

**Universidad del Bío-Bío**  
**Facultad de Ciencias**  
**Departamento de Ciencias Básicas**



Alteración en la barrera hematoencefálica generado por  
vesículas extracelulares pequeñas provenientes de  
placentas hipóxicas

Hermes Sebastián Sandoval Rivas

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas**

Profesor Tutor: Dr. Carlos Escudero Orozco

**CHILLAN, 2023**

## INDICE

Agradecimientos	3
Resumen	4-5
Abstract	6-7
Introducción	8-24
Hipótesis y objetivos del estudio	25-26
Materiales y Métodos	27-46
Resultados	47-58
Discusión	59-77
Conclusión	78
Imágenes suplementarias	79-80
Referencias bibliográficas	81-119

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi profesor tutor Carlos Escudero Orozco, y su esposa Jesenia Acurio Jacome, por el apoyo diario, la sabiduría compartida y por sobre todo, el tiempo brindado a mi enseñanza.

Al director del Magister en Ciencias Biológicas, Andrés Rodríguez Morales, por el recibimiento al programa y por las gestiones que me permitieron llegar al laboratorio en donde hoy estoy.

A mis compañeros del Laboratorio de Fisiología Vasculat, por todo lo que compartimos día a día en nuestra vida de laboratorio, pero sobre todo, por el tiempo humano compartido entre cada ensayo.

A mis amigos y seres amados, que siempre tuvieron un tiempo en cada reunión, para apoyarme y/o preguntarme que experimento nuevo había aprendido.

A la vida de los animales utilizados en este estudio, entregada de forma desinteresada y no voluntaria, para comprender mejor el cuerpo humano.

Al financiamiento y apoyo técnico otorgado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico, mediante FONDECYT-1200250.

Y por último, gracias a mí, por confiar en mí firmemente, sobrellevando las desilusiones propias de la vida científica, y permitirme día a día reencantarme con las experiencias logradas.

## RESUMEN

Preeclampsia (PE) es un síndrome hipertensivo del embarazo humano que se presenta después de las 20 semanas de gestación, y que se caracteriza por disfunción placentaria. Entre 6.2-7.4% de mujeres fallecen por complicaciones cerebrovasculares asociadas a PE como eclampsia, isquemia o hemorragia intracerebral. Además, cursan con disrupción de la barrera hematoencefálica (BHE), y edema cerebral vasogénico. La fisiopatología de estas complicaciones cerebrovasculares es desconocida. En este trabajo de tesis, hipotetizamos que vesículas extracelulares pequeñas (sEVs) provenientes de placentas hipóxicas son capaces de dañar la BHE, por un mecanismo que involucra reducción de la cantidad de claudina 5 (CLDN5). Esta última, es una proteína de unión estrecha entre células endoteliales, primordial para la estabilización en la función de la BHE. Para ello, se aislaron las sEVs desde explantes placentarios de embarazos normales, cultivados en normoxia (sEVs-Nor, 8% O<sub>2</sub>) o hipoxia (sEVs-Hyp, 1% O<sub>2</sub>) durante 18 horas, y se inyectaron a ratonas C57BL/6 no preñadas, para evaluar compromiso neurológico mediante escala rápida de coma y comportamiento murino (RMCBS), así como también análisis de disrupción de la BHE mediante ensayo con Evans blue (EB) sectorial. Además, se analizaron los efectos *in vitro* mediante evaluación de parámetros de BHE como resistencia eléctrica transendotelial (TEER) y permeabilidad celular a dextrano 70 kDa. Adicionalmente, se cuantificó la cantidad de CLDN5 tanto en cultivos celulares de endotelio cerebral de ratón y humano, como en tejido cerebral del modelo *in vivo*. Como resultados, se obtuvo que la inyección de sEVs-Hyp generan déficit neurológico en las ratonas desde las 3 horas, el cual es progresivo hasta las 24 horas post

inyección. En estos animales, se evidenció una disrupción de la BHE mediante la cuantificación de extravasación de EB, principalmente en el área posterior del cerebro. Extravasación que concuerda con el modelo quirúrgico de preeclampsia caracterizado por la reducción de la perfusión uterina (RUPP). Las sEVs-Hyp tienen un alto contenido del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), lo cual se asocia con incremento del nivel de este factor detectado en suero de los animales inyectados con sEVs-Hyp. En forma importante, la inyección de sEVs-Hyp no genera cambios en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias en el suero a las 6 horas post-inyección. Además, en el modelo *in vitro*, encontramos que las sEVs son incorporadas rápidamente (30 minutos) en las células endoteliales cerebrales. Asociado a ello, se evidencia que las sEVs-Hyp disminuyen la TEER y aumentan la permeabilidad a dextrano 70 kDa. Estos resultados asociados con una disminución en los niveles de CLDN5 a las 6 horas post exposición a sEVs-Hyp. En experimentos paralelos, y como una aproximación traslacional, encontramos que sEVs provenientes de plasma de mujeres con PE también dañan la BHE *in vitro*, y reducen la expresión de CLND5, en la membrana de células endoteliales cerebrales humanas. Este efecto, requirió de la presencia íntegra de las sEVs. En conclusión, las sEVs-Hyp dañan la BHE tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, siendo esta disrupción de manera específica, en la zona posterior del cerebro. Además, este daño de la BHE se asocia con disminución en los niveles de proteína CLDN5. El mecanismo implicaría un aumento en el nivel de VEGF circulante, que pudiera dañar la BHE.

**Palabras claves:** Preeclampsia, barrera hematoencefálica, edema cerebral vesículas extracelulares pequeñas.

**ABSTRACT****ALTERATION IN THE BLOOD-BRAIN BARRIER GENERATED BY SMALL EXTRACELLULAR VESICLES FROM HYPOXIC PLACENTAS**

Preeclampsia (PE) is a hypertensive syndrome of human pregnancy that occurs after 20 weeks of gestation and is characterized by placental dysfunction. Between 6.2-7.4% of women die from cerebrovascular complications associated with PE such as eclampsia or stroke. In addition, they present disruption of the blood-brain barrier (BBB), and vasogenic brain edema. The pathophysiology of these cerebrovascular complications is unknown. In this thesis, we hypothesize that small extracellular vesicles (sEVs) from hypoxic placentas can damage the BBB; through a mechanism that involves a reduction in the amount of claudin 5 (CLDN5). The latter is a tight junction protein between endothelial cells, essential for the stabilization of BBB function. We isolate sEVs from placental explants of normal pregnancies, cultured in normoxia (sEVs-Nor, 8% O<sub>2</sub>) or hypoxia (sEVs-Hyp, 1% O<sub>2</sub>) for 18 hours, and injected into C57BL/6 non-pregnant mice, to assess neurological compromise using rapid murine coma and behavior scale (RMCBS), as well as BBB disruption analysis using sectoral Evans blue (EB) extravasation. In addition, *in vitro* effects were analyzed by evaluating BBB parameters such as transendothelial electrical resistance (TEER) and cell permeability to 70 kDa dextran. Additionally, the amount of CLDN5 was quantified both in human and mouse brain endothelial cell cultures, and *in vivo* model brain tissue samples. As results, it was obtained that the injection of sEVs-Hyp generate neurological deficit in the mice from 3 hours, which is progressive up to 24 hours post injection. In these animals, a disruption of the BBB was evidenced by the quantification of EB

extravasation, mainly in the posterior area of the brain. Posterior EB's extravasation consistent with the surgical model of preeclampsia characterized by reduced uterine perfusion pressure (RUPP). sEVs-Hyp have a high content of vascular endothelial growth factor (VEGF), which is associated with increased circulating level of this factor detected in animals injected with sEVs-Hyp. Importantly, injection of sEVs-Hyp does not cause changes in serum pro-inflammatory cytokine levels (at 6 hours post injection). Furthermore, in the *in vitro* model, we found that sEVs are rapidly (30 min) incorporated into brain endothelial cells. sEVs-Hyp decreased the TEER and increase the permeability to dextran 70 kDa in brain endothelial cells. These results were associated with decrease in CLDN5 levels at 6 hours post exposure to sEVs-Hyp. In parallel experiments, and as a translational approach, we found that sEVs from plasma of women with PE also damage the BBB *in vitro*, and reduced the expression of CLND5, in the cell membrane of brain endothelium. This effect required the intact presence of sEVs. In conclusion, sEVs-Hyp damages the BBB both *in vitro* and *in vivo* models, this disruption being specifically in the posterior area of the brain. Furthermore, this BBB damage is associated with decreased CLDN5 protein levels. The mechanism would imply an increase in circulating VEGF levels, which could impair the BBB.

**Keywords:** Preeclampsia, blood-brain barrier, brain edema, small extracellular vesicles.

## **INTRODUCCIÓN**

### **Alteraciones cerebrovasculares y Preeclampsia**

Preeclampsia (PE) es un síndrome hipertensivo que ocurre en el embarazo, caracterizado por deficiente placentación y disfunción endotelial (Han et al., 2020; Roberts et al., 2021). Esta condición afecta a 5-8% de todos los embarazos a nivel mundial (Miller et al., 2019; Duley et al., 2009). Clásicamente, el diagnóstico de PE se ha establecido mediante la aparición de hipertensión arterial y proteinuria desde de las 20 semanas de gestación (ACOG., 2019). Actualmente, proteinuria no es determinante en el diagnóstico de PE, si además de hipertensión arterial se evidencian signos de daño multiorgánico, como trombocitopenia, insuficiencia renal, daño hepático, edema pulmonar, edema cerebral y/o convulsiones (ACOG., 2019).

La patogénesis de PE no está totalmente comprendida. La principal hipótesis está basada en la disfunción endotelial generalizada producto de factores liberados desde la placenta (Redman y Sargent., 2005; Heilmann et al., 2007). Específicamente estas alteraciones placentarias involucran una inadecuada invasión placentaria hacia la vasculatura materna, lo cual genera una placenta hipóxica con el potencial de liberar moléculas dañinas al torrente sanguíneo materno, generando disfunción endotelial generalizada. Lo cual, alcanzaría a todos los tejidos maternos, incluyendo el cerebro que es foco de esta tesis. Al llegar al cerebro, estos potenciales factores placentarios que son dañinos causan disrupción de la microvasculatura cerebral, aumentando el riesgo de afecciones cerebrovasculares agudas (Redman y Sargent., 2005; Magnussen et al., 2007; Burton et al., 2009).



En este sentido, las complicaciones cerebrovasculares agudas de PE como la eclampsia (episodio nuevo de convulsiones en pacientes que cursan con PE), edema cerebral, síndrome de encefalopatía reversible posterior (PRES), accidente cerebrovascular y herniación cerebral, son los que hacen que la madre se ubique en un escenario de grave riesgo de muerte y/o secuelas postparto (MacKay et al., 2001; Hammer y Cipolla., 2015; Miller et al., 2019). Pese a la importancia en términos de la morbi-mortalidad materna generada por estas afecciones cerebrales, la fisiopatología de éstas es poco conocida (Bushnell y Chireau., 2011; Khalil y Hameed., 2017; Miller et al., 2022). Aunque involucran daño de la vasculatura cerebral, su función protectora y autorregulatoria del flujo sanguíneo (Hammer y Cipolla., 2015; Opichka et al., 2021).

Específicamente, la incidencia de alteraciones cerebrovasculares durante la gestación es de 10-34/100.000 partos, siendo PE uno de los mayores factores de riesgo para presentar alteraciones cerebrovasculares. Así, PE aumenta hasta 4 veces la incidencia de alteraciones cerebrovasculares (OR 4.4; 95% CI 3.6-5.4) (Bushnell y Chireau., 2011; Rolnik et al., 2017; Sanders et al., 2018). Como consecuencia, entre 6.2% y 7.4% de las mujeres gestantes mueren por el compromiso cerebrovascular asociado a PE (McDermontt et al., 2018; Hammer y Cipolla., 2015; Miller et al., 2017). Además, PE incrementa en 55-60% la aparición de alteraciones cerebrovasculares maternas tras el parto (McDermott et al., 2018).

Clínicamente, es común que las pacientes con PE reporten síntomas neurológicos, como dolor de cabeza, visión borrosa, náuseas, mareos y convulsiones. Sin embargo, ninguno de estos síntomas es patognomónico de las alteraciones cerebrovasculares en mujeres con PE (Warrington et al., 2015;

Bergman et al., 2014). Aunque las cefaleas, visión borrosa, y compromiso del estado mental se ha asociado específicamente a PRES, una condición de edema cerebral que afecta los lóbulos parietales y occipitales además del cerebelo (Hinchey et al., 1996; Fugate et al., 2010; Liman et al., 2012).

En cuanto a la fisiopatología de las complicaciones cerebrovasculares asociadas a PE, existe limitada información. Así como también sobre los factores predisponentes para desarrollar alteraciones del sistema nervioso central en PE (Burwick et al., 2019). Esto genera una dificultad en desarrollar herramientas diagnósticas y terapéuticas en aquellas mujeres en riesgo de PE (Bergman et al., 2019).

A pesar de ello, se conoce que las mujeres que presentan complicaciones cerebrovasculares desarrollan cambios hemodinámicos cerebrales. Estos se caracterizan por periodos de hiper o hipoperfusión y afectación de la capacidad autorregulatoria cerebral (capacidad de mantener el flujo sanguíneo cerebral a pesar de los cambios de presión en un rango que va entre 50 y 150 mm Hg). Estas afecciones, aparecen previamente a la signología neurológica asociada a PE y eclampsia (Bergman et al., 2014). Además, estudios de resonancia magnética de mujeres cursando PE muestran formación de edema cerebral, sobre todo en la parte posterior del cerebro (Fugate et al., 2010; Liman et al., 2012). Las causas para estos fenómenos no se conocen con exactitud. Sin embargo, han sido asociados a la hipertensión arterial propia de PE y daño vascular cerebral, en particular del endotelio cerebral (Wang et al., 2021).

Una de las características principales de la función de los vasos sanguíneos es la de conformar una barrera o barrera hematoencefálica (BHE) que impide el

traspaso de potenciales sustancias dañinas hacia el parénquima cerebral (Cipolla 2007; Johnson y Cipolla., 2015; Merino-González et al., 2016; Hajal et al., 2021; León et al., 2021; Friis et al., 2022; Escudero et al., 2022).

### **BHE en Preeclampsia**

La BHE está conformada por la asociación física y funcional de células endoteliales cerebrales con pericitos inmersos en la membrana basal, astrocitos y microglía (Page et al., 2016).

En el caso de las células endoteliales, se caracterizan por una abundancia de uniones estrechas o tight junction (en inglés, TJs), que restringen la difusión paracelular (Luissint et al., 2012). El transporte de sustancias a través de la BHE es altamente especializado, debido a que las células endoteliales expresan proteínas de membrana transportadoras, que pertenecen a las familias de transportadores ABC (ATP Binding Cassette) y transportador de solutos (Torres-Vergara et al., 2022) los cuales permiten mantener separado selectivamente el parénquima cerebral de la circulación sistémica (Banks et al., 2020).

En este sentido, evidencia de estudios de PE en animales, sugiere que la disfunción endotelial cerebral genera disrupción de la BHE, edema e inflamación intracerebral, y generación de hipoxia local (Marra et al., 2014; Clayton et al., 2018; Warrington et al., 2014). Esta serie de eventos se convierte en un círculo vicioso que lleva a mayor daño del parénquima cerebral.

La fisiopatología de la alteración de la BHE en PE no se conoce con exactitud, pero existen 3 teorías para explicar su desarrollo. La primera es que se generaría debido a la hipertensión severa, y que llevaría a una inadecuada

autorregulación vascular (Lidington et al., 2021) e hiperperfusión cerebral. La segunda posibilidad sería la vasoconstricción e hipoperfusión que producirían daño estructural de los vasos sanguíneos e isquemia cerebral. Y una tercera teoría estaría asociada a disfunción endotelial debido a toxinas o moléculas circulantes, alterando la integridad de la BHE, generando extravasación de fluidos hacia el parénquima cerebral (Heilmann et al., 2007).

Cómo se generan estos cambios tampoco se conoce con exactitud, pero estudios *in vitro* (Amburgey et al., 2010;) incluyendo algunos de nuestro laboratorio (Bergman et al., 2021; Friis et al., 2022; León et al., 2021), han demostrado que el plasma proveniente de mujeres con PE incrementa la permeabilidad en modelos de BHE. Esta capacidad del plasma de mujeres con PE de alterar la BHE ha sido mostrado también en modelos *in vivo* (Warrington et al., 2014; Johnson et al., 2014; León et al., 2021). Pese a ello, no está claro cuáles factores presentes en el plasma serían los responsables de la disrupción de la BHE. Aunque, existen varios candidatos, como lo son las citoquinas proinflamatorias (Na et al., 2014; Warrington et al., 2015; Michalicova et al., 2020), moduladores vasculares (Amburgey et al., 2010; Schreurs et al., 2012; Bergman et al., 2021) o las vesículas extracelulares provenientes de la placenta (Han et al., 2020; León et al., 2021).

Cualesquiera que sean los factores circulantes que generan el daño de la BHE, existen estudios que sugieren que debería ser un factor(s) que provengan de la placenta hipóxica característica de PE (Warrington et al., 2015; Han et al., 2020; León et al., 2021). Por ejemplo, se ha mostrado que roedores gestantes, en los cuales, se indujo quirúrgicamente una isquemia placentaria, desarrollan una

alteración en la autorregulación cerebral, disrupción en la BHE, neuroinflamación y edema cerebral (Warrington et al., 2014).

En nuestro laboratorio, León y colaboradores (2021) demostraron que las vesículas extracelulares pequeñas (sEVs) extraídas desde placentas expuestas a hipoxia o de plasma de mujeres con PE generan daño de la BHE tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, en ese estudio no indagamos si ese daño de la BHE estaba ubicado en áreas clínicamente relevantes para PE, así como tampoco estudiamos los mecanismos celulares o moleculares que conllevan a este daño de la BHE. Esta falta de información será parcialmente indagada en esta tesis.

### **Vesículas extracelulares en embarazo normal y preeclampsia**

Las vesículas extracelulares (EVs) son estructuras de bicapa lipídica que son liberadas por las células hacia el espacio extracelular, conteniendo proteínas, miRNA, factores de crecimiento o apoptóticos, y potencialmente múltiples otros componentes regulatorios para inducir comunicación intercelular a través del cuerpo (Colombo et al., 2014; Mitchel et al., 2015; Escudero et al., 2016).

Tres principales grupos de EVs ha sido descrito, considerando su tamaño, contenido y biogénesis. Los cuerpos apoptóticos (500-2000nm) son desprendimientos de la membrana celular, proveniente de células en estado de apoptosis. Las microvesículas (50-1000nm) emergen de la membrana celular, almacenando en su interior un amplio rango de contenido para ser llevado a las células diana. Y los exosomas (vesículas extracelulares pequeñas o sEVs, 40-200 nm), los cuales son las EVs más pequeñas, sintetizados desde el cuerpo

multivesicular, y son caracterizados por la incorporación de un amplio cargo de miRNA (Saeedi et al., 2019).

Un creciente número de publicaciones ha mostrado que el embarazo normal se caracteriza por un aumento en los niveles circulantes de sEVs provenientes de la placenta (Salomon et al., 2013; Zhang et al., 2020; Czernek y Döchler., 2020; Smith y Russell., 2022). En forma importante, también se ha mostrado que las mujeres con PE presentan un aumento aún mayor de los niveles de sEVs circulantes (Goswami et al., 2006; Sadovsky et al., 2020) provenientes muy probablemente desde la placenta (Cerdeira y Vatish., 2018).

Por otro lado, a nivel cerebral, las sEVs circulantes actúan como reguladores de la homeostasis (Yáñez-Mó et al., 2015), y a nivel patológico, son las causantes de promover la neuroinflamación, degeneración, o reparación tisular dependiendo de su contenido (Andjus et al., 2020).

Los mecanismos moleculares de estos fenómenos escapan al foco de esta tesis, sin embargo, indicar que existe evidencia suficiente de que las sEVs circulantes son capaces de atravesar la BHE (Rufino-Ramos et al., 2017; Ruan et al., 2021).

### **sEVs placentarias y BHE**

La función de las sEVs placentarias presentes en el embarazo normal o en PE no se conoce con exactitud. Sin embargo, han sido asociadas a respuestas inmune materna para evitar la reacción inmunológica a antígenos fetales (Zhang et al., 2020), y remodelación de las arterias espirales uterinas (Dutta et al., 2020;

Taglauer et al., 2021) necesarias para un correcto intercambio gaseoso feto-placentario y materno.

Además, las sEVs liberadas desde la placenta hacia la circulación materna durante PE han sido asociadas con la fisiopatología de la enfermedad. Por ejemplo, el nivel de sEVs presentes en plasma de mujeres con PE podrían ocasionar injuria endotelial, inflamación sistémica, y disfunción coagulativa (Han et al., 2020), eventos los cuales se han relacionado directamente con la severidad de los signos clínicos de PE (Sergeeva et al., 2015).

La evidencia actual no explica el proceso por el cual las sEVs placentarias generan daño endotelial, pero existen estudios que sugieren que, al ser estructuras de comunicación celular, pueden contener un cargo específico y potencialmente nocivo para las células endoteliales, como citoquinas proinflamatorias (TNF $\alpha$ ), o moléculas oxidativas (ox-LDL), o micro RNAs (miRNA), entre otros (Awoyemi et al., 2020). En el caso particular de la BHE, escasos estudios han mostrado evidencia sobre el potencial rol dañino de las sEVs placentarias en PE (Gilani et al., 2016; Han et al., 2020; León et al., 2021).

Al momento dos estudios han mostrado que las sEVs placentarias son capaces de alterar la BHE. El primero de Han et al, 2020, preguntándose si las sEVs placentarias que se encuentran elevadas en PE son las que producen el síndrome preecláptico o son productos de la fisiopatología en sí. Para ello, aislaron sEVs desde placentas de mujeres con PE, y las inyectaron en ratones gestantes, demostrando la generación de un síndrome similar a PE (hipertensión y proteinuria). Además, al tratar células BEND3 (endotelio cerebral de ratón) con estas EVs placentarias de PE, evidenciaron disrupción la integridad de la

monocapa endotelial, mediante evaluación de permeabilidad celular a una molécula de alto peso molecular como dextrano 70 kDa.

El segundo, un trabajo de nuestro grupo en donde demostramos que las sEVs provenientes de plasma o de placentas hipóxicas son capaces de dañar la BHE *in vitro* e *in vivo* (León et al., 2021). Específicamente, células endoteliales de la microcirculación cerebral humana o hCMEC/D3 fueron sometidos a tratamiento con sEVs aisladas desde plasma de mujeres con PE o de sEVs provenientes de cultivos de explantes placentarios en condiciones de hipoxia, mostrando una reducción en la resistencia eléctrica transendotelial (TEER) y aumento de la permeabilidad a molécula fluorescente de alto peso molecular (dextrano 70 kDa). Además, cuando las sEVs provenientes de placentas cultivadas en hipoxia fueron inyectadas a ratones no gestantes, se visualizó a nivel cerebral hasta 3 veces mayor cantidad de extravasación del colorante Evans blue (EB), en comparación a tratamiento con sEVs placentarias en condición de normoxia (León et al., 2021).

En ambos estudios, no se analiza cómo las sEVs podrían estar dañando específicamente la circulación cerebral, afectando una de sus principales funciones, como la de barrera. En este sentido, algunos estudios han relacionado a las sEVs secretadas en condiciones patológicas y su efecto sobre las uniones intercelulares en células endoteliales. Por ejemplo, Lapping-Carr et al., 2020, aislaron sEVs plasmáticas desde pacientes que presentan complicaciones con síndrome torácico agudo (ACS) por anemia falciforme (SCD). Expusieron células endoteliales microvasculares dermales con sEVs, evidenciando una disrupción endotelial debido a reducción significativa en niveles de mRNA y de proteína VE-cadherina. Complementariamente a este estudio, Gemel et al., 2020 demuestran

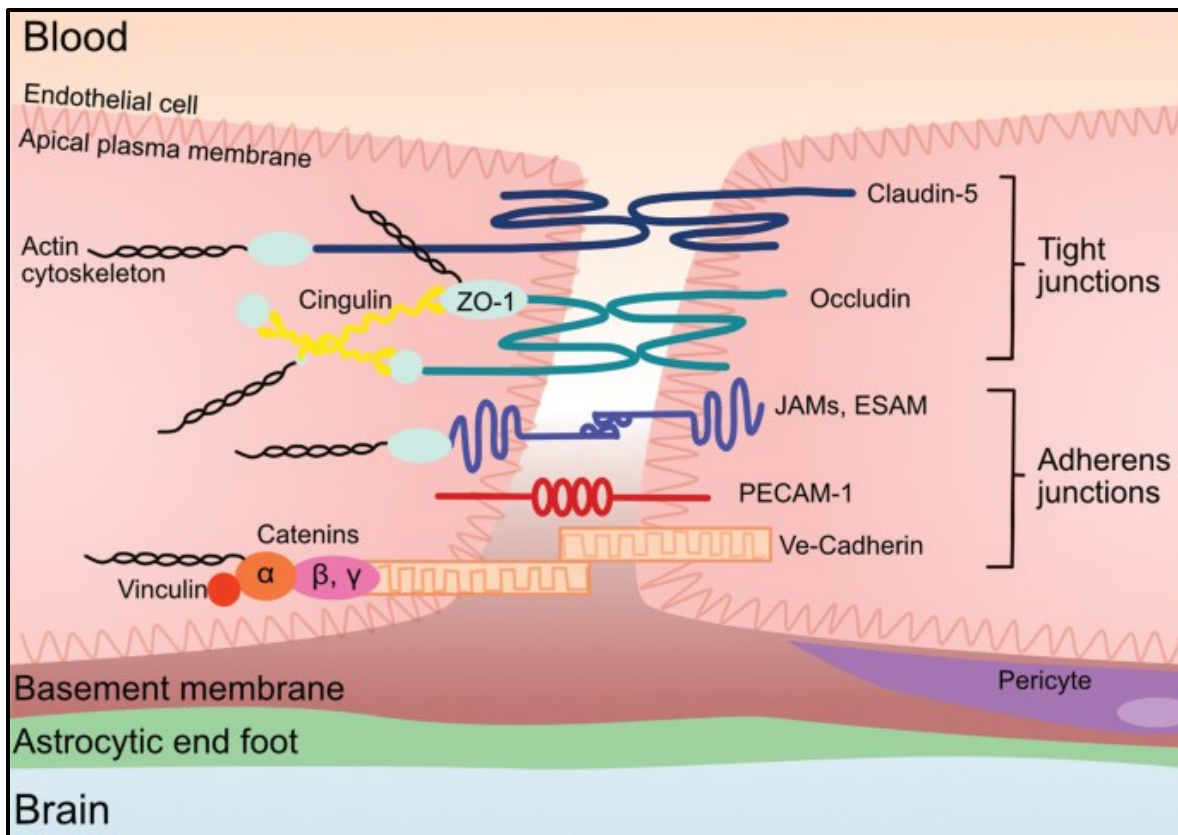


que las sEVs provenientes de pacientes con ACS asociado a SCD, inducen una disminución en la expresión de conexina 43 (Cx43), Zonula occludens 1 (ZO-1) y de las uniones adherentes en células endoteliales de la microvasculatura dermal humana (HDMEC). A pesar de estas evidencias, resaltamos que en PE no se conoce si las sEVs provenientes de placenta afectarían la expresión o función de TJs en la BHE.

