

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO



“Efecto de la administración intranasal de secretoma derivado de células madre mesenquimales en el desarrollo de oligodendrocitos en un modelo animal de asfixia perinatal”

Martina Nikole Redel Villarroel

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN NEUROCIENCIAS

Director de Tesis: Prof. Dra. Paola Morales Retamales.

Co director: Prof. Dr. Mario Herrera-Marschitz.

Co director: Prof. Dr. Fernando Ezquer.

2022

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

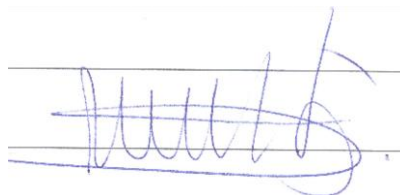
Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magíster presentada por la candidata

MARTINA NIKOLE REDEL VILLARROEL

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Neurociencias en el Examen de Tesis rendido el día 28 de abril de 2022.



Prof. Paola Morales R.



Prof. Mario Herrera-Marschitz.



Prof. Fernando Ezquer

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS



Prof. José Luis Valdés



Prof. Pablo Caviedes



Prof. Germán Ebersperger



Índice

LISTA DE ABREVIACIONES.....	6
RESUMEN.....	7
INTRODUCCION	10
<i>Asfixia</i>	
<i>Perinatal</i>	<i>10</i>
<i>Linaje Oligodendroglial y Mielinización ...</i>	<i>10</i>
<i>Efecto de la Asfixia Perinatal en los Pre Oligodendrocitos.....</i>	<i>14</i>
<i>Factores de Transcripción en Oligodendrocitos.....</i>	<i>17</i>
<i>HIF1-α.....</i>	<i>18</i>
<i>ASCL1</i>	<i>19</i>
<i>OLIG1 y OLIG2</i>	<i>19</i>
<i>MOG, PLP y MBP.....</i>	<i>20</i>
<i>Tratamiento con secretoma derivado de células madre</i>	
<i>Mesenquimales</i>	<i>21</i>
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL.....	26
<i>Objetivos Específicos</i>	<i>26</i>
METODOLOGÍA	
<i>Animales.....</i>	<i>27</i>
<i>Consideraciones éticas</i>	<i>27</i>
<i>Modelo de Asfixia Perinatal.....</i>	<i>28</i>



<i>Aislamiento y caracterización de las células madre mesenquimales humanas.....</i>	29
<i>Precondicionamiento de MSCs con Deferroxamina.....</i>	29
<i>Administración intranasal de secretoma derivado de MSC precondicionado con Deferroxamina.....</i>	30
<i>Eutanasia y obtención de muestras.....</i>	30
<i>Extracción de Proteínas.....</i>	31
<i>Cuantificación de Proteínas.....</i>	31
<i>Western Blot.....</i>	31
<i>PCR en tiempo real.....</i>	34
<i>Análisis Estadístico.....</i>	35

RESULTADOS.....36

- 1. Efecto del desarrollo sobre los niveles de mRNA de factores de transcripción (OLIG1, ASCL1) y proteínas de mielina madura (MOG, PLP y MBP) evaluado en sustancia blanca cerebral mediante RT-qPCR en los días P1, P7 y P14.....36*
- 2. Efecto de la PA y administración de MSC-S sobre los niveles de mRNA del factor de transcripción Hf 1 α evaluado en sustancia blanca telencefálica por RT-qPCR al día P1.....38*
- 3. Efecto de la PA y administración de MSC-S sobre los niveles de mRNA y proteína del factor de transcripción OLIG1 evaluado en sustancia blanca telencefálica por RT-qPCR a P1, P7 y P14; y WB al día P7.....39*
- 4. Efecto de la PA y de la administración de MSC-S sobre los niveles de mRNA y proteínas del factor de transcripción ASCL1 evaluado en sustancia blanca cerebral por RT-qPCR en el día P1 y Western Blot a P1, P7 y P14.....41*



- 5. Efecto de la PA y de la administración de MSC-S sobre los niveles de mRNA de*

<i>MOG</i> evaluado en sustancia blanca telencefálica mediante RT-qPCR a P1, P7 y P14.....	43
6. Efecto de la PA y de la administración de MSC-S sobre los niveles de mRNA de PLP evaluado en sustancia blanca cerebral mediante RT-qPCR a P1, P7 y P14.....	45
7. Efecto de PA y de la administración de MSC-S sobre los niveles de mRNA y proteínas del MBP evaluado en sustancia blanca cerebral mediante RT-qPCR a P1, P7 y P14; y Western Blot a P7 y P14.....	46
DISCUSION	49
CONCLUSIONES	53
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54



Abreviaciones

AP, Asfixia Perinatal.

ASCL1, Achaete-Scute Homolog 1.

CNS, Sistema Nervioso Central.

CNS, Células troncales nerviosas.

DFX, Deferroxamina

EROS, Especies Reactivas del Oxígeno.

HIE, Encefalopatía Hipóxica Isquémica.

HIFs, Factores Inducibles de hipoxia HIF1 α ,

Factor inducible de hipoxia 1 α .c.v,

Intra cerebro ventricular.

MBP, Proteína Básica de la Mielina

MOG, Glicoproteína de Oligodendrocitos de mielina.

MSC, Células Madre Mesenquimales.

MSC-S, Secretoma derivado de células madre mesenquimales.

MRI, Resonancia Nuclear Magnética.

MYRF, Factor regulador de mielina.

NKX2.2, NK Homebox 2.

OL, Oligodendrocito.

OLIG1, Factor de transcripción de Oligodendrocitos 1.

OLIG2, Factor de transcripción de Oligodendrocitos 2.

OPC, Células Precursoras de Oligodendrocitos.

(P), Día Postnatal.

PLP, Proteína proteo lipídica.

WB, Western Blot.

VHL, von Hippel-Lindau.



Resumen

Introducción: El daño en la sustancia blanca cerebral luego de un episodio de asfixia perinatal (PA) está asociado con un amplio espectro de trastornos neurológicos que van desde alteraciones cognitivas leves hasta parálisis cerebral. Estudios previos han demostrado que la administración intranasal de secretoma derivado de células madre mesenquimales (MSC) pre-condicionadas con factores pro hipóxicos (deferroxamina, DFX) a ratas con AP reduce el daño al inducir un aumento en la secreción de moléculas anti-inflamatorias, anti-oxidantes y pro-regenerativas, contribuyendo al desarrollo adecuado del sistema nervioso central.

Hipótesis: La asfixia perinatal disminuye la expresión de factores de transcripción involucrados en la generación y diferenciación de oligodendrocitos y mielinización en la sustancia blanca telencefálica, efecto que es prevenido por la administración intranasal de secretoma derivado de células madre mesenquimales precondicionadas con DFX.

Metodología: La AP se indujo mediante la inmersión de cuernos uterinos con sus fetos obtenidos de una rata a término en un baño termorregulado a 37°C por 21 minutos. Se administró intranasalmente el secretoma derivado de MSC precondicionadas con DFX (MSC-S) o vehículo, a ratas con o sin PA, dos horas posteriores al episodio de PA. Se estudió la sustancia blanca telencefálica, incluyendo cuerpo caloso, cíngulo y cápsula externa mediante WB y RT-qPCR.

Resultados: Se caracterizó la expresión de factores de transcripción y proteínas ASCL1, OLIG1, MOG, MBP y PLP durante los días postnatal (P) P1, P7 y P14. El análisis cuantitativo por RT-qPCR indica que la AP produjo un incremento en los niveles de mRNA de HIF1 α a P1, disminución de ASCL a P1 y de PLP y MBP a P7. La administración de MSC-S produce un efecto sobre ASCL1 a P1, aumentando los niveles de mRNA en el grupo asfíctico. También incrementó los niveles de proteína de ASCL1 a P7 en el grupo asfíctico y de MBP a P14.

Discusión: Los resultados muestran que la PA eleva los niveles de HIF1 α y altera la capacidad de diferenciación de oligodendrocitos en la sustancia blanca, lo que se observa a P1. La administración intranasal de MSC-S pre condicionado con DFX



aumenta la expresión de *MOG* a P1; y *ASCL1* a P1 y P7; e incrementa los niveles de la proteína madura de mielina MBP a P14.

Abstract

Introduction: Cerebral white matter damage after an episode of perinatal asphyxia (PA) is associated with a wide spectrum of neurological disorders ranging from mild cognitive impairment to cerebral palsy. Previous studies have shown that intranasal administration of mesenchymal stem cell (MSC)-derived secretome preconditioned with pro hypoxic factors (deferrioxamine, DFX) to PA rates reduces damage by inducing an increase in the secretion of anti-inflammatory, antioxidant and pro regenerative molecules, contributing to the proper development of the central nervous system.

Hypothesis: Perinatal asphyxia decreases the expression of transcription factors involved in the generation and differentiation of oligodendrocytes and myelination in the telencephalic white matter, an effect that is prevented by the intranasal administration of secretome derived from mesenchymal stem cells preconditioned with DFX.

Methodologies: PA was induced by immersing uterine horns with their fetuses obtained from a term rat in a thermoregulated bath at 37°C for 21 minutes. The secretome derived from MSCs preconditioned with DFX (MSC-S) or vehicle was administered intranasally to rats with or without PA, two hours after the episode of AP. The telencephalic white matter, including the corpus callosum, cingulum, and external capsule, was studied by WB and RT-qPCR.

Results: The expression of transcription factors and proteins *ASCL1*, *OLIG1*, *MOG*, *MBP* and *PLP* was characterized during postnatal days (P) P1, P7 and P14. Quantitative analysis by RT-qPCR indicates that PA produced an increase in the mRNA levels of *HIF1 α* at P1, decreased *ASCL* at P1 and *PLP* and *MBP* at P7. MSC-S administration produces an effect on *ASCL1* at P1, increasing mRNA levels in the asphyxiated group. It also increased protein levels of *ASCL1* at P7 in the asphyxiated group and of *MBP* at P14.

Discussion: The results show that PA increases HIF1 α levels and alters the differentiation capacity of oligodendrocytes in the white matter, which is observed at P1. Intranasal administration of MSC-S preconditioned with DFX increases MOG expression at P1; and ASCL1 to P1 and P7; and increases levels of the mature myelin protein MBP at P14.



Introducción

Asfixia Perinatal

La asfixia perinatal (PA) se refiere a la interrupción o disminución de la tensión de oxígeno durante el trabajo de parto y el nacimiento; causado por eventos perinatales, tales como alteraciones cardiovasculares, hemorragias maternas y/o fetales, compresión del cordón umbilical aguda o intermitente, ruptura de las membranas uterinas, disminuyendo el suministro de sangre oxigenada hacia el feto, o retardo y/o interrupción de la respiración autónoma por parte del feto. Esta condición médica afecta aproximadamente a 4 millones de neonatos por año en el mundo, causando la muerte de un millón de individuos (Lawn et al., 2005). En algunos casos, los infantes se recuperan exitosamente luego de los episodios de hipoxia, pero el 60% de ellos presenta alteraciones motoras y cognitivas de corto y largo-plazo, incluyendo alteraciones neuropsiquiátricas, (Douglas-Escobar & Weiss, 2015) (Schneider & Miller, 2019). Dependiendo de la severidad de la hipoxia, algunos pacientes pueden desarrollar encefalopatía hipóxica isquémica (HIE), resultando en daños neurológicos permanentes, tales como epilepsia, parálisis cerebral, retraso cognitivo y/o trastornos motores (Bhatti & Kumar, 2014). El insulto puede afectar a órganos periféricos y al sistema nervioso central (CNS), perturbando con variada intensidad a diferentes órganos y sistemas. Se ha estimado que la HIE afecta al CNS en un 28%; al sistema cardiovascular en un 25%; riñones en un 50%, y pulmones en un 23% (Kinney, 2009). Los hallazgos con resonancia magnética cerebral (MRI) revelan intensidad de señal anormal en diferentes estructuras cerebrales, incluyendo ganglios basales, tálamo, hipocampo y sustancia blanca frontal en recién nacidos afectados por PA, lo que se correlaciona con un impacto a largo plazo en funciones motoras e intelectuales de los niños afectados. Los resultados de la MRI son un importante predictor del desempeño funcional del sujeto con patología hipóxica y por esto es de gran utilidad en el diagnóstico (Volpe et al, 2018).

En Chile la tasa de incidencia de HIE es de 5-6 por cada 1000 nacidos vivos de término (Novoa P et al., 2012). Dada la alta tasa de incidencia y el gran impacto en las familias, que incluyen necesidades de cuidados multidisciplinarios por un largo



tiempo, se requiere de un diagnóstico predictivo e intervenciones terapéuticas personalizadas de forma urgente.

Linaje Oligodendroglial y Mielinización

En el CNS, los oligodendrocitos (OLs) son los responsables de la producción de mielina. Los OLs se originan de las células troncales nerviosas (NSC), dando lugar a células precursoras de oligodendrocitos (OPC), que se diferencian en OLs mielinizantes inmaduros y por último en OLs mielinizantes maduros (Fig. 1). El OL maduro inicia la producción de mielina al conectarse con el axón (van Tilborg et al., 2018). Estudios han demostrado que en roedores, al primer y segundo día postnatal se expresan mayormente pre-OLs, mientras que al día P7 aumenta la expresión de oligodendrocitos maduros. Al día 14 la mayoría de los oligodendrocitos se encuentra en un estado maduro del desarrollo (Ver Fig. 2) (Dean et al., 2011) (Affeldt et al., 2017) (Peeples, 2018) (Kuhn et al., 2019)(Kuhn et al., 2019).

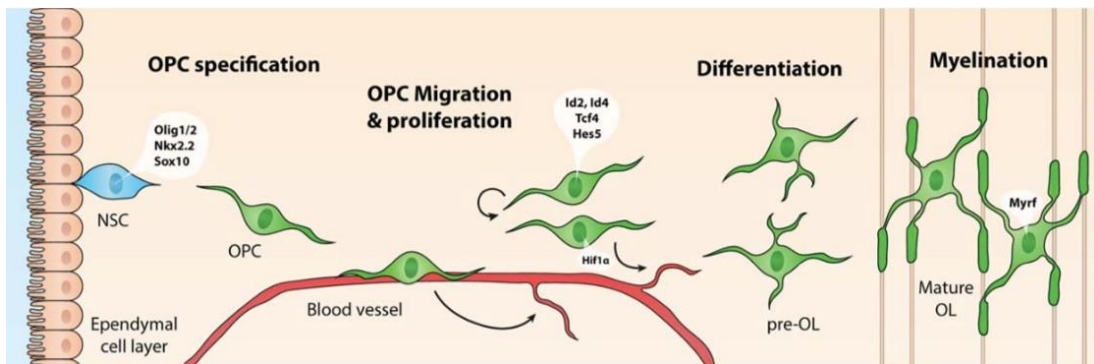


Figura 1. Representación esquemática del desarrollo de OL y factores de transcripción que contribuyen a la progresión del linaje OL. Los OPCs se originan de zonas neuroepiteliales que rodean los ventrículos, en donde las NSCs se diferencian en OPCs bajo la influencia de factores de transcripción específicos de OLs, tales como Olig1/2, Nkx2.2 y Sox10. Los OPCs migran hacia un sitio apropiado a través de vasos sanguíneos, mientras que al mismo tiempo promueven la angiogénesis de una forma dependiente de HIF1- α , en áreas que requieren de mayores niveles de oxígeno. En su destino final, los OPCs expanden su fenotipo de OPCs, bajo la regulación de factores de transcripción como Id2, Id4 y Hes5. Cuando la proliferación es inhibida, los OLs se diferencian en OLs premielinizantes, y finalmente en OLs maduros que envuelven los axones neuronales con vainas de mielina, bajo la influencia de factores de transcripción como Myrf (van Tilborg et al., 2018).

