BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Facultad de Ciencias Químicas y Centro de Química-Instituto de Ciencias

Posgrado en Ciencias Químicas

“Efecto de zinc y taurina sobre el estrés nitrosativo, actividad antioxidante, transaminasas y LDH, y conducta motora en un modelo de isquemia intrauterina”

Tesis presentada para obtener el grado de: Doctorado en Ciencias Químicas en el área de Bioquímica y Biología Molecular

Presenta:

M. C. Alejandro González Vázquez

Director de tesis:
D. C. Bertha Alicia León Chávez
Laboratorio de Investigaciones Químico-Clínicas (LIQC)
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP)

Co-director:
Dr. Juan Antonio González Barrios
Laboratorio de Genómica
Hospital Regional 1° de Octubre ISSTE

PUEBLA, PUE. AGOSTO, 2022

Agradecimientos al CONACYT (No. registro beca 734947)

VIEP-BUAP (# 100293600 NAT/2019)

ISSSTE (# E015-RPI-033.2015)

BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dra. Lourdes Millán Pérez Peña, Dr. Samuel Treviño Mora, Dr. Ilhuicamina Daniel Pérez de León , Dra. Guadalupe Soto Rodríguez y el Dr. Constantino Tomás Sánchez, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **"Efecto de zinc y taurina sobre el estrés nitrosativo, actividad antioxidante, transaminasas y LDH, y conducta motora en un modelo de isquemia intrauterina"**, que presenta el alumno **M.C. Alejandro González Vázquez** para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los nueve días del mes de junio del año dos mil veintidós.

A T E N T A M E N T E

Dra. Lourdes Millán Pérez Peña

Dr. Samuel Treviño Mora

Dr. Ilhuicamina Daniel Limón Pérez de León

Dra. Guadalupe Soto Rodríguez

Dr. Constantino Tomás Sánchez

Posgrado en Ciencias Químicas
FCQ - ICUAP

Edif. 105 I, Ciudad Universitaria,
Col. San Manuel, Puebla, Pue.
C.P. 72570
01 (222) 2 29-55-00 Ext. 7387

Hindawi
Oxidative Medicine and Cellular Longevity
Volume 2021, Article ID 6696538, 20 pages
https://doi.org/10.1155/2021/6696538

Research Article

Taurine Increases Zinc Preconditioning-Induced Prevention of Nitrosative Stress, Metabolic Alterations, and Motor Deficits in Young Rats following Intrauterine Ischemia

Alejandro Gonzalez-Vazquez,[1] Ana-Karina Aguilar-Peralta,[1] Constantino Tomas-Sanchez,[1] Victor-Manuel Blanco-Alvarez,[2,3] Daniel Martinez-Fong,[4] Juan-Antonio Gonzalez-Barrios,[5] Samuel Treviño,[1] Lourdes Millán-Perez Peña,[6] Victorino Alatriste,[1] Guadalupe Soto-Rodriguez,[3] Eduardo Brambila,[1] and Bertha Alicia Leon-Chavez[1]

[1]*Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita, Universidad Autónoma de Puebla, 14 sur y Av. San Claudio, Puebla, 72570 Puebla, Mexico*
[2]*Facultad de enfermería, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 27 sur 1304, Col. Volcanes, Puebla, 72410 Puebla, Mexico*
[3]*Facultad de Medicina, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 13 sur 2702, Col. Volcanes, Puebla, 72410 Puebla, Mexico*
[4]*Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Apartado Postal 14-740, 07000 México, DF, Mexico*
[5]*Laboratorio de Medicina Genómica, Hospital Regional 1° de Octubre, ISSSTE, Avenida, Instituto Politécnico Nacional #1669, 07760 México DF, Mexico*
[6]*Centro de Química, ICUAP, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 14 sur y Av. San Claudio, Puebla, 72570 Puebla, Mexico*

Correspondence should be addressed to Bertha Alicia Leon-Chavez; alileonch@gmail.com

Received 19 October 2020; Revised 12 January 2021; Accepted 19 April 2021; Published 7 May 2021

Academic Editor: Robert Ostrowski

Copyright © 2021 Alejandro Gonzalez-Vazquez et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Oxygen deprivation in newborns leads to hypoxic-ischemic encephalopathy, whose hallmarks are oxidative/nitrosative stress, energetic metabolism alterations, nutrient deficiency, and motor behavior disability. Zinc and taurine are known to protect against hypoxic-ischemic brain damage in adults and neonates. However, the combined effect of prophylactic zinc administration and therapeutic taurine treatment on intrauterine ischemia- (IUI-) induced cerebral damage remains unknown. The present work evaluated this issue in male pups subjected to transient IUI (10 min) at E17 and whose mothers received zinc from E1 to E16 and taurine from E17 to postnatal day 15 (PND15) via drinking water. We assessed motor alterations, nitrosative stress, lipid peroxidation, and the antioxidant system comprised of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx). Enzymes of neuronal energetic pathways, such as aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and lactate dehydrogenase (LDH), were also evaluated. The hierarchization score of the protective effect of pharmacological strategies (HSPEPS) was used to select the most effective treatment. Compared with the IUI group, zinc, alone or combined with taurine, improved motor behavior and reduced nitrosative stress by increasing SOD, CAT, and GPx activities and decreasing the GSSG/GSH ratio in the cerebral cortex and hippocampus. Taurine alone increased the AST/ALT, LDH/ALT, and AST/LDH ratios in the cerebral cortex, showing improvement of the neural bioenergetics system. This result suggests that taurine improves pyruvate, lactate, and glutamate metabolism, thus decreasing IUI-caused cerebral damage and relieving motor behavior impairment. Our results showed that taurine alone or in combination with zinc provides neuroprotection in the IUI rat model.

“From the brain, and from the brain only, arise our pleasures, joys, laughter and jests, as well as our sorrows, pains, griefs, and tears. Through it, in particular, we think, see, hear, and distinguish the ugly from the beautiful, the bad from the good, the pleasant from the unpleasant, in some cases using custom as a test, in others perceiving them from their utility”

Hipócrates (c. 460 A.C. - c. 370 A.C.) (LOEB Classical Library, 2021)

Dedicatoria

A mi padre. Mi mentor en la vida, quien me enseñó a no conformarme, tu disciplina me enseñó a no rendirme, a pelear por tus ideas, su carácter formo mi personalidad. Te debo quién soy. Esto un logro del cual creo firmemente estarías muy orgulloso. Con mucho amor.

A mi madre. Mi principal maestra en la vida, me has apoyado incondicionalmente en cada aspecto de mi vida, con tus preocupaciones, esfuerzo y desvelos. Hoy ves otra meta alcanzada. Madre mía, celebra, porque lo que hiciste hace años hoy abre paso a lo que decidí hacer. Mis logros, también son tuyos. Con todo el amor que te tengo.

Agradecimientos

A mi comisión revisora

A las Dras. Lourdes Millan Perez-Peña y Guadalupe Soto Rodríguez y los Drs. I. Daniel Limón Pérez de León, Constantino Tomás Sánchez y Samuel Treviño Mora. Sus consejos y perspectiva me permitieron mejorar en cada seminario de resultados. De igual manera agradezco su tiempo y dedicación en la investigación, cada uno de ustedes son ejemplo de calidad y profesionalismo.

A mis compañeros de laboratorio

A ustedes les agradezco momentos de ocurrencia para nuestra distracción del trabajo en el laboratorio y fuera de él. Las tardes de café y no café, su asistencia a seminarios y retroalimetación en los trabajos.

A la cD.C. Ana Karina Aguilar Peralta. Persona incomparable. Tu dedicación en cada experimento me permite hoy defender este trabajo. Admiro tu bondad, tenacidad y calidad humana. Gracias por tu apoyo y amistad. Te veo del otro lado.

Al D.C. Víctor Manuel Blanco Álvarez. Amigo y sensei. El Alejandro que hoy defiende este trabajo se reconstruyo con tus consejos, estoicismo y visión. Agradezco tu accesibilidad y disponibilidad.

Al D.C. Constantino Tomás Sánchez. Agradezco las charlas y consejos que desde la maestría pudimos tener y aquí puedo apreciar mejor.

A mis directores de tesis

Al Dr. Juan Antonio González Barrios. Ahora sé que el tiempo es un recurso que se debe invertir de la manera correcta. Gracias por invertir su tiempo en su servidor. En retrospectiva, veo con gran aprecio todo aquello que me brindo. Sus experiencias de vida, y logros son sin duda un ejemplo a seguir.

A mi jefa, a la D.C. Bertha Alicia León Chávez. Su paciencia y dirección de este proyecto. Y que cuatro años después ve la conclusión de un trabajo que me ha permitido adquirir habilidades que en un futuro me permitirán continuar con mi trayectoria como investigador. UD ha sido de gran ayuda en diferentes aspectos de mi formación como Doctor en Ciencias. Con gran aprecio y cariño.

ÍNDICE GENERAL

Contenido

ÍNDICE GENERAL i

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES iv

ÍNDICE DE FIGURAS v

ÍNDICE DE ECUACIONES vii

ÍNDICE DE TABLAS vii

ABREVIATURAS viii

RESUMEN xiv

INTRODUCCIÓN 1

La Asfixia perinatal 1

Secuelas neurológicas 1

Cascada isquémica 3

Las transaminasas (AST y ALT) y lactato deshidrogenasa (LDH) como biomarcadores pronósticos de daño cerebral 6

Papel de AST y ALT en el metabolismo del SNC 7

El zinc y la taurina como estrategias farmacológicas alternativas para contrarrestar el daño cerebral causado por el proceso hipóxico-isquémico 11

Papel del zinc en el sistema nervioso central 12

Papel del zinc en el metabolismo celular 17

Papel del zinc en la actividad antioxidante y antiinflamatoria ante un proceso de daño celular 18

Papel de la taurina en el sistema nervioso central 20

Papel de la taurina en el metabolismo celular 25

Papel de la taurina en la actividad antioxidante y antiinflamatoria ante un proceso de daño celular 27

PLANTEAMIENTO 30

JUSTIFICACION 31

HIPÓTESIS 32

OBJETIVO GENERAL 33

OBJETIVOS PARTICULARES 33

PROTOCOLO EXPERIMENTAL GENERAL 34

METODOLOGÍA 34

Animales de experimentación.....34

Tratamientos.....35

Realización de la isquemia intrauterina (IIU).....35

Estudio histopatológico.....36

Procesamiento de tejidos para deshidratación e inclusión en parafina.....36

Procesamiento de los bloques de parafina.....36

Tinción de Nissl.....37

Procesamiento de las imágenes.....37

Análisis de datos (Histología).....37

Batería de pruebas motoras.....37

Enderezamiento postural (P5).....37

Aversión a la altura (P9).....38

Fuerza de sujeción (P11).....38

Geotaxis negativa (P12).....39

Sujeción con las extremidades delanteras (P13).....39

Sujeción con las extremidades posteriores (P13).....40

Prueba de la viga (P29).....41

Prueba de inversión (P30).....42

Campo abierto (P30).....42

ANÁLISIS DE DATOS.....43

Evaluaciones neuromotoras.....43

Jerarquización del Efecto Protector de Estrategias Farmacológicas (JEPEF).....43

Evaluación bioquímica.....44

Cuantificación de nitritos (NO_2^-).....44

Cuantificación de la peroxidación lipídica (MDA & 4-HDA).....45

Ensayo para la cuantificación de la actividad enzimática de catalasa (Cat).....45

Ensayo para la cuantificación de la actividad enzimática de Superóxido dismutasa total (SOD).....46

Ensayo para la cuantificación de la actividad enzimática de la Glutatión peroxidasa (GPx).....46

Ensayo de glutatión total (GSH + GSSG).....47

Ensayo de glutatión oxidado (GSSG).....48

Ensayo para la cuantificación de la actividad enzimática de aspartato aminotransferasa (AST).....48

Ensayo para la cuantificación de la actividad enzimática de alanina aminotransferasa (ALT) 48

Ensayo para la cuantificación de la actividad enzimática de lactato deshidrogenasa (LDH) 49

Relaciones AST/ALT, LDH/ALT y AST/LDH....49

Análisis de datos de cuantificaciones bioquímicas 49

RESULTADOS....50

Estrés nitrosativo en corteza cerebral e hipocampo P1 50

Actividad antioxidante en corteza cerebral e hipocampo P1 51

Análisis histopatológico en corteza cerebral de ratas P1 52

Batería de pruebas motoras (P5 -P14) 54

Estrés nitrosativo en corteza temporoparietal e hipocampo P15 59

Actividad antioxidante en corteza temporoparietal e hipocampo P15....60

Enzimas del metabolismo energético en corteza temporoparietal e hipocampo P15 63

Batería de pruebas motoras (P29 y P30) 66

Estrés nitrosativo en corteza cerebral, núcleos subcorticales y tallo cerebral P30 70

Actividad antioxidante en corteza temporoparietal, núcleos subcorticales y tallo cerebral P30....71

DISCUSIÓN DE RESULTADOS 73

CONCLUSIÓN....91

PERSPECTIVAS....92

REFERENCIAS 93

ANEXO 119

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Interrelación de la actividad enzimática de las transaminasas (AST y ALT) y lactato deshidrogenasa (LDH) en el metabolismo celular. 9
Ilustración 2. Representación de los mecanismos que induce el zinc para ejercer su efecto neurogénico y neuromodulador. 13
Ilustración 3. Representación de los mecanismos que induce el zinc para ejercer su efecto antioxidante, antiapoptótico y neuromodulador. 19
Ilustración 4. Ruta de síntesis de la taurina en el cerebro. 22
Ilustración 5. Representación de los mecanismos que induce la taurina para ejercer su efecto neurogénico y neuromodulador. 24
Ilustración 6. Interrelación entre la ruta te síntesis de la taurina y el ciclo glutamato-glutamina-GABA en el cerebro. 26
Ilustración 7. Representación de los mecanismos que induce la taurina para ejercer su efecto antioxidante, antiapoptótico y neuromodulador. 28
Ilustración 8. Representación de la prueba de enderezamiento para evaluar el control postural. 38
Ilustración 9. Representación de la prueba de aversión para evaluar la fuerza y coordinación para evitar el estímulo aversivo de la altura. 38
Ilustración 10. Representación de la prueba de fuerza de sujeción para evaluar la resistencia de las cuatro extremidades en contra de la fuerza de gravedad. 39
Ilustración 11. Representación de la prueba de geotaxis negativa. 39
Ilustración 12. Representación de la prueba de sujeción con las extremidades anteriores cuando se sujeta de una guía metálica para evaluar su resistencia y fuerza. 40
Ilustración 13. Representación de la prueba de sujeción para evaluar la resistencia y fuerza de las extremidades posteriores. 40
Ilustración 14. Representación de la prueba de ángulo de caminata. 41
Ilustración 15. Representación de la prueba de la viga o barra. 42
Ilustración 16. Representación de la prueba de inversión. 42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. La suplementación con taurina previene el déficit de la respuesta antioxidante causado por la IIU en la corteza temporoparietal de rata de un día postnatal (P1)……...50

Figura 2. La suplementación con zinc y taurina previene el déficit de la respuesta antioxidante causado por la IIU en el hipocampo de rata de un día postnatal (P1)…..…….52

Figura 3. La administración con zinc o taurina previene la reducción de la densidad celular en la corteza cerebral rata de un día postnatal (P1).……...53

Figura 4. La con administración taurina evito la pérdida de la densidad celular en hipocampo de rata de un día postnatal (P1)……..54

Figura 5. El efecto de la administración de precondicionamiento de zinc y el tratamiento terapéutico con taurina en alteraciones en el enderezamiento de la superficie, aversión a la altura, fuerza de agarre e impulso colgante inducidas por la isquemia intrauterina……55

Figura 6. El efecto de la administración de precondicionamiento de zinc y el tratamiento terapéutico con taurina en las alteraciones de la suspensión de las extremidades anteriores y posteriores, geotaxis negativa y ángulo de la marcha inducidas por la isquemia intrauterina……57

Figura 7. La suplementación de zinc solo o en combinación con taurina disminuyó el estrés nitrosativo inducido por la isquemia intrauterina en el día P15……..60

Figura 8. El efecto de la administración precondicionante de zinc y el tratamiento terapéutico con taurina en de la actividad antioxidante inducida por la isquemia intrauterina en el día P15. ……..61

Figura 9. La administración precondicionante de zinc y el tratamiento terapéutico con taurina aumentaron la capacidad antioxidante del sistema glutatión-GPx en la isquemia intrauterina en el día P15……..62

Figura 10. La suplementación combinada de zinc y taurina recupera el efecto inducido por isquemia intrauterina sobre metabolismo celular en la corteza temporoparietal en el día P15……..64

Figura 11. La suplementación combinada de zinc y taurina recupera el efecto inducido por isquemia intrauterina sobre metabolismo celular en el

hipocampo en el día P15……...65

Figura 12. El efecto de la administración de precondicionamiento de zinc y el tratamiento terapéutico con taurina en las alteraciones motoras inducidas por la isquemia intrauterina evaluadas con la prueba de la viga (P29)……..67

Figura 13. El efecto de la administración de precondicionamiento de zinc y el tratamiento terapéutico con taurina en la resistencia de las extremidades inducidas por la isquemia intrauterina en el día P30……..…68

Figura 14. El efecto de la administración de precondicionamiento de zinc y el tratamiento terapéutico con taurina en las alteraciones motoras inducidas por la isquemia intrauterina (P30)……..……69

Figura 15. La suplementación combinada de zinc y taurina recupera el efecto inducido por isquemia intrauterina sobre el estrés nitrosativo en corteza temporoparietal, núcleos subcorticales y tallo cerebral en el día P30……..……71

Figura 16. El efecto de la administración precondicionante de zinc y el tratamiento terapéutico con taurina en la disminución de la actividad antioxidante inducida por la isquemia intrauterina en el día P30……..…73

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. L-aspartato + α-cetoglutarato ⇆ L-glutamato + oxalacetato.....8
Ecuación 2. L-glutamato + piruvato ⇆ α-cetoglutarato + alanina.....9
Ecuación 3. Piruvato ⇆ Lactato.....10

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Puntaje de rendimiento para cada tratamiento por sujeto......44
Tabla 2. Puntaje de Jerarquización del efecto protector para estrategias farmacológicas (JEPEF)......44
Tabla 3. Jerarquización del efecto protector de estrategias farmacológicas (JEPEF) en la recuperación motora......59
Tabla 4. Jerarquización del efecto protector de estrategias farmacológicas (JEPEF) en la recuperación motora......69

ABREVIATURAS

A	4-hidroxialquenales	4-HDA
	5,5′-ditiobis (2-nitrobenzoico)	DNBT
	Acarreador de soluto Familia 5 Miembro 3	SLC5A3
	α -cetoglutarato	α-KG
	Ácido -aminobutírico	GABA
	Ácido desoxirribonucleico	ADN
	Ácido etilediaminotetraácetico	EDTA
	Ácido retinoico	AR
	Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico	AMPA
	Acrónimo para *zif-268*, *egr-1*, *ngfi-a*, *krox-24*	ZENK
	Activador del factor de transcripción 6	ATF6
	Actividad y tono muscular	A
	Agua	H_2O
	AKT Serina/Treonina Quinasa	Akt
	Alanina	Ala
	Alanina aminotransferasa	ALT
	Amonio iónico	NH_3^+
	Análisis de varianza	ANOVA
	Anión superóxido	$O_2^{\cdot -}$
	Apariencia de la piel	A
	Asfixia perinatal	AP
	Aspartato aminotransferasa	AST
	Aspartato	Asp
	Azufre elemento	S
B	Barrera hematoencefálica	BHE
	Bcl2 mediador interactivo de la muerte celular	Bim
	Mecanismo del Blanco de la rapamicina quinasa	mTOR
	Buffer K_2HPO_4-EDTA	KPE
C	Buffer Tris-(hidroximetil)-aminometano ácido clorhídrico	Tris-HCl
	Cadena transportadora de electrones	CTE
	Cadmio elemento	Cd
	Caja emparejada 6	Pax6
	Calcio iónico	Ca^{2+}
	Calmodulina tipo II	CaMII
	Canal de Ca^{2+} activado por voltaje de tipo N (neuronal)	N-
	Canal de Ca^{2+} tipo L (lento)	L-
	Canal de osmolitos aniones orgánico sensible a volumen	VSOAC
	Canales de Ca^{2+} dependientes de alto voltaje tipo P/Q	P/Q
	Capa I de la corteza cerebral	LI
	Capa II de la corteza cerebral	LII
	Capa III de la corteza cerebral	LIII
	Capa IV de la corteza cerebral	LIV

	Capa V de la corteza cerebral	LV
	Capa VI de la corteza cerebral	LVI
	Carbamoil-fosfato sintetasa 2, aspartato transcarbamilasa y dihidroorotasa	CAD
	Catalasa	Cat
	Célula madre mesenquimal	MSC
	Célula precursora de oligodendrocito	OPC
	Célula precursora neural	NPC
	centímetro	cm
	centímetro cuadrado	cm^2
	Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN	CINVESTAV
	Ciclo de Krebs	CK
	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos	CAT
	Cinasa 1 de la Piruvato deshidrogenasa	PDK1
	Cinasa activada por señales extracelulares 1/2	ERK1/2
	Cinasa fosfoinositol-3-fosfato	PI3K
	Cinasa Janus	JAK
	Cinasa Jun amino-terminal	JNK
	Cinasa activada por inositol 1	p-IRE1
	Cloroamina taurina	TauCl
	Coactivador receptor-gamma activado por la proliferación de peroxisoma 1α	PGC1α
	Complejo acarreador de piruvato	MPC
	Cotransportador de potasio-cloro	KCC
	Cuerno ammonis 1	CA1
	Cuerno ammonis 3	CA3
D	Daño traumático cerebral	TBI
	Defectos del tubo neural	NTD
	Densidad óptica	DO
	Descarboxilasa de ácido sulfínico de cisteína	CSAD
	Día embrionario	E
	Día postnatal	P
	Dicloro difenil tricloroetano	DDT
	Diferencia de DO de la muestra	ΔOD
	Diferencia de DO en el blanco de la reacción	ΔODb
	Dinucleótido de adenina-nicotinamida oxidado	NAD^+
	Dinucleótido de adenina-nicotinamida reducido	NADH
	Dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato	NADPH
	DNA polimerasa	DNA pol
	Doblecortina	DCX
E	Encefalopatía hipóxico-isquémica	HIE
	Enfermedad granulomatosa crónica	CDG
	Erb-B2 Receptor Tirosina Quinasa 2	ERBB2
	Error estándar de la media	SEM
	Especie reactiva de oxígeno	ROS

F	Factor de crecimiento nervioso	NGF
	Factor de crecimiento nervioso 7S	NGF-7S
	Factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2	FGF2
	Factor de crecimiento derivado de la glía	GDNF
	Factor de crecimiento derivado del cerebro	BDNF
	Factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1	IGF-1
	Factor de crecimiento transformante B	TFG-B
	Factor de necrosis tumoral alfa	TNF-α
	Factor de transcripción 1 inducido por metales	MTF-1
	Factor de transcripción BHLH	Myc
	Factor de transcripción SRY-Box 2	Sox2
	Factor inflamatorio del aloinjerto tipo 1	Iba1
	Factor nuclear k de células B	NF-κB
	Factor retinoide-2 nuclear	Nrf-2
	Familia de sitios de integración MMTV de tipo sin alas	Wnt
	Familia de transportadores de solutos 39 Miembro 8	SLC39A8
	Familia GLIS Dedo de zinc 3	GLIS3
	Fase G1 del ciclo celular	G1
	Fase G2 del ciclo celular	G2
	Fase M del ciclo celular	M
	Fase S del ciclo celular	S
	Fenotipo antiinflamatorio de la microglía	M2
	Fenotipo proinflamatorio de la microglía	M1
	Fosfato de dinucleótido de adenina-niacinamida reducido	NADPH
	Fosfato de piridoxal	PLP
G	Gancho BTB y AT con dedo de zinc 1	POZ
	Giro dentado	GD
	Glicina	Gly
	Glutamato	Glu
	Glutamato descarboxilasa	GDL
	Glutamato deshidrogenasa	GDH
	Glutamato sintetasa	GS
	Glutamilcisteína ligasa	GCL
	Glutaminasa	GLS
	Glutatión oxidado	GSSG
	Glutatión peroxidasa	GPx
	Glutatión reducido	GSH
	Glutatión reductasa	GR
	Grados Celsius	ºC
H	Hemoxigenasa 1	OH-1
	Hipoxia-isquemia	H-I
	Histona desacetilasa	HDAC
	Homólogo de la proteasa Lon 1	Lonp1
	hora	h
I	Impulso colgante	IP

	Inhibidor de la recaptura de serotonina	SSRI
	Inhibidor 2 de la unión al DNA	Id2
	Interferón gamma	IFN-γ
	Interleucina 10	IL-10
	Interleucina 1beta	IL-1B
	Interleucina 6	IL-6
	Ion carboxilo	CO_2^-
	Ion cloruro	Cl^-
	Ion nitrito	NO_2^-
	Ión peroxinitrito	$ONOO^-$
	Ion sulfito	SO_3^-
	Isquemia intrauterina	IIU
	Isquemia intrauterina + Taurina	IIU+Tau
J	Jerarquización del Efecto Protector de Estrategias Farmacológicas	JEPEF
K	kilogramo	kg
L	Lactato deshidrogenasa	LDH
	Latencia de caída	LC
	Ligando de quimiocinas CC tipo 2	CCL2
	Línea celular de cáncer de hígado humano	HepG2
	Linfoma 2 de células B	Bcl-2
	Lipopolisacárido	LPS
	litro	L
M	Magnesio iónico	Mg^{2+}
	Malato dehidrogenasa	MDH
	Malonildialdehído	MDA
	Matriz extracelular	MEC
	Metaloproteinasa de matriz extracelular	MMP
	microgramo	µg
	microlitro	µL
	micromolar	µM
	miligramo	mg
	mililitro	mL
	milímetro cuadrado	mm^2
	milimolar	mM
N	nanómetro	nm
	nanomolar	nM
	N-metil-D-aspartato	NMDA
	Norepinefrina	NE
O	Oxalacetato	OAA
	Óxido nítrico	NO
	Oxígeno molecular	O_2
P	p53 modulador positivo de la apoptosis	PUMA
	Partes por millón	ppm
	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
	Peso corporal	PC

	Piruvato	Pyr
	Potasio iónico	K^+
	Potencial de hidrógeno	pH
	Prostaglandina E2	PGE2
	Proteína dedo de zinc 667	ZNF667
	Proteína accesoria A20	A20
	Proteína ácida glial fibrilar	GFAP
	Proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad	Arc
	Proteína beta de unión al potenciador CCAAT	C/EBP
	Proteína de choque térmico 70	Hsp70
	Proteína dedo de zinc 89 con unión al ADN	ZBP89
	Proteína dedo de zinc 281	ZNF281
	Proteína dedo de zinc 32	ZNF637
	Proteína dedo de zinc 423	Zfp423
	Proteína dedo de zinc 580	ZFP580
	Proteína dedo de zinc 750	ZNF750
	Proteína del gen 2 inducida por receptor acoplado a proteína G	Trb1
	Proteína homóloga del factor de transcripción C/EBP	CHOP
	Proteína reguladora y de anclaje beta	VGCC
	Protein-cinasa activada por mitógenos	MAPK
	Protein-cinasa activada por mitógenos p38	p38
	Pulso	P
R	Receptor A de GABA	$GABA_A$
	Receptor a zinc/receptor 39 acoplado a proteínas G	ZnR/GPR39
	Receptor B de GABA	$GABA_B$
	Receptor de glicina	GlyR
	Receptor del factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1	IGFR
	Receptor del ligando de quimiocinas CC tipo 2	CCR2
	Regulador de apoptosis X asociado a Bcl-2	Bax
	Represor transcripcional 2 de la familia snail2	SLUG
	Resonancia magnética nuclear	RMN
	Respiración	R
	Respuesta de crecimiento temprano 1	Erg-1
	Respuesta refleja o irritabilidad (Grimage)	G
	Retículo endoplasmático	RE
	RNA polimerasa	RNA pol
	Rodopsina	Rho
S	segundo	s
	Sin tratamiento	s/t
	Sistema nervioso central	SNC
	Sintasa del óxido nítrico	NOS
	Sintasa del óxido nítrico endotelial	eNOS
	Sintasa del óxido nítrico inducible	iNOS
	Sintasa del óxido nítrico neuronal	nNOS
	Sodio iónico	Na+

	Solución buffer de fosfato	PBS
	Solución salina isotónica	SSI
	Subunidad del factor de transcripción AP-1	c-Jun
	Subunidad NR2A del receptor NMDA	NR2A
	Subunidad NR2B del receptor NMDA	NR2B
	Sulfato de zinc	$ZnSO_4$
	Superóxido dismutasa 1	SOD1
T	Telurio elemento	Te
	Tomografía axial computarizada	TAC
	Transductor de señal y activador de transcripción	STAT
	Transportador 1 de glutamato	GLT-1
	Transportador 1 de zinc	ZnT1
	Transportador 3 de zinc	ZnT3
	Transportador de aspartato/glutamato dependiente de sodio	GLAST
	Transportador de taurina	TauT
	Tribbles homólogo 2	Trb2
	Trifosfato de adenosina	ATP
U	Unidad internacional	U
	Unión de dedos de zinc y Homeobox 1 E-Box	ZEB1
V	Valor promedio	AV
Z	Zinc + isquemia intrauterina	Zn+IIU
	Zinc + isquemia intrauterina + Taurina	Zn+IIU+Tau
	Zinc elemento	Zn
	Zinc iónico	Zn^{2+}

RESUMEN

La asfixia perinatal es causa de encefalopatía hipóxica-isquémica una condición inflamatoria cerebral que se desarrolla en los recién nacidos. La privación de oxígeno conduce al incremento del estrés nitrosativo, deficiencia de nutrientes que provocan alteraciones del metabolismo energético, daño la materia gris y discapacidad motora. El zinc y la taurina administrados de forma individual ejercen un efecto protector contra el daño cerebral hipóxico-isquémico tanto en neonatos como en adultos. Sin embargo, se desconoce el efecto de la administración combinada del zinc profiláctico y el tratamiento terapéutico con taurina ante el daño cerebral inducido por isquemia intrauterina (IIU). En este trabajo se evaluó el efecto de las administraciones de zinc (desde el día E1 hasta el día E16) y de taurina (inciando en el día E17 hasta al día postnatal 15 (P15)) a través del agua de beber ante un modelo de IIU transitoria (10 min) en día E17 sobre las ratas macho neonatas. Además, se llevó a cabo la evaluación de un curso temporal de las edades P1, P15 y P30 en el cerebro de ratas neonatas macho y el daño tisular, estrés nitrosativo (NO_2^-), peroxidación lipídica (MDA & 4-HDA), enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (Cat) y el sistema glutatión peroxidasa - glutatión (GPx - GSH). Así mismo, se cuantificó el glutatión oxidado (GSSG), para posteriormente obtener el índice GSSG/GSH. También se evaluaron las enzimas: aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y lactato deshidrogenasa (LDH), los índices AST/ALT, LDH/ALT y AST/LDH. También se evaluó el efecto de los tratamientos de zinc y taurina sobre alteraciones motoras inducidas por la IIU. Se utilizó la escala de Jerarquización del Efecto protector de Estrategias Farmacológicas (JEPEF) para seleccionar el tratamiento más eficaz. Comparada con el grupo IIU, la administración de zinc, sola o combinada con taurina, contribuyó en la protección tisular (P1), mejoraron la conducta motora (P5 – P14 y P29 – P30) y redujeron el estrés nitrosativo (P15 y P30) al aumentar la actividad antioxidante de SOD, CAT y de GPx, disminuyeron la relación GSSG/GSH en la corteza cerebral y el hipocampo (P15), esto se vio reflejado en la recuperación de las habilidades motoras. La administración de taurina individual incrementó los índices AST/ALT, LDH/ALT y AST/LDH en la corteza cerebral, mostrando una mejora del sistema bioenergético neural (P15). Estos resultados sugieren que la taurina mejora el metabolismo del piruvato, el lactato y el glutamato, participando en la disminución de la inflamación cerebral causada por la IIU y ayudando a disminuir el deterioro motor a mediano y largo plazo. En conclusión, la administración combinada con zinc y taurina mostró un tuvo un efecto neuroprotector ante un daño IIU en rata.

INTRODUCCIÓN

La Asfixia perinatal

La asfixia perinatal (AP) se define como la agresión producida al feto o al recién nacido alrededor del momento del nacimiento por la falta de oxígeno y/o de una perfusión tisular inadecuada **(Hutter et al., 2010, Qin et al., 2019)**, es causada por una amplia gama de procesos patológicos en los que se incluyen: el desprendimiento o ruptura prematura de la placenta, la invasión de los vasos sanguíneos fetales que cruzan el orificio externo del útero (*vasa praevia*) **(Yang et al., 2019)**, eventos hipóxico-isquémicos **(Locatelli et al., 2010, Laptook et al., 2017, Dhillon et al., 2018)**, problemas durante el parto (parto prolongado) **(Kurinczuk et al., 2010)**, incluso el consumo de sustancias nocivas (cocaína, alcohol, etc.) **(Maddox et al., 2019)**.

La AP es la 5ta causa de daño cerebral en recién nacidos e infantes menores de cinco años, causa cerca de 0.69 a 1.02 millones de defunciones en la población recién nacida a nivel mundial **(Laptook et al., 2017)**. Esta enfermedad afecta de 3 a 5 neonatos por cada 1000 recién nacidos vivos, se estima que de 0.5 a 1 neonato de cada 1000 recién nacidos vivos desarrollan daño cerebral en forma de encefalopatía **(Laptook, 2016, Barkhuizen et al., 2017)** con una alta probabilidad de presentar secuelas neurológicas y desarrollar daño multiorgánico impidiendo su desarrollo infantil **(Alsina et al., 2017, Borjini et al., 2019)**.

Secuelas neurológicas

El estrés intrauterino causado por la hipoxia gestacional es un factor de riesgo que conduce al incremento de daño cerebral **(Sacchi et al., 2018a)** y puede determinar el término del alumbramiento **(Bos et al., 2013)**. Las condiciones inflamatorias incrementan la probabilidad de que los neonatos muestren alteraciones motoras a corto y largo plazo **(Bos et al., 2013, Evensen et al., 2020)**.

La materia blanca debe establecer las conexiones necesarias que permitan la intercomunicación entre diferentes regiones cerebrales. Posteriormente, la

mielinización del sistema nervioso central incrementa la velocidad en la transferencia de información frente a una amplia gama de estímulos durante la lactancia e infancia. Las regiones sensio-motoras tienen una maduración temprana **(Sacchi et al., 2018a)**, mientras que las regiones cognitivo-asociativas pueden continuar su desarrollo hasta décadas después del nacimiento **(Dubois et al., 2014)**.

Las habilidades motoras de control postural, locomoción, destreza manual, exploración e interacción son primordiales para asegurar el desarrollo adecuado de los recién nacidos **(Adolph and Hoch, 2020),** lo que permitirá interactuar mejor con su medio ambiente a largo plazo **(Adolph and Hoch, 2019)**. Sin embargo, el daño cerebral causado por sufrimiento fetal altera significativamente el comportamiento de los sujetos **(Fuentefria et al., 2017, Adolph and Hoch, 2020)**. La extensión del daño cerebral desencadenado por la AP está relacionada con la duración de la interrupción en la perfusión tisular y por ende en el suministro de oxígeno, así como el tipo celular del tejido dañado **(Sacchi et al., 2018a)**. Las regiones cerebrales más susceptibles al daño hipóxico son el tálamo, los ganglios basales, la corteza y el hipocampo evidenciado con ayuda de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Tomografía Axial Computarizada (TAC) **(Okumura et al., 1997, Bano et al., 2017, McAdams et al., 2017a)**. La lesión cerebral produce el deterioro en la comunicación neuronal y el desarrollo de disfunción motora **(Torres-Merino et al., 2019)** y cognitiva en los recién nacidos a largo plazo **(McAdams et al., 2017b)**.

La prueba Apgar es utilizada como el estándar de oro para la evaluación del rendimiento motor y las respuestas a estímulos sensoriales en el recién nacido. Esta prueba se realiza en los 0, 5 y 10 minutos posteriores al nacimiento. Consiste en la evaluación del aspecto de la piel (A), el pulso (P), respuesta refleja o irritabilidad del inglés Grimage (G), actividad y tono muscular (A) y la respiración (R). En cada rubro, a cada uno de estos parámetros se le asigna una puntuación de 0 (respuesta nula), 1 (moderada) o 2 (respuesta óptima). La suma total de los parámetros es comparada en una escala que indica el funcionamiento neurológico general del recién nacido donde: un puntaje de 0-3 indica daño neurológico severo, daño

moderado corresponde a un puntaje de 4-6 y 7-10 indica buena salud neuromotora **(American Academy of et al., 2006)**. Los recién nacidos con puntaje 4-6 en la prueba APGAR evaluada a los 10 min, son candidatos directos para tratamiento con hipotermia y en la mayoría de los casos son dados de alta con una vigilancia constante. Sin embargo, en diferentes estudios de imagenología realizados una semana después del nacimiento, se observa la evolución natural del daño cerebral con presencia de secuelas neurológicas **(American Academy of et al., 2006)**. Para esta población afectada, la escala Sarnat **(Sarnat and Sarnat, 1976, Allen and Brandon, 2011)** ayuda a reclasificar la severidad del daño neurológico a largo plazo, también permite obtener información para considerar y aplicar terapia con agentes neuroprotectores y evitar el desarrollo de las secuelas neurológicas **(Dixon et al., 2015, Chalak et al., 2019, McNally and Soul, 2019)**.

Los neonatos que sobreviven a un episodio de hipoxia-isquemia (H-I) pueden mostrar una baja reactividad emocional durante su infancia, esto ha sido relacionado con la susceptibilidad a padecer depresión y problemas motores **(Sacchi et al., 2018b)**. Diferentes estudios se han enfocado en comprender la variabilidad del daño neurológico en neonatos inmaduros con la finalidad de mejorar la eficiencia de su intervención y evitar secuelas neurológicas **(Rogers and Hintz, 2016, Sacchi et al., 2018a)**.

Los modelos animales sometidos a H-I permiten estudiar el desarrollo cronológico del daño cerebral desencadenado por el proceso neuroinflamatorio y oxidativo **(Schneider et al., 1975, Rutherford et al., 1994, Gonzalez-Barrios et al., 2002, Huang et al., 2013, Feather-Schussler and Ferguson, 2016, Fushima et al., 2016)** con el propósito de proponer tratamientos para ayudar a mitigar el daño cerebral **(Arteaga et al., 2015, Zhu et al., 2016, Goren et al., 2017)** e impedir la evolución del déficit neuromotor a corto y largo plazo **(Feather-Schussler and Ferguson, 2016, Fushima et al., 2016, Goren et al., 2017, Nguyen et al., 2017)**.

Cascada isquémica

La interrupción de la perfusión sanguínea provoca la despolarización de la membrana neuronal y activa la cascada isquémica. Mientras que, la baja presión de

oxígeno (pO_2) al parénquima cerebral causa la hipoxia. A nivel mitocondrial, la baja presión de O_2 interrumpe el funcionamiento de la cadena transportadora de electrones (CTE) con lo que se establece la disfunción del complejo I (NADPH deshidrogenasa), promoviendo la acumulación de electrones (e^-), que posteriormente durante el proceso de reperfusión los e^- son cedidos al O_2 para formar el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), lo que potencia la propagación del daño oxidativo; la disfunción de la CTE promueve una falla energética y causa depleción de ATP (Trifosfato de Adenosina) que afecta el funcionamiento de las bombas sodio-potasio ATPasa (Na^+-K^+ ATPasa) en la membrana celular. Al mismo tiempo, se suscita el desbalance iónico que provoca la propagación de la despolarización de la membrana en las neuronas y con ello, la posterior liberación masiva de glutamato (Glu) dando pie al inicio de la fase de daño excitotóxico **(Kalogeris et al., 2016, Riljak et al., 2016)**.

La liberación de Glu desde la terminal presináptica induce la sobreestimulación de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) y permite la entrada masiva de calcio (Ca^{2+}) en las terminales postsinápticas **(Burd et al., 2016)**. La posterior acumulación de Ca^{2+} citoplasmático activa mecanismos de daño en la membrana como la lipoperoxidación **(Martini et al., 2020)** e incrementa la actividad de diferentes enzimas dependientes de Ca^{2+} como la calpaína y las sintasas del óxido nítrico (NOS), estas últimas dirigen la síntesis de óxido nítrico (NO) para favorecer la vasodilatación local, mientras que en una etapa tardía el NO y el $O_2^{\cdot-}$, reaccionan y forman como producto transitorio al ion peroxinitrito ($ONOO^-$) **(Torres-Cuevas et al., 2017, Martini et al., 2020)** un agente altamente reactivo que causa cariorexis por la oxidación ADN, proteínas y lípidos **(Samdani et al., 1997, Bolanos and Almeida, 1999, Qin et al., 2019)**.

La maquinaria enzimática del sistema nervioso en el recién nacido posee baja eficiencia para contrarrestar la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) durante un evento hipóxico, lo que permite el incremento de la excitotoxicidad por glutamato **(Zeevalk and Nicklas, 1992, Follett et al., 2004)**, el estrés oxidativo **(Gonzalez-Barrios et al., 2002, Martin et al., 2009)** y la inflamación **(Bonestroo et**

al., 2015). En conjunto, la disrupción en la comunicación de regiones cerebrales **(Teo and Bourne, 2014, Bonestroo et al., 2015)** provoca el desarrollo de alteraciones neurológicas como parálisis cerebral, disfunción motora y cognitiva **(Feather-Schussler and Ferguson, 2016)**.

El proceso isquémico redirige el metabolismo celular hacia la producción de ácido láctico y reduce el pH (acidosis láctica) **(Murray et al., 2008, Wu et al., 2018)**. Esta alteración es considerada como un biomarcador que está altamente relacionado con el daño cerebral en neonatos que sufrieron un evento hipóxico-isquémico **(Murray et al., 2008, Karlsson et al., 2010, Wu et al., 2018)**.

El tejido cerebral cuenta con diferentes mecanismos compensatorios para evitar la exacerbación del daño causado por la hipoxia-isquemia (H-I). Por ejemplo, el astrocito tiene una alta capacidad para contrarrestar el desbalance hidroelectrolítico a través del incremento en el consumo de potasio (K^+) y agua a través de la regulación de la acuaporina-4 **(Shi et al., 2017)**, puede regular la recaptura de Glu y glicina (Gly), así como dirigir la síntesis de ácido γ-aminobutírico (GABA); bajo condiciones adversas provee a la neurona de moléculas energéticas (lactato y glucosa), favorece la liberación de factores de crecimiento **(Bylicky et al., 2018)** y quimiocinas **(Hennessy et al., 2015)**.

La hipoxia y la inflamación son potentes agentes activadores del astrocito, incrementan su reactividad e inducen la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), causando astrogliosis y modificando su dinámica celular, este fenotipo regula positivamente la inflamación y altera las comunicaciones astrocito-astrocito y astrocito-neurona a través de la liberación de citocinas proinflamatorias como interleucinas (IL-1β, IL-6 y TNF-α), factor transformante-β (TGF-β) e interferón-γ (IFN-γ) **(Becerra-Calixto and Cardona-Gomez, 2017)**.

El incremento de la inflamación es un punto determinante para el establecimiento de la falla energética neuronal. Por su parte, el astrocito modifica su metabolismo para evitar el desbalance de diferentes moléculas involucradas con la neurotransmisión (glutamato y aspartato) y mantiene la osmorregulación a través de la concentración de taurina, creatinina, inositol, etc. **(Lambert et al., 2015,**

Berger et al., 2017). Mientras que los oligodendrocitos son altamente susceptibles al daño oxidativo **(Tekkok and Goldberg, 2001, Singh et al., 2018)**. El incremento del estrés oxidativo y la inflamación **(Bonestroo et al., 2015)** promueven la desmielinización y el daño axonal, afectando la comunicación entre áreas cerebrales **(Aridas et al., 2014)**.

La interrupción de la perfusión sanguínea provoca la alteración en la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE). El incremento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos es causado por el remodelamiento de la matriz extracelular (MEC) a través de la actividad de las metaloproteinasas de matriz (MMP) **(Kim and Han, 2006, Rosell et al., 2006).** La extravasación de células del sistema inmunológico como neutrófilos y macrófagos al parénquima cerebral **(Ceulemans et al., 2010, Jickling et al., 2015)** conducen al incremento en la hiperactivación de la microglía (Iba1+) en una etapa temprana **(ElAli and Jean LeBlanc, 2016)**, posteriormente, la sobreactivación de la microglía lleva a la consecuente activación de los astrocitos al modificar su morfología (GFAP +) incrementando su reactividad y la liberación de citocinas proinflamatorias (IL-1β y TNF-α) **(Hennessy et al., 2015)** exacerbando el proceso inflamatorio cerebral, dañando principalmente a las neuronas, oligodendrocitos y al mismo astrocito **(Bonestroo et al., 2015)**.

Las transaminasas (AST y ALT) y lactato deshidrogenasa (LDH) como biomarcadores pronósticos de daño cerebral

El proceso hipóxico disrumpe la homeostasis cerebral. Se ha reportado que después de un procesos H-I existe fuga masiva de osmolitos como la taurina, fosfocreatina y lactato **(Hagberg et al., 1985)**. La despolarización neuronal conduce a una liberación excesiva de glutamato causando excitotoxicidad y perturbando el metabolismo cerebral **(Lepore et al., 2020)**. Las transaminasas (ALT y AST) se encargan de regular el metabolismo del glutamato tanto en el citosol como en la mitocondria **(Schousboe et al., 2014)**. La disminución de la perfusión sanguínea interrumpe el aporte de nutrientes al parénquima cerebral, especialmente de glucosa, lo cual reduce sustancialmente el aporte bioenergético e induce un

incremento en la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) reduciendo el pH intracelular **(Gao et al., 2017, Jiang et al., 2017)**.