### **BHE y disrupción mediante alteración de TJs**

Una de las características fundamentales del endotelio cerebral es la presencia de un alto contenido de TJs, las mismas que impiden el paso de moléculas en forma intercelular (Runkle y Mu., 2013; Bauer et al., 2014; Hashimoto et al., 2019; Otani y Furuse., 2020). Así, las TJs son un complejo de proteínas transmembrana conformadas por claudinas, ocludina y moléculas de adhesión (JAMs), las mismas que a su vez son ancladas al citoesqueleto de actina mediante proteínas asociadas a membrana, específicamente a zonula 1 (ZO-1), todas ellas crítica para la estabilización de la BHE (Nzou et al., 2019) (Fig. 1).

En particular, las claudinas (CLDN) son consideradas las proteínas primordiales y son determinantes en el establecimiento de la propiedad de barrera a nivel cerebral (Gunzel y Yu., 2013). Estas proteínas constituyen una gran familia de al menos 27 variantes, con un peso molecular aproximado de 26 kDa (Mineta et al., 2011). Entre estas variantes, claudina 5 (CLDN5) ha sido reconocida ampliamente como la TJs más importante en la BHE (Green et al., 2019).



**Figura 1.** Proteínas de unión estrecha y adherentes en las células endoteliales de la microvasculatura cerebral (Figura tomada de Knox et al., 2022). Las proteínas de unión estrecha incluyen Claudina-5, Occludina y Zónula occludens (ZO-1,2,3). Claudina-5 y Occludina son proteínas transmembrana, mientras que Zonula occludens son proteínas intracelulares. Las uniones adherentes incluyen componentes transcelulares, JAM (junction adhesión molecule), ESAM (endothelial cell adhesión molecule), PECAM-1 (platelet endotelial adhesión molecule) y Ve-cadherina. Las cateninas citoplasmáticas forman un complejo con VE-cadherina. El citoesqueleto de actina ayuda a anclar las proteínas de unión estrecha (Tight junctions) en las células endoteliales.

El transcrito (RNA mensajero, mRNA) de CLND5 está presente en un nivel de más de 1000 veces comparado con las otras claudinas en endotelio cerebral, siendo la mayor claudina constitutiva de la BHE (Daneman et al., 2010). Además, se conoce que ratones deficientes de CLDN5 no sobreviven más de 10 horas tras el nacimiento, esto debido al desarrollo de edema cerebral severo (Nitta et al., 2006). Adicionalmente, CLDN5 es la única proteína que contribuye a la reducción del movimiento de iones paracelulares y ayuda a estrechar la hendidura

paracelular (Stamatovic et al., 2016; Sweeney et al., 2019). En forma importante, la presencia de otras CLND como 1, 3 y 12, no son capaces de compensar la deficiencia de CLDN5 y mantener la integridad de la BHE (Nitta et al., 2006).

Ocludina es una proteína transmembrana de 65 kDa que contribuye a la estabilización y optimiza la función de la BHE (Zhang et al., 2021). La degradación de ocludina producida por virus o bacterias se ha asociado a un aumento de permeabilidad en células endoteliales cerebrales (Moroi et al., 1998; Xu et al., 2012). Aunque, se ha reportado que puede existir complejos de TJs bien establecidos inclusive en ausencia de ocludina (Schulzke et al., 2005).

Zonula occludens (ZO-1) es una proteína citoplasmática de 225 kDa, que se asocia a las diferentes TJs de membrana, contribuyendo a una interfase entre estas proteínas y las fibras de actina del citoesqueleto (Stevenson et al., 1986; Umeda et al., 2006). La afinidad de ZO-1 a claudinas determina su vida media y funcionalidad en la BHE (Van Itallie et al., 2019). Así, bajo circunstancias patológicas, claudinas diferentes a CLDN5 se expresan compitiendo por la afinidad a ZO-1 o ZO-2 (Schlingmann et al., 2016).

En cuanto a la alteración de las TJs en la disrupción de BHE presente en PE, la evidencia es controversial. Así, por ejemplo, se ha demostrado que ratas expuestas a un modelo de PE generado mediante la reducción en la presión de perfusión uterina (RUPP), generan una sobreexpresión de CLND1 en la zona cerebral posterior, mientras que los signos de edema cerebral se evidenciaron en la zona anterior del encéfalo. Así mismo, Ocludina y ZO-1 no mostraron diferencias significativas en niveles de expresión proteica (Warrington et al., 2014).

Paralelamente, en nuestro laboratorio demostramos que células endoteliales cerebrales expuestas a plasma de mujeres con PE muestran signos de disrupción de la BHE sin cambios en los niveles de mRNA de Occludina o ZO-1 (Bergman et al., 2020). Pese a ello, estas evidencias muestran la presencia de la proteína, sin indagar en su localización o su función. Por lo mismo, más estudios son necesarios, y en esta tesis buscaremos aportar en el análisis de la localización cerebral de las TJs en cerebros con disrupción de la BHE en un modelo que emula PE.

### **Neuroinflamación en PE**

La neuroinflamación se considera como la respuesta inflamatoria dentro del parénquima cerebral o medular (DiSabato et al., 2016). La neuroinflamación es el escenario común en la fisiopatología de enfermedades neurológicas tanto agudas como crónicas a nivel del sistema nervioso central (SNC) (Chitnis y Weiner., 2017; Werry et al., 2019). Cuando consideramos las alteraciones agudas del SNC, la disrupción de la BHE comienza rápidamente tras el insulto, permitiendo que las proteínas plasmáticas entren al parénquima cerebral. La disrupción de la BHE temprana es mayormente debido a estrés oxidativo producto de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Da Fonseca et al, 2014). Este daño inicial, afecta negativamente a la función de las TJs y el citoesqueleto de actina, lo que conlleva a su vez a la formación de edema cerebral neuroinflamatorio (Takata et al., 2021). No está claro aún si la disfunción de la BHE es causa o efecto de la neuroinflamación, aunque estudios recientes indican, que la disfunción endotelial y

disrupción de BHE es más bien un agravante en respuesta a la reactividad microglial del cerebro (Nishioku et al., 2009).

El embarazo normal es un estado pro-inflamatorio controlado (Mor et al., 2011; Ragsdale et al., 2019). Mientras que modelos animales de PE han demostrado consistentemente un aumento en los niveles de citoquinas proinflamatorias (Waker et al., 2021; Bellos et al., 2018) incluyendo interleucina 6 (IL-6) (de Alwis et al., 2022) factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) entre otros (Teran et al., 2001; Gatford et al., 2020; Chau et al., 2022).

Además, se conoce que las citoquinas proinflamatorias circulantes producen disrupción de la BHE (Johnson et al., 2014; Li et al., 2016; Zhang et al., 2016). Específicamente, los síndromes clínicos de accidentes cerebrovasculares isquémicos y hemorrágicos, PRES y edema cerebral observados en PE, se relacionarían con la presencia de altos nivel circulante de citoquinas inflamatorias como IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$  (Johnson et al., 2014; Li et al., 2016; Zhang et al., 2016). Pero si estas moléculas inflamatorias circulantes son causales o se generan como respuesta a la disrupción de la BHE aún no está claro (Huang et al., 2021).

Numerosos reportes han mencionado que el plasma de mujeres con preeclampsia presenta elevados niveles de IL-6, una citoquina pro y antiinflamatoria (Teran et al., 2001; Madazli et al., 2003; Freeman et al., 2004; Jonsson et al., 2006). Esta citoquina además tiene un rol modulador de la función endotelial (Didion., 2017), lo cual sugiere la participación de esta citoquina en la generación de disfunción endotelial sistémica presente en PE (Lockwood et al., 2008).

Otra citoquina que se encuentra elevada en la circulación de mujeres con preeclampsia es IL-8. La cual se ha asociado con una mayor capacidad de adhesión y movilidad de monocitos en la pared vascular (Arikan et al., 2011), generando un estado de excesiva inflamación sistémica, en contraparte de la fisiología gestacional materna normal (Pinheiro et al., 2013).

Existe evidencia de que, en preeclampsia existen elevados niveles circulantes de TNF- $\alpha$ , producidos por la placenta isquémica (Duncan et al., 2018). Esta molécula proinflamatoria se ha asociado como un gatillante de los mecanismos por los cuales se establecería un elevado riesgo de encefalopatía en mujeres que cursan con PE (Nouh et al., 2014), y que se relacionaría directamente con el desarrollo del síndrome clínico y bioquímico de PE en un modelo animal en babuino (*Papio hamadryas*) (Sunderland et al., 2011). Por otro lado, TNF- $\alpha$  estaría asociado a la presencia de edema cerebral por disrupción de la BHE en el modelo RUPP en ratas (Warrington et al., 2015).

## **Otros mediadores de la disfunción de la BHE en preeclampsia**

### **Factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF)**

Junto al proceso inflamatorio, la disrupción de la BHE en preeclampsia ha sido asociada a la presencia de VEGF (Bergman et al., 2021; Torres-Vergara et al., 2022). Este es el factor angiogénico más importante (Holmes et al., 2005; Ferrara., 2009; Shibuya., 2011), pero además es un potente disruptor de la BHE (Argaw et al., 2006). Por ejemplo, se ha localizado la presencia de altos niveles de VEGF con zonas de reactividad astrocitaria producto de inflamación cerebral (Chapouly et al., 2015; Kim et al., 2022). Además, se ha asociado la

administración de VEGF exógeno en línea celular hCMEC/D3 y en ratones C57BL/6 con disminución en la expresión de CLDN5 y ocludina, provocando disrupción de la BHE, lo que a su vez incrementa la generación de más VEGF (Argaw et al., 2009), estableciendo un círculo vicioso nefasto para la BHE.

Hallazgos propios del laboratorio (Bergman et al., 2021; Torres-Vergara et al., 2022) usando plasma de mujeres con PE para estimular células endoteliales cerebrales humanas muestran que uno de los mediadores de la disrupción de la BHE sería VEGF. Estos resultados confirman evidencia previa usando vasos sanguíneos de rata expuestos a plasma de PE (Johnson y Cipolla., 2018; Nemeth et al., 2022). En este sentido es interesante destacar que la inhibición del receptor de VEGF tipo 2 (VEGFR2 o KDR), revierte el daño de la BHE inducido por el plasma de mujeres con PE, lo cual sugiere su participación directa en este efecto (Schreurs et al., 2012; Torres-Vergara et al., 2022)

Al momento no se conoce de donde proviene el VEGF que está presente en la circulación materna en PE, o cómo finalmente se activaría el VEGFR2 en el contexto de daño de la BHE. Esto es importante, cuando consideramos que en PE existe un aumento en los niveles del receptor de VEGF tipo 1 en su forma soluble (sFlt-1) (Levine et al., 2004; Karumanchi., 2016; Rana et al., 2022) el mismo que secuestra VEGF (Verrax et al., 2011; Matin et al., 2020). Más aún si consideramos que el VEGFR2 involucrado en el daño de la barrera en PE (Schreurs et al., 2012; Torres-Vergara et al., 2022), se encuentra en el extremo basolateral de la célula endotelial cerebral (Hudson et al., 2014).

**En resumen:**

1. PE es un síndrome asociado a alta morbimortalidad materna debido a complicaciones cerebrovasculares a nivel mundial.
2. Una alteración cerebrovascular importante en PE es el PRES, que afecta la parte posterior del cerebro, específicamente desde los lóbulos parietales, hasta el occipital y cerebelo.
3. Las complicaciones cerebrovasculares de PE cursan con disrupción de la BHE, pero no se conocen los mecanismos fisiopatológicos.
4. Las sEVs provenientes de una placenta hipóxica, causan disrupción de la BHE en modelos *in vitro* e *in vivo*.
5. No se conoce si las sEVs afectan directamente la expresión y/o localización de TJs, como mecanismo fisiopatológico de la disrupción de la BHE durante PE.
6. Evidencia preclínica relaciona la generación de neuroinflamación, así como la activación de VEGFR2 con daño de la BHE en modelos de PE.



## **HIPOTESIS:**

Las vesículas extracelulares pequeñas aisladas de placentas hipóxicas dañan la barrera hematoencefálica con preferencia en el área posterior cerebral, lo cual se asociaría a alteración en la expresión de CLDN5 en el endotelio cerebral y aumento de citoquinas pro-inflamatorias y VEGF en la circulación.

## **OBJETIVO GENERAL**

- a. Evaluar si las vesículas extracelulares pequeñas extraídas de cultivos placentarios hipóxicos dañan la barrera hematoencefálica en áreas clínicamente relevantes (posterior) del cerebro, involucrando alteración en la expresión y/o localización de Claudina 5.
- b. Determinar si la inyección de vesículas extracelulares pequeñas provenientes de placentas hipóxicas incrementa los niveles circulantes de proteínas involucradas en la disrupción de la barrera hematoencefálica, como citoquinas pro-inflamatorias y VEGF.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- a. Determinar si las vesículas extracelulares pequeñas provenientes de placentas cultivadas en hipoxia dañan la barrera hematoencefálica de segmentos clínicamente relevantes del cerebro (posterior) en un modelo *in vivo*.
- b. Investigar si la disrupción de la barrera hematoencefálica generado por vesículas extracelulares pequeñas de placentas cultivadas en hipoxia o de plasma

de mujeres con preeclampsia se asocia a alteración en la expresión y/o localización de proteínas de uniones estrechas en el endotelio cerebral.

c. Evaluar si existe un aumento en el nivel de citoquinas pro-inflamatorias y VEGF a nivel circulante, posterior a la inyección de vesículas extracelulares pequeñas de placentas cultivadas en hipoxia.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Humanos**

Para el aislamiento de sEVs circulante humanas, se utilizaron muestras de plasma sanguíneo, provenientes de la Universidad de Nottingham, Reino Unido. Las muestras fueron categorizadas en dos grupos gestacionales: embarazo normal (NP)(n=6) y PE (n=6). Las muestras estaban contenidas en tubos de heparina, las cuales se obtuvieron desde sangre entera, centrifugadas a 1500 rpm (10 minutos).

La Universidad de Nottingham cumplió todos los criterios éticos para la obtención y mantención de las muestras sanguíneas. Así como también, se estableció convenio con la Universidad del Bio Bio para lograr la transferencia de las muestras al Biobanco perteneciente al Laboratorio de Fisiología Vasculuar.

### **Animales**

La inclusión de animales en el presente proyecto está enmarcado dentro del estudio Fondecyt 1200250, que fue autorizado por el comité de ética y bioseguridad de la Universidad del Bio Bio, bajo los principios bioéticos de manejo humanizado de animales o “Tres Erres” (3R’). Este considera los tópicos de Reemplazo, Reducción y Refinamiento asociado a animales de experimentación (Russel y Burch, 1959).

Para el siguiente proyecto, se utilizaron ratones (*Mus musculus*) sexo hembra, cepa C57BL/6, de entre 4 y 6 meses de edad, condición reproductiva no gestante. Estos animales fueron mantenidos permanentemente en el bioterio del Laboratorio de Fisiología Vasculuar, ubicado al interior de la Universidad del Bio

Bio, campus Fernando May - Chillán. Se mantuvieron bajo condiciones ambientales de humedad relativa (40-60%), temperatura del recinto (18-24 °Celsius) y fotoperiodo (12 horas luz / 12 horas oscuridad, controlado por un temporizador automático), con manejo alimentario en base a pellet comercial Laboratory Rodent Diet 5001 (Labdiet®CA) y agua potable en bebedero, ambos de manera *ad libitum*. Además, los animales fueron sometidos a enriquecimiento ambiental desde antes de la experimentación y durante ésta, de manera tal de evitar influencias negativas en los resultados debido a estrés o patologías asociadas. Esto se realizó proveyendo a los animales con material para elaborar nidos, túneles e iglús de plástico y/o papel, material que estuvo siempre disponible para los animales.

Se generaron 3 grupos experimentales: un grupo **control** (CTL, inyección endovenosa de suero fisiológico NaCl 0,9%), un grupo tratados con vesículas extracelulares placentarias aisladas de cultivos **normoxicos** (sEVs-Nor), y un grupo tratado con vesículas extracelulares placentarias aisladas de cultivos **hipóxicos** (sEVs-Hyp).

### **Modelo de PE quirúrgico en ratón.**

Con el propósito de evaluar semejanzas entre modelos de daño de BHE en PE *in vivo*, se realizó el modelo quirúrgico de preeclampsia llamado RUPP, según lo previamente publicado (Li et al., 2012; Fushima et al., 2016; Morton et al., 2019), con menores modificaciones en nuestro grupo (Lara et al., 2021).

Ratones hembra C57BL/6 se sincronizaron los ciclos reproductivos (72 horas). Esto se realizó dejando en la cercanía de la jaula de las hembras, a los

respectivos machos con los que se realizaría el apareamiento. Luego se juntaron los animales hembras y machos en relación 1:1 por cada jaula. Tras 24 horas, los animales se separan, constatando la presencia de tapón vaginal en la hembra, lo cual confirmaba que había existido apareamiento. Se consideró día 0 post coito la mañana en la cual se separan ambos animales. Luego de 12 días, se procedió a confirmar el desarrollo de gestación. Esto se realizó pesando las hembras (WantBalance®, Jiangsu, China) evidenciándose que las hembras gestantes aumentaron de peso en 20% como mínimo con respecto al día 0 post coito. Esto fue considerado como preñez efectiva para posterior cirugía.

Al confirmarse el desarrollo de gestación, las hembras aptas para realizar la cirugía el día 14,5 post coito, fueron divididas en 2 grupos (RUPP y SHAM). En ambos grupos se les administró 1mg/ml de acetaminofeno (1 mg/ml, p/v) y tramadol clorhidrato (0.2 mg/ml, v/v) en infusión oral que se mantuvo hasta el día 18,5 post coito (sacrificio), como manejo analgésico preventivo, ya que las dosis terapéuticas en el ratón demoran 24 horas en alcanzarse. En la cirugía, los animales fueron sometidos a anestesia general con isoflurano inhalado (inducción 4%; mantención 2%), manteniendo los animales en plataforma calefactora (36-37°Celsius) y lubricando el globo ocular con lágrimas artificiales de Hipromelosa. Tras lograrse el plano quirúrgico necesario (confirmando la ausencia de reflejo podal), se procede a generar un campo quirúrgico aséptico. Llegado a este punto, se realizó una incisión de 5 mm en la línea media abdominal bajo la cicatriz umbilical, utilizando bisturí (hoja n°21). Una vez alcanzada la cavidad abdominal, se exteriorizaron ambos cuernos uterinos grávidos con fórceps, hasta visualizar la

totalidad de fetos. Tras identificar la zona ovárica y púbica, se obliteraron las arterias ováricas y uterinas bilateralmente, en 4 puntos totales, utilizando electrocauterizador de baja temperatura (730°Celsius) (BoVie® low temperature, Florida, USA). Al ser visualizada la reducción del diámetro de las arterias uteroplacentarias con un mínimo de 60-70%, se procedió a reintroducir los fetos, cerrando las capas abdominales en dos planos con suturas absorbibles multifilamento Glicosorb® 5/0.

Posterior a la cirugía, los animales fueron inyectados con tramadol clorhidrato (2 mg/kg vía subcutánea, dosis única). Finalmente, los animales son devueltos a sus jaulas respectivas para recuperarse de la anestesia (normotermia y actividad motora), utilizando lámpara infrarroja de 250 watts durante 60 minutos aproximadamente.

Los animales del grupo SHAM (control quirúrgico), se procedió de igual manera que aquellos animales sometidos a cirugía RUPP, con la excepción de que en los animales SHAM, no se cauterizaron las arterias ováricas o uterinas.

Ambos grupos continuaron hasta el día 18,5 de gestación, siendo sometidos nuevamente a anestesia general, con el fin de extraer 100 µl de sangre entera para obtener suero sanguíneo, y recibir una inyección del colorante Evans Blue 2% (2 µl/gramo de peso corporal) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE. UU.) reconstituido en suero fisiológico NaCl 0,9% mediante venopunción yugular (20 min), lavado del excedente de EB por perfusión intracardiaca con PBS 1X (3ml por animal) y fijación con paraformaldehído 4% (3 ml por animal).

Los cerebros extraídos de estos animales fueron mantenidos en paraformaldehído 4% (4°C x 24 h), para posteriormente ser seccionados en matriz cerebral de ratón adulto, con cortes de 100 µm (coronal). Por tanto, el cerebro fue

seccionado en 9 segmentos, permitiendo distribuir las secciones en 3 anteriores, 3 intermedias y 3 posteriores (incluyendo cerebelo). Luego estos cortes histológicos fueron directamente visualizados en lupa estereoscópica y se registraron las fotografías de cada segmento en su cara anterior, para su posterior cuantificación digital (León et al., 2021).

### **Aislamiento de vesículas extracelulares**

Las sEVs placentarias fueron obtenidas del Biobanco perteneciente al Laboratorio de Fisiología Vascular, previamente generadas por León et al., 2021. Adicionalmente, se aislaron sEVs de plasma de embarazo normal (NP) y preeclampsia (PE) utilizando el mismo protocolo usado previamente en el laboratorio (identificadas en sección HUMANOS; ver más abajo en detalle).

En breve, para generar las sEVs, se utilizó protocolo de Miller et al., 2005, con el cual se incluyeron placentas de embarazo normal de 38-41 semanas de gestación de no más de 3 horas desde el alumbramiento (consentimiento informado entregado y firmado por cada paciente). Este protocolo fue autorizado por el comité de bioética del Hospital Herminda Martín - Chillán.

Se extrajeron desde las placentas y usando tijeras estériles, 4 secciones de 100 gramos, desde el lado materno placentario. Luego, se lavaron los explantes con abundante PBS1x a 4° C para extraer la mayor cantidad de sangre y detritus. Luego los explantes pasaron a incubación en placas de 100 mm con 20 ml de medio de cultivo 200 (Gibco, Lot:1749507) suplementado con 2% de suero bovino fetal, 100 IU/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (solución total depletada de nanopartículas por ultra centrifugación), para estabilizar los

explantes por 2 horas en incubadora a 37°C con 21% de oxígeno y 5% de CO<sub>2</sub>. Tras la estabilización, se vuelven a lavar abundantemente con PBS1x a 37°C, y se renueva el medio de cultivo, para posteriormente ser destinados a dos grupos de cultivo: el primero, en condiciones de normoxia (8 % O<sub>2</sub> sEVs-Nor) y el segundo, en hipoxia (1 % O<sub>2</sub> sEVs-Hyp). Condiciones en las cuales se mantuvieron por 18 horas a 37°C.

Para el aislamiento de sEVs desde los medios condicionados de placentas o de plasmas, se utilizó protocolo de Thery et al., 2006, utilizando centrifugaciones diferenciales, culminadas con una ultra centrifugación más prolongada. Las sEVs de placenta y plasma fueron caracterizadas previamente en términos de su número, tamaño y marcadores proteicos (Leon et al., 2021).

### **Evaluación de vesículas extracelulares mediante Western blot**

Se analizó el nivel de proteínas asociadas a angiogénesis, proteínas TJs y marcador placentario (PLAP, fosfatasa placentaria) humano en las muestras de sEVs-Nor, sEVs-Hyp y sEVs aisladas desde plasma de mujeres NP y PE.

Primeramente, las muestras fueron cuantificadas mediante BCA Protein Assay Kit (BCA Protein Assay Kit, Prod #23227), siguiendo protocolo del fabricante del Kit. Luego se realizó ensayo Western Blot, utilizando 70 µg de proteínas. Las membranas obtenidas se incubaron con anticuerpos primarios VEGF (Santa Cruz Biotechnology, INC, Europe; (JH121): sc- 57496, dilución 1: 2000 v / v), PlGF (Santa Cruz Biotechnology, INC, Europe; (37203.111): sc- 57402, dilución 1: 1000 v / v) Flt-1/VEGFR1 (Santa Cruz Biotechnology, INC, Europe; (D2): sc- 271789, dilución 1: 1000 v / v), Flk-1/KDR/VEGFR2 (Santa Cruz



Biotechnology, INC, Europe; (A-3): sc-6251, dilución 1: 1.000 v / v ), CLND5 (Santa Cruz Biotechnology, INC, Europe; (A-12): sc-374221, dilución 1: 1.000 v / v), Ocludina (Santa Cruz Biotechnology, INC, Europe; (E-5): sc-133256, dilución 1: 1.000 v / v), ZO-1 (Santa Cruz Biotechnology, INC, Europe; (R40.76): sc-33725, dilución 1: 1.000 v / v) y PLAP (Santa Cruz Biotechnology, INC, Europe; (8B6): sc-47691, dilución 1: 1000 v / v) durante 18 horas a 4°C, utilizando segmento membrana nitrocelulosa. Se utilizó la tinción de Rojo Ponceau (sección 72kDa) como control de carga.

Tras finalizar el periodo de incubación, se procedió a lavar las membranas con TBS 1x Tween 20. Luego las membranas fueron incubadas por 2 horas con anticuerpo secundario (dilución 1:5000, v / v) conjugado con peroxidasa Anti-Mouse IgG (Thermo Scientific, CA; Sigma-Aldrich, MO 63103, USA.) en el caso de VEGF, PIGF, PLAP, CLDN5, Ocludina, ZO-1. Para Flt-1/VEGFR1 y Flk-1/KDR/VEGFR2 se utilizó anticuerpo secundario (dilución 1: 3.000, v / v) conjugado con peroxidasa Anti-Rabbit IgG (Thermo Scientific, CA; Sigma-Aldrich, MO 31210, USA.) por 2 horas. A continuación, las membranas fueron lavadas y se incubaron con solución Westar Antares ECL substrate (Cyanagen, Italy) (dilución 1:1 v / v). Finalmente, se procedió a realizar el revelado mediante equipo receptor de luminiscencia GeneGnome XRQ (Syngene, California, USA) por 2 minutos (exposición) y digitalizadas en formato TIFF. Las bandas obtenidas se cuantificaron mediante el software ImageJ 1.48 (Instituto Nacional de la Salud, USA.).

## **Inyección de sEVs placentarias**

Los procedimientos de inyección endovenoso en los animales estudiados se realizaron bajo anestesia general con isoflurano inhalado (Isoflurano USP Baxter, Chile) (inducción 5% - mantención 2%, vaporizado con aire ambiental) usando un sistema de anestesia (Somnosuite low flow anesthesia system ®, Kent Scientifics, Connecticut, USA). Paralelamente, se mantuvo el control de temperatura corporal usando una plataforma térmica (Mice Warming platform®, Kent Scientifics) y lubricación ocular bilateral con lágrimas artificiales (Hipromelosa 0,7%, Pharmatek Chile SPA).