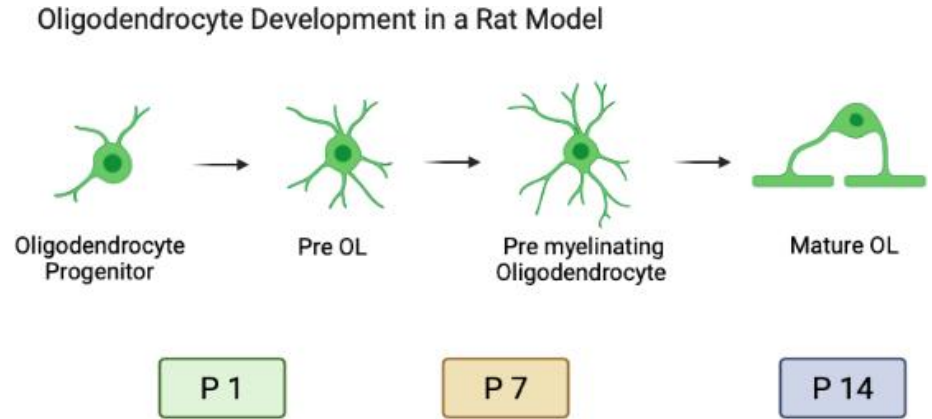


Figura 2. Esquema del desarrollo de oligodendrocitos en los días postnatales 1, 7 y 14 en un modelo animal de rata (elaboración propia).

Trastornos o alteraciones en el período neonatal pueden afectar al linaje oligodendroglial, generando una disfunción de OLs, pérdida de sus procesos y/o generar un daño axonal primario por señalización anormal desde los OLs, impidiendo una mielinización adecuada (ver Fig.3) (Volpe 2018).

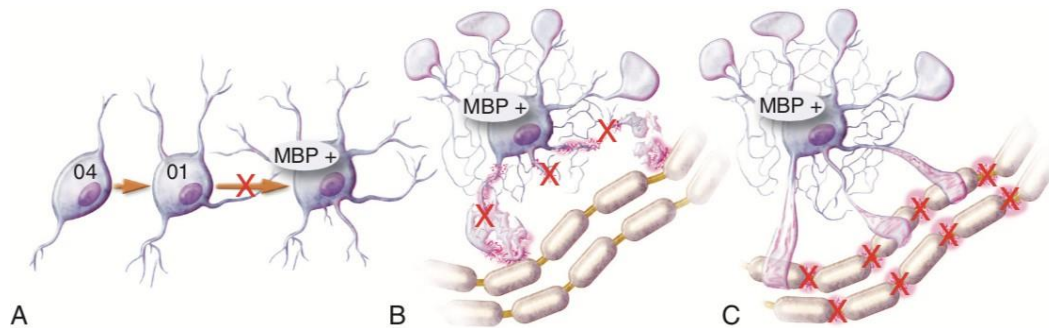


Figura 3. Mecanismos de trastornos de la mielinización del sistema nervioso central (CNS). (A) Alteración en el linaje oligodendroglial; (B) Disfunción de OL o pérdida de sus procesos, y (C) daño axonal primario con señalización anormal hacia los OLs. MBP, Myelin basic protein (Volpe, 2018).



Al respecto, se ha descrito que el daño en la sustancia blanca producido por la hipoxia re-oxigenación neonatal tiene consecuencias en la mielinización retardada y/o desmielinización del CNS (Back, 2017).

Neonatos de pre término, con o sin alguna patología crítica, son particularmente sensibles a daños en la sustancia blanca, relacionado con la susceptibilidad de los OPC en desarrollo al estrés oxidativo (Morrison et al., 2013).

Efecto de la Asfixia Perinatal en los Pre Oligodendrocitos

Durante la ausencia de oxígeno en un episodio de asfixia severa, el suministro de energía de las neuronas como el ATP cae a un umbral crítico, alterando la producción de fosfatos de alta energía (Chakkarapani et al., 2021), secundario a la falla en el acoplamiento del sistema mitocondrial de ácido cítrico y cadena transportadora de electrones; a consecuencia de la falta o disminución de la tensión del último electrón aceptor, el oxígeno.

En respuesta a esta condición anaeróbica, la glicólisis se convierte en la principal fuente de ATP, con piruvato como el principal aceptor, y acumulación de lactato como producto, generando sólo dos moléculas de ADP por cada molécula de glucosa metabolizada. Este número claramente contrasta con las 38 moléculas producidas en condiciones aeróbicas, por lo que se induce un déficit energético producto del insulto hipóxico. En caso de hipoxia severa, esta disminución de fosfatos de alta energía es capaz de gatillar una falla en la bomba dependiente de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$, resultando en influjo de Na^+ y agua, provocando edema y lisis celulares, causando la muerte celular por necrosis (Fig. 4), disminuyendo la efectividad en la recaptación desde el espacio extracelular de especies o sustancias pro-oxidativas, incluyendo glutamato.

La sobrevida a hipoxia requiere de re oxigenación, aún cuando prolongue la muerte celular, principalmente por apoptosis, ya que durante las primeras 3 horas post insulto se produce despolarización de membrana citoplasmática y acumulación extracelular de glutamato por falla en la recaptación de glutamato extracelular, aumento citosólico de Ca^{+2} (por falla dependiente de energía de las bombas dependientes de calcio y apertura de canales dependientes de voltaje de calcio y despolarización de membrana

inducido por glutamato), y una cascada de eventos que provoca muerte celular retardada de tipo apoptótica (Koehler et al., 2018).

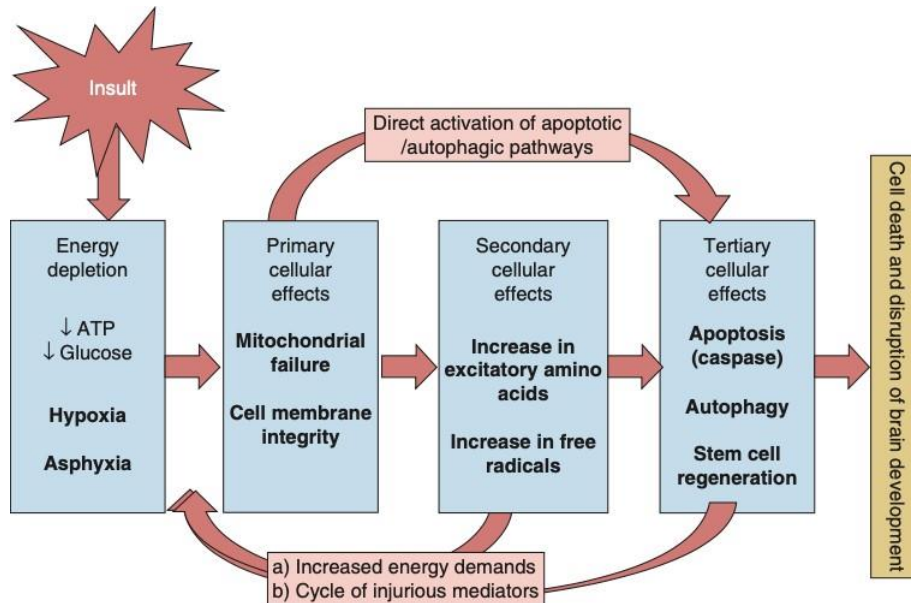


Figura 4. Esquema de los mecanismos y neuropatologías asociadas al daño cerebral inducido por hipoxia en el recién nacido. ATP, Adenosin trifosfato. Volpe et al. 2018.

Ocurre luego una segunda falla energética, por aumento en los niveles de lactato, producto de la metabolización de piruvato, que ocurre en su mayoría en astrocitos, participando en la biosíntesis de lípidos.

La acumulación de glutamato en el espacio extracelular aumenta la probabilidad de unión a receptores glutamatérgicos, principalmente de tipo NMDA extra sinápticos, localizados en parte en procesos oligodendrogliales. También por la unión a receptores AMPA, inmaduros al momento de nacer, localizados en el soma de pre-oligodendrocitos. Estos receptores se sobre expresan en la sustancia blanca cerebral durante el periodo de mayor vulnerabilidad luego del daño por hipoxia. Los receptores NMDA son permeables a calcio, y durante el desarrollo los receptores AMPA expresan una subunidad que modula la permeabilidad a calcio, aumentando los niveles de calcio intracelular, desencadenando cascadas de muerte celular. Lo anterior, sumado a un déficit de la capacidad antioxidante en pre Ols, lo que los hacen extremadamente vulnerables a la PA (Fig. 5) (Perlman, 2002).

El aumento de calcio intracelular conlleva la degradación de lípidos celulares, por activación de fosfolipasas y/o degradación de proteínas del citoesqueleto, con la activación de proteasas y nucleasas, además de mecanismos de destrucción indirectos, como la generación de radicales libres y óxido nítrico. La PA también produce un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (EROS).

El cerebro inmaduro de los neonatos tiene una capacidad limitada para detoxificar la acumulación de peróxido de hidrógeno, por inmadurez de las enzimas antioxidantes (catalasa y glutatión peroxidasa no incrementan su actividad frente al insulto hipóxico). Además, el cerebro en desarrollo posee una alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente en las membranas neuronales, las cuales son blanco del ataque de las EROS, vulnerabilidad incrementada por una alta concentración de hierro libre. Estas condiciones por lo tanto favorecen el incremento del daño oxidativo luego de hipoxia neonatal (Giussani, 2016).

Efecto de la Hipoxia en Pre Oligodendrocitos

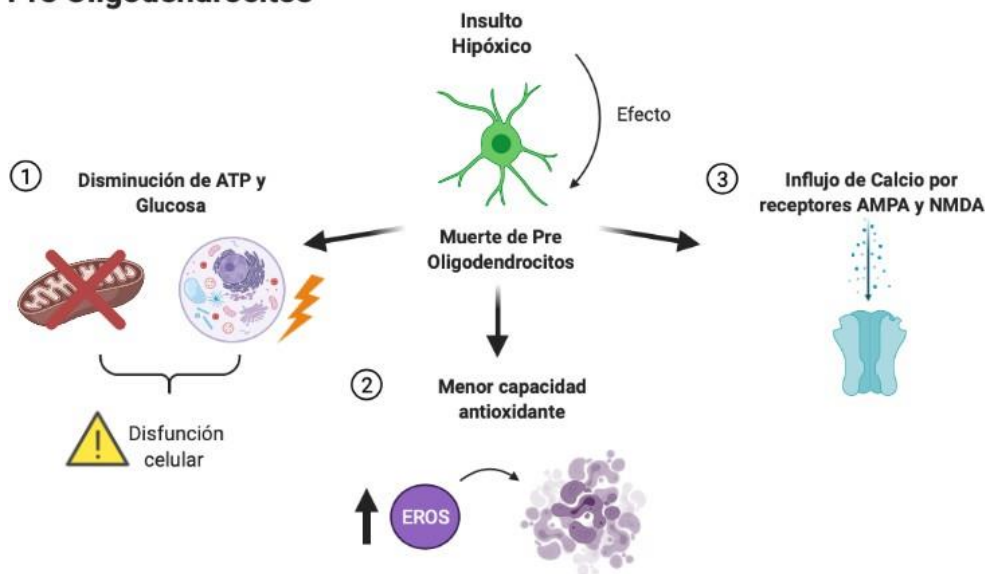


Figura 5. Esquema de los efectos del insulto hipóxico en los pre oligodendrocitos (elaboración propia).



Factores de Transcripción en Oligodendrocitos

Se ha descrito que la hipoxia/re oxigenación en periodos tempranos del desarrollo produce desregulación de factores de transcripción que participan en el desarrollo de las células precursoras de OLs, alterando su diferenciación, afectando así la mielinización de la sustancia blanca periventricular (Back & Miller, 2014). Sin embargo, aún no se ha determinado si estas alteraciones en la mielinización pueden atribuirse a una disminución de ciertos factores específicos de transcripción, involucrados en el proceso de desarrollo. A continuación, se describen algunos de los factores que participan en el desarrollo de los OLs y que se estudian en esta tesis (ver Fig. 5).

HIF1- α

Para mantener la homeostasis celular, se requiere la habilidad de censar y responder a fluctuaciones en los niveles de oxígeno (Kaelin & Ratcliffe, 2008) (Semenza, 2012). Concentraciones moleculares insuficientes de oxígeno gatillan rápidamente una respuesta transcripcional que permite la supervivencia celular a bajos niveles de oxígeno, promoviendo el metabolismo anaeróbico para la producción de energía, eritropoyesis para incrementar el acceso al oxígeno local, induciendo angiogénesis para aumentar la biodisponibilidad de oxígeno y metabolitos. Así también, la activación inicial protectora y prolongada de estas respuestas induce un desequilibrio metabólico y disfunción celular en muchos tejidos. Por ejemplo, la respuesta a hipoxia crónica bloquea la formación de sustancia blanca en individuos nacidos prematuramente (Scafidi et al., 2014) (Volpe, 2009) (Volpe et al., 2011). La primera respuesta a bajos niveles de oxígeno es mediada por los factores inducibles de hipoxia (HIFs), una familia de factores de transcripción que se estabilizan bajo condiciones hipóxicas en todas las células de los mamíferos (Cassavaugh & Lounsbury, 2011) (Choudhry & Harris, 2018). Los HIFs son complejos heterodiméricos, formados por subunidades alpha y beta. En presencia de oxígeno, las subunidades alpha son hidroxiladas por proliil-hidroxilasas, permitiendo el reconocimiento y ubiquitinación vía el factor von Hippel-Lindau (VHL) (Jaakkola et al., 2001), marcadas para su rápida degradación por el proteosoma. A bajas condiciones de oxígeno, las subunidades Alpha escapan a la hidroxilación, evitando su

degradación, translocándose al núcleo para unirse a la unidad constitutiva beta, regulando la expresión génica (Semenza, 2007). Los motivos de unión a HIF1 α están presentes más de 1 millón de veces en el genoma; sin embargo, HIF1 α se une a una pequeña fracción de estos sitios, sugiriendo que la unión de HIF1 α está muy regulada (Schödel et al., 2011).

El CNS consume el 20% del oxígeno total del cuerpo y la sustancia blanca cerebral es altamente susceptible a insultos hipóxicos. La sustancia blanca es un blanco en accidente cerebrovascular (ACV), demencia vascular, síndromes de distrés respiratorio, parto prematuro y parálisis cerebral (Hankey, 2016); (Salmaso et al., 2014); (Shindo et al., 2016).

Como se ha expuesto anteriormente, los OLS se originan de OPCs, las cuales abundan en el desarrollo del SNC y se ha visto que la acumulación de HIF1 α es suficiente para alterar la formación de OLS a partir de OPCs (Jablonska et al., 2012) (van Tilborg et al., 2018).

