014; Zhang and Wang, 2015). También exosomas de células neurales pueden portar proteínas que favorecen muchas de las enfermedades neurodegenerativas como: α -sinuclein, amyloid- β peptides e incluso priones (Emmanouilidou et al., 2010; Fevrier et al., 2004).

La secreción de exosomas y microvesículas son cruciales para el mantenimiento de la multipotencialidad de células troncales, así como en el mecanismo de diferenciación de células troncales a sus respectivos linajes. Las vesículas extracelulares, entre ellas los exosomas, son portadores de factores de transcripción inductores de pluripotencia y de RNAs no codificantes

participantes en la remodelación de la cromatina, fundamental en la reprogramación celular (Camussi et al., 2011; Camussi et al., 2013; Quesenberry et al., 2015; Tomasoni et al., 2013).

En el cerebro, la secreción de estas vesículas extracelulares modula la plasticidad sináptica neuronal y la estrecha comunicación entre las células constituyentes de la unidad neurovascular (Fruhbeis et al., 2012; Lai and Breakefield, 2012).

En la inmunología los exosomas juegan un papel crucial en la presentación de antígenos, ya que el MHC-II está enriquecido en la envoltura de exosomas. Se promueve la activación de células del sistema inmune al interactuar con estos exosomas (Andre et al., 2004; Kim et al., 2007; Raposo et al., 1996; Thery et al., 2002). Los exosomas y microvesículas, al ser moduladores de la inflamación, también han comenzado a ser estudiados en inmunoterapias con abordaje anti-cancerígeno.

Se comienza también a estudiar su papel en la medicina regenerativa con resultados interesantes, al punto que la secreción de exosomas y microvesículas puede constituir una respuesta de por qué los trasplantes de células troncales en modelos de enfermedades permiten cierta recuperación. El posible mecanismo no es por la integración de las células troncales al tejido dañado, sino por el soporte trófico que éstas emiten mediante microvesículas (Camussi et al., 2013; Ratajczak et al., 2012; S et al., 2013; Thery et al., 2002). El potencial terapéutico que poseen los exosomas y microvesículas derivadas de membrana ha ido creciendo conforme se conoce más de su biología.

ANTECEDENTES

Como se discutió antes, el infarto cerebral isquémico como se vio es una patología causada por la interrupción del flujo sanguíneo al tejido cerebral. La isquemia desencadena alteraciones en las funciones de la UNV post-infarto, principalmente de la barrera hematoencefálica y de la homeostasis de glutamato y estrés oxidativo (Liu and Chopp, 2015). Estas alteraciones incrementan el daño ya que activan mecanismos de neurodegeneración como la neuroinflamación, la excitotoxicidad por glutamato y la activación de los mecanismos de muerte celular. Si la afección por el infarto no es letal, después del evento isquémico el organismo activa mecanismos endógenos de recuperación. Algunos de estos mecanismos son: la neurogénesis, la supresión de la inflamación, la angiogénesis y la plasticidad neuronal. En estos mecanismos de recuperación participan todas las células que conforman la unidad neurovascular, justo porque las alteraciones patológicas del infarto generan alteraciones en la unidad neurovascular.

La producción de factores neurotróficos puede ser la clave en la regulación de los mecanismos de recuperación. Estos factores pueden inducir la sobrevivencia celular, la plasticidad neuronal, la supresión de la neuroinflamación y la homeostasis en las funciones neurovasculares. Como vimos anteriormente son factores de crecimiento celular o neurotrofinas. Diversos estudios han visto que la administración post-infarto de alguno de estos factores tiene un efecto neuroprotector. Sin embargo, falta conocer la forma en que estos factores neurotróficos llegan a las zonas donde tienen su acción.

Es importante dilucidar el papel que desempeñan los principales tipos celulares de la unidad neurovascular en los mecanismos endógenos de recuperación post-infarto. Los astrocitos y las células endoteliales de la microvasculatura cerebral son dos tipos celulares importantes en este fenómeno, porque expresan una gran diversidad de factores neurotróficos.

La activación de vías de señalización celular, ante la baja en la concentración de oxígeno y glucosa en el cerebro por un infarto isquémico se da principalmente e inicialmente en la microvasculatura cerebral y en los astrocitos. La hipoxia induce en las células endoteliales, la estabilización de factores de transcripción como HIF-1 que promueven la expresión de una gran diversidad de genes con funciones relacionadas a los mecanismos de recuperación post-infarto. Como ejemplo HIF-1 induce la expresión del VEGF (Forsythe et al., 1996), el cual tiene actividad neuroprotectora (Kilic et al., 2006; Sun et al., 2003).

Los astrocitos son el principal tipo celular para la homeostasis del sistema nervioso, estos son los encargados de dar soporte estructural al parénquima cerebral. Forman la barrera hematoencefálica, regulan el metabolismo, la comunicación celular entre los diferentes tipos celulares de la unidad

neurovascular, son cruciales en la regulación de los neurotransmisores y en la defensa contra el estrés oxidativo (Liu and Chopp, 2015). Cuando hay daño en el sistema nervioso, como sucede en un infarto cerebral. Se desencadena la gliosis reactiva, en la cual los astrocitos cambian de forma y volumen celular, tienen alteraciones en sus funciones fisiológicas y producen una variedad de proteínas proinflamatorias (Orzylowska et al., 1999; Tuttolomondo et al., 2008). Sin embargo, la inhibición de la gliosis reactiva también es contraproducente y puede generar un incremento del daño (Liu et al., 2014; Myer et al., 2006).

El principal mecanismo que podría generar las respuestas endógenas de recuperación, puede ser la producción y secreción de factores neurotróficos por los principales tipos celulares constituyentes de la unidad neurovascular como los astrocitos y células endoteliales de la microvasculatura cerebral. La forma en que estos factores son secretados y la manera en que estos llegan a la zona de daño o a su blanco, aún es desconocida.

Los exosomas tienen un papel fundamental en la comunicación celular y pueden portar una gran variedad de proteínas y otras moléculas con actividad fisiológica. Estas microvesículas derivadas del endosoma, puede ser el medio por el que los factores neurotróficos producidos por astrocitos y células endoteliales llegan a su blanco y desencadenan mecanismos de neuroprotección.

JUSTIFICACIÓN

El infarto cerebral es un padecimiento que afecta a millones de personas y es una de las principales causas de muerte en el mundo, en nuestro país es la tercera. También es de las principales causas de incapacidad permanente. No existe aún un tratamiento clínico que evite el daño severo que el infarto cerebral provoca al sistema nervioso central o ayude de forma óptima a la recuperación ante el daño. Sin embargo, algunos factores neurotróficos promueven la recuperación ante el daño isquémico, pero se desconocen a detalle los mecanismos celulares y moleculares para su secreción celular, así como el papel ejercido por cada tipo celular del parénquima cerebral en la neuroprotección después de un infarto cerebral. Es importante conocerlos para explorar alternativas terapéuticas.

HIPÓTESIS

La hipoxia induce en astrocitos y en células endoteliales de la microvasculatura cerebral, la secreción de exosomas que contienen señales biológicas que regulan procesos de neuroprotección.

OBJETIVO GENERAL

Aislar los exosomas secretados por astrocitos y células endoteliales de la microvasculatura cerebral, cuando son sometidos a hipoxia y cuando están en normoxia. Para evaluar el potencial neuroprotector de los exosomas en un modelo de infarto cerebral.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Generar cultivos primarios de células endoteliales y de astrocitos de cerebro de rata.
- Establecer un modelo de hipoxia *in vitro*.
- Establecer un protocolo de extracción y purificación de exosomas.
- Aislar exosomas de los dos tipos celulares y caracterizarlos.
- Evaluar si los exosomas de astrocitos y células endoteliales aplicados vía intracerebroventricular reducen el tamaño del infarto cerebral en ratas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo primario de células endoteliales de la microvasculatura cerebral de rata

En el cultivo de células endoteliales de la microvasculatura cerebral se utilizaron 5 ratas Wistar macho adultas, que fueron obtenidas del bioterio del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Las ratas fueron anestesiadas con 1.5 ml de pentobarbital, posteriormente a cada rata se le realizó perfusión cardiaca con 250 ml de HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) frío mediante una bomba de perfusión para eliminar los eritrocitos. Después se siguió el protocolo que se estandarizó en este trabajo (ver en resultados). Para el cultivo se utilizó el sustrato de adherencia celular Attachment Factor (Gibco®) y el medio M-131 (Gibco®) suplementado con Microvascular growth supplement 20X (MVGS, Gibco®). *Ver protocolo completo en la sección de anexos.*

Cultivo primario de astrocitos de corteza de rata

Para este cultivo, 3 ratas macho neonatas de 1-2 días de edad fueron sacrificadas por decapitación, inmediatamente después se extrajeron los cerebros con la ayuda de pinzas y tijeras de disección. Cada cerebro se fue colocando en una caja de Petri con buffer HBSS (Hank's balanced salt solution) suplementado con 10% de FBS (Fetal Bovine Serum) y antibiótico-antimicótico, después usando las pinzas de disección se removieron las meninges, los bulbos olfatorios, el cerebelo y la materia blanca en cada cerebro, obteniendo sólo las cortezas. Las cortezas fueron puestas en una jeringa de 10 ml con 5 ml de tripsina 0.25%, se homogenizaron al pasarlas por la aguja de la jeringa de 10 ml. Después se incubaron a 37°C. Se realizó una segunda disgregación mecánica con una pipeta Pasteur haciendo repetidas resuspensiones suaves del homogenado (la punta de la pipeta Pasteur fue pulida en los bordes con el mechero de Bunsen para evitar que estos rompieran las células). El homogenado se centrifugó a 1000 X g durante 3 min después sin eliminar el sobrenadante, se agregaron 5 ml de HBSS con 1.5 mg de DNase para romper la aglutinación de DNA y poder precipitar mejor el tejido disgregado, se hicieron inversiones suaves para homogenizar el pellet y se volvió a centrifugar a 1000 X g por 3 min, después se eliminó el sobrenadante y se le agregaron 5 ml de inhibidor de tripsina, se resuspendió el pellet por inversiones del tubo de forma suave y se centrifugó a 1000 X g por 3 min luego se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió con 5 ml de HBSS. Este homogenado se filtró usando una coladera, el filtrado se centrifugó a 1000 X g por 3 min y el pellet se resuspendió en 3 ml de medio DMEM F12 (suplementado con 10% FBS y antibiótico-antimicótico). Se sembró 1 ml en cada caja T-75 recubierta previamente con PEI (polietilenimina) y se puso a incubación a 37°C con 5% CO₂.

Inmunocitofluorescencia

Para la caracterización del cultivo de células endoteliales se realizó inmunocitofluorescencia contra PECAM (platelet/endothelial cell adhesion molecule 1) y VE-Cadherina. Se hizo un pasaje celular en una placa de 12 pozos con cubreobjetos redondos cubiertos con Attachment Factor. Cuando las células llegaron a confluencia, se fijó con PFA 4% por 20 min a temperatura ambiente. Luego se realizó; 2 lavados con PBS frío y se bloqueó con PB (buffer de boratos) 0.1 M, 0.1% Tritón 100-X y 5% BSA (Albúmina de suero bovino) por 2h en agitación lenta a temperatura ambiente. Luego se puso anticuerpo primario 1:300 contra PECAM (GTX74899) y se incubó toda la noche a 4 °C sin agitación. Después se realizaron 3 lavados de 30 s con 0.5 ml de PB (0.1 M, 0.1% Tritón 100-X) en cada lavado, se puso secundario anti-mouse Alexa Fluor 488 1:300 en PB 0.1 M, 0.1% Tritón 100-X y 5% BSA y se dejó incubando a temperatura ambiente por 1h. Después se hicieron 3 lavados con 0.5 ml de PB (0.1 M, 0.1% Tritón 100-X) en cada lavado. Después se puso Hoescht 33342 (1mg/ml) 1:300 y se incubó por 6 min a temperatura ambiente en agitación. Se retiró el Hoescht y se hicieron 2 lavados con PB (0.1 M, 0.1% Tritón 100X), los portaobjetos se montaron con medio de montaje (Dako). El procedimiento anterior se realizó también para VE-Cadherina, la incubación del anticuerpo primario (anti-VE-Cadherina, SC-6458) fue de 6 días a 4°C sin agitación a 1:300 en PB 0.1 M, 0.1% Tritón 100-X, el secundario se aplicó 1:300 anti-goat Alexa Red.

La caracterización de astrocitos fue realizada de manera similar utilizando el anticuerpo primario contra GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) 1:300 (Abcam AB4674). Se incubó toda la noche a 4 °C sin agitación. Después se realizaron 3 lavados de 30 s con 0.5 ml de PB (0.1 M, 0.1% Tritón 100-X) en cada lavado. Se puso secundario anti-chicken FITC 1:300 en PB 0.1 M, 0.1% Tritón 100-X y 5% BSA y se dejó incubando a temperatura ambiente por 1 h. Después se hicieron 3 lavados con 0.5 ml de PB (0.1 M, 0.1% Tritón 100-X) en cada lavado. Después se puso Hoescht 33342 (1mg/ml) 1:300 y se incubó por 6 min a temperatura ambiente en agitación. Se retiró el Hoescht y se hicieron 2 lavados con PB (0.1 M, 0.1% Tritón 100X), los portaobjetos se montaron con medio de montaje (Dako).

Extracción de exosomas

Para el aislamiento de exosomas, las células en cultivo fueron crecidas en medio con suero libre de exosomas. Para ello el FBS fue ultracentrifugado a 100,000 X g por 70 min y se aprovechó únicamente el sobrenadante de la centrifugación dejando los 5 ml más inmediatos al fondo del tubo de centrifugación. Este FBS recuperado fue usado para suplementar al 10% el medio DMEM F12.

Se utilizó un frasco T-75 de astrocitos de corteza de rata con 100% de confluencia y se dejó incubado durante 60 h. Después se siguió el protocolo que estandarizamos para la extracción de exosomas (*ver*

en anexos). La muestra de exosomas obtenida se almacenó a 4°C y se analizó por microscopía electrónica. Las muestras de exosomas que se estuvieron administrando a las ratas eran almacenadas a -20°C para su administración en días posteriores.

Microscopía electrónica

Se usó muestra de exosomas reciente (extraída 1 día antes y almacenada a 4°C) debido a que no hay fijación en la tinción negativa. La muestra de exosomas fue obtenida en buffer Tris (pH 7.4); la muestra de exosomas se obtuvo a partir de una caja T-75 con 100% de confluencia celular en 100 µl de Tris pH 7.4 filtrado. En una superficie limpia de parafilm se colocó una gota de 50-100 µl de la muestra, dos gotas iguales de agua filtrada bidestilada y una cuarta gota de solución 2% de acetato de uranilo. Se usó una rejilla cubierta con carbono que se colocó sobre la gota de muestra de exosomas por 1 min, y posteriormente en el agua, después de este segundo lavado se retiró el exceso de agua colocando la rejilla de forma vertical sobre una hoja de papel filtro. Luego se puso la rejilla sobre la superficie de la gota de solución de acetato de uranilo por 1 min y al finalizar se volvió a colocar la rejilla en forma vertical sobre el papel filtro para retirar el exceso de solución de acetato de uranilo.

Extracción de proteína

Para realizar el western blot contra HIF-1 α , se extrajo proteína celular total tanto de astrocitos como de células endoteliales. Se realizaron pasajes celulares de los dos cultivos celulares en cajas de Petri de 100 x 20 mm y se esperó a que tuvieran confluencia del 100% después se usaron dos grupos, el grupo control y el de hipoxia. En ambos casos se utilizaron 80µl de buffer de lisis RIPA (Radio-immunoprecipitation assay buffer) *Ver anexos*, y con la ayuda de un “cell scraper” se tallaron las cajas de Petri para obtener la proteína. La muestra se colectó en tubos de microcentrífuga y se sonicaron. Después se centrifugó el lisado a 10,000 rpm durante 1 min a 4°C y el sobrenadante se recuperó y almacenó a -20°C hasta su cuantificación.

Tratamiento de hipoxia

Un grupo de cajas de Petri 100% confluentes de células endoteliales y otras de astrocitos se sometieron a hipoxia usando una cámara de hipoxias (stemcell™ cat. # 27310). Las cajas de Petri fueron puestas dentro de la cámara con sello hermético, la cual elimina el oxígeno mediante la sustitución del aire interno por nitrógeno. El tratamiento de hipoxia fue de 6 h para ambos cultivos y se mantuvo la cámara de hipoxia dentro de la incubadora a 37°C, al finalizar el tratamiento se extrajo inmediatamente la proteína.

