



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Papel de los miARNs en el ictus

Alumno/a: María Esperanza Villén Justicia

Julio, 2023



**UNIVERSIDAD
DE JAÉN**



Trabajo Fin de Grado

PAPEL DE LOS miARNs EN EL ICTUS

Alumno: María Esperanza Villén Justicia

Jaén, Julio, 2023

ÍNDICE

1.	INCIDENCIA.....	3
2.	ICTUS	5
2.1.	Definición y tipos.....	5
2.2.	Sintomatología y zonas afectadas	6
2.3.	Evolución temporal y zona de penumbra	7
3.	DAÑO ISQUÉMICO Y CONSECUENCIAS	9
4.	MICROARN	10
4.1.	Papel de los microARN en el ictus	12
4.1.1	Fallo energético y excitotoxicidad.....	12
4.1.2	Inflamación.....	13
4.1.3	Estrés oxidativo	15
4.1.4	Muerte celular	17
4.1.5	Alteración de la barrera hematoencefálica.....	18
4.1.6	Neurogénesis.....	19
4.1.7	Angiogénesis.....	20
5.	MARCADORES DE RIESGO, DIAGNÓSTICO O PRONÓSTICO	21
6.	TRATAMIENTOS Y PREVENCIÓN DEL ICTUS.....	23
6.1.	Implicación de los miARN en prevención y tratamiento.....	24
7.	REFERENCIAS.....	25

RESUMEN

El ictus representa la tercera causa de muerte y discapacidad en el mundo. Sin embargo, hay una disponibilidad limitada de terapias y de biomarcadores diagnóstico y pronóstico que ayuden a monitorizar la evolución o prevenir nuevos eventos de esta patología. Los microARN son ARN no codificantes que participan en la regulación la expresión génica mediante el silenciamiento o la degradación de los ARNm. Dado que estos miARN juegan un papel importante en el desarrollo y función cerebral, así como en diferentes situaciones patológicas como el ictus, pueden representar una valiosa herramienta clínica. En este TFG se ha revisado la participación de los miARN en la fisiopatología del ictus, incluyendo el fallo energético, inflamación, estrés oxidativo y muerte celular, y con los mecanismos de reparación del tejido dañado. Finalmente, se analiza su potencial como biomarcadores diagnóstico y pronóstico y la utilidad de su estabilización o inhibición en la terapia.

ABSTRACT

Stroke represents the third cause of death around the world. However, there is a limited availability of therapies and diagnostic and prognostic biomarkers that help to monitor the evolution or to prevent new events of this pathology. MicroRNAs are non-coding RNAs that are involved in the regulation of gene expression by silencing or degrading mRNAs. Since these mRNAs play a pivotal role in brain development and function, as well as in different pathological situation such as stroke, they can represent a valuable clinical tool. In this TFG, the participation of miRNAs in the pathophysiology of stroke has been reviewed, including energy failure, inflammation, oxidative stress and cell death, and the repair mechanisms of damaged tissue. Finally, their potential as diagnostic and prognostic biomarkers and the utility of their stabilization or inhibition in therapy are analyzed

1. INCIDENCIA

Las enfermedades cerebrovasculares son un importante problema de salud pública porque se encuentran entre las principales causas de muerte y discapacidad en el mundo (Global Burden of Disease 2016; Stroke Collaborators, 2019). El ictus, también conocido como accidente cerebrovascular (en adelante ACV) o derrame cerebral, es una enfermedad que ocurre cuando el suministro de sangre al cerebro se interrumpe.

El impacto del ictus a nivel global es significativo. Según la Organización Mundial de la Salud, el ictus es la segunda causa principal de muerte y la tercera causa principal de discapacidad en todo el mundo. Se estima que cada año se producen alrededor de 13 millones de casos de ictus a nivel mundial.

En España, el ictus también representa un problema importante de salud. Según datos del Instituto Nacional de Estadística de España (INE, 2022), el ictus fue la tercera causa de muerte en el país en 2022. Los datos de la Sociedad Española de Neurología (SEN) también evidencian que, en España, unas 110.000 personas sufren un ictus cada año, de los cuales al menos un 15% fallecen y, entre los supervivientes, en torno a un 30% queda en situación de dependencia funcional.

Existen unos factores de riesgo no modificables, como la edad, siendo el ictus una de las principales causas de discapacidad en los adultos españoles (Gállego et al., 2008), sobre todo en pacientes mayores de 65 años (El-Hajj et al., 2021); y el sexo, donde las mujeres jóvenes tienen una menor incidencia y mejor pronóstico tras un ACV en comparación con los hombres de la misma edad; sin embargo, esta tendencia se invierte después de la menopausia. Por lo tanto, la edad influye en las diversas respuestas al ictus entre hombres y mujeres (Tang et al, 2022).

Además, La SEN (2022) evidencia que esta enfermedad es la primera causa de mortalidad en las mujeres, la segunda en hombres y la primera causa de discapacidad tanto en hombres como en mujeres: más de 350.000 personas presentan alguna limitación en su capacidad funcional como consecuencia del ictus.

Entre los factores modificables, encontramos la dieta, que juega un papel fundamental en nuestra salud, y se ha demostrado que puede tener un impacto significativo en el riesgo de enfermedades cardiovasculares, incluyendo los accidentes cerebrovasculares. Una alimentación inadecuada, caracterizada por un consumo excesivo de sal puede aumentar el riesgo de hipertensión, así como de sufrir un infarto de miocardio o ACV. Además, comer en exceso o tomar una dieta alta en calorías sobre todo grasas y azúcares, ha demostrado que produce patologías como la hipertensión arterial, diabetes, dislipemia, obesidad y enfermedades cardíacas, entre otros (Figura 1.1) Las bebidas azucaradas también contribuyen al consumo excesivo de azúcar y al aumento de peso, lo que puede aumentar el riesgo de ACV. Por otro lado, una dieta que incluya cereales integrales, frutas y verduras puede ayudar a reducir el peso corporal y proporcionar nutrientes beneficiosos como flavonoides, carotenoides, minerales y oligoelementos. Estos nutrientes pueden ayudar a disminuir el riesgo de enfermedades crónicas y accidentes cerebrovasculares (Medeiros et al., 2012).

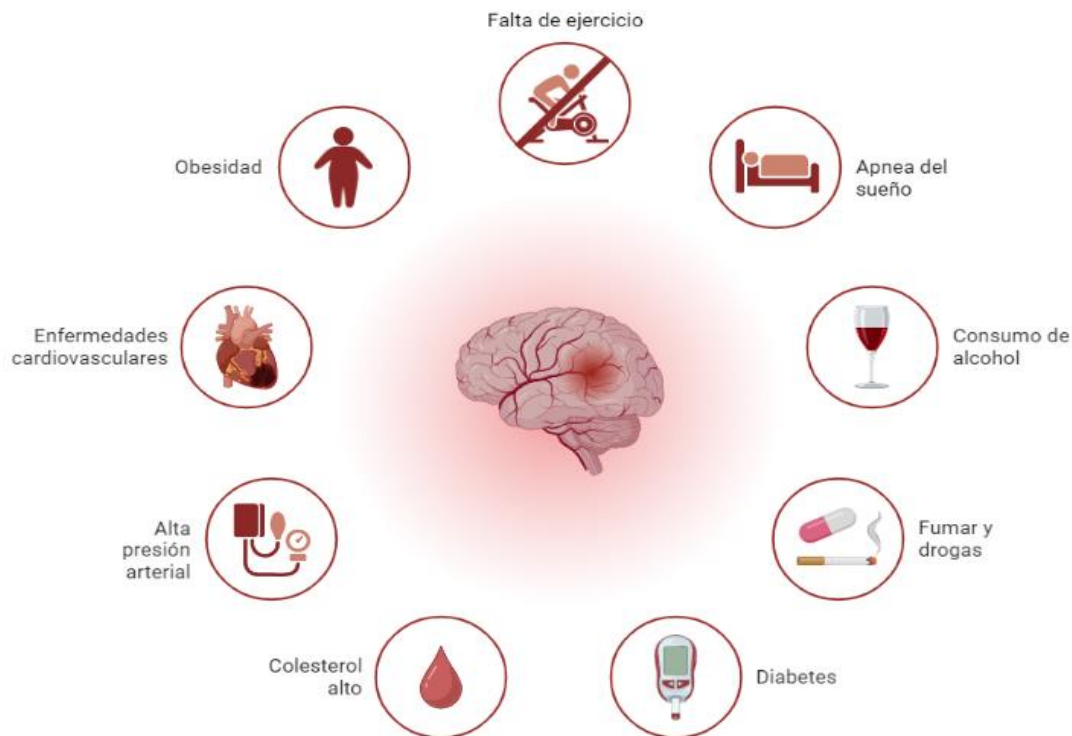


Figura 1.1 Factores de riesgo en el ictus

Además, existen otros factores que pueden aumentar las probabilidades de que ocurra un ictus, entre las cuales se pueden destacar, el consumo de alcohol, tabaco o drogas (anfetaminas, cocaína, etc.) y el sedentarismo (Medeiros et al., 2012).

Gracias a la mejora en el control de los factores de riesgo y en el tratamiento del ictus agudo, tanto la incidencia como la mortalidad en las enfermedades cerebrovasculares ha disminuido en las últimas décadas (Béjot et al, 2016). Sin embargo, esto varía entre países en función de sus políticas y de su nivel de desarrollo (Ramírez-Moreno et al., 2018). En los países desarrollados, la incidencia de ictus aumenta debido al incremento de la esperanza de vida (Béjot et al., 2016). En España se prevé un descenso de la alta invalidez y mortalidad por ACV accidente cerebrovascular en los próximos 30 años (Wafa et al., 2020).

2. ICTUS

2.1. Definición y tipos

El término ictus procede del latín y significa golpe o ataque. Su correspondencia anglosajona *stroke* tiene idéntico significado, ambos expresan lo mismo y describen el carácter brusco y súbito del proceso. Popularmente es conocido por múltiples nombres: infarto cerebral, trombosis, embolia, derrame cerebral, apoplejía; lo que origina una gran confusión en cuanto al concepto y la diferenciación entre sus diferentes tipos.

El término ictus o enfermedad cerebrovascular hace referencia a cualquier trastorno de la circulación cerebral, generalmente de comienzo brusco, que puede ser consecuencia de la interrupción de flujo sanguíneo a una parte del cerebro (ictus isquémico) o de la rotura de una arteria o vena cerebral (ictus hemorrágico). El ictus isquémico es el ACV más común (75%) y ocurre cuando un coágulo de sangre o el estrechamiento de un vaso sanguíneo (arteria) reduce el flujo de sangre al cerebro (Figura 2.1). Esto evita que la sangre fluya hacia otras partes del cerebro e impide que el oxígeno y los nutrientes lleguen a las células cerebrales. Los ACVs isquémicos son comúnmente causados por:

- Trombosis: un coágulo que se forma en un vaso sanguíneo del cerebro o el cuello.
- Embolia: un coágulo que se mueve desde otra parte del cuerpo, p.ej. del corazón al cuello o al cerebro.
- Estenosis: cuando un vaso sanguíneo en el cerebro se estrecha, generalmente debido a ateromas (NINDS, 2022).

Como se ha mencionado anteriormente, el ictus isquémico es con diferencia el tipo más frecuente, por lo que, este trabajo se centrará fundamentalmente en él.