ASCL1

Ascl1 es un factor de transcripción expresado tempranamente por los precursores de OLS. Este factor de transcripción ejerce un rol importante en la generación y diferenciación pre y post natal de neuronas y OLS (Affeldt et al., 2017). Ascl1 juega un rol crucial en la especificación y diferenciación de los oligodendrocitos a través de su regulación por Nkx2.2 y Olig1 (Nakatani et al., 2013). En un modelo animal de desmielinización focal del cuerpo calloso se observó un incremento en la expresión de Ascl1, junto con un aumento en la oligodendrogénesis (Nakatani et al., 2013). Es por esto que el factor Ascl1 se considera un regulador transcripcional esencial que contribuye a la mielinización y remielinización durante el periodo embrionario y adulto (Sugimori et al., 2008).

OLIG1 y OLIG2

Los factores Olig1 y Olig2 son cruciales para la diferenciación y maduración de los oligodendrocitos. Su expresión y localización subcelular señala los estadios específicos del desarrollo de los oligodendrocitos (Elbaz & Popko, 2019). El factor



Olig1 promueve la diferenciación, desarrollo y maduración de los OLs y la formación de mielina (Cheng et al., 2015). El factor Olig2 es crucial para la especificación del linaje de los oligodendrocitos y se encuentra altamente conservado durante el desarrollo (Zhu et al., 2012). El factor de transcripción Nkx2.2 interactúa con Olig1 y Olig2 desempeñando un rol en la diferenciación de los oligodendrocitos, y su ablación retrasa la maduración del oligodendrocito (Cai et al., 2010) (Okahara et al., 2014). En modelos de isquemia y ACV se ha detectado cambios en la expresión de estos factores de transcripción. Sin embargo, aun no está del todo clarificado el efecto de la asfixia perinatal en la expresión de estos factores.

Luego de proliferar, las células precursoras de OLs se diferencian en oligodendrocitos inmaduros y posteriormente en OLs maduros. Es en este momento en el que se induce la expresión de *Myelin Regulatory Factor* (MYRF), factor que regula la progresión de oligodendrocitos inmaduros a oligodendrocitos maduros capaces de producir mielina (Elbaz & Popko, 2019).

MOG, PLP y MBP

Al contactar el axón, los OLs maduros comienzan a producir mielina, la cual es una estructura espiral membranosa de tipo laminar que envuelve los axones. Esta se compone principalmente de lípidos y proteínas, además de algunos tipos de carbohidratos. Los elementos lipídicos de la membrana son fosfolípidos, glicolípidos y colesterol mientras que los principales componentes proteicos son la glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), proteína proteolipídica (PLP) y proteína básica de la mielina (MBP) (Hopper, 1990).

PLP y MBP son proteínas constituyentes, mientras que MOG participa en la comunicación intercelular y en la adhesión celular adyacente.

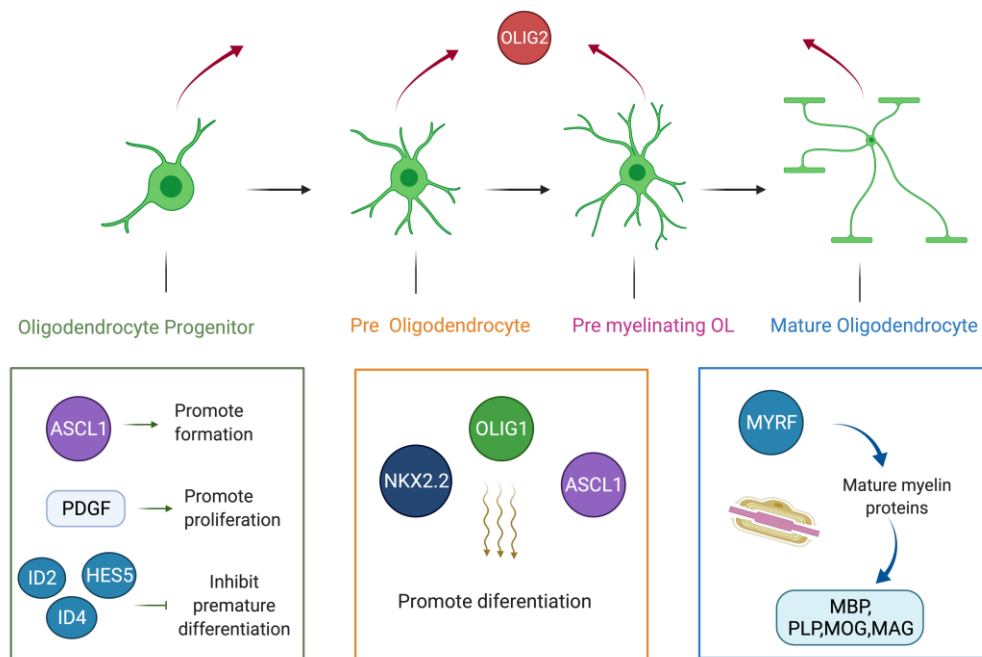


Figura 6. Esquema del desarrollo oligodendroglial y sus factores de transcripción. (elaboración propia).

En estudios previos del laboratorio, se investigó el efecto de la PA en la expresión de los factores de transcripción involucrados en los procesos de mielinización (Tapiabustos et al, 2021). Se observó que la PA no induce cambios en la expresión de Olig1 y Olig2 en el telencéfalo de ratas a P1, sin embargo, a P7 la asfixia gatilla un incremento significativo de Olig1, en comparación con los animales control. No se observó cambios en los niveles de mRNA de Olig2. El incremento de Olig1 a P7 probablemente es un mecanismo compensatorio que activa la mielinización, lo que lleva a la pregunta: ¿Es la desregulación de los factores de transcripción que participan en el desarrollo de los precursores de los oligodendrocitos luego de AP, la que produce las alteraciones en la mielinización?

Tratamiento con secretoma derivado de células madre mesenquimales

La estrategia terapéutica basada en la administración de MSC es una opción preclínica para alteraciones neonatales del CNS (Castillo-Melendez et al., 2013). Esta estrategia se basa en utilizar los efectos paracrinos producidos por las MSC al



secretar al espacio extracelular una combinación de nanovesículas y factores solubles (secretoma), con características antioxidantes, antiinflamatorias y regenerativas. Estudios previos del laboratorio han demostrado que la administración i.c.v. de MSC derivadas de tejido adiposo de rata revierte los efectos de la hipoxia en la maduración de los oligodendrocitos y mielinización en la sustancia blanca telencefálica de ratas sometidas a PA (Tapia-bustos et al., 2021).

Se ha descrito que el pre condicionamiento *in vitro* de las MSC mediante la incubación de estímulos mejoran la efectividad terapéutica del secretoma en diversas patologías. Se ha investigado una amplia variedad de estímulos y condiciones incluyendo hipoxia o fármacos miméticos de hipoxia (Deferroxamina (DFX), Acido Valproico), los cuales incrementan la producción de factores de crecimiento y moléculas anti inflamatorias y antioxidantes; o estímulos pro-inflamatorios (Factor de Necrosis Tumoral alfa, TNF α y/o Interferón γ , IFN γ), que inducen la secreción de altos niveles de factores inmunes (Vizoso et al., 2017). El precondicionamiento *in vitro* de las MSC mediante incubación con estímulos pro-inflamatorios o miméticos de hipoxia mejoran su efectividad terapéutica, al inducir un incremento significativo en la producción y secreción de factores pro-angiogénicos (VEGF α y ANG-1); factores neuroprotectores (GDNF, NGF y NT3), y factores antiinflamatorios (IL4 e IL5) (Oses et al., 2017). También se ha descrito el precondicionamiento con DFX reduce los niveles de especies reactivas del oxígeno (EROS) en el microambiente que rodea a las células, ya que éstas mejoran su capacidad antioxidante, aumentando los niveles de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, macromoléculas como ferritina y pequeñas moléculas que incluyen ácido ascórbico, α -tocopherol, β -caroteno, glutatión reducido, ácido úrico y bilirrubina (De Gregorio et al., 2020) (Oses et al., 2017).

En investigaciones previas de nuestro laboratorio se ha observado que en el modelo experimental de PA utilizado, la administración intranasal de secretoma derivado de MSC precondicionadas con DFX o con TNF α +IFN γ reduce el estrés oxidativo, la neuro inflamación y muerte celular en el hipocampo de ratas asfícticas, atenuando el déficit motor y cognitivo inducido por PA (Fig.6) (Farfán et al., 2020). Al comparar los dos tipos de precondicionamiento se evidenció un efecto terapéutico mayor del precondicionamiento con Deferroxamina en las ratas con PA que del secretoma precondicionado con TNF α +IFN γ .

Es por esta razón que se ha escogido la Deferroxamina para potenciar el efecto terapéutico del secretoma derivado de MSC en PA (ver tabla 1). El quelante de hierro DFX posee un potencial mimético de hipoxia ya que induce la estabilización del factor inducible de hipoxia (HIF1 α), el cual es un regulador crítico de las funciones celulares bajo la condición de hipoxia. Los niveles celulares de HIF1 α son regulados post transcripcionalmente por HIF prolyl-hidroxilasas (HIF-PHDs), Fe^{2+} , O_2 y 2 oxoglutarato (2-OG) que son enzimas que hidroxilan HIF-1 α en el dominio dependiente de degradación por oxígeno y lo marcan para degradación por proteosoma (Jaakkola et al., 2001).

DFX interfiere con la habilidad de las enzimas dependientes de HIF-PHDs, Fe^{2+} , O_2 y 2-OG, impidiendo la hidroxilación y degradación HIF 1 α (David, Coutts, et al., 2021).



Aspectos evaluados	Precond. Hipoxia	Precond. Deferroxamina	Precond. Factores Proinflamatorios
Proliferación, migración celular y angiogénesis	Incrementa la proliferación celular y expresión de VEGF. (Heirani-Tabasi et al., 2020)	Incrementa la migración celular, reorganización de matriz extracelular, expresión de VEGF-A, VEGF-C y ANG-1 (Heirani-Tabasi et al., 2020) (Oses et al., 2017) (De Gregorio et al., 2020)	
Estrés Oxidativo	Incrementa HO1 y Catalasa (Heirani-Tabasi et al., 2020).	Incrementa NRF2, NQO1, SOD, Catalasa, glutatión peroxidasa, alfa tocopherol, beta caroteno, ferritina (Farfán et al., 2020) (Oses et al., 2017)	Incrementa NRF2 y glutatión (Farfán et al., 2020), (Ezquer et al., 2019).
Inflamación	Incrementa IL-6 (Heirani-Tabasi et al., 2020).	Incrementa IL 5, IL6 e IL-6 (Oses et al., 2017)	Incrementa PGE2, PTX3, complemento de Factor B y D, TNF α , IL-23, IL-16 e IL-6 IL-10 TGF β 1 (Drago et al., 2013), (Quintanilla et al., 2019)
Neuroprotección	Incrementa BDNF y GDNF (Bogatcheva & Coleman, 2019).	Incrementa GDNF, NGF y NT3 (Oses et al., 2017).	
Sobrevida	No previene la muerte celular. Incrementa Hif-1 alfa, AKT, Bcl-2 y HGF (David, Curtin, et al., 2021)	Previene la muerte celular. Incrementa Hif 1 alfa (David, Coutts, et al., 2021) (Oses et al., 2017)	Incrementa HGF y AKT (Drago et al., 2013).

Tabla 1. Tabla comparativa de distintos tipos de acondicionamiento *in vitro* de MSCs (elaboración propia).

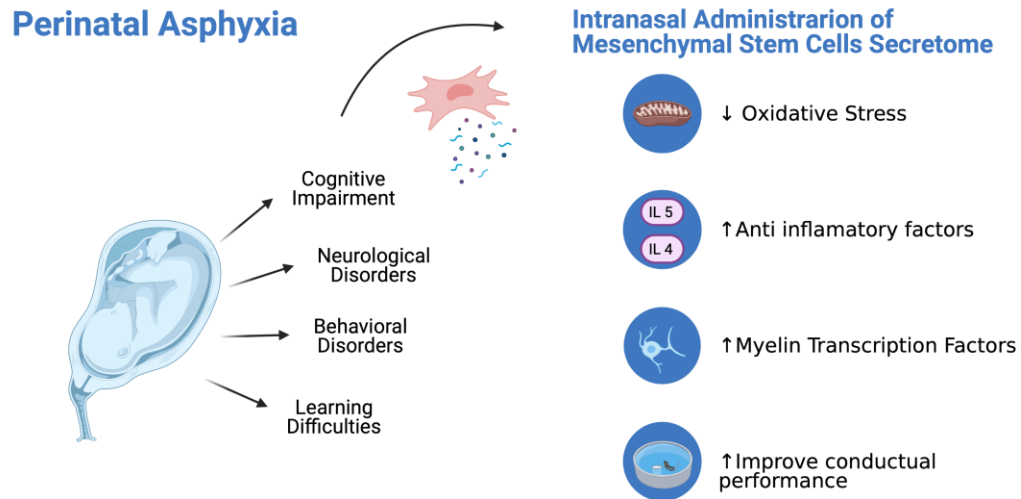


Figura 7. Esquema de los efectos producidos por la administración intranasal de secretoma derivado de MSC precondicionadas con DFX en la asfixia perinatal. (elaboración propia).

La presente tesis propone un estudio con relevancia traslacional, administrando por vía intranasal secretomas derivados de MSC humanas precondicionadas con DFX a ratas que han sido sometidas a asfixia perinatal, determinando sus efectos en el desarrollo de los oligodendrocitos y en la mielinización

Hipótesis

La asfixia perinatal disminuye la expresión de factores de transcripción involucrados en la generación y diferenciación de oligodendrocitos y mielinización en la sustancia blanca telencefálica, efecto que es revertido por la administración intranasal de secretoma derivado de células madre mesenquimales preconicionadas con deferroxamina.

Objetivo General

1. Evaluar el efecto de la asfixia perinatal sobre la expresión de factores de transcripción involucrados en la generación y diferenciación de oligodendrocitos y mielinización en la sustancia blanca telencefálica de ratas.
2. Determinar si la administración intranasal de secretoma derivado de células madre mesenquimales revierte la hipomielinización producida por la disminución de la expresión de factores de transcripción a causa de la asfixia perinatal en ratas.

Objetivos específicos

1. Evaluar la expresión de los factores de transcripción HIF1 α , Olig 1, ASCL1, y MOG involucrados en la oligodendrogénesis y diferenciación de oligodendrocitos en la sustancia blanca luego de PA, mediante RT-qPCR y Western blot a P1, P7 y P14.
2. Analizar el efecto de la PA en la mielinización y en los niveles de proteínas constituyentes de la mielina, i.e. MBP y PLP, mediante RT-qPCR y WB a P1, P7 y P14.
3. Determinar el efecto de la administración intranasal de secretoma derivado de MSC preconicionadas en las variables analizadas en los objetivos anteriores.



Metodología

Animales

Se utilizaron ratas albinas Wistar provenientes del bioterio del programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina, Santiago, Chile, los animales se mantuvieron en un ambiente con temperatura y humedad controlada con un ciclo de 12/12 h de luz/oscuridad, con acceso a agua y comida *ad libitum*.

Consideraciones éticas

Los procedimientos experimentales se enmarcan en el Proyecto FONDECYT 1190562 (PMR) y cuentan con la aprobación del Comité de Ética Local para experimentación con los animales del Laboratorio de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, (Protocolo CBA# 1058 FMUCH), y por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT).