Para la inyección de sEVs, se prepararon 200 µg (Xian et al., 2017) de sEVs-Nor y sEVs-Hyp en suspensión hasta lograr un volumen final máximo de 100 µl con suero fisiológico NaCl 0.9%, según metodología previamente descrita en nuestro laboratorio (León et al., 2021). Las sEVs reconstituidas se inyectaron de forma aséptica con jeringa de insulina (aguja 30 gauge) en la vena yugular externa de los animales. Tras la inyección los animales fueron desconectados de la máscara anestésica y monitorizados hasta que recuperen la actividad motora coordinada y temperatura corporal de 36-37°C. Esta recuperación se realizó colocando los animales bajo una lámpara infrarroja de 250 watts por 30 minutos aproximadamente.

## **Obtención de muestras sanguíneas de ratón**

Se obtuvieron muestras sanguíneas de los animales a las 6 y 24 horas post inyección de sEVs (Nor e Hyp) (previamente a la administración de solución colorante EB endovenoso, ver más abajo). Los volúmenes sanguíneos máximos

de extracción de sangre en el ratón adulto (o mayor a 20 gramos de peso) no superaron el 10% del volumen circulante (Sadler y Bailey, 2013), evitando de esta manera que se produjese hipotensión, o alteraciones de la frecuencia cardiaca o bienestar animal. De forma paralela, se realizó una restitución preventiva de los volúmenes circulantes extraídos con suero fisiológico NaCl 0,9%. Para la extracción de muestras sanguíneas se consideró la punción de la vena yugular externa contralateral a ser utilizada para la inyección de sEVs (Nor e Hyp) o NaCl 0,9%(CTL), como se describió anteriormente. Las muestras de sangre se colocaron en tubos Eppendorf, sin anticoagulante, para obtención de suero sanguíneo mediante centrifugación (1.400 rpm x 10 minutos). Posteriormente, las muestras de suero fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis.

### **Evaluación de suero sanguíneo de ratón mediante Dot blot**

Se analizó el nivel de proteínas asociadas a angiogénesis, inflamación y PLAP, en las muestras de suero sanguíneo murino post 6 y 24 horas de la inyección de tratamientos con sEVs-Nor y sEVs-Hyp. Luego de la cuantificación de la concentración de proteínas, se realizó ensayo Dot blot. Este se realizó con membrana de nitrocelulosa de 0,2  $\mu$ m (Bio-rad Laboratories, Cod: 1620112, California, EE. UU) siguiendo protocolo del fabricante. Brevemente, usamos 50  $\mu$ g (volumen final 2 $\mu$ l para todas las muestras) de proteínas para impregnarlas en la membrana. Las membranas obtenidas se bloquearon e incubaron con anticuerpos primarios VEGF, PIGF, Flt-1/VEGFR1, PLAP, e IL6 (Santa Cruz Biotechnology, INC, Europe; (C12-1-hIL-6): sc- 32296, dilución 1: 1000 v / v) e Interleucina 8 (IL8) (Santa Cruz Biotechnology, INC, Europe; (C-11): sc- 376750, dilución 1: 1000 v /

v) durante 18 horas a 4°C, en concentración similar a la usada en western blot (indicado previamente). La membrana de nitrocelulosa teñida con Rojo Ponceau se usó como control de carga.

Tras finalizar el periodo de incubación, y sus respectivos lavados, las membranas fueron incubadas por 2 horas con anticuerpo secundario según lo indicado previamente en la sección de Western blot. Las marcas obtenidas (dots, puntos) se cuantificaron mediante el software ImageJ 1.48 (Instituto Nacional de la Salud, USA.).

### **Evaluación neurológica seriada**

Antes y después de la inyección de las vesículas, se evaluó cuantitativamente el compromiso neurológico en los animales usando la **Escala Rápida de Coma y Comportamiento Murino** (RMCBS, por sus siglas en Ingles) (Carroll et al, 2010). La escala RMCBS evalúa 10 parámetros, cada uno con un puntaje de 2, y el puntaje máximo de 20, considerado como evaluación normal. Cada animal fue completamente evaluado en 3 minutos en dos periodos de 90 segundos, con mínimo estrés e intervención del operador. Las evaluaciones fueron grabadas y el análisis fue realizado independientemente del grupo experimental. Adicionalmente, todos los experimentos fueron generados en comparación head-to-head, es decir se evaluaron en forma paralela animales de los grupos experimentales.

La escala RMCBS esta validada para detectar la existencia de síndrome clínico neurológico (Carroll et al., 2010). Esta evaluación se realizó en el tiempo 0, 3, 6, 12 y 24 horas, siendo el tiempo 0 previo a la inyección endovenosa de sEVs.

Todas las evaluaciones fueron registradas con los animales sin anestesia, ni sedación.

Brevemente, los animales fueron extraídos individualmente de su jaula en el tiempo estimado y se posicionaron en una cubierta acrílica de fondo ranurado (perteneciente al mismo habitáculo), con dimensiones establecidas de 31,8 cm largo; 19,8 cm de ancho; y 10,5 cm de alto. En este habitáculo se aplicó la escala según se indica en la **Tabla 1**.

### **Medición de presión arterial y pulso**

Al inicio (tiempo 0) y luego de 24 horas tras inyección de las sEVs, se midió la presión arterial y pulso de cada animal usando un sistema no invasivo (CODA®, Kent Scientifics, USA) (Feng et al., 2009; Lara et al., 2022). Las mediciones se realizaron bajo anestesia (isoflurano 2%), y consideró un periodo de estabilización hemodinámica de 3 minutos previo a todas las mediciones. De estas mediciones se consideraron los valores de presión arterial sistólica, diastólica y presión arterial media; así como también la medición de la frecuencia cardíaca. Para la estimación del valor, se consideró un mínimo de 3 ciclos regulares y homogéneos.

### **Inyección de Evans blue (EB) y análisis de cerebros**

Una vez finalizado el periodo de 6 y 24 horas de tratamiento con sEVs-Nor, sEVs-Hyp, los animales recibieron una inyección del colorante EB 2% (2 µl/gr de peso corporal) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE. UU.) reconstituido en suero fisiológico (NaCl 0,9%) mediante venopunción yugular. Tras 20 minutos en circulación, los animales fueron eutanasiados con una sobredosis de isoflurano

inhalado. En forma paralela se realizó la técnica de perfusión intracardiaca anteriormente descrita. Tras la muerte y fijación completa del animal, se les decapito y extrajo el cerebro, registrando su peso fresco.

Los cerebros fueron mantenidos en paraformaldehído 4% (4°C x 24 h), para posteriormente ser seccionados en matriz cerebral de ratón adulto, siguiendo el mismo protocolo utilizado en los animales sometidos al modelo RUPP anteriormente descrito.

**Tabla 1. Escala Rápida de Coma y Comportamiento Murino (RMCBS).**

<b>Item</b>	<b>Puntuación</b>	<b>Descripción</b>
<b>COORDINACIÓN</b>		
<b>Marcha</b>	0-2	Ninguna-Atáxica-Normal
<b>Equilibrio</b>	0-2	Sin extensión corporal - Extensión delantera pared - Elevación completa
<b>EXPLORACIÓN</b>		
<b>Habilidad motora</b>	0-2	Ninguno - 2 a 3 esquinas en 90 segundos - 4 esquinas en 15 segundos
<b>FUERZA Y TONO</b>		
<b>Posición corporal</b>	0-2	Decúbito lateral – Encorbado – Extensión total
<b>Fuerza apendicular</b>	0-2	Hipotónico, sin sujeción – Tracción débil (fuerte solo anterior) – Tracción fuerte (se aleja activamente)
<b>REFLEJOS Y AUTOPRESERVACIÓN</b>		
<b>Reflejo retirada</b>	0-2	Ninguno – Unilateral – Instantáneo y bilateral (en 3 intentos)
<b>Reflejo aural</b>	0-2	Ninguno – Unilateral – Instantáneo y bilateral (en 3 intentos)
<b>Reflejo podal</b>	0-2	Ninguno – Unilateral – Instantáneo y bilateral (en 3 intentos)

<b>Agresividad</b>	0-2	Ninguno- Muerde con corte cola – Muerde previo corte cola (en 5 segundos)
<b>COMPORTAMIENTO DE HIGIENE</b>		
<b>Acicalamiento</b>	0-2	Pelaje desorganizado – polvoriento/piloerección – normal/ brillante

### **Cuantificación de extravasación de EB**

En las imágenes de cada segmento cerebral, se procedió a cuantificar la intensidad (moda) de canal azul mediante histograma color (software ImageJ®), la cual se distribuye entre 0 y 240. Para seleccionar los segmentos con evidencias de extravasación y disrupción de la BHE, se cuantificó una muestra cerebral de ratón como control positivo de EB (animal inyectado con colorante pero sin proceso de perfusión intracardiaca con PBS1x ni paraformaldehído 4% respectivos). Esta estandarización determinó que el colorante EB alojado a nivel cerebral, presenta intensidades entre 75 y 110 del histograma.

Una vez obtenidos los valores de todos los segmentos con respecto a su intensidad de color azul (moda), se procedió a seleccionar solo aquellos segmentos que poseen intensidades entre 75 y 110 (correspondiente a EB de referencia), considerándolos positivos a extravasación del colorante. Los valores se expresan como el porcentaje de segmentos positivos a EB en cada animal (tratamiento), por áreas cerebrales (segmentos anteriores, intermedios o posteriores) a las 24 horas post inyección de sEVs.

### **Western blot en tejido cerebral de ratón.**

Las proteínas de cada segmento cerebrales fueron extraídas de las muestras obtenidas a las 6 horas post inyección de sEVs. Primeramente, las muestras fueron preparadas en tampón de lisis (Tris HCL, pH 8, 20 mM; NaCl 137 mM; EDTA 2 mM; glicerol al 10%, Nonidet P-40 al 1%) más inhibidor de proteasas (Thermo Scientific, CA, EE. UU.). Luego se homogenizan durante 5 minutos a 5000 rpm. A continuación, las muestras se centrifugaron a 2.000 g a 4 ° C durante 20 minutos. Se extrajo el sobrenadante proteico y se cuantificaron las muestras por BCA Protein Assay Kit (BCA ProteinAssay Kit, Prod #23227), con espectrofotómetro a 620 nm (EPOCH, BioTek Instruments, USA). Posteriormente, 50 µg de proteínas fueron utilizados para ensayos de Western blot, según lo indicado anteriormente. Las proteínas de interés fueron CLDN5 (Santa Cruz Biotechnology, INC, Europe; (A-12): sc- 374221, dilución 1: 1000 v / v), PLAP (Santa Cruz Biotechnology, INC, Europe; (8B6): sc- 47691, dilución 1: 1000 v / v) y IBA1 (Santa Cruz Biotechnology, INC, Europe; (1022-5): sc- 32725, dilución 1: 1000 v / v). Se usó β-actina (Sigma Aldrich, MO, EE. UU., Clon AC-74, dilución 1: 15000 v / v) como control de carga.

### **Cultivo celular de endotelio cerebral de ratón (BEND/3)**

Células bEnd.3 fueron cultivadas en medio de cultivo Gibco™DMEM (catalog: 12491015, ThermoFisher Scientific, USA) a 37°C, 21% oxígeno y 5% de CO<sub>2</sub> en placas de 60 mm. Una vez alcanzada la confluencia necesaria (80%), las células fueron mantenidas con 1000 µl de medio de cultivo, y fueron tratadas con 100 µg de sEVs (6 h, v/v). Tras la incubación, se eliminó el medio condicionado



lavándolas con PBS 1x 37°Celsius. Luego se procedió a extracción de proteínas con 60 µl de tampón de lisis (Tris HCL, pH 8, 20 mM; NaCl 137 mM; EDTA 2 mM; glicerol al 10%, Nonidet P-40 al 1%) más inhibidor de proteasas (Thermo Scientific, CA, EE. UU.). Las placas fueron colocadas sobre Gelpack congelado para proceder a raspado de la placa con espátula plástica, así extrayendo el contenido proteico celular.

El sobrenadante de las extracciones celulares fue usado para la cuantificación de proteínas y luego para análisis de Western Blot para la identificación de CLDN5, como fuera descrito previamente.

### **Internalización de vesículas extracelulares en línea celular hCMEC/D3**

Se utilizó PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit (MINI67-1KT, Sigma-Aldrich, Distributed for Phanos Technologies) para marcar fluorescentemente las sEVs, basando en protocolo modificado previamente en el laboratorio ajustándose a este experimento (León et al, 2021).

Se usaron, 100 µg de muestra de sEVs-Nor o sEVs-Hyp que fueron marcadas con PKH67 (2µM) por 5 minutos a temperatura ambiente. Cumplido el tiempo, las sEVs Nor o Hyp + PKH67 diluido y PBS 1x + PKH67 diluido (control negativo) son traspasadas a tubos Amicon Ultra 100 kDa (Millipore, UFC510096), y se realizaron lavados con PBS 1x (depletado de nanopartículas) seguidos por centrifugaciones a 2500 g x 20 minutos.

Para realizar el ensayo de internalización de sEVs marcadas con PKH67, se utilizó línea celular de endotelio cerebral humano (hCMEC/D3) cultivadas en placas de cultivo de 24 Wells (Corning® Costar® TC-Treated Multiple Well Plates,

USA), con inserto de vidrio circular de 12mm x 0.14mm, con medio EndoGro™ MV Supplement Kit (Catalog #SCME004-S, Lot # 3035216) a 37°C con 21% de oxígeno y 5% CO<sub>2</sub>, como fuera descrito previamente por nuestro grupo (León et al., 2021).

Alcanzando un 80% de confluencia celular, las células son tratadas con las sEVs (100 µg) marcadas con PKH67, y mantenidas por 30 minutos en 2 condiciones. La primera condición es nuevamente en estufa de cultivo a 37°C (21% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>) para visualizar el ingreso de sEVs. La segunda condición es tratando las células con frío, generando dormancia celular a 4°C (21% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>) para evaluar si el ingreso de sEVs es dependiente o no de energía celular (Bonsergent et al, 2021).

Finalizados ambos experimentos, se procedió a lavar cada pocillo con PBS a 37°C y luego se les añadió 200 µl de PFA 4% por 10 minutos. Se lavan nuevamente con PBS 1x a 4°C, para finalmente incubar por 10 minutos con 200 µl de solución DAPI (dilución 1:1000, v / v).

Luego de finalizada la incubación con DAPI, se montaron los insertos con células en portaobjetos respectivos, aplicando a cada uno 3 µl de DAKO Mounting Medium (CS70330-2; Agilent Technologies, CA-USA). Usando microscopio de fluorescencia EVOS FL Cell Imaging System (Model: AMF4300, ThermoFisher Scientific, USA), se procede a capturas de imágenes en canales DAPI/FITC con ocular 10x y objetivo 100x (oil).

### **Resistencia eléctrica transendotelial (TEER)**

Se cultivaron células hCMEC/D3 en placas de 24 wells, con inserto Transwell de 0,8  $\mu\text{m}$  (COSTAR, 24 Well Plate, Ref # 3422, Lot #28816041, USA) previamente tratados 18 horas con colágeno tipo I de cola de rata (CORNING, Discovery Labware, Ref # 354236, Lot # 6207007, USA) y mantenidas en medio EndoGro TM MV Supplement Kit (Catalog # SCME004-S, Lot # 3035216) a 37°C, 21% oxígeno y 5% de CO<sub>2</sub>. El parámetro utilizado para determinar la presencia de alta confluencia celular (mínimo 80%), por desarrollo íntegro de monocapa endotelial, fue la medición de TEER utilizando equipo Epithelial Voltohmmeter EVOM2 (Model EVOM2, Serial # 174695, World Precision Instruments, USA).

Mediciones de TEER basales mínimos de 200 milivolts se consideraban aceptables como indicativo de monocapa endotelial (estandarización previamente establecida en el laboratorio). Una vez obtenidos estos valores de TEER aceptables, se privaron las células utilizando medio basal EndoGro sin suplementos, y luego de 6 horas de estabilización, se registró la primera medición de TEER (previo a tratamiento de sEVs) utilizando el equipo. Inmediatamente, se administraron 100  $\mu\text{g}$  de proteínas de sEVs-Nor o sEVs-Hyp en la cámara superior del transwell, dejándola en incubador por 12 horas, 37°C con 21% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>.

Una vez cumplido el tiempo de tratamiento, se midió nuevamente la TEER, definiéndola como la valoración final del experimento (valores que posteriormente se convirtieron a Ohms ( $\Omega$ ) para su análisis. Se calculó el porcentaje de cambio del TEER en función de la medición previa a la incubación con sEVs, usando la siguiente fórmula  $((\text{TEER final} - \text{TEER inicial}) \times 100) / \text{TEER inicial}$ .

### **Permeabilidad celular a dextrano 70kDa**

Posteriormente, a los experimentos de TEER, se realizó determinación de permeabilidad celular a molécula fluorescente de alto peso molecular. Se usó 50 µl de solución FITC dextrano 70 kDa (ChemCruz, sc-263323, Lot # B0717) a una concentración de 4 µM, previamente calentada a 37°C, en la cámara superior, dejando en incubación por 30 minutos.

Posterior a ese tiempo, se procede a recoger el medio de la cámara inferior del transwell en tubos eppendorf ámbar, y se almacenaron a -20°C. Se utilizó equipo espectrofotómetro (EPOCH, BioTek Instruments, USA) con filtros de fluorescencia a 485 nm y de referencia a 540 nm para determinar las unidades de fluorescencia presentes en el medio colectado, como indicador de disrupción de la monocapa endotelial, y consiguiente paso del fluoroforo hacia la cámara inferior de cultivo.

### **Fraccionamiento celular en hCMEC/D3**

Células hCMEC/D3 fueron tratadas por 6 y 12 horas con sEVs-Nor o sEVs-Hyp, y 3 horas con sEVs aisladas desde plasma de embarazo normal (NP) y preeclampsia (PE) para detectar proteína total. Adicionalmente se trató durante 12 horas con sEVs (Nor o Hyp) y 3 horas con sEVs de NP o PE a células hCMEC/D3 para realizar fraccionamiento celular, (protocolo descrito por Kauffman et al., 1990; Troncoso et al., 2017; Graham., 2020).

Para detección de proteína en fraccionamiento celular, el tampón de lisis extraído con células fue dispuesto en tubos Eppendorf para realizar homogenizado y aumentar el fraccionamiento de las células, utilizando una jeringa de insulina de

1000ul y aguja de 27gauge, realizando 15 aspiraciones procurando producir la menor cantidad de burbujas. Luego se procedió a realizar centrifugaciones seriadas: la primera es a 2.000 rpm x 10 minutos, obteniendo un pellet (núcleo) y sobrenadante (citoplasma + membrana celular). Se aspiró con pipeta el sobrenadante y se pasó a un nuevo tubo eppendorf, para ser centrifugado a 14.000 rpm x 30 minutos. Finalmente, se obtuvo en la muestra un sobrenadante (citoplasma) y un pellet (membrana celular), esta última fracción fue suspendida en 20ul de tampón lisis (previamente descrito). Tras esto, las muestras se almacenaron a -80°Celsius para su posterior utilización.

Una vez obtenidas las proteínas totales (3, 6 y 12 horas post sEVs) y fracciones celulares (membrana y citoplasma celular post 3 y 12 horas de sEVs) se procedió a cuantificar las proteínas totales mediante BCA Protein Assay Kit (BCA Protein Assay Kit, Prod #23227), siguiendo protocolo del fabricante del Kit.

Posteriormente, se realizó el ensayo Western Blot, detallado previamente, utilizando 50 µg de proteínas para la detección de CLND5 (Santa Cruz Biotechnology, INC, Europe; (A-12): sc-374221, dilución 1: 1.000 v / v) como fuera descrito previamente.

### **Tamaño muestral**

El “n” muestral para cada ensayo *in vitro* se calculó mediante la fórmula de comparación de dos medias con un nivel de confianza del 95%, poder estadístico de 90%, precisión de 0,21 y varianza de 0,009, y se obtuvo un “n” mínimo de 4 por grupo de estudio.

En el caso del cálculo para ensayos *in vivo*, se utilizó un nivel de confianza del 95%, poder estadístico de 90%, precisión de 2 y varianza de 1.130, resultando un “n” de 6 animales por grupo (Fernández et al., 2010).

Ambos cálculos consideran los valores de cambio encontrados en estudios previos con administración de vesículas extracelulares placentarias (León et al., 2021).

### **Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos se compararán mediante análisis ANOVA paramétrico o no paramétrico, según sea apropiado. Los análisis serán expresados como media  $\pm$  S.E.M.  $p < 0,05$  es considerado estadísticamente significativo.

Se utilizó GraphPad Prism 7.0a (GraphPad Software, San Diego, CA) para el análisis estadístico de los datos.

## **RESULTADOS**

### **1. Western blot de sEVs aisladas de cultivos placentarios**

La caracterización en número y tamaño de las sEVs fue previamente publicada por nuestro grupo (León et al., 2021). En este trabajo, se procedió a analizar parcialmente el contenido de estas vesículas. Así, se observó que las sEVs provenientes de cultivos placentarios hipóxicos (sEVs-Hyp) poseen mayor cantidad de VEGF (Fig. 2B), PLGF (Fig. 2C) y el marcador específico placentario, PLAP (Fig. 2F) con respecto al grupo sEVs-Nor. No se evidenciaron diferencias significativas en el contenido de FLT1, ni KDR entre ambos grupos estudio (Fig. 2D y 2E, respectivamente).

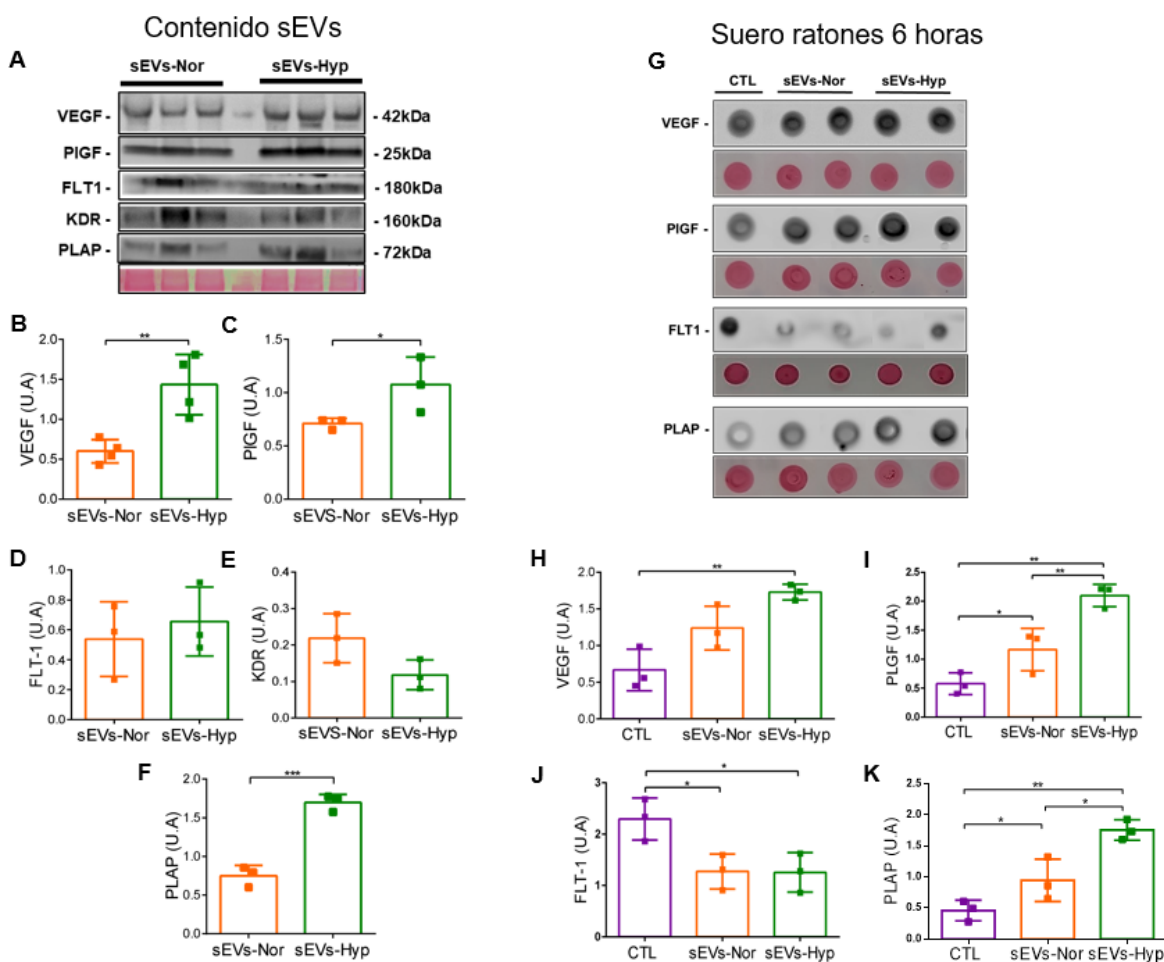
### **2. Dot blot de suero sanguíneo de ratón**

Los resultados obtenidos mediante Dot blot de suero obtenido de ratones a las 6 horas tras la inyección endovenosa de sEVs-Nor o sEVs-Hyp, evidencia que aquellos animales del grupo sEVs-Hyp presentan un aumento (62%) en los niveles de VEGF (Fig. 2H), PLGF (73%, Fig. 2I) y PLAP (73 % Fig. 2K) con respecto al grupo control. Los niveles de PIGF y PLAP además fueron significativamente distintos entre el grupo sEVs-Hyp y sEVs-Nor. Paralelamente, se observa una reducción en los niveles circulantes de FLT1 tanto en los grupos sEVs-Nor como sEVs-Hyp con respecto a CTL (45 %, Fig. 2J).

### **3. Evaluación clínica general de los ratones expuestos a sEVs**

Se determinó mediante RMCBS el estado neurológico y general de los animales inyectados con sEVs-Nor y sEVs-Hyp. Se encontró que aquellas ratonas

tratadas con sEVs-Hyp presentan una disminución significativa en el puntaje total de la escala, a partir de las 3 horas (Fig. 3A), lo cual fue además progresivo hasta el final de la evaluación (24 h), respecto al grupo CTL o sEVs-Nor. Este fenómeno, no se encontró en aquellos animales inyectados con sEVs-Nor.