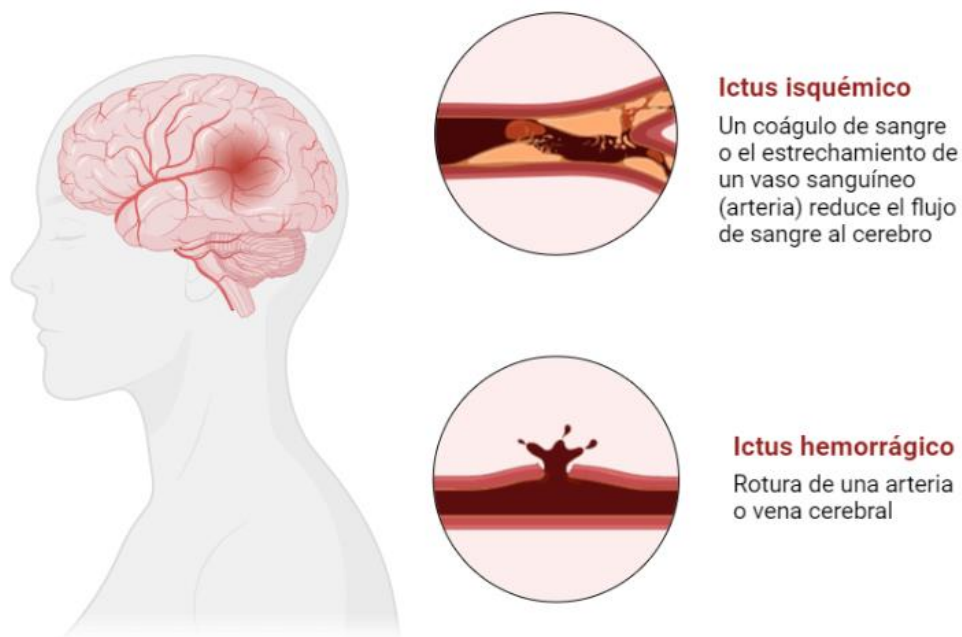


Figura 2.1 Tipos de ictus

2.2. Sintomatología y zonas afectadas

Los efectos del ictus dependen de muchos factores, incluyendo la localización de la obstrucción y cuánto tejido cerebral ha sido afectado. Los síntomas más reconocibles de esta enfermedad son la pérdida brusca de fuerza o sensibilidad en una parte del cuerpo, la afectación de una mitad del cuerpo manifestándose sobre todo en la cara y/o en las extremidades, la alteración brusca en el lenguaje, con dificultades para hablar o entender, y la visión, con pérdida de visión en un ojo, la visión doble o la pérdida de la visión en algún lado de nuestro campo visual, la pérdida brusca de la coordinación o el equilibrio, y dolor de cabeza muy intenso y diferente a otros dolores de cabeza habituales.

Además, puesto que un hemisferio cerebral controla la parte opuesta del cuerpo, podemos diferenciar según si el ictus se produce en la parte derecha o en la parte izquierda del cerebro. Si la zona afectada en el cerebro es la derecha, afectará a la parte izquierda del cuerpo produciendo parálisis de este, problemas de visión, movimientos y comportamientos rápidos y pérdida de memoria. Si el ictus ocurre en la parte izquierda, la parte derecha del cuerpo es la afectada produciéndose parálisis en la parte derecha, problemas en el lenguaje y habla, comportamientos más lentos, y pérdida de memoria (Geriatricarea, 2022)

2.3. Evolución temporal y zona de penumbra

La evolución del infarto cerebral es un proceso dinámico y heterogéneo. Tras la oclusión de una arteria cerebral, se produce una disminución del flujo sanguíneo cerebral (FSC) que se distribuye de forma heterogénea en la zona afectada. Existe una zona gravemente afectada hipoperfundida ($FSC < 10 \text{ ml}/100\text{g}/\text{minuto}$) en el núcleo o *core* de la lesión isquémica. Debido a la carencia de oxígeno y glucosa, y a la consiguiente depleción energética, se pierde la función de la membrana y de la homeostasis iónica, lo que conduce a la muerte celular. Esta zona ya no es recuperable. Alrededor de ese núcleo, existe una zona con menor grado de hipoperfusión gracias al flujo por circulación colateral, denominada penumbra isquémica (FSC entre 17 y 10 $\text{ml}/100\text{g}/\text{min}$), y en la parte más externa se encuentra la zona de oligohemia, donde llega poca sangre, pero puede recuperarse espontáneamente (Figura 2.2). El área de penumbra constituye el tejido cerebral potencialmente recuperable y al mismo tiempo en riesgo de progresar a infarto si persiste la hipoperfusión (Romero-Bravo et al., 2022).

La respuesta del cerebro durante el ictus está organizada en 4 etapas temporales. La primera ocurre durante las primeras horas tras el ictus y representa una etapa para recuperar el tejido dañado a través de la reperfusión o neuroprotección. La segunda fase, donde se produce reparación neuronal espontánea, empieza de días a semanas a partir de que el ictus ha ocurrido. Esta etapa es crucial para aquellos tratamientos que estén enfocados en la inducción de la reparación neural. En la tercera y cuarta etapa, fases subaguda y crónica, tiene lugar la neurogénesis y otros

procesos neuroregenerativos como la vasculogénesis, junto con la recuperación, al menos parcialmente, de la integridad de la barrera hematoencefálica (Figura 2.3) (Cramer et al., 2018).

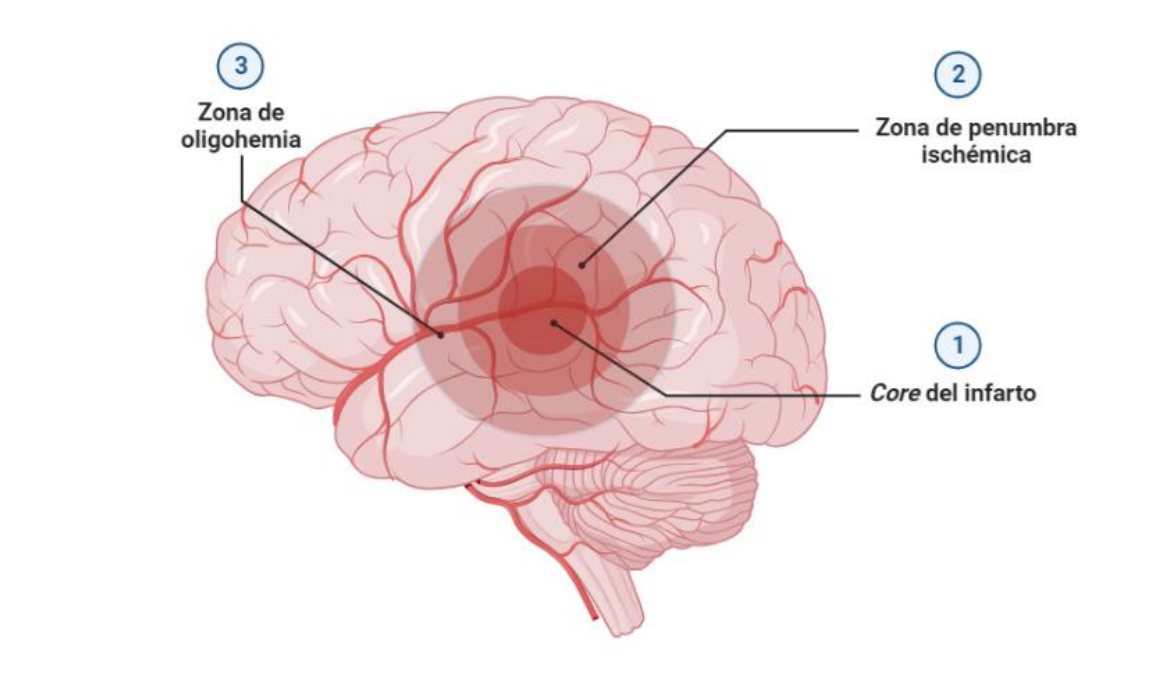


Figura 2.2 Zonas del cerebro afectadas por el ictus

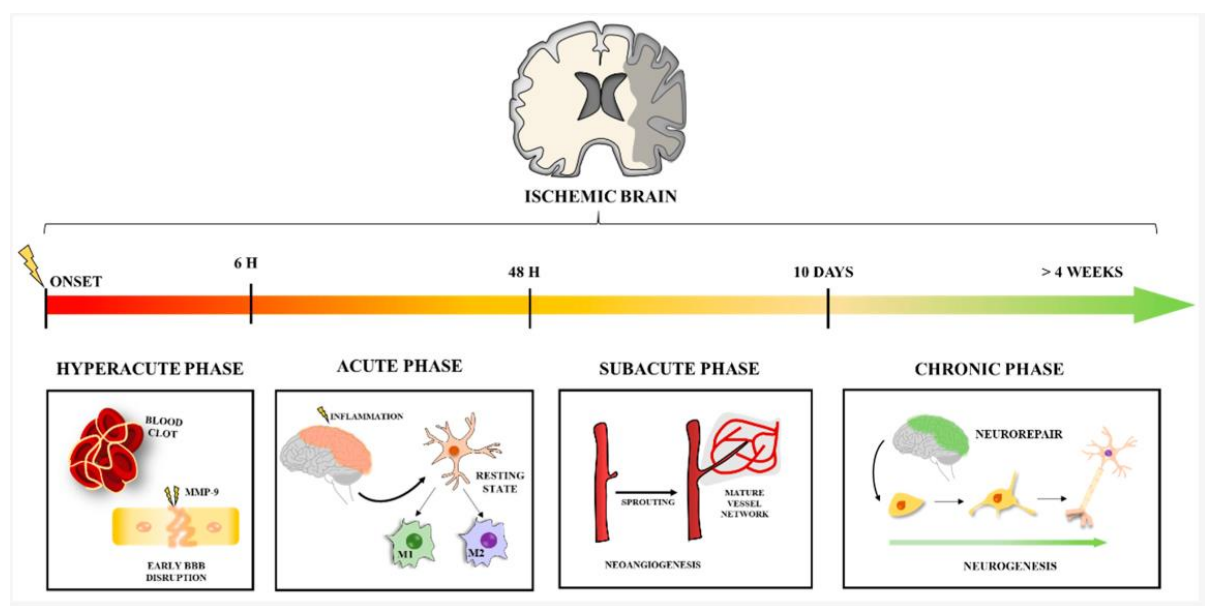


Figura 2.3 Etapas de ictus y procesos involucrados en cada una (Bernardo-Castro, S. et al., 2021)

3. DAÑO ISQUÉMICO Y CONSECUENCIAS

La lesión neuronal en el ictus isquémico es la consecuencia de un proceso en dos etapas, la isquemia y la reperfusión. Se podría decir que en la primera etapa se producen las causas que desencadenan las reacciones que tienen lugar en la segunda y que implican un aumento del daño e inflamación propios de esta patología (Wu et al., 2018). Así, la disminución de oxígeno y glucosa generada por un ictus induce una serie de cambios metabólicos conocidos como cascada isquémica, que a nivel celular incluyen: la inhibición de la cadena transportadora de electrones, la formación en exceso de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, el daño mitocondrial, agotamiento energético, acidosis y pérdida de la homeostasis iónica, entre otras (Di Domenico et al., 2012). A consecuencia de los cambios descritos, las células nerviosas se hinchan, las membranas celulares se alteran con pérdida de la comunicación célula-célula e incluso, si la isquemia llega a ser prolongada, las células no son capaces de recuperarse y acaban muriendo, como normalmente acontece en la zona del núcleo del infarto (Auriel y Bornstein, 2010). La severidad del proceso depende de la duración de la isquemia y, en mayor grado, afecta a todos los tipos celulares de la zona: células de los vasos, glía, y neuronas. En el caso de las neuronas, su deterioro y muerte implica retracción y/o ruptura de axones con pérdida de los correspondientes circuitos neuronales que, de no ser repuestos, llevan a un daño funcional difícil de recuperar (Carmichael et al., 2017).