Los neonatos que sufrieron daño cerebral derivado del proceso H-I muestran un incremento en la actividad de ALT, AST y LDH en la fase temprana postisquémica, por lo tanto, son considerados como biomarcadores clínicos relacionados con la citólisis, por ende, con la magnitud de daño cerebral y se han considerado como una herramienta clínica para pronosticar déficit neuromotor **(Chhavi et al., 2014, Kubo et al., 2017)**.

Papel de AST y ALT en el metabolismo del SNC

El metabolismo de las células del cerebro sistema nervioso central (SNC) adulto depende del aporte de glucosa, por otro lado, se ha reportado que la materia gris del cerebro neonatal mantiene una baja taza metabólica de glucosa, confiriéndole una capacidad relativa para soportar episodios de hipoxia letales comparados con el cerebro adulto **(Belanger et al., 2011, Brekke et al., 2015),** esto podría ser explicado debido a la activación de una reprogramación metabólica y su dependencia a otros sustratos como monocarboxilatos (lactato, piruvato, acetoacetato, acetato y β-hidroxibutirato) derivados del metabolismo de ácidos grasos y proteínas presentes en la leche materna **(Magistretti and Allaman, 2018, Margineanu et al., 2018, Tauffenberger et al., 2019)**.

Las células del SNC pueden utilizar otras fuentes de carbono como el glutamato y biotransformarlo rápidamente en glutamina a través de la enzima glutamina sintetasa (GS) o es interconvertido a glutamato (Glu) (il. 1, reacción 5) y dirigido al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) en el astrocito a través de la ALT (il. 1, reacción 3) **(Brekke et al., 2015)**. Algunos estudios indican que, en el cerebro neonatal, el astrocito posee baja capacidad de recaptura por el glutamato a pesar de expresar los transportadores de glutamato (GLT-1 y GLAST) en comparación al consumo de glutamina, sin embargo, tras detener la lactancia materna este proceso se invierte **(O'Kane et al., 1999, Hawkins and Vina, 2016, Pajarillo et al., 2019, Pajarillo et al., 2020)**.

El cerebro de rata muestra una alta tasa dinámica en el metabolismo de aminoácidos **(Benuck et al., 1971)**. Las AST y ALT son enzimas encargadas de la transferencia de grupos amino ($-NH_3^+$) entre un aminoácido y un cetoácido, sustratos involucrados en diferentes rutas metabólicas para mantener activo el TCA **(Amore and Bonavita, 1965)** o en la interconversión de metabolitos que participan en el neurodesarrollo del encéfalo inmaduro **(Benuck et al., 1971, Benuck and Lajtha, 1975)** y con ello proporcionar un soporte bioenergético **(Diab and Limami, 2016)**. Las transaminasas AST y ALT tienen una compartimentalización subcelular importante para el confinamiento del metabolismo de aminoácidos y moléculas anapleróticas **(Chandran et al., 2014, McCommis and Finck, 2015)**. Se ha demostrado que la síntesis de glutamato incrementa la actividad de las transaminasas dirigiendo el metabolismo celular a la síntesis de aminoácidos **(Benuck et al., 1971)**.

Primero, AST es la enzima encargada de catabolizar la reacción reversible de transferencia de grupos amino entre el aspartato (Asp) y el α-cetoglutarato (α-KG) a oxalacetato (OAA) y glutamato (Glu) **(Hafkenscheid and Dijt, 1979)** (*ec. 1*).

Ecuación 1. L-aspartato + α-cetoglutarato ⇆ L-glutamato + oxalacetato

La AST es expresada en una amplia variedad de tejidos y su función es regular los niveles de Glu celular **(Khanna et al., 2015)** (il. 1, reacción 2). La actividad enzimática de la AST también es regulada por la actividad de enzimas como glutamina sintetasa (GS) (il. 1, reacción 5) y glutaminasa (GLS) (il. 1, reacción 4) para llevar a cabo la interconversión hacia la glutamina (Gln) en el ciclo Glu-Gln y su posterior redireccionamiento a la producción de ácido γ-aminobutírico (GABA) (il. reacción 6) (*ciclo Glu-Gln-GABA*), lo cual hace considerar a AST como una enzima reguladora central en el metabolismo del Glu, participando en gran medida en la neuromodulación **(Schousboe et al., 2014)**. La cinética enzimática de AST en el cerebro depende de factores como la biodisponibilidad de los cetoácidos, del cofactor enzimático el fosfato de piridoxal (PLP), la concentración de O_2 tisular **(Bonavita et al., 1964)**, por lo que, episodios de H-I afectan significativamente su actividad. También, el zinc puede afectar la actividad enzimática de AST **(Takeda**

et al., 2003) debido a que forma parte estructural de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) encargada de la síntesis de GABA a partir de Glu **(Barbeau and Donaldson, 1974)** (il. 1, reacción 6).

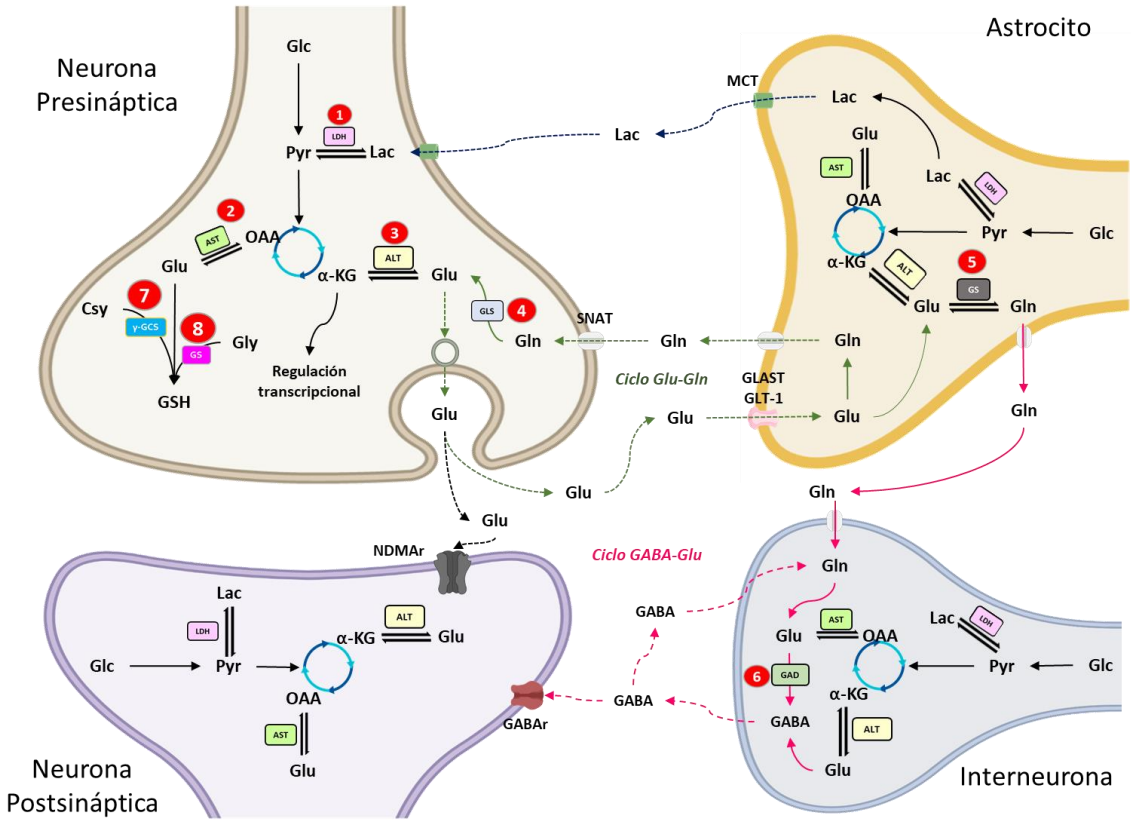


Ilustración 1. Interrelación de la actividad enzimática de las transaminasas (AST y ALT) y lactato deshidrogenasa (LDH) en el metabolismo celular.

Glc, glucosa; Pyr, piruvato; Lac, lactato; Cys, cisteína; Gly, glicina; Asp, aspartato; α-KG, α -cetoglutarato; OAA, oxalacetato; Ala, alanina; Gln, glutamina; GABA, ácido γ-aminobutírico; GSH, glutatión; AST, aspartato transaminasa; ALT, alanina aminotransferasa; LDH, lactato deshidrogenasa; GS, glutamina sintetasa; GLS, glutamina sintetasa; GAD, glutamato descarboxilasa; γ-GCS, sintetasa glutamil-cisteína; GS, glutatión sintetasa; SNAT, transportador de aminoácidos neutros; GLAST, transportador de aspartato/glutamato; GLT-1, transportador-1 de glutamato; MCT, transportador de monocarboxílatos; NDMAr, receptor a glutamato; GABAr, receptor a GABA. Modificado de ***Dienel et al., 2019***.

Segundo, ALT es la enzima que cataboliza la reacción reversible de transferencia de grupos amino entre alanina (Ala) y α-KG a piruvato (Pyr) y Glu (il. 1, reacción 3) **(Hafkenscheid and Dijt, 1979)** (*ec. 2*).

Ecuación 2. L-glutamato + piruvato ⇆ α-cetoglutarato + alanina

Al igual que AST, ALT muestra una expresión ubicua funcionando como un transportador del amonio en la interconversión del Glu entre la neurona y el astrocito. Incluso ALT utiliza intermediarios glucolíticos como el piruvato y alanina,

así como α-KG **(Schousboe et al., 2014)**. La tasa metabólica de ALT incrementa en la materia blanca espinal, mientras que en la materia gris hay una reducción del metabolismo cercano al 50 % del metabolismo basal y se ha reportado que la materia gris cortical presenta una alta taza metabólica de ALT **(Benuck et al., 1972)**.

Por su parte, la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) es la enzima encargada de la biotransformación reversible de Pyr a lactato (Lac) **(Rogatzki et al., 2015)** (*ec. 3*). El cerebro muestra una preferencia sutil entre el uso del lactato sobre la glucosa como una fuente de energía alternativa bajo condiciones de estrés celular **(Quistorff et al., 2008, Brooks, 2020)**. En el cerebro, el astrocito predominantemente forma lactato a partir de glucosa en respuesta a la actividad neuronal y contribuye en la modulación de la excitabilidad neuronal y la adaptación celular para mantener la homeostasis del sistema nervioso **(Magistretti and Allaman, 2018)**.

Ecuación 3. Piruvato ⇆ Lactato

La estimulación aguda en los astrocitos modifica su bioenergética celular incrementando el metabolismo glucolítico y con ello la formación de lactato como una molécula energética de relevo dirigida hacia a la neurona **(Yellen, 2018)**. La actividad enzimática de LDH es un importante regulador redox citosólico, debido a que la reacción de deshidrogenación depende de la oxido-reducción del NADH a NAD^+ (índice $NADH/NAD^+$) y que a su vez controla la sensibilidad del receptor NMDA al Glu y modula la permeabilidad del canal de Ca^{+2} **(Jourdain et al., 2018)**.

El lactato provee a las células madre neurales (NPC) de una fuente de energía **(Werner and Sicard, 1987)** que induce su migración **(Lev-Vachnish et al., 2019)** y diferenciación **(Shyh-Chang et al., 2013)**. El lactato tiene un papel importante en la activación neuronal **(Karagiannis et al., 2021)** durante diferentes etapas del desarrollo cerebral **(Rossignol et al., 2003, Medina and Tabernero, 2005, Valvona et al., 2016, Long et al., 2020)**. Además, el lactato puede inducir la síntesis de neurotransmisores (Glu) necesarios para la maduración de astrocitos y neuronas **(Llorente-Folch et al., 2016)**.

La H-I en los neonatos modifica la neuroquímica del cerebro alterando el perfil metabólico **(Sanchez-Illana et al., 2017, Koenig and Dulla, 2018)**. La baja actividad enzimática de la LDH está relacionada con la reducción en la activación neuronal **(Jourdain et al., 2018)**. Estudios previos reportaron que tras un proceso de H-I se eleva el porcentaje de proliferación celular de forma local **(Lee et al., 2018)**, a través de la modificación en el metabolismo celular **(Majmundar et al., 2010)**. Sin embargo, solo un bajo porcentaje de esas células sobreviven **(Lichtenwalner and Parent, 2006)**, esto podría deberse a que la proliferación es un proceso energéticamente demandante, por lo que las neuronas maduran podrían establecer comunicación deficiente con otras neuronas **(Romero-Garcia et al., 2016, Grist et al., 2018)**.

El zinc y la taurina como estrategias farmacológicas alternativas para contrarrestar el daño cerebral causado por el proceso hipóxico-isquémico

El zinc es el segundo mineral más abundante en el cuerpo humano. Este biometal tiene un amplio espectro de actividad, forma parte estructural de proteínas como las metalotioneínas que colaboran en la desintoxicación por metales pesados **(DeMoor et al., 2001, Krezel and Maret, 2017)** y enzimas como la Superóxido dismutasa Cu-Zn (CuZnSOD o SOD1) o para contrarrestar el daño oxidativo en enfermedades degenerativas **(Valentine et al., 2005, Rodriguez-Rocha et al., 2013, Altobelli et al., 2020)**, hasta formar parte de factores de transcripción como en la estructura de dedos de zinc (ZFP637, SLUG, ZNF750, ZNF281, ZBP89, GLIS1, GLIS3) involucrados en la división y desarrollo celular **(Cassandri et al., 2017)**.

Los estudios referentes al papel del zinc en modelos de daño isquémico cerebral han mostrado resultados controversiales, esto puede deberse a la etapa de estudio en la isquemia, por lo que se ha otorgado un efecto dual a este mineral **(Qi and Liu, 2017)**. Mientras que, los niveles bajos de zinc están relacionados con la magnitud de daño neurológico, tanto en pacientes adultos como en neonatos **(Bhatt et al., 2011, Foley et al., 2016)**.

Por su parte, la taurina es capaz de inducir una respuesta antioxidante **(Schaffer et al., 2009, Jong et al., 2012)**, permitiendo incrementar la actividad enzimática de sistemas como la SOD, glutatión peroxidasa (GPx) y los niveles de glutatión reducido (GSH) (il. 3) **(Yu and Kim, 2009)**. Además, la taurina ha sido utilizada como un agente neuroprotector con gran potencial para evitar el desarrollo del daño cerebral isquémico **(Shuaib, 2003, Zhu et al., 2016)** o hemorrágico **(Jin et al., 2018)**.

Papel del zinc en el sistema nervioso central

El zinc (Zn) es un elemento traza esencial, está fuertemente involucrado en el funcionamiento cerebral. El Zn puede encontrarse en dos formas biológicas: unido a proteínas (enzimas o factores de transcripción) o libre (Zn^{2+}) **(Choi et al., 2020)**. Los dedos de zinc representan una de las formas del Zn unido a proteínas con mayor peso en la regulación transcripcional. También participa como cofactor enzimático en las histonas desacetilasas (HDACs), ADN polimerasa (ADN pol) y ARN polimerasa (ARN pol) durante la división celular **(Wu and Wu, 1987, Wu et al., 1992)**. Las neuronas con alto contenido de Zn **(Aizenman et al., 2000)** lo compartimentalizan en vesículas glutamatérgicas, por lo que, también estas neuronas son llamadas "zincérgicas" **(Frederickson, 1989)**, las cuales se encuentran altamente distribuidas en regiones como la amígdala, bulbos olfatorios, corteza cerebral e hipocampo, este último ha mostrado contiene el reservorio de Zn más importante del cerebro **(Choi et al., 2020)**.

El Zn cuenta con una actividad neuromoduladora, de tal modo que la liberación sináptica de Zn puede inducir la inactivación de los receptores NMDA y AMPA (ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico) durante la estimulación neuronal evocada por potenciales de acción **(Westbrook and Mayer, 1987, Mayer and Vyklicky, 1989, Smart et al., 1994, Bitanihirwe and Cunningham, 2009, Nakashima and Dyck, 2009)** (il. 2). También se ha demostrado que el Zn es capaz de regular la apertura del canal en el receptor $GABA_A$ **(Westbrook and Mayer, 1987, Draguhn et al., 1990, Tabata and Ishida, 1999)**. Incluso, el Zn sináptico puede modificar la excitabilidad neuronal al afectar el

funcionamiento de canales iónicos dependientes de voltaje **(Weiss et al., 1993, Koh et al., 1996, Sensi et al., 1999)** (il. 2). Adicionalmente, el Zn puede incrementar la actividad del cotransportador de K^+/Cl^- (KCC) (il. 2), un canal importante para regular la actividad eléctrica de la membrana neuronal durante la migración y diferenciación celular **(Mero et al., 2019)**.

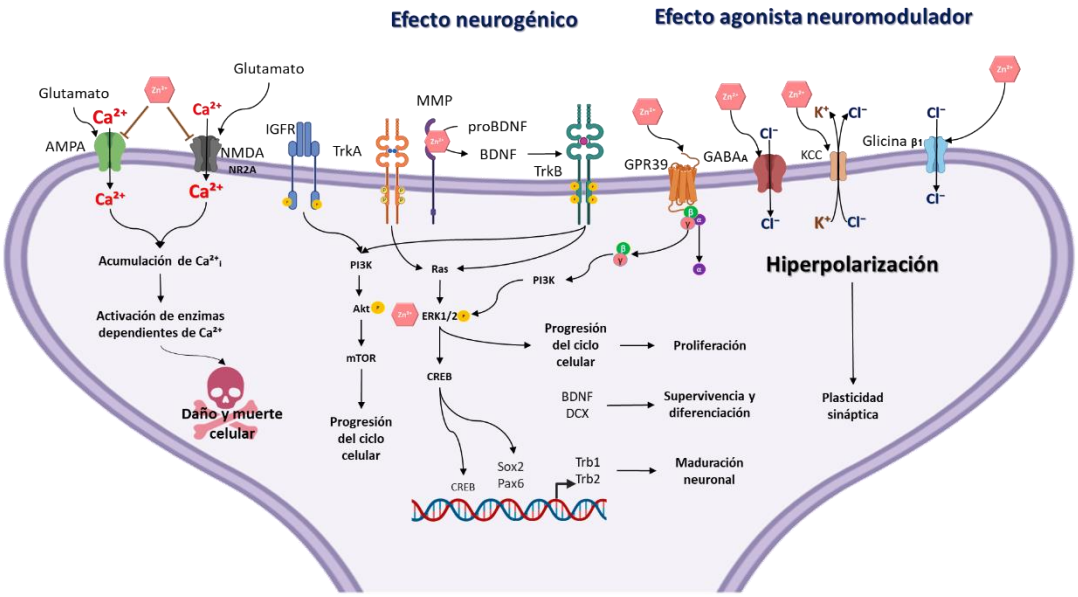


Ilustración 2. Representación de los mecanismos que induce el zinc para ejercer su efecto neurogénico y neuromodulador.

$Ca^{2+}i$, calcio intracelular; IGFR, receptor del factor de crecimiento; TrkA, cinasa A del receptor de tropomiosina; MMP, Metaloproteinasa de matriz extracelular; proBDNF, precursor del factor de crecimiento de derivado del cerebro; BDNF, factor de crecimiento de derivado del cerebro; DCX, doblecortina; TrkB, cinasa B del receptor de tropomiosina; Ras, proteína activada por GTPasas; PI3K, cinasa inositol-3-fosfatoAkt, cinasa de treonina y serina; mTOR, objetivo biológico de la cinasa rapamicina; Ras, reguladores de señales de transducción; ERK1/2, cinasa activada por señales extracelulares 1 y 2; CREB, proteína de unión al elemento de respuesta sensible para cAMP; Sox2; Factor de transcripción SRY-Box 2; Pax6, Caja 6 emparejada; Trb1; Proteína del gen 2 inducida por receptor acoplado a proteína G; Trb2, Tribbles homólogo 2; NMDA(NR2A); subunidad NR2A del receptor NMDA; AMPA, receptor afín al ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico; $GABA_A$, KCC, cotransportador de potasio/cloruro (K^+/Cl^-); subunidad A del receptor afín a GABA; Glicina (β1), subunidad β1 del receptor afín a glicina; Zn/GPR39, Receptor 39 acoplado a proteínas G sensible a Zn.

El Zn es esencial para conservar y mejorar la salud cognitiva, donde la dinámica sináptica del zinc es gobernada por sus transportadores (ZnT) (il. 3). La represión del gen *Slc30a3* que codifica para el transportador 3 de zinc (ZnT3) promueve el daño celular en el hipocampo **(Doering et al., 2010),** lo que conduce al desarrollo de padecimientos neurológicos **(Adlard et al., 2010)**. El Zn induce la expresión del gen *Zfp423*, que codifica a más de 30 factores de transcripción dependientes de este metal, los cuales están involucrados en las vías de

transducción de señales de crecimiento celular y neurogénesis **(Casoni et al., 2017)**.

Las neuronas glutamatérgicas poseen la maquinaria proteica para el almacenaje, distribución y liberación del Zn durante procesos como la defensa antioxidante, transcripción, división celular y comunicación neuronal **(Hasna et al., 2019)**. El Zn es capaz de dirigir la dinámica de proteínas del citoesqueleto incrementando la comunicación neuroquímica en la sinapsis **(Hsieh-Wilson, 2018)**, también colabora en la activación de vías de señalización de MAPK (protein-cinasa activadas por mitógenos) asociadas con el desarrollo celular, extensión y mantenimiento de neuritas en el hipocampo **(Sanford et al., 2019)** y en la corteza cerebral (il. 2) **(Adamo and Oteiza, 2010, Adamo et al., 2010)**.

El Zn ejerce una acción de forma indirecta en diferentes cascadas de señalización. Se ha descrito un receptor que interactúa con el Zn, así como su función celular. El receptor acoplado a proteínas G sensible a Zn (ZnR/GPR39) tiene un papel importante sobre la fisiología de células epiteliales y neuronales. De hecho, el ZnR/GPR39 está encargado de regular el tono inhibitorio neuronal, debido a ello, la deficiencia de Zn está fuertemente relacionada con el incremento en la frecuencia de crisis epilépticas y convulsivas **(Cohen et al., 2012, Asraf et al., 2014, Sunuwar et al., 2017)**. La activación del ZnR/GPR39 puede trabajar de forma colaborativa con MAPK, la cinasa inositol-3-fosfato (PI3K) y con las cinasas activadas por señales extracelulares (ERK1/2) incrementando el número de procesos celulares en los que el Zn participa (il. 2) **(Chang et al., 2003, Abramovitch-Dahan et al., 2016)**.

El Zn ejerce un efecto sobre la actividad del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-1) y del factor de crecimiento nervioso (NGF). Los niveles de Zn están directamente relacionados con los niveles de IGF-1 a nivel sérico en humanos, por lo que la deficiencia de Zn reduce considerablemente procesos celulares dependientes de IGF-1 **(Dorup et al., 1991)**. La unión de IGF-1 con su receptor (IGFR) conduce a la activación de la vía de señalización que inicia con la autofosforilación de residuos en el dominio intracelular del receptor **(MacDonald,**

2000, Beyersmann and Haase, 2001, Goto et al., 2009). Recientemente, se ha demostrado que el Zn puede evitar la desfosforilación de estos residuos para mantener activa la señalización de IGF-1. El Zn forma parte estructural del factor de crecimiento nervioso 7S (NGF-7S) y en el hipocampo se ha reportado una importante actividad neurotrófica dependiente de NGF involucrado en el desarrollo celular de este (il. 2) **(Stewart et al., 1984)**.

La migración neuronal requiere la modificación de la membrana basal a través de la actividad de las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP), un conjunto de enzimas dependientes de zinc **(Bovetti et al., 2007)**. Las MMP3 y MMP9 están involucradas en la migración de neuroblastos en la vía migratoria rostral **(Barkho et al., 2008)**.

El Zn puede estimular la neurogénesis al regular genes involucrados en la proliferación y diferenciación neuronal en diferentes etapas del desarrollo cerebral **(Dvergsten et al., 1984, Gower-Winter et al., 2013)**, al mismo tiempo puede dirigir la diferenciación dependiente de ácido retinoico (AR) e inhibe la apoptosis **(Adamo et al., 2010, Gower-Winter et al., 2013)**. El Zn colabora en la activación de las vías de señalización de la hormona de crecimiento (GH) y de IGF-1, coactivando a Akt **(MacDonald, 2000, Beyersmann and Haase, 2001, Goto et al., 2009)**, la cual depende a su vez de IGF-1 para regular a ciclinas y Cdks para coordinar la transición de G1/S y G2/M en la mitosis **(Chang et al., 2003)**. Debido a esto, la deficiencia de Zn impide la progresión del ciclo celular debido a perturbaciones en la síntesis de ADN y del crecimiento celular **(Ahmed et al., 1997, Alt et al., 2000, Gartel and Shchors, 2003)**, además de permitir el aumento de la apoptosis **(Adamo et al., 2010)**.

La corteza cerebral en ratas tiene un lapso de desarrollo crítico durante el periodo embrionario, favorecida la hiperplasia celular (inicia en el E10 y se mantiene hasta el E17) **(Gotz and Huttner, 2005)** y dependiente de factores como el zinc **(Nuttall et al., 2015, Adamo et al., 2019)**. Una dieta con el aporte inadecuado de Zn causa la reducción de los niveles de Zn séricos y reduce cerca de la mitad la tasa de proliferación de NPCs **(Corniola et al., 2008)**. En sujetos con

hipozinquemia, la recuperación de los niveles de Zn puede prevenir alteraciones en la actividad de p53, al regular genes del ciclo celular (especialmente de las fases G1 y S) **(Gao et al., 2009, Suh et al., 2009)**. Mientras, que el aporte adecuado de Zn durante el embarazo ayuda a mantener la proliferación celular en la zona ventricular del hipocampo. El Zn promueve la proliferación de células precursoras neurales (NPCs), así como la diferenciación de células madre mesenquimales (MSCs) derivadas de adipocitos a neuronas **(Moon et al., 2018)**, este efecto puede ser atribuido al que evita la desfosforilación de ERK1/2 debido a la reducción en la actividad enzimática de las fosfatasas **(Nuttall et al., 2015)**. En el desarrollo embrionario, el Zn incrementa la activación de MAPK, JNK y p38 **(Nuttall and Oteiza, 2012, Nuttall et al., 2015)**, mientras que la activación de ERK1/2 dependiente de Zn incrementa los niveles de factores de transcripción clave (Sox2, Pax6, Trb1 y Trb2) en la maduración neuronal en la corteza e hipocampo (ilustración 2) **(Adamo et al., 2019)**. También, el Zn regula los niveles de doble-cortina (DCX), un marcador de transcripción fundamental en la diferenciación neuronal. Se ha demostrado que el Zn participa en la ramificación neuronal, por lo que, se ha propuesto asignarle un papel neurogénico al Zn **(Gao et al., 2009)**.

El Zn está involucrado en el desarrollo de sistemas neurológicos encargados de procesar estímulos auditivos. La liberación de zinc regula la neurotransmisión en regiones vestibulares dedicadas a la recepción y procesamiento de sonido **(Hsieh-Wilson, 2018)**.

Mientras que la deficiencia de Zn es un factor fuertemente asociado al inicio de síntomas tempranos en procesos neuropatológicos relacionados con la edad **(Portbury et al., 2018)**. La neuroinflamación promueve la neurodegeneración y provoca una alteración en la homeostasis del Zn conduciendo a la regulación negativa de proteínas relacionadas con la comunicación sináptica **(Portbury et al., 2018)** reportado en desordenes psiquiátricos **(Gronli et al., 2013)**.

Actualmente se está evaluando el efecto protector de diversas formas de Zn para utilizarlo como un agente terapéutico. La exposición a cultivos celulares con nanopartículas de CdTe/ZnS induce la polarización de la microglía al fenotipo M1

causando neuroinflamación **(He et al., 2020)**. Mientras que la administración intravenosa de las nanopartículas de CdTe/ZnS induce la polarización hacia ambos fenotipos (M1 y M2), acompañado del deterioro neuronal en el hipocampo **(Wu et al., 2020)**.

Papel del zinc en el metabolismo celular

El metabolismo cerebral depende en gran medida de la tasa glucolítica aeróbica. El Zn puede alterar el metabolismo celular, la exposición de nanopartículas de CdTe/ZnS inducen la polarización de la microglía al fenotipo M1 causada por una reprogramación metabólica en la fosforilación oxidativa dirigida por mTOR **(Wu et al., 2020)**.

El Zn parece tener un efecto indirecto sobre el metabolismo celular, se ha reportado que es capaz de regular la expresión del complejo acarreador de piruvato (MPC) para reestablecer la eficiencia del metabolismo mitocondrial del piruvato y la fosforilación oxidativa. Otra forma en la que el Zn impacta en el metabolismo celular es a través de la regulación del coactivador receptor-gamma activado por proliferación de peroxisoma 1α (PGC1α) y el homólogo de la proteasa Lon 1 (Lonp1) lo que conduce al incremento de la biogénesis mitocondrial restableciendo el metabolismo de carbohidratos y lípidos, a la par de este proceso se mantiene activa a la Cinasa 1 de la Piruvato deshidrogenasa (PDK1) evitando así la desfosforilación de Akt, lo cual evita la reducción de la viabilidad celular ante un estímulo estresor *in vitro* **(Yang et al., 2017)**. Por otro lado, se ha demostrado que el Zn incrementa la activación del factor homeobox 1 (ZEB1), una molécula que favorece la unión de la caja E en el ADN con factores de transcripción con estructura de dedo de zinc para disminuir la invasión celular *in vitro* **(Maciaczyk et al., 2017)**.

Se ha reportado que el manganeso ejerce un efecto importante sobre el metabolismo y movimiento del Zn intracelular. La deficiencia de *SLC39A8* (transportador de zinc 8, ZIP8) puede causar desorden congénito de glicosilación (CDG) tipo II y síndrome semejante a Leigh debido a la reducción de expresión de enzimas que dependen de la presencia de manganeso (β-galactosiltransferasa y la superóxido dismutasa mitocondrial), por lo que se ha propuesto a la administración

conjunta de manganeso y zinc como una tratamiento alternativo para contrarrestar la descompensación de Zn celular causada por la deficiencia de *SLC39A8* **(Riley et al., 2017)**.

En el cerebro, la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) es una metaloproteína dependiente de zinc. Por lo tanto, el consumo celular de zinc impacta en el metabolismo y neuroquímica de GABA en el hipocampo **(Barbeau and Donaldson, 1974)**. La deficiencia de Zn incrementa el metabolismo de glutamato en los botones sinápticos, esto ha sido asociado al aumento en la frecuencia de crisis epilépticas en sujetos, lo que incrementa el daño celular por excitotoxicidad **(Suarez et al., 2016)**.

Papel del zinc en la actividad antioxidante y antiinflamatoria ante un proceso de daño celular

El Zn ha mostrado ejercer un efecto neuroprotector a través de la administración profiláctica con zinc en la corteza e hipocampo al prevenir el incremento del estrés nitrosativo y la muerte celular (vía caspasa 3) **(Blanco-Alvarez et al., 2013)**, también incrementa la respuesta antioxidante mediada por la SOD y GPx ante un proceso isquémico en ratas adultas **(Tomas-Sanchez et al., 2018)**. El zinc puede unirse al factor de transcripción dependiente de metales-1 (MTF-1) y a través de la vía Nrf-2 regular positivamente la expresión de la *Sod1* (Superóxido Dismutasa 1) **(Fullerton et al., 1998, Li et al., 2013)** y la *Gcl* (Glutamilcisteína ligasa), ambas son enzimas clave para mantener activos mecanismos de defensa antioxidante (il. 3) **(Eide, 2011)**.

Por otra parte, se ha demostrado que el Zn es capaz de modular la expresión del receptor Erbb2 al mantener la fosforilación de Akt, favoreciendo la supervivencia y proliferación celular (il. 2) **(Viswanath et al., 2011)**. El Zn reduce la excitotoxicidad mediada por glutamato a través de la modulación del receptor NMDA y con ello evita el incremento de la muerte celular (il. 3) **(Weglicki et al., 2011)** ante estímulos oxidantes en cardiomiocitos **(Korkmaz-Icoz et al., 2016)**. Mientras que en células progenitoras endoteliales permite la neovascularización para favorecer la restauración del daño causado por isquemia **(Groleau et al., 2010).**

El Zn es capaz de ejercer un efecto antiinflamatorio al mediar la expresión de genes inflamatorios dependientes de la vía NF-κB **(Chen and Chen, 2016)**. La interacción de zinc con la proteína A20 evita la activación de la vía de TNF-α **(Yamaguchi and Yamaguchi, 2015, Gammoh and Rink, 2017)** lo que permite la reducción de la respuesta inflamatoria, disminuyendo la reactividad de neutrófilos y macrófagos (il. 3) **(Marreiro et al., 2017)**.

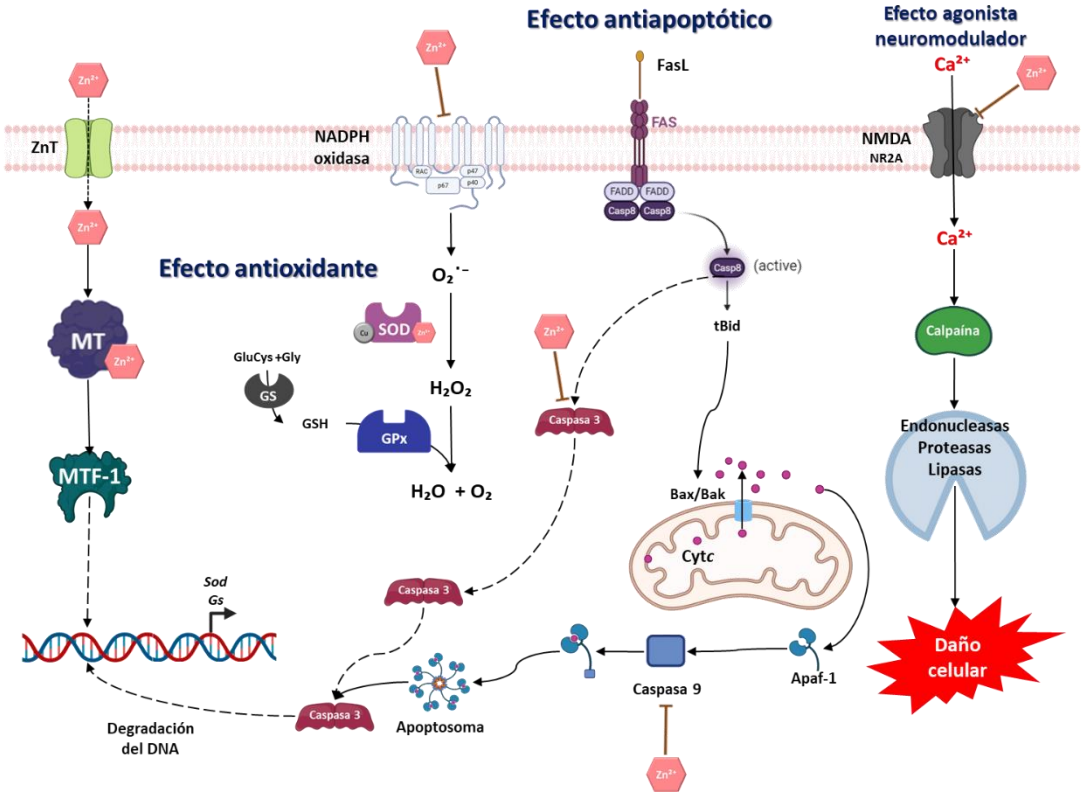


Ilustración 3. Representación de los mecanismos que induce el zinc para ejercer su efecto antioxidante, antiapoptótico y neuromodulador.

ZnT, Transportador de zinc; Zn^{2+}, zinc iónico; MT, metalotíoneina; MTF-1, factor de transcripción 1 de metales; $O_2^{\cdot-}$, anión superóxido; SODCuZn, superóxido dismutasa cobre-zinc; GluCys, glutamil-cisteína; Gly, glicina; GS, glutatión sintetasa; GSH, glutatión reducido; GPX, glutatión peroxidasa; H_2O_2, peróxido de hidrógeno; H_2O, agua; O_2, oxígeno; FasL, ligando Fas; FAS, receptor de Fas; FADD, dominio de muerte asociada a FAS; Casp8, caspasa 8; tBid, ligando de muerte dirigido a la membrana; Bax, regulador de apoptosis vía BCL2 asociado a X; Bak, BCL2 Antagonista/Asesino 1; Cytc, citocromo *c*; Apaf-1, Factor activador de peptidasa apoptótica 1; DNA, ácido desoxirribonucleico; Ca^{2+}, calcio iónico; $NMDA_{NR2A}$, subunidad NR2A del receptor NMDA. Tomado y modificado de ***(Vitvitsky et al., 2011)*.**

En un modelo de inflamación inducido por lipopolisacárido (LPS), la administración con zinc promovió la recuperación de la locomoción a través de la disminución de los niveles de corticosterona y norepinefrina (NE) **(Galvao et al.,**

2015). Mientras que, ante un proceso H-I en ratas adultas, el zinc favorece el incremento de factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 y el factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 (IGF-1 y FGF2), así como del ligando 2 de quimiocina con dominio CC y su receptor (CCL2-CCR2), previniendo la pérdida de procesos cognitivos **(Blanco-Alvarez et al., 2015)**.

El Zn induce la expresión del gen *Arc* (gen de respuesta temprana) y que a su vez está relacionado con comportamientos que evocan actividad neuronal y potencian el desarrollo de las habilidades motoras **(Wang et al., 2014)**. Además, a nivel periférico se ha demostrado que el dominio POZ (una proteína dedo de zinc) interactúa con Myc (Miz1) para mantener activos a c-Jun, Sox2 e Id2 en células de Schwann y colaborar en el mantenimiento de la mielinización **(Sanz-Moreno et al., 2015)**.

Papel de la taurina en el sistema nervioso central

La taurina (ácido 2-amino-etanosulfónico) es un β-aminoácido modificado no esencial con un grupo sulfuro (SO_3^-) en sustitución del grupo carboxilo (CO_2^-), por lo que es considerado como un pseudoaminoácido. Su producción deriva del metabolismo oxidativo de la metionina y cisteína (aminoácidos azufrados) **(Ueki and Stipanuk, 2007)** (il. 4). La fuente más importante de ambos aminoácidos proviene de una dieta rica en pescado, huevo, etc. En el cuerpo existe un reservorio importante de taurina distribuido y compartimentalizado en hígado y músculo esquelético principalmente. El cerebro cuenta con las enzimas necesarias para llevar a cabo la síntesis de taurina, su producción se encuentra regulada por las enzimas cisteico/ácido sulfónico cisteína descarboxilasa (CAD/CSAD) (il. 4), las cuales se localizan en las dendritas de terminales nerviosas **(Wu et al., 1979, Chan-Palay et al., 1982a, Chan-Palay et al., 1982b, Wu, 1982, Lin et al., 1985); (Magnusson et al., 1988).**

La suplementación de taurina durante la gestación incrementa los niveles de taurina en sangre, músculo, hígado y cerebro de las ratas hembra **(Sturman et al., 1977, Stipanuk et al., 1984)**. Además, el cerebro fetal muestra el incremento de la concentración de taurina, por lo que se ha considerado que la taurina juega un papel

importante en el desarrollo del cerebro inmaduro **(Sturman, 1993)**. La hipotaurina, otro producto del metabolismo oxidativo de la cisteína **(Shen et al., 2021)**, junto con la taurina muestra una potente actividad neuromoduladora en el desarrollo cerebral al actuar sobre la actividad de los receptores $NMDA_{NR2B}$, $GABA_B$ de $Gly_{\alpha 1}$ (il. 5) **(Kilb and Fukuda, 2017)**. El consumo de taurina en mamíferos inmaduros depende directamente del aporte lácteo, por lo que el consumo suficiente de aminoácidos azufrados o en su defecto del suplemento de taurina directo durante la gestación y la lactancia, permite mantener los niveles óptimos de taurina para el desarrollo tisular **(Stipanuk et al., 1984)**.

La taurina es una molécula neuroactiva endógena que muestra una importante función trófica **(Rak et al., 2014)**. La concentración en el sistema nervioso central de taurina es alta en el desarrollo temprano de roedores, y está relacionada con la modulación de redes neuronales y refinamiento celular en corteza cerebral y en el cerebelo **(Oja and Saransaari, 2013)**. La taurina es capaz de atravesar la BHE **(Pow et al., 2002)** con ayuda del transportador de taurina (TauT) (il. 5) **(Stummer et al., 1995)**. La suplementación con taurina está relacionada con el incremento en la capacidad proliferativa de células precursoras neurales (NPC) **(Hernandez-Benitez et al., 2010)**, su diferenciación **(Hernandez-Benitez et al., 2012)** y maduración **(Hernandez-Benitez et al., 2013)**, también optimiza el crecimiento y la proliferación de las células cerebrales fetales en humano e incrementa la supervivencia de las neuronas y la extensión de neuritas **(Chen et al., 1998)**. Además, la suplementación prenatal con taurina incrementa la proliferación de células madre neurales en ratas con restricción del crecimiento intrauterino, al inhibir la actividad de los factores de la familia Rho **(Wang et al., 2018)**. Por su parte, la dieta nula en taurina en cachorros gato causó la alteración en el patrón de migración en la corteza cerebelar y visual **(Sturman, 1993)**.

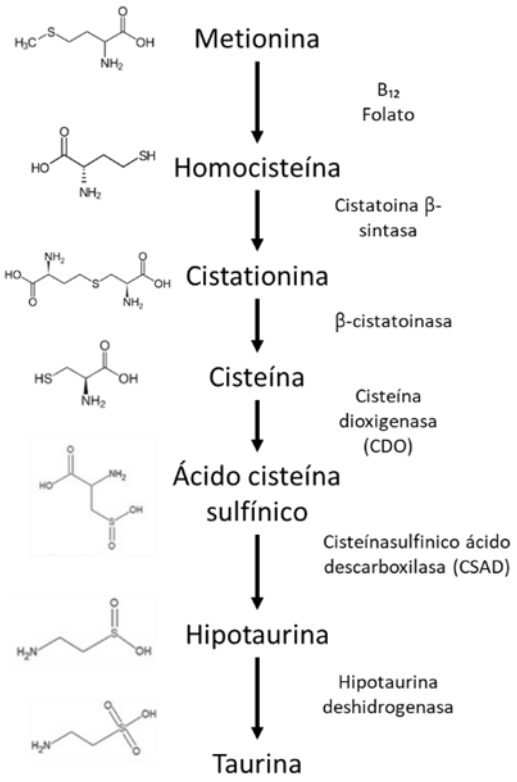


Ilustración 4. Ruta de síntesis de la taurina en el cerebro.

Tomado y modificado de **(Vitvitsky et al., 2011)**.

En el cerebro, la liberación de taurina depende de las fluctuaciones en las concentraciones de Ca^{2+} provocadas por la actividad neuronal en el cerebelo y la corteza cerebral **(Lin et al., 1985)**. Comparte gran similitud estructural con neurotransmisores como el GABA y la Gly **(Smith and Li, 1991)** por lo que presenta una alta afinidad por el receptor $GABA_B$ en el cerebelo (il. 5) **(Okamoto et al., 1983)** e hipocampo donde es capaz de inducir el incremento en la hiperpolarización **(Taber et al., 1986)**.

La taurina osmorregula principalmente a Na^+ y Ca^{2+}. La taurina modula la actividad de la N-metiltransferasa de fosfolípidos en la membrana incrementando la salida de Ca^{2+} a través del cotransportador Na^+/Ca^{2+} (il. 5) **(Hamaguchi et al., 1991)**. Las perturbaciones en las concentraciones intracelulares de $[Na^+]_i$ y $[Ca^{2+}]_i$ causadas por la excitotoxicidad inducida por glutamato, sobreestimula la actividad del cotransportador de membrana Na^+/Ca^{2+} permite la desestabilización en la fluidez membrana celular **(Takuma et al., 1994)**. La taurina regula los niveles de Ca^{2+} al

actuar sobre el cotransportador de Na^+/Ca^{2+} e impulsar la expulsión de Ca^{2+} (il. 5) **(Schaffer et al., 2003)** así como al inhibir canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VGCC) como los tipo L-, N-, y P/Q a nivel extracelular para regular los niveles de Ca^{2+} **(Leon et al., 2009)** y en el retículo endoplásmico **(Raghu et al., 1982)**.

El daño traumático cerebral (TBI, por sus siglas en ingles Traumatic Brain Injury) o la isquemia cerebral interrumpen el funcionamiento de diferentes mecanismos de membrana que conducen a estrés osmótico **(Haskew-Layton et al., 2008)**. El desbalance hidroelectrolítico es potenciado por la disfunción del cotransportador de Na^+/Ca^{2+}, el canal de K^+ dependiente de ATP, VGCC tipo L y canales rápidos de Na^+ **(Schaffer et al., 2000)**. La taurina puede contrarrestar el estrés osmótico al regular el movimiento de Na^+ K^+ y Ca^{2+} ayudando a recuperar la permeabilidad de la membrana celular (il. 5) **(Leon et al., 2009)**. Incluso, en la intoxicación por cadmio se ha reportado una fuga descontrolada de taurina a través del canal de osmolitos aniones orgánicos sensible a volumen (VSOAC), esto lleva a la alteración en la concentración de Ca^{2+} que estimula la activación de mecanismos de daño celular dependientes de Ca^{2+} **(Haskew-Layton et al., 2008)**.