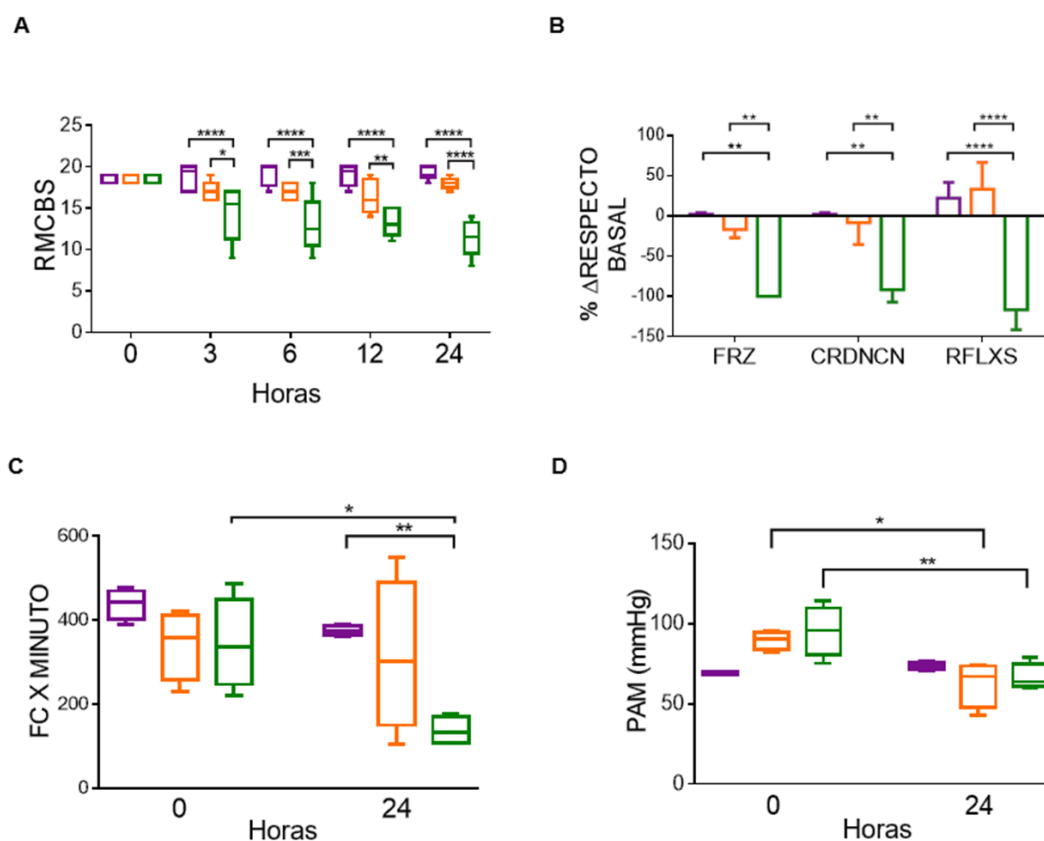


**Figura 2. Contenido de sEVs aisladas de cultivos placentarios, y proteínas presentes en la circulación a las 6 horas post tratamiento con sEVs-Nor y sEVs-Hyp. A.** Western blot de proteínas asociadas a sEVs provenientes de cultivos placentarios, control de carga ponceau. **B.** Vascular endothelial growth factor (VEGF). **C.** Placental growth factor (PLGF). **D.** Receptor 1 de VEGF o Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 1 (FLT1). **E.** Kinase Insert Domain Receptor o receptor 2 de VEGF (KDR). **F.** Placental alkaline phosphatase (PLAP). **G.** Dot blot de proteínas asociadas a angiogénesis y marcador placentario en suero sanguíneo de ratón 6 horas post sEVs. **H.** Niveles relativos de VEGF. **I.** PLGF. **J.**



FLT1. Y K. PLAP a nivel circulante. Morado: CTL; Anaranjado: sEVs-Nor; Verde: sEVs-Hyp. Cada punto representa una extracción independiente o animal de experimentación. Los valores se expresan en medias  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Específicamente, cuando analizamos los resultados considerando los parámetros evaluados en la escala, encontramos que la reducción en el puntaje total del grupo sEVs-Hyp se asocia a déficits en los parámetros neurológicos como la fuerza, coordinación y reflejos espinales (Fig. 3B). Mientras que, no se evidencian diferencias significativas con la habilidad de exploración del animal, ni el comportamiento de higiene.



**Figura 3. Escala RMCBS y evaluación cardiovascular 24 horas post tratamiento con sEVs. A.** RMCBS total (puntaje máximo y normal es 20 puntos). **B.** RMCBS específico (% $\Delta$ RESPECTO BASAL=porcentaje de cambio según su propio basal), a las 24 horas. **C.** Frecuencia cardiaca (FC x minuto) y **D.** Presión

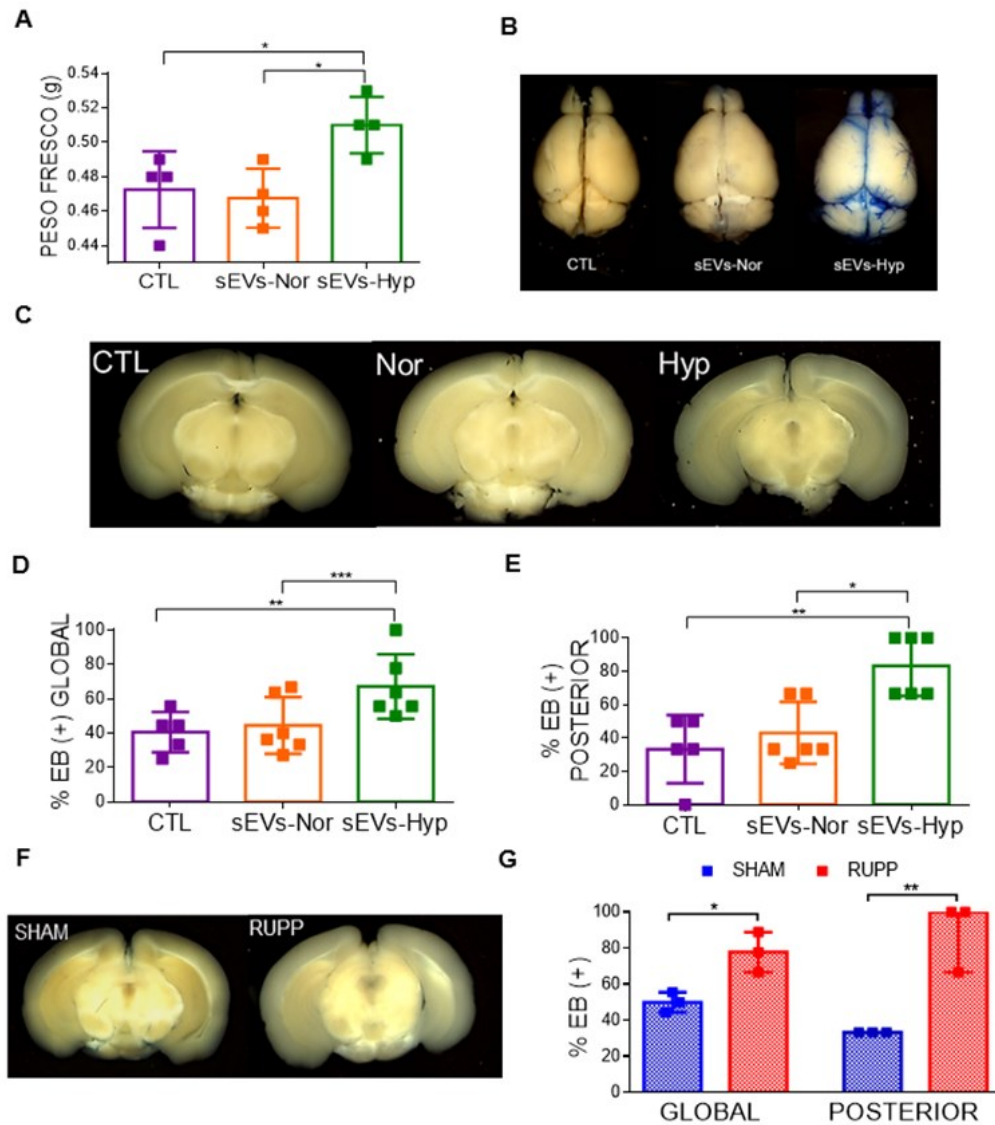
arterial media (PAM), al tiempo 0 (inicial-basal) y 24 horas post tratamiento con sEVs. Morado: CTL; Anaranjado: sEVs-Nor; Verde: sEVs-Hyp. Cada punto representa una extracción independiente o animal de experimentación. Los valores se expresan en medias  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Además, se evidenció una marcada reducción de la frecuencia (bradicardia) (Fig. 3C), que se asoció con reducción significativa de la presión arterial media en el grupo sEVs-Hyp con respecto a su propio basal (Fig. 3D). En el grupo sEVs-Nor también se observó una reducción significativa en la presión arterial media con respecto a su propio basal.

#### **4. Disrupción de la BHE *in vivo***

Los animales tratados con sEVs-Hyp presentan un mayor peso fresco del cerebro a las 24 horas post tratamiento (Fig. 4A). Externamente, al momento de extraer los cerebros post evaluación clínica, los animales tratados con sEVs-Hyp, presentaban mayor cantidad de extravasación de EB (Fig. 4B) en comparación con aquellos tratados con sEVs-Nor. Además, al cortar los cerebros en segmentos específicos, se evidenció que los animales tratados con sEVs-Hyp presentan una mayor cantidad de segmentos positivos a EB en el parénquima cerebral (Fig. 4D) y que éste se alojaba preferencialmente en la zona posterior (Fig. 4C y 4E, zona occipital y cerebelo).

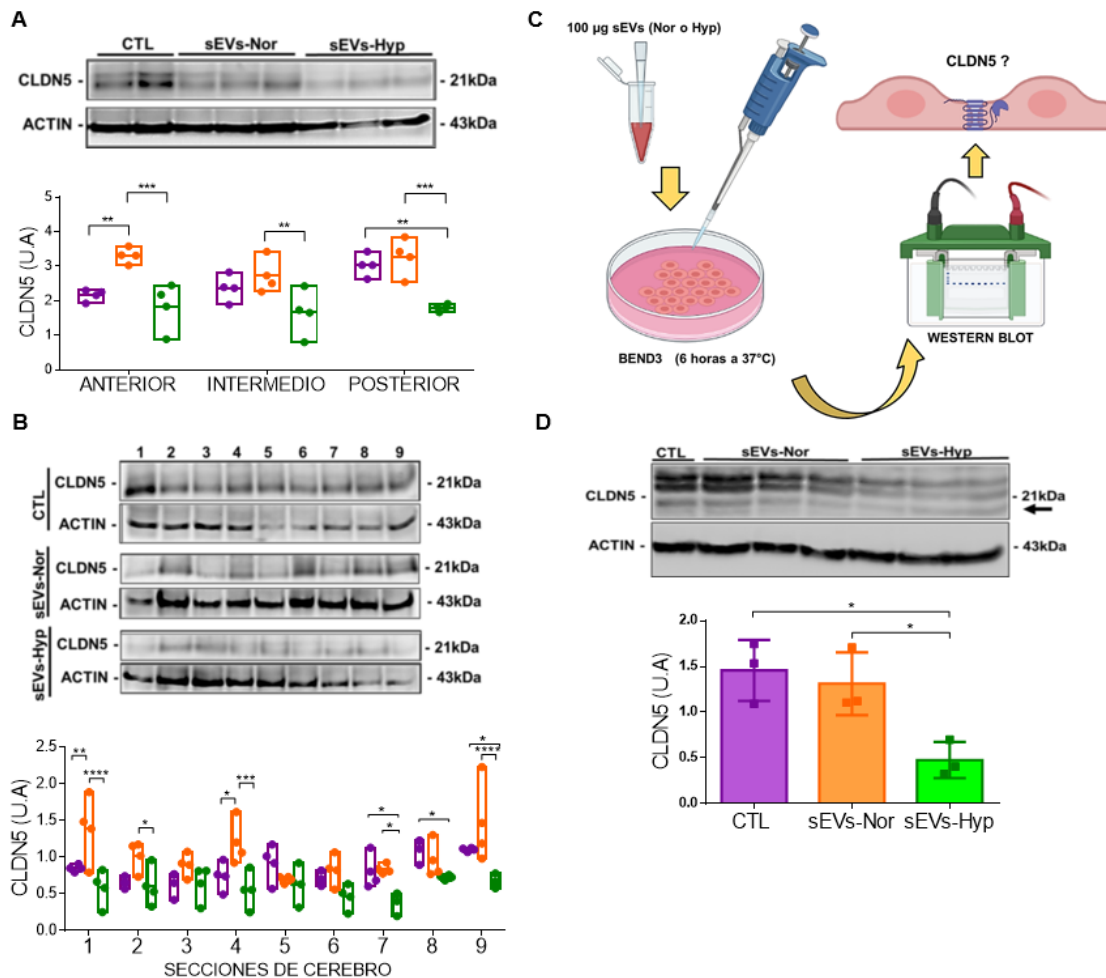
En experimentos paralelos simulando PE, encontramos que los animales preñados y sometidos a RUPP presentaban (al cuarto día post-cirugía) una mayor cantidad de segmentos positivos a EB, y que igualmente este colorante se ubicaba en la zona posterior del encéfalo, en comparación con animales SHAM (Fig. 4F y 4G).



**Figura 4. Análisis de cerebros tras 24 horas de sEVs y cerebros de ratonas gestantes sometidas a RUPP. A.** Peso fresco de cerebros a las 24 horas de inyección de sEVs. **B.** Imagen representativa exterior de los cerebros extraídos. **C.** Extravasación de EB en la zona cerebral posterior de los grupos estudio. **D.** Cuantificación de segmentos positivos a EB considerando todos los segmentos cerebrales y **E.** Correspondientes a la zona posterior del cerebro de los grupos estudio. **F.** Imagen representativa de segmentos positivos a EB en la zona posterior de grupos SHAM v/s RUPP y **G.** Cuantificación de segmentos positivos a extravasación de EB en todos los segmentos, o en la zona posterior del cerebro en el modelo RUPP. Morado: CTL; Anaranjado: sEVs-Nor; Verde: sEVs-Hyp. Cada punto representa una extracción independiente o animal de experimentación. Los valores se expresan en medias  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

## 5. CLDN5 en tejido cerebral de ratón y línea celular BEND3 tratados con sEVs placentarias

Inicialmente, buscamos identificar la presencia de PLAP en los extractos de cerebro analizados. Pero, con la técnica utilizada (western blot), esto no pudo ser posible en ninguna de las secciones analizadas de los animales expuestos a sEVs-Nor o sEVs-Hyp (6 h) (Fig.S2B).



**Figura 5. CLDN5 en segmentos cerebrales y células BEND/3 tras 6 horas de tratamiento con sEVs.** **A.** Cuantificación CLDN5 total en las tres áreas cerebrales estudiadas y **B.** En cada una de las secciones cerebrales generadas. **C.** Imagen representativa de experimento con sEVs en células BEND/3. **D.** Cuantificación CLDN5 en células BEND/3 tratadas con sEVs durante 6 horas. Morado: CTL; Anaranjado: sEVs-Nor; Verde: sEVs-Hyp. Cada punto representa una extracción

independiente o animal de experimentación. Los valores se expresan en medias  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

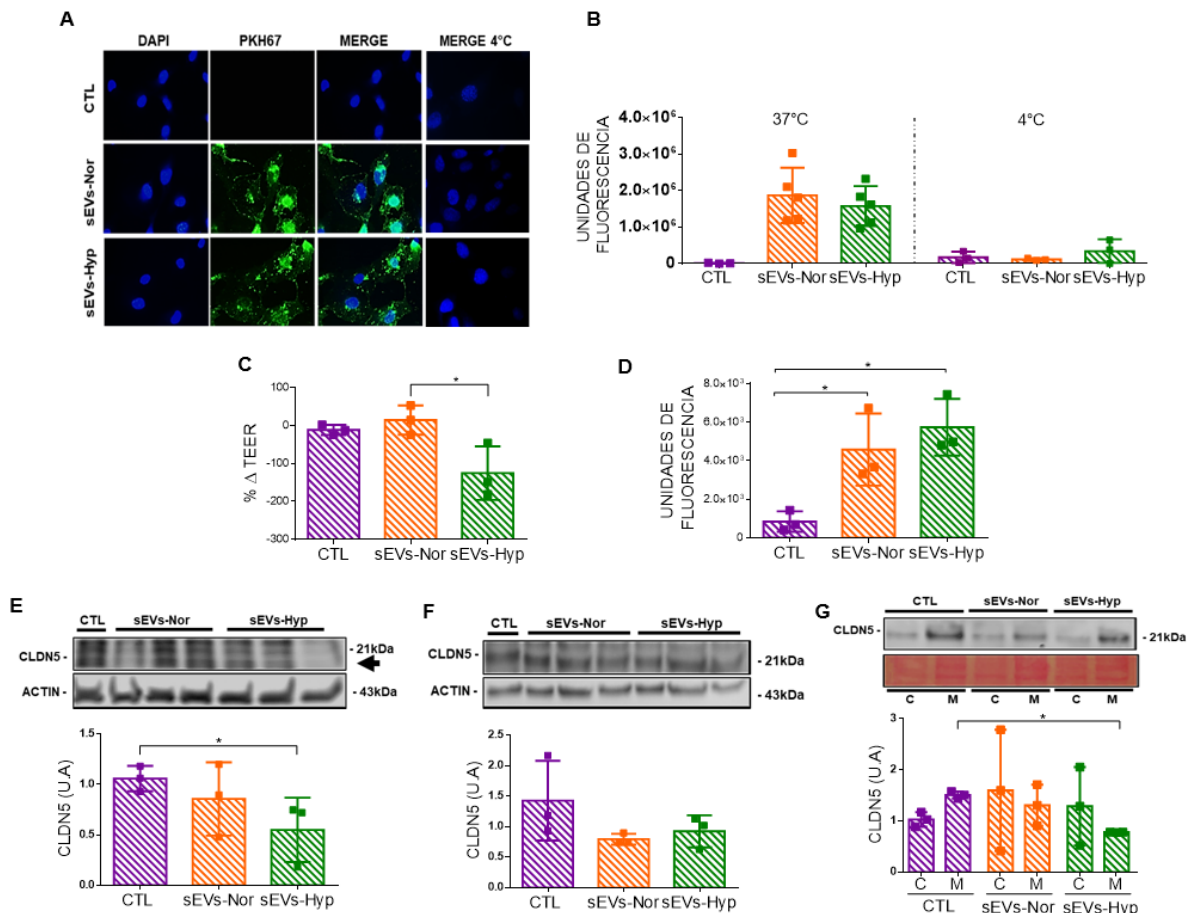
Pese a ello, encontramos que los animales tratados con sEVs-Hyp presentan una reducción significativa en la cantidad de CLDN5 en la zona anterior, media y posterior del cerebro en comparación con los animales tratados con sEVs-Nor. Mientras que en comparación con el grupo CTL, esta reducción fue significativa únicamente en la zona posterior cerebral (Fig. 5A). En el caso de sEVs-Nor, por el contrario, se observa un aumento significativo de esta proteína en la zona anterior cerebral (Fig. 5A).

Además, se evidenció en una segunda instancia, el perfil de cambio que tiene CLDN5 a nivel de todos los segmentos cerebrales a las mismas 6 horas. En el caso de los cerebros de animales inyectados con sEVs-Hyp se encontró una reducción significativa en los segmentos 7, 8 y 9 respecto a las mismas secciones en los animales tratados con sEVs-Nor (Fig. 5B). Estas secciones corresponderían al área occipital y cerebelo. En cambio, aquellos animales tratados con sEVs-Nor el aumento observado en el análisis total, se debería principalmente al aumento presente en la sección 1 del cerebro, la cual corresponde al bulbo olfatorio (Fig. 5B).

Paralelamente a las 6 horas post sEVs, se evidenció en los mismos segmentos cerebrales posteriores, en que ocurre una reducción de CLDN5 en grupo sEVs-Hyp, que existe además una reducción de HIF y VEGF (con respecto a sEVs-Nor y CTL respectivamente), sin cambios significativos en FLT-1 (Fig.S2C).

## 6. Internalización de sEVs placentarias marcadas con PKH67 en línea celular hCMEC/D3.

En busca de translación hacia el contexto humano, realizamos ensayos *in vitro* usando células endoteliales de la microcirculación cerebral humana (hCMEC/D3). Inicialmente, mostramos que las sEVs marcadas con PKH67 son captadas por células hCMEC/D3 (30 min) (Fig. 6A), sin diferencias significativas en la cantidad de fluorescencia emitida entre sEVs-Nor y sEVs-Hyp. Sin perjuicio de ello, la fluorescencia detectada en células tratadas con sEVs fue significativamente mayor a las del grupo control (sin sEVs) (Fig. 6B).



**Figura 6. Modelo *in vitro* de sEVs en línea celular hCMEC/D3. A.** Imágenes representativas con microscopía de fluorescencia de células hCMEC/D3 internalizando sEVs marcadas con PKH67 a 37°C o 4°C. **B.** Cuantificación

fluorescencia de los experimentos indicados en A (30 min). **C.** Ensayo de resistencia eléctrica transendotelial (TEER) y **D.** Ensayo de permeabilidad de monocapa celular al traspaso de dextrano 70 kDa en células hCMEC/D3 tratadas con sEVs por 12 horas. **E.** Western blot CLDN5 a las 6 horas o **F.** 12 horas post tratamiento con sEVs **G.** Fraccionamiento celular (C: citoplasma y M: membrana) a las 12 horas post sEVs. Morado: CTL; Anaranjado: sEVs-Nor; Verde: sEVs-Hyp. Cada punto representa una extracción independiente o animal de experimentación. Los valores se expresan en medias  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ .

Además, a fin de detectar que se trata de un fenómeno de captación activa, los experimentos fueron realizados a 4°C, mostrando que la marcación fluorescente no es detectada en esta condición experimental (Fig. 6B).

## 7. Disrupción de la BHE *in vitro* por sEVs-Hyp

Analizamos la función de barrera de las hCMEC/D3 en presencia de sEVs. Los valores de TEER disminuyeron tras 12 horas de tratamiento con sEVs-Hyp (Fig. 6C) en comparación con sEVs-Nor. Complementariamente, los grupos tratados con sEVs-Nor o sEVs-Hyp aumentan la permeabilidad al paso de Dextrano 70 kDa, en comparación con el control (sin sEVs). No encontramos diferencias significativas en la permeabilidad entre células tratados con sEVs-Nor o sEVs-Hyp (Fig. 6D).

## 8. CLDN5 en células hCMEC/D3 tratadas con sEVs

Las hCMEC/D3 tratadas con sEVs-Hyp presentan una reducción significativa (48%) de CLDN5 respecto al grupo CTL a las 6 horas de exposición (Fig. 6E).

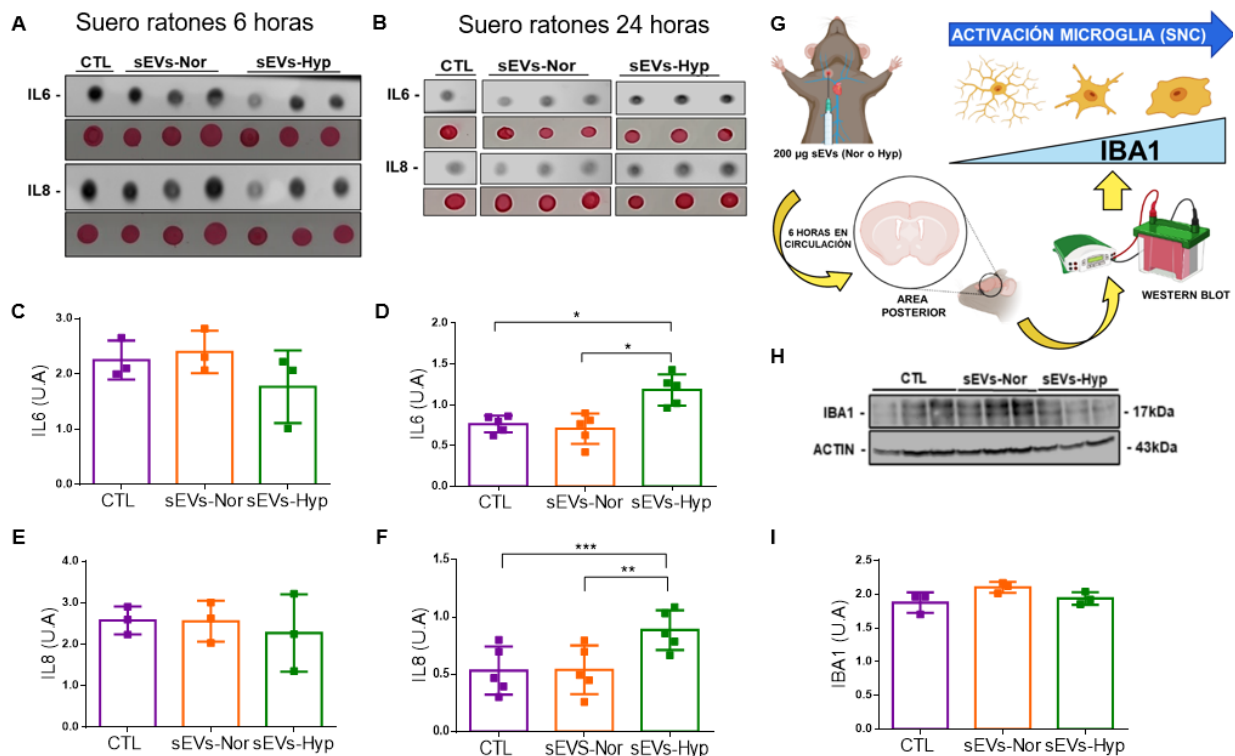
Estos hallazgos ya no son visibles cuando analizamos CLDN5 a las 12 horas post tratamiento con sEVs (Fig. 6F). Aunque, en experimentos de

fraccionamiento celular, vemos que existe una disminución significativa de CLDN5 presente en la membrana celular en presencia de sEVs-Hyp (12 h), en comparación con el grupo control (Fig. 6G).

## 9. Marcadores de inflamación en ratonas tratadas con sEVs

Al analizar los sueros obtenidos de los animales tratados con sEVs a las 6 horas, no se encuentran diferencias significativas en los niveles circulantes de IL-6 e IL-8 en los animales tratados con sEVs-Nor o sEVs-Hyp (Fig. 7A, 7C Y 7E).

Aunque, cuando realizamos nuevamente esa misma evaluación, pero tras 24 horas de sEVs, se observa que los animales tratados con sEVs-Hyp presentan mayores niveles de IL-6 e IL-8 (38% de aumento en ambos casos) en comparación con CTL y sEVs-Nor (Fig. 7B, 7D Y 7F).