Las MSC fueron obtenidas de tejido subcutáneo adiposo de mujeres sanas, posterior a una liposucción cosmética, después de firmar un consentimiento informado. Los protocolos fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Clínica Alemana-Universidad del Desarrollo (Protocolo 2015-40) y el Comité de Ética de la Facultad de Medicina. El monitoreo de los animales fue realizado siguiendo la pauta de ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) para reportar estudios en animales. (Ver anexo 1).

Modelo de Asfixia Perinatal

Se somete a eutanasia e histerectomía a ratas preñadas de término en el día gestacional 22. Algunos fetos son removidos de los cuernos uterinos y reanimados inmediatamente, constituyendo el grupo control no asfixiado. El resto de los fetos dentro de los cuernos uterinos son inmersos en un baño termorregulado a 37°C por 21 minutos. Luego de la asfixia, los fetos son removidos y liberados de los cuernos uterinos, estimulados manualmente a respirar. Posterior a 40 minutos de observación en un cojín térmico, los neonatos son evaluados con una escala APGAR adaptada para ratas. Esta escala evalúa parámetros como sobrevivencia, peso, color de la piel, vocalización, presencia de inspiraciones forzadas (gaspings), frecuencia respiratoria, rigidez muscular y movimientos espontáneos (Fig.7) (Herrera-Marschitz et al., 2014)



Model of Perinatal Asphyxia

Albino Wistar Rats

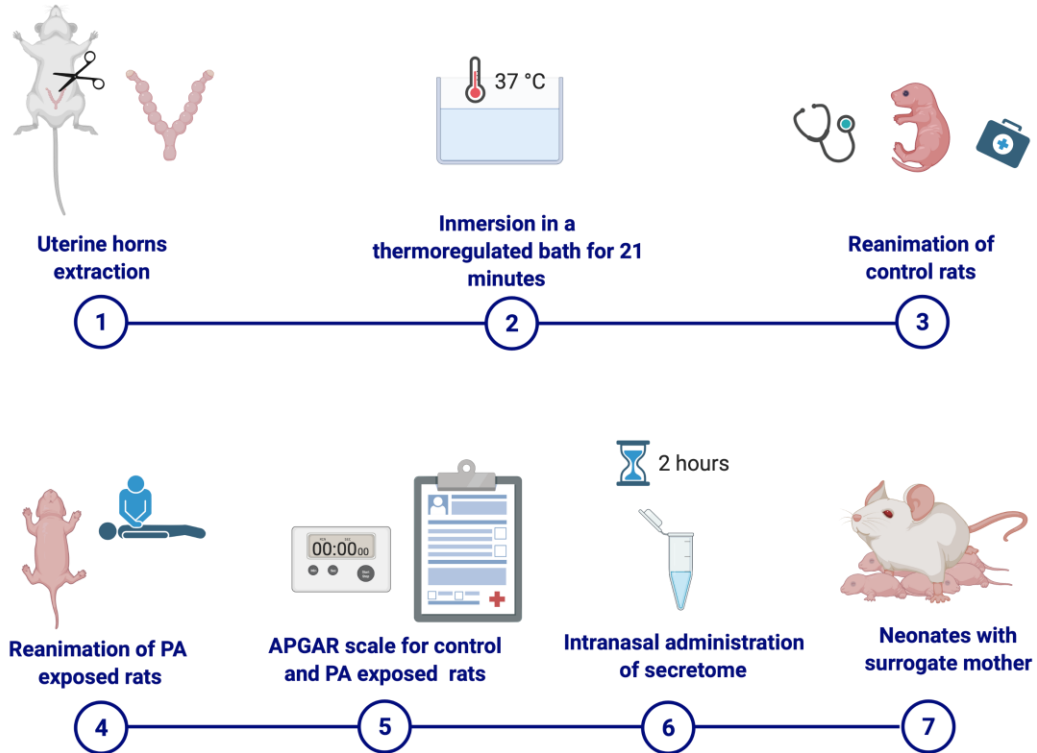


Figura 8. Modelo de Asfixia Perinatal en ratas.

Aislamiento y caracterización de las células madre mesenquimales humanas

Las células madre mesenquimales fueron aisladas de muestras de tejido adiposo subcutáneo (región abdominal) obtenidos mediante liposucción aspirativa de mujeres donantes sanas sometidas a liposucción cosmética en la Clínica Alemana de Chile, posterior a la firma de un consentimiento informado para la toma de muestras como se ha reportado previamente (Oses et al., 2017). Los protocolos usados fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad del Desarrollo. Después de dos subcultivos, las células adherentes se caracterizaron de acuerdo con su potencial de diferenciación adipogénico y osteogénico y por la presencia de marcadores característicos de MSC (CD29, CD13, CD105, CD73 y CD90) y por la ausencia de



marcadores característicos de otros linajes celulares (CD235a, CD31 y CD45) según se describe en Oses y cols., 2017.

Precondicionamiento de MSCs con Deferroxamina

Las MSC fueron cultivadas a una densidad de 7.000 células/ cm² en medio mínimo esencial (α -MEM) (Gibco, New Zealand), suplementadas con 10% de suero bovino fetal (FBS) (Gibco, New Zealand) y 0.16 mg/ml de gentamicina (Laboratorio Sanderson, Chile) a 37° C en 5% CO₂ atmosférico. Cuando las células alcanzaron el 70% de confluencia, se lavaron tres veces con PBS e incubaron por 48 h en α -MEM sin FBS suplementadas con 400 μ M DFX (Sigma-Aldrich, USA). Luego de la incubación con DFX, el medio condicionado de las MSC se obtuvo cosechando el medio de cultivo. Este medio se centrifugó a 400 g por 10 min para remover las células completas, y el sobrenadante se centrifugó otra vez a 5000 g por 20 min, para remover los restos celulares. Finalmente, el medio condicionado se filtró en filtros de 0.22 μ m y se concentró 10 veces usando filtros de 3 kDa (Millipore, USA). Para eliminar completamente el DFX del medio condicionado, los concentrados se lavaron dos veces con 15 ml de PBS y se reconcentraron utilizando el mismo tipo de filtros (De Gregorio et al., 2020).

Administración intranasal de secretoma derivados de MSC precondicionadas con Deferroxamina

Dos horas después del nacimiento se administró 6 μ g/16 μ l de secretoma, obtenidos de 2 x10⁵ células madre mesenquimales precondicionadas con DFX (MSC-S) o 16 μ l de vehículo (NaCl 0.9%), por vía intranasal a ratas expuestas a asfixia o a ratas controles. Se administró con intervalos de 1 μ L/5 min con una punta de micropipeta (p10) en lados alternativos de la cavidad nasal (ocho veces por cada fosa nasal). Posteriormente, los neonatos sobrevivientes se entregaron a una madre nodriza para su cuidado.



Eutanasia y obtención de muestras.

A P1, P7 o P14, las ratas fueron eutanasiadas mediante decapitación. Estudios previos han reportado que, en roedores, al primer y segundo día postnatal se expresan mayormente pre OLs, mientras que al día P7 aumenta la expresión de oligodendrocitos maduros. Al día 14 la mayoría de los oligodendrocitos se encuentra en un estado maduro del desarrollo (Dean et al., 2011) (Affeldt et al., 2017) (Peeples, 2018). Por esta razón se han escogido estos días post natales para los experimentos. Se disecó el cerebro rápidamente en PBS frío. En un corte coronal de telencéfalo se realizó una micro disección de la sustancia blanca (cuerpo caloso, cíngulo y cápsula externa) con *punches* de 0.5 a 1 mm de diámetro. Las muestras obtenidas se depositaron en tubos Eppendorf para ser congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta que fueron utilizados.

Extracción de Proteínas

Se utilizaron muestras de sustancia blanca del cuerpo caloso, cíngulo y cápsula externa para cada condición (control vehículo, asfixia vehículo, control secretoma y asfixia secretoma) a P1, P7 y P14. Cada muestra de sustancia blanca corresponde a un pool de 4 ratas a P1 y P7, resultando en 96 extracciones independientes de proteínas. Para la extracción se utilizó buffer RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 7.2, 0.15 M NaCl, 1.0 mM EDTA, 0.1% SDS, 1.0% Triton X-100, 1.0% deoxicolato de sodio) suplementado con inhibidor de fosfatasa y proteasas (1 mM orthovanadato de sodio, 1 mM PMSF, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM NaF, CALBIOCHEMset III EMD Biosciences Inc., USA; Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Los tejidos se homogeneizaron mediante un homogeneizador Kimble (Pellet Pestle, cat. 749540-0000, Sigma-Aldrich, EE. UU.) en 50 µL de RIPA. Posteriormente, se centrifugó a 14.000 rpm a 4°C y se recuperó el sobrenadante.

Cuantificación de Proteínas

La concentración de proteína total se determinó en una placa de 96 pocillos usando un kit de ensayo de ácido bicinónico (BCA) de Pierce (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EE. UU. Protein Assay Kit, cat. 23227). La absorbancia se midió a 562



nm en un lector de microplacas multimodo (Synergy HT Biotek Instruments, Inc., Winooski, VT, EE. UU.).

Western Blot

Las muestras se mezclaron con un tampón de carga (30% glicerol, 6% SDS, 15% DTT, 0.2% bromofenol azul y tampón Tris HCl 120 mM pH 6.8 Laemmli (Biorad) y posteriormente se calentaron a 95°C por 5 min.

La separación electroforética de proteínas se realizó en condiciones denaturantes en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 6% como gel concentrador y al 12% como gel separador. Las muestras (50 µg) se cargaron en cada pocillo del gel de poliacrilamida junto a un estándar de proteínas para comprobar el peso molecular.

Los geles se corrieron en las cámaras de Bio Rad con tampón de corrida (Tris 2,5 mM, SDS 10%, Glicina 19 mM). La electroforesis se realizó a un voltaje constante, de 20 a 80 V. La electro-transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa de poro 0,2 µm (BIORAD) se realizó en semi-seco en el equipo Trans-Blot Turo System (BIORAD) durante 10 minutos a 2,5 A; 25 V. Como control de transferencia se tiñó la membrana con Rojo Ponceau para verificar la presencia de proteínas. Posteriormente, la membrana se decoloró con TBS-Tween 0,1%.

Para bloquear las uniones no específicas se incubó la membrana con leche descremada al 5% (Bio-Rad, cat. 1706404, Hercules, CA, USA) en TBS 1X-tween 0,1% (TBS-T) por 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Luego se incubó con el anticuerpo primario respectivo diluido a la razón recomendada por el fabricante, en tampón de bloqueo, toda la noche a 4°C con agitación suave. Posteriormente a tres lavados por 5 min con una solución de TBS-T se incubó la membrana con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) en TBS-T por una hora a temperatura ambiente con agitación suave. Después de tres lavados con TBS-T por 5 min cada uno, la membrana se incubó con un reactivo quimio-luminiscente por 5 min (ELV, Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA) en oscuridad, durante distintos tiempos en un ChemiScope 3400 (ClinX Sciences Instruments Co, Ltd. Shanghai, China), utilizando el software Chemiocapture. Las imágenes se digitalizaron y procesaron mediante el software Fiji ImageJ (National Institutes of Health, EE. UU.) dividiendo la densidad óptica del anticuerpo de interés por la de la proteína normalizadora. Como proteínas



normalizadoras se utilizó β -actina. Los datos se presentan normalizados respecto al control vehículo.

Tabla 2 A.

Anticuerpo	Marca, Catálogo	Producido en	Clase	Aplicación	Dilución
Anti-MASH1/Achaete-scute homolog 1	Abcam, #74065	Rabbit	Policlonal	Western Blot	1:1.000
Anti-Olig1	Abcam, #124908	Rabbit	Monoclonal	Western Blot	1:1.000
Anti-MBP	Aves Lab, #2313550	Chicken	Policlonal	Western Blot	1:1.000
Anti-	Synaptic System, #251003	Rabbit	Policlonal	Western Blot	1:2.500

Tabla 2 B.

Anticuerpo Secundario	Marca, Catálogo	Producido en	Clase	Aplicación	Dilución
Anti rabbit	Invitrogen, #31460	Goat	Policlonal	Western Blot	1:10.000
Anti Chicken	Aves lab	Goat	Policlonal	Western Blot	1:7.500

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios. La información incluye marca, hospedador, clase (monoclonal o policlonal, aplicaciones y dilución estandarizada).



PCR en tiempo real

De las muestras de sustancia blanca (cuerpo caloso, cíngulo y cápsula externa) se extrajo el mRNA mediante el uso de 500 μ l de Trizol (Invitrogen). Las muestras se homogenizaron y luego de agregar 200 μ l de cloroformo, se centrifugaron a 12000 rcf a 4°C por 15 min. Se recuperó la fase acuosa a la que se le adicionó 500 μ l de isopropanol para precipitación del RNA. Luego de una centrifugación a 12000 rcf a 4°C por 10 min, el precipitado se lavó con etanol 70%, secando por 5 minutos, para luego ser re-suspendido en agua libre de nucleasas. A partir de 1 μ g de RNA obtenido en el proceso anterior, se realizó transcripción reversa utilizando el kit de Cat. 6005, 59 (Aligent Technologies) según las indicaciones del fabricante. A partir del DNA complementario (cDNA) obtenido, se realizó la reacción de qPCR en un termociclador en tiempo real (modelo Mx3000P, Stratagene) para detectar los transcritos de los genes expresados, usando partidores específicos (Integrated DNA Technologies) para los genes determinados, con amplificadores que variarán desde 85 a 210 pb empleando el Kit SYBR Green Real-Time PCR Master Mix (Invitrogen, cat. 4472908). Como control del ensayo se determinaron los niveles de expresión del gen constitutivo b-actina. Para el análisis de los datos se utilizó el método del $\Delta\Delta$ Ct (Livak & Schmittgen, 2001).

Análisis estadístico

Los valores se expresaron como promedio \pm el error estándar de las medias (SEM). El resultado número 1 es analizado mediante la prueba ANOVA de una vía para comparaciones múltiples, seguido por una prueba post hoc (Tukey).

Los datos de los resultados número 2 a 7 se analizaron mediante la prueba de ANOVA de dos vías para comparaciones múltiples, seguido por una prueba post hoc (Benjamini, Krieger and Yekutieli) mediante el programa GraphPad Prism 8 previa comprobación de la normalidad de los datos mediante la prueba Shapiro-Wilk. Los datos que no se distribuyen de forma normal, se les aplicó el test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido por el post hoc test Dunn's. Se consideró la probabilidad de error de un 5% para las diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Resultados

1. Efecto del desarrollo sobre los niveles de mRNA de factores de transcripción (OLIG1, ASCL1) y proteínas de mielina madura (MOG, PLP y MBP) evaluado en sustancia blanca cerebral mediante RT-qPCR en los días P1, P7 y P14 (Figura 8).