Western blot

Se realizó electroforesis con geles de 7.5% de acrilamida. Se cargaron 50µg de proteína. La transferencia de proteína se dejó toda la noche a 4°C a 45 V constantes usando membranas de PVDF (Polyvinylidene difluoride). Se bloqueó con TBS-T (0.5% Tween-20) y 5% leche por 2 h en agitación a temperatura ambiente; se realizaron 3 lavados con TBS-T de 20 s cada uno, se puso el anticuerpo primario anti-HIF-1α 1:1000 en TBS-T (0.5% tween 20) con 5% de leche por 4 h a temperatura ambiente; se realizaron 6 lavados de 5 min cada uno en agitación con TBS-T. Se puso el anticuerpo secundario anti-rabbit conjugado con HRP- 1:10,000 en TBS-T (0.5% Tween-20) con 1% de leche y se incubó por 50 min a temperatura ambiente en agitación. Después se realizaron 6 lavados de 5 min cada uno. Se reveló con placas fotográficas y se usó un sustrato quimioluminiscente Luminata Forte Western HRP Substrate Merck Millipore™.

Modelo de infarto cerebral por la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO)

La oclusión de la arteria cerebral media mediante la introducción de un filamento es quizá el modelo experimental de infarto cerebral isquémico más frecuentemente usado. Posee la ventaja de poder reproducir la reperfusión y un mayor rango de tiempos de isquemia cerebral manipulando el tiempo de retiro del filamento (Engel et al., 2011). La arteria cerebral media es la arteria más frecuentemente ocluida en el infarto cerebral de humanos (NINDS, 2015). Este método se basa en una cirugía a nivel del cuello en la rata para localizar la arteria carótida común y a partir de su ramificación encontrar la arteria carótida interna. Se hace una incisión en la carótida común para introducir un filamento (cuyo calibre obstruirá al sitio de origen de la arteria cerebral media) que es dirigida dentro de la arteria carótida interna hasta llegar al origen de la arteria cerebral media. En este estudio se ocluyó la arteria cerebral media por un tiempo de 90 min después de los cuales se retiró el filamento, 30 min después se administraron los exosomas mediante una inyección estereotáxica a una tasa de 1µl/min vía intraventricular. En total se administraron 4µl de la muestra. A las 24 h de iniciada la reperfusión se sacrificaron a las ratas y se extrajeron los cerebros para su evaluación.

Tinción con cloruro de trifeníl tetrazolio (TTC) para análisis del infarto cerebral

Para evaluar el efecto de la administración de exosomas derivados de astrocitos en el infarto cerebral se realizó la tinción de los cerebros con TTC. Esta tinción se basa en la coloración rojiza del tejido cerebral viable delimitando la zona del infarto, porque ésta a diferencia permanece en su color original. La reducción del TTC producida por las enzimas deshidrogenasas de la cadena respiratoria mitocondrial permite que se transforme en formazán, que posee una coloración roja intensa. La zona del infarto donde las células están muertas no ocurre dicha reacción y no se produce el formazán. Está

técnica posee la ventaja con respecto a la tinción con hematoxilina- eosina, de ser más barata y más rápida de procesar (Joshi et al., 2004).

Una vez obtenidos los cerebros de las ratas tratadas con MCAO y exosomas, se realizaron cortes histológicos cerebrales de 2mm y luego la tinción de TTC. Posteriormente se tomaron fotos y se procesaron con el software “ImageJ” para cuantificar el volumen del infarto en cada cerebro. También se realizó una corrección del volumen incrementado por efecto del edema cerebral.

RESULTADOS

Caracterización del cultivo de células endoteliales de la microvasculatura cerebral

Con el objetivo de obtener un cultivo de células endoteliales de la microvasculatura cerebral, se consultó en la literatura diferentes protocolos para este tipo de cultivo. Los protocolos tenían variación en cuanto al mecanismo de aislamiento de la microvasculatura cerebral y en la composición del medio para la selectividad celular (generación de la pureza del cultivo). Un protocolo adecuado para los recursos del laboratorio. Para ver el protocolo detallado (*ver anexos*). Para caracterizar el cultivo primario celular de células endoteliales de la microvasculatura cerebral que se obtiene con el protocolo. Se realizó inmunocitofluorescencia contra dos proteínas específicas de células endoteliales de la microvasculatura cerebral, PECAM y VE-Cadherina. La presencia de ambas proteínas en el cultivo indica la autenticidad del cultivo de células endoteliales y reveló un buen grado de pureza en el cultivo.

Caracterización del cultivo de células endoteliales de la microvasculatura cerebral

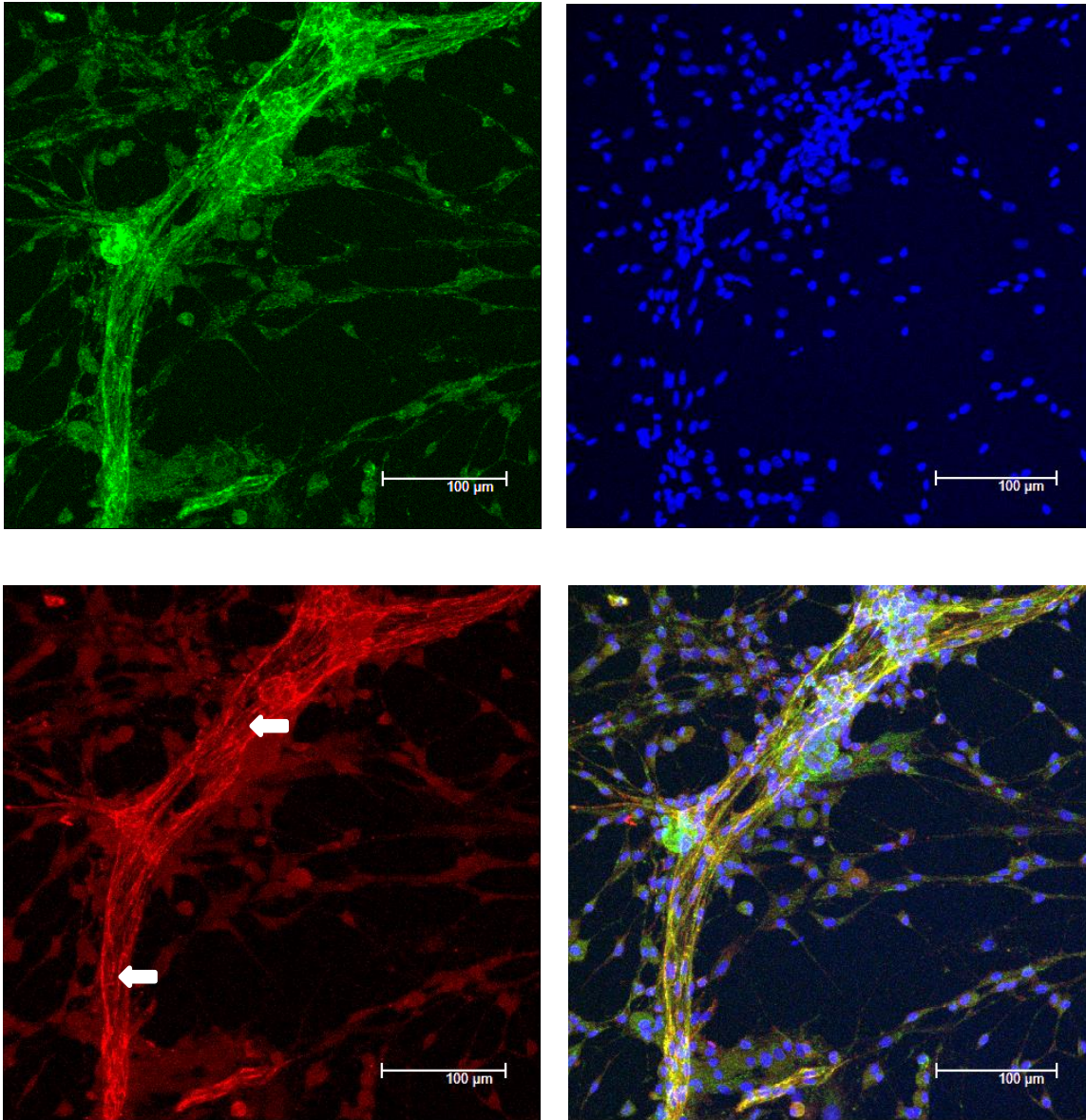


Figura 3. Inmunocitofluorescencia para caracterizar el cultivo primario de células endoteliales de la microvasculatura cerebral, se utilizó dos marcadores específicos de células endoteliales (PECAM y VE-Cadherina). Las imágenes fueron tomadas con microscopía confocal. En la marca verde se observa la marca de PECAM. La marca en rojo corresponde a VE-Cadherina. En la última imagen se observa el empalme de la marca de PECAM, VE-Cadherina y los núcleos (en azul). Las flechas muestran la posible formación de microvasculatura *in vitro*. Notar que la marca de VE-Cadherina (marca de color rojo) se ve más intensa en estas asociaciones celulares precursoras a la formación de vasos, que en el resto de las células.

Formación de microvasculatura in vitro cuando los cultivos de células endoteliales llegan a máxima confluencia celular

Se observó que en las etapas iniciales del cultivo de células endoteliales de la microvasculatura cerebral, no hay presencia de VE-Cadherina. Cuando la confluencia del cultivo es cercana al 75% las inmunocitofluorescencias únicamente nos daba positivo a PECAM (ver imagen A, figura 4). Sin embargo, cuando el cultivo llegaba a un confluencia celular del 100%, comienzan a formarse agrupaciones celulares muy similares a microvasos. Sólo en estas condiciones los cultivos celulares dieron positivo a la inmunocitofluorescencia contra VE-Cadherina (ver imagen de la figura 3, marca roja). La formación de estos tubos *in vitro* similares a capilares es característico del cultivo endotelial de la microvasculatura cerebral y la presencia de VE-Cadherina, una proteína constituyente de las uniones intercelulares endoteliales nos reafirma junto con la presencia de la proteína PECAM, que las células endoteliales que obtuvimos son exclusivas de la microvasculatura cerebral y no de arterias pequeñas (por ejemplo, de las meninges) (Wu et al., 2003).

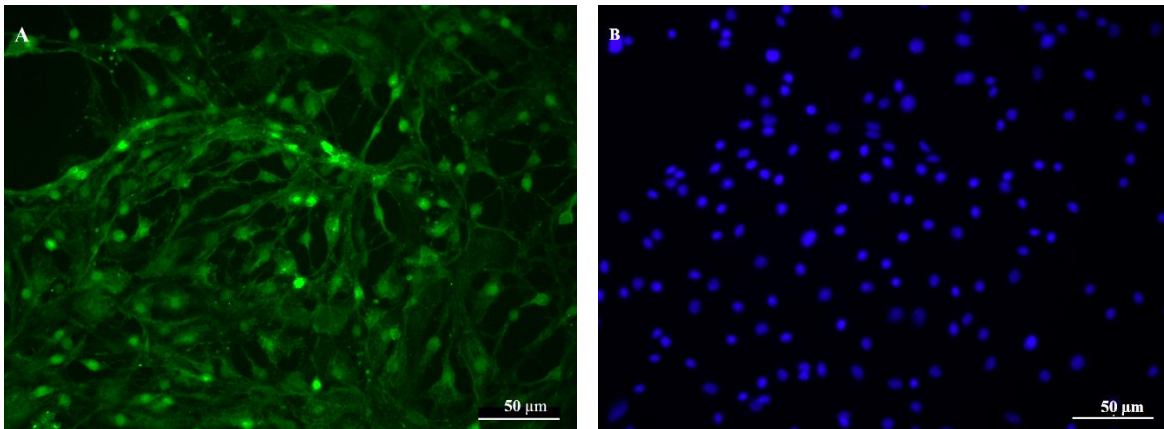


Figura 4. Inmunocitofluorescencia tomada con microscopía de epifluorescencia para observar si existe la presencia de un marcador característico de células endoteliales, PECAM o CD31; en los cultivos obtenidos con el protocolo que se montó para células endoteliales de la microvasculatura cerebral. En la imagen A se aprecia la marca verde de PECAM en las membranas plasmáticas del cultivo celular. En la imagen B se observan los núcleos marcados con Hoescht 33342.

Caracterización de los cultivo de astrocitos de rata

Después de haber obtenido los cultivos primarios de astrocitos. Se caracterizó el cultivo de astrocitos, con un anticuerpo contra un marcador específico de astrocitos, la proteína GFAP (proteína fibrilar ácida glial). La inmunocitofluorescencia fue positiva para GFAP. El cultivo obtenido por el protocolo que se siguió produjo cultivo de astrocitos con alta pureza.

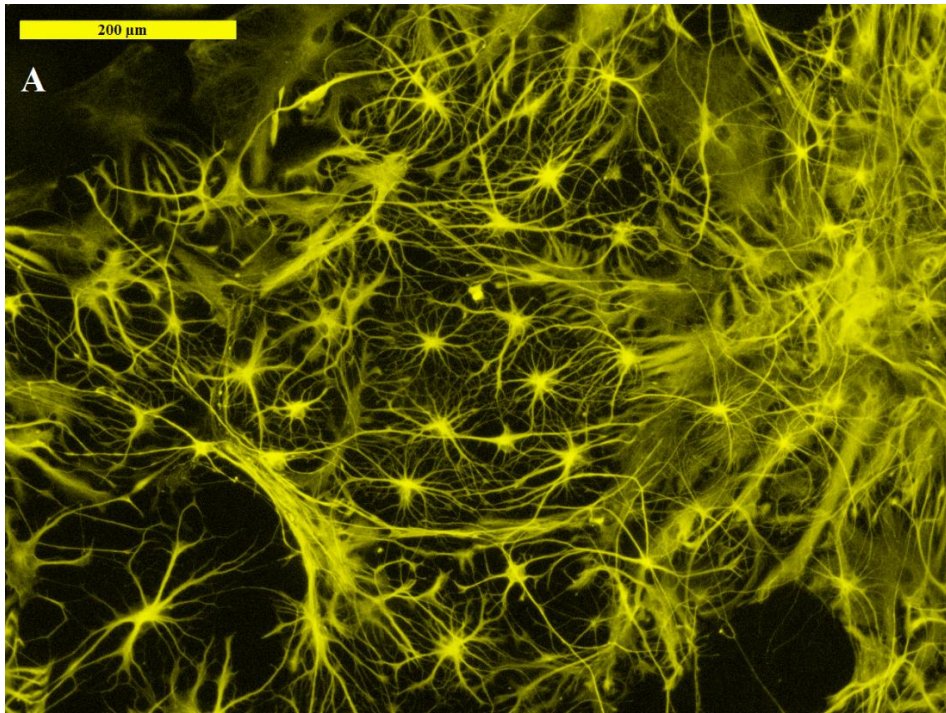
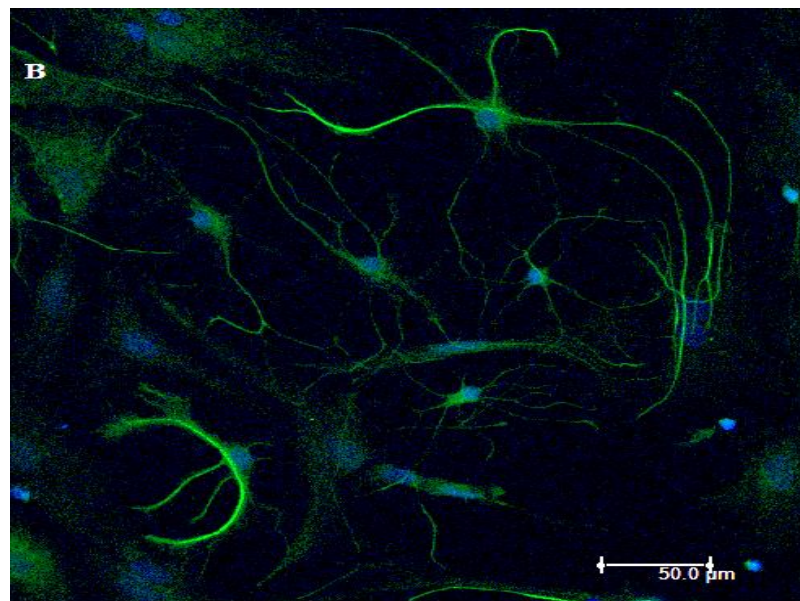


Figura 6. Caracterización del cultivo de astrocitos. En la imagen A se observan astrocitos, tomada con microscopía de epifluorescencia contra GFAP (marca de color amarillo). La imagen B corresponde a un segundo cultivo de astrocitos que fue tomada con microscopía confocal. Se observa la marca de GFAP (en verde) con sus respectivos núcleos (en azul) marcados con Hoescht.