**Figura 7. Marcadores proinflamatorios circulante y cerebrales en ratonas tratadas con sEVs. A.** Dot blot de interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8) en



suero de ratón tratado con sEVs por 6 horas, con sus respectivas cuantificaciones (**C y E**). **B.** Dot blot de IL-6 e IL-8 en suero de ratón tratado con sEVs por 24 horas, con sus respectivas cuantificaciones (**D y F**). **G.** Diseño experimental para análisis de IBA1 en tejido cerebral de la zona posterior a las 6 horas post sEVs. **H.** Western blot de IBA1 según lo indicado en G, y su respectiva cuantificación (**I**). Morado: CTL; Anaranjado: sEVs-Nor; Verde: sEVs-Hyp. Cada punto representa una extracción independiente o animal de experimentación. Los valores se expresan en medias  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

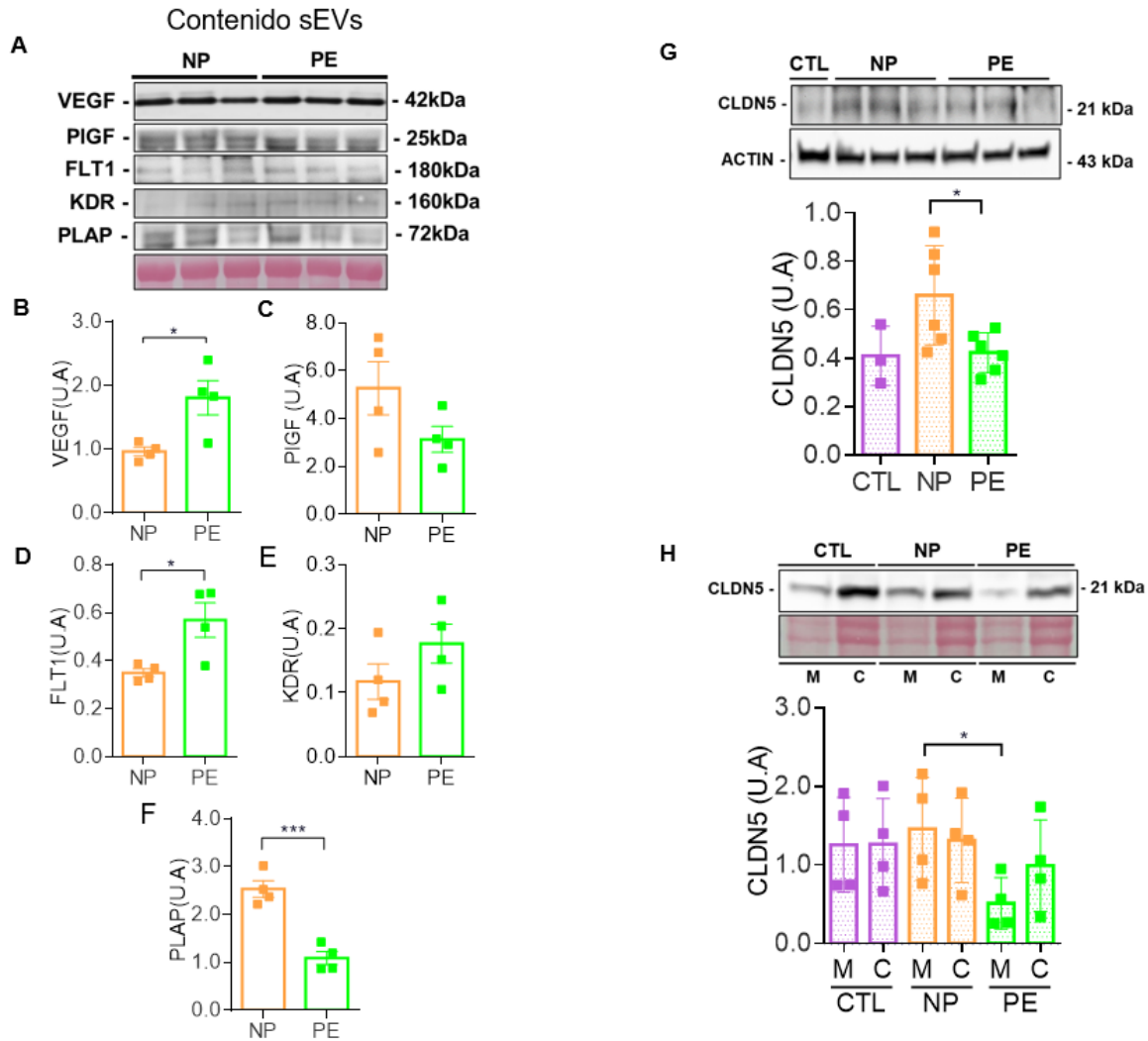
Paralelamente, se evaluó los niveles de proteína IBA1 (marcados de microglía) a nivel cerebral de la zona posterior tras 6 horas de la inyección de sEVs, pero no encontrando diferencias significativas entre los grupos analizados (Fig. 7G, 7H y 7I).

#### **10. sEVs aisladas de plasma de preeclampsia reduce el nivel de CLDN5 en hCMEC/D3**

En busca de traslación de los experimentos *in vivo* e *in vitro*, incluimos el análisis de sEVs aisladas de plasma de mujeres con embarazo normal (sEVs-NP) o preeclampsia (sEVs-PE).

Encontramos que las sEVs-PE poseen mayores niveles de VEGF y FLT1 (Fig.8B y 8D), pero menor nivel de PLAP (Fig.8F) con respecto a las sEVs-NP. No se encontraron diferencias significativas con respecto a proteínas PIGF y KDR entre ambos grupos (Fig.8C y 8E).

El tratamiento con sEVs de PE genera una reducción en el nivel de CLDN5 con respecto a aquellas tratadas con sEVs de NP, pero sin diferencias con respecto al basal (Fig 8G). En experimentos de fraccionamiento celular, encontramos una disminución (63%) de los niveles de CLDN5 en la membrana celular de las células tratadas con sEVs-PE con respecto a las células tratadas con sEVs-NP (Fig. 8H).



**Figura 8. sEVs aisladas de plasma de mujeres embarazadas (normal y preeclampsia) y su efecto sobre CLDN5 en hCMEC/D3. A.** Western blot de proteínas contenidas en las sEVs de embarazo normal (NP) y preeclampsia (PE). **B.** VEGF, **C.** PIGF, **D.** FLT1, **E.** KDR y **F.** PLAP **G.** Ensayo Western blot de proteína total y **H.** Fraccionamiento celular, para detectar niveles CLDN5 en células hCMEC/D3 tratadas por 3 horas con sEVs de NP y PE. Morado achurado: CTL; Anaranjado achurado: NP; Verde achurado: PE. Cada punto representa una extracción independiente o animal de experimentación. Los valores se expresan en medias  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

## **DISCUSION**

Las alteraciones cerebrovasculares en mujeres con preeclampsia (PE) poseen una alta morbimortalidad materno-fetal. En este trabajo, se estudió el rol que cumplirían las sEVs-Hyp, modelo que emula a una condición existente en PE, sobre la disminución en los niveles CLDN5, proteína indispensable para una BHE normal. Además, estos cambios se asocian con un alto contenido de VEGF al interior de estas sEVs-Hyp, sugiriendo su participación en la disrupción de BHE. Adicionalmente, se determinó cuáles son las consecuencias neurológicas de estos hallazgos, y que son clínicamente relevantes para las mujeres que cursan con PE. Por tanto, esta tesis sugiere que las sEVs de placenta, con un contenido alto de VEGF, son capaces de dañar la BHE por un mecanismo que involucra reducción de CNLD5 en el endotelio cerebral.

### **Daño en la BHE inducido por sEVs**

Las mujeres que padecen preeclampsia pueden presentar una disrupción de la BHE (Cipolla., 2013; Hammer y Cipolla., 2015; Kucuk et al., 2018; Bergman et al., 2021; León et al., 2021; Friis et al., 2022). Esta lesión primaria, puede constituir el evento inicial y crucial para desarrollar signos de deficiencia neurológica asociados a esta patología hipertensiva del embarazo. Además, las complicaciones cerebrovasculares en preeclampsia tales como epilepsia, accidente cerebrovascular, entre otros, son de gran relevancia clínica ya que constituyen la principal causa de muerte materna en preeclampsia (Kane et al., 2013; Hammer y Cipolla., 2015; Cipolla y Biller., 2017; Miller., 2019; Sidorova et al., 2021; Escudero et al., 2022).

En este estudio, analizamos los efectos de la administración de sEVs provenientes de cultivos de explantes de placentas cultivados en condición de hipoxia (1% O<sub>2</sub>), y los comparamos con aquellas sEVs extraídas de placentas cultivadas en normoxia (8% O<sub>2</sub>), o con situación control (sin sEVs). Los resultados confirman nuestros hallazgos originales (León et al., 2021), mostrando una disrupción de la BHE *in vivo* e *in vitro* en presencia de sEVs-Hyp. Para dilucidar el mecanismo de este fenómeno, analizamos los niveles de CLDN5 en 9 segmentos cerebrales, distribuidos en 3 áreas mayores. Bajo este esquema, la disrupción de la BHE fue mayormente en el área posterior del cerebro, correspondiente a la zona occipital y cerebelar de los animales sEVs-Hyp, siendo este un hallazgo no descrito previamente en la literatura. Aunque, se conoce que la isquemia en el área posterior del cerebro es más frecuentemente asociada con alta morbilidad (30%) y mortalidad considerando todos los ACV isquémicos del cerebro (Mehndiratta et al, 2021).

El área posterior del cerebro (occipital y cerebelar) tiene ciertas características anatómicas-funcionales que podrían explicar porque el daño de la BHE es más frecuente en este sector. Así, la circulación del cerebro posterior es originada de vasos sanguíneos vertebrales cervicales. Estos vasos, a su vez, son de menor diámetro, y distribuyen menor irrigación (equivalente al 20% del flujo sanguíneo cerebral total) en comparación con las zonas anteriores del cerebro, irrigadas por la arteria carótida interna y sus ramificaciones (Nouh et al., 2014). Estas diferencias anatomo-funcionales se presentan también en la especie *Mus musculus* (Porcello et al., 2014), aunque en esta especie no se conoce sobre la magnitud de cambio en el flujo sanguíneo cerebral a nivel posterior. Si bien, en

esta tesis no analizamos el flujo sanguíneo cerebral, proponemos que estos cambios anatomo-funcionales hacen que el segmento posterior del cerebro sea más proclive que otros segmentos del cerebro a daños vasculares (Aygün et al., 2010; Hasbún et al., 2012; Bushnell et al., 2014; McDermott et al., 2018; Chao et al., 2020 y Bergman et al., 2022). Adicionalmente, si estas arterias son más estrechas, es posible que los vasos a nivel posterior también presenten adaptaciones en su capacidad de barrera. En esta tesis, indagamos la presencia de CLDN5, como una de las TJs fundamentales para la BHE.

Así, los resultados muestran que la disrupción de la BHE tanto *in vivo* como *in vitro* se asocian a reducción en los niveles de CLDN5, tan temprano como a las 6 horas post tratamiento. Estos hallazgos concuerdan con lo descrito por Sugiyama et al., 2023 reportando bajos niveles de ARNm CLDN5 en modelos *in vivo* de ACV isquémico tan temprano como las 3 horas, cambios que se mantienen incluso hasta 48 días post ACV. La reducción de CLDN5, como mecanismo de daño de la BHE ha sido mencionado en otras patologías cerebrovasculares como enfermedad de Alzheimer y Parkinson (Desai et al., 2007), o esquizofrenia (Green et al., 2019).

En PE, poco se conoce sobre la expresión y función de CLDN5. Así, por ejemplo, Liévano et al., 2006 describe que la placenta de PE presenta disminución de los niveles de CLDN5, posiblemente asociada a la poca perfusión sanguínea, en comparación con placentas de embarazo normal. Acercándonos a PE y alteraciones cerebrovasculares, se ha mostrado en un modelo de ratas gestantes que recibieron el inhibidor de la síntesis de óxido nítrico, L-NAME, que los bajos niveles de ARNm de CLDN5 en tejido cerebral de los animales, se relacionan

negativamente con el desarrollo de disfunción cognitiva (analizado mediante test de campo abierto) y el aumento del porcentaje de agua en tejido cerebral, indicativo de edema cerebral (ShamsEldeen et al., 2021).

Con respecto a los cambios obtenidos a las 12 horas en modelos *in vitro*, vemos que tras el insulto producido por la administración de sEVs-Hyp en células, se encuentra una reducción de la abundancia de CLND5 en la membrana celular de endotelio cerebral humano, pese a que no encontramos diferencias en la cantidad total (presente en membrana y citoplasma). Estos resultados concuerdan con lo descrito por Sladojevic et al., 2019, en donde utilizaron un modelo de isquemia/reperfusión con células mBMEC (células de la microvasculatura cerebral de ratón), obteniendo como resultados aumento de la permeabilidad asociado a disminución en la expresión y relocalización de CLDN5 desde la membrana. No conocemos los mecanismos de la reducción de CLND5 en membrana, sin embargo, se ha demostrado que CLDN5 puede ser internalizada (mediado por caveola-1) hacia el citosol, generando cambios desfavorables en la resistencia eléctrica y permeabilidad celular en células endoteliales cerebrales de ratón (Yu et al., 2021).

### **Eventual daño directo en relación con sEVs**

En esta tesis evidenciamos que las sEVs-Hyp pueden ingresar a las células endoteliales de la microvasculatura cerebral, que se asocia a disrupción de la BHE, y un síndrome neurológico temprano, compatible con afectación cerebrovascular que ocurre en PE. Los resultados, sugieren una comunicación entre la placenta y la BHE vía sEVs. En este sentido, normalmente durante la

gestación existe una constante producción de sEVs desde los tejidos fetales (como la placenta) que alcanzan el torrente sanguíneo materno que podrían establecer una comunicación a distancia con los tejidos blanco (Buca et al., 2020; Smith y Russell., 2022; Gebara et al., 2021), como el cerebro. En esta tesis, proponemos que esta comunicación podría ser directa. Esto ya que evidenciamos en nuestro modelo *in vivo*, que la inyección de sEVs-Hyp genera cambios clínicos en forma temprana (a partir de las 3 horas), sin promover una respuesta inflamatoria sistémica (mediado por IL-6 y IL-8) o local (IBA1), al menos a las 6 horas post inyección. Este resultado sugiere entonces que las vesículas inyectadas que son de origen humano, y que generan daño de la BHE, podrían no estar asociadas a la ocurrencia de un rechazo inmunológico/inflamatorio, al menos en las primeras 6 horas post exposición.

Analizando la respuesta inflamatoria, se ha descrito que existen altos niveles de interleucinas proinflamatorias (específicamente IL-6 y IL-8) en PE, generando un desbalance entre los factores inflamatorios y antiinflamatorios (Vilotic et al., 2022; Wang et al., 2022). Nuestros resultados a las 24 horas post inyección de sEVs-Hyp concuerdan con estas publicaciones. En este sentido, el aumento de IL-6 y IL-8 circulante en PE ha sido asociado también a daño placentario y disfunción endotelial, dos eventos claves en la fisiopatología de la enfermedad (Yang et al., 2016; Bellos et al., 2018; Wang et al., 2021). Existe evidencia que IL-6 genera disrupción de la BHE (Takeshita et al., 2021). Mismo escenario ocurre con IL-8 (Sun et al., 2016) y TNF- $\alpha$  (Nishioku et al., 2010; Cheng et al., 2018). Particularmente en el caso de TNF-  $\alpha$  en el contexto de PE, se sabe que a nivel circulante esta aumentado (Sunderland et al., 2011; Trisnawati et al.,

2020), y que este aumento es capaz de generar un daño de la BHE (Warrington et al., 2015). En particular, plasma de mujeres con preeclampsia (con alto contenido de TNF-  $\alpha$ ), o TNF-  $\alpha$  directamente (Cheng et al., 2018) inducen un aumento de la permeabilidad de la BHE. Los mecanismos de este daño se asocian a la activación de su receptor TNFR1 (Connell et al., 2013; Cipolla et al., 2012), ya que la inhibición del mismo, revierten el daño de la BHE. Además, y de forma importante, este factor tiene la capacidad de estimular no solo su receptor específico, sino también transactivar a VEGFR2 (KDR) mediante la tirosina kinasa epitelial/endotelial (Etk/Bmx), un correceptor de TNF-  $\alpha$  que puede transestimular KDR (Zhang et al., 2003). Esto es de especial relevancia, ya que se conoce que la activación de VEGFR2 es necesaria también para la generación de daño de la BHE observados en modelos *in vitro* que simulan PE (Amburgey et al., 2010; Furuya et al., 2011; Bergman et al., 2021; Torres-Vergara et al., 2022; Escudero et al., 2023). Pese a ello, son necesarios más estudios para dilucidar el rol de estas y otras citoquinas en la génesis del síndrome de preeclampsia.

Paralelamente a los resultados de citoquinas circulantes, los resultados de IBA1 en tejido cerebral no evidencian cambios significativos, lo cual no concuerda con los resultados obtenidos de Buscemi et al., 2019. Estos autores muestran que, tras un insulto de isquemia y reperfusión de 30 minutos en ratones, se evidencia un aumento significativo en IBA1 (y de GFAP, un marcador de astrocitos). Sin embargo, otro estudio similar realizado por Yoon et al., 2018, evidencia aumento de marcadores neuroinflamatorios como IBA1 recién a las 24 – 48hrs, por lo que nos hace pensar que en nuestro modelo sería importante reevaluar los tiempos de evaluación y específicamente el marcador a estudiar.



### **Potencial causante de este daño: VEGF**

En esta tesis, encontramos que las sEVs-Hyp o sEVs extraídas de plasma de mujeres con preeclampsia generan una reducción en los niveles CLND5 en células endoteliales cerebrales. Sin embargo, cómo las vesículas son capaces de reducir la expresión y/o función de esta TJs, se desconoce. Pensamos que el contenido de las vesículas sería crucial para dicho fenómeno. Esto se apoya con resultados preliminares en el laboratorio, en donde al romper las sEVs mediante sonicación, encontramos que el efecto sobre la reducción de CLN5 desaparece (resultados no mostrados). Entonces, es posible pensar en que factores presentes en las sEVs serían capaces de dañar la BHE.

Entre las múltiples posibilidades, en esta tesis encontramos que las sEVs-Hyp presentan altos niveles de VEGF y PlGF, sin cambios en sFlt-1 o KDR. Por tanto, estos resultados sugieren la existencia de un desbalance entre ligandos y receptores de la familia de VEGF (Chaballe et al., 2011; Kim et al., 2021; Tian et al., 2023). En este sentido, evidencia previa (Amburgey et al., 2009), y de nuestro laboratorio (Bergman et al., 2021; Torres-Vergara et al., 2022), indican que el plasma de mujeres con preeclampsia (que contiene sEVs) son capaces de dañar la BHE, lo cual es bloqueado por un antagonista de KDR. Estos hallazgos sustentan la idea que un factor circulante, es capaz de activar este receptor. Dado que las sEVs poseen VEGF, que activa KDR a diferencia de PlGF (Luttun et al., 2002 y Zhou et al., 2021), es posible suponer que este factor pudiera ser una de las moléculas de señalización capaz de inducir cambios en la permeabilidad por disminución de CLND5. Además, las sEVs también podrían proteger a algún factor circulante de la degradación, y entregarlo directamente a la célula blanco. Esta

posibilidad es interesante en el contexto de VEGF, ya que los receptores KDR, se encuentran en la parte basal de la célula, haciendo difícil su acceso (Worzfeld et al., 2016). Además, es interesante mencionar que, según nuestros hallazgos, la zona posterior cerebral posee menores niveles de VEGF, quizá como un mecanismo protector endógeno. Este hallazgo concuerda con lo publicado por Tan et al., 2019, bloqueando la síntesis de VEGF astrocitario *in vivo*, para permitir la reparación de la BHE post ACV. Sin embargo, más estudios son necesarios para dilucidar estas posibilidades.

### **¿Que tienen las sEVs que las hacen dañinas para la BHE?**

El contenido de las sEVs es un estudio que demanda el uso de tecnologías “ómicas” con las cuales no contamos en nuestra universidad, y además son muy costosas. Como una aproximación experimental, buscamos la presencia de conocidas proteínas con potencial disruptor sobre la BHE, como el VEGF (Liu et al., 2022; Argaw et al., 2012; Croll et al., 2004; Zhang et al., 2016; Wang et al., 2020). Específicamente en el escenario de PE, Amburgey et al., 2010, muestran que el plasma de PE disrumpe la BHE. En forma importante, este daño se revierte cuando se bloquea el receptor-2 de VEGF. Adicionalmente, Bergman et al., 2020 reportan un incremento en ARNm de receptor 2 de VEGF post tratamiento con plasma de PE usando endotelio cerebral humano. Estas evidencias se aproximan a la hipótesis de que VEGF al interior de las sEVs podría ser el potencial causante de la disrupción en la BHE evidenciada en este estudio. Puntualmente, es claro que las sEVs pueden atravesar la BHE (Awoyemi et al., 2022; Ramos-Zaldivar et al., 2022), y por tanto liberar su contenido en el interior de alguna o todas las

células que componen esta estructura. En el caso de las células endoteliales del cerebro, es también importante conocer que el receptor de VEGF, denominado VEGFR2 o KDR, se encuentra ubicado en la parte basolateral de la célula (Davis et al., 2010). Por lo mismo, inaccesible a los ligandos circulantes. Creemos entonces que el VEGF al ser incorporado en las sEVs podría atravesar la célula endotelial cerebral en forma “segura”, y una vez este al lado basolateral celular, activar a su receptor específico. Esto explicaría al menos en parte la paradoja planteada previamente por nuestro grupo (Torres-Vergara et al., 2022), en donde el daño de la BHE en preeclampsia cursa con activación de KDR, pese a los altos niveles circulantes de otro receptor de VEGF (sFlt-1), cuya función justamente es evitar la activación del primero. Claramente, más estudios son necesarios en este aspecto.

### **Consecuencias Neurológicas**

Tras analizar neurológicamente a los animales inyectados con sEVs-Hyp, estos evidencian desarrollo de síndrome neurológico desde las 3 horas posterior a la administración endovenosa; valoración que empeoró hasta las 24 horas post administración. Los déficits neurológicos observados concuerdan con las zonas que evidencian disrupción de la BHE. En este sentido, para la correcta aplicación del RMCBS, es necesario que el animal posea intactas las zonas cerebrales encargadas de generar un adecuado estado mental, disposición espacial corporal, y propiocepción, las cuales están controladas por el área frontal, parietotemporal y occipitocerebelares, respectivamente (Creed et al., 2011 y Parvez y Ohtsuki., 2022). Nuestros resultados sugieren, que los animales con los déficits

neurológicos producto de sEVs-Hyp son animales que tienen afectación de rutas cerebrales que regulan la actividad motora y propioceptiva (que involucra balance, coordinación y postura corporal), o respuesta a reflejos espinales o, alteración en la zona principalmente cerebelar. Esta hipótesis se sustenta con lo propuesto por otros autores (Vinueza Veloz et al., 2014; Al Sagheer et al., 2018), quienes analizan los efectos de alteraciones cerebelares sobre déficit neurológico en modelos animales. Por otro lado, es difícil poder asegurar mediante la evaluación neurológica realizada, que éstos presentaban dificultades visuales que pudiesen hacer que los animales no respondieran adecuadamente a las pruebas exploratorias. Esto sería de particular relevancia, para comprender otras afectaciones que presentan mujeres con PE (Yacong et al., 2015 y Cvitkovic et al., 2021). Sin perjuicio de ello, también se conoce en humanos que los signos clínicos clásicos de severidad de preeclampsia, como visión borrosa, no son buenos predictores de daño cerebrovascular (Bergman et al., 2014).

### **Signos de edema cerebral vasogénico**

Adicionalmente a lo descrito, macroscópicamente se constató la presencia de mayor peso fresco a las 24 horas, en aquellos cerebros de animales inyectados con sEVs-Hyp, lo cual es atribuible a formación de edema cerebral. Esta evidencia concuerda con resultados de modelos de accidente cerebrovascular descritos por otros autores (Sugiyama et al., 2018; Guo et al., 2020). En esta investigación vemos que el peso fresco es mayor en los animales sEVs-Hyp ( $\approx 20\%$ ). Esto se concluye al analizar el peso fresco en la escala normal de peso cerebral en ratones adultos hembra C57BL6 del Laboratorio Jackson (2023). Por tanto, es

posible suponer que el aumento de peso se asocia a edema vasogénico. Cuyo mecanismo, involucraría la disminución de CLDN5.

### **Niveles fisiológicos de CLDN5 en cerebro**

Chiva et al., 2021 describe que los niveles de CLDN5 son diferentes entre las zonas cerebrales, y que estas diferencias son clave para el entendimiento del desarrollo de diversas patologías cerebrovasculares que cursan con disrupción de la BHE. En este estudio, evidenciamos que los niveles de CLDN5 presentan una diferente distribución en las áreas cerebrales analizadas, lo cual es compatible con lo previamente publicado (Chiva et al., 2021; Sjöstedt et al., 2020). Específicamente, los niveles de CLDN5 son más altos en la zona posterior del cerebro, que la zona anterior.

Aunque no encontramos evidencia sobre la distribución de CLDN5 en el contexto de PE, si se conoce que la expresión de CLDN5 en tejido cerebral de niños con ependimomas, es región específica (Virág et al., 2017). Así, se ha demostrado que los tumores de células ependimarias supratentoriales (anteriores) tienden a poseer mayores niveles de CLDN5 en comparación con los infratentoriales (áreas posteriores, cerebelares y de tallo) (Virág et al., 2017).

Por lo tanto, nuestros resultados sobre los cambios en la distribución de CLDN5 a nivel posterior del cerebro tras la inyección con sEVs-Hyp son pioneros. Por lo mismo, existe una serie de incógnitas sobre las implicancias fisiológicas y patológicas de este hallazgo.

## **Buscando las sEVs en cerebro**

Una pregunta importante en esta tesis es si las sEVs de placenta pueden llegar al cerebro. Para dilucidar esta pregunta, hicimos inmunoanálisis en busca de la presencia de PLAP, como marcador específico de placenta, en los cortes de cerebro analizados. No tuvimos éxito. Esto por qué en verdad es complejo tratar de identificar un pequeño fragmento celular, en un universo completo como es el homogenado de cerebro. Creemos que la técnica utilizada es deficitaria, y se requiere de metodologías más sensibles. Estos estudios deberían incluir, análisis de la presencia de miARN específicos placentarios C19MC (mir-517<sup>a</sup>; mir-517c; mir-519<sup>a</sup>) en tejido cerebral. En este sentido, no en el cerebro, pero en células HCAEC (células endoteliales arteriales coronarias humanas), se pudo detectar la presencia de sEVs provenientes de placentas normales y con preeclampsia mediante la presencia de los miARN específicos (Cronqvist et al., 2017). Más importante aún, este estudio fue capaz de conectar estos miARN específicos placentarios con el la generación de disfunción endotelial. Un componente clave en la fisiopatología de PE.

## **Diferencias importantes en los modelos animales incluidos**

En esta tesis decidimos también comparar el modelo de sEVs en ratón no preñado, con el modelo de PE, RUPP(Lara et al., 2021). Las ratonas preñadas del modelo RUPP mostraron espontáneamente (sin inyección de ninguna sEVs) una disrupción de la BHE, similar a la encontrada con la inyección de sEVs-Hyp en ratones no gestantes. Estos datos en RUPP coinciden con lo publicado anteriormente (Porcello et al., 2014; Duncan et al., 2020; Escouto et al., 2018;

Johnson et al., 2014), y extiende el conocimiento en analizar el daño de la BHE en forma regional en el cerebro. Pese a ello, nuestros resultados difieren a lo mostrado por Warrington et al., 2015, ya que estos autores evidencian daño principalmente en la zona anterior cerebral, en lugar del área posterior que reportamos en este estudio. Las causas para esta diferencia pueden ser múltiples, incluyendo: (1) la técnica quirúrgica utilizada, ya que a diferencia nuestra, el modelo RUPP utilizado por Warrington et al., involucra ocluir ambas arterias ováricas, en conjunto con la arteria aorta abdominal. Nosotros utilizamos el modelo RUPP “refinado”, en el cual se obliteran únicamente las arterias ováricas y las arterias uterinas bilateralmente. (2) especies utilizadas, ratones versus ratas, en el modelo de Warrington et al. Y finalmente, (3) técnicas de cuantificación - la técnica utilizada por ellos para cuantificar la fluorescencia de EB en los sobrenadantes de homogenado de áreas cerebrales fue cuantificación mediante espectrofotómetro con filtros de fluorescencia; nosotros registramos imágenes digitales de las secciones, y utilizamos un software digital para reconocer intensidad de color azul propio del EB presente en cada sección cerebral.