Como se ha comentado anteriormente, tras el ictus, el cerebro es capaz de activar mecanismos de neurogénesis en la zona perilesionada que pueden permitir la reparación de la zona lesionada y la formación de nuevas conexiones.

La neurogénesis adulta ocurre principalmente en la zona subventricular en las paredes del ventrículo lateral y en la zona subgranular del hipocampo. En condiciones patológicas como un ACV, se ha observado un aumento en la neurogénesis en modelos animales (Koh y Park, 2017). Las células progenitoras neurales en proliferación migran al cuerpo estriado y a la corteza dañados; sin embargo, la mayoría de ellos no logran sobrevivir (Casares-Crespo et al., 2018). Por lo tanto, la mejora de mecanismos endógenos que promueven la supervivencia de

las neuronas recién nacidas pueden ser una estrategia potencial para la reparación del ACV.

La neuritogénesis o regeneración de axones durante la isquemia/reperfusión es fundamental para el éxito del restablecimiento de los tejidos dañados y es impulsada por señales que promueven la neuritogénesis. Este proceso empieza a las 2-3 semanas después del ACV y está determinado por el equilibrio entre señales inductoras y represoras y la formación de cicatrices gliales (Carmichael et al., 2017; Xiong et al., 2018). El crecimiento neuronal permite la formación de axones y sinapsis funcionales en el cerebro, tanto en distancias largas como cortas, permitiendo así el reclutamiento y la formación de redes neuronales y/o la restitución de aquellas que han sido dañadas por el accidente cerebrovascular (Hermann y Chopp, 2014).

La angiogénesis, es la formación de vasos sanguíneos nuevos. La zona de penumbra es un sitio de angiogénesis activa y el número de vasos nuevos en las regiones de penumbra isquémica se correlaciona con una supervivencia más prolongada en pacientes con ACV accidente cerebrovascular isquémico (Kuprinski et al., 1997) La angiogénesis post-isquémica tiene múltiples funciones, entre ellas, facilitar la infiltración de macrófagos y eliminar el tejido necrótico (Manoonkitiwongsa et al., 2001), la supervivencia de las células endoteliales, gliales, y neuronas neuronales en la zona de penumbra, y la formación de un nicho neurovascular en el que las células neurales se generen y migren (Li et al., 2006).

4. MICROARN

Los microARN (miARN), fueron descubiertos en 1993 al estudiar la regulación del desarrollo del nemátodo *Caenorhabditis elegans*. Son una clase de ARN no codificantes que juegan un papel importante en la regulación de la expresión génica (Kadir et al., 2022). Están implicados en la regulación de varios procesos biológicos, como el metabolismo, la diferenciación celular, la proliferación, el desarrollo embrionario y tisular y la muerte celular (O'Brien et al, 2018).

La mayoría de los miARN se sintetizan en el núcleo a partir del ADN genómico por la ARN polimerasa II, generando miARN primarios, que se modifican en el núcleo para producir precursores de miARN (pre-miARN), que luego se exportan al citoplasma (Sun et al., 2018). La modificación postranscripcional de estos pre-miARNs genera miARN maduros de unos 22 nucleótidos que se incorporan en un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) (Figura 4.1.) (Ha y Kim, 2014). El miARN integrado en el complejo RISC interactúa con el ARNm uniéndose a la región 3' no traducida (UTR) (Nelson et al., 2008). Esto da como resultado una supresión de la traducción del ARNm a proteína o la degradación del ARNm (Sun et al., 2018; O'Brien et al., 2018; Ha y Kim, 2014).

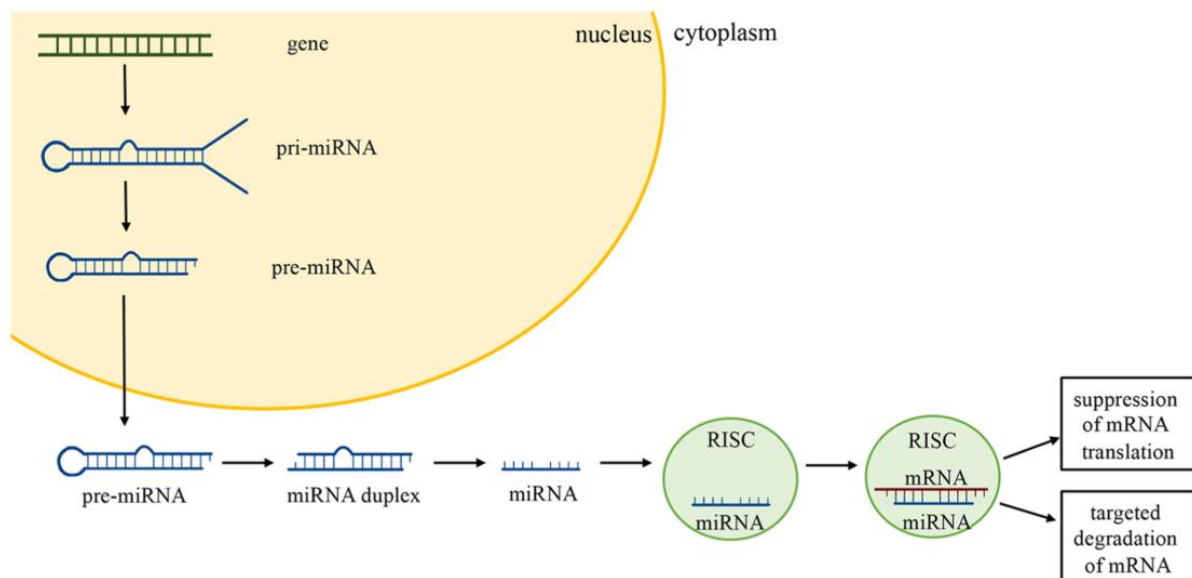


Figura 4.1. Biogénesis del miARN (Todoran et al, 2023)

Los miRs representan solo un 2-3% del genoma humano, y se calcula que pueden regular la expresión de aproximadamente un 60% de los genes. Un solo miR puede regular alrededor de 200 transcritos diferentes, pudiendo actuar cada uno en una vía celular distinta, así como un mismo ARNm puede ser regulado por múltiples miRs (Giner et al., 2016)

Los miARNs juegan un papel clave en la regulación de la expresión génica a nivel cerebral, participando en procesos relacionados con su desarrollo como con su funcionamiento, tales como sinaptogénesis, mielinización, vasculogénesis y angiogénesis, así como en diferentes patologías como enfermedades

neurodegenerativas, la lesión cerebral traumática, la encefalopatía hipóxico-isquémica o la isquemia cerebral (Saugstad, 2010; Ponnusamy y Yip, 2019)

En esta revisión nos centraremos en el papel de los miARN en la fisiopatología del ictus isquémico y, por tanto, en su potencial como biomarcador diagnóstico/pronóstico o como terapia.

4.1. Papel de los microARN en el ictus

4.1.1 Fallo energético y excitotoxicidad

La obstrucción del flujo sanguíneo cerebral durante un ACV isquémico reduce significativamente el suministro de oxígeno y glucosa al tejido cerebral, lo que dificulta la generación adecuada de ATP. Este fallo energético altera la función de las bombas de iones, provocando una despolarización de la membrana y el aumento descontrolado del calcio a nivel intracelular, lo que desencadena la liberación excesiva de neurotransmisores excitotóxicos, como el glutamato. Como consecuencia, se altera la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna y externa, generando un aumento en la formación de radicales libres y la inducción de muerte celular (Lai et al., 2014)

En modelo animales de ictus isquémico y en pacientes, se ha descrito un aumento en ciertos miARN, como, paralelo a un aumento de glutamato. Este miARN inhibe la expresión del transportador de glutamato, GLT-1, reduciendo así la acumulación de glutamato tras el ictus (Li et al., 2015; Yang et al., 2014)

De forma similar, miR-223 regula la expresión de las subunidades del receptor de glutamato GluR2 y NR2B en el cerebro. La sobreexpresión de miR-223 reduce los niveles de estas subunidades del receptor, inhibe la entrada de calcio inducida por NMDA en las neuronas del hipocampo y protege el cerebro de la muerte de las células neuronales después de una isquemia global transitoria y el daño excitotóxico (Harraz et al., 2012).

Los miARN pueden regular la expresión de genes relacionados mitocondriales y afectar a su morfología. Estos miARN tienen a su vez su propio nombre, mitomiARN, llamados así por la ubicación de sus dianas de regulación, ya que debe atravesar el

sistema controlado de doble membrana de las mitocondrias para regular la expresión génica mitocondrial. Otras veces, los miARN no tienen que atravesar las membranas ya que el propio ADN mitocondrial también puede producir miARN. Estos miARN pueden regular tanto dentro de las mitocondrias como en otros orgánulos, como el núcleo (Macgregor-Das et al., 2018).

Uno de los miARN implicados en la disfunción mitocondrial es el miR-142-3p. Este miARN regula varias proteínas implicadas en la biogénesis y función de las mitocondrias tales como los complejos I-III de la cadena de transporte de electrones o algunos factores de transcripción mitocondrial. Además, cuando se sobreexpresa, se mejora la función mitocondrial ya que reduce los efectos tóxicos de los radicales libres de oxígeno (ROS) mediante la inhibición de la ruta NOX2/Rac1/ROS, por lo tanto, este miARN podría ejercer un efecto neuroprotector tras el ictus (Xia et al, 2020).

4.1.2 Inflamación

La inflamación representa una de los principales procesos que producen lesión neurovascular e hiperpermeabilidad tras una lesión isquémica cerebral aguda. Representa un intento de promover la recuperación de la zona afectada. No obstante, si dicha inflamación es excesiva o se prolonga en el tiempo promueve una lesión mayor en la zona infartada que se traduce en la muerte celular. La respuesta inflamatoria se activa como consecuencia del daño tisular, la necrosis celular, los restos celulares y las especies reactivas de oxígeno. Estos elementos activan la microglía, macrófagos del sistema inmune innato del sistema nervioso central, y la liberación de citoquinas (Jayaraj et al., 2019; Kadir et al., 2022).

La microglía son células primarias altamente plásticas involucradas en la neuroinflamación causada por isquemia, que reaccionan a las agresiones del SNC y cambian su fenotipo, modificando su morfología y función, para eliminar el daño neuronal a través de la fagocitosis y la reparación. El fenotipo de la microglía puede modificarse en respuesta a cambios en el microambiente cerebral y la proporción de microglía proinflamatoria y antiinflamatoria desempeña un papel fundamental en la determinación del curso y la gravedad de la neuroinflamación. Además, una

activación excesiva o inapropiada de la microglía promueve la inflamación crónica y conduce a la progresión neuropatológica (Nimmerjahn et al., 2005).