Los episodios de estrés causan un incremento en la excreción de taurina urinaria correlacionado con el aumento en los niveles de 17-hidroxicorticoesteroides **(Barbeau et al., 1975)**. De hecho, tras un proceso isquémico se ha demostrado que disminuye drásticamente la concentración de taurina y otros osmolitos en el cerebro, lo cual podría estar relacionado con el comienzo del desbalance hidroelectrolítico causante de edema excitotóxico **(Haskew-Layton et al., 2008)**. Los primeros trabajos con taurina sugerían que la presencia del grupo sulfuro (SO_3^-) podría influir en la disponibilidad de Ca^{2+}, Mg^{2+} y otros metales divalentes actuando como un agente quelante para contener la movilización de éstos **(Muramatsu et al., 1978, Ohkuma et al., 1981)**. Actualmente se conoce que la taurina tiene acción osmorreguladora **(Trachtman et al., 1990, Schaffer et al., 2000)** al mediar las corrientes de K^+, Na^+ y Ca^{+2} dependientes o no de voltaje **(Shustova et al., 1986, Mozaffari and Schaffer, 2002, Schaffer et al., 2002)**. La sobreestimulación neuronal incrementa la actividad sináptica dentado-hipocampal, la taurina puede

ejercer un efecto neuromodulador, por lo que, la taurina ha sido considerada como una molécula con potencial terapéutico en padecimientos neurológicos **(Sturman et al., 1981, Suarez et al., 2016)**.

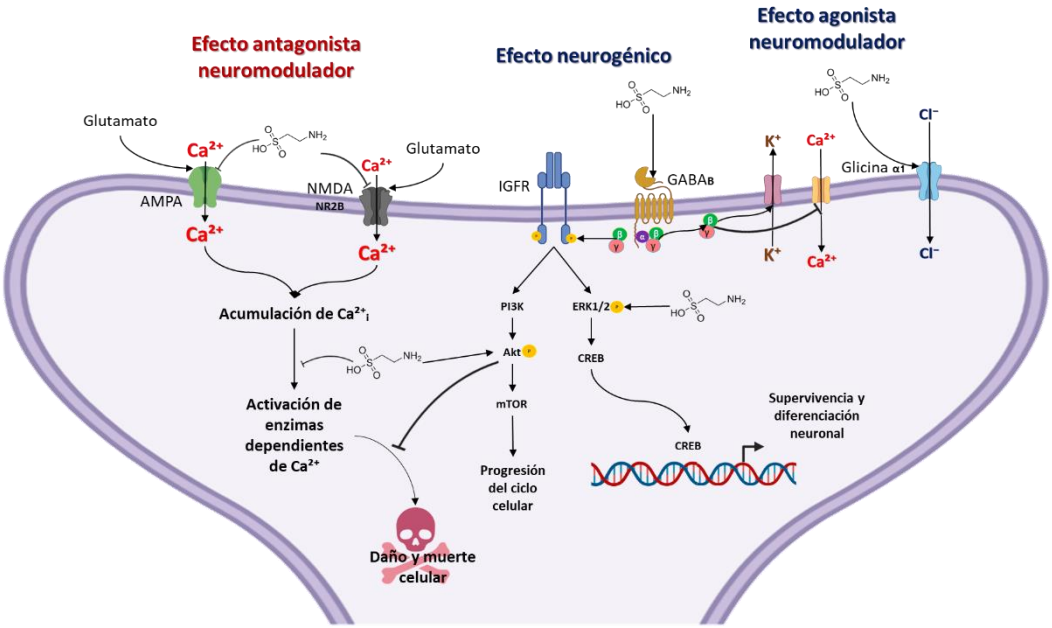


Ilustración 5. Representación de los mecanismos que induce la taurina para ejercer su efecto neurogénico y neuromodulador.

$Ca^{2+}i$, calcio intracelular; IGFR, receptor del factor de crecimiento; PI3K, cinasa inositol-3-fosfato; Akt, cinasa de treonina y serina; mTOR, objetivo biológico de la cinasa rapamicina; ERK1/2, cinasa activada por señales extracelulares 1 y 2; CREB, proteína de unión al elemento de respuesta sensible para cAMP; $NMDA_{NR2B}$; subunidad NR2B del receptor NMDA; AMPA, receptor afín a al ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico; $GABA_B$, subunidad B del receptor afín al GABA; KCC, cotransportador de potasio/cloruro (K^+/Cl^-); Glicina (β1), subunidad β1 del receptor afín a glicina; Zn/GPR39, Receptor 39 acoplado a proteínas G sensible a Zn. *Tomado y modificado de* ***Prentice et al., 2017a.***

La AP en recién nacidos incrementa los niveles de aspartato, glutamato y taurina en el líquido cefalorraquídeo **(Prentice et al., 2017a)**, causando la sobreestimulación de regiones cerebrales con alta densidad de receptores NMDA, lo que conduce a la extensión del daño cerebral **(Gucuyener et al., 1999)**. Este mismo fenómeno se ha reportado en estudios *in vitro* **(Prentice et al., 2017b)**. La taurina permite la reducción del volumen de infarto cerebral y atenúa la lesión tisular al aumentar la actividad enzimática de la SOD y la GPx **(Zhu et al., 2016)** e inhibe la apoptosis inducida por la isquemia en cardiomiocitos de rata neonatal **(Takatani et al., 2004).**

Papel de la taurina en el metabolismo celular

La taurina se encuentra en alta concentración en el cerebro del recién nacido y la obtiene a partir de la leche materna que contiene de 45 a 50 mg/dL **(Chesney et al., 1998)**. Sin embargo, los neonatos prematuros muestran una reducción en la actividad de la β-cistationasa, enzima determinante que cataliza la formación de cisteína a partir de la metionina para producir taurina (il. 4) **(Stipanuk and Rotter, 1984)**.

El metabolismo de la taurina puede verse afectado por el Zn. La deficiencia de Zn conlleva a la alteración del metabolismo de precursores de la taurina (metionina, cistationina y cisteína) conduciendo a la disrupción en la naturaleza excitatoria/inhibitoria en el cerebro, incluso se observó un incremento en la excreción de taurina a nivel renal en ratas de 1 mes de edad **(Wallwork and Sandstead, 1983)**. Mientras que se ha demostrado, que la administración de taurina reestablece los niveles de este pseudoaminoácido en plasma e hipocampo **(Lallemand and De Witte, 2004)**.

El metabolismo celular se modifica y la fosforilación oxidativa es regulada positivamente tras el nacimiento. La taurina juega un papel clave en el funcionamiento del metabolismo mitocondrial **(Mortensen et al., 2010)**, contribuye al desarrollo de la función de la cadena respiratoria después del nacimiento **(Shimada-Takaura et al., 2017)**. Un estudio reveló que las mitocondrias de neonatos con deficiencia de taurina muestran una reducción en el funcionamiento del complejo I de la CTE **(Gibson et al., 2008, Rikimaru et al., 2012)**. Además, la suplementación con taurina materna previene parcialmente el daño oxidativo inducido por la diabetes tanto en la madre como en embriones **(Shivananjappa and Muralidhara, 2012, Li et al., 2015)** y reduce la apoptosis neuronal en ratas fetales a través de un aumento del índice de Bcl-2/Bax y una disminución de la expresión de caspasa-3 **(Liu et al., 2012a).**

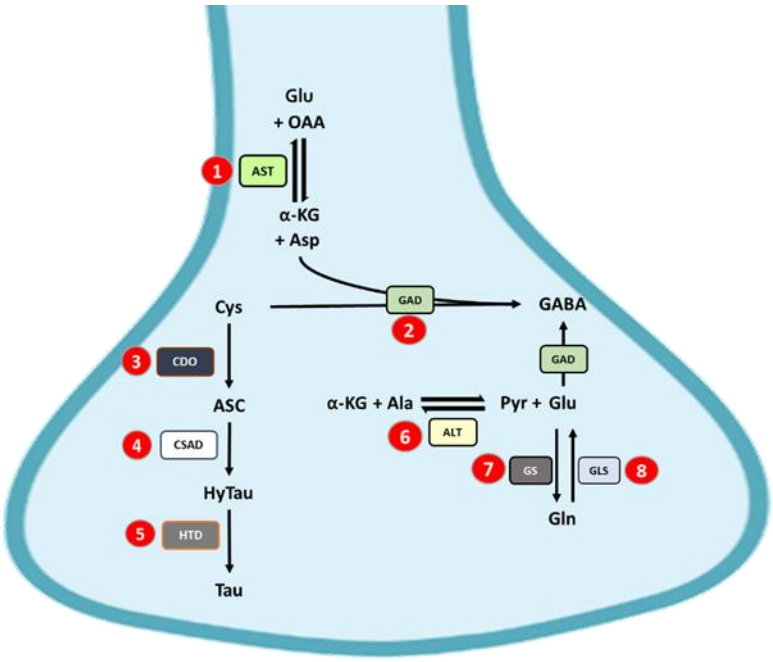


Ilustración 6. Interrelación entre la ruta te síntesis de la taurina y el ciclo glutamato-glutamina-GABA en el cerebro.

Cys, cisteína; ASC, ácido sulfínico cisteína; HyTau, hipotaurina; Tau, taurina; Asp, aspartato; Gln, glutamina; Glu, glutamato; GABA, ácido γ-aminobutírico. CDO, cisteína dioxigenasa; CSAD, ácido sulfónico cisteína descarboxilasa; HTD, hipotaurina deshidrogenasa; GS, glutamato sintetasa; GLS, glutamina sintetasa; GAD, glutamato descarboxilasa.

La enzima glutamato descarboxilasa (GAD) una enzima determinante en la síntesis de GABA (il. 6, reacción 2) y ácido sulfónico cisteína descarboxilasa (CSAD) (il.6, reacción 4) son las enzimas clave producción de taurina, ambas muestran una relación que afecta su síntesis. Las dos enzimas pueden usar como sustratos a L-cisteína, L-cisteína sulfinato y L-aspartato, lo cual, sugiere una interrelación entre la taurina y el ciclo *glutamato-glutamina-GABA* **(Liu et al., 2012b, Suarez et al., 2016)** esencial para modular el balance entre la excitabilidad e inhibición neuronal **(Andersen et al., 2021)** (il. 6, reacciones 1, 6-8).

Un estudio realizado en células de hepatoma humano (HepG2) mostró que la taurina regula negativamente la expresión de la isoenzima 4 de piruvato deshidrogenasa cinasa (PDK4), afecta la actividad del complejo piruvato deshidrogenasa incrementando la formación de acetil-CoA y el metabolismo global **(Park et al., 2006)**. En cultivo de astrocitos expuestos a un medio hiperosmótico (de cloruro de sodio y rafinosa), la taurina regula positivamente la expresión de la *SLC5A3* (Miembro 3 del acarreador de solutos de la familia 5) y el transportador de

taurina (TauT) lo que permite la recuperación del contenido osmolítico intracelular (il. 7) **(Bitoun and Tappaz, 2000)**.

Papel de la taurina en la actividad antioxidante y antiinflamatoria ante un proceso de daño celular

El incremento de la concentración de glucosa esta correlacionado positivamente con los niveles de productos de glicosilación relacionados con la disminución del crecimiento celular en células mesangiales renales, mientras que moléculas antioxidantes endógenas como la vitamina E y la taurina revierten el efecto antiproliferativo causado por los niveles altos de glucosa **(Trachtman et al., 1994)**.

Por su parte, la taurina actúa como un antioxidante al atenuar el incremento del estrés oxidativo sistémico inducido por la administración de un inhibidor no selectivo de las sintasas del óxido nítrico (NOS). La taurina regula positivamente la expresión y actividad de la NOS, también reduce la activación del eje renina-angiotensina-aldosterona y evita el incremento de citocinas proinflamatorias **(Hu et al., 2009)**. La taurina ejerce un efecto positivo sobre el tono vascular al influir en la función endotelial (vasoconstricción o vasodilatación) **(Hu et al., 2009, Satoh and Kang, 2009)**. La exposición prenatal con taurina tiene efectos positivos a largo plazo en la presión arterial y función renal de los individuos **(Menzie et al., 2014)**.

A nivel periférico, los neutrófilos y los macrófagos representan un reservorio de taurina que tiene como función inducir una respuesta antioxidante y antinflamatoria a través de la formación de haloaminas de taurina para evitar la propagación del daño oxidativo (oxidación del ADN, nitración de proteínas, peroxidación de lípidos, etc.) **(Marcinkiewicz et al., 2006)**. Otro estudio indica que la cloramina taurina (TauCl) (il. 7) estimula el proceso de eferocitosis (engullimiento fagocítico de neutrófilos apoptóticos por macrófagos) a través Nrf-2 y OH-1 para atenuar la autofagia **(Kim et al., 2015)**.

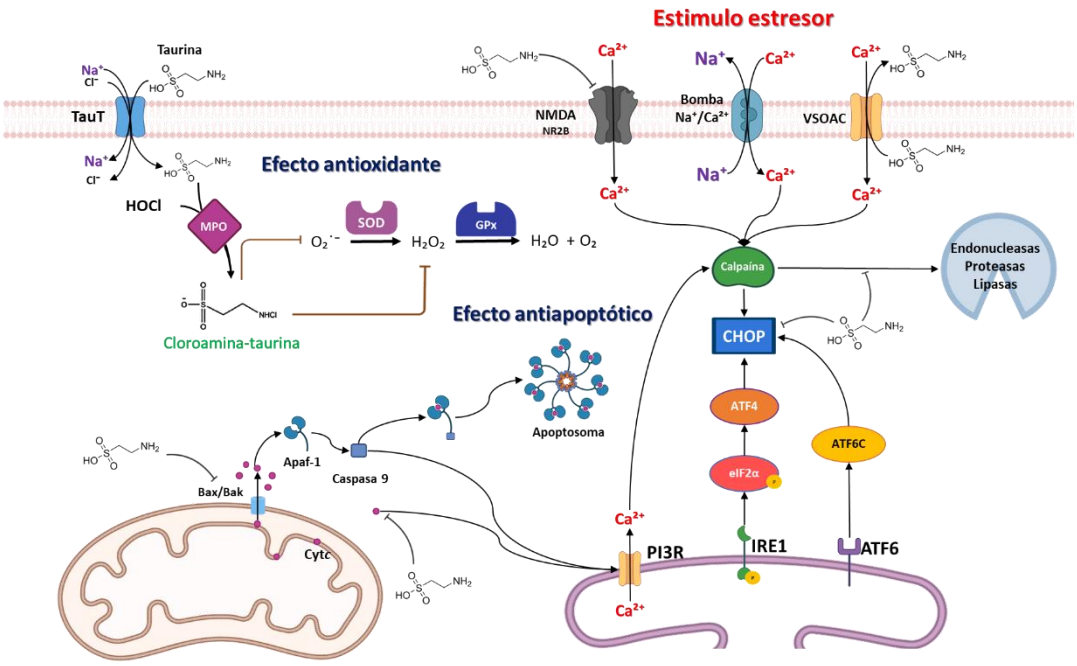


Ilustración 7. Representación de los mecanismos que induce la taurina para ejercer su efecto antioxidante, antiapoptótico y neuromodulador.

TauT, transportador de taurina; $O_2^{\cdot -}$, anión superóxido; SOD, superóxido dismutasa; GPX, glutatión peroxidasa; MPO, mieloperoxidasa; HOCl, ácido hipocloroso; Na^+, sodio catiónico; Cl^-, ion cloruro; Ca^{2+}, ion calcio; H_2O_2, peróxido de hidrógeno; H_2O, agua; O_2, oxígeno; CHOP, proteína homóloga del factor de transcripción C/EBP; p-IRE1, cinasa que requiere de inositol 1; PI3R, receptor de insitol-3 fosfato; ATF4, activador del factor de transcripción 4; ATF6, activador del factor de transcripción 6; ATF6C, activador del factor de transcripción 6 C-terminal; eIF2, factor de elongación; Bax, regulador de apoptosis vía BCL2 asociado a X; Bak, BCL2 Antagonista/Asesino 1; Cytc, citocromo C, Apaf-1, Factor activador de peptidasa apoptótica 1; $NMDA_{NR2B}$, subunidad NR2B del receptor NMDA; VSOAC, canal de osmolitos aniones orgánico sensible a volumen. Tomado y modificado de ***(Menzie et al., 2014)***.

Se ha reportado que, tras un evento isquémico el nivel intracelular de taurina disminuye significativamente **(Berthet et al., 2011)**, esto provoca un desbalance en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular que afecta el funcionamiento mitocondrial **(El Idrissi, 2008)**. La suplementación con taurina ha mostrado colaborar en la regulación de la dinámica mitocondrial evitando la formación del apoptosoma (Apaf-1/caspasa 9) **(Takatani et al., 2004)**, incrementando el índice Bcl-2/Bax **(Hayes et al., 1975, Zhu et al., 2016)**, previniendo la activación de caspasas y liberación del citocromo *c* **(Sun et al., 2011, Zhu et al., 2016)** y atenuando la activación de Bim (Bcl2 mediador interactivo de la muerte celular) y PUMA (p53 modulador positivo de la apoptosis); mientras que, en el retículo endoplásmico, la taurina ayuda a evitar el incremento de la proteína homóloga del factor de transcripción C/EBP (CHOP), la

Cinasa que requiere inositol 1 (p-IRE1) y el Activador del factor de transcripción 6 (ATF6) para reducir la autofagia (il. 7) **(Pan et al., 2012a, Gharibani et al., 2013, Menzie et al., 2013)**.

Con las evidencias antes mencionadas, la taurina puede ser considerada como un candidato fuerte para utilizarlo en estudios clínicos enfocados en prevenir el daño celular **(Andersen et al., 2021)** en diferentes modelos de daño **(Menzie et al., 2014)**.

PLANTEAMIENTO

La interrupción del flujo sanguíneo causado por el proceso isquémico provoca la hiperexcitabilidad neuronal selectiva, al mismo tiempo causa la baja disponibilidad de nutrientes y oxígeno que desencadenan una depleción energética conduciendo a la activación de mecanismos de daño neuronal en la etapa temprana. La hipoxia es capaz de activar diferentes mecanismos celulares para evitar el incremento en la extensión del daño cerebral y compensar las modificaciones metabólicas que se encuentran asociadas a la presencia de secuelas neurológicas en pacientes que sufrieron un episodio de hipoxia durante el embarazo o el nacimiento. Los tratamientos dirigidos a reducir la propagación del daño hipóxico-isquémico ejercen un efecto terapéutico corto, por lo que las alteraciones motoras aún continúan presentándose en etapas del desarrollo postnatal. Por lo que se ha propuesto la búsqueda de agentes profilácticos y terapéuticos con poder antioxidante y antiinflamatorio capaces de inducir un efecto neurorrestaurador para contrarrestar las secuelas neurológicas inducidas por la isquemia intrauterina. Estudios previos nos han permitido considerar la administración de zinc y taurina, de forma individual como una estrategia capaz de coadyubar en la neuroprotección. Actualmente, existe poca información acerca del efecto farmacológico de la administración combinada de zinc y taurina. Por lo que, este proyecto fue dirigido a evaluar el efecto de zinc y la taurina sobre el estrés nitrosativo, la respuesta antioxidante, la actividad de transaminasas y lactato deshidrogenasa, la actividad motora y la protección cerebral tras un evento de isquemia intrauterina.

JUSTIFICACION

Las secuelas provocadas por la asfixia perinatal representan un problema de salud pública, ya que merman la calidad de vida de los neonatos que cursaron por esta patología. Las estrategias terapéuticas utilizadas para disminuir la gravedad de las secuelas neurológicas no cuentan con la suficiente eficacia para generar un efecto neurorrestaurador a largo plazo. El modelo de isquemia intrauterina (IIU) incrementa la neuroinflamación y reduce factores de crecimiento (IGF-1, FGF2 y BDNF) alterando el desarrollo de la corteza e hipocampo en estadios tempranos a la concepción. Algunos reportes muestran que diferentes agentes pueden ayudar a prevenir la activación y la propagación del daño celular, sin embargo, ninguno de ellos ha reestablecido la recuperación neuromotora a largo plazo. En un estudio previo mostramos que el modelo de IIU causa un déficit neuromotor evaluado con una batería de pruebas y clasificado con la Escala de Jerarquización del efecto protector de estrategias farmacológicas (JEPEF). La administración de zinc y taurina ya mostraron tener un efecto neuroprotector, disminuyendo el estrés nitrosativo, la respuesta inflamatoria y participando en la recuperación de las habilidades motoras. Estos resultados sugieren que la administración de zinc y taurina podrían inducir un efecto antioxidante y antiinflamatorio que favorecería la neuroprotección ante la IIU. Diferentes estudios han mostrado que el zinc y la taurina pueden ejercer un efecto en la dinámica metabólica de diferentes rutas que tienen un papel durante el desarrollo celular. En este trabajo se centró en la evaluación del efecto de las estrategias individuales de zinc profiláctico y taurina terapéutica, así como su combinación en procesos como el estrés nitrosativo, la respuesta antioxidante, actividad metabólica relacionados con la protección cerebral y la neurorrestauración tras un proceso hipóxico-isquémico intrauterino.

HIPÓTESIS

La administración de zinc y taurina reduce el estrés nitrosativo, incrementa la actividad antioxidante, modifica las transaminasas y LDH, y mejora la conducta motora en un modelo de isquemia intrauterina.

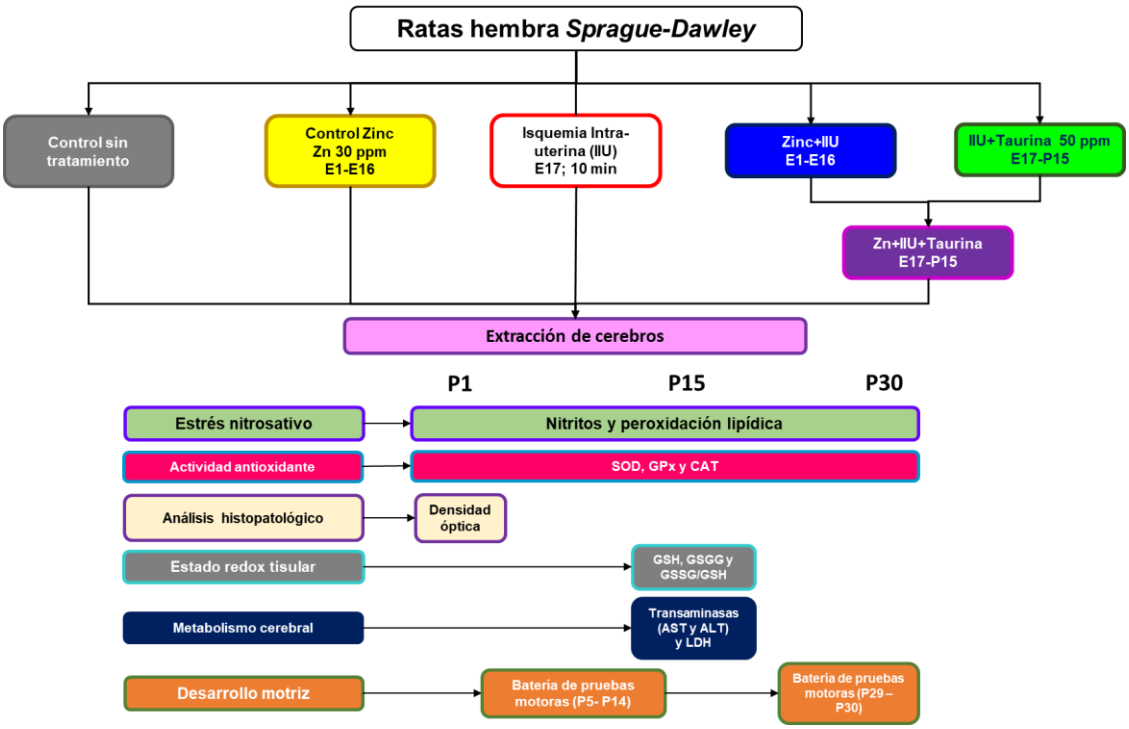
OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la administración de zinc y taurina sobre el estrés nitrosativo, la actividad antioxidante, las transaminasas y LDH, así como de la conducta motora en un modelo de isquemia intrauterina.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto de la administración profiláctica de zinc y terapéutica de taurina sobre el daño morfológico a nivel cortico-hipocampal (P1) en ratas que fueron sometidas a hipoxia-isquemia intrauterina.
2. Evaluar el efecto de la administración profiláctica de zinc y terapéutica de taurina sobre el estrés nitrosativo (P1, P15 y P30) en ratas sometidas a hipoxia-isquemia intrauterina.
3. Evaluar el efecto de la administración profiláctica de zinc y terapéutica de taurina sobre actividad antioxidante (SOD, Cat y GPx) en ratas que fueron sometidas a hipoxia-isquemia intrauterina (P1, P15 y P30).
4. Evaluar el efecto de la administración profiláctica de zinc y terapéutica de taurina sobre los niveles de GSH, GSSG y determinar el índice GSSG/GSH en ratas que fueron sometidas a hipoxia-isquemia intrauterina (P15).
5. Evaluar el efecto de la administración profiláctica de zinc y terapéutica de taurina sobre la actividad de las transaminasas (AST y ALT) y LDH en ratas que fueron sometidas a hipoxia-isquemia intrauterina (P15).
6. Evaluar el efecto de la administración profiláctica de zinc y terapéutica de taurina sobre el comportamiento motor a través de una batería de pruebas motoras en las ratas neonato (P5 – P14) e infantiles (P29 y P30) que fueron sometidas a hipoxia-isquemia intrauterina.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL GENERAL



Abreviaturas del protocolo experimental general. E, día embrionario; Zn, zinc; min, minutos; ppm, partes por millón; P, día postnatal; SOD, superóxido dismutasa; GPx, glutatión peroxidasa; CAT, catalasa; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado; AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa; LDH, lactato deshidrogenasa;

METODOLOGÍA

Animales de experimentación

Fueron utilizadas 48 ratas hembra *Sprague-Dawley* (peso corporal de 190 a 240 g) obtenidas del bioterio del CINVESTAV y se mantuvieron en habitaciones con condiciones controladas de temperatura (22 ± 3 ºC) y ciclos de luz -oscuridad (12 h –12 h). Los alimentos (dieta de laboratorio para roedores 5008, que contiene 73 ppm de zinc, taurina al 0.02%, metionina al 0.43% y cisteína al 0.35%) y el agua potable se les proporcionó *ad libitum*. Todos los procedimientos fueron realizados bajo la legislación mexicana actual, NOM-062-ZOO-1999 (SAGARPA), que a su vez se basa en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. El Comité

Institucional de Cuidado y Uso de Animales aprobó los procedimientos experimentales con el protocolo número 09-102 (CINVESTAV) y 3550 (BUAP).

El inicio del estado gestacional de las ratas hembra fue precisado por la presencia de espermatozoides en el frotis de exudados vaginales teñidos con hematoxilina & eosina observados después de la convivencia con el macho durante toda la noche anterior a la toma de muestra.

Las ratas que pertenecieron al grupo con el modelo de daño (IIU), se les realizó la isquemia transitoria *in útero* se realizó a través de la obliteración de las arterias uterinas en el día embrionario 17 (E17) en ratas hembra *Sprague-Dawley* (SD).

Tratamientos

Las ratas preñadas fueron asignadas en los siguientes grupos (1) Control sin tratamiento (Control s/t), sin exposición a tratamientos o cirugía; (2) IIU, el cual fue expuesto a 10 min de oclusión de las arterias uterinas en el día E17; (3) zinc (Zn 30 ppm), con una administración profiláctica del día E1 al día E16 con una solución de sulfato de zinc heptahidratado ($ZnSO_4$ $7H_2O$) a 30 ppm en el agua de beber que equivale a una concentración de 12 ppm de zinc atómico reportado en estudios previos; (4) Zn+IIU, con el tratamiento profiláctico de zinc ante la IIU; (5) IIU+Tau, grupo con la administración terapéutica de taurina a una concentración de 50 ppm de taurina en el agua de beber desde el día E17 al día postnatal (P15), la concentración de taurina dada corresponde a la concentración de taurina en la leche materna; y (6) Zn+IIU+Tau, combinación de la administración profiláctica de zinc y terapéutica de zinc ante la IIU.

Realización de la isquemia intrauterina (IIU)

La cirugía fue realizada en ratas preñadas en el día E17, y anestesiadas con ketamina (70 mg/kg) y xilacina (6 mg/kg) bajo condiciones de esterilidad, usando una campana de flujo laminar tipo A2. Se realizó una laparotomía media de 2 cm de longitud para exponer los cuernos uterinos, posteriormente las arterias uterinas fueron ocluidas con unas pinzas tipo buldog (Bulldog Clamps) durante 10 min. Los

cuernos uterinos fueron mantenidos húmedos e hidratados con solución estéril de buffer de fosfatos (pH 7.4). Al finalizar la oclusión, la reperfusión de las arterias fue verificada visualmente. Para prevenir infecciones, el útero fue posicionado en la cavidad abdominal y lavado con una solución de penicilina G sódica (150 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) y anfotericina B (25 µg/mL) disueltas en PBS. La incisión de la pared abdominal fue suturada con nylon 3 (0) y la piel con ceda 3 (0). Las ratas macho neonatas de cada uno de los grupos fueron distribuidas en tres puntos de un curso temporal: postnatal 1 (P1); evaluarlas con un batería de pruebas motoras dos rangos de edad (P5 - P14 y P29 - P30); en P15 y P30 para obtener los cerebros, las ratas fueron anestesiadas con ketamina (70 mg/kg) y xilacina (6 mg/kg).

Estudio histopatológico

Las ratas neonatas en la edad P1 fueron utilizadas para la evaluación del daño celular a través de la tinción de Nissl en cortes sagitales de cerebro, estos fueron fijados mediante perfusión intracardíaca con una solución de paraformaldehído 4 % disuelta en solución salina fisiológica al 0.9%. Los cerebros obtenidos fueron mantenidos en fijación a 4 °C.

Procesamiento de tejidos para deshidratación e inclusión en parafina

Los cerebros fueron procesados en el equipo de procesamiento de tejido (Histoquinette Leica, Microsystems, Walldorf, Germany). Las etapas de procesamiento de los tejidos fueron: fijación (formaldehído 4 %), deshidratación progresiva en alcoholes (80, 96 y 100 %), aclaramiento (xilol absoluto) e inclusión en parafina a 56 °C.

Procesamiento de los bloques de parafina

Los bloques de parafina fueron utilizados para obtener cortes histológicos de 3 µm de grosor en un micrótomo rotatorio tipo Minot (Leica RM 2135, Nussloch, Germany). Los cortes histológicos se colocaron en portaobjetos previamente tratados con poli-L-lisina y fijados con calor (56-58 °C).

Tinción de Nissl

Las preparaciones histológicas fueron colocadas en una canastilla de acero inoxidable para sumergirlas en el siguiente tren de tinción: xilol, deshidratación decreciente (alcohol 95 % y alcohol 70 %), enjuague (agua desionizada), tinción con solución de violeta de Cresilo 30 min a temperatura ambiente, fueron enjuagadas (agua destilada), deshidratación creciente (alcohol 70%, alcohol 95% y alcohol absoluto), por último, aclaramiento (xilol). Las laminillas fueron sumergidas en xilol y posteriormente acondicionadas con Resina de Entellan para su observación al microscopio.

Procesamiento de las imágenes

Las imágenes de los cortes histológicos fueron adquiridas con ayuda de un microscopio compuesto. Las preparaciones teñidas de los cerebros de rata P1 fueron procesadas en el software ImageJ (RRID:SCR_003070, National Institute of Health) y se realizó una curva de calibración tomando como referencia al Kodak No. 3 Calibrated Step Tablet escaneado con Epson Expression 1680 Professional scanner, para obtener la densidad óptica en la corteza (por capa (Layer): LI, LII, LIII, LIV, LV y LVI) e hipocampo (en regiones (CA1, CA3 y GD).

Análisis de datos (Histología)

Los resultados de la densidad óptica (DO) de las cortezas e hipocampos de las ratas P1 fueron analizadas con la prueba ANOVA de una vía, post-hoc Dunnett para realizar comparaciones múltiples respecto al Control s/t y al grupo IIU. Las diferencias estadísticamente significativas presentan un valor $P < 0.05$; * al compararlas con el grupo control y † respecto al grupo IIU.

Batería de pruebas motoras

Solo las ratas macho fueron evaluadas cronológicamente con una batería de pruebas motoras descrita a detalle.

Enderezamiento postural (P5)

Los críos fueron colocados sobre sus espaldas en una almohadilla suave y sujetándolos en una posición supina por 5 s. Después, fueron liberados y se registró

el tiempo al que regresan a la posición prono (latencia de giro) durante un minuto (il. 8). La prueba se realizó tres veces por individuo, y el valor promedio se usó para calcular la media ± SEM de al menos 5 críos por grupo.

Ilustración 8. Representación de la prueba de enderezamiento para evaluar el control postural.

Aversión a la altura (P9)

Los críos de edad P9 se colocaron previamente en una superficie elevada (31 × 24 × 17 cm) para explorar el área durante 30 s. Entonces, la cabeza y las extremidades anteriores se colocaron en el abismo de la caja, y el tiempo para retirarse del abismo (latencia de retracción) fue medido (il. 9). Las pruebas fallidas se repitieron con otro sujeto. La prueba se realizó tres veces por sujeto, y el valor promedio se utilizó para calcular la media ± SEM de al menos mínimo 5 críos por grupo.

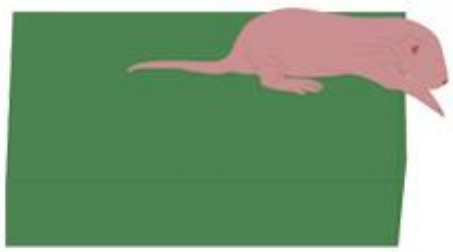


Ilustración 9. Representación de la prueba de aversión para evaluar la fuerza y coordinación para evitar el estímulo aversivo de la altura.

Fuerza de sujeción (P11)

Las crías de edad P11 fueron pesadas y colocadas sobre una malla horizontal (16 × 18 cm de largo × 1 mm^2 de espesor) hasta que las cuatro extremidades agarraron la malla. Entonces la malla fue girada lentamente de una

posición horizontal a una vertical para desafiar la fuerza gravitatoria. Se midió el tiempo de caída (latencia de caída) para calcular el impulso colgante (IP) multiplicando el peso corporal (PC) por la latencia de caída (LC). La prueba se realizó tres veces por sujeto, y el valor promedio se usó para calcular la media ± SEM de al menos 5 críos por grupo (il. 10).

Ilustración 10. Representación de la prueba de fuerza de sujeción para evaluar la resistencia de las cuatro extremidades en contra de la fuerza de gravedad.

Geotaxis negativa (P12)

Los críos de edad P12 fueron colocados boca abajo en una superficie de inclinación de 45° y mantenidos durante 5 s. Después de soltarlos, el tiempo para girar 180º hacia arriba (latencia de giro) se registró durante una prueba de 2 min (il. 11). La prueba se realizó tres veces por crío, y el valor promedio se usó para calcular la media ± SEM de al menos 5 individuos por grupo.

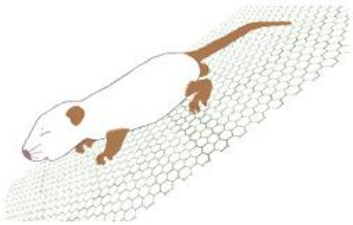


Ilustración 11. Representación de la prueba de geotaxis negativa.

Sujeción con las extremidades delanteras (P13)

Los críos P13 fueron pesados y colgados por las extremidades anteriores en un alambre que cruza la parte superior de un recipiente de plástico transparente de 3.5 L con una base acolchonada (il. 12). Se midió la latencia de caída para calcular

el impulso colgante (IP), al multiplicar el peso corporal (PC) por la latencia de caída. La prueba se realizó tres veces por individuo, y el valor promedio se usó para calcular la media ± SEM de al menos 5 sujetos por grupo (il. 12).

Ilustración 12. Representación de la prueba de sujeción con las extremidades anteriores cuando se sujeta de una guía metálica para evaluar su resistencia y fuerza.

Sujeción con las extremidades posteriores (P13)

Los críos de edad P13 fueron pesados y colgados por las extremidades traseras en el borde de un recipiente de vidrio transparente (15 cm × 6 cm) con paredes con interior liso y una base acolchada (il. 13). La latencia de caída se midió para calcular el impulso colgante (IP) multiplicando el peso corporal (PC) por la latencia de caída. La prueba se realizó tres veces por crío, y el valor promedio se utilizó para calcular la media ± SEM de al menos 5 sujetos por grupo.

Ilustración 13. Representación de la prueba de sujeción para evaluar la resistencia y fuerza de las extremidades posteriores.

Ángulo de caminata (P14)

Los críos de edad P14 fueron colocados en un campo abierto para su libre exploración (il. 14), y el ángulo de las dos extremidades traseras fue grabado en video durante una marcha de 1 min. Este ángulo depende de la edad y es útil para

determinar anomalías en la marcha. El ángulo de la marcha fue calculado con el software ImageJ (RRID:SCR_ 003070, Instituto Nacional de Salud), para lo cual se usaron 5 fotografías seriadas por sujeto durante la caminata. Estos valores se usaron para calcular la media ± SEM de al menos 5 individuos por grupo.

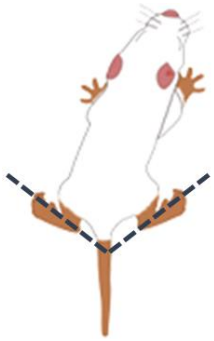


Ilustración 14. Representación de la prueba de ángulo de caminata.

Prueba de la viga (P29)

Los sujetos fueron entrenados durante dos días consecutivos previos a la prueba final realizada en el día P29. Las ratas fueron colocadas en el extremo inferior de la viga (trabe de 2 cm de ancho y 120 cm de longitud) permitiéndoles la exploración libre de la superficie (il. 15), se realizaron tres ensayos por día de entrenamiento (P27 y P28). En caso de que el sujeto no llegará al extremo superior de la viga se le apoyó para que este completara la prueba de entrenamiento. Después, a las ratas de edad P29 se les colocó sobre una viga para evaluar la coordinación motriz de los sujetos para desplazarse. En este ensayo se evitó ayudar a los sujetos. Cada ensayo de entrenamiento y final tuvo una duración de 120 s. La prueba final se realizó por triplicado. Se registró el tiempo que utiliza el individuo para desplazarse desde punto inferior de la viga hasta el superior, el valor promedio se utilizó para calcular la media ± SEM de al menos 5 sujetos por grupo. Este tipo de prueba ha sido aplicada en diferentes modelos de daño cerebral para evaluar la alteración motriz en modelos animales a los que se les indujo daño cerebral. **(Deacon, 2013, Hernandez-Baltazar et al., 2013, Soto-Rojas et al., 2020a)**.

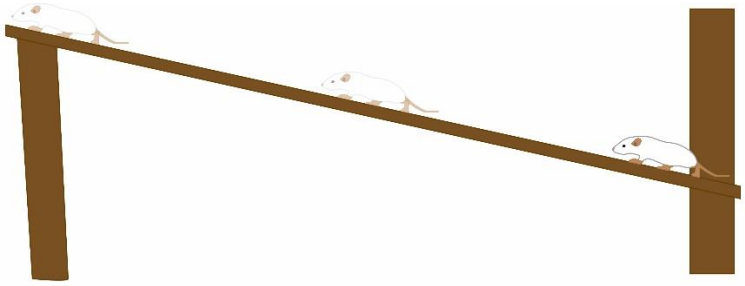


Ilustración 15. Representación de la prueba de la viga o barra.

Prueba de inversión (P30)

Las crías de edad P30 fueron pesadas y colocadas sobre una malla horizontal (20 cm × 30 cm de largo × 1 cm^2 de espesor) elevada a 35 cm con una zona de caída segura para los sujetos hasta que sujetaran la malla con las cuatro extremidades y se evaluó la resistencia de las cuatro extremidades para soportar su propio peso, también se registró la latencia de caída. El peso corporal (PC) fue registrado para calcular el impulso colgante (IP). Se le permitió a cada individuo sujetarse de la malla por 5 s antes de liberarlo (il. 16). La prueba se realizó tres veces por crío, y el valor promedio se utilizó para calcular la media ± SEM de al menos 5 sujetos por grupo.

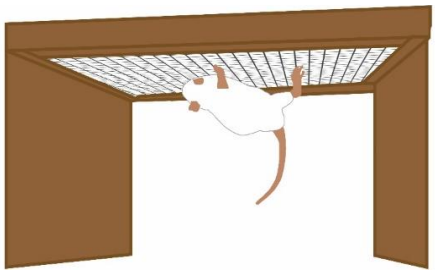


Ilustración 16. Representación de la prueba de inversión.

Campo abierto (P30)

La prueba de campo abierto fue realizada con sujetos de edad P30. Los cuales fueron colocados en una caja (60 x 60 x 60 cm) dividida en nueve cuadrantes. El ensayo comenzó al colocar al individuo en el cuadrante 1 sin posibilidad de observar el resto del interior de la caja gracias a una barrera retráctil. Cada ensayo tuvo una duración de 10 min, en los que fueron contabilizados el número de visitas al cuadrante central (5), la actividad vertical (número de erguidos), la distancia

recorrida y el número de toques a la pared. La prueba se realizó tres veces por crío, y el valor promedio se utilizó para calcular la media ± SEM de al menos 5 sujetos por grupo.

ANÁLISIS DE DATOS

Evaluaciones neuromotoras

Los resultados de las evaluaciones neuromotoras que componen a la batería de prueba fueron ajustados respecto al grupo Control y presentados como promedio ± SEM. Con ayuda del programa Graphpad Prism 7 realizamos la prueba de U de Mann-Whitney para comparar todos los grupos contra el Control, así como llevar a cabo comparaciones internas respecto al grupo IIU (enderezamiento corporal, aversión, geotaxis negativa, fuerza de sujeción, sujeción con los miembros anteriores–posteriores y sus respectivos impulsos colgantes (IC), ángulo de caminata, viga, inversión y campo abierto). Las diferencias estadísticamente significativas presentan un valor $^{*}P < 0.05$ para comparar con respecto al grupo Control s/t y † respecto al grupo IIU.

Jerarquización del Efecto Protector de Estrategias Farmacológicas (JEPEF)

Los valores de las pruebas de conducta se expresaron como los valores JEPEF, que indican la eficacia de un enfoque farmacológico (registro #MX2020010357). A la disfunción motora se le asigno un valor de cero, la recuperación fue calificada con un puntaje igual a 1, y la mejora en el comportamiento motor por encima del Control fue de 2 (Tabla 1). La JEPEF fue construida con la suma de todos los puntajes de desempeño de cada tratamiento (Tabla 2).

Tabla 1. Puntaje de rendimiento para cada tratamiento por sujeto.

Puntaje	Rendimiento
0	Menor que el Control
1	Igual que el Control
2	Mayor que el Control

Tabla 2. Puntaje de Jerarquización del efecto protector para estrategias farmacológicas (JEPEF).

Puntaje	Grado de recuperación
0 a 5	Ineficiente
6 a < 10	Moderado
= 10	Eficiente
> 10	Potenciado

Evaluación bioquímica

La corteza cerebral, el hipocampo (P1 y P15), núcleos subcorticales y tallo cerebral (P30) (n = 5 individuos en cada grupo) fueron individualmente disectados y homogeneizados mecánicamente en PBS 1X. Después, los homogeneizados fueron centrifugados a 12,500 rpm durante 30 min a 4°C en una microcentrífuga Z216MK (HERMLE Labortechnik GmbH; Wehingen, Germany). Las alícuotas de los sobrenadantes se utilizaron para cuantificar nitritos, peroxidación lipídica, niveles de GSH y GSSG, y actividades enzimáticas de AST, ALT, LDH, SOD, Cat y GPx. Para normalizar los resultados bioquímicos, se utilizó el contenido de proteínas, el cual fue cuantificado en los sobrenadantes usando el método de Sedmark y Grosberg (Anexo).

Cuantificación de nitritos (NO_2^-)

La producción de NO fue estimada a través del contenido de nitritos (NO_2^-) en los sobrenadantes de las muestras utilizando el método de Griess **(Chao et al., 1992)**. El reactivo de Griess reacciona con óxido nítrico (NO) presente en la muestra y permite la formación de una sal de diazonio que fue leída en un espectrofotómetro

NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific; Wilmington, DE, USA) a 540 nm. El reactivo de Griess fue preparado con volúmenes iguales de dihidrocloruro de N-1-naftiletilendiamino al 0.1 % disuelta en agua destilada y sulfanilamida al 1.32 % disuelto en ácido acético glacial al 60 %. La concentración de NO_2^- se determinó interpolando la densidad óptica de las muestras en una curva estándar de $NaNO_2$ (0.5 a 10 µg mL^{-1}), la cual se determinó paralelamente en cada ensayo.

Cuantificación de la peroxidación lipídica (MDA & 4-HDA)

La concentración de malondialdehído (MDA) y de 4-hidroxialquenal (4-HDA) fue medida (n = 5) como se describió anteriormente **(Gerard-Monnier et al., 1998)**. La reacción colorimétrica se desencadenó en 200 µL del sobrenadante después de la adición de 650 µL de N-metil-2-fenilindol 10.3 mM diluido en una mezcla de acetonitrilo: metanol (3:1) y 150 µL de metanosulfónico. La mezcla de reacción se agitó y se incubó a una temperatura de 45 °C durante 1 h y luego se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 min en microcentrifuga Z216MK (HERMLE Labortechnik GmbH; Wehingen, Germany), la absorbancia fue cuantificada a 586 nm en un espectrofotómetro (Bio-Rad; Hercules, CA, USA). Los valores de absorbancia se compararon con una curva patrón de 0.25 a 5 µM de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (stock 10 mM) para calcular el contenido de MDA & 4-HDA en las muestras. Los valores se expresaron como nM MDA & 4-HDA mg^{-1} de proteína.

Ensayo para la cuantificación de la actividad enzimática de catalasa (Cat)

La actividad enzimática de la Cat fue cuantificada en 75 µL del sobrenadante en una celda de cuarzo en un espectrofotómetro (Lambda EZ-150; PerkinElmer Company; Waltham, MA, USA). Después de agregar 330 µL H_2O_2 (30 mM) y ajustar a 1mL con PBS, el cambio de absorbancia del H_2O_2 fue monitoreado continuamente a 240 nm cada 30 s en un espectrofotómetro **(Aebi, 1984)**. Los resultados de la actividad enzimática se reportaron como la U min^{-1} mg^{-1} de proteína.