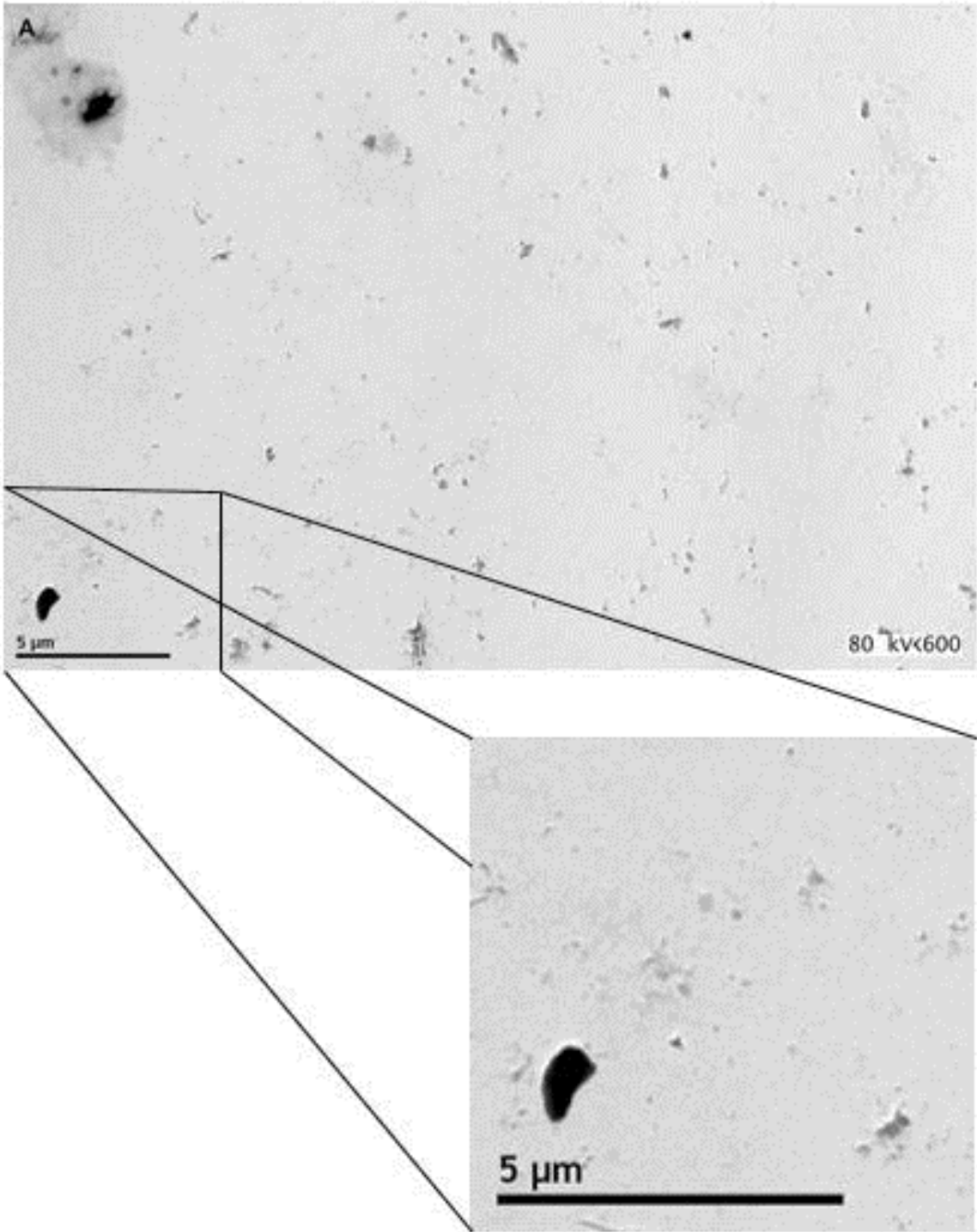
Secreción de exosomas por las células endoteliales de la microvasculatura cerebral y astrocitos

Después de obtener los cultivos de células endoteliales y astrocitos, y de haberlos caracterizado. Se estandarizó en el laboratorio un protocolo para extraer y purificar exosomas; secretados en el medio de cultivo por estos dos tipos celulares. El protocolo que se obtuvo se basa en la combinación de varios protocolos consultados en la literatura *ver anexos*. Para caracterizar los exosomas que se obtenía con el protocolo que se estaba estandarizando se realizó análisis por microscopía electrónica de transmisión y mediante tinción negativa con acetato de uranilo.

En los primeros análisis se pudo observar que la muestra de exosomas que se obtenía, poseía restos celulares *ver imagen B*. Por tanto se adicionó al protocolo dos pasos de purificación, una de ultrafiltración y una centrifugación adicional. La adición de estos dos pasos permitieron conseguir una muestra más pura y facilitó la observación de los exosomas *Ver imágenes (C-E)*.

La muestra de exosomas que se obtuvo, está enriquecida en exosomas. Esto se aprecia mejor por las medidas de las microvesículas encontradas que miden entre (30- 117) nm. También se observó que los exosomas de (30-50) nm fue la medida de los exosomas predominante en nuestras muestras *ver imágenes C y E*.

La *imagen A*, es el análisis de microscopía electrónica control negativo. Esta es una rejilla de carbono con la tinción negativa de acetato de uranilo, donde se realizó el análisis de la muestra de exosomas para verlos por microscopía electrónica de transmisión. Comparar esta imagen A con la imagen B (que si posee muestra de exosomas), No se observa presencia de microvesículas en el control negativo, tampoco de artefactos que semejen claramente a microvesículas. En cambio en la imagen B, se observa la presencia de exosomas.



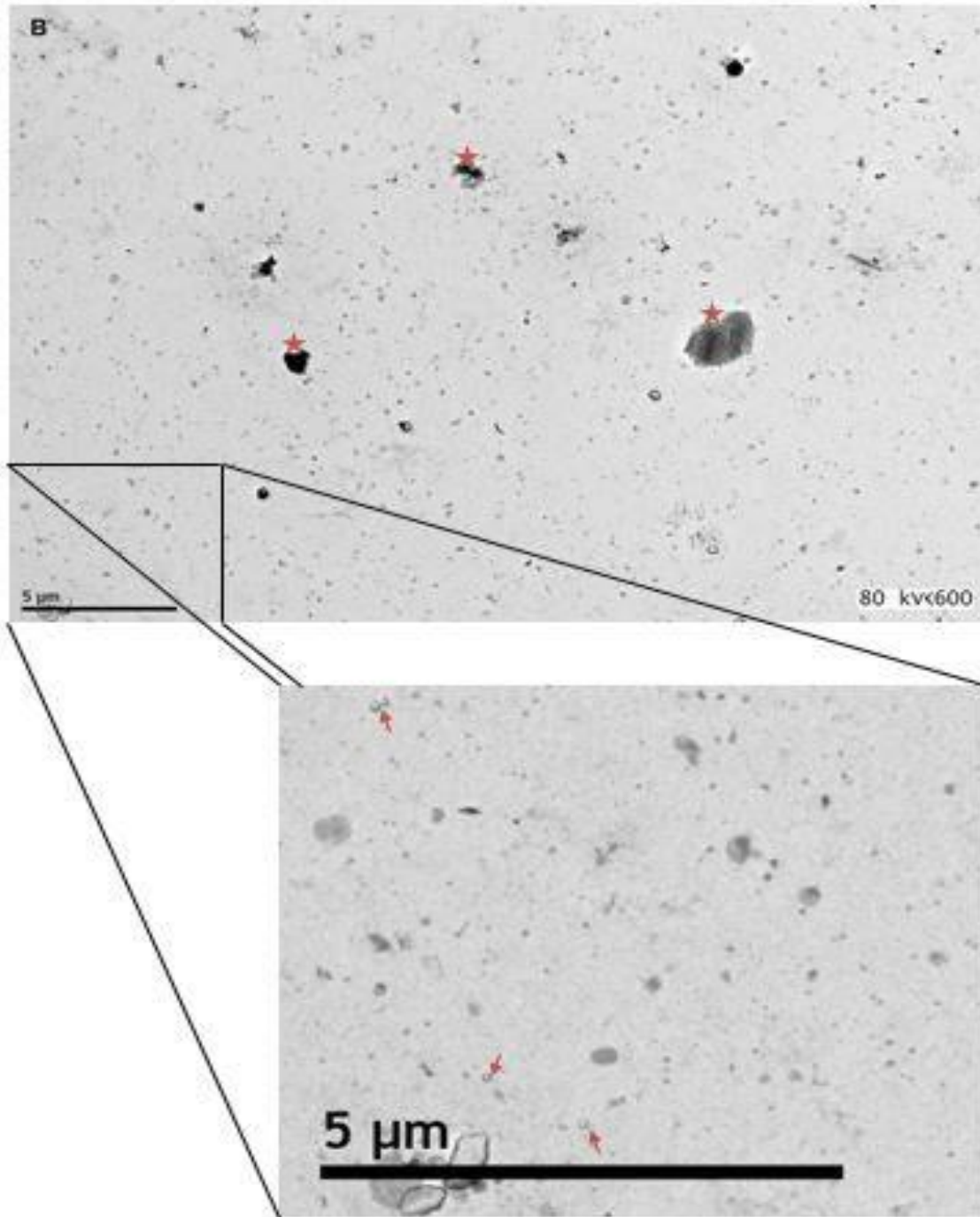


Figura 7. En la imagen A se puede observar la rejilla de carbono con la tinción de acetato de uranilo, pero sin muestra de exosomas. En la imagen B es la misma rejilla de carbono con la tinción de acetato de uranilo, pero con muestra de exosomas. Notar que en la imagen B se aprecia presencia de una población abundante de exosomas (flechas rojas). La imagen B nos permitió observar que dentro de nuestra muestra de exosomas había la presencia de restos celulares (marcadas con estrellas rojas) y se decidió implementar un método para limpiar la muestra de exosomas mediante filtración de $0.22\mu\text{m}$ y centrifugación a $50,000 \times g$ previo a la centrifugación final para la obtención de exosomas.

Extracción y caracterización de exosomas

Obtuvimos exosomas *in vitro* derivados de células endoteliales y de astrocitos, en condiciones de normoxia e hipoxia. Para extraer exclusivamente exosomas secretados por las células en cultivo se usó medio libre de exosomas para el condicionamiento de los cultivos. Para obtener este medio libre de exosomas se realizó ultracentrifugación a 100,000 X g por 70 min del suero fetal bovino (FBS) con el que se suplementa el medio, este proceso es comúnmente usado en los protocolos reportados en la literatura, aunque con algunas variaciones en los tiempos de ultracentrifugación (Witwer et al., 2013). Durante la estandarización incrementamos la purificación de la muestra de exosomas de restos celulares pequeños y cuerpos apoptóticos. Mediante un paso de filtración y un paso extra de centrifugación a 50,000 X g por 30 min, previos a la centrifugación de 100,000 X g por 70 min. La filtración nos permitió eliminar restos celulares grandes, microvesículas derivadas de membrana mayores a 220 nm de diámetro y cuerpos apoptóticos grandes, pero la centrifugación a 50,000 X g ayudó a eliminar la mayoría de microvesículas derivadas de membrana y cuerpos apoptóticos pequeños. un reporte reciente indica que la centrifugación de 10,000-20,000 X g permite precipitar microvesículas grandes como las derivadas de membrana y posiblemente cuerpos apoptóticos pequeños(Witwer et al., 2013). Con la centrifugación que hicimos a 50, 000 X g logramos eliminar restos celulares muy pequeños para que en la última centrifugación a 100,000 X g no tuviéramos en el pellet restos celulares, microvesículas derivadas de membrana y cuerpos apoptóticos.

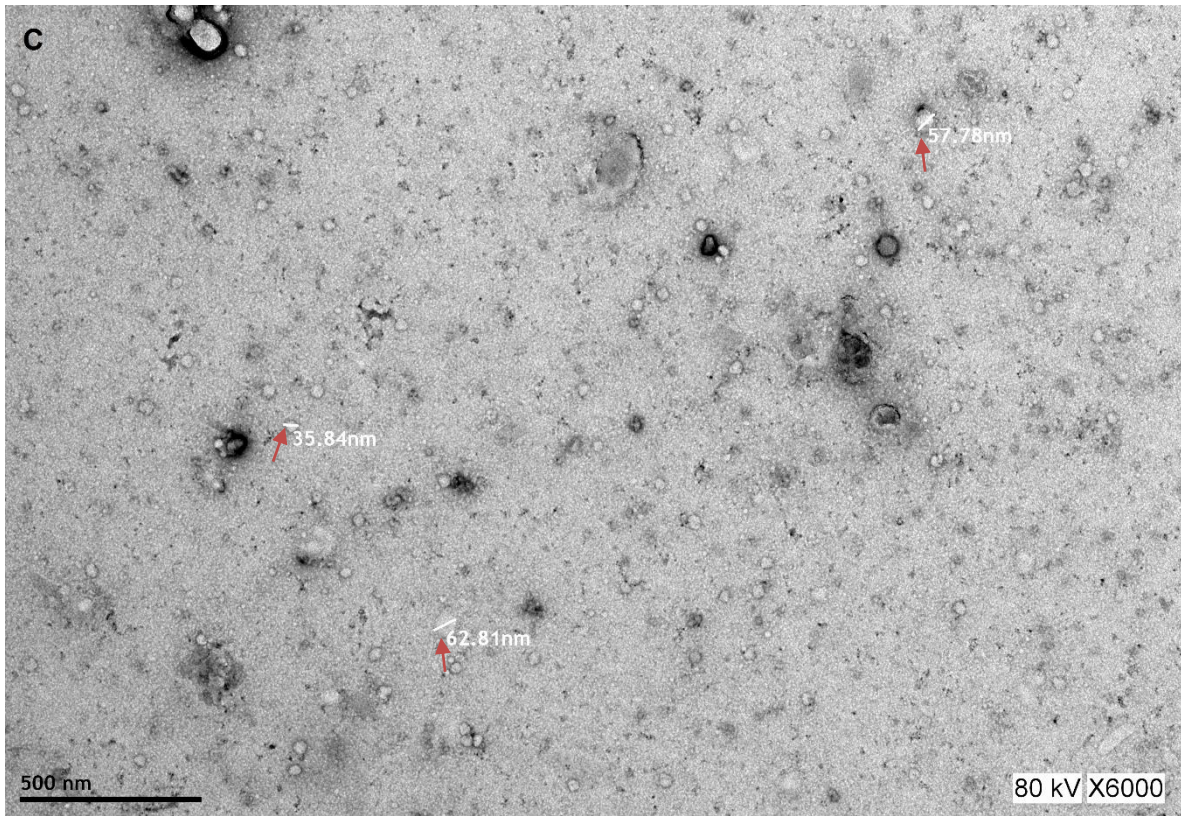


Figura 8. En la imagen C se aprecian exosomas, los cuales se pueden distinguir por su forma esférica y por la clara delimitación de las membranas. Se aprecia el tamaño de algunos exosomas (35, 62 y 57) nm que fueron medidos con el software del microscopio (señalado con las flechas rojas). Notar la abundancia de exosomas en la muestra.