Otra variable clínica de interés en el modelo de inyección de vesículas en ratones no gestantes es el relacionado con la reducción en la presión arterial media que encontramos en nuestras condiciones experimentales. Estos hallazgos no concuerdan con los resultados de presión sanguínea encontrados en experimentos similares en los cuales la inyección de sEVs-Hyp generan un aumento de la presión arterial en ratones gestantes (Salomón et al., 2015; Han et al., 2020). Esto nos hace pensar en varias alternativas que expliquen estos resultados aparentemente controversiales. Por ejemplo; 1) los resultados siguieren

que el efecto de las sEVs-Hyp podrían ser “directos”, ya que no requieren de un aumento de la PAM. Esto es relevante, ya que entre 20 a 30% de las mujeres con PE que presentan signos cerebrovasculares, no presentan elevación de la presión arterial (Triplett et al., 2022). Es más, existe evidencia que las mujeres con PRES pueden presentar incluso hipotensión intracraneana (que depende de la presión arterial sistémica) (Hammad et al., 2015 y Zheng et al., 2020). 2) La inyección de sEVs-Hyp generan hipotensión. Un fenómeno de adaptación hemodinámica muy bien documentado en el embarazo normal (Hohmann et al., 2007). Los mecanismos de esta reducción de la resistencia vascular, que genera hipotensión, no se conocen con exactitud, pero dependerían de la carga hormonal de estrógenos que ocurre en el embarazo, lo cual a su vez llevará a un aumento en la síntesis del vasodilatador óxido nítrico (Choi et al., 2002; Okawa et al., 2004; Socha et al., 2022). Además, cada vez existe más evidencia de que las sEVs placentarias modulan la función endotelial materna, un fenómeno estrechamente ligado al contenido proteico y regulador génico (microRNAs) que tienen estas vesículas (Xu et al., 2021; Foley et al., 2021). Por lo mismo, esta tesis entrega también información preliminar, pero relevante, de que las sEVs-Hyp podrían contribuir en la reducción de la resistencia vascular periférica, independientemente de la carga hormonal característica del embarazo.

En el área cardiovascular también, encontramos que los animales inyectados con sEVs-Hyp presentan reducción de la frecuencia cardiaca. Este hallazgo, podría también estar asociado a la adaptación hemodinámica previamente analizada. Pero no tenemos una explicación certera sobre ese hallazgo. Aunque se ha reportado que mujeres con PE podrían presentar cuadros



de bradicardia, producto de la respuesta de baroreceptores a la vasoconstricción arterial excesiva (Angsubhakorn y Benditt., 2021). Además, la reducción de la frecuencia cardiaca podría ocurrir previo al desarrollo de una condición severa de PE, conocida como el síndrome de hemólisis, elevación de enzimas hepáticas, y bajo conteo plaquetario (HELLP) (Hosokawa et al., 2017). Debido a los pocos reportes de hipotensión y bradicardia en PE, son necesarias más investigaciones sobre esos eventos.

### **Implicaciones clínicas de los hallazgos para la condición de PE**

En esta tesis, dilucidamos que las sEVs-Hyp causan disrupción de la BHE, de preferencia en la parte posterior del cerebro, asociado a disminución de CLDN5 cerebral, y teniendo como posible efector al VEGF. Además, todos estos daños coinciden con la clínica de los animales, y ocurren en tiempos relativamente cortos.

Nuestros resultados indican que la incorporación de sEVs-Hyp en las células endoteliales cerebrales ocurre rápidamente (30 minutos), con efectos negativos sobre la funcionalidad de barrera. Sin embargo, se presume que estas sEVs placentarias pudieran alcanzar otras células blanco, como astrocitos, microglía y neuronas. Estos efectos no son el foco de este trabajo, pero es necesario mencionar, de que esta hipótesis tiene sustento en el desarrollo de síndrome neurológico progresivo y temprano en los animales sEVs-Hyp. Además, los resultados aquí expuestos muestran que, en modelos de PE, el daño cerebrovascular es principalmente en la región posterior, como se evidencian en el diagnóstico imagenológico y clínico de PE.

Esta tesis presenta una idea desafiante en la fisiopatología de las complicaciones cerebrovasculares en PE, la cual sugiere una directa comunicación entre la placenta y la BHE vía sEVs. Esto ya que el daño de la BHE que ocurre *in vivo* sucede independiente del embarazo, cursa con reducción de la presión arterial (en lugar de hipertensión como PE), y no genera cambios importantes en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias a corto plazo. Sin duda más trabajos son necesarios para explorar esta posibilidad.

Esta tesis también indica que las sEVs-Hyp podrían tener distintos blancos. Incluso extenderse a otros tejidos o sistemas, como el mismo sistema cardiovascular. Lo cual da luces de la potencial contribución de estas sEVs en las complicaciones multiorgánicas observadas en PE.

### **Debilidades del estudio y como las pudimos transformar en fortalezas**

Una de las principales fortalezas de este estudio es que combina experimentos *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*, así como también evidencias traslacionales usando muestras de mujeres con PE. Por lo mismo, pensamos que será un importante aporte en la comprensión de la fisiopatología de la disrupción de la BHE que existe en PE. Pese a ello, también reconocemos algunas limitaciones y como las enfrentamos. Por ejemplo:

#### **1. La inyección de sEVs placentarias humanas, en sistema circulatorio de otra especie.**

Al analizar los resultados de que el daño en la BHE era temprano y rápido, visualizado por el descenso en la valoración RMCBS, tuvimos que descartar

signos de SRIS (Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica), analizando la sangre de los animales a las 6 horas, en búsqueda de cambios en IL-6 y IL-8, citoquinas elevadas en SIRS.

## **2. ¿Efectos sEVs placentarias humanas, sobre células BEND3?**

Inicialmente, solo analizamos los efectos de sEVs sobre línea celular humana. Pero para saber exactamente como se comportaban las células endoteliales cerebrales del modelo *in vivo*, realizamos western blot en células BEND3, cuyos resultados son más dramáticos que en el modelo *in vitro* humano.

## **3. Manejo farmacológico en modelo RUPP.**

Preeclampsia se caracteriza por ser un estado proinflamatorio generalizado. El modelo RUPP se realiza mediante cirugía abdominal, la cual genera dolor visceral, que dura por lo menos 48 horas (Bakrania et al., 2020; Travis et al., 2020; Lara et al., 2022). Para evitar la disminución de cualquier efecto pro-inflamatorio que generaría en el animal el modelo RUPP, decidimos realizar manejo integral de analgésicos no anti-inflamatorios, como acetaminofeno (Paracetamol) y tramadol. El efecto de estas drogas sobre los hallazgos reportados es incierto.

## **4. ¿Porque no utilizar RUPP como modelo central?**

El modelo RUPP es un modelo validado de PE, que se asemeja mucho al escenario que ocurre en el humano. La intervención quirúrgica de RUPP genera efectos sobre la placenta similares a PE (considerando que la placenta de ratón es similar, pero no idéntica a la humana), los cuales pueden involucrar muchos más

factores adicionales a las sEVs. Los cuales a su vez pudieran generar efectos negativos sobre la BHE. En este sentido, no analizamos las sEVs placentarias que están presentes en el modelo RUPP debido a la complejidad de poder aislar una cantidad suficientes de sEVs de volúmenes sanguíneos pequeños que presenta el ratón.

## **6. Homologación de los 9 segmentos cerebrales.**

Al inicio de esta tesis, evaluamos preliminarmente la extravasación de EB en los animales, pero cortando manualmente los 9 segmentos cerebrales. Tras darnos cuenta de que existía poca correlación entre los mismos segmentos de diferentes animales, decidimos utilizar una matriz cerebral de cortes coronales de ratón adulto, lo cual evitó este problema, ya que los cerebros en la matriz calzaban de forma adecuada, sin la generación de espacios que pudiesen alterar estas referencias.

## **7. Uso de explantes de placentas normales en hipoxia. ¿Porque no de PE?**

Particularmente en este punto, se presentó la dificultad propia al requerir tejido de origen humano, y en lo específico de conseguir placentas de mujeres con PE. Por lo tanto, como una aproximación experimental, que fuera validada para el estudio de BHE y sEVs placentaria (León et al., 2021) decidimos usar placentas humanas normales (que son relativamente más fáciles de conseguir). Es posible, suponer que, a pesar de la factibilidad experimental y biológica del uso de este tejido, no es menos cierto, que el mismo no ha sufrido todos los cambios estructurales y funcionales que se espera en una placenta de PE.

Sin perjuicio de ello, en esta tesis también reportamos el uso de sEVs aislados de plasma de mujeres con PE. Lo cual también es una aproximación experimental, que indica que del pool de sEVs circulantes, en donde al menos 15% provienen de la placenta (Sadovsky et al., 2020) es capaz de dañar la BHE *in vitro*. Los resultados con esta aproximación experimental dan cuenta de la plausibilidad biológica de lo reportado en esta tesis, que las sEVs de PE dañan directamente la BHE.

#### **8. Visualización de EB como signo de disrupción difusa de la BHE.**

La extravasación de colorante EB a nivel cerebral no es focalizada o lacunar, sino más bien difuso en la zona posterior cerebral. En este punto, se presentó la dificultad de encontrar el software y herramientas necesarias para la detección del EB visualmente. Esto se logró superar, utilizando controles positivos de EB, analizando sus características, y generando ajustes en el programa ImageJ para mejorar la cuantificación de la coloración azul en nuestro modelo experimental.

#### **10. Inyección de sEVs en la cola del ratón.**

La inyección en la cola de ratón requiere de volúmenes muy bajos ( $\approx 70\mu\text{l}$  para un animal de 28 gramos de peso), sobrepasar esos niveles máximos, hace que la vena de la cola se reviente, generándose extravasación del tratamiento, y por lo tanto sin efecto biológico. Niveles menores que eso hace casi imposible cerciorarse que las sEVs ingresan al lecho vascular. Por lo tanto, decidimos

realizar estas inyecciones en la vena yugular externa de los animales, ruta de administración que evita los inconvenientes antes descritos.

## CONCLUSIONES

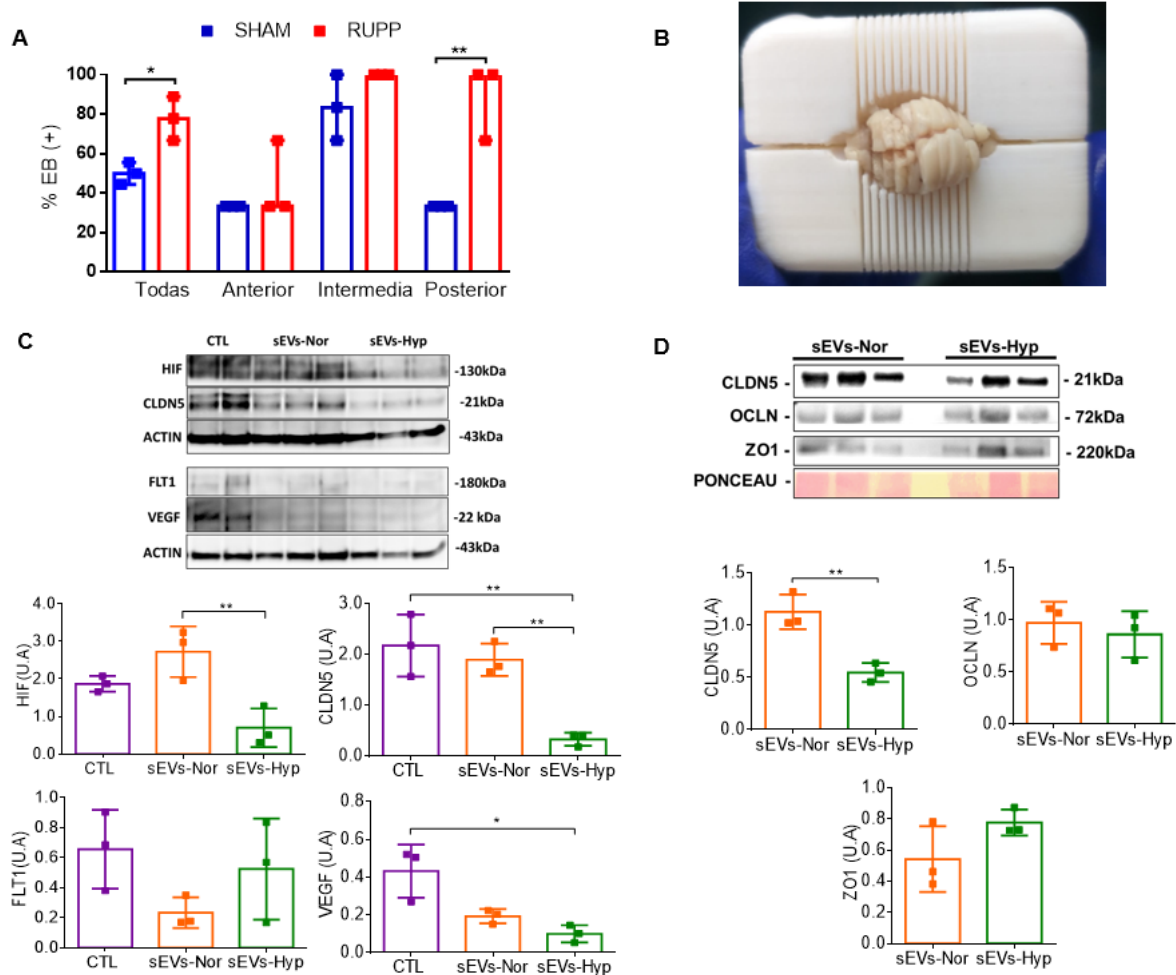
1. Las sEVs-Hyp dañan la BHE en el área posterior del cerebro (área occipital y cerebelo) en un modelo murino *in vivo* no preñado, generando déficits clínicos neurológicos relevantes para la condición de PE.

2. La disrupción de la BHE en modelos *in vivo* e *in vitro* tratados con sEVs-Hyp se produce por la disminución de los niveles de CLDN5.

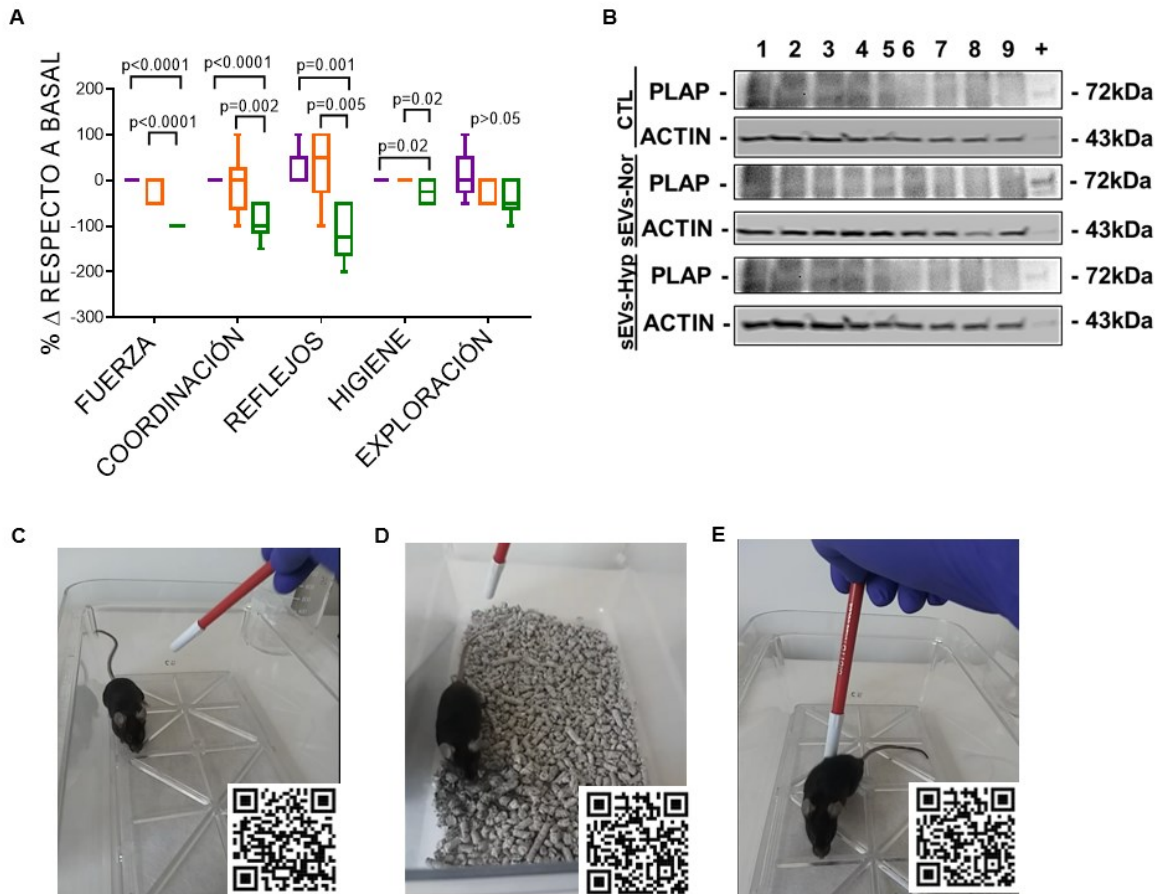
3. La administración de sEVs-Hyp genera aumento de los niveles de proteínas pro-angiogénicas y capaces de modular la función de la BHE como VEGF y PlGF. Además, en tiempos cortos (6 h) no encontramos cambios en los niveles de citoquinas proinflamatorias (IL-6 e IL-8) sugiriendo que los daños son debidos a las vesículas y/o su contenido, antes que una respuesta inflamatoria de rechazo.

4. La valoración clínica neurológica, disrupción de la BHE y disminución de CLDN5 en el área posterior cerebral en el modelo *in vivo* tratado con sEVs-Hyp, no se relaciona con aumento de niveles de IBA1.

## IMÁGENES SUPLEMENTARIAS



**FIGURA S1. A.** Segmentos positivos a extravasación de colorante Evans blue total y por áreas cerebrales en modelo quirúrgico de preeclampsia (RUPP). **B.** Imagen representativa de cortes de cerebro realizados en este estudio, en dirección coronal (100µm grosor) mediante matriz de corte cerebral de ratón adulto. **C.** Western blot de HIF, CLDN5, FLT1 y VEGF en pool de segmentos de la zona posterior cerebral a las 6 horas post inyección de sEVs. **D.** Western blot en sEVs de proteínas TJ de la BHE. Cada punto representa una extracción independiente o animal de experimentación. Los valores se expresan en medias  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .



**FIGURA S2. A.** RMCBS desglose de porcentaje de cambio con respecto al tiempo inicial o basal a las 24 horas. **B.** Western blot de marcador placentario humano (PLAP) en tejido cerebral de ratón post 6 horas inyección sEVs (+ = control positivo – placenta humana). **C, D, y E.** Videos representativos de evaluación RMCBS (evaluación de reflejo de huida, aural y equilibrio solamente) en animal control (CTL), inyectado con sEVs-Nor y sEVs-Hyp a las 24 horas (tiempo final) respectivamente. Se adjunta código QR específico para visualización online de video de corta duración. Cada punto representa una extracción independiente o animal de experimentación. Los valores se expresan en medias  $\pm$  SEM. \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ,



## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ACOG Practice Bulletin No. 202: Gestational Hypertension and Preeclampsia. (2019). *Obstetrics and gynecology*, 133(1), 1.
2. Al Sagheer, T., Haida, O., Balbous, A., Francheteau, M., Matas, E., Fernagut, P. O., & Jaber, M. (2018). Motor Impairments Correlate with Social Deficits and Restricted Neuronal Loss in an Environmental Model of Autism. *The international journal of neuropsychopharmacology*, 21(9), 871–882. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyy043>
3. Amburgey, O. A., Ing, E., Badger, G. J., & Bernstein, I. M. (2009). Maternal hemoglobin concentration and its association with birth weight in newborns of mothers with preeclampsia. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 22(9), 740–744. <https://doi.org/10.3109/14767050902926947>
4. Amburgey, O., Chapman, A., May, V., Bernstein, I., & Cipolla, M. (2010). Plasma From Preeclamptic Women Increases Blood-Brain Barrier Permeability: Role of Vascular Endothelial Growth Factor Signaling. *Hypertension*, 56(5), 1003-1008.
5. Andjus, P., Kosanović, M., Milićević, K., Gautam, M., Vainio, S. J., Jagečić, D., Kozlova, E. N., Pivoriūnas, A., Chachques, J. C., Sakaj, M., Brunello, G., Mitrecic, D., & Zavan, B. (2020). Extracellular Vesicles as Innovative Tool for Diagnosis, Regeneration and Protection against

Neurological Damage. *International journal of molecular sciences*, 21(18), 6859. <https://doi.org/10.3390/ijms21186859>

6. Angsubhakorn, N., & Benditt, D. (2021). Relative Sinus Bradycardia: An Unexpected Finding in Preeclampsia With Acute Pulmonary Edema. *Cureus*, 13(2), e13262. <https://doi.org/10.7759/cureus.13262>
7. Argaw, A. T., Zhang, Y., Snyder, B. J., Zhao, M. L., Kopp, N., Lee, S. C., Raine, C. S., Brosnan, C. F., & John, G. R. (2006). IL-1beta regulates blood-brain barrier permeability via reactivation of the hypoxia-angiogenesis program. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 177(8), 5574–5584. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.8.5574>
8. Lagares, A., Gómez, P. A., Alén, J. F., Arian, F., Sarabia, R., Horcajadas, A., Ibañez, J., Gabarros, A., Morera, J., de la Lama, A., Ley, L., Gonçalves, J., Maillo, A., Domínguez, J., Llacer, J. L., Arrese, I., Santamarta, D., Delgado, P., Rodríguez Boto, G., & Vilalta, J. (2011). Hemorragia subaracnoidea aneurismática: guía de tratamiento del grupo de patología vascular de la sociedad Española de neurocirugía [Aneurysmal subarachnoid hemorrhage: group of study of cerebrovascular pathology of the Spanish society of neurosurgery management guideline]. *Neurocirugia (Asturias, Spain)*, 22(2), 93–115.
9. Awoyemi, T., Tannetta, D., Zhang, W., Kandzija, N., Motta-Mejia, C., Fischer, R., Heilig, R., Raiss, S., Redman, C., & Vatish, M. (2020). Glycosylated Siglec-6 expression in syncytiotrophoblast-derived extracellular vesicles from preeclampsia placentas. *Biochemical and biophysical research communications*, 533(4), 838–844.

10. Awoyemi, T., Cerdeira, A. S., Zhang, W., Jiang, S., Rahbar, M., Logenthiran, P., Redman, C., & Vatish, M. (2022). Preeclampsia and syncytiotrophoblast membrane extracellular vesicles (STB-EVs). *Clinical science* (London, England : 1979), 136(24), 1793–1807. <https://doi.org/10.1042/CS20220149>
11. Aygün, B. K., Baykuş, Y., Berilgen, S., Kavak, B., Celik, H., & Gürateş, B. (2010). Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome in severe preeclampsia: case report and literature review. *Journal of the Turkish German Gynecological Association*, 11(4), 216–219. <https://doi.org/10.5152/jtgga.2010.41>
12. Argaw, A. T., Gurfein, B. T., Zhang, Y., Zameer, A., & John, G. R. (2009). VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(6), 1977–1982. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808698106>
13. Argaw, A. T., Asp, L., Zhang, J., Navrazhina, K., Pham, T., Mariani, J. N., Mahase, S., Dutta, D. J., Seto, J., Kramer, E. G., Ferrara, N., Sofroniew, M. V., & John, G. R. (2012). Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *The Journal of clinical investigation*, 122(7), 2454–2468. <https://doi.org/10.1172/JCI60842>
14. Bakrania, B. A., Spradley, F. T., Drummond, H. A., LaMarca, B., Ryan, M. J., & Granger, J. P. (2020). Preeclampsia: Linking Placental Ischemia with Maternal Endothelial and Vascular

- Dysfunction. *Comprehensive Physiology*, 11(1), 1315–1349.  
<https://doi.org/10.1002/cphy.c200008>
15. Banks, W. A., Sharma, P., Bullock, K. M., Hansen, K. M., Ludwig, N., & Whiteside, T. L. (2020). Transport of Extracellular Vesicles across the Blood-Brain Barrier: Brain Pharmacokinetics and Effects of Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4407.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21124407>
16. Bauer, H. C., Krizbai, I. A., Bauer, H., & Traweger, A. (2014). "You Shall Not Pass"-tight junctions of the blood brain barrier. *Frontiers in neuroscience*, 8, 392. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00392>
17. Bellos, I., Karageorgiou, V., Kapnias, D., Karamanli, K. E., & Siristatidis, C. (2018). The role of interleukins in preeclampsia: a comprehensive review. *American Journal of Reproductive Immunology*, 80(6), e13055.
18. Bergman, L., Akhter, T., Wikström, A. K., Wikström, J., Naessen, T., & Åkerud, H. (2014). Plasma levels of S100B in preeclampsia and association with possible central nervous system effects. *American journal of hypertension*, 27(8), 1105–1111.
19. Bergman, L., Torres-Vergara, P., Penny, J., Wikström, J., Nelander, M., León, J., Tolcher, M., Roberts, J., Wikström, A. y Escudero, C. (2019). Investigating Maternal Brain Alterations in Preeclampsia: the Need for a Multidisciplinary Effort. *Current Hypertension Reports*, 21(9), 72.
20. Bergman, L., Nordlöf-Callbo, P., Wikström, A. K., Snowden, J. M., Hesselman, S., Edstedt Bonamy, A. K., & Sandström, A. (2020). Multi-Fetal

Pregnancy, Preeclampsia, and Long-Term Cardiovascular Disease. *Hypertension* (Dallas, Tex. : 1979), 76(1), 167–175. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.14860>

21. Bergman, L., Acurio, J., Leon, J., Gatu, E., Friis, T., Nelander, M., Wikström, J., Larsson, A., Lara, E., Aguayo, C., Torres-Vergara, P., Wikström, A. K., & Escudero, C. (2021). Preeclampsia and Increased Permeability Over the Blood-Brain Barrier: A Role of Vascular Endothelial Growth Receptor 2. *American journal of hypertension*, 34(1), 73–81.
22. Bonsergent, E., Grisard, E., Buchrieser, J., Schwartz, O., Théry, C., & Lavieu, G. (2021). Quantitative characterization of extracellular vesicle uptake and content delivery within mammalian cells. *Nature communications*, 12(1), 1864. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22126-y>
23. Buca, D., Bologna, G., D'Amico, A., Cugini, S., Musca, F., Febbo, M., D'Arcangelo, D., Buca, D., Simeone, P., Liberati, M., Vitacolonna, E., Miscia, S., D'Antonio, F., & Lanuti, P. (2020). Extracellular Vesicles in Feto-Maternal Crosstalk and Pregnancy Disorders. *International journal of molecular sciences*, 21(6), 2120. <https://doi.org/10.3390/ijms21062120>
24. Burton, G. J., Woods, A. W., Jauniaux, E., & Kingdom, J. C. (2009). Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. *Placenta*, 30(6), 473–482.
25. Burwick, R. M., Togioka, B. M., Speranza, R. J., Gaffney, J. E., Roberts, V., Frias, A. E., & Rincón, M. (2019). Assessment of blood-brain

barrier integrity and neuroinflammation in preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology*, 221(3), 269.e1–269.e8.