El fenotipo M1 es el resultado de la activación de muchos factores de transcripción relacionados con la inflamación como el factor nuclear (NF)- κ B, la proteína activada 1 (AP-1), y algunos interferones, entre otros. Los lipopolisacáridos y el IFN- γ también pueden estimular a la microglía para mostrar ese fenotipo (Chhor et al., 2013; Orihuela et al., 2016).

En las lesiones causadas por isquemia/reperfusión, la inflamación se inicia por el estancamiento del flujo sanguíneo y luego se mantiene por la activación de los leucocitos y la liberación de citocinas proinflamatorias. Reducir o detener el flujo sanguíneo provoca cambios en la cascada de coagulación, activa NF- κ B y aumenta la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales (Jurcau and Simion, 2021). La consecuente activación de la microglía conduce a su migración dentro y alrededor del área afectada (Hao et al., 2020). Junto con la microglía, los macrófagos se acumulan en la lesión (Islam et al., 2018). Tras este proceso de activación, la microglía libera grandes cantidades de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-1 β) que se consideran los principales factores implicados en la inflamación aguda del ictus isquémico (Hao et al., 2020).

Como parte del proceso inflamatorio post-isquémico, la expresión de moléculas de adhesión está inducida en las células endoteliales activadas, lo que facilita la adhesión de los leucocitos y allana el camino para la disrupción de la barrera hematoencefálica (BBB). Por lo tanto, reducir la expresión de las moléculas de adhesión tras un ACV isquémico puede ser de importancia crítica para proteger la neurovasculatura (Ramiro et al. 2018). En este sentido, la administración de miR-126-3p/5p, un regulador de los niveles de moléculas de adhesión cruciales, como VCAM-1 y E-selectina, a ratones sometidos a un modelo de isquemia cerebral disminuye la hiperpermeabilidad de BBB, las alteraciones neurológicas, la infiltración de leucocitos y la expresión de mediadores proinflamatorios (Pan et al. 2020).

Otras de las vías regulada por los miARN es la de NF- κ B, factor de transcripción que activa el fenotipo M1. Algunos miARN, como miR-210, miR-181c, miR-182-5p y miR-

183, regulan esta vía inhibiendo su activación, lo que a su vez reduce la expresión de citocinas proinflamatorias, y por lo tanto también reduce el daño cerebral. Por el contrario, miR-146a favorece la activación del fenotipo M1 estimulada por lipopolisacáridos (Zhang et al., 2015; Wang et al., 2018).

4.1.3 Estrés oxidativo

Su origen es la consecuencia de los efectos de la isquemia sobre los sistemas xantina-oxidasa, NADPH-oxidasa, la cadena transportadora de electrones mitocondrial o el desacoplamiento del sistema óxido nítrico-óxido nítrico sintasa (NO-NOS) (Fioravanti et al., 2022) y conlleva un aumento en el nivel de especies reactivas de oxígeno.

La liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el óxido nítrico, deriva del metabolismo oxidativo celular y juega un papel fundamental en muchas funciones celulares. En condiciones normales, la producción de ROS endógenos se equilibra con el sistema de defensa antioxidante. Las ROS son esenciales para los procesos celulares normales, mientras que su excesiva producción, o la falta de capacidad para eliminar el exceso de ROS, determina un estado redox alterado (Fioravanti et al., 2022)

Una cantidad excesiva de ROS en el cerebro interactúa con proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos, afectando los procesos bioquímicos neuronales y promoviendo la muerte celular. Los principales mecanismos involucrados en la toxicidad de ROS son: peroxidación lipídica de la membrana mitocondrial, entrecruzamiento de moléculas, como ácidos nucleicos, proteínas y carbohidratos que alteran su función en procesos bioquímicos, daño endotelial de BBB y aumento consecutivo de la permeabilidad, activación de factores inflamatorios clave, como citocinas y moléculas de adhesión, y aumento de la síntesis de aminoácidos excitadores, implicados en la muerte neuronal retardada (Wu et al., 2020),

El estrés oxidativo es causado por tres sistemas diferentes: sistema de xantina oxidasa, sistema de NADPH oxidasa (NOX) y sistema de óxido nítrico sintasa (NOS) (Cantu-Medellin and Kelley, 2013; Ma et al., 2017). Se sabe que las ROS derivados de NOX provocan un aumento de células inflamatorias locales y pueden provocar

una perfusión deficiente de múltiples órganos (Meza et al., 2019). Aunque el sistema NOS tiene un papel bien establecido en el suministro de óxido nítrico como agente protector contra la lesión por isquemia, también se sabe que este tipo de lesión puede transformar la NOS en un sistema generador de superóxido, con la consiguiente disminución de la actividad celular (Forstermann and Munzel, 2006). Las ROS pueden promover la inflamación en las células afectadas y provocar la muerte celular (Lisa and Bernardi, 2006).

El proceso de reperfusión proporciona una gran cantidad de oxígeno transportado por los glóbulos rojos al sitio isquémico, lo que favorece la generación de ROS. La isquemia también modifica la concentración de agentes antioxidantes, lo que conduce a un mayor daño causado por las ROS generadas (Wu et al., 2018)

El estrés oxidativo está involucrado en el daño del ADN, la inflamación local y la disfunción endotelial. El factor 2 relacionado con el factor nuclear derivado de eritroides 2 (Nrf2) es un regulador antioxidante activado en condiciones de estrés oxidativo que activa la expresión de genes antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD), la hemooxigenasa-1 (HO-1), NADPH- quinona oxidorreductasa 1 (NQO1) y glutatión S transferasa (GST) (Chen et al., 2015)

Se ha demostrado que la inhibición de miR-424 protege la integridad neurovascular al reducir el nivel de ROS y la peroxidación de lípidos paralelamente a un aumento de la expresión de la MnSOD y la SOD extracelular en ratones tras una isquemia, aunque su diana aún no se ha identificado (Liu et al., 2015)

Otro miARN que aumenta la producción de ROS tras el ictus es miR-128-3p. Este efecto es debido a su unión e inhibición de Nrf2 (Li et al., 2019).

En este mismo sentido, miR-106b-5p y miR-421, también tienen un papel importante en el daño cerebral debido al estrés oxidativo como consecuencia del aumento en su expresión tras el ictus. Estos miARN activan la producción de ROS y promueven la muerte neuronal al desequilibrar las proteínas de la familia Bcl-2, que controlan la apoptosis. (Li et al., 2017)

4.1.4 Muerte celular

Todos los factores implicados en la patogenia de la isquemia, en concreto, el fallo energético, excitotoxicidad, inflamación y el estrés oxidativo pueden provocar la muerte celular en la zona de penumbra, horas o días después de la lesión isquémica y, por tanto, exacerbar daño neurovascular (Chelluboina et al. 2014).

Existen varios tipos de muerte celular, y cada tipo tiene un microARN involucrado.

La necrosis se caracteriza por la permeación de la membrana celular y la dilatación de células y orgánulos. En las áreas cercanas al núcleo isquémico, la falta de oxígeno y nutrientes causa estrés intenso, lo que lleva a la muerte celular por necrosis (D'Arcy, 2019).

Otra forma de muerte celular llamada necroptosis, comparte similitudes con la necrosis, sin embargo, está controlada por señales de muerte, como el receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) y se considera un proceso programado. (Wu et al., 2018). Se ha observado que ciertos miARN, como miR-497 y miR-369, pueden tener un papel en la necroptosis al influir en la respuesta celular al TNF- α , una señal de muerte (Hsu et al., 2020; Yin et al., 2022)

La apoptosis es una forma de muerte celular programada y coordinada. Implica una cascada de procesos y la activación de enzimas llamadas caspasas, que desempeñan un papel importante en este proceso. En las lesiones causadas por la falta de oxígeno y reperusión, la apoptosis está presente tanto durante la fase inicial de falta de oxígeno como durante la reperusión, pero se activa a través de diferentes vías. Durante la falta de oxígeno, la vía intrínseca es más relevante y se produce debido al daño en las mitocondrias, lo que lleva a la activación de las caspasas y la muerte celular. Durante la reperusión, los mediadores inflamatorios son responsables de activar la vía extrínseca, que también conduce a la muerte celular (Wu et al., 2018)

Un microARN implicado en la apoptosis es miR-211. Cuando este se reduce, aumenta el daño neurológico y el tamaño del infarto en el cerebro. Esto se debe a que su reducción, impide la inhibición de una proteína llamada BBC3, que está involucrada en la apoptosis. Sin embargo, cuando aumenta la acción de miR-211, se

inhibe BBC3 y se reduce el tamaño del infarto, mejorando la puntuación neurológica y disminuyendo la apoptosis. Otro miARN, miR-29a, también actúa inhibiendo BBC3, por lo cual activa la apoptosis (Liu et al., 2020; Ouyang et al., 2013)

Se ha descrito que miR-7-5p aumenta su expresión en modelos de lesión por falta de oxígeno y reperfusión. Este miARN activa la apoptosis neuronal al favorecer la degradación de la proteína Sirtuina-1 (Diwu et al., 2021). Esta proteína juega un papel importante en la apoptosis neuronal al inhibir la deacetilación de NF- κ B, IL-6 y TNF- α y la ruta apoptótica (Kim et al., 2018).

La lesión isquémica cerebral disminuye el nivel de miR-214. Este miARN disminuye la expresión de la proteína proapoptótica Bax y aumenta la de la proteína antiapoptótica Bcl-2, por lo que la apoptosis estaría inhibida (Ping et al., 2017)

La ferroptosis es una forma de muerte celular dependiente de hierro. La acumulación de hierro intracelular conduce a través de la reacción de Fenton a la formación de radicales hidroxilo (Zhang et al., 2021).

En condiciones de falta de oxígeno y glucosa, se ha descrito que el aumento de los niveles de miR-194 mejora la supervivencia y la viabilidad celular. Este efecto se debe a que este miARN, regula la expresión de GPX4, la principal enzima reguladora de la ferroptosis lo que sugiere que el miR-194 tiene el potencial de reducir la ferroptosis y mejorar la supervivencia de las neuronas en situaciones reales (Ping et al., 2017)

4.1.5 Alteración de la barrera hematoencefálica

Cuando ocurre un ictus isquémico, BBB se vuelve permeable de manera descontrolada, lo que significa que deja pasar moléculas circulantes al tejido cerebral. Esto provoca la acumulación de estas moléculas en el cerebro, lo que a su vez causa dos problemas graves: la formación de edema vasogénico (acumulación de líquido) y la transformación hemorrágica. Estos dos problemas son las principales causas de muerte que ocurren dentro de la primera semana después de un derrame cerebral isquémico (Winkler et al. 2020).

La interrupción de la BBB y el posterior aumento de la permeabilidad de la BBB dan como resultado daños en la vaina de mielina, lo que lleva a una disfunción neuronal. Las principales vías que se activan con la interrupción de la BBB consisten en la degradación de las proteínas de unión estrecha, el daño de las células endoteliales microvasculares (EC), la infiltración de células inmunitarias y la activación de la expresión de citoquinas (Ma et al., 2020). A través de una estrecha regulación de estas proteínas de unión estrecha, varios miRNAs han demostrado participar activamente en ACV isquémicos. Por ejemplo, la sobreexpresión de miR-150 parece mitigar la hiperpermeabilidad de la BBB, el volumen del infarto y deterioro neurológico en modelos animales de ictus mediante la regulación de la expresión de claudina-5 y supervivencia de las células endoteliales (Fang et al. 2016).