Ensayo para la cuantificación de la actividad enzimática de Superóxido dismutasa total (SOD)

La actividad enzimática de SOD total en los sobrenadantes fue medida usando pirogalol como sustrato y registrando su producto de degradación a 420 nm, previamente detallado por **Gao, 1998**. En una celda de cuarzo, se añadieron 100 µL del sobrenadante, complementado con 700 µL de solución buffer de Tris-HCl (pH 8.2) y 50 µL de EDTA. Posteriormente, se añadieron 50 µL de pirogalol, y después de 10 s de reacción, se determinaron los cambios de densidad óptica (OD) durante un minuto a 420 nm en un espectrofotómetro (Lambda EZ-150; PerkinElmer Company; Waltham, MA, USA) **(Gao, 1998)**. Al lograr un cambio de absorbancia de 0.020 ± 0.001, la absorbancia fue evaluada continuamente durante dos minutos más. Los resultados de la actividad enzimática se presentaron como U min^{-1}/mg de proteína usando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad enzimática} = (AV\ \Delta ODs * 100 AV\ \Delta ODb - 100) * 0.6,$$

donde AV es el valor promedio, ΔODs es la diferencia de DO de la muestra, ΔODb es la diferencia de DO en blanco de la reacción, y 0.6 es un factor constante.

El contenido de proteína se midió en los sobrenadantes utilizando el método de Sedmark y Groosberg. Los resultados de la actividad enzimática se reportaron en U $min^{-1}mg^{-1}$ de proteína.

Ensayo para la cuantificación de la actividad enzimática de la Glutatión peroxidasa (GPx)

Se utilizó un kit de Glutatión peroxidasa (Item No. 703102) para medir la actividad enzimática de la GPx, siguiendo las instrucciones del fabricante (Cayman Chemical Company; Ann Arbor, MI, USA). Los tejidos cerebrales después de la perfusión con PBS, fueron homogeneizados con 200 µL de buffer frío para la GPx 10X (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, EDTA 5 mM y DTT 1 mM). En una placa de 96 pozos (Costar®, 96 well, No. Lid, Kennebunk, ME, 04043, USA) los pozos de control contenían 70 µl de un buffer de ensayo GPx (10X), 50 µL de la mezcla de cosustrato

y 50 µL de NADPH. Los pozos de control positivo se complementaron con 50 µL de un buffer de ensayo, 50 µL de una mezcla de cosustrato, 50 µL de NADPH, y 20 µl de un control GPx diluido. Posteriormente, los pozos de los controles positivos se leyeron a 340 nm por triplicado, registrando el cambio de absorbancia del NADPH durante cada minuto durante 5 min. Los pocillos de muestra contenían 70 µL de un buffer de ensayo, 50 µL de la mezcla de cosustrato, 50 µL de NADPH y 20 µL del sobrenadante de la muestra. La reacción se inició agregando 20 µL de hidroperóxido de cumeno a todos los pozos. Finalmente, se registró la absorbancia a 340 nm cada minuto durante 5 min, utilizando un lector de microplacas (Bechmark™, Bio-Rad; Hercules, California 94547, USA). Los resultados de la actividad enzimática de la GPx fueron presentados como GPx (NADPH nmol/min^{-1}/mL).

Ensayo de glutatión total (GSH + GSSG)

La cuantificación de los niveles de glutatión total se realizó en una placa de 96 pozos, como se describe previamente por **Rahman et al., 2006**. Las muestras fueron homogeneizadas en una solución que contiene una proporción igual de Tritón-X (0.1%) y de ácido 5-sulfosalicílico dihidratado (0.6 %) y centrifugado a 8000 × g durante 10 min a 2 – 4 °C en una microcentrífuga Z216MK (HERMLE Labortechnik GmbH; Wehingen, Germany) para obtener el sobrenadante. Los pozos de los blancos, por triplicado, contenían 20 µL de KPE (buffer K_2HPO_4-EDTA). El glutatión total se cuantificó en 20 µL de sobrenadantes añadiendo 60 µL de 5,5′-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DNTB) y 60 µL de glutatión reductasa. Después de 30 s de incubación, 60 µL de β-NADPH fue adicionado para leer inmediatamente la formación de ácido 2-nitro-5-tiobenzoico a una longitud de onda ideal a 412 nm cada 30 s durante 2 min con un lector de microplacas (Bechmark™, Bio-Rad, Hercules, California 94547, USA). La concentración total de glutatión se determinó a través de la interpolación en una curva estándar de glutatión (0.4125 – 26.4 nM). Los resultados fueron expresados como µM mg^{-1} de proteínas totales **(Rahman et al., 2006)**.

Ensayo de glutatión oxidado (GSSG)

La cuantificación de GSSG en se realizó en 100 µL de sobrenadantes agregando 2 µL de 4- vinilpiridina e incubando la mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 6 µL de trietanolamina a cada muestra, y la absorbancia se leyó a 412 nm cada 30 s durante 2 min con un lector de microplacas. La concentración se calculó mediante interpolación a partir de una curva estándar de GSSG que van desde 0.4125 a 26.4nM. La concentración total de GSSG se expresó como µM mg^{-1} de proteínas totales. La concentración de GSH fue la diferencia entre los valores de glutatión total (GSH + GSSG) y el glutatión oxidado (GSSG) **(Rahman et al., 2006)**.

Ensayo para la cuantificación de la actividad enzimática de aspartato aminotransferasa (AST)

La actividad enzimática de AST se midió en 100 µL de sobrenadante utilizando el kit MIBEIS46-GOT(AST)-LQ, siguiendo las instrucciones del fabricante. Añadimos 100 µL de una mezcla 1:2 de reactivo R1 (Tris, pH 7.8 + lactato deshidrogenasa (LDH) + malato deshidrogenasa (MDH) + L-aspartato y reactivo R2 (NADH + α-cetoglutarato) a 25 °C. Inmediatamente, el cálculo del consumo de NADH fue monitoreado continuamente a 340 nm por 3 minutos. Los valores de referencia informados en la hoja de datos son para humanos adultos para AST la cual varia de 9U/L a 25 °C hasta 38 U/L a 37 °C. Los resultados de la actividad enzimática se reportaron como U $min^{-1}mg^{-1}$ proteína.

Ensayo para la cuantificación de la actividad enzimática de alanina aminotransferasa (ALT)

La actividad enzimática de ALT se evaluó en 100 µL del sobrenadante utilizando el kit GPT_ALT_BEIS36_02-2011 siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de agregar 100 µL de una mezcla 1:2 de reactivo R1 (Tris, pH 7.8 + lactato deshidrogenasa, LDH+ L-alanina) y el reactivo R2 (NADH + α-cetoglutarato), la absorbancia fue monitoreada continuamente a 340 nm por 3 min a 25 °C. Valores de referencia informados en la hoja de datos para hombres adultos

humanos para ALT fueron de 22 U/L a 25 °C hasta 40 U/L a 37 °C. Los resultados de la actividad enzimática fueron reportados como U min^{-1} mg^{-1} de proteína.

Ensayo para la cuantificación de la actividad enzimática de lactato deshidrogenasa (LDH)

La actividad enzimática de la LDH se evaluó en 100 µL de sobrenadante usando el kit BEIS16_LDH_02-2015. Después de agregar 100 µL de una mezcla 1:2 del reactivo R1 (imidazol + piruvato) y el reactivo R2 (NADH), la absorbancia se registró a 340 nm durante 3 minutos a 25 °C. Los resultados de la actividad enzimática se reportaron como U min^{-1} mg^{-1} proteína.

Relaciones AST/ALT, LDH/ALT y AST/LDH

El Índice de Retis (AST/ALT), es una referencia de pronóstico clínico del daño tisular **(Botros and Sikaris, 2013)**, y se utilizó para identificar la dirección del metabolismo del glutamato. La relación AST/ALT indica si el metabolismo del glutamato se llevaría a cabo en la mitocondria o el citosol, basado en la reacción AST (glutamato + oxaloacetato ⇆ aspartato + α-cetoglutarato). Esta reacción podría llevarse a cabo preferentemente en astrocitos participando en la síntesis de GABA y la degradación del glutamato **(Schousboe et al., 2014)**. Así mismo, la relación AST/LDH se consideró como un indicador del metabolismo del glutamato-piruvato suministrado por otras fuentes moleculares **(McKenna et al., 1996)**. Basado en las reacciones de ALT (alanina + α-cetoglutarato ⇆ piruvato + glutamato) y LDH (lactato ⇆ piruvato), propusimos que la relación LDH/ALT podría ser un indicador de la dirección del metabolismo del lactato-piruvato **(McKenna et al., 1996)**. Y la propuesta de las relaciones LDH/ALT y AST/LDH no tienen antecedentes reportados en la literatura.

Análisis de datos de cuantificaciones bioquímicas

Todos los valores se expresaron como media ± SEM de al menos 5 experimentos independientes. Los resultados de las pruebas bioquímicas se analizaron con un ANOVA de una vía utilizando la prueba post hoc de Dunnett para comparar todos los grupos con el Control s/t y el grupo IIU. Todos los análisis

estadísticos se realizaron con el software Graphpad Prism 7. Se consideró que una $P < 0.05$ indicaba diferencia estadísticasignificancia.

RESULTADOS

Estrés nitrosativo en corteza cerebral e hipocampo P1

El modelo de la IIU disminuyó los niveles de nitritos en 59.96 ± 6.89 % ($^{*}P$ = 0.0401) en la corteza temporoparietal **(Fig. 1A)** comparado al Control s/t. La administración profiláctica de zinc en las ratas sanas (Zn 30 ppm) generó el incremento de nitritos (68.21 ± 23.41 %, $^{*}P$ = 0.0363) **(Fig. 1A)** y de MDA y 4-HDA (247.14 ± 149.22 %, $^{*}P$ = 0.0479) **(Fig. 1C)** respecto al grupo Control s/t. Los tratamientos individuales de zinc (Zn+IIU) y taurina (IIU+Tau) no causaron un efecto en los nitritos **(Fig. 1A)** y ni en la lipoperoxidación **(Fig. 1C).** Solo la administración precondicionante de zinc combinada con taurina (Zn+IIU+Tau) disminuyó los niveles de nitritos en 66.57 ± 7.13 % ($^{*}P$ = 0.0208) comparado con el grupo Control s/t **(Fig. 1A)**.

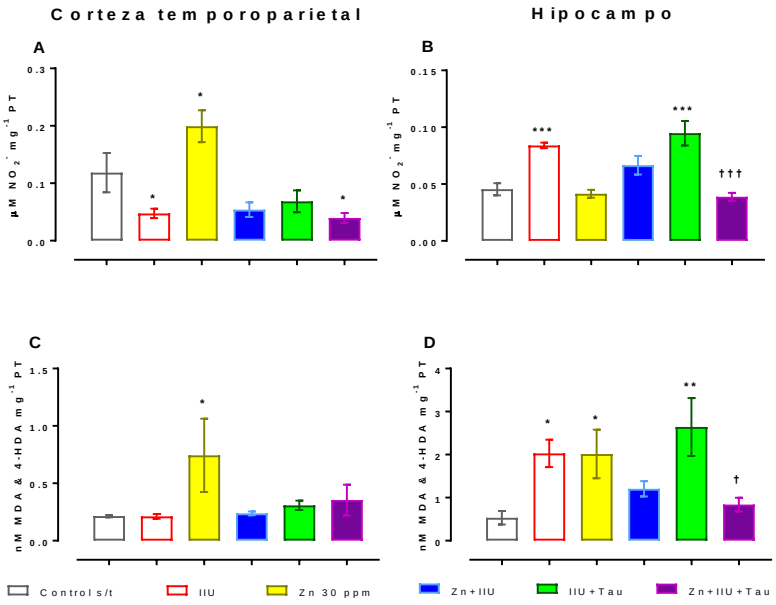


Figura 1. La suplementación con taurina previene el déficit de la respuesta antioxidante causado por la IIU en la corteza temporoparietal de rata de un día postnatal (P1). Los valores representan la media ± EEM, con una n = 6 y fueron analizados con la prueba ANOVA de una vía, post-hoc Dunnett. $P < 0.05$, ***** vs Control; **†** vs IIU.

En el hipocampo, la IIU causo el incremento de nitritos (84.81 ± 5.30 %, $^{***}P$ = 0.0007) **(Fig. 1B)** y de MDA & 4-HDA (280.45 ± 59.77 %, $^{*}P$ = 0.0309) **(Fig. 1D)** respecto al grupo Control. La administración de zinc (Zn 30 ppm) incrementó los niveles de MDA & 4-HDA (277.95 ± 106.23 %, $^{*}P$ = 0.0222) **(Fig.1D)** respecto al grupo Control. La administración terapéutica de taurina (IIU+Tau) elevó los niveles de nitritos (108.50 ± 23.68 %, $^{**}P$ < 0.0001) **(Fig.1B)** y de MDA & 4-HDA (277.95 ± 106.23 %, $^{*}P$ = 0.0222) **(Fig.1D)** comparado con el grupo Control s/t. La administración precondicionante de zinc y terapéutica de taurina (Zn+IIU+Tau) evitó el incremento de nitritos (53.86 ± 4.22 %, $^{\dagger\dagger\dagger}P$ = 0.0005) **(Fig. 1B)** y de MDA & 4-HDA (58.64 ± 7.91 %, $^{\dagger}P$ = 0.0359) **(Fig. 1D)** inducidos por la IIU.

Actividad antioxidante en corteza cerebral e hipocampo P1

La IIU no modifico en la corteza temporoparietal la actividad enzimática de la SOD **(Fig. 2A)** ni de la catalasa (Cat) **(Fig. 2C)** comparado con el grupo Control. Ningún tratamiento individual o combinado causo un efecto sobre la actividad enzimática de la catalasa comparados con el grupo Control s/t **(Fig. 2C).** La administración terapéutica con taurina individual (IIU+Tau) (416.27 ± 56.96 %, $^{\dagger\dagger}P$ = 0.0033) o combinada con el precondicionamiento de zinc (Zn+IIU+Tau) (445.94 ± 105.39 %, $^{\dagger\dagger}P$ = 0.0019) aumentaron la actividad de la SOD respecto al grupo IIU **(Fig. 2A)**.

En el hipocampo la IIU no generó efecto significativo sobre la actividad de la SOD **(Fig. 2B),** pero sí en la actividad de la catalasa (75.65 ± 3.47 %, $^{**}P$ = 0.0046) **(Fig. 2D)** respecto al grupo Control. El zinc (Zn 30 ppm) causo la reducción en la actividad de la catalasa en (59.11 ± 5.45 %, $^{*}P$ = 0.0422) respecto al grupo Control s/t **(Fig. 2D)**. Ninguno de los tratamientos individuales o combinado causo un efecto sobre la actividad enzimática de la SOD comparados con el grupo Control s/t **(Fig. 2B).** La taurina individual (IIU+Tau) redujo la actividad enzimática de la catalasa en 61.74 ± 7.08 % ($^{*}P$ = 0.0323), comparado contra el grupo Control **(Fig. 2D)**.

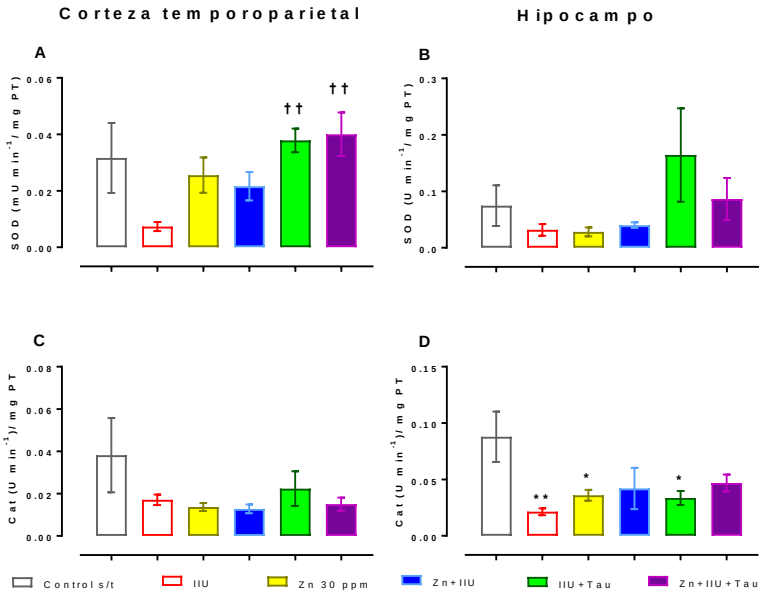


Figura 2. La suplementación con zinc y taurina previene el déficit de la respuesta antioxidante causado por la IIU en el hipocampo de rata de un día postnatal (P1). Los valores representan el promedio ± SEM (n = 6) y fueron analizados con la prueba ANOVA de una vía, post-hoc Dunnett, $P < 0.05$, ***** vs Control; **†** vs IIU.

Análisis histopatológico en corteza cerebral de ratas P1

La IIU causó la reducción de la densidad óptica (DO) en las capas LI, LII y LIII (45.18 ± 4.82 %, $^{*}P = 0.0031$) (**Fig. 3A**) así como en las capas LV y LVI (60.66 ± 12.85 %, $^{*}P = 0.0407$) (**Fig. 3B**) de la corteza cerebral comparado con el grupo Control s/t. La administración de zinc (Zn 30 ppm) en ausencia de daño mantuvo la DO similar al Control s/t en las capas superiores de la corteza, sin embargo, se observó la reducción de la DO en 22.42 ± 2.66 % ($^{**}P = 0.0060$) en las capas LV y LVI respecto al Control s/t (**Fig. 3C**).

El precondicionamiento de zinc previno el efecto inducido por la IIU en las capas de la corteza cerebral, comparado con el grupo IIU (**Fig. 3A**, **3B** y **3C**). El tratamiento terapéutico de taurina (IIU+Tau) mostró un efecto protector previniendo el efecto de IIU en las capas LI, LII y LIII (**Fig. 3A**) así como en las capas LV y LVI **(Fig. 3C)** comparado con el grupo IIU. Por su parte, el precondicionamiento de zinc combinado con la taurina mostró un efecto positivo al evitar la reducción de la DO en todos los estratos corticales (**Fig. 3A**, **3B** y **3C**) comparado contra el grupo IIU.

La IIU causó la reducción de la DO en todas las regiones del hipocampo, en 27.35 ± 2.43 % (*P = 0.0111) en la región de CA1 (**Fig. 4A**) en un 22.16 5.28 % (*P = 0.017) en la región de CA3 y en 20.79 ± 4.05 %, (*P = 0.0185) (**Fig. 4B**) y en el giro dentado (GD) (**Fig. 4C**), respecto al Control s/t. Por su parte, la administración control de zinc (Zn+IIU) conservó la DO en las regiones evaluadas.

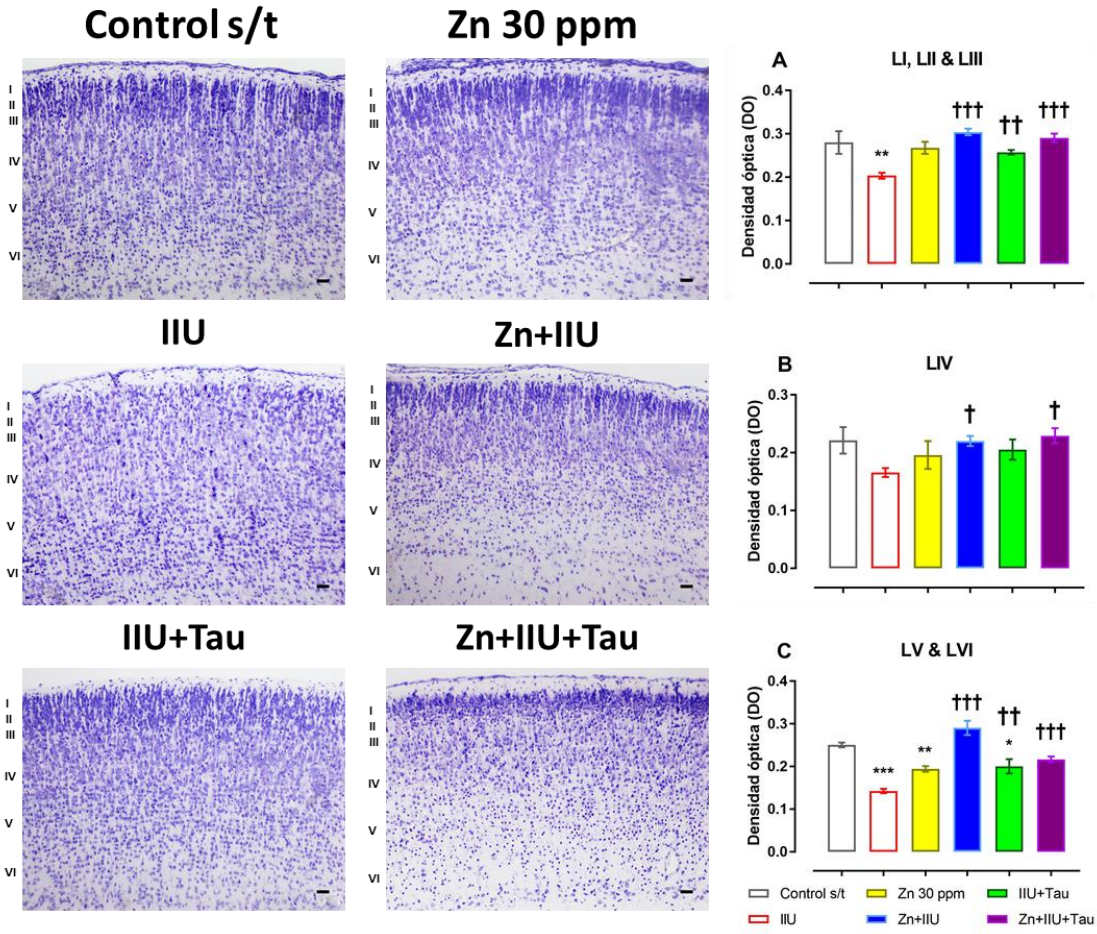


Figura 3. La administración con zinc o taurina previene la reducción de la densidad celular en la corteza cerebral de rata de un día postnatal (P1). Los valores representan el promedio ± SEM (n = 5). La barra de escala representa 100 µm. Los datos fueron analizados con la prueba ANOVA de una vía, post-hoc Dunnett. $P < 0.05$, ***** vs Control; **†** vs IIU.

El precondicionamiento de zinc causo la reducción en la DO en la región de CA3 (15.32 ± 0.68 %, **P = 0.0017) (**Fig. 4B**) y de GD (26.19 ± 2.78 %, **P = 0.0074) (**Fig. 4C**) comparado con el grupo Control s/t. El tratamiento terapéutico de taurina evitó el efecto causado por la IIU en todas las regiones del hipocampo, comparado a la IIU **(Fig. 4A**, **4B** y **4C)**. El precondicionamiento de zinc combinado con el

tratamiento de taurina evito la reducción de la DO en la región de CA1(25.18 ± 4.92 %, †*P* = 0.0147) comparado con el grupo IIU **(Fig. 4A)** y causo la disminución de la DO en la región del GD (25.18 ± 4.92 %, **P* = 0.0147) comparado con el grupo Control **(Fig. 4C)**.

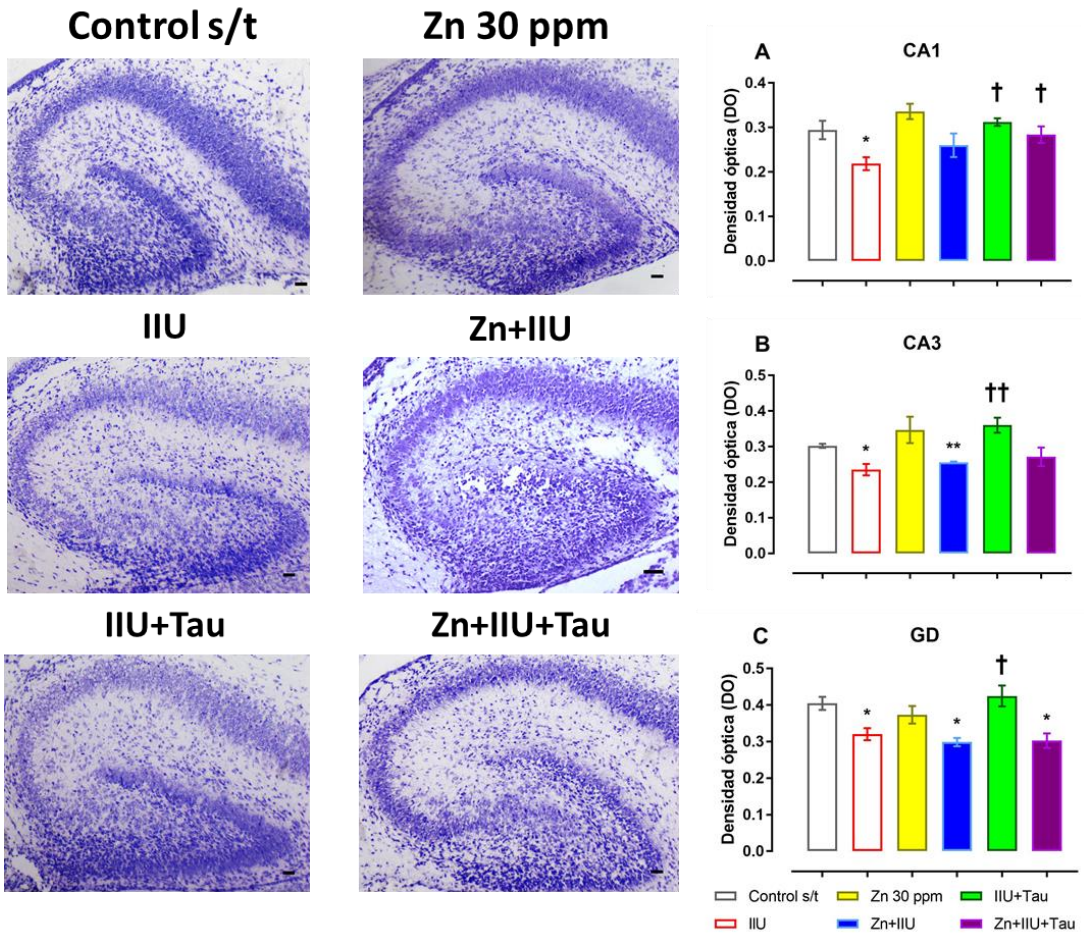


Figura 4. La administración de taurina evito la pérdida de la densidad celular en hipocampo de rata de un día postnatal (P1). Los valores representan el promedio ± SEM (n = 5). La barra de escala representa 100 µm. Los datos fueron analizados con la prueba ANOVA de una vía, post-hoc Dunnett. *P* < 0.05, ***** vs Control; **†** vs IIU.

Batería de pruebas motoras (P5 -P14)

La prueba enderezamiento postural realizada en el día P5 mostró que la IIU incrementó la latencia de enderezamiento en un 82.14 ± 44.17 % (***P* = 0.0105) comparado con el grupo Control s/t. La administración precondicionante de zinc (Zn+IIU) no cambio la latencia de enderezamiento, esto fue prevenido por el tratamiento de taurina individual (IIU+Tau) en un 40.52 ± 6.85 % (†*P* = 0.0115) o en

combinación con el zinc (Zn+IIU+Tau) por 42.62 ± 4.07 % (†*P* = 0.0311) comparados con el grupo IIU (**Fig. 5A**).

La prueba de aversión a la altura en el P9 mostró que la IIU incrementó la latencia de retirada por 81.48 ± 33.84 % (******P* = 0.0023) comparado con el grupo Control s/t. La administración profiláctica de zinc redujo la latencia de retirada en 42.85 ± 6.54 % (******P* = 0.0091) para retirase de la zona de peligro comparado con el Control. Todos los tratamientos previnieron por completo el incremento inducido por la IIU en la latencia de retirada **(Fig. 5**B).

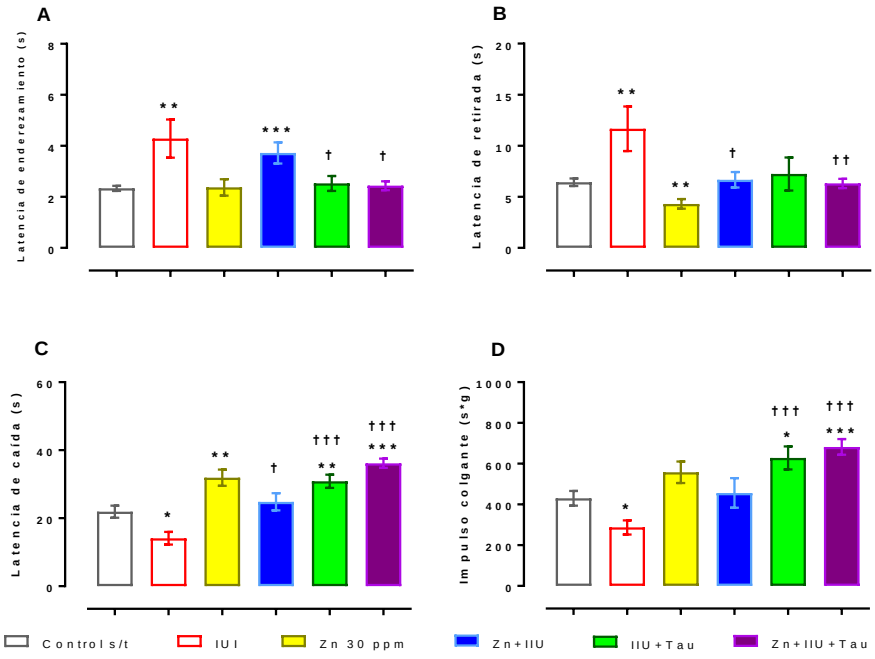


Figura 5. El efecto de la administración de precondicionamiento de zinc y el tratamiento terapéutico con taurina en alteraciones en el enderezamiento de la superficie, aversión a la altura, fuerza de agarre e impulso colgante inducidas por la isquemia intrauterina. Los valores son el promedio ± SEM (n = 5 a 8). *****P* < 0.05. Kruskal-Wallis de comparaciones múltiples y post hoc de Dunn versus el Control s/t. **†** comparado con el IIU analizado por la prueba U de Mann-Whitney. s: segundo; s∗g: segundo × gramos.

La prueba de fuerza de sujeción realizada en el P11 de los sujetos del grupo IIU muestran una disminución en la latencia de caída del 30.25 ± 8.89 % (*****P* = 0.0113) comparado con el Control s/t. Todos los tratamientos previnieron el efecto inducido por la IIU comparado con el grupo Control s/t. De hecho, se observó el incremento en la latencia de caída en 62.46 ± 16.64 % (†*P* = 0.026) en el grupo Zn+IIU, de 101.89 ± 12.82 % (†††*P* <0.0001) en el grupo IIU+Tau y de 136.60 ± 9.08

% (†††*P* <0.0001) en el grupo Zn+IIU+Tau, comparados con el grupo IIU. En el grupo Zn fue observado el incremento significativo en la latencia de caída (33.18 ± 10.72 %, **P* = 0.0023) (**Fig. 5C**).

En la prueba de impulso colgante del día P11 se muestra que la IIU también disminuyó la resistencia de las cuatro extremidades en 33.2 ± 8.06% (**P* = 0.0172) comparada con el Control. No se encontraron diferencias estadísticas en los grupos Zn y Zn+IIU, ambos comparados con el grupo Control s/t e IIU. El tratamiento de taurina individual o combinado con zinc previeron eficazmente el efecto de la IIU y adicionalmente se observó el incremento del impulso colgante comparado con el grupo Control en 46.12 ± 13.12 % (**P* = 0.0169) en el grupo IIU+Tau y en 58.55 ± 8.9 % (****P* = 0.0004) en el grupo Zn+IIU+Tau (**Fig. 5D**).

La prueba de suspensión de las extremidades anteriores realizada en las ratas de edad P13 mostró que la IIU disminuyó la latencia de caída en 35.32 ± 9.52 % (***P* = 0.0062) en comparación con el grupo Control s/t. El tratamiento con el precondicionamiento de zinc prolongó la latencia de caída (62.36 ± 19.26 %, **P* = 0.0214) en comparación con el Control s/t y previno por completo el efecto inducido por la IIU. La taurina sola o combinada con zinc impidió el efecto de la IIU y además aumentó la latencia caída en 37.42 ± 8.0 % (***P* = 0.0026; IIU+Tau) y 77.5 ± 12.17 % (****P* = 0.0001; Zn+IIU+Tau) en comparación con el grupo Control s/t. En comparación con el grupo IIU, el aumento de la latencia de caída fue de 78.13 ± 14.06 % (††*P* = 0.0037) en el grupo Zn+IIU, 112.48 ± 12.4 % (†††*P* = 0.0001) en el grupo IIU+Tau, y 174.42 ± 18.81% (†††*P* < 0.0001) en el grupo Zn+IUI+Tau (**Fig. 6A**).

La prueba de impulso colgante de suspensión de los miembros anteriores mostró un patrón similar a la latencia de caída en todos los grupos. La disminución del impulso colgante en el grupo IIU fue de 37.88 ± 10.2 % (***P* = 0.0075). Los otros grupos mostraron un aumento en el impulso colgante que fue de 36.88 ± 12.20 % (**P* = 0.0214) en el grupo Zn, de 45.62 ± 16.30 % (**P* = 0.0426), en el grupo IIU+Tau y de 59.03 ± 15.42 % (****P* = 0.0003) en el grupo Zn+IIU+Tau comparados con el

grupo Control s/t. Una vez más, la administración precondicionante de zinc impidió la disminución inducida por IIU en el impulso colgante (**Fig. 6B**).

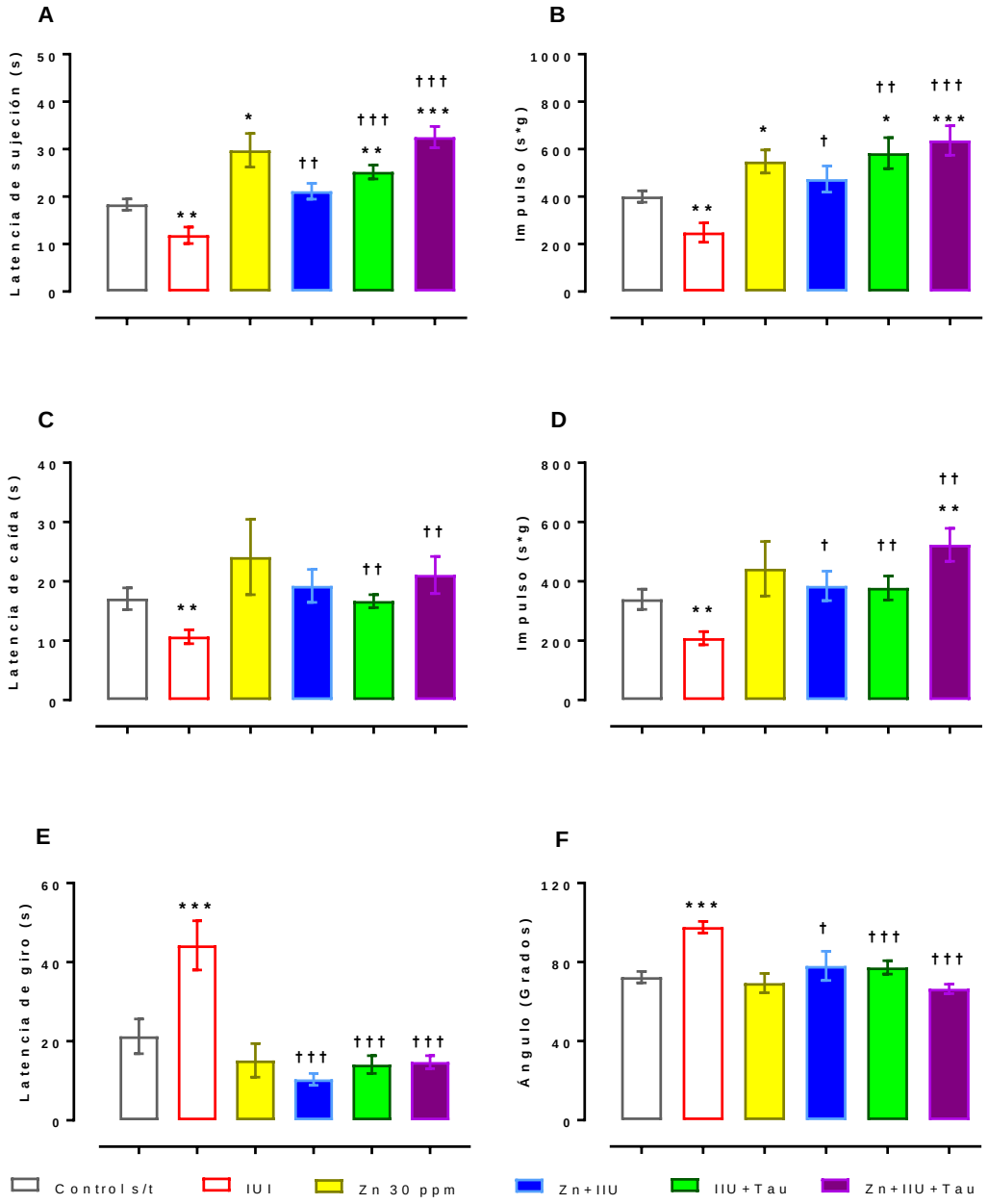


Figura 6. El efecto de la administración de precondicionamiento de zinc y el tratamiento terapéutico con taurina en las alteraciones de la suspensión de las extremidades anteriores y posteriores, geotaxis negativa y ángulo de la marcha inducidas por la isquemia intrauterina. Los valores son el promedio ± SEM (n = 5 a 8). ***P* < 0.05. Kruskal-Wallis de comparaciones múltiples y post hoc de Dunn versus el Control s/t. **†** comparado con el IIU analizado por la prueba U de Mann-Whitney. s: segundo; s∗g: segundo × gramos.

La prueba de suspensión de las extremidades inferiores de los individuos P13 mostró que IIU también disminuyó la latencia de caída en 37.56 ± 6.9 % (******P = 0.0036) en comparación con el grupo Control s/t. El grupo de zinc no modificó significativamente la latencia de caída. En comparación con el grupo de IIU, los tratamientos de taurina sola (56.25 ± 10.35 %, **††**P = 0.0023) o combinado con la administración precondicionante de zinc (97.57 ± 29.44 %, **††**P = 0.0072) impidiendo la disminución en la latencia de caída inducida por IIU (**Fig. 6C**).

La prueba del impulso colgante evaluado por la suspensión de las extremidades traseras mostró un patrón similar a la latencia de caída. La disminución del impulso colgante en el grupo IIU fue de 46.34 ± 5.7 % (******P = 0.0059). Este efecto se logró evitar en los grupos Zn+IIU (84.51 ± 23.7 %, **†**P = 0:0165), IIU+Tau (81.22 ± 19.23 %, **††**P = 0.0011) y Zn+IIU+Tau (151 ± 26.54 %, **†††**P = 0.0012) comparados con el grupo IIU. Además, la taurina combinada con zinc también aumentó el impulso colgante en 34.66 ± 14.23 % (*****P = 0.0053) sobre el grupo Control s/t (**Fig. 6D**).

La prueba de geotaxis negativa mostró diferencias en la latencia de giro entre los grupos en el día P12. La IIU aumentó la latencia de giro en 108.23 ± 29.24 % (*****P = 0.026) en comparación con el grupo Control s/t. Todos los tratamientos previnieron eficazmente el efecto inducido por la IIU (**Fig. 6E**).

La prueba de ángulo de las extremidades traseras en P14 mostró que IIU aumentó el ángulo de marcha en 35.04 ± 4.07 % (*******P = 0.0001) en comparación con el grupo Control s/t. Todos los tratamientos impidieron por completo el efecto inducido por IIU en el ángulo de la marcha. Mientras que no hubo efectos causados por la administración de zinc de precondicionamiento (**Fig. 6F**).

El análisis JEPEF mostró fielmente la eficacia de los tratamientos en la prevención y mejora de la discapacidad motora inducida por la IIU (Tabla 3). El grupo IIU mostró una puntuación igual a 0, mientras que todos los tratamientos tuvieron una puntuación total igual a 10, lo que indica prevención de la discapacidad motora. Mientras que, puntuaciones superiores a 10 indicaron la capacidad de mejorar el rendimiento motor. En consecuencia, se otorgó una puntuación igual 10

para la administración precondicionante de zinc, demostrando que este tratamiento impidió el deterioro motor inducido por la IIU. Por su parte, la puntuación más alta se le otorgo al tratamiento individual de taurina (14) o a la combinación de taurina con zinc (15). Por lo tanto, el mejor tratamiento fue la combinación del precondicionamiento de zinc con taurina terapéutica porque muestra una mejor la capacidad en la recuperación motora respecto a los otros tratamientos. La administración precondicionante de zinc mejora la capacidad motora de los sujetos sanos (Tabla 3).

Tabla 3. Jerarquización del efecto protector de estrategias farmacológicas (JEPEF) en la recuperación motora.

Edad (P)	Prueba	IIU	Zn	Zn+IIU	IIU+Tau	Zn+IIU+Tau
5	Enderezamiento corporal	0	1	1	1	1
9	Aversión a la altura	0	2	1	1	1
11	Fuerza de sujeción	0	2	1	2	2
11	Impulso colgante	0	2	1	2	2
12	Geotaxis negativa	0	1	1	1	1
13	Suspensión de los miembros superiores	0	2	1	2	2
13	Impulso colgante	0	2	1	2	2
13	Suspensión de los miembros inferiores	0	1	1	1	1
13	Impulso colgante	0	1	1	1	2
14	Angulo de los miembros inferiores	0	1	1	1	1
	Total	**0**	**14**	**10**	**14**	**15**

Estrés nitrosativo en corteza temporoparietal e hipocampo P15

Nuestros resultados mostraron que la IIU creó un entorno prooxidante en la corteza temporoparietal. En consecuencia, la IIU incrementó los niveles de nitritos en 67.78 ± 10.03 % (**P = 0.0021) **(Fig. 7A**) y de MDA & 4-HDA en 247.28 ± 97.84 % (**P = 0.0066) **(Fig. 7C**) en comparación con el grupo Control. Todos los tratamientos previnieron el aumento en los niveles de nitritos (**Fig. 7A**) y MDA & 4-HDA (**Fig. 7C**) inducidos por la IIU.

En el hipocampo, la IIU aumentó los niveles de nitritos en 39.34 ± 9.12 % (**P = 0.0048) (**Fig. 7B**) y niveles de MDA & 4-HDA en 177.13 ± 55.73 % (*P = 0.0106) en comparación con el grupo Control s/t (**Fig. 7D**). Todos los tratamientos impidieron el efecto inducido por IIU sobre los nitritos (**Fig. 7B**) y los niveles de MDA & 4-HDA (**Fig. 7D**). A excepción del grupo Zn+IIU+Tau en el que se observó el incremento de nitritos en 109.67 ± 17.48 % (***P = 0.0001) comparado con el grupo Control s/t (**Fig. 7B**).

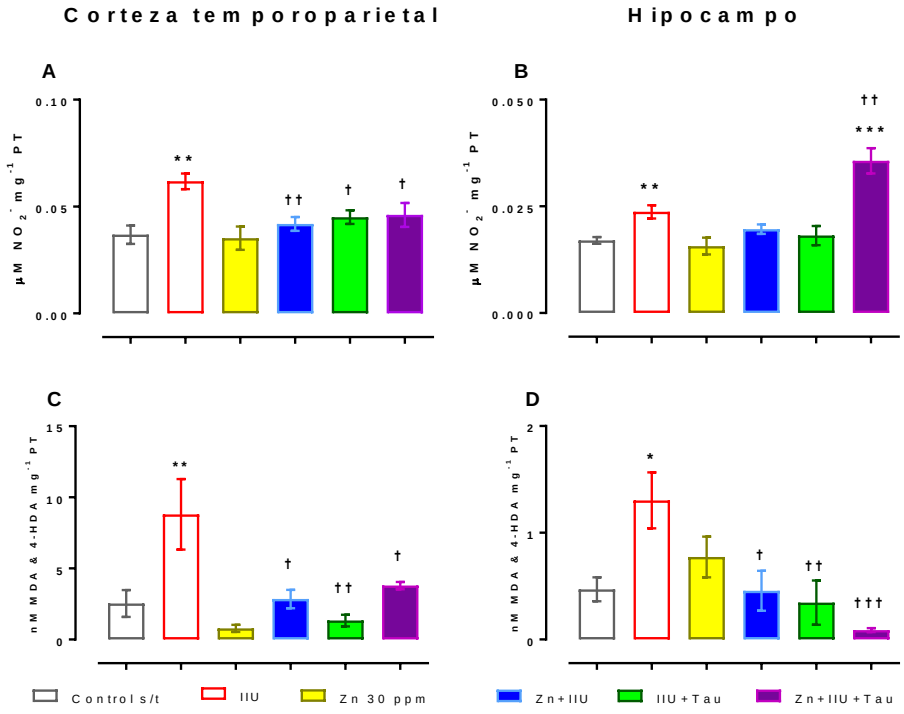


Figura 7. La suplementación de zinc solo o en combinación con taurina disminuyó el estrés nitrosativo inducido por la isquemia intrauterina en el día P15. Los valores representan el promedio ± SEM (n = 5). ∗P < 0.05 en comparación con el grupo Control s/t; †P < 0.05 en comparación con el grupo IIU. ANOVA de una vía, post hoc de Dunnett.