26. Buscemi, L., Price, M., Bezzi, P., & Hirt, L. (2019). Spatio-temporal overview of neuroinflammation in an experimental mouse stroke model. *Scientific reports*, 9(1), 507. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36598-4>
27. Bushnell, C., Arnan, M., & Han, S. (2014). A new model for secondary prevention of stroke: transition coaching for stroke. *Frontiers in neurology*, 5, 219. <https://doi.org/10.3389/fneur.2014.00219>
28. Bushnell, C., & Chireau, M. (2011). Preeclampsia and Stroke: Risks during and after Pregnancy. *Stroke research and treatment*, 2011, 858134.
29. Carroll, RW; Wainwright, MS; Kim, K-Y; Kidambi, T; Gómez, ND; Taylor, T y Haldar, K. (2010) A Rapid Murine Coma and Behavior Scale for Quantitative Assessment of Murine Cerebral Malaria. *PLoS ONE* 5(10): e13124.
30. Cerdeira, A. S., & Vatish, M. (2018). Taming preeclampsia at its source. *Nature biotechnology*, 36(12), 1151–1152.
31. Chaballe, L., Close, P., Sempels, M., Delstanche, S., Fanielle, J., Moons, L., Carmeliet, P., Schoenen, J., Chariot, A., & Franzen, R. (2011). Involvement of placental growth factor in Wallerian degeneration. *Glia*, 59(3), 379–396. <https://doi.org/10.1002/glia.21108>
32. Chao, L. L., Barlow, C., Karimpoor, M., & Lim, L. (2020). Changes in Brain Function and Structure After Self-Administered Home

- Photobiomodulation Treatment in a Concussion Case. *Frontiers in neurology*, 11, 952. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00952>
33. Candice Chapouly, Azeb Tadesse Argaw, Sam Horng, Kamilah Castro, Jingya Zhang, Linnea Asp, Hannah Loo, Benjamin M. Laitman, John N. Mariani, Rebecca Straus Farber, Elena Zaslavsky, German Nudelman, Cedric S. Raine, Gareth R. John, Astrocytic TYMP and VEGFA drive blood–brain barrier opening in inflammatory central nervous system lesions, *Brain*, Volume 138, Issue 6, June 2015, Pages 1548–1567, <https://doi.org/10.1093/brain/awv077>
34. Chau, K., Welsh, M., Makris, A. et al. Progress in preeclampsia: the contribution of animal models. *J Hum Hypertens* 36, 705–710 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41371-021-00637-x>
35. Cheng, Y., Desse, S., Martinez, A., Worthen, R. J., Jope, R. S., & Beurel, E. (2018). TNF $\alpha$  disrupts blood brain barrier integrity to maintain prolonged depressive-like behavior in mice. *Brain, behavior, and immunity*, 69, 556–567. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.02.003>
36. Chitnis, T., & Weiner, H. L. (2017). CNS inflammation and neurodegeneration. *The Journal of clinical investigation*, 127(10), 3577–3587.
37. Chiva, C., Mendes Maia, T., Panse, C., Stejskal, K., Douché, T., Matondo, M., ... & Sabidó, E. (2021). Quality standards in proteomics research facilities: Common standards and quality procedures are essential for proteomics facilities and their users. *EMBO reports*, 22(6), e52626.

38. Choi, J. W., Im, M. W., & Pai, S. H. (2002). Nitric oxide production increases during normal pregnancy and decreases in preeclampsia. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 32(3), 257-263.
39. Cipolla M. J. (2007). Cerebrovascular function in pregnancy and eclampsia. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 50(1), 14–24.  
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.106.079442>
40. Cipolla, M. J., Pusic, A. D., Grinberg, Y. Y., Chapman, A. C., Poynter, M. E., & Kraig, R. P. (2012). Pregnant serum induces neuroinflammation and seizure activity via TNF $\alpha$ . *Experimental neurology*, 234(2), 398–404.
41. Cipolla, M. J., & Biller, J. (2017). Persistent brain injury after preeclampsia. *Neurology*, 88(13), 1216–1217.  
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003773>
42. Cipolla M. J. (2013). The adaptation of the cerebral circulation to pregnancy: mechanisms and consequences. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 33(4), 465–478.  
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.210>
43. Clayton, A. M., Shao, Q., Paauw, N. D., Giambone, A. B., Granger, J. P., & Warrington, J. P. (2018). Postpartum increases in cerebral edema and inflammation in response to placental ischemia during pregnancy. *Brain, behavior, and immunity*, 70, 376–389.
44. Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual review of cell and developmental biology*, 30, 255–289.



45. Connell, J. J., Chatain, G., Cornelissen, B., Vallis, K. A., Hamilton, A., Seymour, L., Anthony, D. C., & Sibson, N. R. (2013). Selective permeabilization of the blood-brain barrier at sites of metastasis. *Journal of the National Cancer Institute*, 105(21), 1634–1643. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt276>
46. Creed, J. A., DiLeonardi, A. M., Fox, D. P., Tessler, A. R., & Raghupathi, R. (2011). Concussive brain trauma in the mouse results in acute cognitive deficits and sustained impairment of axonal function. *Journal of neurotrauma*, 28(4), 547–563. <https://doi.org/10.1089/neu.2010.1729>
47. Croll, S. D., Goodman, J. H., & Scharfman, H. E. (2004). Vascular endothelial growth factor (VEGF) in seizures: a double-edged sword. *Advances in experimental medicine and biology*, 548, 57–68. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-6376-8\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-6376-8_4)
48. Cronqvist, T., Tannetta, D., Mörgelin, M., Belting, M., Sargent, I., Familiar, M., & Hansson, S. (2017). Syncytiotrophoblast derived extracellular vesicles transfer functional placental miRNAs to primary human endothelial cells. *Scientific Reports*, 7(1).
49. Cvitkovic, K., Pusic Sesar, A., Sesar, A., & Cavar, I. (2022). Ophthalmic Disorders in Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome Associated with Preeclampsia. *IntechOpen*. doi: 10.5772/intechopen.101270
50. Czernek, L., & Döchler, M. (2020). Exosomes as Messengers Between Mother and Fetus in Pregnancy. *International journal of molecular sciences*, 21(12), 4264. <https://doi.org/10.3390/ijms21124264>

51. Da Fonseca, A. C., Matias, D., Garcia, C., Amaral, R., Geraldo, L. H., Freitas, C., & Lima, F. R. (2014). The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 362.
52. Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A. A., & Barres, B. A. (2010). Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*, 468(7323),562–566.  
<https://doi.org/10.1038/nature09513>
53. Davis, B., Tang, J., Zhang, L., Mu, D., Jiang, X., Biran, V., Vexler, Z., & Ferriero, D. M. (2010). Role of vasodilator stimulated phosphoprotein in VEGF induced blood-brain barrier permeability in endothelial cell monolayers. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 28(6), 423–428. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2010.06.010>
54. de Alwis, N., Binder, N. K., Beard, S., Mangwiro, Y. T., Kadife, E., Cuffe, J. S., Keenan, E., Fato, B. R., Kaitu'u-Lino, T. J., Brownfoot, F. C., Marshall, S. A., & Hannan, N. J. (2022). The L-NAME mouse model of preeclampsia and impact to long-term maternal cardiovascular health. *Life science alliance*, 5(12), e202201517. <https://doi.org/10.26508/lsa.202201517>
55. Desai, B. S., Monahan, A. J., Carvey, P. M., & Hendey, B. (2007). Blood-brain barrier pathology in Alzheimer's and Parkinson's disease: implications for drug therapy. *Cell transplantation*, 16(3), 285–299.  
<https://doi.org/10.3727/000000007783464731>

56. Didion S. P. (2017). Cellular and Oxidative Mechanisms Associated with Interleukin-6 Signaling in the Vasculature. *International journal of molecular sciences*, 18(12), 2563. <https://doi.org/10.3390/ijms18122563>
57. DiSabato, D. J., Quan, N., & Godbout, J. P. (2016). Neuroinflammation: the devil is in the details. *Journal of neurochemistry*, 139 Suppl 2(Suppl 2), 136–153. <https://doi.org/10.1111/jnc.13607>
58. Duley, L. (2009). The Global Impact of Pre-eclampsia and Eclampsia. *Seminars In Perinatology*, 33(3), 130-137.
59. Duncan, J. W., Azubuike, D., Booz, G. W., Fisher, B., Williams, J. M., Fan, F., Ibrahim, T., LaMarca, B., & Cunningham, M. W., Jr (2020). Angiotensin II type 1 receptor autoantibody blockade improves cerebral blood flow autoregulation and hypertension in a preclinical model of preeclampsia. *Hypertension in pregnancy*, 39(4), 451–460. <https://doi.org/10.1080/10641955.2020.1833215>
60. Dutta, S., Lai, A., Scholz-Romero, K., Shiddiky, M. J. A., Yamauchi, Y., Mishra, J. S., Rice, G. E., Hyett, J., Kumar, S., & Salomon, C. (2020). Hypoxia-induced small extracellular vesicle proteins regulate proinflammatory cytokines and systemic blood pressure in pregnant rats. *Clinical science (London, England : 1979)*, 134(6), 593–607. <https://doi.org/10.1042/CS20191155>
61. Escouto, D. C., Gadonski, G., Porcello-Marrone, L., Costa da Costa, J., Paludo, N., do Amaral, R. R., da Costa, B. E. P., & Poli-de-Figueiredo, C. E. (2018). Using the Reduced Uterine Perfusion Pressure model of

- preeclampsia to study the blood brain barrier permeability. *Scientia Medica*, 28(2), ID29631. <https://doi.org/10.15448/1980-6108.2018.2.29631>
62. Escudero, C. A., Herlitz, K., Troncoso, F., Acurio, J., Aguayo, C., Roberts, J. M., Truong, G., Duncombe, G., Rice, G., & Salomon, C. (2016). Role of Extracellular Vesicles and microRNAs on Dysfunctional Angiogenesis during Preeclamptic Pregnancies. *Frontiers in physiology*, 7, 98.
63. Escudero, C., Giachini, F. R., García-Robles, R., Galaviz-Hernandez, C., & Damiano, A. E. (2022). Editorial: Vascular dysfunction beyond pathological pregnancies. An international effort addressed to fill the gaps in Latin America, Volume II. *Frontiers in physiology*, 13, 989407. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.989407>
64. Escudero, C., Kupka, E., Ibañez, B., Sandoval, H., Troncoso, F., Wikström, A. K., López-Espíndola, D., Acurio, J., Torres-Vergara, P., & Bergman, L. (2023). Brain Vascular Dysfunction in Mothers and Their Children Exposed to Preeclampsia. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 80(2), 242–256. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.122.19408>
65. Feng, M., DiPetrillo, K. (2009). Non-invasive Blood Pressure Measurement in Mice. In: DiPetrillo, K. (eds) *Cardiovascular Genomics. Methods in Molecular Biology™*, vol 573. Humana Press, Totowa, NJ. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-247-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-247-6_3)
66. Fernández P., Calviño L., Díaz P., Pillado S. (2010). Determinación del tamaño muestral.

67. Ferrara N. (2009). Vascular endothelial growth factor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 29(6), 789–791. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179663>
68. Foley, H. B., Howe, C. G., Eckel, S. P., Chavez, T., Gevorgian, L., Reyes, E. G., Kapanke, B., Martinez, D., Xue, S., Suglia, S. F., Bastain, T. M., Marsit, C., & Breton, C. V. (2021). Extracellular vesicle-enriched miRNA profiles across pregnancy in the MADRES cohort. *PloS one*, 16(5), e0251259. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251259>
69. Freeman, D. J., McManus, F., Brown, E. A., Cherry, L., Norrie, J., Ramsay, J. E., Clark, P., Walker, I. D., Sattar, N., & Greer, I. A. (2004). Short- and long-term changes in plasma inflammatory markers associated with preeclampsia. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 44(5), 708–714. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000143849.67254.ca>
70. Friis, T., Wikström, A. K., Acurio, J., León, J., Zetterberg, H., Blennow, K., Nelander, M., Åkerud, H., Kaihola, H., Cluver, C., Troncoso, F., Torres-Vergara, P., Escudero, C., & Bergman, L. (2022). Cerebral Biomarkers and Blood-Brain Barrier Integrity in Preeclampsia. *Cells*, 11(5), 789.
71. Fugate, J. E., Claassen, D. O., Cloft, H. J., Kallmes, D. F., Kozak, O. S., & Rabinstein, A. A. (2010). Posterior reversible encephalopathy syndrome: associated clinical and radiologic findings. *Mayo Clinic proceedings*, 85(5), 427–432.
72. Furuya, M., Kurasawa, K., Nagahama, K., Kawachi, K., Nozawa, A., Takahashi, T., & Aoki, I. (2011). Disrupted balance of angiogenic and

antiangiogenic signalings in preeclampsia. *Journal of pregnancy*, 2011, 123717. <https://doi.org/10.1155/2011/123717>

73. Fushima, T., Sekimoto, A., Minato, T., Ito, T., Oe, Y., Kisu, K., Sato, E., Funamoto, K., Hayase, T., Kimura, Y., Ito, S., Sato, H., & Takahashi, N. (2016). Reduced Uterine Perfusion Pressure (RUPP) Model of Preeclampsia in Mice. *PloS one*, 11(5), e0155426. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155426>

74. Gatford, K. L., Andraweera, P. H., Roberts, C. T., & Care, A. S. (2020). Animal Models of Preeclampsia: Causes, Consequences, and Interventions. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 75(6), 1363–1381. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14598>

75. Gebara, N., Correia, Y., Wang, K., & Bussolati, B. (2021). Angiogenic Properties of Placenta-Derived Extracellular Vesicles in Normal Pregnancy and in Preeclampsia. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10), 5402. <https://doi.org/10.3390/ijms22105402>

76. Gemel, J., Mao, Y., Lapping-Carr, G., & Beyer, E. C. (2020). Gap Junctions between Endothelial Cells Are Disrupted by Circulating Extracellular Vesicles from Sickle Cell Patients with Acute Chest Syndrome. *International journal of molecular sciences*, 21(23), 8884.

77. Gilani, S. I., Weissgerber, T. L., Garovic, V. D., & Jayachandran, M. (2016). Preeclampsia and Extracellular Vesicles. *Current hypertension reports*, 18(9), 68.

78. Goswami, D., Tannetta, D. S., Magee, L. A., Fuchisawa, A., Redman, C. W., Sargent, I. L., & von Dadelszen, P. (2006). Excess

syncytiotrophoblast microparticle shedding is a feature of early-onset pre-eclampsia, but not normotensive intrauterine growth restriction. *Placenta*, 27(1), 56–61.

79. Graham J. M. (2002). Homogenization of mammalian cultured cells. *TheScientificWorldJournal*, 2, 1630–1633. <https://doi.org/10.1100/tsw.2002.848>

80. Greene, C., Hanley, N., & Campbell, M. (2019). Claudin-5: gatekeeper of neurological function. *Fluids and barriers of the CNS*, 16(1), 3.

81. Günzel, D., & Yu, A. S. (2013). Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiological reviews*, 93(2), 525–569. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2012>

82. Guo, F., Xu, D., Lin, Y., Wang, G., Wang, F., Gao, Q., ... & Lei, S. (2020). Chemokine CCL2 contributes to BBB disruption via the p38 MAPK signaling pathway following acute intracerebral hemorrhage. *The FASEB Journal*, 34(1), 1872-1884.

83. Hajal, C., Le Roi, B., Kamm, R. D., & Maoz, B. M. (2021). Biology and models of the blood–brain barrier. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 23, 359-384.

84. Hammad, T., DeDent, A., Algahtani, R., Alastal, Y., Elmer, L., Medhkour, A., Safi, F., & Assaly, R. (2015). Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome Secondary to CSF Leak and Intracranial Hypotension: A Case Report and Literature Review. *Case reports in neurological medicine*, 2015, 538523. <https://doi.org/10.1155/2015/538523>

85. Hammer, E. S., & Cipolla, M. J. (2015). Cerebrovascular Dysfunction in Preeclamptic Pregnancies. *Current hypertension reports*, 17(8), 64.
86. Han, C., Wang, C., Chen, Y., Wang, J., Xu, X., Hilton, T., Cai, W., Zhao, Z., Wu, Y., Li, K., Houck, K., Liu, L., Sood, A. K., Wu, X., Xue, F., Li, M., Dong, J. F., & Zhang, J. (2020). Placenta-derived extracellular vesicles induce preeclampsia in mouse models. *Haematologica*, 105(6), 1686–1694.
87. Hasbún, J., Rodríguez, M., & Miranda, G. (2012). Síndrome de encefalopatía posterior reversible (PRES) en dos casos clínicos de eclampsia. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*, 50(1), 35-41.
88. Heilmann, L., Rath, W., & Pollow, K. (2007). Hemostatic abnormalities in patients with severe preeclampsia. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 13(3), 285–291.
89. Hinchey, J., Chaves, C., Appignani, B., Breen, J., Pao, L., Wang, A., Pessin, M. S., Lamy, C., Mas, J. L., & Caplan, L. R. (1996). A reversible posterior leukoencephalopathy syndrome. *The New England journal of medicine*, 334(8), 494–500.
90. Holmes, D. I., & Zachary, I. (2005). The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome biology*, 6(2), 209. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-2-209>
91. Hosokawa, A., Umazume, T., Yamada, T., & Minakami, H. (2017). Maternal bradycardia occurring prior to onset of HELLP syndrome in a woman with pre-eclampsia. *BMJ case reports*, 2017, bcr2016217964. <https://doi.org/10.1136/bcr-2016-217964>



92. Huang, S. S., Pavenski, K., Lee, T. Y., Jurkiewicz, M. T., Bharatha, A., Thiessen, J. D., St Lawrence, K., Théberge, J., Mandzia, J., Barth, D., Licht, C., & Patriquin, C. J. (2021). Blood-brain barrier permeability in survivors of immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura: a pilot study. *Blood advances*, 5(20), 4211–4218. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021005317>
93. Hudson, N., Powner, M. B., Sarker, M. H., Burgoyne, T., Campbell, M., Ockrim, Z. K., Martinelli, R., Futter, C. E., Grant, M. B., Fraser, P. A., Shima, D. T., Greenwood, J., & Turowski, P. (2014). Differential apicobasal VEGF signaling at vascular blood-neural barriers. *Developmental cell*, 30(5), 541–552. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.06.027>
94. Johnson, A. C., Tremble, S. M., Chan, S. L., Moseley, J., LaMarca, B., Nagle, K. J., & Cipolla, M. J. (2014). Magnesium sulfate treatment reverses seizure susceptibility and decreases neuroinflammation in a rat model of severe preeclampsia. *PloS one*, 9(11), e113670.
95. Johnson, A. C., & Cipolla, M. J. (2015). The cerebral circulation during pregnancy: adapting to preserve normalcy. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 30(2), 139–147.
96. Johnson, A. C., & Cipolla, M. J. (2018). Impaired function of cerebral parenchymal arterioles in experimental preeclampsia. *Microvascular research*, 119, 64-72.
97. Kane, S. C., Dennis, A., da Silva Costa, F., Kornman, L., & Brennecke, S. (2013). Contemporary clinical management of the cerebral

- complications of preeclampsia. *Obstetrics and gynecology international*, 2013, 985606. <https://doi.org/10.1155/2013/985606>
98. Karumanchi S. A. (2016). Angiogenic Factors in Preeclampsia: From Diagnosis to Therapy. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 67(6), 1072–1079. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.06421>
99. Kauffman, M. G., Noga, S. J., Kelly, T. J., & Donnenberg, A. D. (1990). Isolation of cell cycle fractions by counterflow centrifugal elutriation. *Analytical biochemistry*, 191(1), 41-46.
100. Khalil G, Hameed A (2017) Preeclampsia: Pathophysiology and the Maternal-Fetal Risk. *J Hypertens Manag* 3:024. [doi.org/10.23937/2474-3690/1510024](https://doi.org/10.23937/2474-3690/1510024)
101. Kim, I. D., Cave, J. W., & Cho, S. (2021). Aflibercept, a VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)-Trap, Reduces Vascular Permeability and Stroke-Induced Brain Swelling in Obese Mice. *Stroke*, 52(8), 2637–2648. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.121.034362>
102. Kim, D. K., Jeong, J., Lee, D. S., Hyeon, D. Y., Park, G. W., Jeon, S., ... & Jung, K. (2022). PD-L1-directed PIGF/VEGF blockade synergizes with chemotherapy by targeting CD141+ cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer. *Nature Communications*, 13(1), 6292.
103. Knox, E.G., Aburto, M.R., Clarke, G. et al. The blood-brain barrier in aging and neurodegeneration. *Mol Psychiatry* 27, 2659–2673 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01511-z>
104. Kucuk, M., Yilmaz, C. U., Orhan, N., Ahishali, B., Arican, N., Elmas, I., ... & Kaya, M. (2018). The effects of lipopolysaccharide on the disrupted

blood-brain barrier in a rat model of preeclampsia. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 27(12), 3411-3418.

105. Lapping-Carr, G., Gemel, J., Mao, Y., Sparks, G., Harrington, M., Peddinti, R., & Beyer, E. C. (2020). Circulating extracellular vesicles from patients with acute chest syndrome disrupt adherens junctions between endothelial cells. *Pediatric research*, 89(4), 776–784.

106. Lara, E., Rivera, N., González-Bernal, A., Rojas, D., López-Espíndola, D., Rodríguez, A., & Escudero, C. (2022). Abnormal cerebral microvascular perfusion and reactivity in female offspring of reduced uterine perfusion pressure (RUPP) mice model. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 42(12), 2318–2332. <https://doi.org/10.1177/0271678X221121872>

107. León, J., Acurio, J., Bergman, L., López, J., Karin Wikström, A., Torres-Vergara, P., Troncoso, F., Castro, F. O., Vatish, M., & Escudero, C. (2021). Disruption of the Blood-Brain Barrier by Extracellular Vesicles From Preeclampsia Plasma and Hypoxic Placentae: Attenuation by Magnesium Sulfate. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 78(5), 1423–1433.

108. Levine, R. J., Maynard, S. E., Qian, C., Lim, K. H., England, L. J., Yu, K. F., Schisterman, E. F., Thadhani, R., Sachs, B. P., Epstein, F. H., Sibai, B. M., Sukhatme, V. P., & Karumanchi, S. A. (2004). Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *The New England journal of medicine*, 350(7), 672–683. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa031884>

109. Li, J., LaMarca, B., & Reckelhoff, J. F. (2012). A model of preeclampsia in rats: the reduced uterine perfusion pressure (RUPP) model. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 303(1), H1-H8.
110. Li, Y., Wang, Y., Ding, X., Duan, B., Li, L., & Wang, X. (2016). Serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 are associated with pregnancy-induced hypertension. *Reproductive Sciences*, 23(10), 1402-1408.
111. Lidington, D., Wan, H., & Bolz, S. S. (2021). Cerebral Autoregulation in Subarachnoid Hemorrhage. *Frontiers in neurology*, 12, 688362.
112. Liévano, S., Alarcón, L., Chávez–Munguía, B., & González–Mariscal, L. (2006). Endothelia of term human placentae display diminished expression of tight junction proteins during preeclampsia. *Cell and tissue research*, 324(3), 433-448.
113. Liman, T. G., Bohner, G., Heuschmann, P. U., Endres, M., & Siebert, E. (2012). The clinical and radiological spectrum of posterior reversible encephalopathy syndrome: the retrospective Berlin PRES study. *Journal of neurology*, 259(1), 155–164.
114. Liu, Y., Li, Y., Wang, Y. et al. Recent progress on vascular endothelial growth factor receptor inhibitors with dual targeting capabilities for tumor therapy. *J Hematol Oncol* 15, 89 (2022). <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01310-7>
115. Lockwood, C. J., Yen, C. F., Basar, M., Kayisli, U. A., Martel, M., Buhimschi, I., Buhimschi, C., Huang, S. J., Krikun, G., & Schatz, F. (2008). Preeclampsia-related inflammatory cytokines regulate interleukin-6

- expression in human decidual cells. *The American journal of pathology*, 172(6), 1571–1579. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070629>
116. Luissint, A. C., Artus, C., Glacial, F., Ganeshamoorthy, K., & Couraud, P. O. (2012). Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids and barriers of the CNS*, 9(1), 23.
117. Lutun, A., Tjwa, M., Moons, L., Wu, Y., Angelillo-Scherrer, A., Liao, F., Nagy, J. A., Hooper, A., Priller, J., De Klerck, B., Compernelle, V., Daci, E., Bohlen, P., Dewerchin, M., Herbert, J. M., Fava, R., Matthys, P., Carmeliet, G., Collen, D., Dvorak, H. F., ... Carmeliet, P. (2002). Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nature medicine*, 8(8), 831–840. <https://doi.org/10.1038/nm731>
118. MacKay, A. P., Berg, C. J., & Atrash, H. K. (2001). Pregnancy-related mortality from preeclampsia and eclampsia. *Obstetrics and gynecology*, 97(4), 533–538.
119. Madazli, R., Aydin, S., Uludag, S., Vildan, O. and Tolun, N. (2003), Maternal plasma levels of cytokines in normal and preeclamptic pregnancies and their relationship with diastolic blood pressure and fibronectin levels. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 82: 797-802. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0412.2003.00206.x>
120. Magnussen, E. B., Vatten, L. J., Lund-Nilsen, T. I., Salvesen, K. A., Davey Smith, G., & Romundstad, P. R. (2007). Prepregnancy cardiovascular

risk factors as predictors of pre-eclampsia: population based cohort study. *BMJ (Clinical research ed.)*, 335(7627), 978.

121. Marra, A., Vargas, M., Striano, P., Del Guercio, L., Buonanno, P., & Servillo, G. (2014). Posterior reversible encephalopathy syndrome: the endothelial hypotheses. *Medical hypotheses*, 82(5), 619–622.

122. Matin, M., Mörgelin, M., Stetefeld, J., Schermer, B., Brinkkoetter, P. T., Benzing, T., Koch, M., & Hagmann, H. (2020). Affinity-Enhanced Multimeric VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) and PlGF (Placental Growth Factor) Variants for Specific Adsorption of sFlt-1 to Restore Angiogenic Balance in Preeclampsia. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 76(4), 1176–1184.

<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.14974>

123. McDermott, M., Miller, E. C., Rundek, T., Hurn, P. D., & Bushnell, C. D. (2018). Preeclampsia: Association With Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome and Stroke. *Stroke*, 49(3), 524–530.