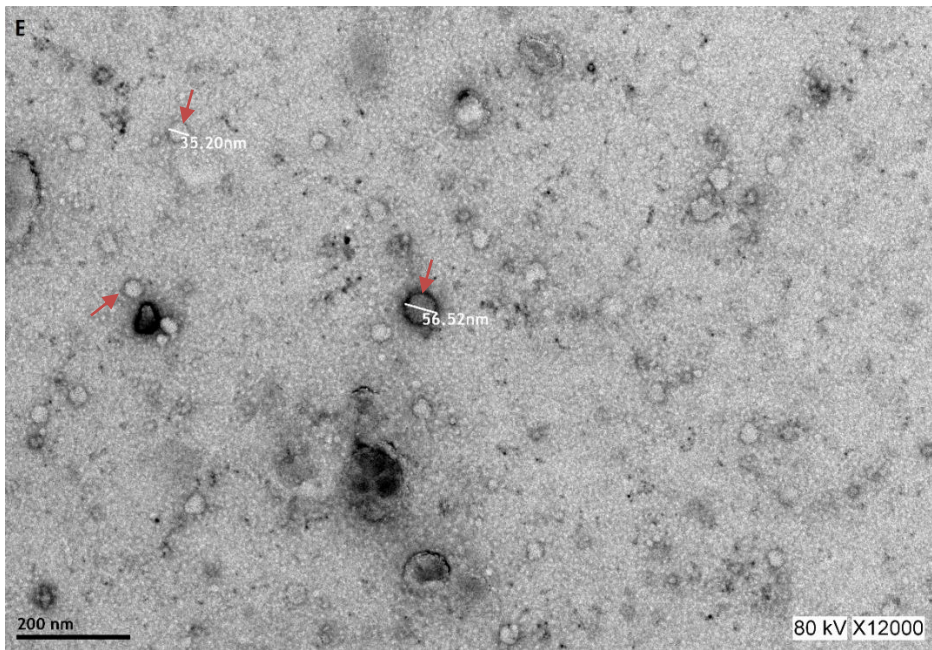
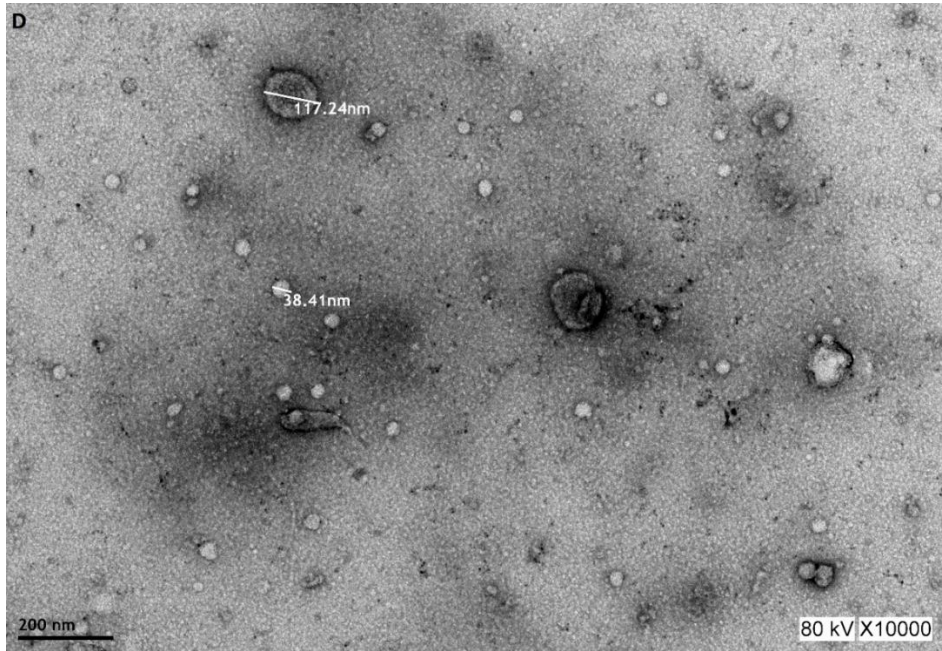


Figura 9. En D, observación de exosomas con mayor amplificación (10,000 x). Se aprecian exosomas pequeños de 38nm y grandes de 117 nm. En la imagen E se observan exosomas medianos y pequeños (35 y 56) nm (señalados por flechas rojas). Observar que las membranas limitantes de exosomas en esta tinción negativa se ven con un tono oscuro y el lumen de los exosomas con un tono más claro que el fondo; esto gracias a la tinción negativa con acetato de uranilo.

Estabilización de HIF-1 α por hipoxia en cultivos de células endoteliales y de astrocitos

La estabilización de HIF-1 α es un marcador de hipoxia tanto *in vitro* como *in vivo*. En este trabajo células endoteliales y astrocitos fueron sometidos a hipoxia por 6 h mediante una cámara de hipoxia. El tratamiento con 6 h de hipoxia fue elegido en base a los reportes para la estabilización de HIF-1 (Mojsilovic-Petrovic, 2007; Engelhardt, 2014). Después del tratamiento con 6 h de hipoxia, se extrajo los exosomas que liberan las células del cultivo celular al medio. Para corroborar la estabilización de HIF-1 α y por tanto de nuestro modelo *in vitro* de hipoxia. Se realizó un ensayo tipo western blot contra esta proteína. Se encontró la presencia de HIF-1 α que pesa 120 kDa y posiblemente al complejo HIF-1 que pesa 200 kDa. Posiblemente la detección de una banda de 200 kDa que se observó en el WB corresponda al heterodímero de HIF-1, porque el peso molecular del complejo HIF-1 que se señala en la imagen B corresponde al peso molecular de este heterodímero reportado por (Wang and Semenza, 1995). Además porque cuando se estabiliza HIF-1 α por la hipoxia se asocia con la subunidad HIF-1 β para constituir a HIF-1.

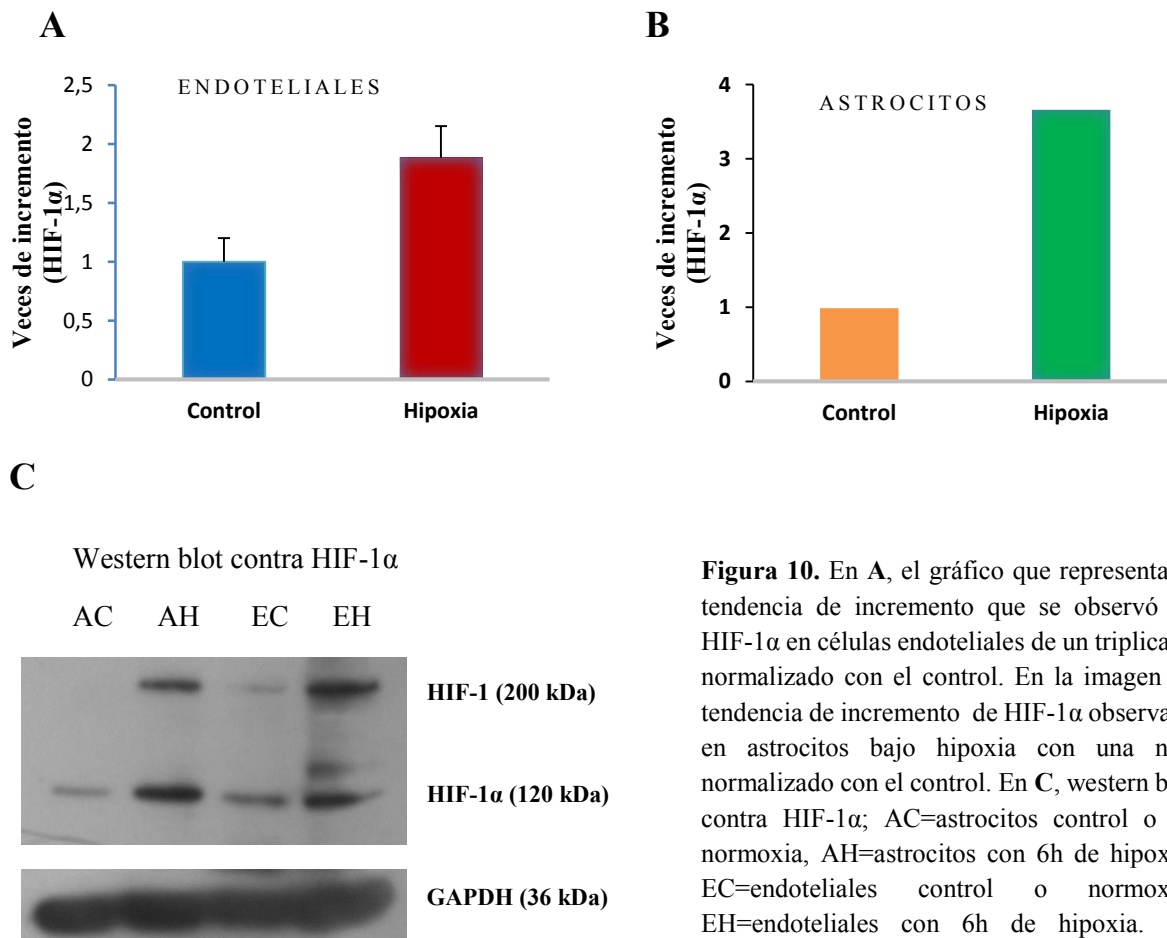


Figura 10. En A, el gráfico que representa la tendencia de incremento que se observó de HIF-1 α en células endoteliales de un triplicado normalizado con el control. En la imagen B, tendencia de incremento de HIF-1 α observada en astrocitos bajo hipoxia con una n=2 normalizado con el control. En C, western blot contra HIF-1 α ; AC=astrocitos control o en normoxia, AH=astrocitos con 6h de hipoxia, EC=endoteliales control o normoxia, EH=endoteliales con 6h de hipoxia. En 200kDa, se observa la marca posible de HIF-1.

La administración de exosomas secretados por astrocitos en condiciones fisiológicas, reducen el tamaño del infarto cerebral en ratas

El cultivo de células endoteliales de la microvasculatura cerebral y de astrocitos, el aislamiento de los exosomas que estos tipos celulares secretan en condiciones fisiológicas y de hipoxia fue con el propósito de estudiar el papel que tiene la microvasculatura y la glía en los procesos de recuperación post-infarto. Así como también en los posibles mecanismos endógenos que exacerban el daño post-infarto.

Mediante un modelo de hipoxia *in vitro*, se produjo una muestra de los exosomas que secretan los astrocitos en normoxia y de los exosomas que secretan cuando están bajo hipoxia. Un volumen de 4µl de las muestras de exosomas fue administrado a cada rata con infarto cerebral a los 30 min de reperfusión. Posteriormente, a las 24 h de reperfusión las ratas fueron sacrificadas y los cerebros extraídos. Estos fueron analizados por la técnica de TTC como se describió anteriormente.

Para la obtención de exosomas en hipoxia en ambos cultivos, cajas 100% confluentes fueron sometidas a hipoxia por 6 h y después se regresaron a las condiciones de normoxia por 36 h, después de 42 h del inicio de la hipoxia aproximadamente se extrajeron los exosomas, tiempo suficiente para que el tratamiento de hipoxia permita la activación de vías inducidas por hipoxia en las células como la estabilización de HIF-1 y la expresión-traducción de sus genes blancos (por ejemplo, VEGF y eritropoyetina) (Mojsilovic-Petrovic et al., 2007; Semenza, 2000b; Semenza et al., 1991). Las 30 h de normoxia posteriores que reproducen el tiempo después de la reperfusión permiten en conjunto que en la recolección existan exosomas cuyo contenido podría estar vinculado con las vías activadas durante la hipoxia y de exosomas secretados por las células tiempo después de la hipoxia. Esta muestra recolectada es la que se aplica a las ratas en el modelo de infarto cerebral. El tiempo más comúnmente usado en los estudios con microvesículas extracelulares, es de una incubación celular previa a la recolección de 24-48 h, aunque algunos han probado tiempos más pequeños después de un tratamiento o estimulación (Witwer et al., 2013).

El resultado de la administración de exosomas de astrocitos post-infarto cerebral en ratas, fue una reducción significativa en el tamaño del infarto en las ratas a las que se les administró muestra de exosomas secretados por astrocitos en condiciones fisiológicas (normoxia). La administración de exosomas secretados por astrocitos que se sometieron a hipoxia durante 6 h no generó una disminución significativa del tamaño del infarto.

Para investigar si la neuroprotección de los exosomas de astrocitos que secretan en condiciones fisiológicas tiene asociación con la activación del receptor 2 de VEGF (VEGFR2). Se hizo una co-administración de exosomas secretados por astrocitos en condiciones fisiológicas y un inhibidor específico de VEGFR2, SU-1498. La co-administración generó que se perdiera parte de la capacidad neuroprotectora de los exosomas de astrocitos secretados en normoxia.

La evaluación en el infarto cerebral en ratas, con la administración de los exosomas secretados por las células endoteliales de microvasculatura cerebral aún está en estudio en el laboratorio. Sin embargo, con el trabajo de esta tesis se consiguió estandarizar un protocolo en el laboratorio para obtener cultivos primarios de la microvasculatura cerebral y para la extracción de exosomas que secretan las células endoteliales, justo para poder realizar los estudios del efecto de la administración de exosomas de la microvasculatura cerebral en el infarto cerebral isquémico.

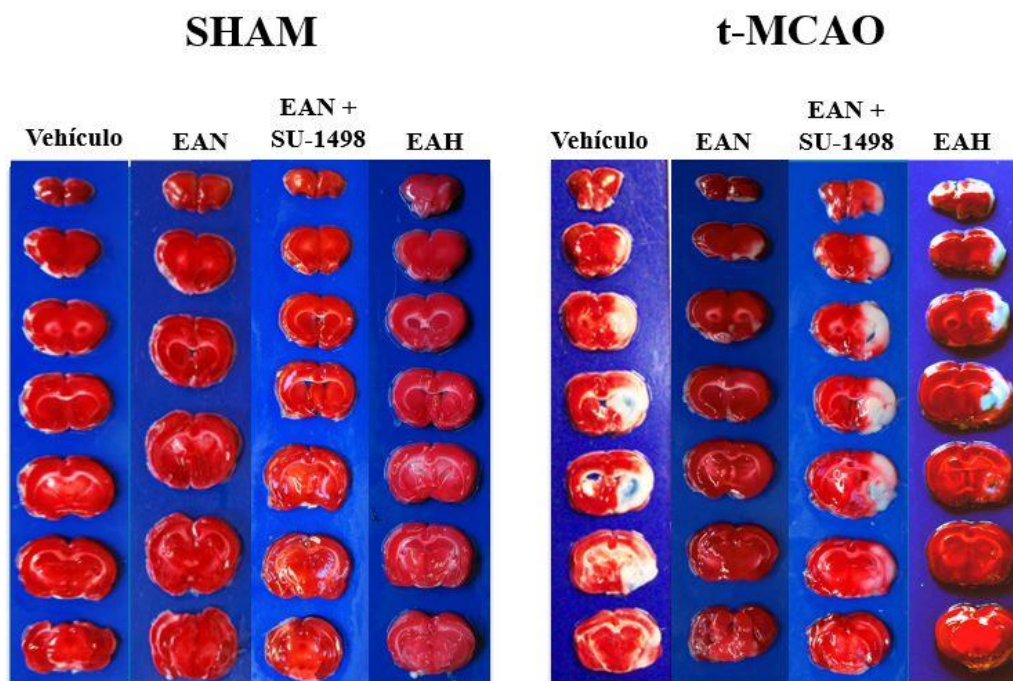


Figura 11. Análisis del tamaño del infarto cerebral mediante la Tinción con cloruro de trifetil tetrazolio (TTC). La zona de color blanco en los cortes cerebrales corresponde a la zona con muerte celular (zona del infarto). El grupo SHAM, corresponde al control negativo para el infarto cerebral. En SHAM sólo se realizó la cirugía sin la inserción del filamento para generar la oclusión de la arteria cerebral media. Pero, se repitió cada tratamiento administrado a los grupos donde sí se generó el infarto (T-MCAO). T-MCAO corresponde a los grupos donde se produjo el infarto cerebral por la oclusión de la arteria cerebral media. EAN, corresponde al grupo que se le administró exosomas de astrocitos en normoxia. EAN+SU-1498, corresponde al grupo que se le co-administró exosomas de astrocitos en normoxia más SU-1498 (un inhibidor del receptor VEGFR2). EAH, es el grupo al que se le administró exosomas de astrocitos sometidos a hipoxia.

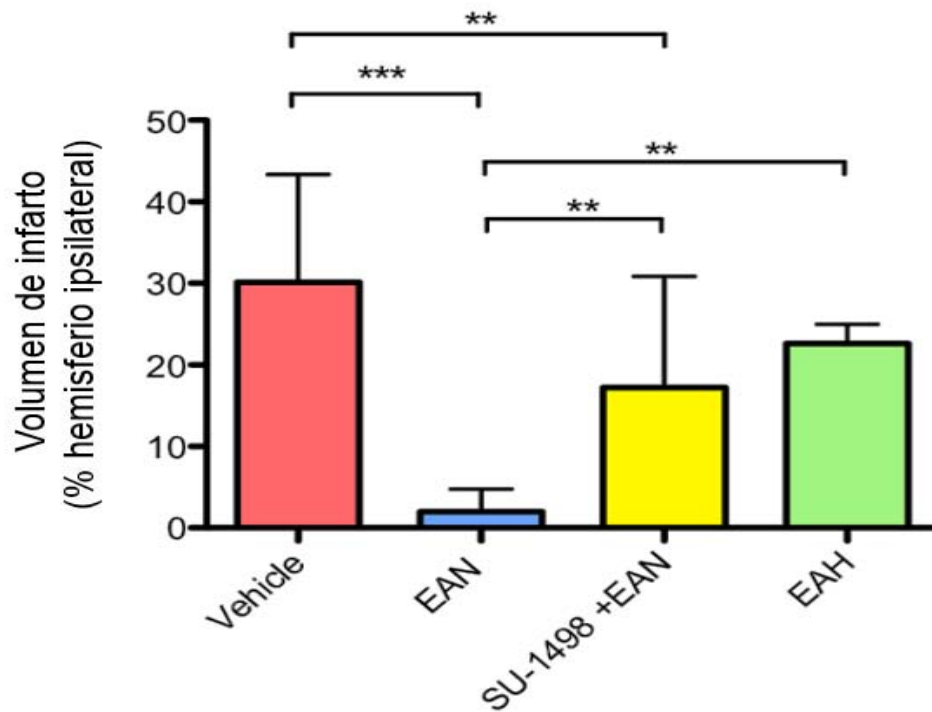


Figura 12. Reducción del volumen del infarto en ratas después de la administración de exosomas secretados por astrocitos que se mantuvieron en condiciones de normoxia (EAN) y de astrocitos que se sometieron a 6 h de hipoxia (EAH). Para evaluar si la neuroprotección asociada con los exosomas depende de la activación de VEGFR2 se realizó una co-administración del inhibidor de VEGFR2, SU-1498 y de exosomas secretados por astrocitos que se mantuvieron en normoxia, la administración de SU-1498 reduce el efecto neuroprotector de los exosomas secretados por astrocitos en normoxia (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ANOVA de una vía, seguido de Bonferroni/Dunn post-test).