Actividad antioxidante en corteza temporoparietal e hipocampo P15

En la corteza temporoparietal, la IIU redujo la actividad de SOD en 88.19 ± 5.65 % (**P = 0.0032) (**Fig. 8A**). La administración precondicionante de zinc no modificó este efecto. En cambio, la taurina sola o combinada con zinc impidió el efecto de la IIU y aumentó la actividad SOD en comparación con el grupo Control s/t. El aumento fue de 1438.6 ± 233.32 % (†††P = 0.0001) en el grupo IIU+Tau y de 2324.93 ± 204.63 % (†††P = 0.0001) en el grupo Zn+IIU+Tau comparados con el

grupo Control s/t. El grupo de zinc no mostró diferencia estadística en comparación con el Control grupo s/t (**Fig. 8A**).

La IIU también redujo la actividad CAT en 65.61 ± 6.8 % (***P* = 0.0006). Sólo la administración precondicionante de zinc combinado con el tratamiento con taurina impidió la disminución de la actividad CAT inducida por la IIU (**Fig. 8C**).

En el hipocampo, la IIU disminuyó la actividad de SOD (**Fig. 8B**) por 86.20 ± 2.72 % (***P* < 0.0001) y la actividad de la Cat (**Fig. 8D**) por 56.67 ± 8 % (***P* = 0.0004). Todos los tratamientos no lograron modificar la disminución inducida por IIU en las actividades de la SOD y la CAT (**Fig. 8B** y **8D**). El precondicionamiento de la administración de zinc disminuyó la actividad de CAT en 34.65 ± 6.8 % (**P* = 0.032) comparado con el Control (**Fig. 8D**).

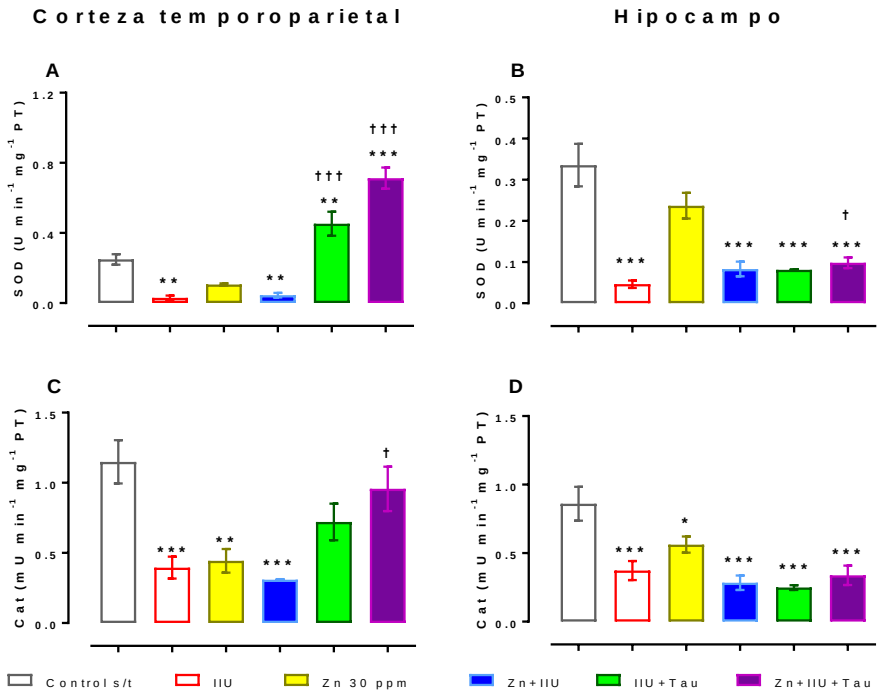


Figura 8. El efecto de la administración precondicionante de zinc y el tratamiento terapéutico con taurina en la actividad antioxidante inducida por la isquemia intrauterina en el día P15. Los valores representan el promedio ± SEM (n = 5). **P* < 0.05 comparado con el Control s/t; † comparado con el grupo IIU. ANOVA de una vía y post hoc de Dunnett.

En la corteza temporoparietal, la IIU disminuyó la actividad de la GPx (28.96 ± 3.2 %; **P* = 0.0287, **Fig. 9A**) y los niveles de GSH (98.23 ± 0.52 %, ***P* < 0.0001,

Fig. 9C) y aumentó los niveles de GSSG (102.35 ± 5.91 %, ***P* = 0.008, **Fig. 9E**) y el índice GSSG/GSH (**Fig. 9G**) en comparación con el grupo Control s/t.

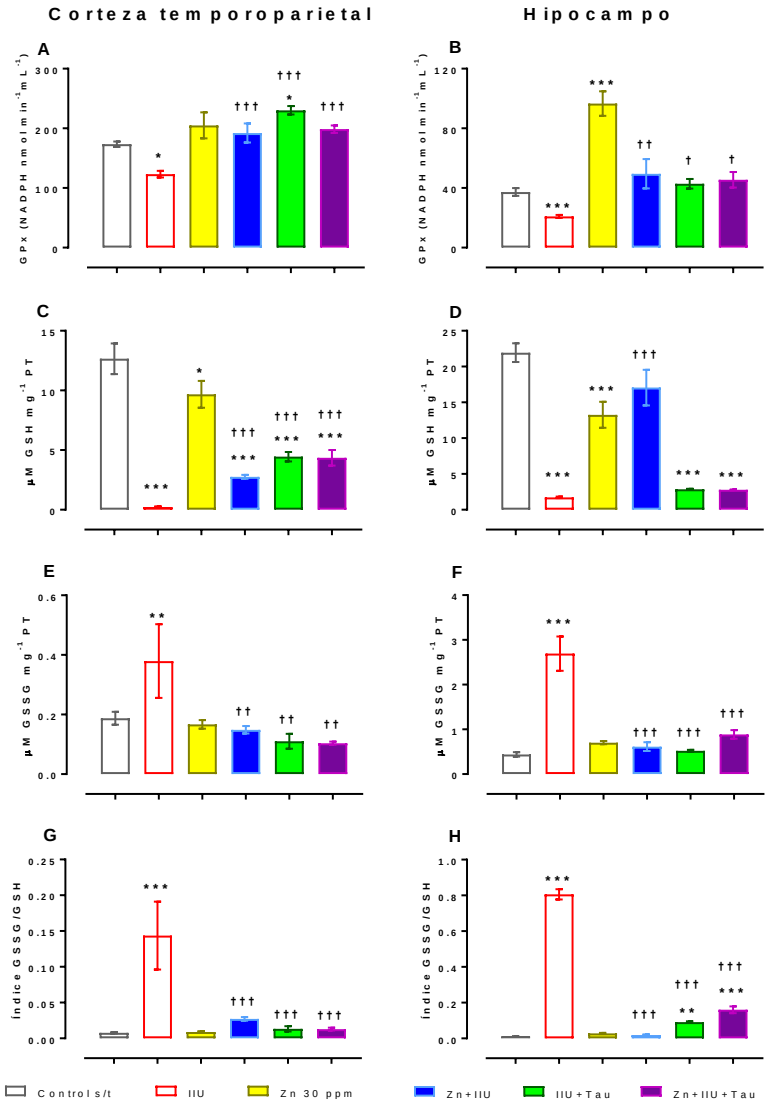


Figura 9. La administración precondicionante de zinc y el tratamiento terapéutico con taurina aumentaron la capacidad antioxidante del sistema glutatión-GPx en la isquemia intrauterina en el día P15. Los valores representan el promedio ± SEM (n = 5). ∗P < 0.05 comparado con el Control s/t; † comparado con el grupo IIU. ANOVA de una vía, post hoc de Dunnett.

Todos los tratamientos individuales o combinados impidieron por completo los efectos de la IIU sobre la actividad de GPx y los niveles de GSSG y el GSSG/GSH proporción (**Fig. 9A**, **9E** y **9G**), además se observó un efecto parcial sobre los niveles de GSH (**Fig. 9C**). En comparación con el grupo IIU, el aumento en los niveles de GSH fue de 123.45 ± 13.57 % (†*P* = 0.0379) en el grupo Zn+IIU,

de 260.26 ± 32.13 % (†††*P* < 0.0001) en el grupo IIU+Tau, y de 252.59 ± 53.27 % (†††*P* = 0.0001) en el grupo Zn+IIU+Tau (**Fig. 9C**).

En el hipocampo, la IIU redujo la actividad de GPx en 43.89 ± 2.65 % (******P = 0.0004, **Fig. 9B**) junto con los niveles de GSH (92.39 ± 1.06 %, *******P < 0.0001, **Fig. 9D**), pero aumentó los niveles de GSSG (511.01 ± 86.99 %, *******P < 0:0001, **Fig. 9F**) en comparación con el Control s/t. Una vez más, todos los tratamientos individuales o combinados impidieron el efecto de la IIU en la actividad de la GPx y los niveles de GSSG (**Fig. 9B** y **9F**). Solo la administración de Zn evitó una disminución del nivel de GSH (**Fig. 9D**) y un aumento de la relación GSSH/GSH (**Fig. 9H**). Este último efecto fue sólo parcial en los tratamientos con taurina individual (88.70 %) o combinada con el zinc (80.1 %) comparado con el Control s/t (**Fig. 9H**).

Enzimas del metabolismo energético en corteza temporoparietal e hipocampo P15

En la corteza temporoparietal, la IIU disminuyó la actividad basal de AST en 30.77 ± 9.4 % (*****P = 0.0124) (**Fig. 10A**) y aumentó la actividad basal de la ALT por 19.85 ± 6.57 % (*****P = 0.0251) (**Fig. 10C**). El precondicionamiento con la administración de zinc solo impidió el efecto de la IIU sobre la actividad de ALT, mientras que el tratamiento con taurina bloqueó el efecto inducido por la IIU tanto en AST como en ALT (**Fig. 10A** y **10C**) y causó una disminución adicional en la actividad de ALT por 25.93 ± 4.33 % (******P = 0.0029) comparado con el grupo Control s/t. Sin embargo, la administración combinada de zinc y de taurina no cambió el efecto de la IIU sobre la AST, pero bloqueó el efecto sobre la actividad de ALT (**Fig. 10A** y **10C**). La actividad basal de LDH no se vio afectada por la IIU y los tratamientos, aunque se encontró que disminuyó en un 40.23 ± 2.75 % (*******P = 0.0001) en el grupo Zn+IIU+Tau (**Fig. 10E**). El precondicionamiento de la administración de zinc no modificó la actividad basal de las tres enzimas estudiadas (**Fig. 10A**, **10C** y **10E**).

En comparación con el grupo Control s/t, la IIU disminuyó los tres índices estudiados: es decir, AST/ALT (**Fig. 10B**) por 40.17 ± 10.27 % (*****P = 0.0021),

LDH/ALT (20.40 ± 3.85 %, $^{**}P$ = 0.0042, **Fig. 10D**) y AST/LDH (20.40 ± 3.85 %, $^{**}P$ = 0.0011, **Fig. 10F**). Sólo la administración de taurina evitó significativamente el efecto inducido por la IIU en todos los índices (**Fig. 10B**, **10D** y **10F**) y produjo un aumento adicional del índice AST/ALT (64.04 ± 16.38 %, $^{***}P$ = 0.0003, **Fig. 10B**), el índice LDH/ALT en 28.34 ± 10.24 % ($^{*}P$ = 0.0133, **Fig. 10D**) y el índice AST/LDH en 29.29 ± 14.14 % ($^{*}P$ = 0.0376, **Fig. 10F**) comparados con el grupo Control s/t.

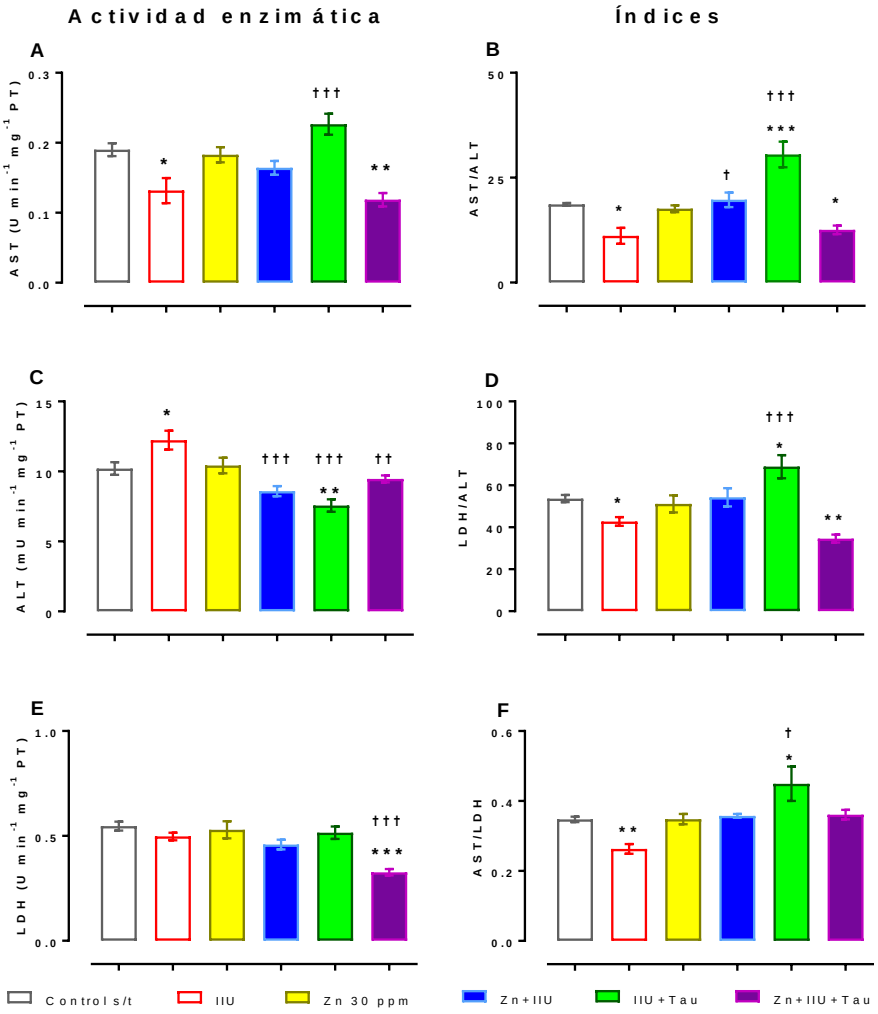


Figura 10. La suplementación combinada de zinc y taurina recupera el efecto inducido por isquemia intrauterina sobre el metabolismo celular en la corteza temporoparietal en el día P15. Los valores representan el promedio ± SEM (n = 5). $^{*}P$ < 0.05 comparado con el Control s/t; † comparado con IIU. ANOVA de una vía post-hoc de Dunnett.

En el hipocampo, la IIU disminuyó la actividad de AST (**Fig. 11A**) en 47.03 ± 4.76 % ($^{***}P$ = 0.0002) y la actividad de la LDH en 43.58 ± 4.10 % ($^{***}P$ = 0.0001) (**Fig. 11E**), pero no afectó a la actividad de la ALT (**Fig. 11C**). Todos los tratamientos

fallaron en prevenir el efecto de la IIU sobre la actividad de la AST y la ALT. La IIU también disminuyó el índice AST/ALT en 34.48 ± 5.84 % (**P* = 0.0412) (**Fig. 11B**) y el índice LDH/ALT en 35.02 ± 7.45 % (**P* = 0.0204, **Fig. 11D**), pero no modificó el índice AST/LDH en comparación con Control s/t (**Fig. 11F**).

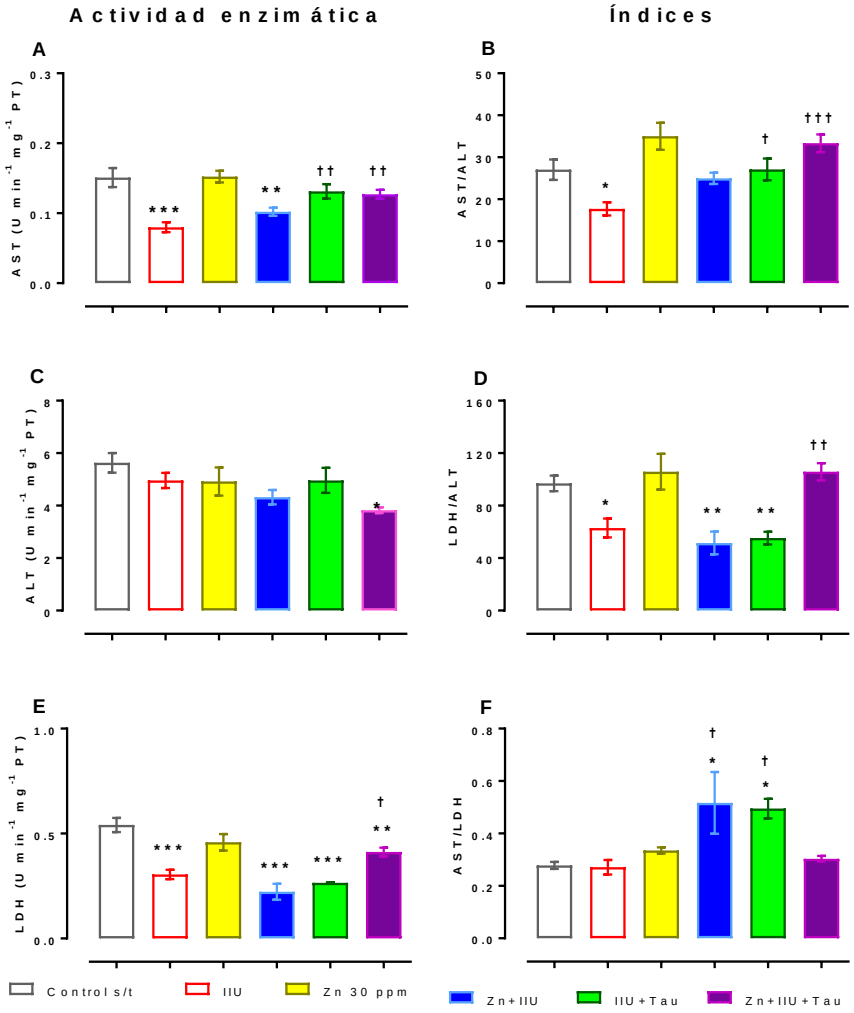


Figura 11. La suplementación combinada de zinc y taurina recupera el efecto inducido por isquemia intrauterina sobre el metabolismo celular en el hipocampo en el día P15. Los valores representan el promedio ± SEM (n = 5). ⁎*P* < 0.05 comparado con el Control s/t; † comparado con IIU. ANOVA de una vía post-hoc de Dunnett.

La administración precondicionante de zinc impidió significativamente el efecto de la IIU solo en el índice AST/LDH, que aumentó adicionalmente en un 90.47 ± 43.41 % (†*P* = 0.0409) en comparación con el Control s/t (**Fig. 11F**). Del mismo modo, la administración terapéutica de taurina bloqueó la disminución inducida por la IIU en el índice AST/ALT (**Fig. 11B**) e incremento el índice AST/LDH en 82.51 ±

13.76 % (†*P* = 0.0498) (**Fig. 11F**). Ningún tratamiento individual (zinc o taurina) evitó el efecto IIU en el índice LDH/ALT (**Fig. 11D**). Sin embargo, la administración combinada de zinc y taurina previno el efecto de la IIU sobre los índices AST/ALT (**Fig. 11B**) y LDH/ALT (**Fig. 11D**).

Batería de pruebas motoras (P29 y P30)

La prueba de la viga (P29) mostró que la IIU causó una alteración motora que provocó el incremento de la latencia de llegada al extremo superior del az en 517.22 ± 59.77 % (**P* = 0.001) (**Fig. 12A**), el número de claudicaciones en 137.5 ± 14.23 % (**P* = 0.0286) (**Fig. 12B**) y de retornos al inicio del az en 326.37 ± 49.46 % (***P* = 0.0026) (**Fig. 12C**) comparado con el Control s/t. El precondicionamiento de zinc (Zn+IIU) previno en 68.01 ± 18.46 % (†*P* = 0.0395) el incremento en el número de retornos al inicio de la viga causado por la IIU (**Fig. 12C**). La taurina (IIU+Tau) retornó completamente a los niveles basales en la prueba de la viga (**Fig. 12A**, **12B** y **12C**). El precondicionamiento de zinc combinado con la taurina (Zn+IIU+Tau) disminuyó la latencia de llegada por 77.92 ± 6.39 % (††*P* = 0.0089) (**Fig. 12A**) y el número de retornos (68.01 ± 20.41 %, †*P* = 0.0395) comparado con el grupo IIU (**Fig. 12C**).

La prueba de inversión en P30 mostró que la IIU causó la reducción en la latencia de sujeción (47.45 ± 8.34 %, ***P* = 0.0066) (**Fig. 13A**) y el impulso colgante 59.60 ± 5.57 %, **P* = 0.0179) (**Fig. 13B**), comparado con el grupo Control s/t. Todos los tratamientos evitaron el daño motor inducido por la IIU sobre la resistencia de las extremidades (**Fig. 13A** y **13B**).

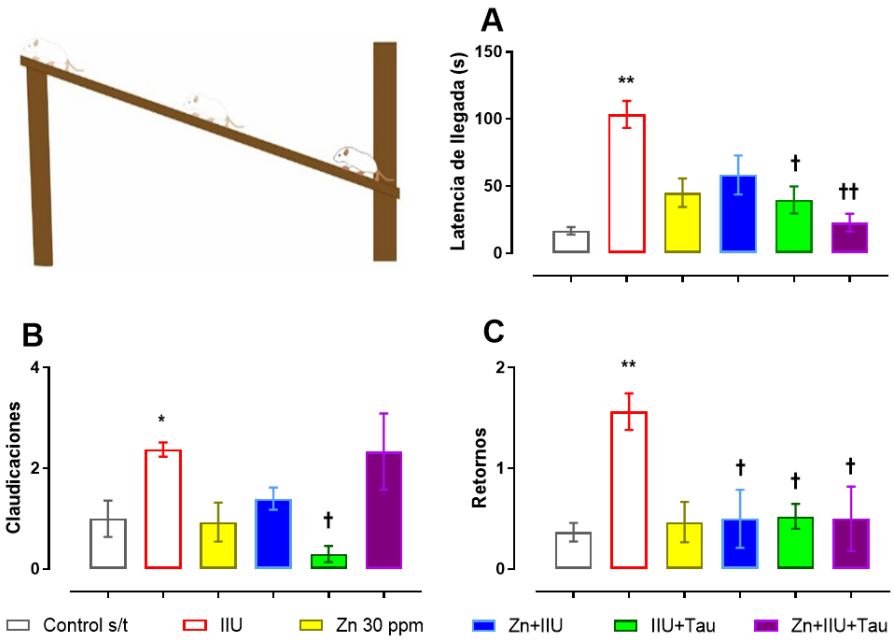


Figura 12. El efecto de la administración de precondicionamiento de zinc y el tratamiento terapéutico con taurina en las alteraciones motoras inducidas por la isquemia intrauterina evaluadas con la prueba de la viga (P29). Los valores son el promedio ± SEM (n = 5 a 7). *****$P < 0.05$. Kruskal-Wallis de comparaciones múltiples y post hoc de Dunn versus el Control s/t. **†** comparado con el IIU analizado por la prueba U de Mann-Whitney.

La prueba de campo abierto en P30 mostró que la IIU causó una alteración en la actividad motora y reactividad emocional al disminuir el número de visitas al centro (41.66 ± 4.81 %, $^{*}P = 0.0138$) (**Fig. 14A**), la actividad vertical (57.07 ± 1.68 %, $^{**}P = 0.0086$) (**Fig. 14B**), la distancia recorrida total (34.47 ± 5.38 %, $^{**}P = 0.0074$) (**Fig. 14C**) e incrementó el número de toques a la pared (66.09 ± 14.20 %, $^{*}P = 0.0188$) (**Fig. 14D**) comparado con el grupo Control s/t. El zinc precondicionante (Zn+IIU) no fue capaz de prevenir totalmente el efecto de la IIU debido a que redujo los erguidos (44.23 ± 7.33 %, $^{*}P = 0.0116$) (**Fig. 14B**) comparado al Control s/t; sin embargo, evitó en un 48.14 ± 4.27 % ($^{\dagger}P = 0.0158$) los toques a la pared comparado con el grupo IIU (**Fig. 14D**). La taurina individual (IIU+Tau) logró prevenir el desorden en la actividad motora inducido por la IIU (**Fig. 14A**, **14B** y **14D**). La combinación del zinc precondicionante y la taurina terapéutica (Zn+IIU+Tau) pudo evitar el daño causado por la IIU sobre actividad motora reflejado en el incremento en el número de visitas al centro (166.66 ± 50.39 %, $^{\dagger}P = 0.0169$) (**Fig. 14A**) y la distancia recorrida (59.24 ± 4.59 %, $^{\dagger}P = 0.0071$) (**Fig. 14D**).

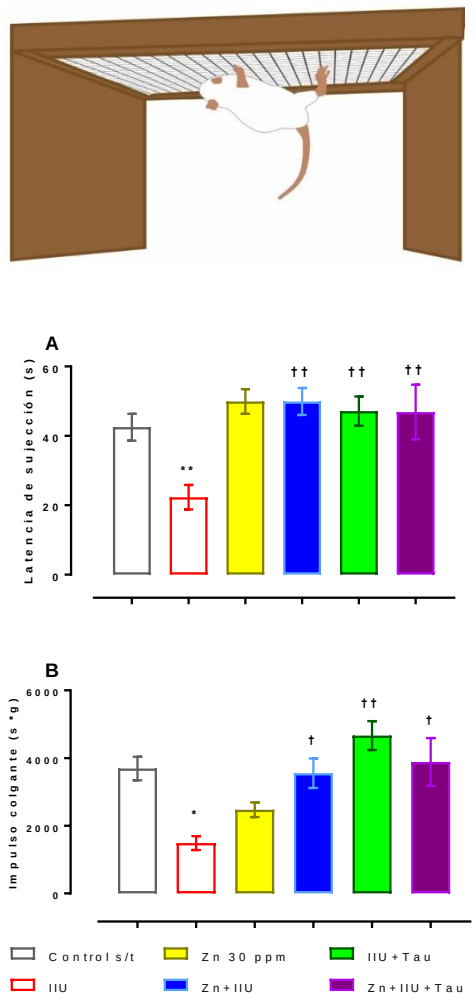


Figura 13. El efecto de la administración de precondicionamiento de zinc y el tratamiento terapéutico con taurina en la resistencia de las extremidades inducidas por la isquemia intrauterina en el día P30. Los valores son el promedio ± SEM (n = 5 a 7). *$P < 0.05$. Kruskal-Wallis de comparaciones múltiples y post hoc de Dunn versus el Control s/t. † comparado con el IIU analizado por la prueba U de Mann-Whitney.

Los resultados obtenidos en el curso temporal hasta el día P29 y P30 y el análisis JEPEF muestran que los tratamientos continúan ejerciendo un efecto neuroprotector al prevenir la discapacidad motora causada por la IIU. El grupo IIU mostró un puntaje igual a 0 y todos los tratamientos tuvieron un puntaje mayor o igual a 8, lo que sugiere un efecto neurorrestaurador. Por lo tanto, el tratamiento precondicionante de zinc (Zn+IIU) logró evitar el deterioro de la actividad motora. Los tratamientos de taurina individual (IIU+Tau) (9) o combinado con el precondicionamiento de zinc (Zn+IIU+Tau) (9) tuvieron el puntaje más alto, ambos

grupos mostraron una mejoría motora global. Mientras que la administración de zinc conserva el desempeño motor en los sujetos sanos (Tabla 4).

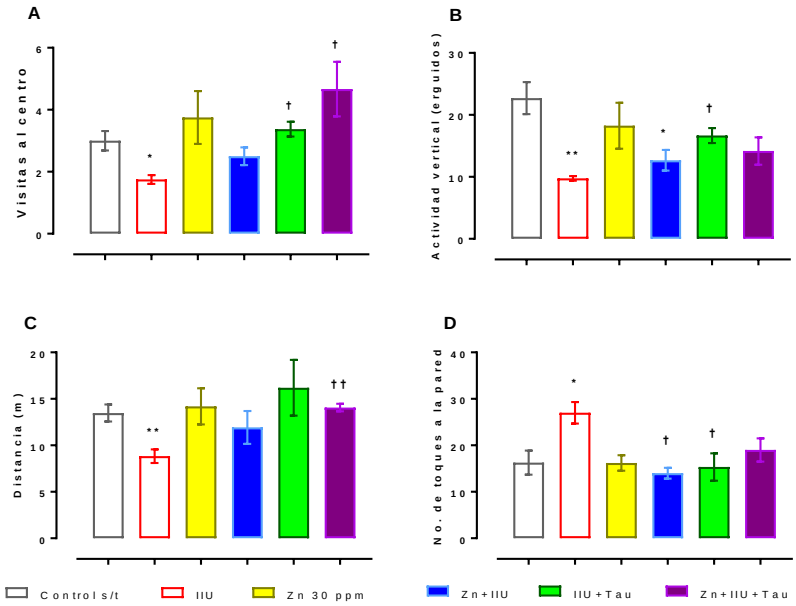


Figura 14. El efecto de la administración de precondicionamiento de zinc y el tratamiento terapéutico con taurina en las alteraciones motoras inducidas por la isquemia intrauterina (P30). Los valores son el promedio ± SEM (n = 5). *P < 0.05. Kruskal-Wallis de comparaciones múltiples y post hoc de Dunn versus el Control s/t. † comparado con el IIU analizado por la prueba U de Mann-Whitney.

Tabla 4. Jerarquización del efecto protector de estrategias farmacológicas (JEPEF) en la recuperación motora.

Edad (P)	Prueba	IIU	Zn	Zn+IIU	IIU+Tau	Zn+IIU+Tau
	Escalamiento	0	1	1	1	1
	Claudicaciones	0	1	1	1	1
29	Retornos	0	1	1	1	1
	Fuera de agarre	0	1	1	1	1
	Impulso colgante	0	1	1	1	1
	Conducta de riesgo	0	1	1	1	1
	Erguidos	0	1	0	1	1
30	Actividad motora	0	1	1	1	1
	Exploración	0	1	1	1	1
	Total	**0**	**9**	**8**	**9**	**9**

Estrés nitrosativo en corteza cerebral, núcleos subcorticales y tallo cerebral P30

Los resultados muestran que el modelo de daño intrauterino causó el incremento (65.14 ± 21.53 %, $^{*}P$ = 0.0458) de los niveles de nitritos en la corteza temporoparietal (**Fig. 15A**) y la reducción de MDA y 4-HDA (64.91 ± 10.57 %, $^{*}P$ = 0.0256) respecto al Control s/t (**Fig. 15D**). El precondicionamiento con zinc en los individuos sanos (Zn 30 ppm) disminuyó en 48.06 ± 10.22 % ($^{*}P$ = 0.026) los nitritos respecto al grupo Control s/t (**Fig. 15A**). Los tratamientos precondicionantes individual del zinc (Zn+IIU) o combinado con la taurina (Zn+IIU+Tau) previnieron el incremento de los niveles de nitritos en 40.84 ± 7.56 % ($^{\dagger}P$ = 0.0398) y 47.41 ± 7.63 % ($^{\dagger}P$ = 0.0138), respectivamente comparados con el grupo IIU (**Fig. 15A**). Sin embargo, en los tratamientos individuales de precondicionamiento con zinc (Zn+IIU) y terapéutico de taurina (IIU+Tau) mostraron el incremento en los niveles de MDA y 4-HDA, comparados con el grupo IIU (**Fig. 15D**).

En los núcleos subcorticales, la IIU aumentó los nitritos (43.83 ± 4.55 %, $^{**}P$ = 0.0038) (**Fig. 15B**) y produjo la reducción de los niveles de MDA & 4-HDA (57.94 ± 3.41 %, $^{**}P$ =0.0011) comparado con el Control s/t (**Fig. 15E**). El precondicionamiento del zinc (Zn+IIU) mantuvo el incremento de los nitritos (34.29 ± 4.82 %, $^{*}P$ = 0.0495) respecto al Control s/t (**Fig. 15B**), también se observó un incremento en los niveles de la lipoperoxidación de 42.70 ± 21.33 % ($^{\dagger}P$ = 0.0385) comparado con el grupo IIU (**Fig. 15E**). El tratamiento terapéutico de taurina individual (IIU+Tau) evitó el efecto inducido por la IIU sobre los nitritos en 33.58 ± 6.11 % ($^{\dagger\dagger\dagger}P$ = 0.0002) (**Fig. 15B**) y aumento los niveles de MDA & 4-HDA (73.27 ± 6.55 %, $^{\dagger\dagger\dagger}P$ = 0.0004) comparado con el grupo IIU (**Fig. 15E**). Mientras que la combinación del precondicionamiento de zinc y la taurina terapéutica (Zn+IIU+Tau) bloqueó el incremento de los nitritos inducido por la IIU (**Fig. 15B**) y produjo la reducción de los niveles de MDA y 4-HDA (39.30 ± 15.53 %, $^{*}P$ = 0.0399) respecto al grupo Control s/t (**Fig. 15E**).

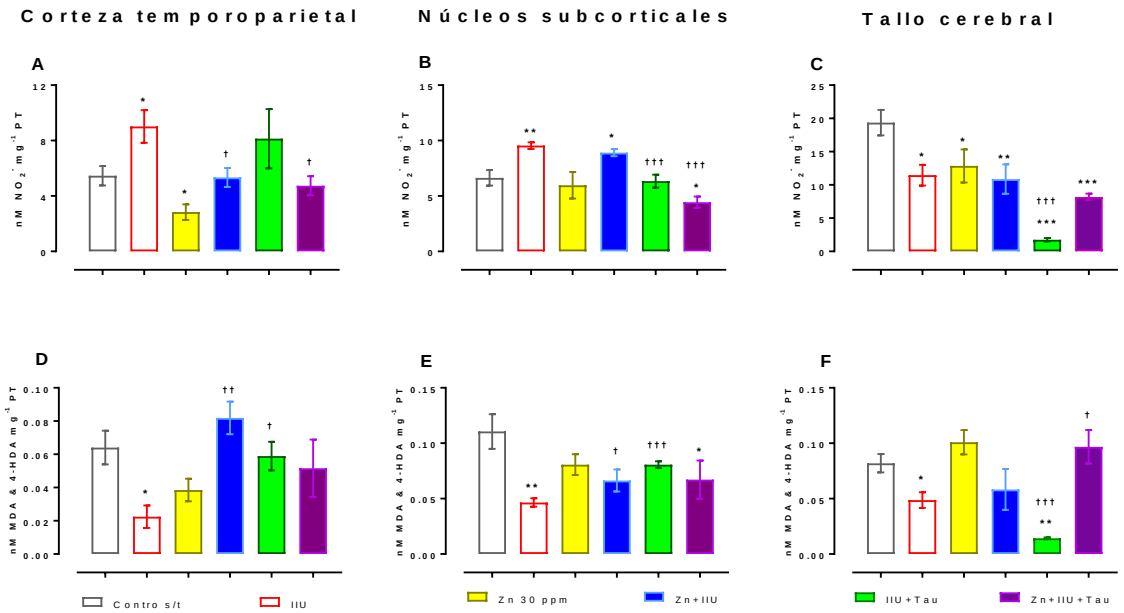


Figura 15. La suplementación combinada de zinc y taurina recupera el efecto inducido por isquemia intrauterina sobre el estrés nitrosativo en corteza temporoparietal, núcleos subcorticales y tallo cerebral en el día P30. Los valores representan el promedio ± SEM (n = 5). ∗*P* < 0.05 comparado con el Control s/t; †comparado con IIU. ANOVA de una vía post-hoc de Dunnett.

En el tallo cerebral, la IIU provocó la reducción de nitritos (40.78 ± 8.06 %, $^{*}P$ = 0.0208) (**Fig. 15C**) y de la lipoperoxidación (40.60 ± 8.67 %, $^{*}P$ = 0.016) (**Fig. 15F**) respecto al Control s/t. Todos los tratamientos lograron mantener disminuidos los niveles de nitritos respecto al Control s/t (**Fig. 15C**). Mientras que comparado con el grupo IIU, el tratamiento de taurina individual (IIU+Tau) evitó el aumento de nitritos (**Fig. 15C**) y de MDA & 4-HDA (**Fig. 15F**). El tratamiento combinado de zinc y taurina (Zn+IIU+Tau) incrementó los niveles de MDA & 4-HDA comparado con el grupo IIU (**Fig. 15F**).

Actividad antioxidante en corteza temporoparietal, núcleos subcorticales y tallo cerebral P30

La IIU provocó un déficit en la actividad antioxidante en la corteza temporoparietal (**Fig. 16A, D y G**). El tratamiento control de zinc (Zn 30 ppm) no mostró alteraciones en la actividad de la SOD y GPx respecto al Control s/t, pero disminuyó la actividad de la catalasa en un 61.53 ± 8.85 % ($^{*}P$ = 0.0381) (**Fig. 16D**). El precondicionamiento de zinc (Zn+IIU) previno el déficit en la actividad de la SOD

ante el efecto causado por la IIU (**Fig. 16A**), pero mantuvo la disminución en la actividad de la GPx 60.21 ± 8.69 % (***P = 0.0005) comparada con el grupo Control (**Fig. 16G**). La taurina (IIU+Tau) redujo la actividad de la SOD en 44.10 ± 2.19 % (**P = 0.0053) (**Fig. 16A**), además previno el déficit sobre la catalasa causado por la IIU incrementando la actividad en un 268.38 ± 67 % (††P = 0.0034) (**Fig. 16D**) y la actividad de la GPx en 56.35 ± 12.93 % (†P = 0.026) (**Fig. 16G**). El tratamiento del precondicionamiento de zinc y la taurina (Zn+IIU+Tau) causaron la reducción en la actividad enzimática de la SOD por 45.32 ± 5.36 % (**P = 0.0069) (**Fig. 16A**) y la GPx por 50.40 ± 4.10 % (**P = 0.0031) (**Fig. 16G**) comparado con el grupo Control s/t, pero incrementó la actividad de la GPx en 61.77 ± 13.38 % (†P = 0.0192) con respecto a la IIU (**Fig. 16G**).

En los núcleos subcorticales, la IIU causó la disminución en la actividad enzimática de la catalasa (50.24 ± 11.86 %, *P = 0.0322) (**Fig. 16E**) y la GPx (60.61 ± 3.11 %, ***P = 0.0004) (**Fig. 16H**) respecto al grupo Control. La actividad de la GPx se redujo tanto en el grupo control de zinc (Zn 30 ppm) en 47.28 ± 5.07 % (**P = 0.0036) como en el grupo Zn+IIU en 54.12 ± 4.49 % (***P = 0.001) comparado al Control s/t (**Fig. 16H**). La taurina terapéutica previno el déficit antioxidante causado por la IIU en la SOD (26.88 ± 6.56 %, †P = 0.0422) (**Fig. 16B**), catalasa (936.02 ± 197.31 %, †††P = 0.0003) (**Fig. 16E**) y GPx (21.62 ± 7.46 %, ††P = 0.0031) (**Fig. 16H**). Mientras que la combinación del precondicionamiento de zinc y la taurina terapéutica recupero la actividad de la GPx por 110.78 ± 20.07 %, †††P <0.0001) comparado con la IIU (**Fig. 16H**).

En el tallo cerebral, la IIU causó un déficit en la actividad antioxidante (**Fig. 16C, F e I**). El tratamiento con el precondicionamiento de zinc disminuyó la actividad de la catalasa por 70.75 ± 8.40 % (**P = 0.0027) (**Fig. 16F**) y la GPx en 65.79 ± 5.64 % (*P = 0.0159) (**Fig. 16I**) respecto al Control s/t. La taurina no modificó el efecto inducido por la IIU sobre la actividad de la SOD (**Fig. 16C**), también disminuyó la actividad de la catalasa (92.23 ± 1.51, ***P = 0.0002) (**Fig. 16F**) comparado con el grupo Control s/t, pero restauró los niveles de la actividad de la GPx (**Fig. 16I**). El tratamiento combinado del zinc y la taurina causó la reducción en la actividad de la

SOD en 49.96 ± 7.23 % (***P = 0.0003) (**Fig. 16C**) y de la catalasa en 69.56 ± 5.14 % (**P = 0.0032) respecto al grupo Control s/t, (**Fig. 16F**), pero previno la disminución de la actividad de la GPx inducida por la IIU incrementando en 258.38 ± 61.26 % (†††P <0.0001) (**Fig. 16I**).

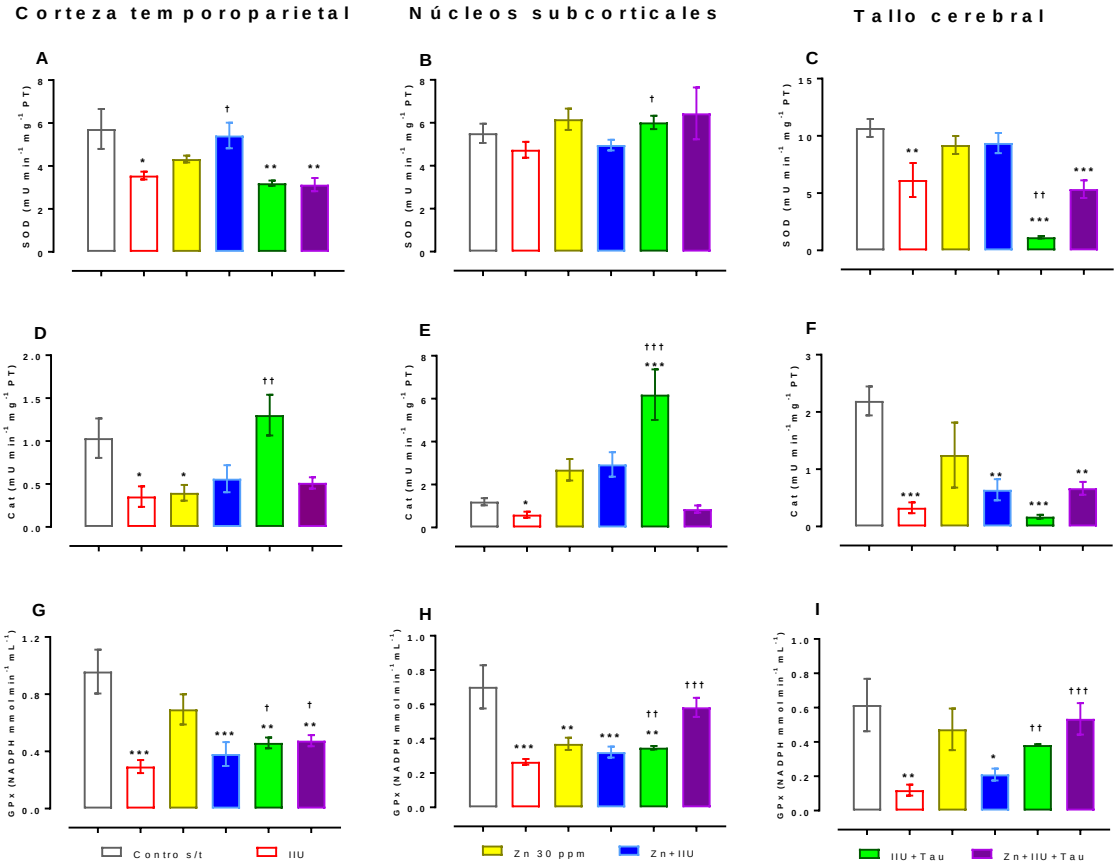


Figura 16. El efecto de la administración precondicionante de zinc y el tratamiento terapéutico con taurina en la disminución de la actividad antioxidante inducida por la isquemia intrauterina en el día P30. Los valores representan el promedio ± SEM (n = 5). ∗P < 0.05 comparado con el Control s/t; †comparado con el grupo IIU. ANOVA de una vía y post hoc de Dunnett.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La IIU causó un incremento progresivo del estrés nitrosativo en la corteza cerebral e hipocampo, asociado con un decremento de la actividad antioxidante y un incremento del ambiente oxidante hasta el día P15, promoviendo la pérdida progresiva del contenido celular, causando una alteración en la actividad motriz que permanece hasta el día P30. Los tratamientos previnieron el estrés nitrosativo, la

perdida de la densidad celular, restaurando parcialmente la actividad antioxidante, y mejorando el ambiente reductor en P15, lo que conduce a la recuperación de la actividad motriz en el día P30.

La IIU aumentó el estrés nitrosativo en el hipocampo en el día P1. Sin embargo, causó la reducción de la densidad celular en las capas LI, LII y LIII, LV y LVI. Mientras que, en el hipocampo el modelo de la IIU causó el incremento del estrés nitrosativo aunado a la reducción de la actividad de la catalasa y de la densidad celular en el hipocampo, también observamos que la corteza y el hipocampo tienen una respuesta celular diferencial frente al daño intrauterino

El cerebro inmaduro es considerablemente susceptible a episodios de hipoxia. La isquemia causa una regulación positiva de la actividad enzimática y la transcripción de las tres isoformas de las sintasas del óxido nítrico (nNOS, iNOS y eNOS) en la corteza cerebral, incrementando el estrés nitrosativo en la fase aguda post-IIU **(Gonzalez-Barrios et al., 2002)**. El estrés nitrosativo promueve un consumo de las enzimas antioxidantes, por lo que, la activación de los sistemas antioxidantes depende de la región cerebral dañada. La IIU disminuyó la actividad de la catalasa lo que conduce al incremento del daño oxidativo **(Armogida et al., 2011),** siendo incapaz de controlar el estrés oxidativo inducido por el H_2O_2 **(Vainshtein et al., 1981, Rong et al., 1999),** sin lograr evitar la disfunción de la barrera hematoencefálica **(Buard et al., 1992),** esto se puede deber a que el hipocampo cuenta con mecanismos antioxidantes no enzimáticos de mayor eficiencia como el glutatión, el α-tocoferol y el ácido ascórbico **(Makar et al., 1994)**.

La IIU provoca una deficiencia antioxidante que promueve el incremento del daño tisular, disrumpiendo la dinámica de la migración tangencial y radial de neuroblastos en el hipocampo **(Zechel et al., 2005, Stevens et al., 2013, Vasilev et al., 2016)**, conduciendo a la incorrecta conexión de redes neuronales entre la corteza cerebral e hipocampo **(DeFelipe and Farinas, 1992)**, además de producir anormalidades estructurales **(Golan et al., 2009, Vasilev et al., 2016)** que conllevan a un déficit motor y cognitivo a largo plazo **(Cai et al., 1998)** que se ve reflejado en los estudios conductuales a lo largo del primer mes de vida.