124. Mehndiratta, M. M., Gulhane, M., Jabeen, S. A., Patten, A., Dash, A., & Malhotra, M. (2021). Efficacy and safety of adjunctive perampanel in patients with focal seizures or generalized tonic-clonic seizures: Post hoc analysis of Phase II and Phase III double-blind and open-label extension studies in India. *Epilepsia open*, 6(1), 90–101.

<https://doi.org/10.1002/epi4.12448>

125. Merino-González, C., Zuñiga, F. A., Escudero, C., Ormazabal, V., Reyes, C., Nova-Lamperti, E., Salomón, C., & Aguayo, C. (2016). Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote

Angiogenesis: Potencial Clinical Application. *Frontiers in physiology*, 7, 24.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00024>

126. Michalicova, A., Majerova, P., & Kovac, A. (2020). Tau Protein and Its Role in Blood-Brain Barrier Dysfunction. *Frontiers in molecular neuroscience*, 13, 570045.
127. Miller, R., Genbacev, O., Turner, M., Aplin, J., Caniggia, I., & Huppertz, B. (2005). Human placental explants in culture: Approaches and assessments. *Placenta*, 26(6), 439-448.
128. Miller, E. C., Gatollari, H. J., Too, G., Boehme, A. K., Leffert, L., Marshall, R. S., ... & Willey, J. Z. (2017). Risk factors for pregnancy-associated stroke in women with preeclampsia. *Stroke*, 48(7), 1752-1759.
129. Miller, K. B., Miller, V. M., & Barnes, J. N. (2019). Pregnancy history, hypertension, and cognitive impairment in postmenopausal women. *Current Hypertension Reports*, 21(12), 1-8.
130. Miller, D., Motomura, K., Galaz, J., Gershater, M., Lee, E. D., Romero, R., & Gomez-Lopez, N. (2022). Cellular immune responses in the pathophysiology of preeclampsia. *Journal of Leukocyte Biology*, 111(1), 237-260.
131. Miller E. C. (2019). Preeclampsia and Cerebrovascular Disease. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 74(1), 5–13.
132. Mineta, K., Yamamoto, Y., Yamazaki, Y., Tanaka, H., Tada, Y., Saito, K., Tamura, A., Igarashi, M., Endo, T., Takeuchi, K., & Tsukita, S. (2011). Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS letters*, 585(4), 606–612.

133. Mitchell, M. D., Peiris, H. N., Kobayashi, M., Koh, Y. Q., Duncombe, G., Illanes, S. E., Rice, G. E., & Salomon, C. (2015). Placental exosomes in normal and complicated pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*, 213(4 Suppl), S173–S181.
134. Mor, G., Cardenas, I., Abrahams, V., & Guller, S. (2011). Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1221(1), 80–87. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05938.x>
135. Moroi, S., Saitou, M., Fujimoto, K., Sakakibara, A., Furuse, M., Yoshida, O., & Tsukita, S. (1998). Occludin is concentrated at tight junctions of mouse/rat but not human/guinea pig Sertoli cells in testes. *The American journal of physiology*, 274(6), C1708–C1717.
136. Morton, J. S., Levasseur, J., Ganguly, E., Quon, A., Kirschenman, R., Dyck, J. R. B., Fraser, G. M., & Davidge, S. T. (2019). Characterisation of the Selective Reduced Uteroplacental Perfusion (sRUPP) Model of Preeclampsia. *Scientific reports*, 9(1), 9565. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45959-6>
137. Na, K. S., Jung, H. Y., & Kim, Y. K. (2014). The role of pro-inflammatory cytokines in the neuroinflammation and neurogenesis of schizophrenia. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 48, 277–286.
138. Nemeth, D. V., Baldini, E., Sorrenti, S., D'Andrea, V., & Bellini, M. I. (2022). Cancer Metabolism and Ischemia-Reperfusion Injury: Two Sides of the Same Coin. *Journal of Clinical Medicine*, 11(17), 5096.



139. Nishioku, T., Dohgu, S., Takata, F., Eto, T., Ishikawa, N., Kodama, K. B., Nakagawa, S., Yamauchi, A., & Kataoka, Y. (2009). Detachment of brain pericytes from the basal lamina is involved in disruption of the blood-brain barrier caused by lipopolysaccharide-induced sepsis in mice. *Cellular and molecular neurobiology*, 29(3), 309–316.
140. Nishioku, T., Matsumoto, J., Dohgu, S., Sumi, N., Miyao, K., Takata, F., Shuto, H., Yamauchi, A., & Kataoka, Y. (2010). Tumor necrosis factor- $\alpha$  mediates the blood-brain barrier dysfunction induced by activated microglia in mouse brain microvascular endothelial cells. *Journal of pharmacological sciences*, 112(2), 251–254. <https://doi.org/10.1254/jphs.09292sc>
141. Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., & Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *The Journal of cell biology*, 161(3), 653–660. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302070>
142. Nouh, A., Remke, J., & Ruland, S. (2014). Ischemic posterior circulation stroke: a review of anatomy, clinical presentations, diagnosis, and current management. *Frontiers in neurology*, 5, 30. <https://doi.org/10.3389/fneur.2014.00030>
143. Nzou G, Seeds MC, Wicks RT, Atala AJ (2019) Fundamental Neurovascular Components for the Development of Complex and Dynamic in Vitro Brain Equivalent Models. *J Alzheimers Neurodegener Dis* 5: 021.
144. Okawa, T., Honda, S., Sanpei, M., Ishida, T., Fujimori, K., & Sato, A. (2004). Effects of nitric oxide and prostacyclin on hemodynamic response by

- big endothelin-1 in near term fetal sheep. *Journal of perinatal medicine*, 32(6), 495–499. <https://doi.org/10.1515/JPM.2004.149>
145. Opichka, M. A., Rappelt, M. W., Gutterman, D. D., Grobe, J. L., & McIntosh, J. J. (2021). Vascular Dysfunction in Preeclampsia. *Cells*, 10(11), 3055. <https://doi.org/10.3390/cells10113055>
146. Otani, T., & Furuse, M. (2020). Tight Junction Structure and Function Revisited. *Trends in cell biology*, 30(10), 805–817. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.08.004>
147. Page, S., Raut, S., & Al-Ahmad, A. (2019). Oxygen-Glucose Deprivation/Reoxygenation-Induced Barrier Disruption at the Human Blood-Brain Barrier is Partially Mediated Through the HIF-1 Pathway. *Neuromolecular medicine*, 21(4), 414–431. <https://doi.org/10.1007/s12017-019-08531-z>
148. Parvez, M. S. A., & Ohtsuki, G. (2022). Acute Cerebellar Inflammation and Related Ataxia: Mechanisms and Pathophysiology. *Brain sciences*, 12(3), 367. <https://doi.org/10.3390/brainsci12030367>
149. Pinheiro, M. B., Martins-Filho, O. A., Mota, A. P., Alpoim, P. N., Godoi, L. C., Silveira, A. C., Teixeira-Carvalho, A., Gomes, K. B., & Dusse, L. M. (2013). Severe preeclampsia goes along with a cytokine network disturbance towards a systemic inflammatory state. *Cytokine*, 62(1), 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2013.02.027>
150. Porcello Marrone, L. C., Farina Brunelli, J. P., Lutzky Saute, R., Henrique Tomasi, G., Cecchele Madeira, B., Alves Martins, W., ... & Costa

- da Costa, J. (2014). Cardioembolic sources in stroke patients in south of Brazil. *Thrombosis*, 2014.
151. Ragsdale, H. B., Kuzawa, C. W., Borja, J. B., Avila, J. L., & McDade, T. W. (2019). Regulation of inflammation during gestation and birth outcomes: Inflammatory cytokine balance predicts birth weight and length. *American journal of human biology : the official journal of the Human Biology Council*, 31(3), e23245. <https://doi.org/10.1002/ajhb.23245>
152. Ramos-Zaldívar, H. M., Polakovicova, I., Salas-Huenuleo, E., Corvalán, A. H., Kogan, M. J., Yefi, C. P., & Andia, M. E. (2022). Extracellular vesicles through the blood–brain barrier: a review. *Fluids and Barriers of the CNS*, 19(1), 1-15.
153. Rana, S., Burke, S. D., & Karumanchi, S. A. (2022). Imbalances in circulating angiogenic factors in the pathophysiology of preeclampsia and related disorders. *American journal of obstetrics and gynecology*, 226(2S), S1019–S1034. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.10.022>
154. Redman, C. W., & Sargent, I. L. (2005). Latest advances in understanding preeclampsia. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5728), 1592–1594. <https://doi.org/10.1126/science.1111726>
155. Roberts, J. M., Rich-Edwards, J. W., McElrath, T. F., Garmire, L., Myatt, L., & Global Pregnancy Collaboration (2021). Subtypes of Preeclampsia: Recognition and Determining Clinical Usefulness. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 77(5), 1430–1441.
156. Rolnik, D. L., Wright, D., Poon, L. C., O’Gorman, N., Syngelaki, A., de Paco Matallana, C., Akolekar, R., Cicero, S., Janga, D., Singh, M., Molina, F.

- S., Persico, N., Jani, J. C., Plasencia, W., Papaioannou, G., Tenenbaum-Gavish, K., Meiri, H., Gizurarson, S., Maclagan, K., & Nicolaides, K. H. (2017). Aspirin versus Placebo in Pregnancies at High Risk for Preterm Preeclampsia. *The New England journal of medicine*, 377(7), 613–622.
157. Ruan, J., Miao, X., Schlüter, D., Lin, L., & Wang, X. (2021). Extracellular vesicles in neuroinflammation: Pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 29(6), 1946–1957.
158. Rufino-Ramos, D., Albuquerque, P. R., Carmona, V., Perfeito, R., Nobre, R. J., & Pereira de Almeida, L. (2017). Extracellular vesicles: Novel promising delivery systems for therapy of brain diseases. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 262, 247–258.
159. Runkle, E. A., & Mu, D. (2013). Tight junction proteins: from barrier to tumorigenesis. *Cancer letters*, 337(1), 41–48.  
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.05.038>
160. Russel, W. M. S and R. L. Burch. (1959). *The principles of Humane Experimental Technique*. Methuen, London. UK.
161. Sadler, A. M., & Bailey, S. J. (2013). Validation of a refined technique for taking repeated blood samples from juvenile and adult mice. *Laboratory Animals*, 47(4), 316–319.
162. Sadovsky, Y., Ouyang, Y., Powell, J. S., Li, H., Mouillet, J. F., Morelli, A. E., Sorkin, A., & Margolis, L. (2020). Placental small extracellular vesicles: Current questions and investigative opportunities. *Placenta*, 102, 34–38.

163. Saeedi, S., Israel, S., Nagy, C., & Turecki, G. (2019). The emerging role of exosomes in mental disorders. *Translational psychiatry*, 9(1), 122.
164. Salomon C, Kobayashi M, Ashman K, Sobrevia L, Mitchell MD, Rice GE (2013) Hypoxia-Induced Changes in the Bioactivity of Cytotrophoblast-Derived Exosomes. *PLoS ONE* 8(11): e79636.
165. Salomon C, Yee S, Sarker S, et al. (2015). Placenta derived exosomes promote trophoblast invasion and spiral arterial remodeling a possible role in the physiopathology of preeclampsia. *Reprod Sci.* 2015;22: 290a.
166. Sanders, B. D., Davis, M. G., Holley, S. L., & Phillippi, J. C. (2018). Pregnancy-Associated Stroke. *Journal of midwifery & women's health*, 63(1), 23–32.
167. Schlingmann, B., Overgaard, C. E., Molina, S. A., Lynn, K. S., Mitchell, L. A., Dorsainvil White, S., Mattheyses, A. L., Guidot, D. M., Capaldo, C. T., & Koval, M. (2016). Regulation of claudin/zonula occludens-1 complexes by hetero-claudin interactions. *Nature communications*, 7, 12276. <https://doi.org/10.1038/ncomms12276>
168. Schreurs, M. P., Houston, E. M., May, V., & Cipolla, M. J. (2012). The adaptation of the blood-brain barrier to vascular endothelial growth factor and placental growth factor during pregnancy. *The FASEB Journal*, 26(1), 355.
169. Schulzke, J. D., Gitter, A. H., Mankertz, J., Spiegel, S., Seidler, U., Amasheh, S., Saitou, M., Tsukita, S., & Fromm, M. (2005). Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochimica et biophysica acta*, 1669(1), 34–42.

170. Schuster, J., Cheng, S. B., Padbury, J., & Sharma, S. (2021). Placental extracellular vesicles and pre-eclampsia. *American journal of reproductive immunology* (New York, N.Y. : 1989), 85(2), e13297. <https://doi.org/10.1111/aji.13297>
171. Sergeeva, O. N., Chesnokova, N. P., Ponukalina, E. V., Rogozhina, I. E., & Glukhova, T. N. (2015). *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk*, (5), 599–603. <https://doi.org/10.15690/vramn.v70.i5.1448>
172. ShamsEldeen, A. M., Mehesen, M. N., Aboulhoda, B. E., Rashed, L. A., Elsebaie, M. M., Mohamed, E. A., & Gamal, M. M. (2021). Prenatal intake of omega-3 promotes Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, and preserves integrity of the blood-brain barrier in preeclamptic rats. *Physiological reports*, 9(12), e14925. <https://doi.org/10.14814/phy2.14925>
173. Shibuya M. (2011). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes & cancer*, 2(12), 1097–1105. <https://doi.org/10.1177/1947601911423031>
174. Sidorova I.S., Nikitina N.A., Ageev M.B., Kokin A.A. Cerebrovascular disorders associated with severe preeclampsia and eclampsia. *Akusherstvo i Ginekologiya/Obstetrics and Gynecology*. 2021; 9: 81-92 (in Russian)<https://dx.doi.org/10.18565/aig.2021.9.81-92>
175. Sjöstedt, E., Zhong, W., Fagerberg, L., Karlsson, M., Mitsios, N., Adori, C., Oksvold, P., Edfors, F., Limiszewska, A., Hikmet, F., Huang, J., Du, Y., Lin, L., Dong, Z., Yang, L., Liu, X., Jiang, H., Xu, X., Wang, J., Yang, H., ... Mulder, J. (2020). An atlas of the protein-coding genes in the human,

- pig, and mouse brain. *Science (New York, N.Y.)*, 367(6482), eaay5947.  
<https://doi.org/10.1126/science.aay5947>
176. Sladojevic, N., Stamatovic, S. M., Johnson, A. M., Choi, J., Hu, A., Dithmer, S., Blasig, I. E., Keep, R. F., & Andjelkovic, A. V. (2019). Claudin-1-Dependent Destabilization of the Blood-Brain Barrier in Chronic Stroke. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 39(4), 743–757.
177. Smith, Tahlia I., Ashley E. Russell. 2022. "Extracellular vesicles in reproduction and pregnancy" *Extracellular Vesicles and Circulating Nucleic Acids*. 3, no.3: 292-317. <http://dx.doi.org/10.20517/evcna.2022.27>
178. Socha, M. W., Stankiewicz, M., Żolnieżewicz, K., Puk, O., & Wartęga, M. (2022). Decrease in Nitric Oxide Production as a Key Mediator in the Pathogenesis of Preeclampsia and a Potential Therapeutic Target: A Case-Control Study. *Biomedicines*, 10(10), 2653.  
<https://doi.org/10.3390/biomedicines10102653>
179. Stamatovic SM, Johnson AM, Keep RF, and Andjelkovic AV. Junctional proteins of the blood-brain barrier: New insights into function and dysfunction. 2016. *Tissue Barriers*; 4(1): e1154641 [12p.].
180. Stevenson, B. R., Siliciano, J. D., Mooseker, M. S., & Goodenough, D. A. (1986). Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *The Journal of cell biology*, 103(3), 755–766.
181. Sugiyama, T., Imai, T., Nakamura, S., Yamauchi, K., Sawada, S., Shimazawa, M., & Hara, H. (2018). A novel Nrf2 activator, RS9, attenuates

secondary brain injury after intracerebral hemorrhage in sub-acute phase. *Brain research*, 1701, 137-145.

182. Sun, J., Su, J., Xie, Y., Yin, M. T., Huang, Y., Xu, L., ... & Zhu, B. (2016). Plasma IL-6/IL-10 ratio and IL-8, LDH, and HBDH level predict the severity and the risk of death in AIDS patients with pneumocystis pneumonia. *Journal of Immunology Research*, 2016.

183. Sunderland, N. S., Thomson, S. E., Heffernan, S. J., Lim, S., Thompson, J., Ogle, R., ... & Hennessy, A. (2011). Tumor necrosis factor  $\alpha$  induces a model of preeclampsia in pregnant baboons (*Papio hamadryas*). *Cytokine*, 56(2), 192-199.

184. Sweeney, M. D., Zhao, Z., Montagne, A., Nelson, A. R., & Zlokovic, B. V. (2019). Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiological reviews*, 99(1), 21–78.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2017>

185. Taglauer, E. S., Fernandez-Gonzalez, A., Willis, G. R., Reis, M., Yeung, V., Liu, X., ... & Kourembanas, S. (2021). Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicle therapy prevents preeclamptic physiology through intrauterine immunomodulation. *Biology of Reproduction*, 104(2), 457-467.

186. Takata, F., Nakagawa, S., Matsumoto, J., & Dohgu, S. (2021). Blood-Brain Barrier Dysfunction Amplifies the Development of Neuroinflammation: Understanding of Cellular Events in Brain Microvascular Endothelial Cells for Prevention and Treatment of BBB Dysfunction. *Frontiers in cellular neuroscience*, 15, 661838.



187. Takeshita, Y., Fujikawa, S., Serizawa, K., Fujisawa, M., Matsuo, K., Nemoto, J., Shimizu, F., Sano, Y., Tomizawa-Shinohara, H., Miyake, S., Ransohoff, R. M., & Kanda, T. (2021). New BBB Model Reveals That IL-6 Blockade Suppressed the BBB Disorder, Preventing Onset of NMOSD. *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation*, 8(6), e1076. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000001076>
188. Tan, Q. Q., Christiansen, S. P., & Wang, J. (2019). Development of refractive error in children treated for retinopathy of prematurity with anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) agents: a meta-analysis and systematic review. *PLoS One*, 14(12), e0225643.
189. Teran, E., Escudero, C., Moya, W., Flores, M., Vallance, P., & Lopez-Jaramillo, P. (2001). Elevated C-reactive protein and pro-inflammatory cytokines in Andean women with pre-eclampsia. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 75(3), 243-249.
190. They C., Amigorena S., Raposo G., Clayton A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*. Chapter 3: Unit 3 22.
191. Tian, Y., Niu, H. T., Li, M. H., & Wang, Y. Z. (2023). Effect of VEGF on neurological impairment and prognosis of acute cerebral infarction patients: A retrospective case-control study. *Medicine*, 102(6), e29835. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000029835>
192. Torres-Vergara, P., Rivera, R., & Escudero, C. (2022). How Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase 1 Could Contribute to Blood-Brain Barrier Dysfunction in Preeclampsia?. *Frontiers in physiology*, 12, 805082.

193. Travis, O. K., White, D., Baik, C., Giachelli, C., Thompson, W., Stubbs, C., ... & Cornelius, D. C. (2020). Interleukin-17 signaling mediates cytolytic natural killer cell activation in response to placental ischemia. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 318(6), R1036-R1046.
194. Triplett, R. L., Lean, R. E., Parikh, A., Miller, J. P., Alexopoulos, D., Kaplan, S., ... & Smyser, C. D. (2022). Association of prenatal exposure to early-life adversity with neonatal brain volumes at birth. *JAMA Network Open*, 5(4), e227045-e227045.
195. Trisnawati, E., & Nontji, W. (2020). Tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) serum levels in preeclampsia pregnant women and pregnant women at risk with preeclampsia. *Enfermería Clínica*, 30, 27-30.
196. Troncoso, F., Acurio, J., Herlitz, K., Aguayo, C., Bertoglia, P., Guzman-Gutierrez, E., Loyola, M., Gonzalez, M., Rezgaoui, M., Desoye, G., & Escudero, C. (2017). Gestational diabetes mellitus is associated with increased pro-migratory activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 and reduced expression of vascular endothelial growth factor receptor 1. *PloS one*, 12(8), e0182509. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182509>
197. Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M., & Tsukita, S. (2006). ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell*, 126(4), 741–754.

198. Van Itallie CM, Lidman KF, Tietgens AJ, Anderson JM. Newly synthesized claudins but not occludin are added to the basal side of the tight junction. *Mol Biol Cell*. 2019 Jun 1;30(12):1406-1424. doi: 10.1091/mbc.E19-01-0008. Epub 2019 Apr 3. PMID: 30943107; PMCID: PMC6724697.
199. Verrax, J., Defresne, F., Lair, F., Vandermeulen, G., Rath, G., Dessy, C., ... & Feron, O. (2011). Delivery of soluble VEGF receptor 1 (sFlt1) by gene electrotransfer as a new antiangiogenic cancer therapy. *Molecular pharmaceutics*, 8(3), 701-708.
200. Vilotić, A., Nacka-Aleksić, M., Pirković, A., Bojić-Trbojević, Ž., Dekanski, D., & Jovanović Krivokuća, M. (2022). IL-6 and IL-8: An Overview of Their Roles in Healthy and Pathological Pregnancies. *International journal of molecular sciences*, 23(23), 14574. <https://doi.org/10.3390/ijms232314574>
201. Vinueza Veloz, M. F., Zhou, K., Bosman, L. W., Potters, J. W., Negrello, M., Seepers, R. M., Strydis, C., Koekkoek, S. K., & De Zeeuw, C. I. (2015). Cerebellar control of gait and interlimb coordination. *Brain structure & function*, 220(6), 3513–3536. <https://doi.org/10.1007/s00429-014-0870-1>
202. Virág, J., Haberler, C., Baksa, G., Piurkó, V., Hegedüs, Z., Reiniger, L., ... & Hegedűs, B. (2017). Region specific differences of claudin-5 expression in pediatric intracranial ependymomas: potential prognostic role in supratentorial cases. *Pathology & Oncology Research*, 23, 245-252.
203. Waker, C. A., Kaufman, M. R., & Brown, T. L. (2021). Current state of preeclampsia mouse models: approaches, relevance, and standardization. *Frontiers in Physiology*, 12, 681632.

204. Wang, X., Bove, A. M., Simone, G., & Ma, B. (2020). Molecular bases of VEGFR-2-mediated physiological function and pathological role. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 599281.
205. Wang, M., Hao, H., Leeper, N. J., & Zhu, L. (2018). Thrombotic regulation from the endothelial cell perspectives. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 38(6), e90-e95.
206. Warrington, J. P., Fan, F., Murphy, S. R., Roman, R. J., Drummond, H. A., Granger, J. P., & Ryan, M. J. (2014). Placental ischemia in pregnant rats impairs cerebral blood flow autoregulation and increases blood-brain barrier permeability. *Physiological reports*, 2(8), e12134.
207. Warrington, J. P., Drummond, H. A., Granger, J. P., & Ryan, M. J. (2015). Placental ischemia-induced increases in brain water content and cerebrovascular permeability: role of TNF- $\alpha$ . *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 309(11), R1425–R1431.
208. Werry, E. L., Bright, F. M., Piguet, O., Ittner, L. M., Halliday, G. M., Hodges, J. R., Kiernan, M. C., Loy, C. T., Kril, J. J., & Kassiou, M. (2019). Recent Developments in TSPO PET Imaging as A Biomarker of Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders. *International journal of molecular sciences*, 20(13), 3161.
209. Worzfeld, T., & Schwaninger, M. (2016). Apicobasal polarity of brain endothelial cells. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 36(2), 340-362.
210. Xu, R., Feng, X., Xie, X., Zhang, J., Wu, D., & Xu, L. (2012). HIV-1 Tat protein increases the permeability of brain endothelial cells by both

inhibiting occludin expression and cleaving occludin via matrix metalloproteinase-9. *Brain research*, 1436, 13–19.

211. Xu, F., Fei, Z., Dai, H., Xu, J., Fan, Q., Shen, S., Zhang, Y., Ma, Q., Chu, J., Peng, F., Zhou, F., Liu, Z., Wang, C., Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles with High PD-L1 Expression for Autoimmune Diseases Treatment. *Adv. Mater.* 2022, 34, 2106265. <https://doi.org/10.1002/adma.202106265>
212. Yacong, W., Qinying, C., Lihong, Z., Su'e, Z., Liang, S., & Ou, S. (2015). Acute cortical blindness caused by pre-eclampsia in the antepartum; posterior reversible encephalopathy syndrome (PRES). *African Health Sciences*, 15(2), 705.
213. Yang, W., Wang, A., Zhao, C., Li, Q., Pan, Z., Han, X., ... & Ren, C. (2016). miR-125b enhances IL-8 production in early-onset severe preeclampsia by targeting sphingosine-1-phosphate lyase 1. *PloS one*, 11(12), e0166940.
214. Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., Gursel, M., ... De Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of extracellular vesicles*, 4, 27066. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>
215. Yoon, J. S., Jo, D., Lee, H. S., Yoo, S. W., Lee, T. Y., Hwang, W. S., Choi, J. M., Kim, E., Kim, S. S., & Suh-Kim, H. (2018). Spatiotemporal

Protein Atlas of Cell Death-Related Molecules in the Rat MCAO Stroke Model. *Experimental neurobiology*, 27(4), 287–298.  
<https://doi.org/10.5607/en.2018.27.4.287>

216. Yu, P., Li, Y., Zhong, G., Li, W., Chen, B., & Zhang, J. (2021). Claudin-5 Affects Endothelial Autophagy in Response to Early Hypoxia. *Frontiers in physiology*, 12, 737474.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2021.737474>

217. Zhang, H., Vutskits, L., Pepper, M. S., & Kiss, J. Z. (2003). VEGF is a chemoattractant for FGF-2-stimulated neural progenitors. *The Journal of cell biology*, 163(6), 1375–1384. <https://doi.org/10.1083/jcb.200308040>

218. Zhang, Z., Yan, J., & Shi, H. (2016). Role of Hypoxia Inducible Factor 1 in Hyperglycemia-Exacerbated Blood-Brain Barrier Disruption in Ischemic Stroke. *Neurobiology of disease*, 95, 82–92.  
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.07.012>

219. Zhang, J., Li, H., Fan, B., Xu, W., & Zhang, X. (2020). Extracellular vesicles in normal pregnancy and pregnancy-related diseases. *Journal of cellular and molecular medicine*, 24(8), 4377–4388.

220. Zhang, Y., Li, X., Qiao, S., Yang, D., Li, Z., Xu, J., Li, W., Su, L., & Liu, W. (2021). Occludin degradation makes brain microvascular endothelial cells more vulnerable to reperfusion injury in vitro. *Journal of neurochemistry*, 156(3), 352–366.

221. Zheng, Y., Lu, Z., Shen, J., & Xu, F. (2020). Intracranial pseudoaneurysms: evaluation and management. *Frontiers in neurology*, 11, 582.

222. Zhou, Y., Zhu, X., Cui, H., Shi, J., Yuan, G., Shi, S., & Hu, Y. (2021). The Role of the VEGF Family in Coronary Heart Disease. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 8, 738325. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.738325>