En este mismo sentido, miARN-132 empeoran la permeabilidad de BBB al interactuar con proteínas de unión estrecha, como TJAP-1 y claudina-1, que son importantes para su función adecuada (Yan et al, 2021).

Por otro lado, niveles bajos de miR-539 también se ha relacionado con problemas en la BBB. Al unirse a SNAI2, un represor transcripcional, el miR-539 ayuda a restaurar la permeabilidad de las células endoteliales al bloquear la actividad de la enzima MMP9, una metaloproteinasa capaz de degradar los componentes de la matriz extracelular, como colágeno y elastina, y que está asociada con la BBB alterada (Li et al., 2021).

Durante un ACV accidente cerebrovascular isquémico, se han observado cambios en los componentes celulares de la barrera hematoencefálica (BBB) debido a la acción de ciertos microARNs. La disminución de miR-149-5p aumenta la expresión de S1PR2 en los pericitos que regulan el flujo sanguíneo y la permeabilidad de los capilares, lo que conduce a una disminución en la expresión de N-cadherina y un aumento en la migración de los pericitos, lo que empeora la integridad de la BBB (Wan et al., 2018).

4.1.6 Neurogénesis

Se ha descrito que los miARN modulan la neurogénesis en la corteza cerebral y la médula espinal en ACV, lesiones de la médula espinal y lesiones cerebrales

traumáticas. La sobreexpresión del grupo miR-17-92 en la zona subventricular mejoró significativamente la neurogénesis y promovió la proliferación de células madre neurales después de un ACV isquémico agudo (Liu et al., 2013). Por su parte la inhibición de miR-20a aumentó la neurogénesis y mejoró la supervivencia de las neuronas motoras en ratones después de una lesión de la médula espinal a través del aumento de la expresión del gen diana de miR-20 neurogenina 1 (Jee et al., 2012).

4.1.7 Angiogénesis

Varios miARN modulan la angiogénesis en ACVs. El miR-107 favorece la angiogénesis en condiciones de hipoxia a través de un aumento en la expresión del ARNm de VEGF mediado por la inhibición de Dicer-1, encargada del procesamiento de miARN (Li et al., 2015).

Por el contrario, otros miARN tienen un efecto inhibitor sobre la angiogénesis post-isquémica. Concretamente miR-15a/16-1 disminuye la síntesis de VEGFA y el factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF2), así como sus receptores (Sun et al., 2020) (Figura 4.2)

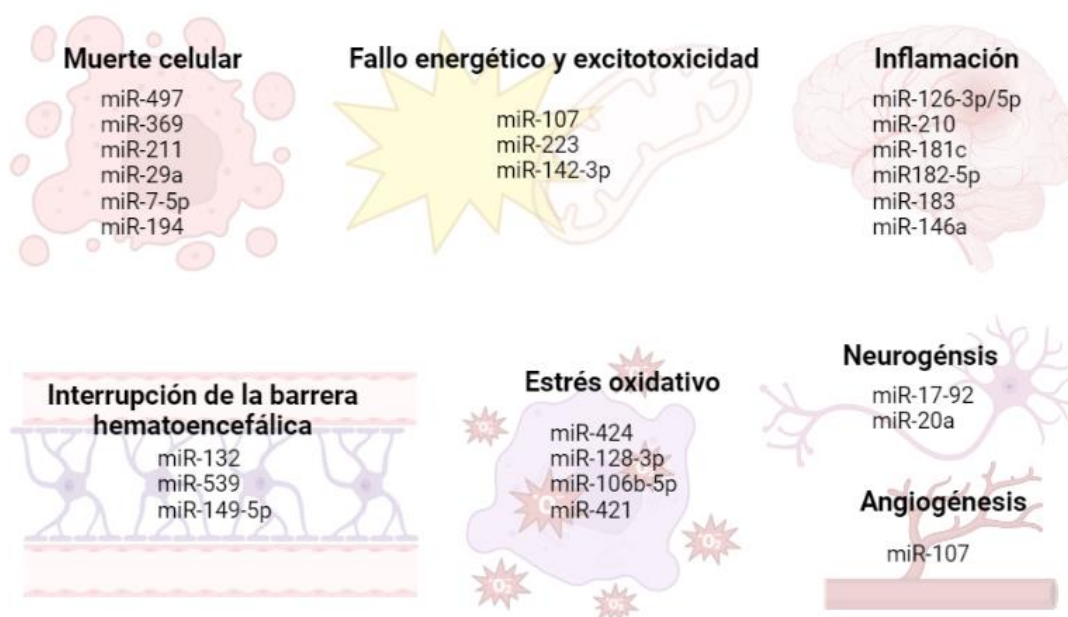


Figura 4.2 Fisiopatología del ictus

5. MARCADORES DE RIESGO, DIAGNÓSTICO O PRONÓSTICO

Identificar a personas que podrían estar en riesgo de sufrir un ACV para el inicio inmediato del tratamiento. La utilización de miARN circulantes como un biomarcador sanguíneo en pacientes con ACV agudo ha despertado un especial interés (Kadir et al., 2022).

A diferencia de los ARNm intracelulares, los miARN exhiben una notable estabilidad y resistencia a la digestión con nucleasas, así como a otras condiciones adversas como una alta temperatura, pH bajo o alto, prolongado almacenamiento y ciclos de congelación y descongelación. El análisis de los niveles circulantes de ciertos miARNs puede ayudar a controlar los cambios cerebrales y sistémicos después de un ACV. Estos biomarcadores tienen una notable sensibilidad (85,6%) y especificidad (76,3%) (Tiedt et al., 2017).

Además, un buen biomarcador pronóstico para el ACV debe ser capaz de predecir complicaciones relacionadas con la enfermedad a corto y largo plazo, identificar a los pacientes que pueden beneficiarse más de la intervención y controlar la eficacia del tratamiento aplicado durante un intervalo de tiempo especificado. (Kadir et al., 2022)

Hay trabajos que sugieren que los miARN pueden estar involucrados en las consecuencias del ACV (Zheng et al., 2012). Por ejemplo, se encontró que los miARN están involucrados en la depresión después del ACV y en su aparición (Yan et al. 2013). Tanto los miRNA circulantes como los específicos de tejido han sido evaluados en pacientes ACV. Los miARN circulantes se pueden utilizar como biomarcadores efectivos en diversas enfermedades como el cáncer y el accidente cerebrovascular. Estas moléculas son no invasivas, accesibles y fácilmente detectables. Varios estudios han sugerido que más del 20% de los miARN están alterados en el cerebro isquémico (Sun et al., 2013). Estos estudios indican que estas moléculas están involucradas en vías importantes en el ACV. Por lo tanto, el reconocimiento de estas, puede proporcionar nuevas dianas terapéuticas.

Hay evidencia que indica que la expresión de miR-124 en el sistema nervioso central es 100 veces mayor que en otros órganos (Mishima et al., 2007). MiR-124 es

importante en varios procesos de desarrollo, tales como neurogénesis y diferenciación neuronal durante el desarrollo del sistema nervioso central (Cheng et al. 2009; Yu et al. 2008). Weng et al. (2011) describieron que los niveles de miR-124 aumentaron significativamente en plasma a las 6 h después de un infarto cerebral en un modelo de rata, y se mantuvieron aumentados durante 48h. Estos resultados revelaron que miR-124 puede usarse como un biomarcador potencial para detección de infarto cerebral (Laterza et al., 2009). Además, la combinación de miR-124-3p con otros se correlaciona con la gravedad del daño cerebral en pacientes con ACV tratados con medicamentos o sometidos a cirugía. (He et al., 2019)

Otra investigación mostró una correlación positiva el miR-210 en tejido y en ratones isquémicos. Además, se encontró que miR-210 disminuyó significativamente en pacientes con ACV en comparación con el grupo de control, especialmente a los 7 y 14 días post-ictus (Zeng et al., 2011). Asimismo, el nivel de miR-210 en pacientes con ACV con buena evolución fue significativamente mayor que los pacientes con mala evolución. Estos resultados sugirieron que el nivel de miR-210 en sangre se puede utilizar como un nuevo factor de diagnóstico y pronóstico en la isquemia cerebral aguda (Zeng et al., 2011).

MiR-320 es otro miARN que se puede utilizar como biomarcador candidato en pacientes con ACV. Algunos estudios han demostrado que la expresión de miR-320 está disminuida en el ACV, lo que se ha relacionado con procesos anti-apoptóticos (Jickling et al., 2014; Tan et al., 2009). MiR-320 se puede utilizar como biomarcador predictivo en pacientes con accidente cerebrovascular.

El miR-128 está relacionado con la inflamación del cerebro y la muerte de las células nerviosas y se ha asociado positivamente con el tamaño del área dañada en el cerebro, así como con la gravedad de los síntomas y el nivel de discapacidad después de un ACV isquémico (Kadir et al., 2022).

Las personas que han tenido un primer ACV accidente cerebrovascular tienen un mayor riesgo de sufrir otro en comparación con la población en general. Además, se ha observado que aquellos que tienen un segundo ACV tienen aproximadamente 3 veces más probabilidades de morir en comparación con aquellos que no

experimentan otro. Al analizar la relación entre ciertos miARNs relacionados con la aterosclerosis y el riesgo de recurrencia de los ACV, se ha encontrado que el miR-17 es especialmente importante durante los primeros 24 meses después de un ACV (Kim et al., 2015).

Todavía es necesaria una intensa investigación en este campo.

6. TRATAMIENTOS Y PREVENCIÓN DEL ICTUS

Las intervenciones que permiten disolver o eliminar el coágulo han supuesto un importante avance en el tratamiento de los ictus isquémicos. Sin embargo, las ventanas terapéuticas tan reducidas que se requieren para que estos tratamientos sean efectivos no siempre consiguen evitar el daño isquémico. Tal es el caso del tratamiento con activador del plasminógeno tisular (tPA) que actúa en la fase aguda del ictus disolviendo el coágulo y mejorando el flujo sanguíneo; no obstante, si no se administra dentro de las primeras horas tras el accidente vascular, no evita la neurodegeneración adicional (Pandya et al., 2011). Por otro lado, el 10-40% de los pacientes tratados con tPA desarrollan procesos hemorrágicos que aumentan la mortalidad y la morbilidad del ictus (Beslow et al., 2011). Recientemente, la terapia endovascular representa un importante logro en el caso de los ictus isquémicos, pero adolece del mismo problema que el tPA en cuanto a la necesidad de extraer el coágulo en las primeras horas tras el infarto (van den Berg, 2017). Más aún, los tratamientos frente al ictus deberían actuar no solo en la restauración de la circulación normal, sino también protegiendo al tejido del daño por reperusión y favoreciendo la regeneración neuronal. En los últimos 20 años se han desarrollado una gran cantidad de ensayos clínicos neuroprotectores con resultados decepcionantes (Yu et al., 2012). Así, la utilización de ácido acetilsalicílico o la hipotermia (van der Worp et al., 2014) apenas disminuyen el riesgo de que la persona que sufre el ictus termine muy afectada y siendo dependiente (Donnan et al., 2008). Otros tratamientos farmacológicos, como los inhibidores de oxalato, glutamato, NOS u otros fármacos asociados con la cascada isquémica todavía no han rendido los resultados esperados. El uso de un captador de glutamato en sangre (Castillo et al., 2016) o las estatinas (García-Bonilla et al., 2012) también

representan futuras terapias prometedoras para el tratamiento de las secuelas del ictus.