La suplementación individual de zinc o ante la IIU tuvieron un efecto dependiente de la región cerebral, así como del tipo de estrategia. La administración de zinc en las ratas sanas no mostró cambios en la actividad antioxidante ni daño celular. Sin embargo, ante daño isquémico, el zinc previno el incremento del estrés nitrosativo en ambas regiones, manteniendo la actividad de la SOD o catalasa a niveles basales, sin cambios en la citoarquitectura en la corteza cerebral, pero no así en el hipocampo, donde, el zinc no fue capaz de evitar el daño celular inducido por la IIU en el día P1.

La administración profiláctica de zinc durante la gestación mostró tener un efecto positivo en el desarrollo cerebral durante la gestación. Se ha reportado que el zinc es un bioelemento fundamental en el desarrollo celular, mantiene la proliferación de células madre neurales (NPC) a través de la activación de la vía de señalización de ERK1/2 **(Han et al., 2015b, Adamo et al., 2019)** y su maduración a neuronas glutamatérgicas en la corteza cerebral **(Levenson and Morris, 2011)**. Además, el Zn es capaz de inducir un efecto precondicionante que puede estar acompañado por el incremento del estrés oxidativo, causando un daño subletal en diferentes tipos celulares **(Lee et al., 2015, O'Kane et al., 2018, Perera et al., 2021)**, el cual juega un papel clave en la proliferación, diferenciación y maduración en una gran variedad de células a través de la activación de vías de señalización (c-Jun o MAPKp38) en el desarrollo del SNC **(Coyoy et al., 2013)**, por lo que, la actividad antioxidante (SOD y catalasa) es finamente regulada para no descompensar el desarrollo tisular dependiente del estado redox **(Mavelli et al., 1982)**. Se ha reportado que el Zn ejerce un efecto antioxidante diferencial entre regiones cerebrales **(Doering et al., 2010, Cope et al., 2012),** debido a que el hipocampo es una región rica en neuronas glutamatérgicas que contienen zinc, lo que la hace altamente susceptible al daño hipóxico-isquémico **(Chen et al., 2019)**, produciendo una acumulación de Zn debido a la regulación negativa del transportador ZnT1 y CaMII **(Ni et al., 2009)** en las fibras musgosas, incrementando la excitabilidad de las neuronas glutamatérgicas, favoreciendo el daño por excitotoxicidad **(Elsas et al., 2009)** y promoviendo un déficit antioxidante **(Ben Mimouna et al., 2018)**.

La administración de taurina individual no previno el incremento del estrés nitrosativo, y disminuyó la actividad de la catalasa, pero fue capaz de bloquear el daño tisular en el hipocampo. En la corteza temporoparietal, la taurina incrementó la actividad de la SOD, lo cual podría relacionarse con la prevención del daño tisular en la corteza cerebral, permitiendo ejercer un efecto citoprotector. La estrategia del precondicionamiento de zinc combinada con el tratamiento terapéutico de taurina previenen el incremento del estrés nitrosativo y favorece el incremento de la actividad de SOD total en corteza e hipocampo, evitando la reducción de la densidad celular inducida por la IIU.

Se ha reportado que la taurina regula la actividad y la expresión de la NOS en un modelo de hipertensión inducido por el alto consumo de cloruro de sodio y previene el incremento del estrés oxidativo **(Hu et al., 2009)**, sugiriendo que el NO derivado de la eNOS **(Gregosiewicz, 1978, Cai et al., 1998, Shu et al., 2015)** podría ayudar a promover participar en procesos fisiológicos como la neurogénesis **(Moreno-Lopez et al., 2004)**.

El incremento en la actividad de la SOD en la corteza cerebral inducido por la administración de taurina, podría estar relacionado con la viabilidad celular a través de la activación de la vía de señalización inducida por el factor de crecimiento derivado de la glía (GDNF) en la corteza cerebral y nichos neurogénicos (zonas subventricular y subgranular) **(Liu et al., 2013)**, reduciendo la apoptosis vía caspasa 3 **(Liu et al., 2012a, Liu et al., 2013)**. Además, la taurina tiene un papel importante en la neurogénesis durante el desarrollo embrionario al modular la vía de señalización de Wnt, evitando el desarrollo de defectos del tubo neural (NTD) **(Zhang et al., 2017)**.

El efecto precondicionante del zinc individual **(Maret, 2017)**no es capaz de reducir el estrés nitrosativo, por lo que, se requiere el efecto sumatorio de la administración de taurina para contrarrestar el daño celular. Existen reportes demuestran el efecto de la administración de un complejo taurina-zinc al inducir el incremento en la expresión de la proteína de choque térmico 70 (HSP70) **(Yu et al., 2015)**, un factor fuertemente relacionado con la protección celular ante el daño

isquémico para la prevención de la muerte celular **(Giffard and Yenari, 2004)**, favoreciendo la recuperación motora.

El tratamiento más eficaz en la prevención de discapacidades neuromotoras causadas por la IIU en P15 fue analizado a través de la escala JEPEF, siendo el tratamiento con taurina individual o combinado con la administración profiláctica de zinc que mostraron un mejor efecto preventivo que el zinc individual ante la IIU, recuperando el reflejo de enderezamiento postural (P5) y aversión a la altura (P9). También incrementaron la fuerza muscular de las cuatro extremidades, como lo revelan las pruebas de fuerza de agarre (P11), impulso colgante (P11) y la fuerza de resistencia a la suspensión (P13). Es más, mejoraron la coordinación motora y la marcha, como lo demuestran las pruebas de la geotaxis negativa (P12) y el ángulo de las extremidades traseras durante la marcha (P14). Estas mejoras en el rendimiento motor fueron asociadas con las mejoras bioquímicas en la corteza cerebral e hipocampo en P15, es decir, la recuperación del metabolismo energético (actividad enzimática de AST y ALT), mejorando la actividad antioxidante (SOD, Cat, GPx y GSH) y la disminución de la peroxidación lipídica.

La recuperación de los reflejos primarios en P5 provocados por tratamiento con taurina individual o combinado con la administración profiláctica de zinc sugiere que estos tratamientos previnieron el daño celular causado por la IIU en el giro dorsal de ratas neonatas, como se ha encontrado en otros modelos de obstrucción **(Ten et al., 2003, Teo et al., 2017).** La estabilidad de la marcha, el mantenimiento del equilibrio y la coordinación fueron resultado del aumento en el tono muscular, la fuerza de agarre y una reducción del ángulo en las extremidades posteriores, lo que sugiere una ganancia celular que se extiende a las regiones del cerebro involucradas en el control motor **(Feather-Schussler and Ferguson, 2016)**. Estos resultados en conjunto indican que los tratamientos previnieron la reducción de la densidad celular causada por el estrés oxidativo en las estructuras corticales, talámicas y vestibulares **(Zafeiriou, 2004)**.

El JEPEF mostró que la administración de zinc durante el período gestacional mejoró el rendimiento motor en ratas recién nacidas sanas (puntuación de 14) y

aquellas sometidas a IIU (puntuación de 10). Esta mejora podría resultar del impacto positivo del zinc sobre la neurogénesis embrionaria **(Han et al., 2015b, Li et al., 2018, Adamo et al., 2019)** y en el desarrollo correcto del SNC en roedores jóvenes **(Han et al., 2015b, Adamo et al., 2019)** y humanos **(Castillo-Duran et al., 2001, Pfaender et al., 2016)**. La suplementación oral de zinc ha mostrado reducir la mortalidad de la sepsis neonatal y mejorar el desarrollo mental **(Banupriya et al., 2018)**, mientras que la deficiencia de zinc afecta el desarrollo cognitivo y el comportamiento emocional al reducir la sobreactividad neuronal **(Black, 1998, Bhatnagar and Taneja, 2001, Christian et al., 2010)**. En contraste, otros autores han reportado que los suplementos de zinc en niños mejoran su desarrollo motor y mental **(Gogia and Sachdev, 2012)**. Sin embargo, el zinc combinado con el hierro promueve el desarrollo motor y el comportamiento exploratorio en los infantes **(Black et al., 2004)**. Las proteínas con estructura de dedos de zinc podrían ejercer un efecto celular positivo al mediar la protección inducida por zinc contra el daño isquémico en diferentes niveles. Por ejemplo, ZNF667 o Mipu1 regulan negativamente la expresión génica de Bax **(Wang et al., 2010, Wang et al., 2013, Han et al., 2015a)** activada por mediadores inflamatorios **(Yuan et al., 2013)** y estrés oxidativo **(Yuan et al., 2013, Qu et al., 2014)**. A través de este mecanismo, el zinc inhibe la expresión de Bax **(Wang et al., 2013)** y Fas **(Yuan et al., 2013)**, evitando así la apoptosis. Se ha demostrado que el factor de transcripción con dedo de zinc Egr-1 (ZENK) disminuye el proceso inflamatorio que regula la señalización JAK-STAT dependiente de IL-6 **(Billah et al., 2019)**, mientras que ZFP580 modula la señalización río abajo de ERK1/2 con funciones antiapoptóticas en células miocárdicas **(Meng et al., 2014)**. Además, el Zn regula mecanismos epigenéticos actuando como cofactor de la histona desacetilasa (HDAC) **(Silva et al., 2003)**.

El análisis JEPEF también mostró que la taurina, individual (puntuación de 14) o combinada con zinc (puntuación de 15), tuvo mejor efecto sobre los eventos conductuales que la administración exclusiva de zinc, posiblemente activando mecanismos protectores adicionales. Se ha demostrado que la taurina participa en la diferenciación de las células precursoras de oligodendrocitos (OPC) para producir mielina **(Beyer et al., 2018)** y promueve la producción de diferentes metabolitos de

glutamato y cisteína **(Shimada-Takaura et al., 2017)** para la producción de GSH en la mitocondria **(Lu, 2009)**. La taurina actúa como agonista de los receptores GABA y puede modular la actividad electrofisiológica **(Kilb and Fukuda, 2017)** para proteger contra la lesión muscular inducida por el ejercicio **(Dawson et al., 2002, McLeay et al., 2017)**.

La suplementación con taurina en ratas preñadas no se ha usado como control debido a que esta suplementación causa hiperexcitabilidad y alteraciones en el comportamiento motor en los recién nacidos **(Santora et al., 2013)** y adolescentes **(Vargas-Castro et al., 2022)** modificando la neurotransmisión GABAérgica **(L'Amoreaux et al., 2010)** y glutamatérgica **(Chan et al., 2014)**, ambas fundamentales para el neurodesarrollo **(Fernandez-Montoya et al., 2017, Kilb and Fukuda, 2017)**. La taurina previene el deterioro cognitivo relacionado con la edad, por lo que el efecto nocivo de la taurina no se presenta en ratas seniles al intervenir sobre la neurotransmisión GABAérgica **(El Idrissi, 2008)**, inhibiendo la excitotoxicidad del glutamato **(Prentice et al., 2017b)** y disminuyendo el estrés nitrosativo **(Samdani et al., 1997, Gonzalez-Barrios et al., 2002)**.

La IIU mantuvo el incremento del estrés nitrosativo y la reducción de la respuesta antioxidante en el día P15, como un resultado típico en la encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI). En consecuencia, nuestros resultados muestran que la IIU incrementó el estrés nitrosativo (NO_2^-, MDA & 4-HDA) en la corteza temporoparietal (P15). El aumento de NO_2^- podría resultar de la actividad de las sintasas del óxido nítrico (NO) endotelial (eNOS) y neuronal (nNOS) estimuladas por la IIU en la corteza cerebral a las 24 h post-reperfusión **(Samdani et al., 1997, Gonzalez-Barrios et al., 2002)**, y un incremento en la actividad inducible de iNOS entre P8 y P14 **(Cai et al., 1998)**. También el microambiente oxidativo resultó en la reducción de la actividad antioxidante de SOD, Cat, GPx y en los niveles de GSH, así como el incremento en los niveles de GSSG en P15, como ha sido reportado previamente en otros modelos de asfixia perinatal **(Khan and Black, 2003, Lespay-Rebolledo et al., 2018)**. Del mismo modo, el deterioro de la actividad enzimática de GPx perdura hasta 22 días después de la IIU, lo que confirma que el cerebro

inmaduro tiene una actividad de GPx limitada, por lo que, es más susceptible al daño oxidativo **(Sheldon et al., 2004)** que se ve reflejado en un incremento de la peroxidación lipídica sostenida que encontramos en P15.

La administración profiláctica de zinc (12 ppm) en P15, mostró niveles basales del estrés nitrosativo, peroxidación lipídica y no modificó la respuesta antioxidante en cerebros sanos en P15. Sin embargo, la actividad de CAT disminuyó, posiblemente por un mecanismo postranscripcional que implica la fosforilación deficiente de ERK1/2 **(Patrushev et al., 2012)**. Además, los niveles de GSH disminuyeron sin modificar la relación GSSG/GSH en el grupo Zn 30 ppm, lo que sugiere que esta disminución puede ser debida a la inhibición inducida por zinc de la enzima glutatión reductasa (GR) como ocurre en los astrocitos **(Bishop et al., 2007)**.

A la vez, la administración profiláctica de zinc mantiene su efecto neuroprotector después de la IIU. Esta prevención resulta de la capacidad antioxidante del zinc al actuar como cofactor de SOD (Cu-Zn) **(Fullerton et al., 1998)**, componente estructural de las metalotioneínas, regular la expresión de CAT y GPx o como inhibidor de NADPH oxidasa y los receptores NMDA **(Jarosz et al., 2017, Marreiro et al., 2017)** a partir de los cuales se puede evitar la excitotoxicidad y prevenir el estrés oxidativo relacionado con la isquemia/reperfusión **(Marreiro et al., 2017)**.

Los grupos Zn y Zn+IIU muestran un aumento en los niveles de GSH, ya que el zinc induce el incremento de la expresión de la glutamil-cisteína ligasa para la síntesis de GSH **(Marreiro et al., 2017)**, lo que podría ayudar a explicar el aumento de la actividad de GPx tanto en la corteza temporoparietal como en el hipocampo en el P15. Además, nuestros resultados muestran una disminución en el índice GSSG/GSH en ambas regiones cerebrales después de la administración profiláctica de zinc en la IIU, lo que refleja un microambiente reductor y colabora en la prevención de la peroxidación lipídica inducida por IIU y una mejora de la capacidad motora en ratas jóvenes después de la IIU. La falta de un efecto del zinc sobre las actividades de SOD y Cat, apoyan la idea de que GPx juega un papel más crítico

que la SOD en la defensa contra el estrés oxidativo al día P15 **(Fullerton et al., 1998, Sheldon et al., 2008, Li et al., 2013)**.

En la corteza temporoparietal, la taurina (50 ppm) bloqueó el estrés nitrosativo inducido por IIU al aumentar las actividades de SOD y GPx, de acuerdo con reportes previos de una lesión hipóxico-isquémica cerebral en ratas de 7 días **(Zhu et al., 2016)**. Además, la taurina individual o combinada con zinc también promovió un microambiente antioxidante al aumentar la actividad de GPx y reduciendo el índice GSSG/GSH. Sin embargo, la combinación de zinc y taurina mostró un efecto sinérgico solo sobre la actividad de SOD en la corteza temporoparietal, aunque fue el tratamiento más efectivo para mejorar el desempeño motor. Además, la acción antioxidante de la taurina puede resultar de su biotransformación en cloramina-taurina (haloamina de taurina) a través de microglía/macrófago, lo que puede ayudar a disminuir la neuroinflamación, la autofagia, el estrés del retículo endoplasmático y la apoptosis a través del factor Nrf2 **(Kim et al., 2015)** en un proceso hipóxico-isquémico **(Prentice et al., 2017a)**. Adicionalmente, se ha reportado que el zinc y la cloramina-taurina inhiben la producción de NO en células microgliales activadas en ratas adultas sometidas a isquemia cerebral **(Serban et al., 2003)**. La acción antioxidante de la taurina también puede verse potenciada por la liberación endógena de taurina estimulada por el NO **(Saransaari and Oja, 2003)**, que podría ayudar a explicar el aumento de NO y la reducción de peróxidos lipídicos en el hipocampo en el grupo Zn+IIU+Tau. La taurina también puede actuar a través de mecanismos antioxidantes independientes de enzimas en el hipocampo, donde desempeña un papel nutricional primordial en el crecimiento, la diferenciación y el desarrollo de las células neuronales. Además, la taurina juega un papel crucial en la síntesis de proteínas y, en la mitocondria, mejora la actividad de la cadena de transporte de electrones (ETC) y la bioenergética neuronal, evitando así el exceso de ERO **(Niu et al., 2018)**. A nivel celular, la taurina regula principalmente el volumen celular como factor osmorregulador, atenúa las señales eléctricas e hiperpolariza las neuronas a través de la modulación de tres receptores blanco: GABA, glicina y NMDA **(Kilb and Fukuda, 2017, Oja and Saransaari, 2017)**.

La combinación de la administración precondicionante de zinc con el tratamiento de taurina proporcionó la mejor neuroprotección debido a que se recuperó la actividad motora (el puntaje JEPEF más alto), disminuyó el estrés nitrosativo, previno la peroxidación lipídica y mejoró la respuesta antioxidante. Nuestros resultados concuerdan con el efecto reportado de la taurina en la protección contra las lesiones gástricas inducidas por etanol al potenciar la actividad antioxidante, la producción endógena de PGE2 y atenuar la producción de NO **(Yu et al., 2015)**. Sin embargo, se necesitan más experimentos para identificar el mecanismo molecular que sustenta el efecto neuroprotector de la administración profiláctica de zinc y el tratamiento terapéutico con taurina en la IIU.

La actividad de AST y ALT puede ser utilizada como biomarcador del metabolismo energético en el cerebro en condiciones fisiológicas e incluso patológicas. Se conoce que la IIU reduce el metabolismo energético en el cerebro, alterando el metabolismo de la glucosa como fuente de energía, modificando el metabolismo mitocondrial del piruvato en el ciclo de Krebs y aumentando el lactato a través de la actividad de la LDH **(Dienel, 2017, 2019)**. Las neuronas afectadas requieren la producción de lactato por los astrocitos para mantener los niveles de piruvato y la energía neuronal. Para compensar los déficits del metabolismo energético inducidos por la IIU, las transaminasas (ALT y AST) aumentan los niveles de glutamato y α-cetoglutarato **(Netopilova et al., 2001)**. Por lo tanto, una perturbación en la actividad de ALT y AST altera el metabolismo de glutamato-glutamina y, en consecuencia, altera la síntesis de GABA en los astrocitos, que es fundamental para el control de las habilidades motoras y el aprendizaje en el desarrollo posnatal **(Yellen, 2018, Diaz-Garcia and Yellen, 2019)**. Además, la ALT juega un papel esencial en el desarrollo porque participa en el metabolismo del aspartato y el glutamato, crucial en la maduración de las estructuras glutamatérgicas en la segunda semana posnatal **(Benuck et al., 1971, Benuck and Lajtha, 1975, Sanderson and Murphy, 1981)**. Los índices de estas enzimas indican la dirección del flujo metabólico; el incremento del índice AST/LDH sugiere la generación de glutamato, mientras que la reducción de este reflejaría la producción de lactato. El aumento del índice LDH/ALT sugiere acumulación de lactato, mientras que su

disminución indicaría una alta producción de piruvato. El incremento del índice AST/ALT también sugiere producción de glutamato, mientras que su disminución indicaría la preferencia por la producción de piruvato.

Los resultados de los índices de actividad metabólica sugieren que la corteza cerebral depende de la producción de piruvato y lactato, ambos relacionados con la proliferación celular y la astrogliosis reactiva en respuesta al daño cerebral inducido por la IIU **(Benuck et al., 1971, Benuck and Lajtha, 1975)**. Nuestros resultados también muestran que la suplementación profiláctica de zinc en ratas preñadas sanas no modificó el metabolismo fisiológico en la corteza temporoparietal y el hipocampo. Por el contrario, restauró la actividad enzimática en esas regiones en el modelo de IIU. Posterior a la IIU, el tratamiento con taurina promovió el flujo metabólico de glutamato y lactato, lo que sugiere que la taurina favorece la maduración de la corteza cerebral a través del ciclo glutamato-glutamina-GABA **(Bonavita et al., 1964, Peng et al., 1991, McKenna et al., 1994, Waagepetersen et al., 1998, McKenna et al., 2000, Hertz, 2013)**. El consumo de glutamato favorece la síntesis de GABA y conduce a la prevención de la neurodegeneración inducida por excitotoxicidad, lo que acelera la recuperación neuromotora después de la IIU y mejora la cognición **(Peng et al., 1991, McKenna et al., 1994, Ruban et al., 2015, Kobayashi and Tohda, 2017)**. Además, el lactato producido a partir de glucosa en los astrocitos es transferible a las neuronas que posteriormente lo oxidan en piruvato para asegurar un aporte energético adecuado **(Werner and Sicard, 1987, Magistretti and Allaman, 2018, Margineanu et al., 2018, Tauffenberger et al., 2019)**. Con base en esta idea, sugerimos que la combinación de zinc y taurina (Zn+IIU+Tau) aumenta el flujo metabólico de lactato y piruvato entre los astrocitos y las neuronas para modular la excitabilidad, la neuroplasticidad, la consolidación de la memoria y la actividad motora **(Werner and Sicard, 1987, Krutetskaia et al., 1998, Ostapiv et al., 2015, Magistretti and Allaman, 2018, Margineanu et al., 2018, Tauffenberger et al., 2019)**.

En el hipocampo, los resultados sugieren que la IIU favorece el metabolismo del piruvato en P15, lo que indica una recuperación metabólica mitocondrial **(Pan et**

al., 2012b) insuficiente para restaurar el sistema antioxidante y la capacidad motora. La administración profiláctica de zinc no recuperó la actividad enzimática de AST y LDH, pero favoreció el flujo metabólico de glutamato y piruvato. La taurina recuperó las actividades de AST y ALT y promovió un flujo citosólico de piruvato y glutamato, vinculado a procesos de maduración neuronal y transmisión sináptica en neuronas *de novo* **(Spasov et al., 1977, Rothe and Wolf, 1984, Schmidt and Wolf, 1986)** en las capas dendríticas como las colaterales de Schaffer, el estrato oriens y radiatum **(Schmidt and Wolf, 1987)**. Asimismo, la administración combinada de zinc y taurina restauró la relación enzimática a los niveles del grupo control, sugiriendo que el establecimiento de la regulación fisiológica de lactato y glutamato en astrocitos y neuronas **(McKenna, 2013)** disminuye la excitotoxicidad causada por la IIU **(Pan et al., 2012a, Gharibani et al., 2013, Menzie et al., 2013)**.

Diferentes reportes han evaluado la gravedad de las secuelas neurológicas tempranas de estímulos nocivos en roedores inmaduros, entre ellos se encuentran la excitotoxicidad inducida por kainato **(Johnston, 2005)**, el pinzamiento total de las arterias ováricas **(Gunn et al., 1992)**, intoxicación con etanol durante la gestación **(Abel et al., 1983)** o la oclusión de la arteria cerebral **(Zhu et al., 2016)**, los cuales demuestran su letalidad sobre el desarrollo del sistema nervioso central, sin llegar a evaluar su efecto a largo plazo.

La interrupción de la oxigenación en la asfixia perinatal o la encefalopatía hipóxico-isquémica tienen repercusiones en el comportamiento de la vida adolescente **(Gadian et al., 2000, Maneru et al., 2001, van Handel et al., 2007)**, afectando severamente el control motor-postural y emocional en este tipo de pacientes **(Mota-Rojas et al., 2022)**. El monitoreo neuromotor **(Perez et al., 2013)** a lo largo de la vida después de la IIU, ayuda en el diseño de estrategias que mejoren la eficacia de la intervención y tratamiento del daño cerebral en estos sujetos **(Anderson and Burnett, 2017, Trivedi et al., 2017)**. La excitotoxicidad desencadenada por la asfixia compromete la integridad de las redes neuronales **(Zafeiriou, 2004)** entre diferentes regiones cerebrales involucradas en la ejecución de una amplia variedad de tareas **(Lanciego et al., 2012)** encargadas de modular

procesos como la reactividad emocional, el tono muscular y control motor **(Takakusaki, 2017)**.

Los resultados de las pruebas motoras muestran que los sujetos con IIU presentan una alteración neuromotora (puntaje JEPEF 0) reflejando, en la incoordinación (P29) y agotamiento en las extremidades (P30), disminuyendo la reactividad emocional y la actividad motora en campo abierto (P30). La oxigenación deficiente causada por la reducción del aporte sanguíneo en la etapa fetal incrementó las claudicaciones y disminuyó el número de intentos durante el ascenso en la prueba de la viga, esto podría relacionarse con la perturbación de la marcha evaluada con la prueba del ángulo de la caminata (P14) causando la fatiga de las extremidades pues los sujetos no fueron capaces de resistir su peso corporal frente a la fuerza gravitatoria en la prueba de inversión (P30).

Además, la IIU redujo la actividad motora y reactividad emocional en la prueba de campo abierto (P30). El daño en la interconexión entre la corteza, núcleos subcorticales y tallo cerebral afecta el control postural, la coordinación de la marcha y se encarga de la regulación del tono muscular. Por una parte, la comunicación corteza-núcleos subcorticales afecta la postura del individuo, mientras que la corteza y el tallo cerebral controlan los movimientos voluntarios en el gateo o la marcha **(Takakusaki, 2017)**. Se ha reportado que los infantes que sufrieron un proceso obstructivo a nivel cerebral durante la concepción presentan lesiones cerebrales que se extienden a regiones relacionadas con el habla **(Shapiro et al., 2017)**, aprendizaje y habilidades motoras **(Trivedi et al., 2017)**.

La IIU incrementó los nitritos en la corteza temporoparietal y los núcleos subcorticales, no así en el tallo cerebral. Además, observamos la disminución de la peroxidación lipídica (MDA & 4-HDA) y un déficit de la actividad antioxidante (SOD, Cat y GPx) en las tres regiones. Estos resultados sugieren que el incremento de nitritos podría estar encargado del daño oxidativo al interrumpir la comunicación entre ambas regiones, esto podría ser responsables por la presencia del déficit antioxidante afectando la neuroquímica entre ambas regiones. La reducción de nitritos y la lipoperoxidación presente en el tallo cerebral sugiere un deterioro tisular

establecido por la baja actividad antioxidante que conduciría a una disfunción neurológica que podemos observar la descoordinación en la marcha, flacidez en las extremidades e hipoactividad.

El incremento de la producción de NO en la corteza cerebral y los núcleos subcorticales nos permite sugerir que el daño intrauterino interrumpe la comunicación entre ambas regiones. Primero sobre la propiocepción **(Redgrave et al., 2010)** y posteriormente, en el procesamiento e integración de la información **(Takakusaki, 2017)**, para regular la destreza motora a través de circuitos neuronales entre la corteza y el tallo cerebrales **(May, 2006, Lanciego et al., 2012)**. La sobreestimulación de las neuronas glutamatérgicas de la capa V en la corteza cerebral y las neuronas nitrérgicas en el estriado **(Lanciego et al., 2012)** podrían contribuir a la sobreproducción de NO y su posterior acumulación. A su vez, los núcleos subcorticales presentan una alta actividad oxidativa debido a la síntesis de catecolaminas, en gran medida encargadas de la neuroquímica en todo el cerebro **(Kamal and Lappin, 2022)**.

La IIU causa incoordinación y baja reactividad emocional, sugiere daño en los núcleos subcorticales, afectando el circuito nervioso entre la corteza o tallo cerebral. La neurodegeneración en enfermedades como Alzheimer o Parkinson causa la baja producción de neurotransmisores relacionada con déficit neuromotores **(Sulzer et al., 2016)**, debido a procesos neuroinflamatorios como se ha visto en la degeneración dopaminérgica que se extiende a regiones subcorticales alterando la dinámica de la caminata en roedores **(Soto-Rojas et al., 2020b)**. Los procesos de H-I en el cerebro inmaduro tienen consecuencias devastadoras al provocar la aparición de secuelas neurológicas a mediano **(Torres-Merino et al., 2019)** y largo plazo **(Muntsant et al., 2019)**. Los pacientes que sobreviven a un evento isquémico cerebral presentan una lesión en la materia blanca, estrechamente relacionada con discinesias **(de Laat et al., 2011, Jones et al., 2016)** y déficit somatosensorial **(Kessner et al., 2019)**.

Por otro lado, el tallo cerebral está relacionado con el control del tono muscular postural **(Takakusaki, 2017)**. Además, es una región rica en mielina **(Ford**

et al., 2015), esto la convierte en una región altamente susceptible al estrés oxidativo **(O'Sullivan et al., 2017, Shapiro et al., 2017, Trivedi et al., 2017)** que podría derivar en desmielinización **(Collste and Bergman, 1976, Muntsant et al., 2019)**. El incremento del estrés oxidativo es un factor desencadenante del daño celular **(Blanco-Alvarez et al., 2013)** que permite la depleción de la capacidad antioxidante en sujetos adultos **(Tomas-Sanchez et al., 2018)** e infantes **(Khan and Black, 2003)** que muestran un pobre desempeño psicomotor y cognitivo **(Huang et al., 2009, Anderson and Burnett, 2017, Trivedi et al., 2017),** debido a que el tallo cerebral recibe terminaciones aferentes y eferentes para mantener el control motor **(Takakusaki, 2017)**. En la fase tardía de la IIU se muestra un decremento del estrés nitrosativo y antioxidante asociado al daño motor, que se mantiene a edades infantiles.

La administración con zinc en las ratas sanas mostró un desempeño motor normal a los días P29 y P30 (JEPEF igual a 9), así como en el desarrollo motor, la resistencia en las extremidades y mejorarmiento del comportamiento exploratorio, sin modificar los parámetros bioquímicos evaluados (NO_2^-, MDA & 4-HDA) o la actividad antioxidante (SOD, Cat y GPx) en el día P30.

El zinc es un bioelemento fundamental para el desarrollo celular del sistema nervioso central **(Nakashima and Dyck, 2009, Sensi et al., 2009)**. El zinc tiene una actividad neuromoduladora al actuar sobre los receptores $NMDA_{NR2A}$ **(Paoletti et al., 1997)**; **(Krall et al., 2021)** y $GABA_A$ **(Ben-Ari and Cherubini, 1991, Buhl et al., 1996)**, debido a esto, se ha propuesto que el zinc juega un papel importante en la regulación neuronal **(Krall et al., 2021)**, tales como las neuronas glutamatérgicas de la corteza cerebral y la amígdala que son ricas en zinc **(Rockland, 2014, Vogler et al., 2020)**, debido a que la deficiencia de zinc está asociada a la disminución en el volumen de regiones subcorticales, lo que reduce la respuesta somatosensorial **(Schoen et al., 2019)**.

La déficit de zinc en la dieta parece no tener efecto sobre el desarrollo y función del tallo cerebral **(Wensink et al., 1989)**. Sin embargo, el zinc es capaz de inducir el incremento en la expresión del receptor a glicina (GlyR), modulando la

actividad inhibitoria del tallo cerebral y la médula espinal, ya que la deficiencia de zinc produce cambios estructurales del receptor a Gly, un reemplazo de la subunidad α1 por α2 contribuye a la disfunción celular que deriva en un estado patológico, presente en infantes, caracterizado por temblor, retraso en el enderezamiento postural, marcha anormal y reflejo de sobresalto **(Hirzel et al., 2006)**. Mientras que la suplementación con zinc en sujetos sanos es capaz de inducir el incremento en los niveles de IGF-1 **(Adriani and Wirjatmadi, 2014, Rocha et al., 2015)** y IGFBP3 **(Rocha et al., 2015)** que está íntimamente relacionado con la activación de vías de señalización involucradas con el desarrollo y buen funcionamiento celular.

El tratamiento con el precondicionamiento de zinc (Zn+IIU) previno el déficit motor inducido por la IIU en los días P29 y P30 (JEPEF igual a 8), mostrando una mejora en la capacidad para realizar las pruebas motoras, así como la recuperación de la reactividad emocional. Se ha reportado que el zinc induce un efecto ansiolítico y antidepresivo utilizado en el tratamiento del desorden de depresión mayor, debido a que incrementa la efectividad de inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRI) **(Ranjbar et al., 2013)**. El zinc es capaz de modular la actividad de neuronas glutamatérgicas, GABAérgicas y glicinérgicas en la corteza cerebral, la amígdala y la médula espinal **(Nowak et al., 2003, Poleszak et al., 2008)**, a través de regular la síntesis de glutamato y GABA **(Bailey et al., 2011)** o al interactuar con la subunidad NR2A del receptor NMDA **(Vergnano et al., 2014, Anderson et al., 2015)**, AMPA **(Blakemore and Trombley, 2019)**, receptor a $GABA_A$ **(Wang et al., 2001)** y glicina **(Hirzel et al., 2006, Trombley et al., 2011)**. Otro efecto benéfico del zinc como antidepresivo es a través del incremento de los niveles de BDNF en la corteza cerebral, lo cual conduce a la recuperación estructural de regiones como el hipocampo o la corteza cerebral **(Franco et al., 2008)(Nowak, et al. 2003)**.

El precondicionamiento de zinc durante el periodo fetal mantuvo los niveles basales de NO en el día P30 en la corteza cerebral, núcleos subcorticales, aunque se encontraron niveles altos de NO en el tallo cerebral, esto no causó un incremento

de peroxidación lipídica, manteniendo la actividad antioxidante de la catalasa y la SOD.

La SOD representa un sistema antioxidante valioso en la defensa contra el estrés oxidativo **(Faraci and Didion, 2004)**, juega un papel clave en el mantenimiento de uniones celulares **(Shuvaev et al., 2007, Fukai and Ushio-Fukai, 2011),** por lo que, la deficiencia del gen *Sod* (Cu-Zn) conduce al incremento del daño tisular en las extremidades inferiores y deterioro neurofuncional en ratones **(Groleau et al., 2010)**. El tratamiento con proteínas con dedos de zinc evita el desarrollo de la distrofia muscular de Duchenne y produce la recuperación funcional de las extremidades **(Ousterout et al., 2015)**, preservando la actividad neuronal en los núcleos subcorticales y en el tallo cerebral **(Wensink et al., 1989, Nowak et al., 2003, Poleszak et al., 2008)**, evitando el deterioro celular para mantener la comunicación entre ambas regiones, reflejando la recuperación del desempeño motor de los individuos respecto al grupo IIU.

La actividad de la catalasa o GPx no fue modificada por la administración de zinc en la etapa embrionaria, debido a que su efecto se pudo observar en la etapa temprana del desarrollo (P1 y P15), evitando el daño inducido por la IIU sobre la actividad antioxidante y el metabolismo, permitiendo recuperar la capacidad neuromotora.

La suplementación terapéutica con taurina individual o combinada con el zinc tuvieron un efecto en el restablecimiento de la conducta motora y emocional, observado en el puntaje JEPEF igual 9 en ambos grupos al P30. A nivel conductual, en los dos grupos (IIU+Tau y Zn+IIU+Tau), el zinc y la taurina tuvieron un efecto protector, debido a que previnieron la incoordinación en la marcha, incrementaron la resistencia de las extremidades y normalizaron la reactividad emocional inducidas por la IIU, debido a su efecto antioxidante en la corteza y los núcleos subcorticales, manteniendo la peroxidación lipídica en los niveles basales. La taurina detuvo significativamente el estrés nitrosativo en el tallo cerebral asociado con una recuperación en la actividad de la SOD y catalasa en la corteza y núcleos subcorticales; y de la GPx en las tres regiones.

La administración crónica de taurina ha ejercido un efecto antioxidante en la médula espinal, núcleos subcorticales y corteza cerebral en un modelo hipomielinizante-desmielinizante, evitando la progresión de la hipomielinización y mejorando el comportamiento motor **(Vargas-Castro et al., 2022)**. Por otro lado, la taurina ejerce un efecto antiinflamatorio en la distrofia muscular **(Terrill et al., 2016)** e isquemia muscular, al inhibir la actividad del factor transcripcional NF-κB y mieloperoxidasa, esto conduce a la recuperación de la fuerza contráctil y la capacidad de sujeción en las extremidades **(Nanobashvili et al., 2003)**.

La taurina es un poderoso neuromodulador **(Santora et al., 2013, Rotondo et al., 2019)** y ansiolítico **(El Idrissi et al., 2009)**, participa en la neurogénesis y la maduración de redes neuronales en la corteza cerebral e hipocampo al regular la actividad de los receptores $NMDA_{NR2B}$ **(Chan et al., 2015)** y $GABA_B$ **(Kilb and Fukuda, 2017)**. En los núcleos subcorticales, la taurina muestra alta afinidad por los receptores $GABA_A$ y glicina **(Song et al., 2012)**. Mientras que, en el estriado la taurina es capaz de participar en el transporte y reciclaje de dopamina evitando desregulaciones en el metabolismo de dopamina derivadas por la degeneración neuronal **(Chen et al., 2018)**. En el tallo cerebral, la taurina puede brindar protección contra la hiperexcitabilidad neuronal a través de la modulación de los receptores $NMDA_{NR2B}$ y AMPA **(Fletcher et al., 2018)** en los oligodendrocitos y con ello evitar el deterioro de la mielinización **(Fulmer et al., 2014)** inducida por la excitotoxicidad por glutamato en neuronas noradrenérgicas **(Hou et al., 2021)**. Esta región tiene una población considerable de neuronas con alta sensibilidad a GABA y glicina **(Nowak et al., 2003, Poleszak et al., 2008)** que están encargadas del control motor, por lo que, no podría descartarse el efecto de la taurina sobre la funcionalidad del tallo cerebral. Adicionalmente, la reducción en la materia gris es un factor clave para que se presenten secuelas neurológicas a corto y largo plazo. Estos estudios sugirieren que la taurina tiene un papel importante en la coordinación motora y postural, pero se necesitan estudios que permitan evaluar el efecto de la taurina sobre cambios estructurales que ayuden a explicar el efecto protector a través de la modulación neuroquímica **(Singleton et al., 2014)** al mes de edad (P30).

CONCLUSIÓN

En resumen, nuestros resultados demuestran que la IIU genera alteraciones estructurales en corteza e hipocampo en P1. Ambas regiones cerebrales se vieron afectadas por el agotamiento de los sistemas antioxidantes y enzimas metabólicas, lo que promovió el incremento del estrés oxidativo y la presencia de secuelas motoras severas resultantes de las alteraciones bioquímicas en el cerebro hasta P15. Mas tarde, el incremento de nitritos en la corteza temporoparietal y en los

núcleos subcorticales, sumado a la reducción en la actividad de la SOD, Cat y GPx causado por la IIU estarían asociados al déficit motor presente en P29 y P30.

La administración profiláctica de zinc y el tratamiento con taurina individuales o combinado evitan el incremento del daño tisular en corteza e hipocampo (P1), lo que posteriormente se refleja en la disminución del estrés nitrosativo y la discapacidad motriz (P5-P14). Sin embargo, estos tratamientos ejercieron un efecto dependiente de la región sobre el metabolismo energético, piruvato-lactato, y los ciclos glutamato-glutamina-GABA (P15) y sobre el estrés nitrosativo actuando como un mecanismo compensatorio del daño isquémico (P30). La escala JEPEF mostró que la administración profiláctica de zinc es eficaz contra la IIU, pero la administración de taurina individual o combinado con zinc proporcionó un mejor efecto neuroprotector (P15) que se mantiene hasta P30. La combinación de zinc y taurina mejora la actividad motora y protege la corteza temporoparietal y el hipocampo de los flujos metabólicos de lactato y piruvato, como se indica por nuestros resultados en P15. Por lo tanto, los tratamientos a base de taurina o combinación con zinc pueden usarse para prevenir el daño neuromotor en la IIU.

PERSPECTIVAS

Evaluar el efecto de la administración crónica de taurina:

1. Los niveles de zinc (ZnT) y taurina (TauT), así como proteínas asociadas a su movilización en el cerebro.
2. Los niveles de Glu, Gln, GABA (HPLC) relacionados con su metabolismo o marcadores de maduración neuronal.
3. Los niveles de Pyr y Lac (HPLC) y con ello el índice Pyr/Lac (aerobiosis/anaerobiosis).

4. Los niveles de NAD^+ y NADH (espectrofotometría) y el índice NAD^+/NADH.
5. La morfología celular (Nissl, TTC y NBT) y la inmunoreactividad (GFAP, Iba1, CD206) en el cerebro de ratas P30.
6. El aprendizaje y memoria (LAM y NORT) en ratas P30, P45 y P60.

REFERENCIAS

Abel EL, Jacobson S, Sherwin BT (1983) In utero alcohol exposure: functional and structural brain damage. Neurobehav Toxicol Teratol 5:363-366.

Abramovitch-Dahan C, Asraf H, Bogdanovic M, Sekler I, Bush AI, Hershfinkel M (2016) Amyloid beta attenuates metabotropic zinc sensing receptor, mZnR/GPR39, dependent Ca(2+) , ERK1/2 and Clusterin signaling in neurons. J Neurochem 139:221-233.

Adamo AM, Liu X, Mathieu P, Nuttall JR, Supasai S, Oteiza PI (2019) Early Developmental Marginal Zinc Deficiency Affects Neurogenesis Decreasing Neuronal Number and Altering Neuronal Specification in the Adult Rat Brain. Front Cell Neurosci 13:62.

Adamo AM, Oteiza PI (2010) Zinc deficiency and neurodevelopment: the case of neurons. Biofactors 36:117-124.

Adamo AM, Zago MP, Mackenzie GG, Aimo L, Keen CL, Keenan A, Oteiza PI (2010) The role of zinc in the modulation of neuronal proliferation and apoptosis. Neurotox Res 17:1-14.

Adlard PA, Parncutt JM, Finkelstein DI, Bush AI (2010) Cognitive loss in zinc transporter-3 knock-out mice: a phenocopy for the synaptic and memory deficits of Alzheimer's disease? J Neurosci 30:1631-1636.

Adolph KE, Hoch JE (2019) Motor Development: Embodied, Embedded, Enculturated, and Enabling. Annu Rev Psychol 70:141-164.

Adolph KE, Hoch JE (2020) The Importance of Motor Skills for Development. Nestle Nutr Inst Workshop Ser 95:136-144.

Adriani M, Wirjatmadi B (2014) The effect of adding zinc to vitamin A on IGF-1, bone age and linear growth in stunted children. J Trace Elem Med Biol 28:431-435.

Aebi H (1984) [13] Catalase in vitro. Methods in Enzymology

Volume 105.

Ahmed NN, Grimes HL, Bellacosa A, Chan TO, Tsichlis PN (1997) Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase. Proc Natl Acad Sci U S A 94:3627-3632.

Aizenman E, Stout AK, Hartnett KA, Dineley KE, McLaughlin B, Reynolds IJ (2000) Induction of neuronal apoptosis by thiol oxidation: putative role of intracellular zinc release. Journal of neurochemistry 75:1878-1888.

Alsina M, Martin-Ancel A, Alarcon-Allen A, Arca G, Gaya F, Garcia-Alix A (2017) The Severity of Hypoxic-Ischemic Encephalopathy Correlates With Multiple Organ Dysfunction in the Hypothermia Era. Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies 18:234-240.

Alt JR, Cleveland JL, Hannink M, Diehl JA (2000) Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation. Genes Dev 14:3102-3114.

Altobelli GG, Van Noorden S, Balato A, Cimini V (2020) Copper/Zinc Superoxide Dismutase in Human Skin: Current Knowledge. Front Med (Lausanne) 7:183.

Allen KA, Brandon DH (2011) Hypoxic Ischemic Encephalopathy: Pathophysiology and Experimental Treatments. Newborn and infant nursing reviews : NAINR 11:125-133.

American Academy of P, Committee on F, Newborn, American College of O, Gynecologists, Committee on Obstetric P (2006) The Apgar score. Advances in neonatal care : official journal of the National Association of Neonatal Nurses 6:220-223.

Amore G, Bonavita V (1965) Aspartate aminotransferase in the brain of the developing rat. Life sciences 4:2417-2424.

Andersen JV, Markussen KH, Jakobsen E, Schousboe A, Waagepetersen HS, Rosenberg PA, Aldana BI (2021) Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration. Neuropharmacology 196:108719.

Anderson CT, Radford RJ, Zastrow ML, Zhang DY, Apfel UP, Lippard SJ, Tzounopoulos T (2015) Modulation of extrasynaptic NMDA receptors by synaptic and tonic zinc. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 112:E2705-2714.

Anderson PJ, Burnett A (2017) Assessing developmental delay in early childhood - concerns with the Bayley-III scales. Clin Neuropsychol 31:371-381.

Aridas JD, Yawno T, Sutherland AE, Nitsos I, Ditchfield M, Wong FY, Fahey MC, Malhotra A, Wallace EM, Jenkin G, Miller SL (2014) Detecting brain injury in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: closing the gap between experimental and clinical research. Experimental neurology 261:281-290.

Armogida M, Spalloni A, Amantea D, Nutini M, Petrelli F, Longone P, Bagetta G, Nistico R, Mercuri NB (2011) The protective role of catalase against cerebral ischemia in vitro and in vivo. International journal of immunopathology and pharmacology 24:735-747.

Arteaga O, Revuelta M, Uriguen L, Alvarez A, Montalvo H, Hilario E (2015) Pretreatment with Resveratrol Prevents Neuronal Injury and Cognitive Deficits Induced by Perinatal Hypoxia-Ischemia in Rats. PloS one 10:e0142424.

Asraf H, Salomon S, Nevo A, Sekler I, Mayer D, Hershfinkel M (2014) The ZnR/GPR39 interacts with the CaSR to enhance signaling in prostate and salivary epithelia. J Cell Physiol 229:868-877.