DISCUSIÓN

Estandarización exitosa de un protocolo para el cultivo de células endoteliales de la microvasculatura cerebral

El aislamiento y cultivo de células endoteliales de la microvasculatura cerebral es una herramienta de importancia en el estudio de las principales enfermedades neurodegenerativas, ya que este tipo celular está íntimamente ligado a la barrera hematoencefálica, en la regulación de procesos de neuroinflamación, remoción de sustancias tóxicas y de desecho, transporte de nutrientes y producción de factores tróficos esenciales para el cerebro.

La degeneración del endotelio participa crucialmente en la etiología de las enfermedades de Alzheimer, Parkinson, esclerosis amiotrófica lateral y esclerosis múltiple (Zlokovic, 2008). Sin embargo, la obtención de cultivos de la microvasculatura cerebral con alto grado de pureza representa un reto debido a las dificultades metodológicas y de mantenimiento del cultivo.

Se han reportado varios métodos para este tipo de cultivo principalmente de ratón. La mayoría se basa en el uso de un medio enriquecido con varios factores de crecimiento celular que permite la sobrevivencia y proliferación de las células endoteliales y de un sustrato de adherencia óptimo para este tipo celular, ya que los sustratos convencionales para las cajas de cultivo poseen una tasa casi nula de adherencia para las células endoteliales. Por último, el aislamiento de la microvasculatura se consiguen con el uso de gradientes poliméricos: dextrán (15%) y percoll (45%) y con centrifugaciones diferenciales para aislar la microvasculatura del resto del tejido cerebral (Navone et al., 2013a; Wu et al., 2003). En este trabajo se generó un protocolo de cultivo utilizando estos procesos pero sin el uso de la solución de percoll al 45%, únicamente de dextrán al 15% porque observamos que realizar el paso con percoll (descrito para eliminar los eritrocitos y debris celular) disminuía la sobrevivencia celular de las células endoteliales aisladas, y la centrifugación en colchón de dextrán es suficiente para aislar la microvasculatura del resto del tejido cerebral. Además, en nuestro método se eliminó a los eritrocitos por la perfusión con Hank's Buffered Salt Solution antes de la extracción de los cerebros. También se realizaron pruebas para la adherencia celular del cultivo sin el uso de sustrato, con el sustrato PEI, con colágena tipo I de cola de rata y por último con el sustrato comercial Attachment Factor (Gibco) de los cuales sólo el Attachment Factor nos permitió una alta tasa de adherencia celular para un cultivo primario exitoso. El medio también es de suma importancia para el éxito del cultivo, ya que al inicio se hicieron pruebas con DMEM F12 adicionado con FBS 10%, dos factores de crecimiento (EGF y VEGF) y dos hormonas (progesterona e insulina bovina), pero el

medio no permitió la sobrevivencia de las células endoteliales obtenidas y los cultivos fallaron. Esto quizá esté de acuerdo a lo reportado (Navone et al., 2013a; Navone et al., 2013b) en el cual gran parte del éxito de su método de cultivo de la microvasculatura cerebral se debe al uso de una alta diversidad de factores de crecimiento y hormonas.

El método que se obtuvo en este trabajo es muy eficiente. Se consiguen cultivos con buena pureza sin necesidad de utilizar citometría de flujo o columnas de perlas magnéticas basada en anticuerpos para purificar el cultivo, como se pudo constatar en la inmunocaracterización con PECAM y VE-Cadherina.

En este trabajo se realizó este cultivo para estudiar el papel de la microvasculatura cerebral en la posible secreción de factores tróficos que pudieran generar neuroprotección en un modelo de infarto cerebral en ratas, ya que se ha reportado que las células endoteliales en condiciones semejantes al infarto cerebral (por ejemplo, hipoxia) incrementan la producción de factores tróficos como el VEGF, que activan vías de señalización celular que inducen la sobrevivencia neuronal (Kilic et al., 2006; Yihui Ma, 2012). El mecanismo por el cual estos factores tróficos pueden estar siendo liberados es mediante exosomas, de aquí que estudiar el efecto en la etapa de post-infarto de los exosomas secretados por células endoteliales en condiciones de hipoxia y en condiciones fisiológicas normales (normoxia), proveerá información sobre el papel que desempeñan las células endoteliales cerebrales cuando hay un infarto cerebral isquémico. También si es posible que este tipo celular secrete factores tróficos neuroprotectores mediante exosomas. Para colaborar en la recuperación ante el daño post-infarto.

En este trabajo se logró el objetivo del cultivo de las células endoteliales de la microvasculatura cerebral y la obtención de exosomas de éstas, sin embargo las pruebas de la administración de los exosomas en el modelo de infarto cerebral en ratas aún continúa en proceso.

Estabilización de HIF-1 α por el tratamiento de hipoxia de 6 h

El incremento de HIF-1 α , por su estabilización en condiciones de hipoxia se analizó por western blot. Se encontró que si hubo una tendencia a la inducción de este factor de transcripción por hipoxia en células endoteliales y en astrocitos, correspondiendo con lo reportado (Badawi et al., 2012; Engelhardt et al., 2014; Engelhardt et al., 2015; Mojsilovic-Petrovic et al., 2007). Una posible explicación de la estabilización que se observó de HIF-1 α en las células endoteliales en normoxia, es que existen otros mecanismos celulares que inducen el incremento de HIF-1 α . Posiblemente por la presencia del factor de crecimiento epidermal y el factor de crecimiento de fibroblasto básico en el

medio especial para el cultivo de células endoteliales (M131 y complemento). Ya que estos dos factores de crecimiento y otros como el VEGF y PDGF inducen a HIF-1 (Deudero et al., 2008; Engelhardt et al., 2014; Lee et al., 2009; Richard et al., 2000; Shi et al., 2007; Zhong et al., 2000). A pesar de la inducción de HIF-1 α en normoxia en el cultivo de células endoteliales y en astrocitos, si se observó una clara estabilización de HIF-1 α en condiciones de hipoxia.

La administración de exosomas extraídos de astrocitos en condiciones fisiológicas ejerce neuroprotección en el infarto cerebral isquémico, y la hipoxia elimina esta actividad neuroprotectora

Los astrocitos son el tipo celular encargado de: la sobrevivencia, proliferación y plasticidad neuronal, la remoción de tóxicos y desechos celulares, así como la regulación iónica, la homeostasis de agua y de neurotransmisores (por ejemplo la remoción del glutamato en el espacio extracelular) todos son dependiente de la actividad de los astrocitos (Kimmelberg and Nedergaard, 2010). También los astrocitos son el tipo celular más abundante del sistema nervioso central y en condiciones fisiológicas normales liberan una gran diversidad de factores de crecimiento celular y neurotrofinas como: el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor de crecimiento de fibroblasto básico, el factor neurotrófico ciliar, el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y las neurotrofinas (Chen and Swanson, 2003; Rudge et al., 1992).

Cuando ocurre daño al sistema nervioso central por la isquemia en el infarto cerebral, los astrocitos al igual que el resto de células del parénquima cerebral se ven sometidos a cambios en su microambiente. En la zona de penumbra del infarto la hipoxia afecta a todos los tipos celulares impidiendo la producción de ATP mediante la fosforilación oxidativa. Las células comienzan a incrementar su actividad glucolítica para buscar contrarrestar la deficiencia de ATP, pero esto genera un incremento en la producción de ácido láctico que acidifica el medio extracelular, la deficiencia energética conduce a un desbalance en las concentraciones iónicas intracelulares y permite la activación de canales que provoca una gran entrada citosólica de Ca²⁺. Este calcio daña a las mitocondrias y se comienza a producir un exceso de especies reactivas de oxígeno. En las primeras etapas del infarto cerebral los astrocitos tratan de evitar estos cambios en el microambiente neural como la remoción del glutamato, del estrés oxidativo y dando soporte energético a las neuronas; pero luego la acidificación del medio extracelular y la alta tasa de estrés oxidativo termina dañándolos a estos y a las células vasculares. Suceso que exagera el daño y da pie al inicio de la neuroinflamación y el rompimiento de la barrera hematoencefálica (Chen and Swanson, 2003; Obrenovitch, 1995; Pekny and Nilsson, 2005; Rossi et al., 2007).

La disfunción de astrocitos y la entrada de la gliosis reactiva donde los astrocitos sufren hipertrófia e incrementan su proliferación generando la pérdida de su función homeostática, potencia la muerte neuronal (Ridet et al., 1997). Sin embargo la gliosis reactiva ha sido reportada como benéfica para la recuperación ante el daño y su ausencia potencia aún más el daño (Liu et al., 2014). Lo que sí es claro es que los astrocitos reactivos expresan un nuevo patrón de proteínas con respecto a su condición fisiológica normal, entre ellos citosinas que activan la inflamación como (IL-1, IL6, IL10, TNF- α , TNF- β e interferones) (Dong and Benveniste, 2001; Feuerstein et al., 1998; Zhang et al., 2006).

El papel fundamental de HIF-1 en la etapa post-infarto inicia con su inducción en el infarto cerebral. Tanto por la hipoxia, el incremento del estrés oxidativo, como por factores de crecimiento que tienen un asa de retroalimentación positiva con HIF-1. Este factor de transcripción promueve la expresión de citosinas proinflamatorias en los diferentes tipos celulares (Eddleston and Mucke, 1993; Mojsilovic-Petrovic et al., 2007). Por tanto la participación de HIF-1 en el infarto cerebral tiene aspectos controversiales ya que la abolición de su función o de su expresión agrava el daño post-infarto, pero tiene un papel neuroprotector al promover la expresión de algunos factores de crecimiento con actividad neuroprotectora como el VEGF y la eritropoyetina además de enzimas antioxidantes y enzimas glucolíticas que promueven la sobrevivencia neuronal (Semenza et al., 1994; Siren et al., 2001). Pero recientemente ha comenzado a surgir evidencia que HIF-1 también puede favorecer la muerte neuronal mediante otras vías como la de Notch-1 (Cheng et al., 2014).

Un evento importante que potencia el daño en el infarto cerebral es la reperfusión sanguínea, porque se produce hiperglucemia y un aporte mayor de estrés oxidativo. Enfocándonos la glía; el incremento de la acidosis láctica producto de la hiperglucemia y de la alta tasa de glucólisis junto con la exacerbación en la producción de estrés oxidativo genera la disfunción de los astrocitos mencionada anteriormente (Ginsberg et al., 1977; Rehnrona et al., 1981). Todo esto nos lleva a una pregunta importante que es: ¿Los astrocitos una vez disfuncionales podrían potenciar el daño o simplemente son menos eficientes en el soporte que le dan a la neuronas para permitirles sobrevivir después del infarto cerebral?; esta pregunta, que es esencial en la patología del infarto cerebral ya se ha comenzado a abordar con los estudios de la gliosis reactiva, en los cuales se reporta que es benéfica para la recuperación ante un daño en el sistema nervioso central, pues su eliminación aumenta el daño (Liu et al., 2014). En este trabajo se encontró que los astrocitos sometidos a hipoxia no secretan exosomas que potencien el daño en el infarto cerebral, sin embargo los exosomas que secretan los astrocitos en condiciones similares al infarto cerebral (hipoxia) pierden la actividad neuroprotectora

observada por los exosomas secretados por estos cuando están en condiciones fisiológicas. El contenido de estos dos grupos de exosomas debe poseer diferentes moléculas, porque la hipoxia activa un cambio en la expresión y regulación de muchos genes en astrocitos, y probablemente conduce a un cargo diferente en los exosomas que se producen y se secretan.

Para analizar la posible relación de la neuroprotección entre exosomas y el VEGF, se realizó la co-administración de exosomas derivados de astrocitos que se mantuvieron en normoxia y SU-1498, un inhibidor del receptor 2 de VEGF. Interesantemente se observó una disminución de la neuroprotección ejercida por los exosomas. Esto hace pensar que quizá los exosomas poseen en su contenido VEGF y que parte de su actividad neuroprotectora se debe a este factor de crecimiento y que puede ser mediada por la activación del receptor 2 de VEGF (VEGFR2) (Wang et al., 2005; Wick et al., 2002). Al respecto es importante mencionar que después del infarto cerebral existe una sobreexpresión de VEGFR2 en todos los tipos celulares del parénquima cerebral (Hermann and Zechariah, 2009; Kilic et al., 2006; Lennmyr et al., 1998; Marti and Risau, 1998; Wick et al., 2002).

En los exosomas secretados por las células endoteliales se espera que también puedan ejercer neuroprotección. Ya que estas células producen factores tróficos en condiciones de hipoxia. Por ejemplo: el factor de crecimiento vascular endotelial, BDNF, NGF y neurotrofinas. Este es un mecanismo que promueve la recuperación post-infarto. Sin embargo, aún se desconoce a detalle el mecanismo molecular para la secreción de estos factores neurotróficos (Abumiya et al., 1999; Carmeliet, 2003; Hennigan et al., 2007; Lok et al., 2007; Manalo et al., 2005). No se ha reportado que la secreción del VEGF en células endoteliales sea mediada por exosomas, pero si existe evidencia que apunta a una alta probabilidad de que así sea. Como lo reflejan los estudios hechos por (Kawano et al., 2014; Kucharzewska et al., 2013; Salomon et al., 2013) donde reportan que la vasculogénesis y la migración celular endotelial es dependiente de la señalización inducida por exosomas, también que la ausencia de proteínas esenciales para la biogénesis de exosomas, reduce la secreción de VEGF.

Quizá los exosomas secretados por las células endoteliales medien la sobreexpresión de VEGF a través de la estabilización de HIF-1. Pero dado al papel dual de HIF-1 en el infarto cerebral, los exosomas secretados por células endoteliales sometidas a hipoxia tendrán un efecto parecido al observado en astrocitos. La actividad neuroprotectora será menor que el de los exosomas que secretan en condiciones fisiológicas (Fan, 2014).

Las células endoteliales en condiciones de hipoxia inducen genes proinflamatorios después de estar sometidas a hipoxia (Flamant et al., 2009).

Como se mencionó anteriormente, los astrocitos producen una gran diversidad de factores tróficos que promueven la sobrevivencia neuronal y de la propia glía, pero aún no se conoce a detalle el mecanismo molecular mediante el cual se secretan estos factores. Basándonos en lo que se sabe de la biología de los exosomas y de un estudio que reportó que es necesario la endocitosis y proteólisis intracelular de las proneurotrofinas para que tengan su activación y se unan a sus receptores (Boutillier et al., 2008; Lee et al., 2001). Nos hace pensar que existe un vínculo entre la secreción de las proneurotrofinas con los exosomas, y que éstos últimos permiten que las proneurotrofinas puedan llegar a sus células blanco y tener su actividad. Esto podría también explicar la capacidad neuroprotectora que se observó de los exosomas secretados por los astrocitos.

Quizá la menor neuroprotección asociada de los exosomas liberados por los astrocitos que se sometieron a hipoxia, sea que entre su contenido haya una proporción de factores tróficos neuroprotectores y RNAs inductores de la sobrevivencia celular, y otra proporción de proteínas que potencian el daño post-infarto como citosinas proinflamatorias (Eddleston and Mucke, 1993; Mocchetti and Wrathall, 1995; Rudge et al., 1992; Schwartz and Nishiyama, 1994; Stanimirovic et al., 2001; Strauss et al., 1994).

La presencia de RNAs en el contenido de los exosomas de astrocitos que podrían participar relevantemente en la neuroprotección que observamos, puede verse sustentada en los miRNAs de astrocitos sobreexpresados después de un infarto cerebral. Algunos de estos miRNAs como el miR-29 y el miR-146a, están asociados con neuroprotección ante la isquemia cerebral (Ouyang et al., 2014).

Lo anterior puede ser apoyado si tomamos en cuenta algunos estudios que han visto protección ante un infarto isquémico en tejido cardiaco; con la sola administración de medio condicionado de cultivos de células mesenquimales troncales (Timmers et al., 2007). Un estudio con este mismo tipo celular, en el que se administró los exosomas que secretan en un infarto cerebral (con el modelo de MCAO), observaron también neuroprotección. Esta fue asociada con la promoción de la angiogénesis y la remodelación de neuritas (Xin et al., 2013).