Al analizar el efecto del desarrollo en los niveles de mRNA de los distintos factores y proteínas de mielina en individuos controles en los días P1, P7 y P14, se observó que los niveles de mRNA de OLIG1 incrementa a través del tiempo, siendo significativamente mayor al día P14 en comparación al día P1 y P7. Su mayor expresión se observa a P14 (Fig. 9 A). ASCL1 se comporta distinto a los otros factores y proteínas. Este factor presenta su máxima expresión a P1, disminuyendo significativamente a P7, volviendo a incrementarse a P14 (Fig. 9 B). MOG a P1 presenta una expresión de mRNA muy baja y a P14 incrementa significativamente su expresión (Fig.9 C). La proteína PLP posee baja expresión a P1, aumentando significativamente su expresión a P7 para luego disminuir a P14 (Fig. 9 D). Por último, MBP posee niveles de expresión muy bajos a P1 y P7 que luego incrementan significativamente a P14 (Fig. 9 E).

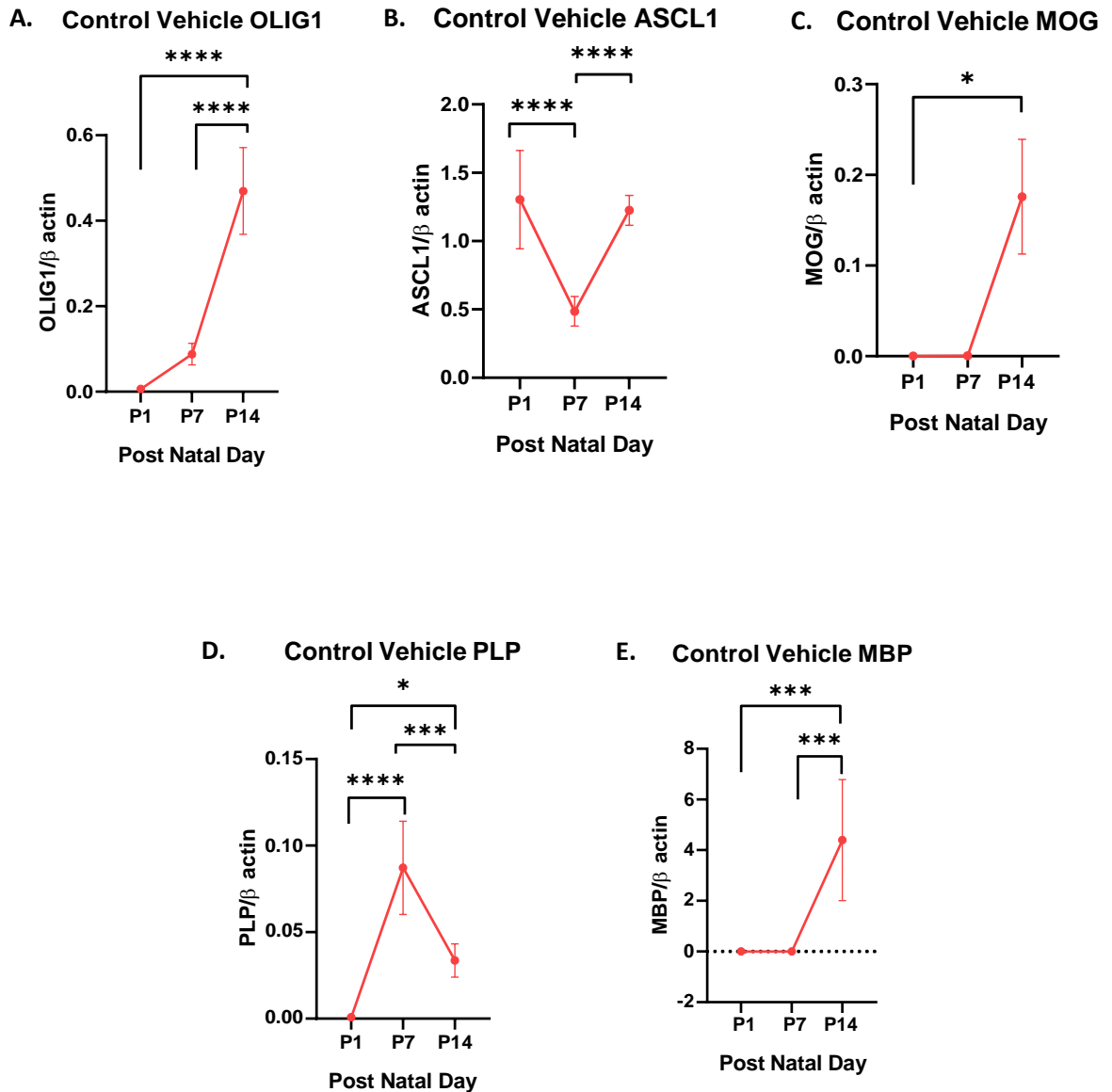


Figura 9. Efecto del desarrollo en individuos controles en los niveles de mRNA expresados como los promedios de gen de interés/ β -actina en los días P1, P7 y P14 (N=5-6 para cada grupo experimental). **(A)** OLIG1 **(B)** ASCL1 **(C)** MOG **(D)** PLP y **(E)** MBP. Los datos representan el promedio \pm SEM, (N=5-6 para cada grupo experimental). ANOVA una vía, seguido por el post hoc test Tukey, * $p < 0.05$.



2. Efecto de la PA y administración de MSC-S sobre los niveles de mRNA del factor de transcripción HIF1 α evaluado en sustancia blanca telencefálica por RT-qPCR al día P1 (Figura 9).

Los transcritos de genes fueron amplificados por RT-qPCR, cuantificados por el método $\Delta\Delta$ CT, usando β -actina como el gen normalizador. Los niveles de mRNA de cada gen estudiado son normalizados respecto a lo observado en los neonatos de la condición control vehículo graficándose como valor de cambio (fold/change). La figura 10 muestra los niveles de mRNA de HIF1 α monitoreados en la sustancia blanca telencefálica de ratas control y asfícticas tratadas con vehículo o MSC-S. La PA indujo un aumento significativo (~ 8 veces) en la expresión del mRNA de HIF1 α en comparación al grupo control. La administración de MSC-S no revirtió este efecto.

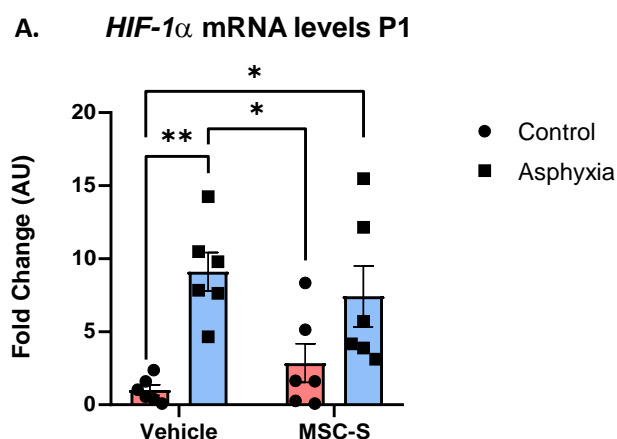


Figura 10. Niveles de mRNA de HIF1 α en sustancia blanca telencefálica de ratas controles y asfícticas con administración intranasal de vehículo o MSC-S, evaluados a P1 mediante RT-qPCR. Los datos se presentan como valor de cambio (Fold Change) con relación al gen β Actina normalizados a niveles del grupo control. Los datos representan el promedio \pm SEM, C.Vhc y C.MSC-S (barras rojas), A.Vhc y A.MSC-S (barras azules). N=6 de cada grupo experimental. ANOVA de dos vías, seguido por el post-hoc test Benjamini, Krieger and Yekutieli, * $p < 0.05$.



3. Efecto de la PA y administración de MSC-S sobre los niveles de mRNA y proteína del factor de transcripción OLIG1 evaluado en sustancia blanca telencefálica por RT-qPCR a P1, P7 y P14; y WB al día P7 (Figura 11).

En la figura 11 se evalúan los niveles de mRNA del factor de transcripción OLIG1 a P1 (Fig. 11A), P7 (Fig. 11. B) y P14 (Fig. 11. C) monitoreados en la sustancia blanca telencefálica de ratas control y asfíctica tratadas con vehículo o MSC-S. Al comparar los grupos no se observan diferencias significativas en los niveles de mRNA de OLIG1 entre las diferentes condiciones experimentales a P1, P7 ni a P14. Al analizar el nivel de proteína OLIG1 a P7 mediante WB, tampoco se observaron diferencias en ninguna de las condiciones experimentales analizadas (Fig. 11D y E).

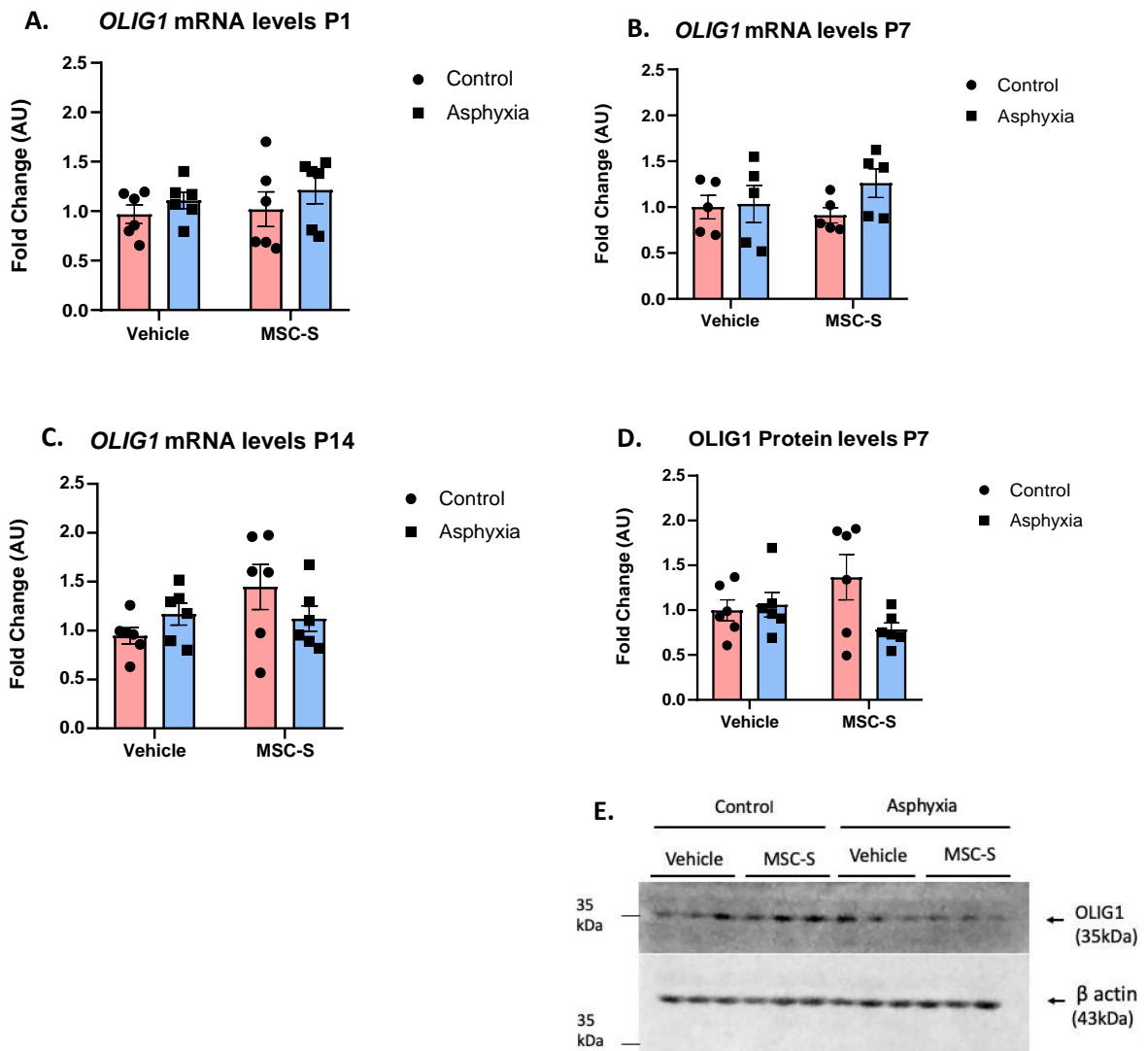


Figura 11. Niveles de mRNA y proteína de OLIG1 determinados por análisis cuantitativo de RT-qPCR y Western Blot. Los datos se presentan como valor de cambio de OLIG1/ gen normalizador en relación a los niveles del grupo control a P1 (A), P7(B) y P14(C). (D). Niveles de proteínas de OLIG1 en la sustancia blanca telencefálica a P7 evaluada por WB. Los datos son presentados como la razón OLIG1/ β -actina, normalizado a los niveles del grupo control vehículo. (E). Muestra una imagen representativa de WB de OLIG 1 (35 kDa) y su correspondiente proteína normalizadora β -actina (42 kDa). Los datos representan el promedio \pm SEM, N =6 en cada grupo experimental. En el WB cada punto corresponde a un pool de 4 sujetos de cada grupo experimental. ANOVA dos vías, seguido por el post hoc test Benjamini, Krieger and Yekutieli, * $p < 0.05$.

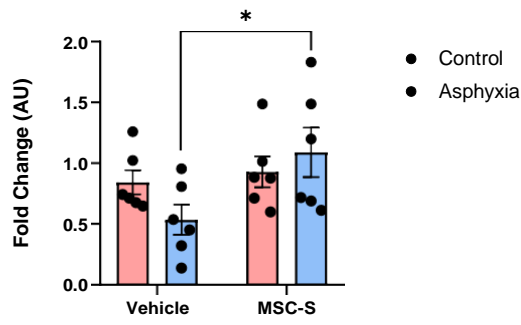
4. Efecto de la PA y de la administración de MSC-S sobre los niveles de mRNA y proteínas del factor de transcripción ASCL1 evaluado en sustancia blanca cerebral por RT-qPCR en el día P1 y Western Blot a P1, P7 y P14 (Figura 12).

En la figura 12 A se observa la expresión de mRNA de ASCL1 a P1, observándose que la PA disminuye su expresión y que la administración de MSC-S revierte esta disminución (Fig.12 A).

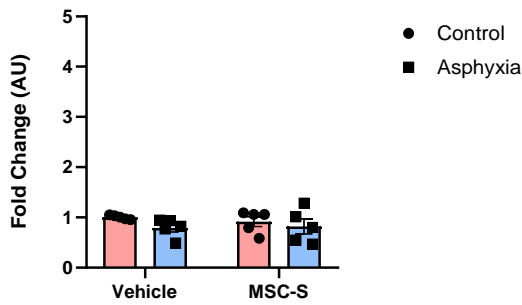
Los resultados del WB muestran que los niveles de ASCL1 no se ven afectados por la PA ni por el tratamiento con MSC-S al día P1 (Fig. 12 B y C). A P7 no se observa diferencia entre el control y asfixia vehículo, sin embargo, la administración de MSC-S a ratas con PA induce un aumento significativo de proteínas de ASCL1 en comparación a los grupos control y asfixia tratados con vehículo (Fig. 12 D y E). A P14 desaparecen las diferencias en los niveles de ASCL1 entre los grupos, manteniéndose el incremento de ASCL1 en las ratas con PA tratados con MSC-S.