Bailey J, Powell L, Sinanan L, Neal J, Li M, Smith T, Bell E (2011) A novel mechanism of V-type zinc inhibition of glutamate dehydrogenase results from disruption of subunit interactions necessary for efficient catalysis. FEBS J 278:3140-3151.

Bano S, Chaudhary V, Garga UC (2017) Neonatal Hypoxic-ischemic Encephalopathy: A Radiological Review. Journal of pediatric neurosciences 12:1-6.

Banupriya N, Bhat BV, Benet BD, Catherine C, Sridhar MG, Parija SC (2018) Short Term Oral Zinc Supplementation among Babies with Neonatal Sepsis for Reducing Mortality and Improving Outcome - A Double-Blind Randomized Controlled Trial. Indian J Pediatr 85:5-9.

Barbeau A, Donaldson J (1974) Zinc, taurine, and epilepsy. Arch Neurol 30:52-58.

Barbeau A, Inoue N, Tsukada Y, Butterworth RF (1975) The neuropharmacology of taurine. Life Sci 17:669-677.

Barkho BZ, Munoz AE, Li X, Li L, Cunningham LA, Zhao X (2008) Endogenous matrix metalloproteinase (MMP)-3 and MMP-9 promote the differentiation and migration of adult neural progenitor cells in response to chemokines. Stem Cells 26:3139-3149.

Barkhuizen M, van den Hove DL, Vles JS, Steinbusch HW, Kramer BW, Gavilanes AW (2017) 25 years of research on global asphyxia in the immature rat brain. Neuroscience and biobehavioral reviews 75:166-182.

Becerra-Calixto A, Cardona-Gomez GP (2017) The Role of Astrocytes in Neuroprotection after Brain Stroke: Potential in Cell Therapy. Frontiers in molecular neuroscience 10:88.

Belanger M, Allaman I, Magistretti PJ (2011) Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. Cell metabolism 14:724-738.

Ben-Ari Y, Cherubini E (1991) Zinc and GABA in developing brain. Nature 353:220.

Ben Mimouna S, Boughammoura S, Chemek M, Haouas Z, Banni M, Messaoudi I (2018) Disruption of the zinc metabolism in rat foetal brain after prenatal exposure to cadmium. Chemico-biological interactions 286:88-95.

Benuck M, Lajtha A (1975) Aminotransferase activity in brain. Int Rev Neurobiol 17:85-129.

Benuck M, Stern F, Lajtha A (1971) Transamination of amino acids in homogenates of rat brzain. J Neurochem 18:1555-1567.

Benuck M, Stern F, Lajtha A (1972) Regional and subcellular distribution of aminotransferases in rat brain. J Neurochem 19:949-957.

Berger HR, Nyman AKG, Morken TS, Vettukattil R, Brubakk AM, Wideroe M (2017) Early metabolite changes after melatonin treatment in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain injury studied by in-vivo1H MR spectroscopy. PloS one 12:e0185202.

Berthet C, Lei H, Gruetter R, Hirt L (2011) Early predictive biomarkers for lesion after transient cerebral ischemia. Stroke 42:799-805.

Beyer BA, Fang M, Sadrian B, Montenegro-Burke JR, Plaisted WC, Kok BPC, Saez E, Kondo T, Siuzdak G, Lairson LL (2018) Metabolomics-based discovery of a metabolite that enhances oligodendrocyte maturation. Nature chemical biology 14:22-28.

Beyersmann D, Haase H (2001) Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. Biometals 14:331-341.

Bhatnagar S, Taneja S (2001) Zinc and cognitive development. Br J Nutr 85 Suppl 2:S139-145.

Bhatt A, Farooq MU, Enduri S, Pillainayagam C, Naravetla B, Razak A, Safdar A, Hussain S, Kassab M, Majid A (2011) Clinical significance of serum zinc levels in cerebral ischemia. Stroke research and treatment 2010:245715.

Billah M, Ridiandries A, Rayner BS, Allahwala UK, Dona A, Khachigian LM, Bhindi R (2019) Egr-1 functions as a master switch regulator of remote ischemic preconditioning-induced cardioprotection. Basic Res Cardiol 115:3.

Bishop GM, Dringen R, Robinson SR (2007) Zinc stimulates the production of toxic reactive oxygen species (ROS) and inhibits glutathione reductase in astrocytes. Free Radic Biol Med 42:1222-1230.

Bitanihirwe BK, Cunningham MG (2009) Zinc: the brain's dark horse. Synapse 63:1029-1049.

Bitoun M, Tappaz M (2000) Gene expression of the transporters and biosynthetic enzymes of the osmolytes in astrocyte primary cultures exposed to hyperosmotic conditions. Glia 32:165-176.

Black MM (1998) Zinc deficiency and child development. The American journal of clinical nutrition 68:464S-469S.

Black MM, Baqui AH, Zaman K, Ake Persson L, El Arifeen S, Le K, McNary SW, Parveen M, Hamadani JD, Black RE (2004) Iron and zinc supplementation promote motor development and exploratory behavior among Bangladeshi infants. Am J Clin Nutr 80:903-910.

Blakemore LJ, Trombley PQ (2019) Mechanisms of zinc modulation of olfactory bulb AMPA receptors. Neuroscience 410:160-175.

Blanco-Alvarez VM, Lopez-Moreno P, Soto-Rodriguez G, Martinez-Fong D, Rubio H, Gonzalez-Barrios JA, Pina-Leyva C, Torres-Soto M, Gomez-Villalobos Mde J, Hernandez-Baltazar D, Brambila E, Eguibar JR, Ugarte A, Cebada J, Leon-Chavez BA (2013) Subacute zinc administration and L-NAME caused an increase of NO, zinc, lipoperoxidation, and caspase-3 during a cerebral hypoxia-ischemia process in the rat. Oxidative medicine and cellular longevity 2013:240560.

Blanco-Alvarez VM, Soto-Rodriguez G, Gonzalez-Barrios JA, Martinez-Fong D, Brambila E, Torres-Soto M, Aguilar-Peralta AK, Gonzalez-Vazquez A, Tomas-Sanchez C, Limon ID, Eguibar JR, Ugarte A, Hernandez-Castillo J, Leon-Chavez BA (2015) Prophylactic Subacute Administration of Zinc Increases CCL2, CCR2, FGF2, and IGF-1 Expression and Prevents the Long-Term Memory Loss in a Rat Model of Cerebral Hypoxia-Ischemia. Neural plasticity 2015:375391.

Bolanos JP, Almeida A (1999) Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. Biochimica et biophysica acta 1411:415-436.

Bonavita V, Guarneri R, Scardi V (1964) The Effect of Anoxia on Aspartate Aminotransferase of the New-Born Rats. Life Sci (1962) 3:889-894.

Bonestroo HJ, Heijnen CJ, Groenendaal F, van Bel F, Nijboer CH (2015) Development of cerebral gray and white matter injury and cerebral inflammation over time after inflammatory perinatal asphyxia. Developmental neuroscience 37:78-94.

Borjini N, Sivilia S, Giuliani A, Fernandez M, Giardino L, Facchinetti F, Calza L (2019) Potential biomarkers for neuroinflammation and neurodegeneration at short and long term after neonatal hypoxic-ischemic insult in rat. Journal of neuroinflammation 16:194.

Bos AF, Van Braeckel KN, Hitzert MM, Tanis JC, Roze E (2013) Development of fine motor skills in preterm infants. Dev Med Child Neurol 55 Suppl 4:1-4.

Botros M, Sikaris KA (2013) The de ritis ratio: the test of time. Clin Biochem Rev 34:117-130.

Bovetti S, Hsieh YC, Bovolin P, Perroteau I, Kazunori T, Puche AC (2007) Blood vessels form a scaffold for neuroblast migration in the adult olfactory bulb. J Neurosci 27:5976-5980.

Brekke E, Morken TS, Sonnewald U (2015) Glucose metabolism and astrocyte-neuron interactions in the neonatal brain. Neurochem Int 82:33-41.

Brooks GA (2020) Lactate as a fulcrum of metabolism. Redox Biol 35:101454.

Buard A, Clement M, Bourre JM (1992) Developmental changes in enzymatic systems involved in protection against peroxidation in isolated rat brain microvessels. Neurosci Lett 141:72-74.

Buhl EH, Otis TS, Mody I (1996) Zinc-induced collapse of augmented inhibition by GABA in a temporal lobe epilepsy model. Science 271:369-373.

Burd I, Welling J, Kannan G, Johnston MV (2016) Excitotoxicity as a Common Mechanism for Fetal Neuronal Injury with Hypoxia and Intrauterine Inflammation. Advances in pharmacology 76:85-101.

Bylicky MA, Mueller GP, Day RM (2018) Mechanisms of Endogenous Neuroprotective Effects of Astrocytes in Brain Injury. Oxidative medicine and cellular longevity 2018:6501031.

Cai Z, Hutchins JB, Rhodes PG (1998) Intrauterine hypoxia-ischemia alters nitric oxide synthase expression and activity in fetal and neonatal rat brains. Brain research Developmental brain research 109:265-269.

Casoni F, Croci L, Bosone C, D'Ambrosio R, Badaloni A, Gaudesi D, Barili V, Sarna JR, Tessarollo L, Cremona O, Hawkes R, Warming S, Consalez GG (2017) Zfp423/ZNF423 regulates cell cycle progression, the mode of cell division and the DNA-damage response in Purkinje neuron progenitors. Development 144:3686-3697.

Cassandri M, Smirnov A, Novelli F, Pitolli C, Agostini M, Malewicz M, Melino G, Raschella G (2017) Zinc-finger proteins in health and disease. Cell Death Discov 3:17071.

Castillo-Duran C, Perales CG, Hertrampf ED, Marin VB, Rivera FA, Icaza G (2001) Effect of zinc supplementation on development and growth of Chilean infants. J Pediatr 138:229-235.

Ceulemans AG, Zgavc T, Kooijman R, Hachimi-Idrissi S, Sarre S, Michotte Y (2010) The dual role of the neuroinflammatory response after ischemic stroke: modulatory effects of hypothermia. Journal of neuroinflammation 7:74.

Cohen L, Asraf H, Sekler I, Hershfinkel M (2012) Extracellular pH regulates zinc signaling via an Asp residue of the zinc-sensing receptor (ZnR/GPR39). J Biol Chem 287:33339-33350.

Collste P, Bergman U (1976) Proceedings: Significance of drug plasma levels based on the plasma level monitoring service of a department of clinical pharmacology. Arzneimittelforschung 26:1255-1256.

Cope EC, Morris DR, Scrimgeour AG, Levenson CW (2012) Use of zinc as a treatment for traumatic brain injury in the rat: effects on cognitive and behavioral outcomes. Neurorehabilitation and neural repair 26:907-913.

Corniola RS, Tassabehji NM, Hare J, Sharma G, Levenson CW (2008) Zinc deficiency impairs neuronal precursor cell proliferation and induces apoptosis via p53-mediated mechanisms. Brain Res 1237:52-61.

Coyoy A, Olguin-Albuerne M, Martinez-Briseno P, Moran J (2013) Role of reactive oxygen species and NADPH-oxidase in the development of rat cerebellum. Neurochemistry international 62:998-1011.

Chalak LF, Adams-Huet B, Sant'Anna G (2019) A Total Sarnat Score in Mild Hypoxic-ischemic Encephalopathy Can Detect Infants at Higher Risk of Disability. The Journal of pediatrics 214:217-221 e211.

Chan-Palay V, Lin CT, Palay S, Yamamoto M, Wu JY (1982a) Taurine in the mammalian cerebellum: demonstration by autoradiography with [3H]taurine and immunocytochemistry with antibodies against the taurine-synthesizing enzyme, cysteine-sulfinic acid decarboxylase. Proc Natl Acad Sci U S A 79:2695-2699.

Chan-Palay V, Palay SL, Wu JY (1982b) Sagittal cerebellar microbands of taurine neurons: immunocytochemical demonstration by using antibodies against the taurine-synthesizing enzyme cysteine sulfinic acid decarboxylase. Proc Natl Acad Sci U S A 79:4221-4225.

Chan CY, Singh I, Magnuson H, Zohaib M, Bakshi KP, Le Francois B, Anazco-Ayala A, Lee EJ, Tom A, YeeMon K, Ragnauth A, Friedman E, Banerjee SP (2015) Taurine Targets the GluN2b-Containing NMDA Receptor Subtype. Adv Exp Med Biol 803:531-544.

Chan CY, Sun HS, Shah SM, Agovic MS, Friedman E, Banerjee SP (2014) Modes of direct modulation by taurine of the glutamate NMDA receptor in rat cortex. Eur J Pharmacol 728:167-175.

Chandran S, Yap F, Hussain K (2014) Molecular mechanisms of protein induced hyperinsulinaemic hypoglycaemia. World J Diabetes 5:666-677.

Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA (2003) Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. Leukemia 17:590-603.

Chao CC, Hu S, Molitor TW, Shaskan EG, Peterson PK (1992) Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. Journal of immunology 149:2736-2741.

Chen NN, Zhao DJ, Sun YX, Wang DD, Ni H (2019) Long-Term Effects of Zinc Deficiency and Zinc Supplementation on Developmental Seizure-Induced Brain Damage and the Underlying GPR39/ZnT-3 and MBP Expression in the Hippocampus. Frontiers in neuroscience 13:920.

Chen TI, Chen MY (2016) Zinc Is Indispensable in Exercise-Induced Cardioprotection against Intermittent Hypoxia-Induced Left Ventricular Function Impairment in Rats. PloS one 11:e0168600.

Chen VC, Chiu CC, Chen LJ, Hsu TC, Tzang BS (2018) Effects of taurine on striatal dopamine transporter expression and dopamine uptake in SHR rats. Behav Brain Res 348:219-226.

Chen XC, Pan ZL, Liu DS, Han X (1998) Effect of taurine on human fetal neuron cells: proliferation and differentiation. Advances in experimental medicine and biology 442:397-403.

Chesney RW, Helms RA, Christensen M, Budreau AM, Han X, Sturman JA (1998) The role of taurine in infant nutrition. Advances in experimental medicine and biology 442:463-476.

Chhavi N, Zutshi K, Singh NK, Awasthi A, Goel A (2014) Serum liver enzyme pattern in birth asphyxia associated liver injury. Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr 17:162-169.

Choi S, Hong DK, Choi BY, Suh SW (2020) Zinc in the Brain: Friend or Foe? Int J Mol Sci 21.

Christian P, Murray-Kolb LE, Khatry SK, Katz J, Schaefer BA, Cole PM, Leclerq SC, Tielsch JM (2010) Prenatal micronutrient supplementation and intellectual and motor function in early school-aged children in Nepal. Jama 304:2716-2723.

Dawson R, Jr., Biasetti M, Messina S, Dominy J (2002) The cytoprotective role of taurine in exercise-induced muscle injury. Amino acids 22:309-324.

de Laat KF, Tuladhar AM, van Norden AG, Norris DG, Zwiers MP, de Leeuw FE (2011) Loss of white matter integrity is associated with gait disorders in cerebral small vessel disease. Brain : a journal of neurology 134:73-83.

Deacon RM (2013) Measuring motor coordination in mice. Journal of visualized experiments : JoVE e2609.

DeFelipe J, Farinas I (1992) The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. Progress in neurobiology 39:563-607.

DeMoor JM, Kennette WA, Collins OM, Koropatnick J (2001) Zinc-metallothionein levels are correlated with enhanced glucocorticoid responsiveness in mouse cells exposed to ZnCl(2), HgCl(2), and heat shock. Toxicol Sci 64:67-76.

Dhillon SK, Lear CA, Galinsky R, Wassink G, Davidson JO, Juul S, Robertson NJ, Gunn AJ, Bennet L (2018) The fetus at the tipping point: modifying the outcome of fetal asphyxia. The Journal of physiology 596:5571-5592.

Diab H, Limami AM (2016) Reconfiguration of N Metabolism upon Hypoxia Stress and Recovery: Roles of Alanine Aminotransferase (AlaAT) and Glutamate Dehydrogenase (GDH). Plants 5.

Diaz-Garcia CM, Yellen G (2019) Neurons rely on glucose rather than astrocytic lactate during stimulation. J Neurosci Res 97:883-889.

Dienel GA (2017) Lack of appropriate stoichiometry: Strong evidence against an energetically important astrocyte-neuron lactate shuttle in brain. J Neurosci Res 95:2103-2125.

Dienel GA (2019) Brain Glucose Metabolism: Integration of Energetics with Function. Physiol Rev 99:949-1045.

Dixon BJ, Reis C, Ho WM, Tang J, Zhang JH (2015) Neuroprotective Strategies after Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy. International journal of molecular sciences 16:22368-22401.

Doering P, Stoltenberg M, Penkowa M, Rungby J, Larsen A, Danscher G (2010) Chemical blocking of zinc ions in CNS increases neuronal damage following traumatic brain injury (TBI) in mice. PLoS One 5:e10131.

Dorup I, Flyvbjerg A, Everts ME, Clausen T (1991) Role of insulin-like growth factor-1 and growth hormone in growth inhibition induced by magnesium and zinc deficiencies. Br J Nutr 66:505-521.

Draguhn A, Verdorn TA, Ewert M, Seeburg PH, Sakmann B (1990) Functional and molecular distinction between recombinant rat GABAA receptor subtypes by Zn2+. Neuron 5:781-788.

Dubois J, Dehaene-Lambertz G, Kulikova S, Poupon C, Huppi PS, Hertz-Pannier L (2014) The early development of brain white matter: a review of imaging studies in fetuses, newborns and infants. Neuroscience 276:48-71.

Dvergsten CL, Fosmire GJ, Ollerich DA, Sandstead HH (1984) Alterations in the postnatal development of the cerebellar cortex due to zinc deficiency. II. Impaired maturation of Purkinje cells. Brain Res 318:11-20.

Eide DJ (2011) The oxidative stress of zinc deficiency. Metallomics : integrated biometal science 3:1124-1129.

El Idrissi A (2008) Taurine increases mitochondrial buffering of calcium: role in neuroprotection. Amino acids 34:321-328.

El Idrissi A, Boukarrou L, Heany W, Malliaros G, Sangdee C, Neuwirth L (2009) Effects of taurine on anxiety-like and locomotor behavior of mice. Adv Exp Med Biol 643:207-215.

ElAli A, Jean LeBlanc N (2016) The Role of Monocytes in Ischemic Stroke Pathobiology: New Avenues to Explore. Frontiers in aging neuroscience 8:29.

Elsas SM, Hazany S, Gregory WL, Mody I (2009) Hippocampal zinc infusion delays the development of afterdischarges and seizures in a kindling model of epilepsy. Epilepsia 50:870-879.

Evensen KAI, Ustad T, Tikanmaki M, Haaramo P, Kajantie E (2020) Long-term motor outcomes of very preterm and/or very low birth weight individuals without cerebral palsy: A review of the current evidence. Semin Fetal Neonatal Med 25:101116.

Faraci FM, Didion SP (2004) Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24:1367-1373.

Feather-Schussler DN, Ferguson TS (2016) A Battery of Motor Tests in a Neonatal Mouse Model of Cerebral Palsy. Journal of visualized experiments : JoVE.

Fernandez-Montoya J, Avendano C, Negredo P (2017) The Glutamatergic System in Primary Somatosensory Neurons and Its Involvement in Sensory Input-Dependent Plasticity. Int J Mol Sci 19.

Fletcher JL, Wood RJ, Nguyen J, Norman EML, Jun CMK, Prawdiuk AR, Biemond M, Nguyen HTH, Northfield SE, Hughes RA, Gonsalvez DG, Xiao J, Murray SS (2018) Targeting TrkB with a

Brain-Derived Neurotrophic Factor Mimetic Promotes Myelin Repair in the Brain. J Neurosci 38:7088-7099.

Foley MA, Kamel HM, Mounir SM, Habeb SN (2016) Role of Serum Level of Neurometals; Copper, Zinc and Magnesium in Neonates with Hypoxic Ischemic Encephalopathy. Clinical laboratory 62:1633-1641.

Follett PL, Deng W, Dai W, Talos DM, Massillon LJ, Rosenberg PA, Volpe JJ, Jensen FE (2004) Glutamate receptor-mediated oligodendrocyte toxicity in periventricular leukomalacia: a protective role for topiramate. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 24:4412-4420.

Ford MC, Alexandrova O, Cossell L, Stange-Marten A, Sinclair J, Kopp-Scheinpflug C, Pecka M, Attwell D, Grothe B (2015) Tuning of Ranvier node and internode properties in myelinated axons to adjust action potential timing. Nat Commun 6:8073.

Franco JL, Posser T, Brocardo PS, Trevisan R, Uliano-Silva M, Gabilan NH, Santos AR, Leal RB, Rodrigues AL, Farina M, Dafre AL (2008) Involvement of glutathione, ERK1/2 phosphorylation and BDNF expression in the antidepressant-like effect of zinc in rats. Behav Brain Res 188:316-323.

Frederickson CJ (1989) Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. Int Rev Neurobiol 31:145-238.

Fuentefria RDN, Silveira RC, Procianoy RS (2017) Motor development of preterm infants assessed by the Alberta Infant Motor Scale: systematic review article. J Pediatr (Rio J) 93:328-342.

Fukai T, Ushio-Fukai M (2011) Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. Antioxid Redox Signal 15:1583-1606.

Fulmer CG, VonDran MW, Stillman AA, Huang Y, Hempstead BL, Dreyfus CF (2014) Astrocyte-derived BDNF supports myelin protein synthesis after cuprizone-induced demyelination. J Neurosci 34:8186-8196.

Fullerton HJ, Ditelberg JS, Chen SF, Sarco DP, Chan PH, Epstein CJ, Ferriero DM (1998) Copper/zinc superoxide dismutase transgenic brain accumulates hydrogen peroxide after perinatal hypoxia ischemia. Annals of neurology 44:357-364.

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:e0155426.

Gadian DG, Aicardi J, Watkins KE, Porter DA, Mishkin M, Vargha-Khadem F (2000) Developmental amnesia associated with early hypoxic-ischaemic injury. Brain 123 Pt 3:499-507.

Galvao MC, Chaves-Kirsten GP, Queiroz-Hazarbassanov N, Carvalho VM, Bernardi MM, Kirsten TB (2015) Prenatal zinc reduces stress response in adult rat offspring exposed to lipopolysaccharide during gestation. Life sciences 120:54-60.

Gammoh NZ, Rink L (2017) Zinc in Infection and Inflammation. Nutrients 9.

Gao HL, Zheng W, Xin N, Chi ZH, Wang ZY, Chen J, Wang ZY (2009) Zinc deficiency reduces neurogenesis accompanied by neuronal apoptosis through caspase-dependent and -independent signaling pathways. Neurotox Res 16:416-425.

Gao RGZYZZX (1998) Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. Bioelectrochemistry and Bioenergetics

Volume 45.

Gao S, Zhan L, Yang Z, Shi R, Li H, Xia Z, Yuan S, Wu QP, Wang T, Yao S (2017) Remote Limb Ischaemic Postconditioning Protects Against Myocardial Ischaemia/Reperfusion Injury in Mice: Activation of JAK/STAT3-Mediated Nrf2-Antioxidant Signalling. Cellular physiology

and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology 43:1140-1151.

Gartel AL, Shchors K (2003) Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes. Exp Cell Res 283:17-21.

Gerard-Monnier D, Erdelmeier I, Regnard K, Moze-Henry N, Yadan JC, Chaudiere J (1998) Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. Chemical research in toxicology 11:1176-1183.

Gharibani PM, Modi J, Pan C, Menzie J, Ma Z, Chen PC, Tao R, Prentice H, Wu JY (2013) The mechanism of taurine protection against endoplasmic reticulum stress in an animal stroke model of cerebral artery occlusion and stroke-related conditions in primary neuronal cell culture. Advances in experimental medicine and biology 776:241-258.

Gibson K, Halliday JL, Kirby DM, Yaplito-Lee J, Thorburn DR, Boneh A (2008) Mitochondrial oxidative phosphorylation disorders presenting in neonates: clinical manifestations and enzymatic and molecular diagnoses. Pediatrics 122:1003-1008.

Giffard RG, Yenari MA (2004) Many mechanisms for hsp70 protection from cerebral ischemia. Journal of neurosurgical anesthesiology 16:53-61.

Gogia S, Sachdev HS (2012) Zinc supplementation for mental and motor development in children. Cochrane Database Syst Rev 12:CD007991.

Golan MH, Mane R, Molczadzki G, Zuckerman M, Kaplan-Louson V, Huleihel M, Perez-Polo JR (2009) Impaired migration signaling in the hippocampus following prenatal hypoxia. Neuropharmacology 57:511-522.

Gonzalez-Barrios JA, Escalante B, Valdes J, Leon-Chavez BA, Martinez-Fong D (2002) Nitric oxide and nitric oxide synthases in the fetal cerebral cortex of rats following transient uteroplacental ischemia. Brain research 945:114-122.

Goren B, Cakir A, Ocalan B, Serter Kocoglu S, Alkan T, Cansev M, Kahveci N (2017) Long-term cognitive effects of uridine treatment in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic encephalopathy. Brain research 1659:81-87.

Goto M, Iwase A, Harata T, Takigawa S, Suzuki K, Manabe S, Kikkawa F (2009) IGF1-induced AKT phosphorylation and cell proliferation are suppressed with the increase in PTEN during luteinization in human granulosa cells. Reproduction 137:835-842.

Gotz M, Huttner WB (2005) The cell biology of neurogenesis. Nature reviews Molecular cell biology 6:777-788.

Gower-Winter SD, Corniola RS, Morgan TJ, Jr., Levenson CW (2013) Zinc deficiency regulates hippocampal gene expression and impairs neuronal differentiation. Nutr Neurosci 16:174-182.

Gregosiewicz A (1978) [Seasonal occurrence of slipped epiphyses of the hip in juveniles]. Chirurgia narzadow ruchu i ortopedia polska 43:571-574.

Grist JT, Jarvis LB, Georgieva Z, Thompson S, Kaur Sandhu H, Burling K, Clarke A, Jackson S, Wills M, Gallagher FA, Jones JL (2018) Extracellular Lactate: A Novel Measure of T Cell Proliferation. Journal of immunology 200:1220-1226.

Groleau J, Dussault S, Haddad P, Turgeon J, Menard C, Chan JS, Rivard A (2010) Essential role of copper-zinc superoxide dismutase for ischemia-induced neovascularization via modulation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 30:2173-2181.

Gronli O, Kvamme JM, Friborg O, Wynn R (2013) Zinc deficiency is common in several psychiatric disorders. PLoS One 8:e82793.

Gucuyener K, Atalay Y, Aral YZ, Hasanoglu A, Turkyilmaz C, Biberoglu G (1999) Excitatory amino acids and taurine levels in cerebrospinal fluid of hypoxic ischemic encephalopathy in newborn. Clinical neurology and neurosurgery 101:171-174.

Gunn AJ, Parer JT, Mallard EC, Williams CE, Gluckman PD (1992) Cerebral histologic and electrocorticographic changes after asphyxia in fetal sheep. Pediatr Res 31:486-491.

Hafkenscheid JC, Dijt CC (1979) Determination of serum aminotransferases: activation by pyridoxal-5'-phosphate in relation to substrate concentration. Clin Chem 25:55-59.

Hagberg H, Lehmann A, Sandberg M, Nystrom B, Jacobson I, Hamberger A (1985) Ischemia-induced shift of inhibitory and excitatory amino acids from intra- to extracellular compartments. J Cereb Blood Flow Metab 5:413-419.

Hamaguchi T, Azuma J, Schaffer S (1991) Interaction of taurine with methionine: inhibition of myocardial phospholipid methyltransferase. J Cardiovasc Pharmacol 18:224-230.

Han D, Zhang C, Fan WJ, Pan WJ, Feng DM, Qu SL, Jiang ZS (2015a) Myocardial ischemic preconditioning upregulated protein 1(Mipu1):zinc finger protein 667 - a multifunctional KRAB/C2H2 zinc finger protein. Braz J Med Biol Res 48:1-5.

Han J, Zhao J, Jiang J, Ma X, Liu X, Wang C, Jiang S, Wan C (2015b) Zinc deficiency impairs the renewal of hippocampal neural stem cells in adult rats: involvement of FoxO3a activation and downstream p27(kip1) expression. Journal of neurochemistry 134:879-891.

Haskew-Layton RE, Rudkouskaya A, Jin Y, Feustel PJ, Kimelberg HK, Mongin AA (2008) Two distinct modes of hypoosmotic medium-induced release of excitatory amino acids and taurine in the rat brain in vivo. PLoS One 3:e3543.

Hasna J, Bohic S, Lemoine S, Blugeon C, Bouron A (2019) Zinc Uptake and Storage During the Formation of the Cerebral Cortex in Mice. Molecular neurobiology 56:6928-6940.

Hawkins RA, Vina JR (2016) How Glutamate Is Managed by the Blood-Brain Barrier. Biology (Basel) 5.

Hayes KC, Carey RE, Schmidt SY (1975) Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat. Science 188:949-951.

He K, Liang X, Wei T, Liu N, Wang Y, Zou L, Bai C, Yao Y, Wu T, Kong L, Zhang T, Xue Y, Tang M (2020) A metabolomics study: CdTe/ZnS quantum dots induce polarization in mice microglia. Chemosphere 246:125629.

Hennessy E, Griffin EW, Cunningham C (2015) Astrocytes Are Primed by Chronic Neurodegeneration to Produce Exaggerated Chemokine and Cell Infiltration Responses to Acute Stimulation with the Cytokines IL-1beta and TNF-alpha. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 35:8411-8422.

Hernandez-Baltazar D, Mendoza-Garrido ME, Martinez-Fong D (2013) Activation of GSK-3beta and caspase-3 occurs in Nigral dopamine neurons during the development of apoptosis activated by a striatal injection of 6-hydroxydopamine. PloS one 8:e70951.

Hernandez-Benitez R, Pasantes-Morales H, Saldana IT, Ramos-Mandujano G (2010) Taurine stimulates proliferation of mice embryonic cultured neural progenitor cells. Journal of neuroscience research 88:1673-1681.

Hernandez-Benitez R, Ramos-Mandujano G, Pasantes-Morales H (2012) Taurine stimulates proliferation and promotes neurogenesis of mouse adult cultured neural stem/progenitor cells. Stem cell research 9:24-34.

Hernandez-Benitez R, Vangipuram SD, Ramos-Mandujano G, Lyman WD, Pasantes-Morales H (2013) Taurine enhances the growth of neural precursors derived from fetal human brain and promotes neuronal specification. Developmental neuroscience 35:40-49.

Hertz L (2013) The Glutamate-Glutamine (GABA) Cycle: Importance of Late Postnatal Development and Potential Reciprocal Interactions between Biosynthesis and Degradation. Front Endocrinol (Lausanne) 4:59.

Hirzel K, Muller U, Latal AT, Hulsmann S, Grudzinska J, Seeliger MW, Betz H, Laube B (2006) Hyperekplexia phenotype of glycine receptor alpha1 subunit mutant mice identifies Zn(2+) as an essential endogenous modulator of glycinergic neurotransmission. Neuron 52:679-690.

Hou L, Che Y, Sun F, Wang Q (2021) Correction to: Taurine protects noradrenergic locus coeruleus neurons in a mouse Parkinson's disease model by inhibiting microglial M1 polarization. Amino Acids 53:321-322.

Hsieh-Wilson LC (2018) A Molecular Window into the Brain: Special Issue on Molecules and the Brain. Biochemistry 57:3989-3990.

Hu J, Xu X, Yang J, Wu G, Sun C, Lv Q (2009) Antihypertensive effect of taurine in rat. Advances in experimental medicine and biology 643:75-84.

Huang Y, Lai H, Xu H, Wu W, Lai X, Ho G, Chen Y, Ma L (2013) Impact of perinatal systemic hypoxic-ischemic injury on the brain of male offspring rats: an improved model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy in early preterm newborns. PloS one 8:e82502.

Huang Z, Liu J, Cheung PY, Chen C (2009) Long-term cognitive impairment and myelination deficiency in a rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. Brain Res 1301:100-109.

Hutter D, Kingdom J, Jaeggi E (2010) Causes and mechanisms of intrauterine hypoxia and its impact on the fetal cardiovascular system: a review. International journal of pediatrics 2010:401323.

Jarosz M, Olbert M, Wyszogrodzka G, Mlyniec K, Librowski T (2017) Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF-kappaB signaling. Inflammopharmacology 25:11-24.

Jiang WW, Huang BS, Han Y, Deng LH, Wu LX (2017) Sodium hydrosulfide attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing overactivated autophagy in rats. FEBS open bio 7:1686-1695.

Jickling GC, Liu D, Ander BP, Stamova B, Zhan X, Sharp FR (2015) Targeting neutrophils in ischemic stroke: translational insights from experimental studies. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism 35:888-901.

Jin R, Xiao AY, Liu S, Wang M, Li G (2018) Taurine Reduces tPA (Tissue-Type Plasminogen Activator)-Induced Hemorrhage and Microvascular Thrombosis After Embolic Stroke in Rat. Stroke 49:1708-1718.

Johnston MV (2005) Excitotoxicity in perinatal brain injury. Brain Pathol 15:234-240.

Jones PS, Pomeroy VM, Wang J, Schlaug G, Tulasi Marrapu S, Geva S, Rowe PJ, Chandler E, Kerr A, Baron JC, investigators SW-C (2016) Does stroke location predict walk speed response to gait rehabilitation? Human brain mapping 37:689-703.

Jong CJ, Azuma J, Schaffer S (2012) Mechanism underlying the antioxidant activity of taurine: prevention of mitochondrial oxidant production. Amino Acids 42:2223-2232.

Jourdain P, Rothenfusser K, Ben-Adiba C, Allaman I, Marquet P, Magistretti PJ (2018) Dual action of L-Lactate on the activity of NR2B-containing NMDA receptors: from potentiation to neuroprotection. Sci Rep 8:13472.

Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ (2016) Ischemia/Reperfusion. Comprehensive Physiology 7:113-170.

Kamal S, Lappin SL (2022) Biochemistry, Catecholamine Degradation. In: StatPearls Treasure Island (FL).

Karagiannis A, Gallopin T, Lacroix A, Plaisier F, Piquet J, Geoffroy H, Hepp R, Naude J, Le Gac B, Egger R, Lambolez B, Li D, Rossier J, Staiger JF, Imamura H, Seino S, Roeper J, Cauli B (2021) Lactate is an energy substrate for rodent cortical neurons and enhances their firing activity. Elife 10.

Karlsson M, Wiberg-Itzel E, Chakkarapani E, Blennow M, Winbladh B, Thoresen M (2010) Lactate dehydrogenase predicts hypoxic ischaemic encephalopathy in newborn infants: a preliminary study. Acta Paediatr 99:1139-1144.

Kessner SS, Schlemm E, Cheng B, Bingel U, Fiehler J, Gerloff C, Thomalla G (2019) Somatosensory Deficits After Ischemic Stroke. Stroke 50:1116-1123.

Khan JY, Black SM (2003) Developmental changes in murine brain antioxidant enzymes. Pediatric research 54:77-82.

Khanna S, Briggs Z, Rink C (2015) Inducible glutamate oxaloacetate transaminase as a therapeutic target against ischemic stroke. Antioxid Redox Signal 22:175-186.

Kilb W, Fukuda A (2017) Taurine as an Essential Neuromodulator during Perinatal Cortical Development. Frontiers in cellular neuroscience 11:328.

Kim HY, Han SH (2006) Matrix metalloproteinases in cerebral ischemia. Journal of clinical neurology 2:163-170.

Kim W, Kim HU, Lee HN, Kim SH, Kim C, Cha YN, Joe Y, Chung HT, Jang J, Kim K, Suh YG, Jin HO, Lee JK, Surh YJ (2015) Taurine Chloramine Stimulates Efferocytosis Through Upregulation of Nrf2-Mediated Heme Oxygenase-1 Expression in Murine Macrophages: Possible Involvement of Carbon Monoxide. Antioxidants & redox signaling 23:163-177.

Kobayashi R, Tohda C (2017) Extracellular Cytosolic Aspartate Aminotransferase Promotes Axonal Growth and Object Recognition Memory. Neurochemical research 42:3465-3473.

Koenig JB, Dulla CG (2018) Dysregulated Glucose Metabolism as a Therapeutic Target to Reduce Post-traumatic Epilepsy. Frontiers in cellular neuroscience 12:350.

Koh JY, Suh SW, Gwag BJ, He YY, Hsu CY, Choi DW (1996) The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. Science 272:1013-1016.

Korkmaz-Icoz S, Atmanli A, Radovits T, Li S, Hegedus P, Ruppert M, Brlecic P, Yoshikawa Y, Yasui H, Karck M, Szabo G (2016) Administration of zinc complex of acetylsalicylic acid after the onset of myocardial injury protects the heart by upregulation of antioxidant enzymes. The journal of physiological sciences : JPS 66:113-125.

Krall RF, Tzounopoulos T, Aizenman E (2021) The Function and Regulation of Zinc in the Brain. Neuroscience 457:235-258.

Krezel A, Maret W (2017) The Functions of Metamorphic Metallothioneins in Zinc and Copper Metabolism. Int J Mol Sci 18.

Krutetskaia ZI, Lebedev OE, Krutetskaia NI (1998) [Role of protein kinase C in the regulation of Ca-responses induced by purinergic agonists and thapsigargin in rat peritoneal macrophages]. Tsitologiia 40:445-454.

Kubo H, Shimono R, Nakamura S, Koyano K, Jinnai W, Yamato S, Yasuda S, Nakamura M, Tanaka A, Fujii T, Kanenishi K, Chiba Y, Miki T, Kusaka T, Ueno M (2017) Hypoxic-Ischemic Encephalopathy-Associated Liver Fatty Degeneration and the Effects of Therapeutic Hypothermia in Newborn Piglets. Neonatology 111:203-210.

Kurinczuk JJ, White-Koning M, Badawi N (2010) Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. Early human development 86:329-338.

L'Amoreaux WJ, Marsillo A, El Idrissi A (2010) Pharmacological characterization of GABAA receptors in taurine-fed mice. J Biomed Sci 17 Suppl 1:S14.

Lallemand F, De Witte P (2004) Taurine concentration in the brain and in the plasma following intraperitoneal injections. Amino acids 26:111-116.

Lambert IH, Kristensen DM, Holm JB, Mortensen OH (2015) Physiological role of taurine--from organism to organelle. Acta physiologica 213:191-212.

Lanciego JL, Luquin N, Obeso JA (2012) Functional neuroanatomy of the basal ganglia. Cold Spring Harb Perspect Med 2:a009621.

Laptook AR (2016) Birth Asphyxia and Hypoxic-Ischemic Brain Injury in the Preterm Infant. Clinics in perinatology 43:529-545.

Laptook AR, Shankaran S, Tyson JE, Munoz B, Bell EF, Goldberg RN, Parikh NA, Ambalavanan N, Pedroza C, Pappas A, Das A, Chaudhary AS, Ehrenkranz RA, Hensman AM, Van Meurs KP, Chalak LF, Khan AM, Hamrick SEG, Sokol GM, Walsh MC, Poindexter BB, Faix RG, Watterberg KL, Frantz ID, 3rd, Guillet R, Devaskar U, Truog WE, Chock VY, Wyckoff MH, McGowan EC, Carlton DP, Harmon HM, Brumbaugh JE, Cotten CM, Sanchez PJ, Hibbs AM, Higgins RD, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child H, Human Development Neonatal Research N (2017) Effect of Therapeutic Hypothermia Initiated After 6 Hours of Age on Death or Disability Among Newborns With Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: A Randomized Clinical Trial. Jama 318:1550-1560.

Lee JS, Kim SK, Jung BJ, Choi SB, Choi EY, Kim CS (2018) Enhancing proliferation and optimizing the culture condition for human bone marrow stromal cells using hypoxia and fibroblast growth factor-2. Stem cell research 28:87-95.

Lee JY, Oh SB, Hwang JJ, Suh N, Jo DG, Kim JS, Koh JY (2015) Indomethacin preconditioning induces ischemic tolerance by modifying zinc availability in the brain. Neurobiol Dis 81:186-195.

Leon R, Wu H, Jin Y, Wei J, Buddhala C, Prentice H, Wu JY (2009) Protective function of taurine in glutamate-induced apoptosis in cultured neurons. J Neurosci Res 87:1185-1194.

Lepore MG, Buscemi L, Hirt L, Lei H (2020) Metabolic fingerprints discriminating severity of acute ischemia using in vivo high-field (1) H magnetic resonance spectroscopy. J Neurochem 152:252-262.

Lespay-Rebolledo C, Perez-Lobos R, Tapia-Bustos A, Vio V, Morales P, Herrera-Marschitz M (2018) Regionally Impaired Redox Homeostasis in the Brain of Rats Subjected to Global Perinatal Asphyxia: Sustained Effect up to 14 Postnatal Days. Neurotoxicity research 34:660-676.

Lev-Vachnish Y, Cadury S, Rotter-Maskowitz A, Feldman N, Roichman A, Illouz T, Varvak A, Nicola R, Madar R, Okun E (2019) L-Lactate Promotes Adult Hippocampal Neurogenesis. Frontiers in neuroscience 13:403.

Levenson CW, Morris D (2011) Zinc and neurogenesis: making new neurons from development to adulthood. Advances in nutrition 2:96-100.

Li H, Zhang J, Niswander L (2018) Zinc deficiency causes neural tube defects through attenuation of p53 ubiquitylation. Development 145.

Li M, Reynolds CM, Sloboda DM, Gray C, Vickers MH (2015) Maternal taurine supplementation attenuates maternal fructose-induced metabolic and inflammatory dysregulation and partially reverses adverse metabolic programming in offspring. The Journal of nutritional biochemistry 26:267-276.

Li S, Case AJ, Yang RF, Schultz HD, Zimmerman MC (2013) Over-expressed copper/zinc superoxide dismutase localizes to mitochondria in neurons inhibiting the angiotensin II-mediated increase in mitochondrial superoxide. Redox biology 2:8-14.

Lichtenwalner RJ, Parent JM (2006) Adult neurogenesis and the ischemic forebrain. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism 26:1-20.

Lin CT, Song GX, Wu JY (1985) Is taurine a neurotransmitter in rabbit retina? Brain Res 337:293-298.

Liu J, Liu L, Wang XF, Teng HY, Yang N (2012a) Antenatal supplementation of taurine for protection of fetal rat brain with intrauterine growth restriction from injury by reducing neuronal apoptosis. Neuropediatrics 43:258-263.

Liu J, Liu Y, Wang XF, Chen H, Yang N (2013) Antenatal taurine supplementation improves cerebral neurogenesis in fetal rats with intrauterine growth restriction through the PKA-CREB signal pathway. Nutritional neuroscience 16:282-287.

Liu P, Ge X, Ding H, Jiang H, Christensen BM, Li J (2012b) Role of glutamate decarboxylase-like protein 1 (GADL1) in taurine biosynthesis. J Biol Chem 287:40898-40906.

Locatelli A, Incerti M, Paterlini G, Doria V, Consonni S, Provero C, Ghidini A (2010) Antepartum and intrapartum risk factors for neonatal encephalopathy at term. American journal of perinatology 27:649-654.

Long DM, Frame AK, Reardon PN, Cumming RC, Hendrix DA, Kretzschmar D, Giebultowicz JM (2020) Lactate dehydrogenase expression modulates longevity and neurodegeneration in Drosophila melanogaster. Aging (Albany NY) 12:10041-10058.

Lu SC (2009) Regulation of glutathione synthesis. Molecular aspects of medicine 30:42-59.

Llorente-Folch I, Rueda CB, Perez-Liebana I, Satrustegui J, Pardo B (2016) L-Lactate-Mediated Neuroprotection against Glutamate-Induced Excitotoxicity Requires ARALAR/AGC1. J Neurosci 36:4443-4456.

MacDonald RS (2000) The role of zinc in growth and cell proliferation. J Nutr 130:1500S-1508S.

Maciaczyk D, Picard D, Zhao L, Koch K, Herrera-Rios D, Li G, Marquardt V, Pauck D, Hoerbelt T, Zhang W, Ouwens DM, Remke M, Jiang T, Steiger HJ, Maciaczyk J, Kahlert UD (2017) CBF1 is clinically prognostic and serves as a target to block cellular invasion and chemoresistance of EMT-like glioblastoma cells. Br J Cancer 117:102-112.

Maddox TR, Haas J, Andrews L, Miller B, Davies TH (2019) Abnormal Presentation of Hypoxic Ischemic Encephalopathy Attributed to Polysubstance Exposure. The American journal of case reports 20:1715-1718.

Magistretti PJ, Allaman I (2018) Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule. Nature reviews Neuroscience 19:235-249.

Magnusson KR, Madl JE, Clements JR, Wu JY, Larson AA, Beitz AJ (1988) Colocalization of taurine- and cysteine sulfinic acid decarboxylase-like immunoreactivity in the cerebellum of the rat with monoclonal antibodies against taurine. J Neurosci 8:4551-4564.

Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC (2010) Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. Molecular cell 40:294-309.

Makar TK, Nedergaard M, Preuss A, Gelbard AS, Perumal AS, Cooper AJ (1994) Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain. J Neurochem 62:45-53.

Maneru C, Junque C, Botet F, Tallada M, Guardia J (2001) Neuropsychological long-term sequelae of perinatal asphyxia. Brain Inj 15:1029-1039.

Marcinkiewicz J, Kurnyta M, Biedron R, Bobek M, Kontny E, Maslinski W (2006) Anti-inflammatory effects of taurine derivatives (taurine chloramine, taurine bromamine, and taurolidine) are mediated by different mechanisms. Advances in experimental medicine and biology 583:481-492.

Maret W (2017) Zinc in Cellular Regulation: The Nature and Significance of "Zinc Signals". International journal of molecular sciences 18.

Margineanu MB, Mahmood H, Fiumelli H, Magistretti PJ (2018) L-Lactate Regulates the Expression of Synaptic Plasticity and Neuroprotection Genes in Cortical Neurons: A Transcriptome Analysis. Front Mol Neurosci 11:375.