El blanco celular de los exosomas es un aspecto interesante a dilucidar, pero el hecho de que el blanco de los exosomas que se estudió sean los propios astrocitos y neuronas. Es tal vez más probable si razonamos que las produjeron astrocitos. Si es así; apoyaría la idea establecida de que los astrocitos son un blanco terapéutico esencial para combatir las enfermedades del sistema nervioso central. Si

los astrocitos están bien funcionalmente las neuronas tienen altas posibilidades de sobrevivir aún bajo condiciones desfavorables, porque los astrocitos tratarán de mantener la homeostasis de su microambiente (Li et al., 2014).

CONCLUSIÓN

Se estableció exitosamente el cultivo de células endoteliales de la microvasculatura cerebral. Se obtuvieron exosomas de astrocitos y células endoteliales en condiciones de hipoxia y en condiciones fisiológicas. Este trabajo permitió estudiar el papel fisiológico de los exosomas en el infarto cerebral. La administración de exosomas derivados de astrocitos en condiciones fisiológicas mostró una propiedad neuroprotectora en ratas, al reducir el tamaño del infarto cerebral. La hipoxia elimina la actividad neuroprotectora observada de los exosomas de astrocitos. La administración de SU-1498 (inhibidor de VEGFR2), disminuye la capacidad neuroprotectora de los exosomas de astrocitos en normoxia, indicando que existe una posible asociación entre la activación de VEGFR2 y parte de la actividad neuroprotectora de los exosomas de astrocitos en normoxia.

Los datos obtenidos apuntan a que los astrocitos después de estar sometidos a hipoxia y quizá durante la etapa aguda del infarto cerebral, disminuyen su capacidad neuroprotectora al menos en el mecanismo de secreción de biomoléculas con capacidad neuroprotectora dependiente de exosomas.

PERSPECTIVAS

Analizar el contenido de los exosomas de astrocitos y células endoteliales secretados en condiciones fisiológicas y cuando hay un evento de hipoxia. Esto permitirá dirigir la investigación del mecanismo molecular implicado en la propiedad neuroprotectora de los exosomas que se observó.

Evaluar el efecto de los exosomas en las ratas con infarto cerebral, pero administrando de forma sistémica los exosomas.

ANEXOS

PROTOCOLO PARA EL CULTIVO DE CÉLULAS ENDOTELIALES DE LA MICROVASCULATURA CEREBRAL DE RATA

1. Preparar las cajas de petri con el sustrato de adherencia celular Attachment Factor (cascade biologicals, Gibco®). Cubrir con 4 ml de Attachment Factor cada caja T-75 a usar e incubar a 37°C durante 45min. Después aspirar el Attachment Factor con una bomba de vacío y poner 12 ml de medio M-131 (M131WOAF, Gibco®). Todo el procedimiento se realiza bajo esterilidad en la campana de flujo laminar.
2. Para el cultivo se necesitan 5 ratas machos de (300-350) g. Realizar perfusión cardíaca con HBSS a cada rata utilizando una bomba peristáltica y buffer HBSS. Se necesitan 250ml por rata. Para la perfusión cardíaca, anestesiar de 2 en 2 vía peritoneal con 1.5 ml de pentobarbital por rata.
3. Cuando las ratas están completamente anestesiadas. Hacer un corte transversal a la altura de la caja torácica y abrir la musculatura con cuidado para evitar dañar los órganos internos con los cortes.
4. Insertar la aguja conectada a la bomba peristáltica con flujo constante de HBSS, en el ventrículo izquierdo e inmediatamente, con la tijera hacer un corte de la vena pulmonar que se localiza muy cerca al lado derecho del corazón. Esto corta el flujo sanguíneo y permite el la perfusión del buffer con el bombeo sanguíneo.
5. Cuando la perfusión haya concluido el hígado debe tomar un color amarillo pálido. Este procedimiento se repite para cada rata.
6. Después de la perfusión decapitar a cada rata y extraer los cerebros. Inmediatamente colocar cada cerebro en buffer de extracción para hacer un lavado rápido y mantener la viabilidad.
7. Colocar los cerebros sobre un trozo de papel filtro humedecido con buffer de extracción que debe estar sobre una caja de Petri. La caja de Petri debe estar sobre hielo.
8. Remover con el uso de un bisturí los bulbos olfatorios y los cerebelos.
9. Hacer un corte longitudinal en el cerebro para separar los dos hemisferios y extraer las cortezas cerebrales.
10. Hacer trozos pequeños cúbicos con las cortezas cerebrales.
11. . Colocar los trozos de corteza en un tubo de 50 ml y añadir 3 ml de buffer de extracción por cada cerebro. Al finalizar, en una campana de flujo laminar realizar una disgregación mecánica del tejido utilizando una jeringa de 10 ml. Pasar los trozos de cerebro junto con su

- respectivo buffer de extracción a través de la aguja de una jeringa de 10 ml para obtener un homogenado de las cortezas.
12. Centrifugar el homogenado a 1000 X g (fuerza g) durante 3 min y eliminar el sobrenadante, que corresponde a restos de sustancia blanca cerebral.
 13. Resuspender el pellet en 5 ml de una mezcla de enzimas; dispasa 1 U/ml (unidades enzimáticas por cada ml), papaína 2.5 U/ml y DNAsa 250 U/ml. Después poner a incubar a 37°C por 15 min.
 14. Al finalizar centrifugar a 1000 X g por 3min.
 15. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet muy bien con inversiones y con la ayuda de una pipeta serológica, en 15 ml de dextran al 15 %. Luego realizar ultracentrifugación.
 16. Para realizar la ultracentrifugación, usar tubos especiales para ultracentrifugación, desinfectar con alcohol al 75 % el tubo donde se colocará la muestra (el pellet condextran) y secar completamente el tubo con papel absorbente sin dejar residuos de alcohol.
 17. Colocar el pellet resuspendido en dextrán, en el tubo para ultracentrifugación limpio y pesar el tubo en la balanza analítica, llenar con PBS 1X filtrado el tubo con nuestra muestra al volumen requerido según el tubo de ultracentrifugación que usaremos. Balancear los pesos de los tubos a ultracentrifugar exactamente usando una balanza analítica.
 18. Programar la ultracentrífuga a la equivalencia de revoluciones por minuto (rpm) para obtener la equivalencia en fuerza g que necesitaremos. Existen convertidores en internet de acceso libre.fuerza g en web.
 19. Centrifugar el pellet resuspendido en dextrán a 10,000 X g durante 16 min a 4°C.
 20. Con una pipeta Pasteur extraer el pellet (este será de color blanco) a una velocidad lenta. Colocar el pellet en un tubo de 15 ml nuevo.
 21. Agregar 10 ml de HBSS y homogenar por inversiones (el proceso corresponde a un lavado para eliminar el exceso de dextrán).
 22. Centrifugar a 1000 X g durante 5 min.
 23. Resuspender el pellet en 5 ml en una solución de dispasa/colagenasa (0.1%) cada una e incubar a 37°C por 1 hora con ocasional agitación.
 24. Centrifugar a 1,000 x g por 5 min. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 10 ml de HBSS para hacer un lavado de las enzimas.
 25. Centrifugar a 1,000 X g por 3 min.
 26. Resuspender el pellet en 3 ml de medio M-131 (M131WOAF, Gibco®) suplementado con Microvascular growth supplement 20x (MVGS, Gibco®).

27. Para ver la viabilidad de la muestra celular sembrada. Tomar 10 microlitros de esta suspensión celular y 10 microlitros de azul de propano, mezclar y colocar la mezcla en el hematocitometro para el conteo celular.
- **NOTA IMPORTANTE:** *Revisar las células hasta dos días después del sembrado, no mover la caja del cultivo antes (de lo contrario se compromete la tasa de adherencia celular). Si el cultivo fue exitoso se observarán pequeños parches celulares con morfología de huso alrededor de 2-4 días después del sembrado celular.*
28. Hacer cambio de medio hasta las 72h después del sembrado celular.
29. Para el mantenimiento del cultivo, realizar cambio de medio cada 3 días.

PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE EXOSOMAS

Se consultó la literatura científica para elaborar un protocolo para extraer exosomas de cultivos celulares. El resultado fue un método que se basa en una serie de centrifugaciones diferenciales y filtración; procesos que han sido reportados ampliamente en la literatura y que permiten obtener una muestra con buena pureza de exosomas. Posteriormente para validar el protocolo y caracterizar la presencia de exosomas en las muestras obtenidas que fueron administradas en el modelo de infarto cerebral de ratas. Se hizo análisis de microscopía electrónica de transmisión con una tinción negativa de acetato de uranilo.

1. **Preparar medio libre de exosomas.** Necesitamos eliminar los exosomas contenidos en el suero fetal bovino (FBS) con el que se suplementará el medio donde incubaremos nuestro cultivo celular. Ultracentrifugar el FBS a 100,000 X g a 4°C durante 70 min; después recuperar el el FBS, pero dejando la última porción del FBS (donde estará contenidos los exosomas del suero). Por ejemplo en este protocolo se usó tubos de propileno de 36 ml para la ultracentrifugación y se dejaba aproximadamente los últimos 5 ml de FBS del fondo.
2. Hacer cambio de medio a una caja T-75 de nuestro cultivo celular en máxima confluencia, por el medio libre de exosomas preparado.
3. Dejar incubando el cultivo celular de la caja T-75 a 37°C por (48 a 60) h. Para posteriormente coleccionar los exosomas liberados por las células.

4. **Extracción del medio con exosomas.** Revisar que las células estén sanas durante la incubación. En la campana de flujo laminar dar suaves golpes con la mano en las paredes de la caja T-75 de nuestro cultivo para incentivar a las células a liberar una cantidad mayor de exosomas, regresar la caja de cultivo a la incubadora y esperar 2 min.
5. Recuperar el medio con una pipeta serológica y colocar el medio en un tubo de 15 ml. Poner medio fresco a la caja del cultivo celular para mantener el cultivo celular.
6. **Centrifugación para eliminar células muertas y debris celular.** El medio contenido en el tubo de 15 ml centrifugar a 3000 r.p.m. durante 10 min a temperatura ambiente.
7. **Filtrar el sobrenadante para eliminar resto celulares pequeños y microvesículas.** Después recuperar el sobrenadante dejando el pellet y los últimos 2 ml de medio del fondo. Filtrar el sobrenadante con un filtro de pirinola de 0.22 μm .
8. Poner el sobrenadante filtrado en un tubo para ultracentrifugación y aforar el volumen requerido del tubo para ultracentrifugación con buffer TRIS (pH 7.5) “filtrado” (*el uso de este buffer es indispensable si la muestra será observada con microscopía electrónica, ya que un buffer de sales de fosfatos interferirá con el análisis microscópico*).
9. **Centrifugar a 50,000 X g por 30 min a 4^o C.**
10. Recuperar el sobrenadante dejando el pellet con un pequeño volumen (el más inmediato al pellet). Por ejemplo nosotros usamos tubos de centrifugación de 36 ml y dejamos los últimos 5 ml del fondo del tubo (se recuperaba cerca de 30 ml de sobrenadante).
11. Aforar de nuevo el sobrenadante al volumen requerido por el tubo de ultracentrifugación (por ejemplo a 36 ml en nuestros tubos) con el buffer TRIS y balancear su contrapeso de forma muy exacta.
12. **Centrifugar a 100,000 X g durante 70 min a 4^o C.**
13. **Obtención de exosomas.** Después de la ultracentrifugación aspirar con mucho cuidado el sobrenadante con una pipeta Pasteur y usando una bomba de vacío. Decantar lentamente el tubo para aspirar todo el sobrenadante sin tocar con la pipeta el fondo del tubo donde está el pellet. *El pellet de exosomas no será visible.*
14. Inmediatamente después de aspirar todo el sobrenadante, poner 90 μl de buffer TRIS sobre la base del tubo donde estará el pellet (ya que no se puede observar). Lavar las paredes del tubo cercanas al pellet suavemente usando la micropipeta y los 90 μl de buffer agregado.
 - **Almacenamiento de la muestra de exosomas.** Recuperar absolutamente todo el pellet resuspendido en 90 μl de buffer TRIS y ponerlo sobre un tubo eppendorf estéril. Realizar una centrifugación sencilla rápida (de aproximadamente 30s) y guardar a 4^o C si se usará la muestra el mismo día o - 20^o C para usos posteriores.

Buffer de lisis

10 mM Tris-Cl (pH 8.0)

1 mM EDTA

0.5 mM EGTA

1% Triton X-100

0.1% sodium deoxycholate

0.1% SDS

140 mM NaCl

La solución de arriba es estable a temperatura ambiente.

Antes de usar, agregar:

Inhibidor de proteasas: 1 mM PMSF

Tomado de Cold Spring Harbor protocols.

Buffer de boratos

Ácido bórico 100 mM

NaCl 75mM

Tetraborato de sodio 25 mM

Preparación de PEI para la adherencia del cultivo de astrocitos (polietilenimina).

A partir del stock comercial de PEI, hacer una dilución 1:800 en buffer de boratos. Para preparar 40 ml de PEI para cubrir las cajas donde se cultivarán los astrocitos. Poner 50 μ l de PEI comercial en 40 ml de buffer de boratos. Después filtrar la dilución de PEI obtenida con filtro de 0.22 μ m.

REFERENCIAS

- (OMS), O.M.d.I.S. (2002). Deaths from stroke. http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/cvd_atlas_16_death_from_stroke.pdf.
- Abbott, N.J., Ronnback, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews Neuroscience* 7, 41-53.
- Abumiya, T., Lucero, J., Heo, J.H., Tagaya, M., Koziol, J.A., Copeland, B.R., and del Zoppo, G.J. (1999). Activated microvessels express vascular endothelial growth factor and integrin alpha(v)beta3 during focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 19, 1038-1050.
- American Stroke Association, U. (2015). http://www.strokeassociation.org/STROKEORG/AboutStroke/About-Stroke_UCM_308529_SubHomePage.jsp. In *Stroke; a journal of cerebral circulation*.
- Anderson, H.C. (1969). Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J Cell Biol* 41, 59-72.
- Andre, F., Chaput, N., Scharz, N.E., Flament, C., Aubert, N., Bernard, J., Lemonnier, F., Raposo, G., Escudier, B., Hsu, D.H., *et al.* (2004). Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. I. Dendritic cell-derived exosomes transfer functional MHC class I/peptide complexes to dendritic cells. *J Immunol* 172, 2126-2136.
- Argaw, A.T., Asp, L., Zhang, J., Navrazhina, K., Pham, T., Mariani, J.N., Mahase, S., Dutta, D.J., Seto, J., Kramer, E.G., *et al.* (2012). Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *The Journal of clinical investigation* 122, 2454-2468.
- Azmi, I., Davies, B., Dimaano, C., Payne, J., Eckert, D., Babst, M., and Katzmann, D.J. (2006). Recycling of ESCRTs by the AAA-ATPase Vps4 is regulated by a conserved VSL region in Vta1. *J Cell Biol* 172, 705-717.
- Badawi, Y., Ramamoorthy, P., and Shi, H. (2012). Hypoxia-inducible factor 1 protects hypoxic astrocytes against glutamate toxicity. *ASN Neuro* 4, 231-241.
- Baietti, M.F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., *et al.* (2012). Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol* 14, 677-685.
- Baldauf, K., and Reymann, K.G. (2005). Influence of EGF/bFGF treatment on proliferation, early neurogenesis and infarct volume after transient focal ischemia. *Brain Res* 1056, 158-167.
- Basu, A., Krady, J.K., and Levison, S.W. (2004). Interleukin-1: a master regulator of neuroinflammation. *J Neurosci Res* 78, 151-156.
- Batagov, A.O., Kuznetsov, V.A., and Kurochkin, I.V. (2011). Identification of nucleotide patterns enriched in secreted RNAs as putative cis-acting elements targeting them to exosome nano-vesicles. *BMC Genomics* 12 Suppl 3, S18.
- Bellingham, S.A., Guo, B.B., Coleman, B.M., and Hill, A.F. (2012). Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Front Physiol* 3, 124.
- Boje, K.M., Jaworowicz, D., Jr., and Raybon, J.J. (2003). Neuroinflammatory role of prostaglandins during experimental meningitis: evidence suggestive of an in vivo relationship between nitric oxide and prostaglandins. *J Pharmacol Exp Ther* 304, 319-325.
- Boutillier, J., Ceni, C., Pagdala, P.C., Forgie, A., Neet, K.E., and Barker, P.A. (2008). Proneurotrophins require endocytosis and intracellular proteolysis to induce TrkA activation. *J Biol Chem* 283, 12709-12716.
- Calzolari, A., Raggi, C., Deaglio, S., Sposi, N.M., Stafnes, M., Fecchi, K., Parolini, I., Malavasi, F., Peschle, C., Sargiacomo, M., *et al.* (2006). Tfr2 localizes in lipid raft domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway. *J Cell Sci* 119, 4486-4498.
- Camussi, G., Deregibus, M.C., Bruno, S., Grange, C., Fonsato, V., and Tetta, C. (2011). Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells. *Am J Cancer Res* 1, 98-110.
- Camussi, G., Deregibus, M.C., and Cantaluppi, V. (2013). Role of stem-cell-derived microvesicles in the paracrine action of stem cells. *Biochemical Society transactions* 41, 283-287.