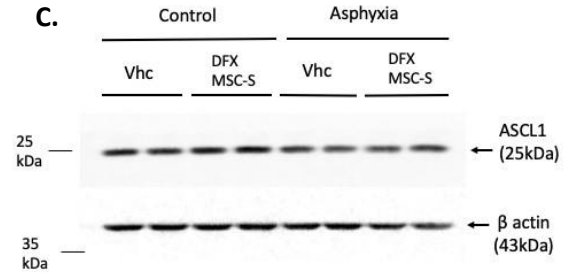
A. ASCL1 mRNA levels P1



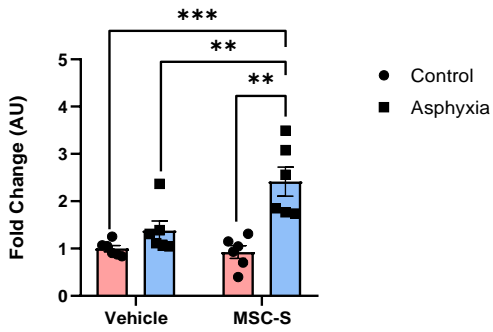
B. ASCL1 Protein levels P1



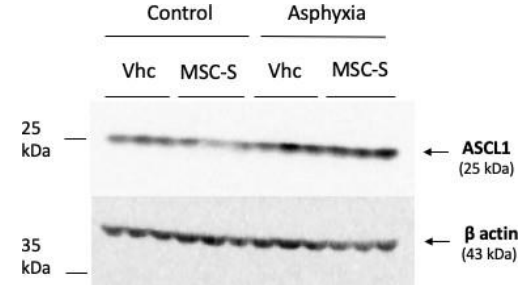
C.



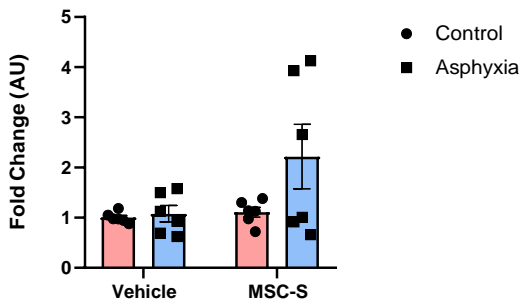
D. ASCL1 Protein levels P7



E.



F. ASCL1 Protein levels P14



G.

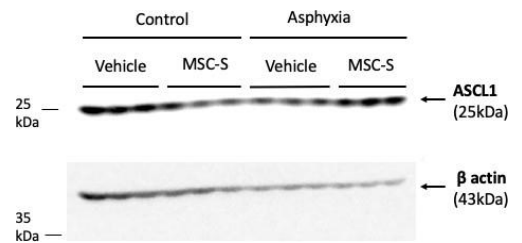


Figura 12 (A). Niveles de mRNA de ASCL1 determinados por análisis cuantitativo de RT-qPCR a P1. Los datos se presentan como valor de cambio (Fold Change) en relación con la expresión del gen housekeeping, normalizados a niveles del grupo control. Niveles de expresión de proteínas de ASCL1 en la sustancia blanca cerebral a P1 **(B)**, P7 **(D)** y P14 **(F)** evaluada por WB. Los datos son presentados como la razón ASCL1/ β -actina, normalizado a los niveles del grupo control vehículo. Se muestra una imagen representativa de WB de ASCL1 (25 kDa) y su correspondiente proteína normalizadora β -actina (42 kDa) a P1 **(C)**; P7 **(E)** y a P14 **(G)**.

Los datos se representan como el promedio \pm SEM, N=5-6 para cada grupo experimental, ANOVA de dos vías, seguido por el post-hoc test Benjamini, Krieger and Yekutieli, * $p < 0.05$ para **(A)**, **(B)** y **(D)** y Kruskal-Wallis, seguido por el post-hoc test Dunn`s, * $p < 0.05$ para **(F)**.

5. Efecto de la PA y de la administración de MSC-S sobre los niveles de mRNA de MOG evaluado en sustancia blanca telencefálica mediante RT-qPCR a P1, P7 y P14 (Figura 13).

Los resultados del nivel de expresión de mRNA de MOG a P1 muestran que la PA produce un aumento de aproximadamente 4 veces a P7 y de aproximadamente >5 mil veces a P14 en comparación al grupo control vehículo, aunque esta diferencia no alcanzó significancia estadística. En la figura 13 A se observa que existe un incremento de expresión de mRNA en el grupo sometido a PA con la administración de MSC-S, comparado con el grupo control vehículo. A P7 y P14 no se observan diferencias en la expresión de mRNA de MOG entre los grupos (Figura 13 B y C).

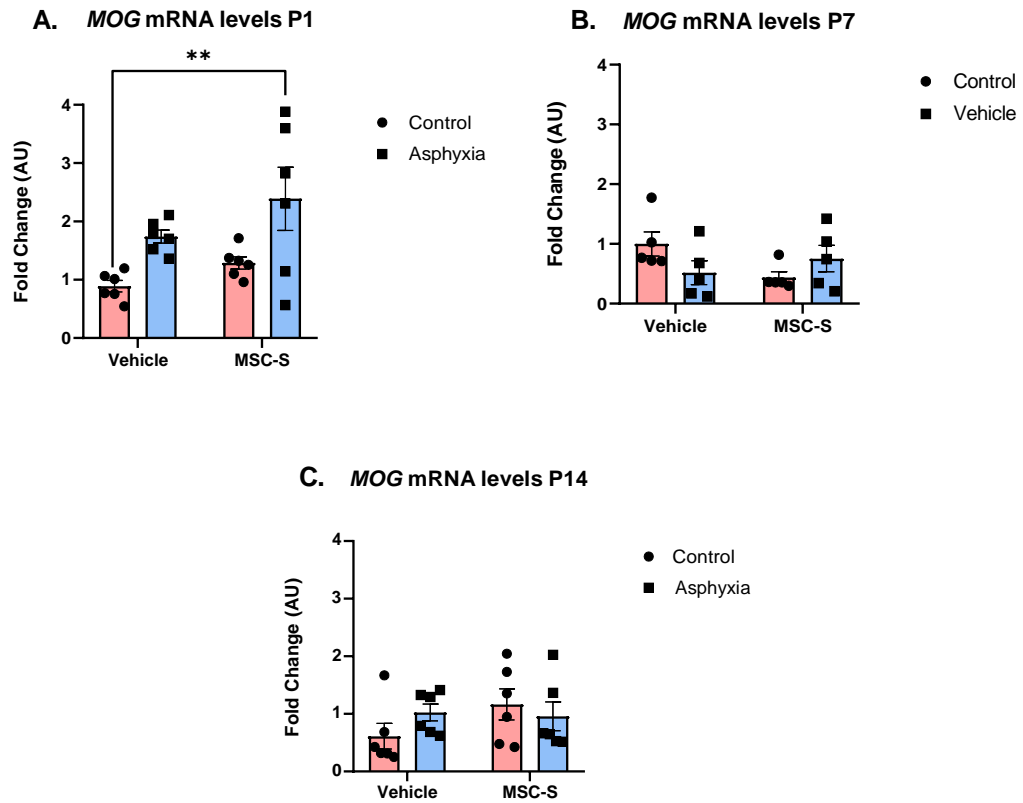


Figura 13 (A, B, C). Niveles de mRNA de MOG determinados mediante análisis cuantitativo de RT-qPCR a P1 (A), P7 (B) y P14 (C). Los datos se presentan como valor de cambio (Fold Change) en relación con la expresión del gen housekeeping, normalizados a niveles del grupo control. Los datos representan el promedio \pm SEM, N=5-6 para cada grupo experimental. ANOVA de dos vías, seguido por el post-hoc test Benjamini, Krieger and Yekutieli, * $p < 0.05$.



6. Efecto de la PA y de la administración de MSC-S sobre los niveles de mRNA de PLP evaluado en sustancia blanca cerebral mediante RT-qPCR a P1, P7 y P14 (Figura 14).

Al analizar los niveles de expresión de mRNA de PLP se observa que la PA y la administración de MSC-S no tiene un efecto significativo en los días P1, P7 ni P14 en la sustancia blanca cerebral.

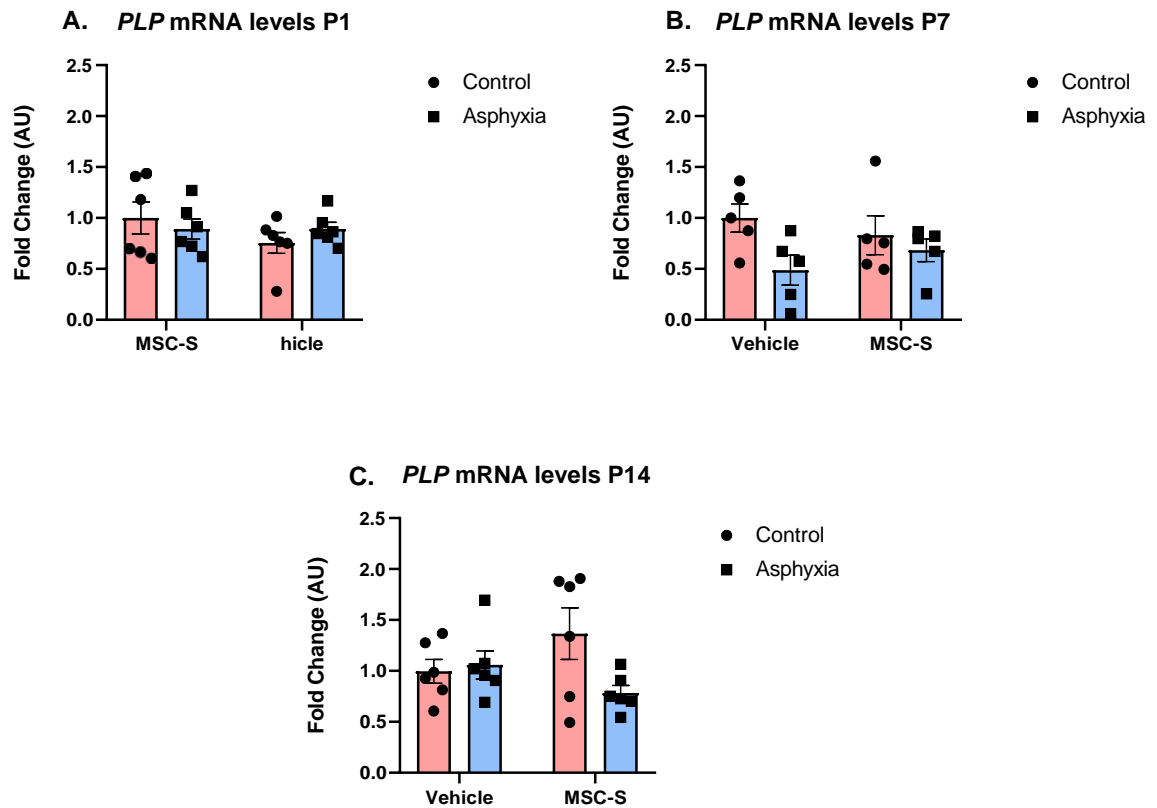


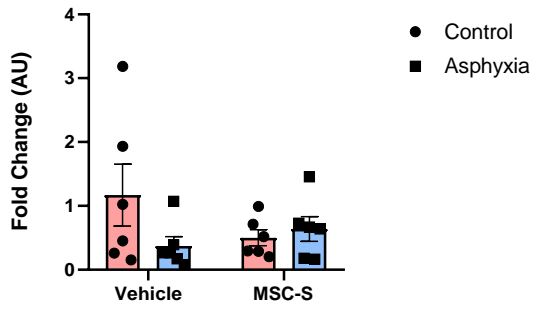
Figura 14 (A, B, C). Niveles de mRNA de PLP determinados mediante análisis cuantitativo de RT-qPCR a P1, P7 y P14. Los datos se presentan como valor de cambio (Fold Change) en relación con la expresión del gen housekeeping, normalizados a niveles del grupo control. Los datos representan el promedio \pm SEM, N=6 para cada grupo experimental. ANOVA de dos vías, seguido por el post-hoc test Benjamini, Krieger and Yekutieli, * $p < 0.05$.



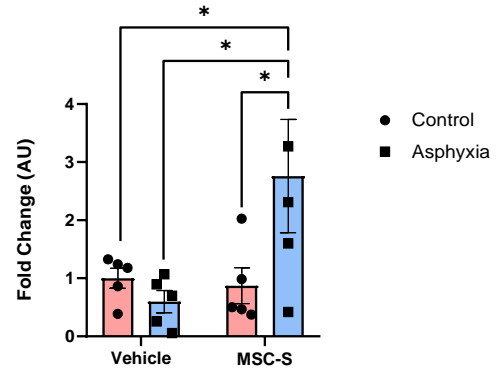
7. Efecto de PA y de la administración de MSC-S sobre los niveles de mRNA y proteínas del MBP evaluado en sustancia blanca cerebral mediante RT-qPCR a P1, P7 y P14; y Western Blot a P7 y P14 (Figura 15).

Al analizar los niveles de mRNA de MBP, se observa que la PA produce una disminución en la expresión de esta proteína en comparación al grupo control a P1 y P7 (Fig. 15 A y B). La administración de MSC-S produce un leve aumento no significativo en el grupo sometido a PA a P1 (Fig. 15 A), el cual se incrementa a valores significativos estadísticamente a P7 (Fig.15 B), en comparación al grupo control vehículo. A P14 no se observan diferencias en la expresión de MBP entre los distintos grupos (Fig. 15 C). Los resultados de expresión de proteína obtenidos por WB, indican que a P7 no se observan diferencias en MBP entre los grupos (Fig.15 D), sin embargo, a P14 se evidencia un aumento de la proteína en el grupo control con administración de MSC-S, individuos sometidos a PA y sometidos a PA con administración de MSC-S (Fig.15 E).

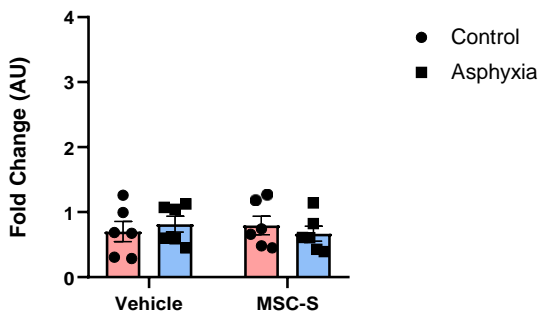
A. MBP mRNA levels P1



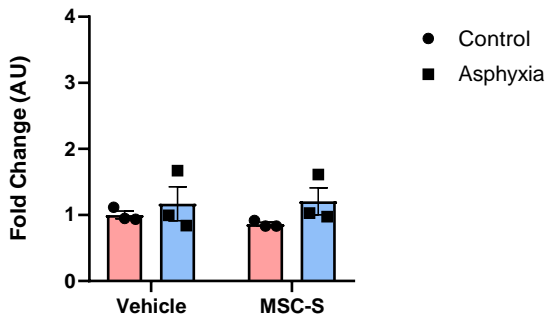
B. MBP mRNA levels P7



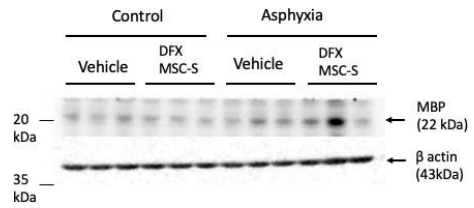
C. MBP mRNA levels P14



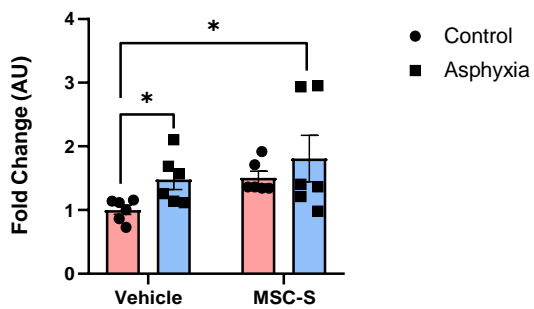
D. MBP Protein levels P7



E.