6.1. Implicación de los miARN en prevención y tratamiento

Los miARN tienen un potencial terapéutico notable puesto que son moléculas endógenas capaces de controlar la expresión de genes potencialmente nocivos. Además, Los miARN pueden regular genes que contribuyen en la neuro-protección, neurogénesis y angiogénesis que conducen a mejorar los mecanismos de recuperación y reparación en el ACV isquémico (Koshman et al. 2017).

El antagomir, un oligonucleótido antisentido que bloquea la actividad por unión complementaria al miR- maduro NA, podría ser una estrategia útil para la inhibición de la función del miARN (Zhang et al., 2013). Por lo tanto, el uso de un antagomir puede ser otra opción terapéutica cuando el aumento en la expresión de un miARN puede ser patogénico. La ventaja de los antagomirs es que se pueden llevar a las células directamente sin necesidad de vectores, porque son resistentes a las nucleasas, por lo tanto, evitan esta complicación del uso de vectores. Sin embargo, los inconvenientes de la aplicación de antagomir como reactivos terapéuticos en humanos son la necesidad de dosis altas y sus posibles efectos secundarios (Patrick et al., 2010).

El antagomir podría administrarse fácilmente por vía intravenosa, pero no pueden llegar fácilmente al cerebro debido a la barrera hematoencefálica (Jiang et al., 2011). En los últimos años, la vía intranasal se ha utilizado para llegar al cerebro, a través del nervio olfativo y el nervio trigémino, vía vascular y linfática (Liu, 2011). Sin embargo, todavía no se ha descrito la administración de ningún antagomir por esta vía.

A diferencia del silenciamiento de miARN dirigido por antagomir, también se han descrito estrategias de sobreexpresión de miARN a través de la administración de miARN sintético.

La modificación química y los sistemas de administración de miARN para cruzar eficientemente la BBB y alcanzar el tejido cerebral objetivo son el foco de la investigación en curso.

Los liposomas se utilizan para administrar pequeños ARN de interferencia (siR-N / A). Sin embargo, los sistemas sintéticos como los liposomas tienen rendimiento significativamente menor en comparación con los vectores virales (Li and Rana, 2014; Zhang et al., 2014).

Aunque, tanto los vectores virales, como los liposomas, podrían superar estos desafíos, aunque, pueden ser tóxicos y/o inmunogénicos lo que restringiría su aplicación clínica (Kishida et al., 2004).

La administración de miARN en ausencia de un portador presenta limitaciones de distribución tisular, y son absorbidos por el hígado y el riñón y rápidamente excretado en la orina. Además, la dosis letal, LD50, de miARN específicos aún no se han establecido (Li, Z., 2014). Sin embargo, es probable que un número creciente de estas moléculas progrese y eventualmente se desarrollará para convertirse en un tratamiento aprobado para el ACV isquémico en los próximos años.

Cada vez hay más pruebas de que las terapias basadas en miARN son prometedoras. Sin embargo, a pesar del emocionante potencial de miRNA, quedan obstáculos críticos por superar que a menudo incluyen la liberación de agentes capaces de unirse al miARN. Otras limitaciones incluyen la estabilidad in vivo, la distribución tisular y los efectos secundarios adversos (Koshman et al., 2017).

Es crucial entender los sistemas de transporte para llevar los miARN a la práctica clínica. A medida que los estudios en modelos animales se perfeccionen, será posible traducir estos hallazgos en terapias efectivas para tratar el accidente cerebrovascular isquémico en humanos (Koshman et al., 2017)

7. REFERENCIAS

Auriel, E., & Bornstein, N. M. (2010). Neuroprotection in acute ischemic stroke--current status. *Journal of cellular and molecular medicine*, 14(9), 2200–2202.

Béjot, Y., Bailly, H., Durier, J., & Giroud, M. (2016). Epidemiology of stroke in Europe and trends for the 21st century. *Presse medicale (Paris, France: 1983)*, 45(12 Pt 2), e391–e398.

Bernardo-Castro, S., Albino, I., Barrera-Sandoval, Á. M., Tomatis, F., Sousa, J. A., Martins, E., Simões, S., Lino, M. M., Ferreira, L., & Sargento-Freitas, J. (2021). Therapeutic Nanoparticles for the Different Phases of Ischemic Stroke. *Life (Basel, Switzerland)*, 11(6), 482.

Beslow, L. A., Smith, S. E., Vossough, A., Licht, D. J., Kasner, S. E., Favilla, C. G., Halperin, A. R., Gordon, D. M., Jones, C. I., Cucchiara, A. J., & Ichord, R. N. (2011).

Cantu-Medellin, N., & Kelley, E. E. (2013). Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: A process in critical need of reevaluation. *Redox biology*, 1(1), 353–358.

Carmichael, S. T., Kathirvelu, B., Schweppe, C. A., & Nie, E. H. (2017). Molecular, cellular and functional events in axonal sprouting after stroke. *Experimental neurology*, 287(Pt 3), 384–394.

Casares-Crespo, L., Calatayud-Baselga, I., García-Corzo, L., & Mira, H. (2018). On the Role of Basal Autophagy in Adult Neural Stem Cells and Neurogenesis. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 339.

Casares-Cruz, K., M. Prada-Bonilla & J. Santos-Zambrano. (2020) Importancia de la imagen en la selección de candidatos para trombolisis en pacientes con isquemia cerebral aguda. *Anales de Radiología México*. 19(1):60-74

Castillo, J., Loza, M. I., Mirelman, D., Brea, J., Blanco, M., Sobrino, T., & Campos, F. (2016). A novel mechanism of neuroprotection: Blood glutamate grabber. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 36(2), 292–301.

Chelluboina, B., Klopfenstein, J. D., Gujrati, M., Rao, J. S., & Veeravalli, K. K. (2014). Temporal regulation of apoptotic and anti-apoptotic molecules after middle cerebral artery occlusion followed by reperfusion. *Molecular neurobiology*, 49(1), 50–65

Chen, B., Lu, Y., Chen, Y., & Cheng, J. (2015). The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries. *The Journal of endocrinology*, 225(3), R83–R99

Cheng, L. C., Pastrana, E., Tavazoie, M., & Doetsch, F. (2009). miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. *Nature neuroscience*, 12(4), 399–408.

Chhor, V., Le Charpentier, T., Lebon, S., Oré, M. V., Celador, I. L., Josserand, J., Degos, V., Jacotot, E., Hagberg, H., Sävman, K., Mallard, C., Gressens, P., & Fleiss, B. (2013). Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain, behavior, and immunity*, 32, 70–85.

Cramer S. C. (2018). Treatments to Promote Neural Repair after Stroke. *Journal of stroke*, 20(1), 57–70.

D'Arcy M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international*, 43(6), 582–592.

Di Domenico, F., Casalena, G., Jia, J., Sultana, R., Barone, E., Cai, J., Pierce, W. M., Cini, C., Mancuso, C., Perluigi, M., Davis, C. M., Alkayed, N. J., & Butterfield, D. A. (2012). Sex differences in brain proteomes of neuron-specific STAT3-null mice after cerebral ischemia/reperfusion. *Journal of neurochemistry*, 121(4), 680–692.

Di Lisa, F., & Bernardi, P. (2006). Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole. *Cardiovascular research*, 70(2), 191–199.

Diwan, D., Vellimana, A. K., Aum, D. J., Clarke, J., Nelson, J. W., Lawrence, M., Han, B. H., Gidday, J. M., & Zipfel, G. J. (2021). Sirtuin 1 Mediates Protection Against Delayed Cerebral Ischemia in Subarachnoid Hemorrhage in Response to Hypoxic Postconditioning. *Journal of the American Heart Association*, 10(20), e021113.

Donnan, G. A., Fisher, M., Macleod, M., & Davis, S. M. (2008). Stroke. *Lancet (London, England)*, 371(9624), 1612–1623.

El-Hajj, M., Salameh, P., Rachidi, S., Al-Hajje, A., & Hosseini, H. (2021). Adherence to the Mediterranean diet decreases the risk of stroke in the Lebanese population: a case-control study. *Pharmacy practice*, 19(1), 2157.

Fang, Z., He, Q. W., Li, Q., Chen, X. L., Baral, S., Jin, H. J., Zhu, Y. Y., Li, M., Xia, Y. P., Mao, L., & Hu, B. (2016). MicroRNA-150 regulates blood-brain barrier permeability via Tie-2 after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 30(6), 2097–2107.

Fioravanti, A., Giordano, A., Dotta, F., & Pirtoli, L. (2022). Crosstalk between MicroRNA and Oxidative Stress in Physiology and Pathology 2.0. *International journal of molecular sciences*, 23(12), 6831.

Fitridge, R., & Thompson, M. (Eds.). (2011). *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists*. University of Adelaide Press.

Förstermann, U., & Münzel, T. (2006). Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*, 113(13), 1708–1714.

Gállego, J., Herrera, M., Jericó, I., Muñoz, R., Aymerich, N., & Martínez-Vila, E. (2008). El ictus en el siglo XXI. Tratamiento de urgencia [Stroke in the XXI century. Emergency care]. *Anales del sistema sanitario de Navarra*, 31 Suppl 1, 15–29.

Garcia-Bonilla, L., & Iadecola, C. (2012). Peroxiredoxin sets the brain on fire after stroke. *Nature medicine*, 18(6), 858–859.

Geriatricarea (<https://www.geriatricarea.com/2022/11/17/los-casos-de-ictus-aumentaran-un-34-en-la-proxima-decada-en-europa/>)

Giner, M., Montoya M.J., Vázquez M.A., Miranda, C., Miranda, M.J. & Pérez-Cano, R. (2016) What are microRNAs?: possible biomarkers and therapeutic targets in osteoporotic disease. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, vol.8, nº1

Global Burden of Disease 2016 Stroke Collaborators (2019). Global, regional, and national burden of stroke, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet. Neurology*, 18(5), 439–458.

Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(8), 509–524.

Hao, T., Yang, Y., Li, N., Mi, Y., Zhang, G., Song, J., Liang, Y., Xiao, J., Zhou, D., He, D., & Hou, Y. (2020). Inflammatory mechanism of cerebral ischemia-reperfusion injury with treatment of stepharine in rats. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 79, 153353.

Harraz, M. M., Eacker, S. M., Wang, X., Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2012). MicroRNA-223 is neuroprotective by targeting glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(46), 18962–18967.

He, X. W., Shi, Y. H., Liu, Y. S., Li, G. F., Zhao, R., Hu, Y., Lin, C. C., Zhuang, M. T., Su, J. J., & Liu, J. R. (2019). Increased plasma levels of miR-124-3p, miR-125b-5p and miR-192-5p are associated with outcomes in acute ischaemic stroke patients receiving thrombolysis. *Atherosclerosis*, 289, 36–43.

Hemorrhagic transformation of childhood arterial ischemic stroke. *Stroke*, 42(4), 941–946. AL., K. E. MicroRNA: An Emerging Predictive, Diagnostic, Prognostic and Therapeutic Strategy in Ischaemic Stroke. In. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2022.