- Carayon, K., Chaoui, K., Ronzier, E., Lazar, I., Bertrand-Michel, J., Roques, V., Balor, S., Terce, F., Lopez, A., Salome, L., *et al.* (2011). Proteolipidic composition of exosomes changes during reticulocyte maturation. *J Biol Chem* 286, 34426-34439.
- Carlos, C.-B. (2011). Factores de riesgo, causas y pronóstico de los tipos de enfermedad vascular cerebral en México: Estudio RENAMEVASC. *Revista Mexicana de Neurociencia* 12(5), 224-234.
- Carmeliet, P. (2003). Blood vessels and nerves: common signals, pathways and diseases. *Nat Rev Genet* 4, 710-720.
- Colombo, M., Moita, C., van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Manel, N., Moita, L.F., They, C., and Raposo, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci* 126, 5553-5565.
- Colombo, M., Raposo, G., and They, C. (2014). Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Vol 30 30, 255-289.
- Columbia University Medical Center Neurosurgery, U. (2015). Cerebral Ischemia. In <http://www.columbianeurosurgery.org/conditions/cerebral-ischemia>.
- Crawford, N. (1971). The presence of contractile proteins in platelet microparticles isolated from human and animal platelet-free plasma. *Br J Haematol* 21, 53-69.
- Cullen, P.J. (2008). Endosomal sorting and signalling: an emerging role for sorting nexins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 574-582.
- Chen, Y., and Swanson, R.A. (2003). Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 137-149.
- Cheng, Y.L., Park, J.S., Manzanero, S., Choi, Y., Baik, S.H., Okun, E., Gelderblom, M., Fann, D.Y., Magnus, T., Launikonis, B.S., *et al.* (2014). Evidence that collaboration between HIF-1alpha and Notch-1 promotes neuronal cell death in ischemic stroke. *Neurobiol Dis* 62, 286-295.
- del Zoppo, G.J., Sharp, F.R., Heiss, W.D., and Albers, G.W. (2011). Heterogeneity in the penumbra. *J Cereb Blood Flow Metab* 31, 1836-1851.
- Denzer, K., Kleijmeer, M.J., Heijnen, H.F., Stoorvogel, W., and Geuze, H.J. (2000). Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci* 113 Pt 19, 3365-3374.
- Deudero, J.J., Caramelo, C., Castellanos, M.C., Neria, F., Fernandez-Sanchez, R., Calabria, O., Penate, S., and Gonzalez-Pacheco, F.R. (2008). Induction of hypoxia-inducible factor 1alpha gene expression by vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 283, 11435-11444.
- Dice, J.F. (1990). Peptide Sequences That Target Cytosolic Proteins for Lysosomal Proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences* 15, 305-309.
- Dong, Y., and Benveniste, E.N. (2001). Immune function of astrocytes. *Glia* 36, 180-190.
- Dvorak, H.F., Quay, S.C., Orenstein, N.S., Dvorak, A.M., Hahn, P., Bitzer, A.M., and Carvalho, A.C. (1981). Tumor shedding and coagulation. *Science* 212, 923-924.
- Eddleston, M., and Mucke, L. (1993). Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54, 15-36.
- Edgar, J.R., Eden, E.R., and Futter, C.E. (2014). Hrs- and CD63-dependent competing mechanisms make different sized endosomal intraluminal vesicles. *Traffic* 15, 197-211.
- Emmanouilidou, E., Melachroinou, K., Roumeliotis, T., Garbis, S.D., Ntzouni, M., Margaritis, L.H., Stefanis, L., and Vekrellis, K. (2010). Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *J Neurosci* 30, 6838-6851.
- Engel, O., Kolodziej, S., Dirnagl, U., and Prinz, V. (2011). Modeling stroke in mice - middle cerebral artery occlusion with the filament model. *J Vis Exp*.
- Engelhardt, S., Al-Ahmad, A.J., Gassmann, M., and Ogunshola, O.O. (2014). Hypoxia selectively disrupts brain microvascular endothelial tight junction complexes through a hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) dependent mechanism. *J Cell Physiol* 229, 1096-1105.
- Engelhardt, S., Huang, S.F., Patkar, S., Gassmann, M., and Ogunshola, O.O. (2015). Differential responses of blood-brain barrier associated cells to hypoxia and ischemia: a comparative study. *Fluids Barriers CNS* 12, 4.

- Erwin, C. (2011). Mortalidad por enfermedad vascular cerebral en México, 2000-2008: Una exhortación a la acción. *Revista Mexicana de Neurociencia* 12(5), 235-241.
- Fader, C.M., Sanchez, D.G., Mestre, M.B., and Colombo, M.I. (2009). TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochim Biophys Acta* 1793, 1901-1916.
- Fan, G.C. (2014). Hypoxic exosomes promote angiogenesis. *Blood* 124, 3669-3670.
- Feng, D., Zhao, W.L., Ye, Y.Y., Bai, X.C., Liu, R.Q., Chang, L.F., Zhou, Q., and Sui, S.F. (2010). Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic* 11, 675-687.
- Feuerstein, G.Z., Wang, X., and Barone, F.C. (1998). The role of cytokines in the neuropathology of stroke and neurotrauma. *Neuroimmunomodulation* 5, 143-159.
- Fevrier, B., Vilette, D., Archer, F., Loew, D., Faigle, W., Vidal, M., Laude, H., and Raposo, G. (2004). Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9683-9688.
- Flamant, L., Toffoli, S., Raes, M., and Michiels, C. (2009). Hypoxia regulates inflammatory gene expression in endothelial cells. *Exp Cell Res* 315, 733-747.
- Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D., and Semenza, G.L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Molecular and cellular biology* 16, 4604-4613.
- Fruhbeis, C., Frohlich, D., and Kramer-Albers, E.M. (2012). Emerging roles of exosomes in neuron-glia communication. *Front Physiol* 3, 119.
- Gera Neufeld, T.C., Stela Gengrinovitch, and Zoya Poltorak (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13, 9-22.
- Giaccia, A., Siim, B.G., and Johnson, R.S. (2003). HIF-1 as a target for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2, 803-811.
- Ginsberg, M.D., Reivich, M., Giandomenico, A., and Greenberg, J.H. (1977). Local glucose utilization in acute focal cerebral ischemia: local dysmetabolism and diaschisis. *Neurology* 27, 1042-1048.
- Greenwood, J., Heasman, S.J., Alvarez, J.I., Prat, A., Lyck, R., and Engelhardt, B. (2011). Review: leucocyte-endothelial cell crosstalk at the blood-brain barrier: a prerequisite for successful immune cell entry to the brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 37, 24-39.
- Grysiewicz, R.A., Thomas, K., and Pandey, D.K. (2008). Epidemiology of ischemic and hemorrhagic stroke: incidence, prevalence, mortality, and risk factors. *Neurologic clinics* 26, 871-895, vii.
- Hannafon, B.N., and Ding, W.Q. (2013). Intercellular Communication by Exosome-Derived microRNAs in Cancer. *Int J Mol Sci* 14, 14240-14269.
- Hanson, P.I., and Cashikar, A. (2012). Multivesicular body morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28, 337-362.
- Harding, C., Heuser, J., and Stahl, P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol* 97, 329-339.
- Hasdemir, B., Bunnett, N.W., and Cottrell, G.S. (2007). Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (HRS) mediates post-endocytic trafficking of protease-activated receptor 2 and calcitonin receptor-like receptor. *J Biol Chem* 282, 29646-29657.
- Hawkins, B.T.a.D., T.P. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 57, 173-185.
- Hennigan, A., O'Callaghan, R.M., and Kelly, A.M. (2007). Neurotrophins and their receptors: roles in plasticity, neurodegeneration and neuroprotection. *Biochemical Society transactions* 35, 424-427.
- Hermann, D.M., and Zechariah, A. (2009). Implications of vascular endothelial growth factor for postischemic neurovascular remodeling. *J Cereb Blood Flow Metab* 29, 1620-1643.
- Hsu, C., Morohashi, Y., Yoshimura, S., Manrique-Hoyos, N., Jung, S., Lauterbach, M.A., Bakhti, M., Gronborg, M., Mobius, W., Rhee, J., *et al.* (2010). Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *J Cell Biol* 189, 223-232.

- INEGI, M. (2013). Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>.
- Ishitsuka, K., Ago, T., Arimura, K., Nakamura, K., Tokami, H., Makihara, N., Kuroda, J., Kamouchi, M., and Kitazono, T. (2012). Neurotrophin production in brain pericytes during hypoxia: A role of pericytes for neuroprotection. *Microvascular Research* 83, 352-359.
- Jaiswal, J.K., Andrews, N.W., and Simon, S.M. (2002). Membrane proximal lysosomes are the major vesicles responsible for calcium-dependent exocytosis in nonsecretory cells. *J Cell Biol* 159, 625-635.
- Jia, H., Jezequel, S., Lohr, M., Shaikh, S., Davis, D., Soker, S., Selwood, D., and Zachary, I. (2001). Peptides encoded by exon 6 of VEGF inhibit endothelial cell biological responses and angiogenesis induced by VEGF. *Biochem Biophys Res Commun* 283, 164-173.
- Johnstone, R.M., Adam, M., Hammond, J.R., Orr, L., and Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem* 262, 9412-9420.
- Joshi, C.N., Jain, S.K., and Murthy, P.S. (2004). An optimized triphenyltetrazolium chloride method for identification of cerebral infarcts. *Brain Res Brain Res Protoc* 13, 11-17.
- Kawano, N., Miyado, K., Yoshii, N., Kanai, S., Saito, H., Miyado, M., Inagaki, N., Odawara, Y., Hamatani, T., and Umezawa, A. (2014). Absence of CD9 reduces endometrial VEGF secretion and impairs uterine repair after parturition. *Sci Rep* 4, 4701.
- Kaya, D., Gursoy-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.
- Kilic, E., Kilic, U., Wang, Y., Bassetti, C.L., Marti, H.H., and Hermann, D.M. (2006). 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.
- Kim, S.H., Bianco, N.R., Shufesky, W.J., Morelli, A.E., and Robbins, P.D. (2007). MHC class II+ exosomes in plasma suppress inflammation in an antigen-specific and Fas ligand/Fas-dependent manner. *J Immunol* 179, 2235-2241.
- Kimelberg, H.K., and Nedergaard, M. (2010). Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. *Neurotherapeutics* 7, 338-353.
- Kowal, J., Tkach, M., and Thery, C. (2014). Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol* 29, 116-125.
- Kucharzewska, P., Christianson, H.C., Welch, J.E., Svensson, K.J., Fredlund, E., Ringner, M., Morgelin, M., Bourseau-Guilmain, E., Bengzon, J., and Belting, M. (2013). Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 7312-7317.
- Lacoste, B., Comin, C.H., Ben-Zvi, A., Kaeser, P.S., Xu, X., Costa Lda, F., and Gu, C. (2014). Sensory-related neural activity regulates the structure of vascular networks in the cerebral cortex. *Neuron* 83, 1117-1130.
- Lai, C.P., and Breakefield, X.O. (2012). Role of exosomes/microvesicles in the nervous system and use in emerging therapies. *Front Physiol* 3, 228.
- Le Roy, C., and Wrana, J.L. (2005). Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 112-126.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K.K., and Hempstead, B.L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294, 1945-1948.
- Lee, S.H., Koo, K.H., Park, J.W., Kim, H.J., Ye, S.K., Park, J.B., Park, B.K., and Kim, Y.N. (2009). HIF-1 is induced via EGFR activation and mediates resistance to anoikis-like cell death under lipid rafts/caveolae-disrupting stress. *Carcinogenesis* 30, 1997-2004.
- Lee, T.Y., Folkman, J., and Javaherian, K. (2010). HSPG-binding peptide corresponding to the exon 6a-encoded domain of VEGF inhibits tumor growth by blocking angiogenesis in murine model. *PLoS One* 5, e9945.

- Lenmyr, F., Ata, K.A., Funa, K., Olsson, Y., and Terent, A. (1998). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (Flt-1 and Flk-1) following permanent and transient occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *J Neuropathol Exp Neurol* *57*, 874-882.
- Li, Y., Liu, Z., Xin, H., and Chopp, M. (2014). The role of astrocytes in mediating exogenous cell-based restorative therapy for stroke. *Glia* *62*, 1-16.
- Liegeois, S., Benedetto, A., Garnier, J.M., Schwab, Y., and Labouesse, M. (2006). The V0-ATPase mediates apical secretion of exosomes containing Hedgehog-related proteins in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* *173*, 949-961.
- Liu, Z., and Chopp, M. (2015). Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke. *Progress in neurobiology*.
- Liu, Z., and Li, Y. (2015). Cortical Cerebral Blood Flow, Oxygen Extraction Fraction, and Metabolic Rate in Patients with Middle Cerebral Artery Stenosis or Acute Stroke. *AJNR American journal of neuroradiology*.
- Liu, Z., Li, Y., Cui, Y., Roberts, C., Lu, M., Wilhelmsson, U., Pekny, M., and Chopp, M. (2014). Beneficial effects of gfap/vimentin reactive astrocytes for axonal remodeling and motor behavioral recovery in mice after stroke. *Glia* *62*, 2022-2033.
- Lochhead, J.J., McCaffrey, G., Quigley, C.E., Finch, J., DeMarco, K.M., Nametz, N., and Davis, T.P. (2010). Oxidative stress increases blood-brain barrier permeability and induces alterations in occludin during hypoxia-reoxygenation. *J Cereb Blood Flow Metab* *30*, 1625-1636.
- Lok, J., Gupta, P., Guo, S., Kim, W.J., Whalen, M.J., van Leyen, K., and Lo, E.H. (2007). Cell-cell signaling in the neurovascular unit. *Neurochem Res* *32*, 2032-2045.
- Longo, F.M., and Massa, S.M. (2013). Small-molecule modulation of neurotrophin receptors: a strategy for the treatment of neurological disease. *Nat Rev Drug Discov* *12*, 507-525.
- Luzio, J.P., Pryor, P.R., and Bright, N.A. (2007). Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* *8*, 622-632.
- Manalo, D.J., Rowan, A., Lavoie, T., Natarajan, L., Kelly, B.D., Ye, S.Q., Garcia, J.G., and Semenza, G.L. (2005). Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* *105*, 659-669.
- Marti, H.H., and Risau, W. (1998). Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 15809-15814.
- Mathivanan, S., Ji, H., and Simpson, R.J. (2010). Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* *73*, 1907-1920.
- Mattson, M.P. (2008). Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann N Y Acad Sci* *1144*, 97-112.
- Mattson, M.P., Kumar, K.N., Wang, H., Cheng, B., and Michaelis, E.K. (1993). Basic FGF regulates the expression of a functional 71 kDa NMDA receptor protein that mediates calcium influx and neurotoxicity in hippocampal neurons. *J Neurosci* *13*, 4575-4588.
- Mattson, M.P., Lovell, M.A., Furukawa, K., and Markesbery, W.R. (1995). Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca²⁺ concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons. *J Neurochem* *65*, 1740-1751.
- Mizuno, E., Kawahata, K., Kato, M., Kitamura, N., and Komada, M. (2003). STAM proteins bind ubiquitinated proteins on the early endosome via the VHS domain and ubiquitin-interacting motif. *Mol Biol Cell* *14*, 3675-3689.
- Mocchetti, I., and Wrathall, J.R. (1995). Neurotrophic factors in central nervous system trauma. *J Neurotrauma* *12*, 853-870.
- Mojsilovic-Petrovic, J., Callaghan, D., Cui, H., Dean, C., Stanimirovic, D.B., and Zhang, W. (2007). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is involved in the regulation of hypoxia-stimulated expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) and MCP-5 (Ccl12) in astrocytes. *J Neuroinflammation* *4*, 12.