F. MBP Protein levels P14



G.

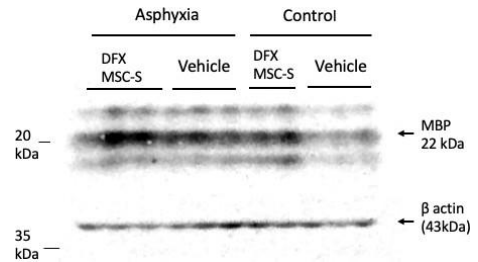


Figura 15 (A, B, C). Niveles de mRNA de MBP determinados mediante análisis cuantitativo de RT-qPCR a P1 **(A)**, P7 **(B)** y P14 **(C)**. Los datos se presentan como valor de cambio (Fold Change) en relación con la expresión del gen housekeeping, normalizados a niveles del grupo control. Niveles de expresión de proteínas de MBP en la sustancia blanca cerebral a P7 **(D)** y P14 **(F)** evaluada por WB. Los datos son presentados como la razón MBP/ β -actina, normalizado a los niveles del grupo control vehículo. Se muestra una imagen representativa de WB de MBP (22 kDa) y su correspondiente proteína normalizadora β -actina (42 kDa) a P7 **(E)** y a P14 **(G)**. Los datos son presentados como proporciones porcentuales de MBP/ β -actin, en relación con los niveles del grupo control vehículo. Los datos se representan como el promedio \pm SEM, N= 5-6 para cada grupo experimental, ANOVA de dos vías, seguido por el post-hoc test Benjamini, Krieger and Yekutieli, * $p < 0.05$ para qPCR y Kruskal-Wallis, seguido por el post-hoc test Dunn`s, * $p < 0.05$.

Discusión

La mielina favorece de gran manera la velocidad de la comunicación eléctrica entre las neuronas y es sintetizada por los OLs en el SNC, de los cuales la mayoría se desarrolla durante las primeras 6 semanas postnatal en roedores (Dean et al., 2011). Durante el desarrollo, los OPC se generan en múltiples olas, en distintas regiones cerebrales. Por la acción de diversos factores de transcripción, eventualmente la mayoría de los OPC se diferencian en OLs maduros para mielinizar axones neuronales. En este estudio se investigó la expresión de factores de transcripción en el desarrollo post natal en ratas, ya que se ha evidenciado que una alteración en los niveles de estos factores lleva a una mielinización retardada en sustancia blanca telencefálica (Affeldt et al., 2017). En este estudio se observó que OLIG1, MOG y MBP presentan baja expresión a P1, incrementando sus niveles, hasta alcanzar una máxima expresión a P14. ASCL1 se comporta muy diferentemente, con una máxima expresión a P1, disminuyendo a P7, re-aumentando a P14, lo que podría explicarse porque ASCL1 favorece la diferenciación de OLs en periodos tempranos del desarrollo (Nakatani et al., 2013). En este caso sería a P1. El presente estudio utiliza ratas controles nacidas por cesárea, ya que si bien se han evidenciado diferencias entre bebés humanos nacidos por cesárea y parto natural, en una investigación realizada por Dell'Anna, no se encontraron diferencias significativas entre ratas nacidas por cesárea y de forma espontánea evaluando muerte celular en distintos periodos del desarrollo (Dell'Anna et al., 1997).

Estudios en roedores han revelado que la mielinización es un proceso muy dinámico, generándose una gran cantidad de OPCs para compensar la pérdida de OLs frente a posibles injurias en el SNC (Kessar et al., 2006); (Viganò et al., 2016). El desarrollo adecuado de los OLs contribuye a la plasticidad neural, mejorando diversas funciones cognitivas como la memoria y el aprendizaje motor (McKenzie et al., 2014). El CNS es vulnerable a la hipoxia reoxigenación, en particular al momento del parto. La PA genera una alteración metabólica durante el periodo de mayor desarrollo de la mielina (Cheng et al. 2014), lo cual altera la mielinización, y como consecuencia el neonato desarrolla alteraciones en el sistema nervioso, a corto y largo plazo, tales como parálisis cerebral, déficit atencional, déficit cognitivo, trastornos del aprendizaje, entre otros (Back & Miller, 2014). En este estudio se investigó el efecto de la PA en factores de transcripción que participan en el desarrollo de los OLs. Los presentes resultados



indican que la PA incrementó significativamente la expresión del mRNA de HIF1 α en la sustancia blanca de ratas sometidas a hipoxia en comparación a ratas controles, lo que indica que HIF α es un regulador clave del SNC durante el desarrollo, lo que permite que los OLs se adapten a señales hipóxicas, fisiológicas y patológicas. Se sugiere que HIF α actuaría como un regulador celular que controla la diferenciación de OPC durante la mielinización del SNC (Zhang et al., 2021). En el SNC humano, la diferenciación de los OLs formadores de mielina a partir de los OPC se inicia en el tercer trimestre de la edad gestacional y alcanza su punto máximo durante el primeros años después del nacimiento. En el SNC murino, la diferenciación y mielinización de OPC ocurre principalmente durante el desarrollo posnatal (Semple et al., 2013). Se ha descrito que la proteína HIF1 α se estabiliza en OLs de la sustancia blanca de ratones prematuros y se reduce a un nivel indetectable alrededor del P10 en condiciones normales (Zhang et al., 2021). Así, la actividad fisiológica de HIF α puede ser beneficiosa para la diferenciación de OPC y el desarrollo de la mielinización, mientras que la hiperactividad patológica de HIF α puede ser perjudicial (Guo et al 2022). Se ha reportado que la acumulación de HIF1 α detiene la diferenciación temprana de OPC, retrasando la formación de OLs (Allan et al., 2021), lo cual tiene implicancias para numerosas patologías de la sustancia blanca provocadas por hipoxia, tales como el daño difuso de la sustancia blanca del prematuro (Salmaso et al., 2014), accidentes cerebrovasculares en adultos (Hankey, 2016) y esclerosis múltiple (Graumann et al., 2003). Recientemente, se demostró que la respuesta frente a la translocación de HIF1 α al núcleo durante hipoxia, es la disminución del factor Sox 10 en OPCs, inhibiendo la diferenciación de OLs en la sustancia blanca cerebral (Allan et al., 2021). Como se ha descrito, las evidencias respecto a HIF1 α y el desarrollo de OLs es diversa por lo que es necesario realizar futuros experimentos para conocer el rol de este factor en el presente modelo.

En cuanto a los otros factores de transcripción estudiados, se observó que la PA tiene un efecto en los niveles de mRNA de ASCL1, disminuyendo su expresión a P1. La PA también produjo una disminución de MOG y PLP a P7.

Se ha sugerido que los efectos beneficiosos del MSC-S precondicionado con DFX se debe a su capacidad de entregar factores de transcripción que actúan en células blanco, permitiendo la activación de vías anti apoptóticas y pro sobre vida que resultan en una mejor reparación tisular y regeneración (Eleuteri & Fierabracci, 2019).



Además, su pre condicionamiento estimula propiedades funcionales que modifican el contenido y efecto terapéutico del secretoma (Harrell et al., 2019). Es así como este estudio demuestra que la administración intranasal de MSC-S pre condicionadas con DFX ejerce un efecto sobre distintos factores de transcripción, los cuales producen a su vez un aumento en la mielinización de la sustancia blanca cerebral en el presente modelo de PA en ratas.

En el presente estudio se observó que la administración de MSC-S tuvo un efecto importante en el factor de transcripción ASCL1, ya que a nivel de mRNA incrementó su expresión en comparación a individuos asfícticos tratados con vehículo a P1. En cuanto a las proteínas, la administración de MSC-S aumentó la expresión de ASCL1a P7 en sujetos asfícticos, en comparación al grupo asfixia y controles tratados con vehículo. Respecto del rol de ASCL1, se ha descrito que este factor regula positivamente la especificación de OPC en la zona subventricular y el balance entre su diferenciación y proliferación (Nakatani et al., 2013). En el presente estudio se observó que la administración de MSC-S aumenta la expresión de ASCL1 en la sustancia blanca telencefálica, por lo que favorecería la diferenciación de OLs en periodos tempranos del desarrollo.

Respecto a las proteínas que componen la mielina madura, en este estudio encontramos que la administración de MSC-S produjo un aumento de mRNA de MBP en el grupo asfíctico, revirtiendo la disminución producida por la PA a P7. Respecto a los niveles de proteína, se observó que la administración de MSC-S incrementó los niveles de la proteína de MBP en el grupo asfíctico en comparación al control vehículo a P14. Es interesante observar que el grupo sometido a PA presenta niveles similares de proteína de MBP que el grupo control, dejando la pregunta si la PA afecta la calidad de la mielina madura y no sus niveles a P14. En cuanto a PLP, la administración de MSC-S no afecta la expresión de mRNA a P1, P7 ni P14. Respecto a MOG, se observó que a P1 aumentó la expresión de mRNA en el grupo asfíctico en comparación al grupo control, pero la PA no tuvo un efecto los niveles de esta proteína. Otro aspecto interesante para investigar en futuros estudios es la comunicación entre el OL y la neurona. Se podría analizar si la PA produce un daño en los axones neuronales, lo que afectaría directamente la mielinización, ya que el OL sólo produce mielina cuando el axón neuronal está indemne (Morrison et al., 2013).

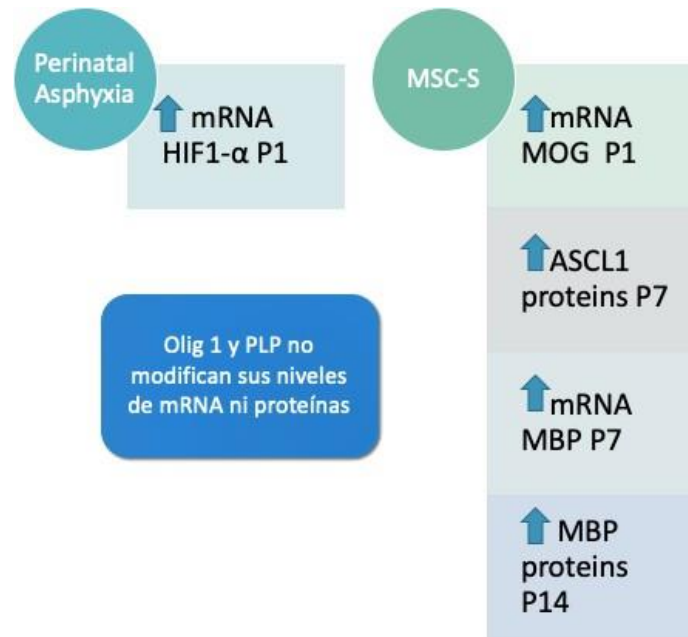


Figura 4. Esquema de los efectos de la PA y administración de MSC-S precondicionado con DFX (elaboración propia).

Conclusiones

En conclusión, la diferenciación de OLs en la sustancia blanca telencefálica es un proceso complejo que se ve alterado por PA. En el modelo de PA en ratas, se encontró que la PA indujo en el cuerpo caloso, cíngulo y cápsula externa (i) alteraciones en los factores transcripción HIF1 α ; ASCL1; y proteínas de mielina como MPB (ii) La administración intranasal temprana de secretomas derivados de MSC precondicionadas con DFX revirtió los efectos de la PA en ASCL1 y MBP sugiriendo una mejora en la mielinización en la sustancia blanca telencefálica.

Se propone continuar investigando las propiedades regenerativas y reparadoras de MSC-S para constituirse en una alternativa de un tratamiento clínico en la condición de PA.



Referencias Bibliográficas

- Affeldt, B. M., Obenaus, A., Chan, J., & Pardo, A. C. (2017). Region specific oligodendrocyte transcription factor expression in a model of neonatal hypoxic injury. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 61(January), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2017.05.001>
- Allan, K. C., Hu, L. R., Scavuzzo, M. A., Morton, A. R., Gevorgyan, A. S., Cohn, E. F., Clayton, B. L. L., Bederman, I. R., Hung, S., Bartels, C. F., Madhavan, M., & Tesar, P. J. (2021). Non-canonical Targets of HIF1a Impair Oligodendrocyte Progenitor Cell Function. *Cell Stem Cell*, 28(2), 257-272.e11. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.09.019>
- Back, S. A. (2017). White matter injury in the preterm infant: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathologica*, 134(3), 331–349. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1718-6>
- Back, S. A., & Miller, S. P. (2014). Brain injury in premature neonates: A primary cerebral dysmaturation disorder? *Annals of Neurology*, 75(4), 469–486. <https://doi.org/10.1002/ana.24132>
- Bhatti, A., & Kumar, P. (2014). Systemic effects of perinatal asphyxia. In *Indian Journal of Pediatrics*. <https://doi.org/10.1007/s12098-013-1328-9>
- Bogatcheva, N. V., & Coleman, M. E. (2019). Conditioned Medium of Mesenchymal Stromal Cells: A New Class of Therapeutics. *Biochemistry (Moscow)*, 84(11), 1375–1389. <https://doi.org/10.1134/S0006297919110129>
- Cai, J., Zhu, Q., Zheng, K., Li, H., Qi, Y., Cao, Q., & Qiu, M. (2010). Co-localization of Nkx6.2 and Nkx2.2 homeodomain proteins in differentiated myelinating oligodendrocytes. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.20937>
- Cassavaugh, J., & Lounsbury, K. M. (2011). Hypoxia-mediated biological control. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(3), 735–744. <https://doi.org/10.1002/jcb.22956>
- Castillo-Melendez, M., Yawno, T., Jenkin, G., & Miller, S. L. (2013). Stem cell therapy to protect and repair the developing brain: A review of mechanisms of action of cord blood and amnion epithelial derived cells. In *Frontiers in Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00194>



- Chakkarapani, A. A., Aly, H., Benders, M., Cotten, C. M., El-Dib, M., Gressens, P., Hagberg, H., Sabir, H., Wintermark, P., & Robertson, N. J. (2021). Therapies for neonatal encephalopathy: Targeting the latent, secondary and tertiary phases of evolving brain injury. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 26(June).
<https://doi.org/10.1016/j.siny.2021.101256>
- Cheng, T., Xue, X., & Fu, J. (2015). Effect of OLIG1 on the development of oligodendrocytes and myelination in a neonatal rat PVL model induced by hypoxia-ischemia. *Molecular Medicine Reports*, 11(4), 2379–2386.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2014.3028>
- Choudhry, H., & Harris, A. L. (2018). Advances in Hypoxia-Inducible Factor Biology. *Cell Metabolism*, 27(2), 281–298. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.10.005>
- David, B. T., Coutts, D. J. C., Curtin, J. J., Brown, J. L., Boles, N. C., & Hill, C. E. (2021). Treatment with hypoxia-mimetics protects cultured rat Schwann cells against oxidative stress-induced cell death trials. *September 2020*, 1–20.
<https://doi.org/10.1002/glia.24019>
- David, B. T., Curtin, J. J., Brown, J. L., Coutts, D. J. C., Boles, N. C., & Hill, C. E. (2021). Treatment with hypoxia-mimetics protects cultured rat Schwann cells against oxidative stress-induced cell death. *Glia*, 69(9), 2215–2234.
<https://doi.org/10.1002/glia.24019>
- De Gregorio, C., Contador, D., Díaz, D., Cárcamo, C., Santapau, D., Lobos-Gonzalez, L., Acosta, C., Campero, M., Carpio, D., Gabriele, C., Gaspari, M., Aliaga-Tobar, V., Maracaja-Coutinho, V., Ezquer, M., & Ezquer, F. (2020). Human adipose-derived mesenchymal stem cell-conditioned medium ameliorates polyneuropathy and foot ulceration in diabetic BKS db/db mice. *Stem Cell Research and Therapy*, 11(1), 1–21.
<https://doi.org/10.1186/s13287-020-01680-0>
- Dean, J. M., Moravec, M. D., Grafe, M., Abend, N., Ren, J., Gong, X., Volpe, J. J., Jensen, F. E., Hohimer, A. R., & Back, S. A. (2011). Strain-specific differences in perinatal rodent oligodendrocyte lineage progression and its correlation with human. *Developmental Neuroscience*, 33(3–4), 251–260. <https://doi.org/10.1159/000327242>
- Dell'Anna, E., Chen, Y., Engidawork, E., Andersson, K., Lubec, G., Luthman, J., &



Herrera-Marschitz, M. (1997). Delayed neuronal death following perinatal asphyxia in rat. *Experimental Brain Research*, 115(1), 105–115.