Hermann, D. M., & Chopp, M. (2014). Promoting neurological recovery in the post-acute stroke phase: benefits and challenges. *European neurology*, 72(5-6), 317–325.

Hsu, C. C., Huang, C. C., Chien, L. H., Lin, M. T., Chang, C. P., Lin, H. J., & Chio, C. C. (2020). Ischemia/reperfusion injured intestinal epithelial cells cause cortical neuron death by releasing exosomal microRNAs associated with apoptosis, necroptosis, and pyroptosis. *Scientific reports*, 10(1), 14409.

Hussein, M. & Magdy, R. MicroRNAs in central nervous system disorders: current advances in pathogenesis and treatment (2021). The Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery **57**, 36.

Instituto Nacional de Estadística (INE).
https://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/operacion.htm?c=Estadistica_C&cid=1254736176780&menu=ultiDatos&idp=1254735573175

Islam, A., Choudhury, M. E., Kigami, Y., Utsunomiya, R., Matsumoto, S., Watanabe, H., Kumon, Y., Kunieda, T., Yano, H., & Tanaka, J. (2018). Sustained anti-inflammatory effects of TGF- β 1 on microglia/macrophages. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1864(3), 721–734.

Jayaraj, R. L., Azimullah, S., Beiram, R., Jalal, F. Y., & Rosenberg, G. A. (2019). Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke. *Journal of neuroinflammation*, 16(1), 142.

Jee, M. K., Jung, J. S., Im, Y. B., Jung, S. J., & Kang, S. K. (2012). Silencing of miR20a is crucial for Ngn1-mediated neuroprotection in injured spinal cord. *Human gene therapy*, 23(5), 508–520.

Jiang, Y., Wei, N., Lu, T., Zhu, J., Xu, G., & Liu, X. (2011). Intranasal brain-derived neurotrophic factor protects brain from ischemic insult via modulating local inflammation in rats. *Neuroscience*, 172, 398–405.

Jickling, G. C., Ander, B. P., Zhan, X., Noblett, D., Stamova, B., & Liu, D. (2014). microRNA expression in peripheral blood cells following acute ischemic stroke and their predicted gene targets. *PloS one*, 9(6), e99283.

Jurcau, A., & Simion, A. (2021). Neuroinflammation in Cerebral Ischemia and Ischemia/Reperfusion Injuries: From Pathophysiology to Therapeutic Strategies. *International journal of molecular sciences*, 23(1), 14.

Khoshnam, S. E., Winlow, W., Farbood, Y., Moghaddam, H. F., & Farzaneh, M. (2017). Emerging Roles of microRNAs in Ischemic Stroke: As Possible Therapeutic Agents. *Journal of stroke*, 19(2), 166–187.

Kim, J. M., Jung, K. H., Chu, K., Lee, S. T., Ban, J., Moon, J., Kim, M., Lee, S. K., & Roh, J. K. (2015). Atherosclerosis-Related Circulating MicroRNAs as a Predictor of Stroke Recurrence. *Translational stroke research*, 6(3), 191–197.

Kim, T., Mehta, S. L., Morris-Blanco, K. C., Chokkalla, A. K., Chelluboina, B., Lopez, M., Sullivan, R., Kim, H. T., Cook, T. D., Kim, J. Y., Kim, H., Kim, C., & Vemuganti, R. (2018). The microRNA miR-7a-5p ameliorates ischemic brain damage by repressing α -synuclein. *Science signaling*, 11(560), eaat4285.

Koh, S. H., & Park, H. H. (2017). Neurogenesis in Stroke Recovery. *Translational stroke research*, 8(1), 3–13.

Krupinski, J., Issa, R., Bujny, T., Slevin, M., Kumar, P., Kumar, S., & Kaluza, J. (1997). A putative role for platelet-derived growth factor in angiogenesis and neuroprotection after ischemic stroke in humans. *Stroke*, 28(3), 564–573.

Lai, T. W., Zhang, S., & Wang, Y. T. (2014). Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Progress in neurobiology*, 115, 157–188.

Laterza, O. F., Lim, L., Garrett-Engele, P. W., Vlasakova, K., Muniappa, N., Tanaka, W. K., Johnson, J. M., Sina, J. F., Fare, T. L., Sistare, F. D., & Glaab, W. E. (2009). Plasma MicroRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury. *Clinical chemistry*, 55(11), 1977–1983..

Li, H., Han, G., He, D., Wang, Y., Lin, Y., Zhang, T., Wang, J., Du, Y., Li, G., Wang, Y., Zhou, J., & Liu, B. (2021). miR-539 Targeting SNAI2 Regulates MMP9 Signaling Pathway and Affects Blood-Brain Barrier Permeability in Cerebrovascular Occlusive Diseases: A Study Based on Head and Neck Ultrasound and CTA. *Journal of healthcare engineering*, 2021, 5699025.

Li, P., Shen, M., Gao, F., Wu, J., Zhang, J., Teng, F., & Zhang, C. (2017). An Antagomir to MicroRNA-106b-5p Ameliorates Cerebral Ischemia and Reperfusion Injury in Rats Via Inhibiting Apoptosis and Oxidative Stress. *Molecular neurobiology*, 54(4), 2901–2921.

Li, Q., Ford, M. C., Lavik, E. B., & Madri, J. A. (2006). Modeling the neurovascular niche: VEGF- and BDNF-mediated cross-talk between neural stem cells and endothelial cells: an in vitro study. *Journal of neuroscience research*, 84(8), 1656–1668.

Li, R., Li, X., Wu, H., Yang, Z., Fei, L., & Zhu, J. (2019). Theaflavin attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by abolishing miRNA-128-3p-mediated Nrf2 inhibition and reducing oxidative stress. *Molecular medicine reports*, 20(6), 4893–4904.

Li, Y., Liu, Y., Wang, Z., Hou, H., Lin, Y. & Jiang, Y. (2013). MicroRNA: not far from clinical application in ischemic stroke. *International Scholarly Research Notices*, vol. 2013, 7 pages.

Li, Y., Mao, L., Gao, Y., Baral, S., Zhou, Y., & Hu, B. (2015). MicroRNA-107 contributes to post-stroke angiogenesis by targeting Dicer-1. *Scientific reports*, 5, 13316.

Li, Y., Mao, L., Gao, Y., Baral, S., Zhou, Y., & Hu, B. (2015). MicroRNA-107 contributes to post-stroke angiogenesis by targeting Dicer-1. *Scientific reports*, 5, 13316.

Li, Z., & Rana, T. M. (2014). Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nature reviews. Drug discovery*, 13(8), 622–638.

Liu X. (2011). Clinical trials of intranasal delivery for treating neurological disorders--a critical review. *Expert opinion on drug delivery*, 8(12), 1681–1690.

Liu, P., Zhao, H., Wang, R., Wang, P., Tao, Z., Gao, L., Yan, F., Liu, X., Yu, S., Ji, X., & Luo, Y. (2015). MicroRNA-424 protects against focal cerebral ischemia and reperfusion injury in mice by suppressing oxidative stress. *Stroke*, 46(2), 513–519.

Liu, W., Miao, Y., Zhang, L., Xu, X., & Luan, Q. (2020). MiR-211 protects cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting cell apoptosis. *Bioengineered*, 11(1), 189–200.

Liu, X. S., Chopp, M., Wang, X. L., Zhang, L., Hozeska-Solgot, A., Tang, T., Kassis, H., Zhang, R. L., Chen, C., Xu, J., & Zhang, Z. G. (2013). MicroRNA-17-92 cluster mediates the proliferation and survival of neural progenitor cells after stroke. *The Journal of biological chemistry*, 288(18), 12478–12488.

Ma, F., Zhang, X., & Yin, K. J. (2020). MicroRNAs in central nervous system diseases: A prospective role in regulating blood-brain barrier integrity. *Experimental neurology*, 323, 113094.

Ma, M. W., Wang, J., Zhang, Q., Wang, R., Dhandapani, K. M., Vadlamudi, R. K., & Brann, D. W. (2017). NADPH oxidase in brain injury and neurodegenerative disorders. *Molecular neurodegeneration*, 12(1), 7.

Macgregor-Das, A. M., & Das, S. (2018). A microRNA's journey to the center of the mitochondria. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 315(2), H206–H215.

Manoonkitiwongsa, P. S., Jackson-Friedman, C., McMillan, P. J., Schultz, R. L., & Lyden, P. D. (2001). Angiogenesis after stroke is correlated with increased numbers of macrophages: the clean-up hypothesis. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 21(10), 1223–1231.

Medeiros, F., Casanova, M.deA., Fraulob, J. C., & Trindade, M. (2012). How can diet influence the risk of stroke?. *International journal of hypertension*, 2012, 763507.

Meza, C. A., La Favor, J. D., Kim, D. H., & Hickner, R. C. (2019). Endothelial Dysfunction: Is There a Hyperglycemia-Induced Imbalance of NOX and NOS? *International journal of molecular sciences*, 20(15), 3775.

Mishima, T., Mizuguchi, Y., Kawahigashi, Y., Takizawa, T., & Takizawa, T. (2007). RT-PCR-based analysis of microRNA (miR-1 and -124) expression in mouse CNS. *Brain research*, 1131(1), 37–43.

National Institute of Neurological Disorders and Stroke (<https://www.ninds.nih.gov/>)

Nelson, P. T., Wang, W. X., & Rajeev, B. W. (2008). MicroRNAs (miRNAs) in neurodegenerative diseases. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 18(1), 130–138.

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5726), 1314–1318.

O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in endocrinology*, 9, 402.

Orihuela, R., McPherson, C. A., & Harry, G. J. (2016). Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *British journal of pharmacology*, 173(4), 649–665.

Ouyang, Y. B., Xu, L., Lu, Y., Sun, X., Yue, S., Xiong, X. X., & Giffard, R. G. (2013). Astrocyte-enriched miR-29a targets PUMA and reduces neuronal vulnerability to forebrain ischemia. *Glia*, 61(11), 1784–1794.

Pan, J., Qu, M., Li, Y., Wang, L., Zhang, L., Wang, Y., Tang, Y., Tian, H. L., Zhang, Z., & Yang, G. Y. (2020). MicroRNA-126-3p/-5p Overexpression Attenuates Blood-Brain Barrier Disruption in a Mouse Model of Middle Cerebral Artery Occlusion. *Stroke*, 51(2), 619–627.

Pandya, R. S., Mao, L., Zhou, H., Zhou, S., Zeng, J., Popp, A. J., & Wang, X. (2011). Central nervous system agents for ischemic stroke: neuroprotection mechanisms. *Central nervous system agents in medicinal chemistry*, 11(2), 81–97.

Patrick, D. M., Montgomery, R. L., Qi, X., Obad, S., Kauppinen, S., Hill, J. A., van Rooij, E., & Olson, E. N. (2010). Stress-dependent cardiac remodeling occurs in the absence of microRNA-21 in mice. *The Journal of clinical investigation*, 120(11), 3912–3916.

Ping, G., Zhang, X. & Zhang, P. (2017). miRNA-214 ameliorates neuronal apoptosis in an experimental rat stroke model by targeting Bax. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 10(4):6293-6302

Ponnusamy, V., & Yip, P. K. (2019). The role of microRNAs in newborn brain development and hypoxic ischaemic encephalopathy. *Neuropharmacology*, 149, 55–65.