- Montecalvo, A., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Stolz, D.B., Sullivan, M.L., Karlsson, J.M., Baty, C.J., Gibson, G.A., Erdos, G., Wang, Z., *et al.* (2012). Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* *119*, 756-766.
- Morelli, A.E., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Sullivan, M.L., Stolz, D.B., Papworth, G.D., Zahorchak, A.F., Logar, A.J., Wang, Z., Watkins, S.C., *et al.* (2004). Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* *104*, 3257-3266.
- Myer, D.J., Gurkoff, G.G., Lee, S.M., Hovda, D.A., and Sofroniew, M.V. (2006). Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain : a journal of neurology* *129*, 2761-2772.
- Nakao, Y., Otani, H., Yamamura, T., Hattori, R., Osako, M., and Imamura, H. (2001). Insulin-like growth factor 1 prevents neuronal cell death and paraplegia in the rabbit model of spinal cord ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg* *122*, 136-143.
- National Heart Lung and Blood Institute, U. (2014). Stroke. In <http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/stroke>.
- Navone, S.E., Marfia, G., Invernici, G., Cristini, S., Nava, S., Balbi, S., Sangiorgi, S., Ciusani, E., Bosutti, A., Alessandri, G., *et al.* (2013a). Isolation and expansion of human and mouse brain microvascular endothelial cells. *Nat Protoc* *8*, 1680-1693.
- Navone, S.E., Marfia, G., Nava, S., Invernici, G., Cristini, S., Balbi, S., Sangiorgi, S., Ciusani, E., Bosutti, A., Alessandri, G., *et al.* (2013b). Human and mouse brain-derived endothelial cells require high levels of growth factors medium for their isolation, in vitro maintenance and survival. *Vasc Cell* *5*, 10.
- NINDS, W.U. (2015). The Internet Stroke Center, W.U. National Institute of Neurological Disorders and Stroke, ed. (USA).
- Nitta, A., Zheng, W.H., and Quirion, R. (2004). Insulin-like growth factor 1 prevents neuronal cell death induced by corticosterone through activation of the PI3k/Akt pathway. *J Neurosci Res* *76*, 98-103.
- Obrenovitch, T.P. (1995). The ischaemic penumbra: twenty years on. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* *7*, 297-323.
- OMS (2012). The 10 leading causes of death in the world, 2000 and 2012. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.
- Orzylowska, O., Oderfeld-Nowak, B., Zaremba, M., Januszewski, S., and Mossakowski, M. (1999). Prolonged and concomitant induction of astroglial immunoreactivity of interleukin-1beta and interleukin-6 in the rat hippocampus after transient global ischemia. *Neuroscience letters* *263*, 72-76.
- Ostrowski, M., Carmo, N.B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C.F., Schauer, K., Hume, A.N., Freitas, R.P., *et al.* (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol* *12*, 19-30; sup pp 11-13.
- Ouyang, Y.B., Xu, L., Yue, S., Liu, S., and Giffard, R.G. (2014). Neuroprotection by astrocytes in brain ischemia: importance of microRNAs. *Neuroscience letters* *565*, 53-58.
- Pan, B.T., and Johnstone, R.M. (1983). Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* *33*, 967-978.
- Peinado, H., Aleckovic, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., Garcia-Santos, G., Ghajar, C.M., *et al.* (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature Medicine* *18*, 883-+.
- Pekny, M., and Nilsson, M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* *50*, 427-434.
- Pryor, P.R., and Luzzio, J.P. (2009). Delivery of endocytosed membrane proteins to the lysosome. *Biochim Biophys Acta* *1793*, 615-624.
- Puri, N., and Roche, P.A. (2008). Mast cells possess distinct secretory granule subsets whose exocytosis is regulated by different SNARE isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 2580-2585.
- Quaegebeur, A., Lange, C., and Carmeliet, P. (2011). The neurovascular link in health and disease: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neuron* *71*, 406-424.
- Quesenberry, P.J., Aliotta, J., Deregibus, M.C., and Camussi, G. (2015). Role of extracellular RNA-carrying vesicles in cell differentiation and reprogramming. *Stem Cell Res Ther* *6*, 153.

- Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J., and Geuze, H.J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* *183*, 1161-1172.
- Raposo, G., and Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* *200*, 373-383.
- Raposo, G., Tenza, D., Mecheri, S., Peronet, R., Bonnerot, C., and Desaymard, C. (1997). Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Mol Biol Cell* *8*, 2631-2645.
- Ratajczak, M.Z., Kucia, M., Jadczyk, T., Greco, N.J., Wojakowski, W., Tendera, M., and Ratajczak, J. (2012). Pivotal role of paracrine effects in stem cell therapies in regenerative medicine: can we translate stem cell-secreted paracrine factors and microvesicles into better therapeutic strategies? *Leukemia* *26*, 1166-1173.
- Rehncrona, S., Rosen, I., and Siesjo, B.K. (1981). Brain lactic acidosis and ischemic cell damage: 1. Biochemistry and neurophysiology. *J Cereb Blood Flow Metab* *1*, 297-311.
- Richard, D.E., Berra, E., and Pouyssegur, J. (2000). Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* *275*, 26765-26771.
- Ridet, J.L., Malhotra, S.K., Privat, A., and Gage, F.H. (1997). Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* *20*, 570-577.
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., and Zerial, M. (2005). Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* *122*, 735-749.
- Rossi, D.J., Brady, J.D., and Mohr, C. (2007). Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nat Neurosci* *10*, 1377-1386.
- Rudge, J.S., Alderson, R.F., Pasnikowski, E., McClain, J., Ip, N.Y., and Lindsay, R.M. (1992). Expression of Ciliary Neurotrophic Factor and the Neurotrophins-Nerve Growth Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin 3-in Cultured Rat Hippocampal Astrocytes. *Eur J Neurosci* *4*, 459-471.
- S, E.L.A., Mager, I., Breakefield, X.O., and Wood, M.J. (2013). Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* *12*, 347-357.
- Sacco, R.L., Kasner, S.E., Broderick, J.P., Caplan, L.R., Connors, J.J., Culebras, A., Elkind, M.S., George, M.G., Hamdan, A.D., Higashida, R.T., *et al.* (2013). An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke; a journal of cerebral circulation* *44*, 2064-2089.
- Sahu, R., Kaushik, S., Clement, C.C., Cannizzo, E.S., Scharf, B., Follenzi, A., Potolicchio, I., Nieves, E., Cuervo, A.M., and Santambrogio, L. (2011). Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Dev Cell* *20*, 131-139.
- Salomon, C., Ryan, J., Sobrevia, L., Kobayashi, M., Ashman, K., Mitchell, M., and Rice, G.E. (2013). Exosomal signaling during hypoxia mediates microvascular endothelial cell migration and vasculogenesis. *PLoS One* *8*, e68451.
- Savina, A., Vidal, M., and Colombo, M.I. (2002). The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *J Cell Sci* *115*, 2505-2515.
- Schwartz, J.P., and Nishiyama, N. (1994). Neurotrophic factor gene expression in astrocytes during development and following injury. *Brain Res Bull* *35*, 403-407.
- Secretaría de Salud, M. (2009). Rehabilitación de adultos con enfermedad vascular cerebral. www.cenetecsaludgobmx/descargas/gpc//EyR_DIF_331_09.pdf.
- Segura, E., Nicco, C., Lombard, B., Veron, P., Raposo, G., Batteux, F., Amigorena, S., and Thery, C. (2005). ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. *Blood* *106*, 216-223.
- Semenza, G.L. (2000a). HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev* *14*, 1983-1991.
- Semenza, G.L. (2000b). HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* (1985) *88*, 1474-1480.
- Semenza, G.L. (2007). Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci STKE* *2007*, cm8.

- Semenza, G.L., Nejfelt, M.K., Chi, S.M., and Antonarakis, S.E. (1991). Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5680-5684.
- Semenza, G.L., Roth, P.H., Fang, H.M., and Wang, G.L. (1994). Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 269, 23757-23763.
- Shaftel, S.S., Griffin, W.S., and O'Banion, M.K. (2008). The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. *J Neuroinflammation* 5, 7.
- Shi, Y.H., Bingle, L., Gong, L.H., Wang, Y.X., Corke, K.P., and Fang, W.G. (2007). Basic FGF augments hypoxia induced HIF-1-alpha expression and VEGF release in T47D breast cancer cells. *Pathology* 39, 396-400.
- Siren, A.L., Fratelli, M., Brines, M., Goemans, C., Casagrande, S., Lewczuk, P., Keenan, S., Gleiter, C., Pasquali, C., Capobianco, A., *et al.* (2001). Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4044-4049.
- Stanimirovic, D., and Satoh, K. (2000). Inflammatory mediators of cerebral endothelium: a role in ischemic brain inflammation. *Brain Pathol* 10, 113-126.
- Stanimirovic, D., Zhang, W., Howlett, C., Lemieux, P., and Smith, C. (2001). Inflammatory gene transcription in human astrocytes exposed to hypoxia: roles of the nuclear factor-kappaB and autocrine stimulation. *J Neuroimmunol* 119, 365-376.
- Stanimirovic, D.B., and Friedman, A. (2012). Pathophysiology of the neurovascular unit: disease cause or consequence? *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32, 1207-1221.
- Stegmayr, B., and Ronquist, G. (1982). Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes. *Urol Res* 10, 253-257.
- Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 513-525.
- Stoorvogel, W., Strous, G.J., Geuze, H.J., Oorschot, V., and Schwartz, A.L. (1991). Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell* 65, 417-427.
- Strauss, S., Otten, U., Joggerst, B., Pluss, K., and Volk, B. (1994). Increased levels of nerve growth factor (NGF) protein and mRNA and reactive gliosis following kainic acid injection into the rat striatum. *Neuroscience letters* 168, 193-196.
- Sun, Y., Jin, K., Xie, L., Childs, J., Mao, X.O., Logvinova, A., and Greenberg, D.A. (2003). VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *The Journal of clinical investigation* 111, 1843-1851.
- Tamai, K., Tanaka, N., Nakano, T., Kakazu, E., Kondo, Y., Inoue, J., Shiina, M., Fukushima, K., Hoshino, T., Sano, K., *et al.* (2010). Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 399, 384-390.
- Tan, S.S., Yin, Y., Lee, T., Lai, R.C., Yeo, R.W., Zhang, B., Choo, A., and Lim, S.K. (2013). Therapeutic MSC exosomes are derived from lipid raft microdomains in the plasma membrane. *J Extracell Vesicles* 2.
- Tekin, D., Dursun, A.D., and Xi, L. (2010). Hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) and cardioprotection. *Acta Pharmacol Sin* 31, 1085-1094.
- Thery, C., Zitvogel, L., and Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2, 569-579.
- Tian, T., Zhu, Y.L., Hu, F.H., Wang, Y.Y., Huang, N.P., and Xiao, Z.D. (2013). Dynamics of exosome internalization and trafficking. *J Cell Physiol* 228, 1487-1495.
- Timmers, L., Lim, S.K., Arslan, F., Armstrong, J.S., Hofer, I.E., Doevendans, P.A., Piek, J.J., El Oakley, R.M., Choo, A., Lee, C.N., *et al.* (2007). Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem Cell Res* 1, 129-137.
- Tomasoni, S., Longaretti, L., Rota, C., Morigi, M., Conti, S., Gotti, E., Capelli, C., Inrona, M., Remuzzi, G., and Benigni, A. (2013). Transfer of growth factor receptor mRNA via exosomes unravels the regenerative effect of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 22, 772-780.

- Tovar, Y.R.L.B., Penagos-Puig, A., and Ramirez-Jarquin, J.O. (2015). Endogenous recovery after brain damage: molecular mechanisms that balance neuronal life/death fate. *J Neurochem*.
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brugger, B., and Simons, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* *319*, 1244-1247.
- Tuttolomondo, A., Di Raimondo, D., di Sciacca, R., Pinto, A., and Licata, G. (2008). Inflammatory cytokines in acute ischemic stroke. *Current pharmaceutical design* *14*, 3574-3589.
- Valapala, M., and Vishwanatha, J.K. (2011). Lipid raft endocytosis and exosomal transport facilitate extracellular trafficking of annexin A2. *J Biol Chem* *286*, 30911-30925.
- Valencia, K., Luis-Ravelo, D., Bovy, N., Anton, I., Martinez-Canarias, S., Zandueta, C., Ormazabal, C., Struman, I., Tabruyn, S., Rebmann, V., *et al.* (2014). miRNA cargo within exosome-like vesicle transfer influences metastatic bone colonization. *Molecular Oncology* *8*, 689-703.
- van Niel, G., Charrin, S., Simoes, S., Romao, M., Rochin, L., Saftig, P., Marks, M.S., Rubinstein, E., and Raposo, G. (2011). The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev Cell* *21*, 708-721.
- Vempati, P., Popel, A.S., and Mac Gabhann, F. (2014). Extracellular regulation of VEGF: Isoforms, proteolysis, and vascular patterning. *Cytokine & Growth Factor Reviews* *25*, 1-19.
- Waldenstrom, A., and Ronquist, G. (2014). Role of exosomes in myocardial remodeling. *Circ Res* *114*, 315-324.
- Wang, G.L., and Semenza, G.L. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* *270*, 1230-1237.
- Wang, J.M., Hayashi, T., Zhang, W.R., Sakai, K., Shiro, Y., and Abe, K. (2000a). Reduction of ischemic brain injury by topical application of insulin-like growth factor-I after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res* *859*, 381-385.
- Wang, X., Kumar, R., Navarre, J., Casanova, J.E., and Goldenring, J.R. (2000b). Regulation of vesicle trafficking in madin-darby canine kidney cells by Rab11a and Rab25. *J Biol Chem* *275*, 29138-29146.
- Wang, Y., Chang, C.F., Morales, M., Chiang, Y.H., and Hoffer, J. (2002). Protective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor in ischemic brain injury. *Ann N Y Acad Sci* *962*, 423-437.
- Wang, Y., Kilic, E., Kilic, U., Weber, B., Bassetti, C.L., Marti, H.H., and Hermann, D.M. (2005). VEGF overexpression induces post-ischaemic neuroprotection, but facilitates haemodynamic steal phenomena. *Brain : a journal of neurology* *128*, 52-63.
- Waterhouse, E.G., An, J.J., Orefice, L.L., Baydyuk, M., Liao, G.Y., Zheng, K., Lu, B., and Xu, B. (2012). BDNF promotes differentiation and maturation of adult-born neurons through GABAergic transmission. *J Neurosci* *32*, 14318-14330.
- Weidemann, A., and Johnson, R.S. (2008). Biology of HIF-1alpha. *Cell Death Differ* *15*, 621-627.
- Wick, A., Wick, W., Waltenberger, J., Weller, M., Dichgans, J., and Schulz, J.B. (2002). Neuroprotection by hypoxic preconditioning requires sequential activation of vascular endothelial growth factor receptor and Akt. *J Neurosci* *22*, 6401-6407.
- Witwer, K.W., Buzas, E.I., Bemis, L.T., Bora, A., Lasser, C., Lotvall, J., Nolte-'t Hoen, E.N., Piper, M.G., Sivaraman, S., Skog, J., *et al.* (2013). Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles* *2*.
- Wollert, T., Wunder, C., Lippincott-Schwartz, J., and Hurley, J.H. (2009). Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature* *458*, 172-177.
- Wu, Z., Hofman, F.M., and Zlokovic, B.V. (2003). A simple method for isolation and characterization of mouse brain microvascular endothelial cells. *J Neurosci Methods* *130*, 53-63.
- Xin, H., Li, Y., Cui, Y., Yang, J.J., Zhang, Z.G., and Chopp, M. (2013). Systemic administration of exosomes released from mesenchymal stromal cells promote functional recovery and neurovascular plasticity after stroke in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* *33*, 1711-1715.
- Yeung, T., Gilbert, G.E., Shi, J., Silvius, J., Kapus, A., and Grinstein, S. (2008). Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science* *319*, 210-213.

- Yihui Ma, A.Z., Yan Qu, and Dirk M. Hermann (2012). Effects of Vascular Endothelial Growth Factor in Ischemic Stroke. *Journal of Neuroscience Research*, 1873–1882
- Zhang, W., Petrovic, J.M., Callaghan, D., Jones, A., Cui, H., Howlett, C., and Stanimirovic, D. (2006). Evidence that hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) mediates transcriptional activation of interleukin-1beta (IL-1beta) in astrocyte cultures. *J Neuroimmunol* 174, 63-73.
- Zhang, Y., and Wang, X.F. (2015). A niche role for cancer exosomes in metastasis. *Nat Cell Biol* 17, 709-711.
- Zheng, Y., Campbell, E.C., Lucocq, J., Riches, A., and Powis, S.J. (2013). Monitoring the Rab27 associated exosome pathway using nanoparticle tracking analysis. *Exp Cell Res* 319, 1706-1713.
- Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Hanrahan, C., Georgescu, M.M., Simons, J.W., and Semenza, G.L. (2000). Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 60, 1541-1545.
- Ziello, J.E., Jovin, I.S., and Huang, Y. (2007). Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale J Biol Med* 80, 51-60.
- Zlokovic, B.V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57, 178-201.
- Zlokovic, B.V. (2011). Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nature reviews Neuroscience* 12, 723-738.