<https://doi.org/10.1007/PL00005670>

Douglas-Escobar, M., & Weiss, M. D. (2015). Hypoxic-Ischemic Encephalopathy A Review for the Clinician. *JAMA Pediatrics*, 169(4), 397–403.

<https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2014.3269>

Drago, D., Cossetti, C., Iraci, N., Gaude, E., Musco, G., Bachi, A., & Pluchino, S. (2013).

The stem cell secretome and its role in brain repair. *Biochimie*, 95(12), 2271–2285.

<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.06.020>

Elbaz, B., & Popko, B. (2019). Molecular Control of Oligodendrocyte Development. *Trends in Neurosciences*, 42(4), 263–277.

<https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.01.002>

Eleuteri, S., & Fierabracci, A. (2019). Insights into the secretome of mesenchymal stem cells and its potential applications. *International Journal of Molecular Sciences*,

20(18). <https://doi.org/10.3390/ijms20184597>

Ezquer, F., Quintanilla, M. E., Morales, P., Santapau, D., Ezquer, M., Kogan, M. J., Salas-Huenuleo, E., Herrera-Marschitz, M., & Israel, Y. (2019). Intranasal delivery of mesenchymal stem cell-derived exosomes reduces oxidative stress and markedly inhibits ethanol consumption and post-deprivation relapse drinking. *Addiction Biology*,

24(5), 994–1007. <https://doi.org/10.1111/adb.12675>

Farfán, N., Carril, J., Redel, M., Zamorano, M., Araya, M., Monzón, E., Alvarado, R., Contreras, N., Tapia-Bustos, A., Quintanilla, M. E., Ezquer, F., Valdés, J. L., Israel, Y., Herrera-Marschitz, M., & Morales, P. (2020). Intranasal administration of mesenchymal stem cell secretome reduces hippocampal oxidative stress, neuroinflammation and cell death, improving the behavioral outcome following perinatal asphyxia. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 1–27.

<https://doi.org/10.3390/ijms21207800>

Giussani, D. A. (2016). The fetal brain sparing response to hypoxia: Physiological mechanisms. *Journal of Physiology*, 594(5), 1215–1230.

<https://doi.org/10.1113/JP271099>

Graumann, U., Reynolds, R., Steck, A. J., & Schaeren-Wiemers, N. (2003). Molecular



Changes in Normal Appearing White Matter in Multiple Sclerosis are Characteristic of Neuroprotective Mechanisms Against Hypoxic Insult. *Brain Pathology*, 13(4), 554–573. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2003.tb00485.x>

Hankey, G. J. (2016). *Seminar Stroke*. 6736(16), 1–14.

Harrell, C., Fellabaum, C., Jovicic, N., Djonov, V., Arsenijevic, N., & Volarevic, V. (2019). Molecular Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome. *Cells*, 8(5), 467. <https://doi.org/10.3390/cells8050467>

Heirani-Tabasi, A., Mirahmadi, M., Mishan, M. A., Naderi-Meshkin, H., Toosi, S., Matin, M. M., Bidkhori, H. R., & Bahrami, A. R. (2020). Comparison the effects of hypoxia-mimicking agents on migration-related signaling pathways in mesenchymal stem cells. *Cell and Tissue Banking*, 21(4), 643–653. <https://doi.org/10.1007/s10561-020-09851-2>

Herrera-Marschitz, M., Neira-Pena, T., Rojas-Mancilla, E., Espina-Marchant, P., Esmar, D., Perez, R., Muñoz, V., Gutierrez-Hernandez, M., Rivera, B., Simola, N., Bustamante, D., Morales, P., & Gebicke-Haerter, P. J. (2014). Perinatal asphyxia: CNS development and deficits with delayed onset. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(MAR), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00047>

Hopper, K. D. (1990). Magnetic Resonance of Myelin, Myelination, and Myelin Disorders. In *Radiology* (Vol. 175, Issue 2). <https://doi.org/10.1148/radiology.175.2.442>

Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Von Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., & Ratcliffe, P. J. (2001). Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, 292(5516), 468–472. <https://doi.org/10.1126/science.1059796>

Jablonska, B., Scafidi, J., Aguirre, A., Vaccarino, F., Nguyen, V., Borok, E., Horvath, T. L., Rowitch, D. H., & Gallo, V. (2012). Oligodendrocyte regeneration after neonatal hypoxia requires FoXo1-mediated p27kip1 expression. *Journal of Neuroscience*, 32(42), 14775–14793. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2060-12.2012>

Kaelin, W. G., & Ratcliffe, P. J. (2008). Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway. *Molecular Cell*, 30(4), 393–402.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.04.009>

Kessarar, N., Fogarty, M., Iannarelli, P., Grist, M., Wegner, M., & Richardson, W. D. (2006). Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nature Neuroscience*, 9(2), 173–179. <https://doi.org/10.1038/nn1620>

Kinney, H. C. (2009). The Encephalopathy of Prematurity: One Pediatric Neuropathologist's Perspective. In *Seminars in Pediatric Neurology*. <https://doi.org/10.1016/j.spen.2009.09.003>

Koehler, R. C., Yang, Z. J., Lee, J. K., & Martin, L. J. (2018). Perinatal hypoxic-ischemic brain injury in large animal models: Relevance to human neonatal encephalopathy. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 38(12), 2092–2111. <https://doi.org/10.1177/0271678X18797328>

Kuhn, S., Gritti, L., Crooks, D., & Dombrowski, Y. (2019). *Generation and Beyond*. 1–23.

Lawn, J. E., Cousens, S., & Zupan, J. (2005). 4 Million neonatal deaths: When? Where? Why? In *Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)71048-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)71048-5)

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

McKenzie, I. A., Ohayon, D., Li, H., De Faria, J. P., Emery, B., Tohyama, K., & Richardson, W. D. (2014). Motor skill learning requires active central myelination. *Science*, 346(6207), 318–322. <https://doi.org/10.1126/science.1254960>

Morrison, B. M., Lee, Y., & Rothstein, J. D. (2013). Oligodendroglia metabolically support axons and maintain structural integrity. *Trends in Cell Biology*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.07.007>

Nakatani, H., Martin, E., Hassani, H., Clavairoly, A., Maire, C. L., Viadieu, A., Kerninon, C., Delmas, A., Frah, M., Weber, M., Nakafuku, M., Zalc, B., Thomas, J. L., Guillemot, F., Nait-Oumesmar, B., & Parras, C. (2013). Ascl1/Mash1 promotes brain oligodendrogenesis during myelination and remyelination. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0805-13.2013>



- Novoa P, J. M., Milad A, M., Fabres B, J., Fasce C, J. A., Toso M, P. A., Arriaza O, M., Gandolfi E, C., Samamé M, M. M., & Aspillaga M, C. (2012). Consenso sobre manejo integral del neonato con encefalopatía hipóxica isquémica TT - Consensus statement on integral management of the newborn with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Revista Chilena de Pediatría*. <https://doi.org/10.4067/S0370-41062012000500012>
- Okahara, K., Kizuka, Y., Kitazume, S., Ota, F., Nakajima, K., Hirabayashi, Y., Maekawa, M., Yoshikawa, T., & Taniguchi, N. (2014). Ceramide galactosyltransferase expression is regulated positively by Nkx2.2 and negatively by OLIG2. *Glycobiology*. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwu042>
- Oses, C., Olivares, B., Ezquer, M., Acosta, C., Bosch, P., Donoso, M., Léniz, P., & Ezquer, F. (2017). Preconditioning of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with deferoxamine increases the production of pro-angiogenic, neuroprotective and anti-inflammatory factors: Potential application in the treatment of diabetic neuropathy. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178011>
- Peebles, E. (2018). *jisa2018.pdf*.
- Perlman, J. M. (2002). Perinatal brain injury. *Clinics in Perinatology*, 29(4). [https://doi.org/10.1016/S0095-5108\(02\)00061-1](https://doi.org/10.1016/S0095-5108(02)00061-1)
- Quintanilla, M. E., Ezquer, F., Morales, P., Santapau, D., Berríos-Cárcamo, P., Ezquer, M., Herrera-Marschitz, M., & Israel, Y. (2019). Intranasal mesenchymal stem cell secretome administration markedly inhibits alcohol and nicotine self-administration and blocks relapse-intake: Mechanism and translational options. *Stem Cell Research and Therapy*, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1304-z>
- Salmaso, N., Jablonska, B., Scafidi, J., Vaccarino, F. M., & Gallo, V. (2014). Neurobiology of premature brain injury. *Nature Neuroscience*, 17(3), 341–346. <https://doi.org/10.1038/nn.3604>
- Scafidi, J., Hammond, T. R., Scafidi, S., Ritter, J., Jablonska, B., Roncal, M., Szigeti-Buck, K., Coman, D., Huang, Y., McCarter, R. J., Hyder, F., Horvath, T. L., & Gallo, V. (2014). Intranasal epidermal growth factor treatment rescues neonatal brain injury. *Nature*, 506(7487), 230–234. <https://doi.org/10.1038/nature12880>



Schneider, J., & Miller, S. P. (2019). Preterm brain Injury: White matter injury. *Handbook of Clinical Neurology*, 162, 155–172. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64029-1.00007-2>

Schödel, J., Oikonomopoulos, S., Ragoussis, J., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., & Mole, D. R. (2011). High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood*, 117(23), 207–218. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-314427>

Semenza, G. L. (2007). Life with oxygen. *Science*, 318(5847), 62–64. <https://doi.org/10.1126/science.1147949>

Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*, 148(3), 399–408. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021>

Shindo, A., Liang, A. C., Maki, T., Miyamoto, N., Tomimoto, H., Lo, E. H., & Arai, K. (2016). Subcortical ischemic vascular disease: Roles of oligodendrocyte function in experimental models of subcortical white-matter injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 36(1), 187–198. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.80>

Sugimori, M., Nagao, M., Parras, C. M., Nakatani, H., Lebel, M., Guillemot, F., & Nakafuku, M. (2008). Ascl1 is required for oligodendrocyte development in the spinal cord. *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.015370>

Tapia-bustos, A., Lespay-rebolledo, C., Vío, V., Pérez-lobos, R., Casanova-ortiz, E., Ezquer, F., Herrera-marschitz, M., & Morales, P. (2021). Neonatal mesenchymal stem cell treatment improves myelination impaired by global perinatal asphyxia in rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6). <https://doi.org/10.3390/ijms22063275>

van Tilborg, E., de Theije, C. G. M., van Hal, M., Wagenaar, N., de Vries, L. S., Benders, M. J., Rowitch, D. H., & Nijboer, C. H. (2018). Origin and dynamics of oligodendrocytes in the developing brain: Implications for perinatal white matter injury. *Glia*, 66(2), 221–238. <https://doi.org/10.1002/glia.23256>

Viganò, F., Schneider, S., Cimino, M., Bonfanti, E., Gelosa, P., Sironi, L., Abbracchio, M. P., & Dimou, L. (2016). GPR17 expressing NG2-Glia: Oligodendrocyte progenitors serving as a reserve pool after injury. *Glia*, 64(2), 287–299. <https://doi.org/10.1002/glia.22929>



- Vizoso, F. J., Eiro, N., Cid, S., Schneider, J., & Perez-Fernandez, R. (2017). Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9).
<https://doi.org/10.3390/ijms18091852>
- Volpe, J. J. (2009). Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *The Lancet Neurology*, 8(1), 110–124.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70294-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70294-1)
- Volpe, J. J., Kinney, H. C., Jensen, F. E., & Rosenberg, P. A. (2011). The developing oligodendrocyte: Key cellular target in brain injury in the premature infant. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 29(4), 423–440.
<https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2011.02.012>
- Zhang, S., Wang, Y., Xu, J., Kim, B., Deng, W., & Guo, F. (2021). HIF α regulates developmental myelination independent of autocrine wnt signaling. *Journal of Neuroscience*, 41(2), 251–268. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0731-20.2020>
- Zhu, X., Zuo, H., Maher, B. J., Serwanski, D. R., LoTurco, J. J., Richard Lu, Q., & Nishiyama, A. (2012). Olig2-dependent developmental fate switch of NG2 cells. *Development (Cambridge)*. <https://doi.org/10.1242/dev.078873>



Anexo 1.

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CHILE



CICUA

COMITÉ INSTITUCIONAL DE
CUIDADO Y USO DE ANIMALES

Santiago, 06 de mayo de 2019

Certificado N°: **19255-MED-UCH**

CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el Protocolo **CBA 1058 FMUCH**, del Proyecto de Investigación titulado: **"Secretomas de células troncales mesenquimáticas protegen de las consecuencias de la hipoxia-reoxigenación neonatal. Estudios mecanísticos y translacionales"**, de la **Investigadora Responsable, Dra. Paola Morales Retamales**, Profesor Asociado, Programa de Farmacología Molecular & Clínica, ICBM, Departamento de Neurociencias, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas de Bioética de manejo y cuidado de animales, así mismo la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

La Académica se ha comprometido a la ejecución de este proyecto dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo revisado y autorizado por el CICUA, a mantener los procedimientos experimentales planteados y a no realizar ninguna modificación sin previa aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación para el uso de un total de **304** ratas de la especie *Rattus Norvegicus*, cepa *Wistar*, provenientes del Bioterio Central, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, desde mayo de 2019 a diciembre de 2021, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por **Proyecto Fondecyt Nro. 1190562**.

El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 53 miembros: 5 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del "Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales" después de un estudio acucioso y de la acogida de los investigadores de las observaciones exigidas por el Comité.

Ronald Vargas Casanova
Director
CICUA – VID
Universidad de Chile



Dr. Emilio Herrera Videla
Presidente
CICUA - VID
Universidad de Chile

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile
www.uchile/cicua.cl email: coordinador.cicua@uchile.cl