Prieto-Arribas, R., Pascual-Garvi, J. M., González-Llanos, F., & Roda, J. M. (2011). How to repair an ischemic brain injury? Value of experimental models in search of answers. *Neurologia (Barcelona, Spain)*, 26(2), 65–73.

Ramírez-Moreno, J. M., Felix-Redondo, F. J., Fernández-Bergés, D., & Lozano-Mera, L. (2018). Trends in stroke hospitalisation rates in Extremadura between 2002 and 2014: Changing the notion of stroke as a disease of the elderly. Tendencias en las tasas de hospitalización por ictus en Extremadura en el periodo 2002-2014. Cambiando la idea del ictus como una enfermedad propia de la senectud. *Neurología*, 33(9), 561–569.

Ramiro, L., Simats, A., García-Berrocso, T., & Montaner, J. (2018). Inflammatory molecules might become both biomarkers and therapeutic targets for stroke management. *Therapeutic advances in neurological disorders*, 11, 1756286418789340.

Romero-Bravo, M., de la Cruz-Cosme, C., Barbancho, M. A., & García-Casares, N. (2022). Conocimiento sobre el ictus en la población española. Una revisión sistemática [Knowledge on stroke in Spanish population. A systematic review]. *Revista de neurología*, 74(6), 189–201.

Saugstad J. A. (2010). MicroRNAs as effectors of brain function with roles in ischemia and injury, neuroprotection, and neurodegeneration. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 30(9), 1564–1576.

Sociedad Española de Neurología (SEN)(<https://www.sen.es/>)

Sun, P., Liu, D. Z., Jickling, G. C., Sharp, F. R., & Yin, K. J. (2018). MicroRNA-based therapeutics in central nervous system injuries. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 38(7), 1125–1148.

Sun, P., Zhang, K., Hassan, S. H., Zhang, X., Tang, X., Pu, H., Stetler, R. A., Chen, J., & Yin, K. J. (2020). Endothelium-Targeted Deletion of microRNA-15a/16-1 Promotes Poststroke Angiogenesis and Improves Long-Term Neurological Recovery. *Circulation research*, 126(8), 1040–1057.

Sun, Y., Gui, H., Li, Q., Luo, Z. M., Zheng, M. J., Duan, J. L., & Liu, X. (2013). MicroRNA-124 protects neurons against apoptosis in cerebral ischemic stroke. *CNS neuroscience & therapeutics*, 19(10), 813–819.

Tang, T., Hu, L., Liu, Y., Fu, X., Li, J., Yan, F., Cao, S., & Chen, G. (2022). Sex-Associated Differences in Neurovascular Dysfunction During Ischemic Stroke. *Frontiers in molecular neuroscience*, 15, 860959.

Tiedt, S., Prestel, M., Malik, R., Schieferdecker, N., Duering, M., Kautzky, V., Stoycheva, I., Böck, J., Northoff, B. H., Klein, M., Dorn, F., Krohn, K., Teupser, D., Liesz, A., Plesnila, N., Holdt, L. M., & Dichgans, M. (2017). RNA-Seq Identifies Circulating miR-125a-5p, miR-125b-5p, and miR-143-3p as Potential Biomarkers for Acute Ischemic Stroke. *Circulation research*, 121(8), 970–980.

Todoran, R., Falcione, S. R., Clarke, M., Joy, T., Boghozian, R., & Jickling, G. C. (2023). microRNA as a therapeutic for ischemic stroke. *Neurochemistry international*, 163, 105487.

van den Berg, L. A., Dijkgraaf, M. G., Berkhemer, O. A., Fransen, P. S., Beumer, D., Lingsma, H. F., Majoie, C. B., Dippel, D. W., van der Lugt, A., van Oostenbrugge, R. J., van Zwam, W. H., Roos, Y. B., & MR CLEAN Investigators (2017). Two-Year Outcome after Endovascular Treatment for Acute Ischemic Stroke. *The New England journal of medicine*, 376(14), 1341–1349.

van der Worp, H. B., Macleod, M. R., Bath, P. M., Demotes, J., Durand-Zaleski, I., Gebhardt, B., Glud, C., Kollmar, R., Krieger, D. W., Lees, K. R., Molina, C., Montaner, J., Roine, R. O., Petersson, J., Staykov, D., Szabo, I., Wardlaw, J. M., Schwab, S., & EuroHYP-1 investigators (2014). EuroHYP-1: European multicenter, randomized, phase III clinical trial of therapeutic hypothermia plus best medical treatment vs. best medical treatment alone for acute ischemic stroke. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society*, 9(5), 642–645.

Wafa, H. A., Wolfe, C. D. A., Emmett, E., Roth, G. A., Johnson, C. O., & Wang, Y. (2020). Burden of Stroke in Europe: Thirty-Year Projections of Incidence, Prevalence, Deaths, and Disability-Adjusted Life Years. *Stroke*, 51(8), 2418–2427.

Wan, Y., Jin, H. J., Zhu, Y. Y., Fang, Z., Mao, L., He, Q., Xia, Y. P., Li, M., Li, Y., Chen, X., & Hu, B. (2018). MicroRNA-149-5p regulates blood-brain barrier permeability after transient middle cerebral artery occlusion in rats by targeting S1PR2 of pericytes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 32(6), 3133–3148.

Wang, J., Xing, H., Wan, L., Jiang, X., Wang, C., & Wu, Y. (2018). Treatment targets for M2 microglia polarization in ischemic stroke. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 105, 518–525.

Wei, R., Zhang, R., Xie, Y., Shen, L., & Chen, F. (2015). Hydrogen Suppresses Hypoxia/Reoxygenation-Induced Cell Death in Hippocampal Neurons Through Reducing Oxidative Stress. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 36(2), 585–598.

Wei, R., Zhang, R., Xie, Y., Shen, L., & Chen, F. (2015). Hydrogen Suppresses Hypoxia/Reoxygenation-Induced Cell Death in Hippocampal Neurons Through Reducing Oxidative Stress. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 36(2), 585–598.

Weng, H., Shen, C., Hirokawa, G., Ji, X., Takahashi, R., Shimada, K., Kishimoto, C., & Iwai, N. (2011). Plasma miR-124 as a biomarker for cerebral infarction. *Biomedical research (Tokyo, Japan)*, 32(2), 135–141.

Winkler, L., Blasig, R., Breitzkreuz-Korff, O., Berndt, P., Dithmer, S., Helms, H. C., Puchkov, D., Devraj, K., Kaya, M., Qin, Z., Liebner, S., Wolburg, H., Andjelkovic, A. V., Rex, A., Blasig, I. E., & Haseloff, R. F. (2021). Tight junctions in the blood-brain barrier promote edema formation and infarct size in stroke - Ambivalent effects of sealing proteins. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 41(1), 132–145.

Wu, L., Xiong, X., Wu, X., Ye, Y., Jian, Z., Zhi, Z., & Gu, L. (2020). Targeting Oxidative Stress and Inflammation to Prevent Ischemia-Reperfusion Injury. *Frontiers in molecular neuroscience*, 13, 28.

Wu, M. Y., Yiang, G. T., Liao, W. T., Tsai, A. P., Cheng, Y. L., Cheng, P. W., Li, C. Y., & Li, C. J. (2018). Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 46(4), 1650–1667.

Xia, P. P., Zhang, F., Chen, C., Wang, Z. H., Wang, N., Li, L. Y., Guo, Q. L., & Ye, Z. (2020). Rac1 relieves neuronal injury induced by oxygenglucose deprivation and re-oxygenation via regulation of mitochondrial biogenesis and function. *Neural regeneration research*, 15(10), 1937–1946.

Xiong, X. X., Pan, F., Chen, R. Q., Hu, D. X., Qiu, X. Y., Li, C. Y., Xie, X. Q., Tian, B., & Chen, X. Q. (2018). Neuroglobin boosts axon regeneration during ischemic reperfusion via p38 binding and activation depending on oxygen signal. *Cell death & disease*, 9(2), 163.

Yan, H., Kanki, H., Matsumura, S., Kawano, T., Nishiyama, K., Sugiyama, S., Takemori, H., Mochizuki, H., & Sasaki, T. (2021). MiRNA-132/212 regulates tight junction stabilization in blood-brain barrier after stroke. *Cell death discovery*, 7(1), 380.

Yang, X., Li, F., Ma, J., Liu, Y., Wang, X., Wang, R., Zhang, Y., Zhang, W., He, Q., Song, D., & Yu, J. (2021). Study on the Relationship between the miRNA-centered ceRNA Regulatory Network and Fatigue. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 71(10), 1967–1974.

Yang, Z. B., Zhang, Z., Li, T. B., Lou, Z., Li, S. Y., Yang, H., Yang, J., Luo, X. J., & Peng, J. (2014). Up-regulation of brain-enriched miR-107 promotes excitatory neurotoxicity through down-regulation of glutamate transporter-1 expression following ischaemic stroke. *Clinical science (London, England : 1979)*, 127(12), 679–689.

Yin, K. J., Deng, Z., Huang, H., Hamblin, M., Xie, C., Zhang, J., & Chen, Y. E. (2010). miR-497 regulates neuronal death in mouse brain after transient focal cerebral ischemia. *Neurobiology of disease*, 38(1), 17–26.

Yu, J. Y., Chung, K. H., Deo, M., Thompson, R. C., & Turner, D. L. (2008). MicroRNA miR-124 regulates neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Experimental cell research*, 314(14), 2618–2633.

Yu, Z., Liu, N., Liu, J., Yang, K., & Wang, X. (2012). Neuroglobin, a novel target for endogenous neuroprotection against stroke and neurodegenerative disorders. *International journal of molecular sciences*, 13(6), 6995–7014.

Zeng, L., Liu, J., Wang, Y., Wang, L., Weng, S., Tang, Y., Zheng, C., Cheng, Q., Chen, S., & Yang, G. Y. (2011). MicroRNA-210 as a novel blood biomarker in acute cerebral ischemia. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 3(4), 1265–1272.

Zhang, H., Shykind, B., & Sun, T. (2013). Approaches to manipulating microRNAs in neurogenesis. *Frontiers in neuroscience*, 6, 196.

Zhang, L., Li, Y. J., Wu, X. Y., Hong, Z., & Wei, W. S. (2015). MicroRNA-181c negatively regulates the inflammatory response in oxygen-glucose-deprived microglia by targeting Toll-like receptor 4. *Journal of neurochemistry*, 132(6), 713–723.

Zhang, Y., Lu, X., Tai, B., Li, W., & Li, T. (2021). Ferroptosis and Its Multifaceted Roles in Cerebral Stroke. *Frontiers in cellular neuroscience*, 15, 615372.

Zhang, Y., Wang, Z., & Gemeinhart, R. A. (2013). Progress in microRNA delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 172(3), 962–974.

Zhang, Y., Wang, Z., & Gemeinhart, R. A. (2013). Progress in microRNA delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 172(3), 962–974.

Zheng, H. W., Wang, Y. L., Lin, J. X., Li, N., Zhao, X. Q., Liu, G. F., Liu, L. P., Jiao, Y., Gu, W. K., Wang, D. Z., & Wang, Y. J. (2012). Circulating MicroRNAs as

potential risk biomarkers for hematoma enlargement after intracerebral hemorrhage. *CNS neuroscience & therapeutics*, 18(12), 1003–1011.