Mariani E, Mangialasche F, Feliziani FT, Cecchetti R, Malavolta M, Bastiani P, Baglioni M, Dedoussis G, Fulop T, Herbein G, Jajte J, Monti D, Rink L, Mocchegiani E, Mecocci P (2008) Effects of zinc supplementation on antioxidant enzyme activities in healthy old subjects. Exp Gerontol 43:445-451.

Marreiro DD, Cruz KJ, Morais JB, Beserra JB, Severo JS, de Oliveira AR (2017) Zinc and Oxidative Stress: Current Mechanisms. Antioxidants (Basel) 6.

Martin LJ, Gertz B, Pan Y, Price AC, Molkentin JD, Chang Q (2009) The mitochondrial permeability transition pore in motor neurons: involvement in the pathobiology of ALS mice. Experimental neurology 218:333-346.

Martini S, Austin T, Aceti A, Faldella G, Corvaglia L (2020) Free radicals and neonatal encephalopathy: mechanisms of injury, biomarkers, and antioxidant treatment perspectives. Pediatric research 87:823-833.

Mavelli I, Rigo A, Federico R, Ciriolo MR, Rotilio G (1982) Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in developing rat brain. The Biochemical journal 204:535-540.

May PJ (2006) The mammalian superior colliculus: laminar structure and connections. Prog Brain Res 151:321-378.

Mayer ML, Vyklicky L, Jr. (1989) The action of zinc on synaptic transmission and neuronal excitability in cultures of mouse hippocampus. J Physiol 415:351-365.

McAdams RM, Fleiss B, Traudt C, Schwendimann L, Snyder JM, Haynes RL, Natarajan N, Gressens P, Juul SE (2017a) Long-Term Neuropathological Changes Associated with Cerebral Palsy in a Nonhuman Primate Model of Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. Developmental neuroscience 39:124-140.

McAdams RM, McPherson RJ, Kapur RP, Juul SE (2017b) Focal Brain Injury Associated with a Model of Severe Hypoxic-Ischemic Encephalopathy in Nonhuman Primates. Developmental neuroscience 39:107-123.

McCommis KS, Finck BN (2015) Mitochondrial pyruvate transport: a historical perspective and future research directions. Biochem J 466:443-454.

McKenna MC (2013) Glutamate pays its own way in astrocytes. Front Endocrinol (Lausanne) 4:191.

McKenna MC, Sonnewald U, Huang X, Stevenson J, Zielke HR (1996) Exogenous glutamate concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. J Neurochem 66:386-393.

McKenna MC, Stevenson JH, Huang X, Hopkins IB (2000) Differential distribution of the enzymes glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in cortical synaptic mitochondria contributes to metabolic compartmentation in cortical synaptic terminals. Neurochemistry international 37:229-241.

McKenna MC, Tildon JT, Stevenson JH, Hopkins IB (1994) Energy metabolism in cortical synaptic terminals from weanling and mature rat brain: evidence for multiple compartments of tricarboxylic acid cycle activity. Developmental neuroscience 16:291-300.

McLeay Y, Stannard S, Barnes M (2017) The Effect of Taurine on the Recovery from Eccentric Exercise-Induced Muscle Damage in Males. Antioxidants 6.

McNally MA, Soul JS (2019) Pharmacologic Prevention and Treatment of Neonatal Brain Injury. Clinics in perinatology 46:311-325.

Medina JM, Tabernero A (2005) Lactate utilization by brain cells and its role in CNS development. J Neurosci Res 79:2-10.

Meng XY, Yu HL, Zhang WC, Wang TH, Mai X, Liu HT, Xu RC (2014) ZFP580, a novel zinc-finger transcription factor, is involved in cardioprotection of intermittent high-altitude hypoxia against myocardial ischemia-reperfusion injury. PLoS One 9:e94635.

Menzie J, Pan C, Prentice H, Wu JY (2014) Taurine and central nervous system disorders. Amino acids 46:31-46.

Menzie J, Prentice H, Wu JY (2013) Neuroprotective Mechanisms of Taurine against Ischemic Stroke. Brain sciences 3:877-907.

Mero M, Asraf H, Sekler I, Taylor KM, Hershfinkel M (2019) ZnR/GPR39 upregulation of K(+)/Cl(-)-cotransporter 3 in tamoxifen resistant breast cancer cells. Cell Calcium 81:12-20.

Moon MY, Kim HJ, Choi BY, Sohn M, Chung TN, Suh SW (2018) Zinc Promotes Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Differentiation towards a Neuronal Fate. Stem Cells Int 2018:5736535.

Moreno-Lopez B, Romero-Grimaldi C, Noval JA, Murillo-Carretero M, Matarredona ER, Estrada C (2004) Nitric oxide is a physiological inhibitor of neurogenesis in the adult mouse subventricular zone and olfactory bulb. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 24:85-95.

Mortensen OH, Olsen HL, Frandsen L, Nielsen PE, Nielsen FC, Grunnet N, Quistorff B (2010) Gestational protein restriction in mice has pronounced effects on gene expression in newborn offspring's liver and skeletal muscle; protective effect of taurine. Pediatric research 67:47-53.

Mota-Rojas D, Villanueva-Garcia D, Solimano A, Muns R, Ibarra-Rios D, Mota-Reyes A (2022) Pathophysiology of Perinatal Asphyxia in Humans and Animal Models. Biomedicines 10.

Mozaffari MS, Schaffer SW (2002) Chronic taurine treatment ameliorates reduction in saline-induced diuresis and natriuresis. Kidney Int 61:1750-1759.

Muntsant A, Shrivastava K, Recasens M, Gimenez-Llort L (2019) Severe Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury Induces Long-Term Sensorimotor Deficits, Anxiety-Like Behaviors and Cognitive Impairment in a Sex-, Age- and Task-Selective Manner in C57BL/6 Mice but Can Be Modulated by Neonatal Handling. Front Behav Neurosci 13:7.

Muramatsu M, Kakita K, Nakagawa K, Kuriyama K (1978) A modulating role of taurine on release of acetylcholine and norepinephrine from neuronal tissues. Jpn J Pharmacol 28:259-268.

Murray DM, Boylan GB, Fitzgerald AP, Ryan CA, Murphy BP, Connolly S (2008) Persistent lactic acidosis in neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy correlates with EEG grade and electrographic seizure burden. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 93:F183-186.

Nakashima AS, Dyck RH (2009) Zinc and cortical plasticity. Brain Res Rev 59:347-373.

Nanobashvili J, Neumayer C, Fugl A, Punz A, Blumer R, Prager M, Mittlbock M, Gruber H, Polterauer P, Roth E, Malinski T, Huk I (2003) Ischemia/reperfusion injury of skeletal muscle: plasma taurine as a measure of tissue damage. Surgery 133:91-100.

Netopilova M, Haugvicova R, Kubova H, Drsata J, Mares P (2001) Influence of convulsants on rat brain activities of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase. Neurochemical research 26:1285-1291.

Nguyen AT, Armstrong EA, Yager JY (2017) Neurodevelopmental Reflex Testing in Neonatal Rat Pups. Journal of visualized experiments : JoVE.

Ni H, Jiang YW, Tao LY, Jin MF, Wu XR (2009) ZnT-1, ZnT-3, CaMK II, PRG-1 expressions in hippocampus following neonatal seizure-induced cognitive deficit in rats. Toxicology letters 184:145-150.

Niu X, Zheng S, Liu H, Li S (2018) Protective effects of taurine against inflammation, apoptosis, and oxidative stress in brain injury. Mol Med Rep 18:4516-4522.

Nowak G, Szewczyk B, Sadlik K, Piekoszewski W, Trela F, Florek E, Pilc A (2003) Reduced potency of zinc to interact with NMDA receptors in hippocampal tissue of suicide victims. Pol J Pharmacol 55:455-459.

Nuttall JR, Oteiza PI (2012) Zinc and the ERK kinases in the developing brain. Neurotox Res 21:128-141.

Nuttall JR, Supasai S, Kha J, Vaeth BM, Mackenzie GG, Adamo AM, Oteiza PI (2015) Gestational marginal zinc deficiency impaired fetal neural progenitor cell proliferation by disrupting the ERK1/2 signaling pathway. J Nutr Biochem 26:1116-1123.

O'Kane D, Gibson L, May CN, du Plessis J, Shulkes A, Baldwin GS, Bolton D, Ischia J, Patel O (2018) Zinc preconditioning protects against renal ischaemia reperfusion injury in a preclinical sheep large animal model. Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine 31:821-834.

O'Kane RL, Martinez-Lopez I, DeJoseph MR, Vina JR, Hawkins RA (1999) Na(+)-dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) of the blood-brain barrier. A mechanism for glutamate removal. J Biol Chem 274:31891-31895.

O'Sullivan SA, Velasco-Estevez M, Dev KK (2017) Demyelination induced by oxidative stress is regulated by sphingosine 1-phosphate receptors. Glia 65:1119-1136.

Ohkuma S, Tamura J, Kuriyama K, Takino T (1981) Characteristics of taurine transport in freshly isolated rat hepatocytes. Jpn J Pharmacol 31:1061-1070.

Oja SS, Saransaari P (2013) Ischemia induces release of endogenous amino acids from the cerebral cortex and cerebellum of developing and adult mice. Journal of amino acids 2013:839036.

Oja SS, Saransaari P (2017) Significance of Taurine in the Brain. Adv Exp Med Biol 975 Pt 1:89-94.

Okamoto K, Kimura H, Sakai Y (1983) Taurine-induced increase of the Cl-conductance of cerebellar Purkinje cell dendrites in vitro. Brain Res 259:319-323.

Okumura A, Hayakawa F, Kato T, Kuno K, Watanabe K (1997) MRI findings in patients with spastic cerebral palsy. I: Correlation with gestational age at birth. Developmental medicine and child neurology 39:363-368.

Ostapiv RD, Humenyuk SL, Manko VV (2015) Activity and Isozyme Content of Lactate Dehydrogenase under Long-Term Oral Taurine Administration to Rats. Ukr Biochem J 87:54-62.

Ousterout DG, Kabadi AM, Thakore PI, Perez-Pinera P, Brown MT, Majoros WH, Reddy TE, Gersbach CA (2015) Correction of dystrophin expression in cells from Duchenne muscular dystrophy patients through genomic excision of exon 51 by zinc finger nucleases. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 23:523-532.

Pajarillo E, Johnson J, Jr., Rizor A, Nyarko-Danquah I, Adinew G, Bornhorst J, Stiboller M, Schwerdtle T, Son DS, Aschner M, Lee E (2020) Astrocyte-specific deletion of the transcription factor Yin Yang 1 in murine substantia nigra mitigates manganese-induced dopaminergic neurotoxicity. J Biol Chem 295:15662-15676.

Pajarillo E, Rizor A, Lee J, Aschner M, Lee E (2019) The role of astrocytic glutamate transporters GLT-1 and GLAST in neurological disorders: Potential targets for neurotherapeutics. Neuropharmacology 161:107559.

Pan C, Prentice H, Price AL, Wu JY (2012a) Beneficial effect of taurine on hypoxia- and glutamate-induced endoplasmic reticulum stress pathways in primary neuronal culture. Amino acids 43:845-855.

Pan R, Rong Z, She Y, Cao Y, Chang LW, Lee WH (2012b) Sodium pyruvate reduces hypoxic-ischemic injury to neonatal rat brain. Pediatr Res 72:479-489.

Paoletti P, Ascher P, Neyton J (1997) High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. J Neurosci 17:5711-5725.

Park SH, Lee H, Park KK, Kim HW, Lee DH, Park T (2006) Taurine-induced changes in transcription profiling of metabolism-related genes in human hepatoma cells HepG2. Advances in experimental medicine and biology 583:119-128.

Patrushev N, Seidel-Rogol B, Salazar G (2012) Angiotensin II requires zinc and downregulation of the zinc transporters ZnT3 and ZnT10 to induce senescence of vascular smooth muscle cells. PloS one 7:e33211.

Peng LA, Schousboe A, Hertz L (1991) Utilization of alpha-ketoglutarate as a precursor for transmitter glutamate in cultured cerebellar granule cells. Neurochemical research 16:29-34.

Perera M, Ischia J, Bolton D, Shulkes A, Baldwin GS, Patel O (2021) Zinc Preconditioning Provides Cytoprotection following Iodinated Contrast Media Exposure in In Vitro Models. Contrast Media Mol Imaging 2021:6686803.

Perez A, Ritter S, Brotschi B, Werner H, Caflisch J, Martin E, Latal B (2013) Long-term neurodevelopmental outcome with hypoxic-ischemic encephalopathy. J Pediatr 163:454-459.

Pfaender S, Fohr K, Lutz AK, Putz S, Achberger K, Linta L, Liebau S, Boeckers TM, Grabrucker AM (2016) Cellular Zinc Homeostasis Contributes to Neuronal Differentiation in Human Induced Pluripotent Stem Cells. Neural Plast 2016:3760702.

Poleszak E, Wlaz P, Wrobel A, Fidecka S, Nowak G (2008) NMDA/glutamate mechanism of magnesium-induced anxiolytic-like behavior in mice. Pharmacol Rep 60:655-663.

Portbury SD, Hare DJ, Bishop DP, Finkelstein DI, Doble PA, Adlard PA (2018) Trehalose elevates brain zinc levels following controlled cortical impact in a mouse model of traumatic brain injury. Metallomics 10:846-853.

Pow DV, Sullivan R, Reye P, Hermanussen S (2002) Localization of taurine transporters, taurine, and (3)H taurine accumulation in the rat retina, pituitary, and brain. Glia 37:153-168.

Prentice H, Gharibani PM, Ma Z, Alexandrescu A, Genova R, Chen PC, Modi J, Menzie J, Pan C, Tao R, Wu JY (2017a) Neuroprotective Functions Through Inhibition of ER Stress by Taurine or Taurine Combination Treatments in a Rat Stroke Model. Advances in experimental medicine and biology 975 Pt 1:193-205.

Prentice H, Pan C, Gharibani PM, Ma Z, Price AL, Giraldo GS, Retz HM, Gupta A, Chen PC, Chiu H, Modi J, Menzie J, Tao R, Wu JY (2017b) Analysis of Neuroprotection by Taurine and Taurine Combinations in Primary Neuronal Cultures and in Neuronal Cell Lines Exposed to Glutamate Excitotoxicity and to Hypoxia/Re-oxygenation. Advances in experimental medicine and biology 975 Pt 1:207-216.

Qi Z, Liu KJ (2017) Pathophysiological role of zinc in ischemic brain injury. Oncotarget 8:5670-5671.

Qin X, Cheng J, Zhong Y, Mahgoub OK, Akter F, Fan Y, Aldughaim M, Xie Q, Qin L, Gu L, Jian Z, Xiong X, Liu R (2019) Mechanism and Treatment Related to Oxidative Stress in Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. Frontiers in molecular neuroscience 12:88.

Qu SL, Fan WJ, Zhang C, Guo F, Han D, Pan WJ, Li W, Feng DM, Jiang ZS (2014) Mipu1 overexpression protects macrophages from oxLDL-induced foam cell formation and cell apoptosis. DNA Cell Biol 33:839-846.

Quistorff B, Secher NH, Van Lieshout JJ (2008) Lactate fuels the human brain during exercise. FASEB J 22:3443-3449.

Raghu CN, Manikeri SR, Sheth UK, Dadkar VN (1982) Probable mode of taurine action. Indian J Exp Biol 20:481-483.

Rahman I, Kode A, Biswas SK (2006) Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. Nature protocols 1:3159-3165.

Rak K, Volker J, Jurgens L, Scherzad A, Schendzielorz P, Radeloff A, Jablonka S, Mlynski R, Hagen R (2014) Neurotrophic effects of taurine on spiral ganglion neurons in vitro. Neuroreport 25:1250-1254.

Ranjbar E, Kasaei MS, Mohammad-Shirazi M, Nasrollahzadeh J, Rashidkhani B, Shams J, Mostafavi SA, Mohammadi MR (2013) Effects of zinc supplementation in patients with major depression: a randomized clinical trial. Iran J Psychiatry 8:73-79.

Redgrave P, Coizet V, Comoli E, McHaffie JG, Leriche M, Vautrelle N, Hayes LM, Overton P (2010) Interactions between the Midbrain Superior Colliculus and the Basal Ganglia. Front Neuroanat 4.

Rikimaru M, Ohsawa Y, Wolf AM, Nishimaki K, Ichimiya H, Kamimura N, Nishimatsu S, Ohta S, Sunada Y (2012) Taurine ameliorates impaired the mitochondrial function and prevents stroke-like episodes in patients with MELAS. Internal medicine 51:3351-3357.

Riley LG, Cowley MJ, Gayevskiy V, Roscioli T, Thorburn DR, Prelog K, Bahlo M, Sue CM, Balasubramaniam S, Christodoulou J (2017) A SLC39A8 variant causes manganese deficiency, and glycosylation and mitochondrial disorders. J Inherit Metab Dis 40:261-269.

Riljak V, Kraf J, Daryanani A, Jiruska P, Otahal J (2016) Pathophysiology of perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy - biomarkers, animal models and treatment perspectives. Physiological research 65:S533-S545.

Rockland KS (2014) Zinc-positive and zinc-negative connections of the claustrum. Front Syst Neurosci 8:37.

Rocha ED, de Brito NJ, Dantas MM, Silva Ade A, Almeida M, Brandao-Neto J (2015) Effect of Zinc Supplementation on GH, IGF1, IGFBP3, OCN, and ALP in Non-Zinc-Deficient Children. J Am Coll Nutr 34:290-299.

Rodriguez-Rocha H, Garcia-Garcia A, Pickett C, Li S, Jones J, Chen H, Webb B, Choi J, Zhou Y, Zimmerman MC, Franco R (2013) Compartmentalized oxidative stress in dopaminergic cell death induced by pesticides and complex I inhibitors: distinct roles of superoxide anion and superoxide dismutases. Free Radic Biol Med 61:370-383.

Rogatzki MJ, Ferguson BS, Goodwin ML, Gladden LB (2015) Lactate is always the end product of glycolysis. Front Neurosci 9:22.

Rogers EE, Hintz SR (2016) Early neurodevelopmental outcomes of extremely preterm infants. Semin Perinatol 40:497-509.

Romero-Garcia S, Moreno-Altamirano MM, Prado-Garcia H, Sanchez-Garcia FJ (2016) Lactate Contribution to the Tumor Microenvironment: Mechanisms, Effects on Immune Cells and Therapeutic Relevance. Frontiers in immunology 7:52.

Rong Y, Doctrow SR, Tocco G, Baudry M (1999) EUK-134, a synthetic superoxide dismutase and catalase mimetic, prevents oxidative stress and attenuates kainate-induced neuropathology. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96:9897-9902.

Rosell A, Ortega-Aznar A, Alvarez-Sabin J, Fernandez-Cadenas I, Ribo M, Molina CA, Lo EH, Montaner J (2006) Increased brain expression of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. Stroke 37:1399-1406.

Rossignol F, Solares M, Balanza E, Coudert J, Clottes E (2003) Expression of lactate dehydrogenase A and B genes in different tissues of rats adapted to chronic hypobaric hypoxia. J Cell Biochem 89:67-79.

Rothe F, Wolf G (1984) Alanine aminotransferase in the rat nervous system during the postnatal development referring to the glutamate transmitter metabolism. Neurochem Res 9:661-668.

Rotondo S, Sadek R, Mekawy N, Arnos M, El Idrissi A (2019) Taurine Enhances Stretch Reflex Excitability. Adv Exp Med Biol 1155:359-365.

Ruban A, Malina KC, Cooper I, Graubardt N, Babakin L, Jona G, Teichberg VI (2015) Combined Treatment of an Amyotrophic Lateral Sclerosis Rat Model with Recombinant GOT1 and Oxaloacetic Acid: A Novel Neuroprotective Treatment. Neuro-degenerative diseases 15:233-242.

Rutherford MA, Pennock JM, Dubowitz LM (1994) Cranial ultrasound and magnetic resonance imaging in hypoxic-ischaemic encephalopathy: a comparison with outcome. Developmental medicine and child neurology 36:813-825.

Sacchi C, De Carli P, Mento G, Farroni T, Visentin S, Simonelli A (2018a) Socio-Emotional and Cognitive Development in Intrauterine Growth Restricted (IUGR) and Typical Development Infants: Early Interactive Patterns and Underlying Neural Correlates. Rationale and Methods of the Study. Front Behav Neurosci 12:315.

Sacchi C, De Carli P, Vieno A, Piallini G, Zoia S, Simonelli A (2018b) Does infant negative emotionality moderate the effect of maternal depression on motor development? Early Hum Dev 119:56-61.

Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL (1997) Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. Stroke 28:1283-1288.

Sanchez-Illana A, Nunez-Ramiro A, Cernada M, Parra-Llorca A, Valverde E, Blanco D, Moral-Pumarega MT, Cabanas F, Boix H, Pavon A, Chaffanel M, Benavente-Fernandez I, Tofe I, Loureiro B, Fernandez-Lorenzo JR, Fernandez-Colomer B, Garcia-Robles A, Kuligowski J, Vento M, Group HS (2017) Evolution of Energy Related Metabolites in Plasma from Newborns with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy during Hypothermia Treatment. Scientific reports 7:17039.

Sanderson C, Murphy S (1981) Glutamate binding in the rat cerebral cortex during ontogeny. Brain Res 254:329-339.

Sanford L, Carpenter MC, Palmer AE (2019) Intracellular Zn(2+) transients modulate global gene expression in dissociated rat hippocampal neurons. Scientific reports 9:9411.

Santora A, Neuwirth LS, L'Amoreaux WJ, Idrissi AE (2013) The effects of chronic taurine supplementation on motor learning. Adv Exp Med Biol 775:177-185.

Sanz-Moreno A, Fuhrmann D, Zankel A, Reingruber H, Kern L, Meijer D, Niemann A, Elsasser HP (2015) Late onset neuropathy with spontaneous clinical remission in mice lacking the POZ domain of the transcription factor Myc-interacting zinc finger protein 1 (Miz1) in Schwann cells. The Journal of biological chemistry 290:727-743.

Saransaari P, Oja SS (2003) Involvement of nitric oxide in ischemia-evoked taurine release in the mouse hippocampus. Adv Exp Med Biol 526:453-461.

Sarnat HB, Sarnat MS (1976) Neonatal encephalopathy following fetal distress. A clinical and electroencephalographic study. Archives of neurology 33:696-705.

Satoh H, Kang J (2009) Modulation by taurine of human arterial stiffness and wave reflection. Advances in experimental medicine and biology 643:47-55.

Schaffer S, Azuma J, Takahashi K, Mozaffari M (2003) Why is taurine cytoprotective? Adv Exp Med Biol 526:307-321.

Schaffer S, Takahashi K, Azuma J (2000) Role of osmoregulation in the actions of taurine. Amino Acids 19:527-546.

Schaffer SW, Azuma J, Mozaffari M (2009) Role of antioxidant activity of taurine in diabetes. Can J Physiol Pharmacol 87:91-99.

Schaffer SW, Solodushko V, Kakhniashvili D (2002) Beneficial effect of taurine depletion on osmotic sodium and calcium loading during chemical hypoxia. Am J Physiol Cell Physiol 282:C1113-1120.

Schmidt W, Wolf G (1986) [Aspartate aminotransferase activity high affinity (3H) glutamate/(3H) aspartate uptake in rat nervous tissue in postnatal development]. Acta Histochem Suppl 33:281-288.

Schmidt W, Wolf G (1987) Activity of aspartate aminotransferase in the hippocampal formation of the rat during post-natal development and after lesion of the hippocampal Schaffer's collaterals: A quantitative histochemical study. Neurochem Int 11:39-47.

Schneider H, Ballowitz L, Schachinger H, Hanefeld F, Droszus JU (1975) Anoxic encephalopathy with predominant involvement of basal ganglia, brain stem and spinal cord in the perinatal period. Report on seven newborns. Acta neuropathologica 32:287-298.

Schoen M, Asoglu H, Bauer HF, Muller HP, Abaei A, Sauer AK, Zhang R, Song TJ, Bockmann J, Kassubek J, Rasche V, Grabrucker AM, Boeckers TM (2019) Shank3 Transgenic and Prenatal Zinc-Deficient Autism Mouse Models Show Convergent and Individual Alterations of Brain Structures in MRI. Front Neural Circuits 13:6.

Schousboe A, Scafidi S, Bak LK, Waagepetersen HS, McKenna MC (2014) Glutamate metabolism in the brain focusing on astrocytes. Advances in neurobiology 11:13-30.

Sensi SL, Paoletti P, Bush AI, Sekler I (2009) Zinc in the physiology and pathology of the CNS. Nat Rev Neurosci 10:780-791.

Sensi SL, Yin HZ, Carriedo SG, Rao SS, Weiss JH (1999) Preferential Zn2+ influx through Ca2+-permeable AMPA/kainate channels triggers prolonged mitochondrial superoxide production. Proc Natl Acad Sci U S A 96:2414-2419.

Serban V, Liu Y, Quinn MR (2003) Production of nitric oxide by activated microglial cells is inhibited by taurine chloramine. Adv Exp Med Biol 526:357-364.

Shapiro KA, Kim H, Mandelli ML, Rogers EE, Gano D, Ferriero DM, Barkovich AJ, Gorno-Tempini ML, Glass HC, Xu D (2017) Early changes in brain structure correlate with language outcomes in children with neonatal encephalopathy. Neuroimage Clin 15:572-580.

Sheldon RA, Christen S, Ferriero DM (2008) Genetic and pharmacologic manipulation of oxidative stress after neonatal hypoxia-ischemia. International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience 26:87-92.

Sheldon RA, Jiang X, Francisco C, Christen S, Vexler ZS, Tauber MG, Ferriero DM (2004) Manipulation of antioxidant pathways in neonatal murine brain. Pediatric research 56:656-662.

Shen D, Tian L, Yang F, Li J, Li X, Yao Y, Lam EW, Gao P, Jin B, Wang R (2021) ADO/hypotaurine: a novel metabolic pathway contributing to glioblastoma development. Cell Death Discov 7:21.

Shi Z, Zhang W, Lu Y, Lu Y, Xu L, Fang Q, Wu M, Jia M, Wang Y, Dong L, Yan X, Yang S, Yuan F (2017) Aquaporin 4-Mediated Glutamate-Induced Astrocyte Swelling Is Partially Mediated through Metabotropic Glutamate Receptor 5 Activation. Frontiers in cellular neuroscience 11:116.

Shimada-Takaura K, Takahashi K, Ito T, Schaffer S (2017) Role for Taurine in Development of Oxidative Metabolism After Birth. Advances in experimental medicine and biology 975 Pt 2:1047-1057.

Shivananjappa MM, Muralidhara (2012) Taurine attenuates maternal and embryonic oxidative stress in a streptozotocin-diabetic rat model. Reproductive biomedicine online 24:558-566.

Shu X, Keller TCt, Begandt D, Butcher JT, Biwer L, Keller AS, Columbus L, Isakson BE (2015) Endothelial nitric oxide synthase in the microcirculation. Cellular and molecular life sciences : CMLS 72:4561-4575.

Shuaib A (2003) The role of taurine in cerebral ischemia: studies in transient forebrain ischemia and embolic focal ischemia in rodents. Advances in experimental medicine and biology 526:421-431.

Shustova TI, Mashkova N, Cherkashina EM, Dokshina GA (1986) [Effect of taurine on potassium, calcium and sodium levels in the blood and tissues of rats]. Vopr Med Khim 32:113-116.

Shuvaev VV, Tliba S, Nakada M, Albelda SM, Muzykantov VR (2007) Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1-directed endothelial targeting of superoxide dismutase alleviates oxidative stress caused by either extracellular or intracellular superoxide. J Pharmacol Exp Ther 323:450-457.

Shyh-Chang N, Daley GQ, Cantley LC (2013) Stem cell metabolism in tissue development and aging. Development 140:2535-2547.

Silva J, Mak W, Zvetkova I, Appanah R, Nesterova TB, Webster Z, Peters AH, Jenuwein T, Otte AP, Brockdorff N (2003) Establishment of histone h3 methylation on the inactive X chromosome requires transient recruitment of Eed-Enx1 polycomb group complexes. Developmental cell 4:481-495.

Singh DK, Ling EA, Kaur C (2018) Hypoxia and myelination deficits in the developing brain. International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience 70:3-11.

Singleton O, Holzel BK, Vangel M, Brach N, Carmody J, Lazar SW (2014) Change in Brainstem Gray Matter Concentration Following a Mindfulness-Based Intervention is Correlated with Improvement in Psychological Well-Being. Front Hum Neurosci 8:33.

Smart TG, Xie X, Krishek BJ (1994) Modulation of inhibitory and excitatory amino acid receptor ion channels by zinc. Prog Neurobiol 42:393-441.

Smith SS, Li J (1991) GABAB receptor stimulation by baclofen and taurine enhances excitatory amino acid induced phosphatidylinositol turnover in neonatal rat cerebellum. Neuroscience letters 132:59-64.

Song NY, Shi HB, Li CY, Yin SK (2012) Interaction between taurine and GABA(A)/glycine receptors in neurons of the rat anteroventral cochlear nucleus. Brain Res 1472:1-10.

Soto-Rojas LO, Banuelos C, Garces-Ramirez L, Luna-Herrera C, Flores-Martinez YM, Soto-Rodriguez G, Gatica-Garcia B, Lopez-Salas FE, Ayala-Davila J, Gutierrez-Castillo ME, Padilla-Viveros A, de la Cruz-Lopez F, Martinez-Davila IA, Martinez-Fong D (2020a) A sequential methodology for integral evaluation of motor and non-motor behaviors in parkinsonian rodents. MethodsX 7:100821.

Soto-Rojas LO, Martinez-Davila IA, Luna-Herrera C, Gutierrez-Castillo ME, Lopez-Salas FE, Gatica-Garcia B, Soto-Rodriguez G, Bringas Tobon ME, Flores G, Padilla-Viveros A, Banuelos C, Blanco-Alvarez VM, Davila-Ayala J, Reyes-Corona D, Garces-Ramirez L, Hidalgo-Alegria O, De La Cruz-Lopez F, Martinez-Fong D (2020b) Unilateral intranigral administration of beta-sitosterol beta-D-glucoside triggers pathological alpha-synuclein spreading and bilateral nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the rat. Acta neuropathologica communications 8:56.

Spasov P, Markovski N, Coseva-Manceva S (1977) [Values of spirographic measurements of MMFR as 25-75% of FEVC in healthy men aged 20-29]. God Zb Med Fak Skopje 23:427-430.

Stevens HE, Su T, Yanagawa Y, Vaccarino FM (2013) Prenatal stress delays inhibitory neuron progenitor migration in the developing neocortex. Psychoneuroendocrinology 38:509-521.

Stewart GR, Frederickson CJ, Howell GA, Gage FH (1984) Cholinergic denervation-induced increase of chelatable zinc in mossy-fiber region of the hippocampal formation. Brain Res 290:43-51.

Stipanuk MH, Kuo SM, Hirschberger LL (1984) Changes in maternal taurine levels in response to pregnancy and lactation. Life Sci 35:1149-1155.

Stipanuk MH, Rotter MA (1984) Metabolism of cysteine, cysteinesulfinate and cysteinesulfonate in rats fed adequate and excess levels of sulfur-containing amino acids. The Journal of nutrition 114:1426-1437.

Stummer W, Betz AL, Shakui P, Keep RF (1995) Blood-brain barrier taurine transport during osmotic stress and in focal cerebral ischemia. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism 15:852-859.

Sturman JA (1993) Taurine in development. Physiol Rev 73:119-147.

Sturman JA, Rassin DK, Gaull GE (1977) Taurine in developing rat brain: transfer of [35S] taurine to pups via the milk. Pediatr Res 11:28-33.

Sturman JA, Wen GY, Wisniewski HM, Hayes KC (1981) Histochemical localization of zinc in the feline tapetum. Effect of taurine depletion. Histochemistry 72:341-350.

Suarez LM, Munoz MD, Martin Del Rio R, Solis JM (2016) Taurine content in different brain structures during ageing: effect on hippocampal synaptic plasticity. Amino Acids 48:1199-1208.

Suh SW, Won SJ, Hamby AM, Yoo BH, Fan Y, Sheline CT, Tamano H, Takeda A, Liu J (2009) Decreased brain zinc availability reduces hippocampal neurogenesis in mice and rats. J Cereb Blood Flow Metab 29:1579-1588.

Sulzer D, Cragg SJ, Rice ME (2016) Striatal dopamine neurotransmission: regulation of release and uptake. Basal Ganglia 6:123-148.

Sun M, Gu Y, Zhao Y, Xu C (2011) Protective functions of taurine against experimental stroke through depressing mitochondria-mediated cell death in rats. Amino acids 40:1419-1429.

Sunuwar L, Gilad D, Hershfinkel M (2017) The zinc sensing receptor, ZnR/GPR39, in health and disease. Front Biosci (Landmark Ed) 22:1469-1492.

Tabata T, Ishida AT (1999) A zinc-dependent Cl- current in neuronal somata. J Neurosci 19:5195-5204.

Taber KH, Lin CT, Liu JW, Thalmann RH, Wu JY (1986) Taurine in hippocampus: localization and postsynaptic action. Brain Res 386:113-121.

Takakusaki K (2017) Functional Neuroanatomy for Posture and Gait Control. J Mov Disord 10:1-17.

Takatani T, Takahashi K, Uozumi Y, Shikata E, Yamamoto Y, Ito T, Matsuda T, Schaffer SW, Fujio Y, Azuma J (2004) Taurine inhibits apoptosis by preventing formation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome. American journal of physiology Cell physiology 287:C949-953.

Takeda A, Hirate M, Tamano H, Oku N (2003) Release of glutamate and GABA in the hippocampus under zinc deficiency. J Neurosci Res 72:537-542.

Takuma K, Matsuda T, Hashimoto H, Asano S, Baba A (1994) Cultured rat astrocytes possess Na(+)-Ca2+ exchanger. Glia 12:336-342.

Tauffenberger A, Fiumelli H, Almustafa S, Magistretti PJ (2019) Lactate and pyruvate promote oxidative stress resistance through hormetic ROS signaling. Cell Death Dis 10:653.

Tekkok SB, Goldberg MP (2001) Ampa/kainate receptor activation mediates hypoxic oligodendrocyte death and axonal injury in cerebral white matter. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 21:4237-4248.

Ten VS, Bradley-Moore M, Gingrich JA, Stark RI, Pinsky DJ (2003) Brain injury and neurofunctional deficit in neonatal mice with hypoxic-ischemic encephalopathy. Behavioural brain research 145:209-219.

Teo JD, Morris MJ, Jones NM (2017) Maternal obesity increases inflammation and exacerbates damage following neonatal hypoxic-ischaemic brain injury in rats. Brain Behav Immun 63:186-196.

Teo L, Bourne JA (2014) A reproducible and translatable model of focal ischemia in the visual cortex of infant and adult marmoset monkeys. Brain pathology 24:459-474.

Terrill JR, Pinniger GJ, Graves JA, Grounds MD, Arthur PG (2016) Increasing taurine intake and taurine synthesis improves skeletal muscle function in the mdx mouse model for Duchenne muscular dystrophy. The Journal of physiology 594:3095-3110.

Tomas-Sanchez C, Blanco-Alvarez VM, Martinez-Fong D, Gonzalez-Barrios JA, Gonzalez-Vazquez A, Aguilar-Peralta AK, Torres-Soto M, Soto-Rodriguez G, Limon ID, Brambila E, Millan-Perez-Pena L, Cebada J, Orozco-Barrios CE, Leon-Chavez BA (2018) Prophylactic Zinc and Therapeutic Selenium Administration Increases the Antioxidant Enzyme Activity in the Rat Temporoparietal Cortex and Improves Memory after a Transient Hypoxia-Ischemia. Oxidative medicine and cellular longevity 2018:9416432.

Torres-Cuevas I, Parra-Llorca A, Sanchez-Illana A, Nunez-Ramiro A, Kuligowski J, Chafer-Pericas C, Cernada M, Escobar J, Vento M (2017) Oxygen and oxidative stress in the perinatal period. Redox biology 12:674-681.

Torres-Merino S, Moreno-Sandoval HN, Thompson-Bonilla MDR, Leon JAO, Gomez-Conde E, Leon-Chavez BA, Martinez-Fong D, Gonzalez-Barrios JA (2019) Association Between rs3833912/rs16944 SNPs and Risk for Cerebral Palsy in Mexican Children. Molecular neurobiology 56:1800-1811.

Trachtman H, del Pizzo R, Sturman JA (1990) Taurine and osmoregulation. III. Taurine deficiency protects against cerebral edema during acute hyponatremia. Pediatr Res 27:85-88.

Trachtman H, Futterweit S, Prenner J, Hanon S (1994) Antioxidants reverse the antiproliferative effect of high glucose and advanced glycosylation end products in cultured rat mesangial cells. Biochemical and biophysical research communications 199:346-352.

Trivedi SB, Vesoulis ZA, Rao R, Liao SM, Shimony JS, McKinstry RC, Mathur AM (2017) A validated clinical MRI injury scoring system in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. Pediatr Radiol 47:1491-1499.

Trombley PQ, Blakemore LJ, Hill BJ (2011) Zinc modulation of glycine receptors. Neuroscience 186:32-38.

Ueki I, Stipanuk MH (2007) Enzymes of the taurine biosynthetic pathway are expressed in rat mammary gland. J Nutr 137:1887-1894.

Vainshtein BK, Melik-Adamyan WR, Barynin VV, Vagin AA, Grebenko AI (1981) Three-dimensional structure of the enzyme catalase. Nature 293:411-412.

Valentine JS, Doucette PA, Zittin Potter S (2005) Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. Annu Rev Biochem 74:563-593.

Valvona CJ, Fillmore HL, Nunn PB, Pilkington GJ (2016) The Regulation and Function of Lactate Dehydrogenase A: Therapeutic Potential in Brain Tumor. Brain Pathol 26:3-17.

van Handel M, Swaab H, de Vries LS, Jongmans MJ (2007) Long-term cognitive and behavioral consequences of neonatal encephalopathy following perinatal asphyxia: a review. Eur J Pediatr 166:645-654.

Vargas-Castro V, Gomez-Diaz R, Blanco-Alvarez VM, Tomas-Sanchez C, Gonzalez-Vazquez A, Aguilar-Peralta AK, Gonzalez-Barrios JA, Martinez-Fong D, Eguibar JR, Ugarte A, Soto-Rodriguez G, Brambila E, Millan-Perez Pena L, Leon-Chavez BA (2022) Effects of chronic

taurine administration on healthy pregnant rats and the consequences on the offspring: Datasets for motor tests and oxidative stress. Data Brief 41:108015.

Vasilev DS, Dubrovskaya NM, Tumanova NL, Zhuravin IA (2016) Prenatal Hypoxia in Different Periods of Embryogenesis Differentially Affects Cell Migration, Neuronal Plasticity, and Rat Behavior in Postnatal Ontogenesis. Frontiers in neuroscience 10:126.

Vergnano AM, Rebola N, Savtchenko LP, Pinheiro PS, Casado M, Kieffer BL, Rusakov DA, Mulle C, Paoletti P (2014) Zinc dynamics and action at excitatory synapses. Neuron 82:1101-1114.

Viswanath K, Bodiga S, Balogun V, Zhang A, Bodiga VL (2011) Cardioprotective effect of zinc requires ErbB2 and Akt during hypoxia/reoxygenation. Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine 24:171-180.

Vitvitsky V, Garg SK, Banerjee R (2011) Taurine biosynthesis by neurons and astrocytes. J Biol Chem 286:32002-32010.

Vogler NW, Betti VM, Goldberg JM, Tzounopoulos T (2020) Mechanisms Underlying Long-Term Synaptic Zinc Plasticity at Mouse Dorsal Cochlear Nucleus Glutamatergic Synapses. J Neurosci 40:4981-4996.

Waagepetersen HS, Bakken IJ, Larsson OM, Sonnewald U, Schousboe A (1998) Comparison of lactate and glucose metabolism in cultured neocortical neurons and astrocytes using 13C-NMR spectroscopy. Developmental neuroscience 20:310-320.

Wallwork JC, Sandstead HH (1983) Effect of zinc deficiency on appetite and free amino acid concentrations in rat brain. The Journal of nutrition 113:47-54.

Wang DC, Lin YY, Chen TJ, Lin HT (2014) Motor skill learning enhances the expression of activity-regulated cytoskeleton-associated protein in the rat cerebellum. Journal of comparative physiology A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology 200:959-966.

Wang G, Zuo X, Jiang L, Wang K, Wei X, Zhang B, Xiao X (2010) Tissue expression and subcellular localization of Mipu1, a novel myocardial ischemia-related gene. Braz J Med Biol Res 43:43-51.

Wang K, Lei J, Zou J, Xiao H, Chen A, Liu X, Liu Y, Jiang L, Xiao Z, Xiao X (2013) Mipu1, a novel direct target gene, is involved in hypoxia inducible factor 1-mediated cytoprotection. PLoS One 8:e82827.

Wang Y, Li XW, Liu J, Fu W (2018) Antenatal taurine supplementation in fetal rats with growth restriction improves neural stem cell proliferation by inhibiting the activities of Rho family factors. 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 Obstet 31:1454-1461.

Wang Z, Li JY, Dahlstrom A, Danscher G (2001) Zinc-enriched GABAergic terminals in mouse spinal cord. Brain Res 921:165-172.

Weglicki WB, Chmielinska JJ, Kramer JH, Mak IT (2011) Cardiovascular and intestinal responses to oxidative and nitrosative stress during prolonged magnesium deficiency. The American journal of the medical sciences 342:125-128.

Weiss JH, Hartley DM, Koh JY, Choi DW (1993) AMPA receptor activation potentiates zinc neurotoxicity. Neuron 10:43-49.

Wensink J, Hoeve H, Mertens zur Borg I, Van den Hamer CJ (1989) Dietary zinc deficiency has no effect on auditory brainstem responses in the rat. Biol Trace Elem Res 22:55-62.

Werner JC, Sicard RE (1987) Lactate metabolism of isolated, perfused fetal, and newborn pig hearts. Pediatr Res 22:552-556.

Westbrook GL, Mayer ML (1987) Micromolar concentrations of Zn2+ antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons. Nature 328:640-643.

Wu FY, Huang WJ, Sinclair RB, Powers L (1992) The structure of the zinc sites of Escherichia coli DNA-dependent RNA polymerase. J Biol Chem 267:25560-25567.

Wu FY, Wu CW (1987) Zinc in DNA replication and transcription. Annu Rev Nutr 7:251-272.

Wu JY (1982) Purification and characterization of cysteic acid and cysteine sulfinic acid decarboxylase and L-glutamate decarboxylase from bovine brain. Proc Natl Acad Sci U S A 79:4270-4274.

Wu JY, Moss LG, Chen MS (1979) Tissue and regional distribution of cysteic acid decarboxylase. A new assay method. Neurochem Res 4:201-212.

Wu T, He K, Liang X, Wei T, Wang Y, Zou L, Zhang T, Xue Y, Tang M (2020) The glycolytic shift was involved in CdTe/ZnS quantum dots inducing microglial activation mediated through the mTOR signaling pathway. J Appl Toxicol 40:388-402.

Wu TW, Tamrazi B, Hsu KH, Ho E, Reitman AJ, Borzage M, Bluml S, Wisnowski JL (2018) Cerebral Lactate Concentration in Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: In Relation to Time, Characteristic of Injury, and Serum Lactate Concentration. Front Neurol 9:293.

Yamaguchi N, Yamaguchi N (2015) The seventh zinc finger motif of A20 is required for the suppression of TNF-alpha-induced apoptosis. FEBS letters 589:1369-1375.

Yang W, Wang L, Tian T, Liu L, Jin L, Liu J, Ren A (2019) Maternal hypertensive disorders in pregnancy and risk of hypoxic-ischemia encephalopathy. 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 Obstet 1-9.

Yang X, Wang H, Huang C, He X, Xu W, Luo Y, Huang K (2017) Zinc enhances the cellular energy supply to improve cell motility and restore impaired energetic metabolism in a toxic environment induced by OTA. Scientific reports 7:14669.

Yellen G (2018) Fueling thought: Management of glycolysis and oxidative phosphorylation in neuronal metabolism. J Cell Biol 217:2235-2246.

Yu C, Mei XT, Zheng YP, Xu DH (2015) Taurine zinc solid dispersions protect against cold-restraint stress-induced gastric ulceration by upregulating HSP70 and exerting an anxiolytic effect. Eur J Pharmacol 762:63-71.

Yu J, Kim AK (2009) Effect of taurine on antioxidant enzyme system in B16F10 melanoma cells. Adv Exp Med Biol 643:491-499.

Yuan D, Huang J, Yuan X, Zhao J, Jiang W (2013) Zinc finger protein 667 expression is upregulated by cerebral ischemic preconditioning and protects cells from oxidative stress. Biomed Rep 1:534-538.

Zafeiriou DI (2004) Primitive reflexes and postural reactions in the neurodevelopmental examination. Pediatric neurology 31:1-8.

Zechel JL, Gamboa JL, Peterson AG, Puchowicz MA, Selman WR, Lust WD (2005) Neuronal migration is transiently delayed by prenatal exposure to intermittent hypoxia. Birth defects research Part B, Developmental and reproductive toxicology 74:287-299.

Zeevalk GD, Nicklas WJ (1992) Evidence that the loss of the voltage-dependent Mg2+ block at the N-methyl-D-aspartate receptor underlies receptor activation during inhibition of neuronal metabolism. Journal of neurochemistry 59:1211-1220.

Zhang Q, Liu Y, Wang H, Ma L, Xia H, Niu J, Sun T, Zhang L (2017) The preventive effects of taurine on neural tube defects through the Wnt/PCP-Jnk-dependent pathway. Amino acids 49:1633-1640.

Zhu XY, Ma PS, Wu W, Zhou R, Hao YJ, Niu Y, Sun T, Li YX, Yu JQ (2016) Neuroprotective actions of taurine on hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats. Brain research bulletin 124:295-305.

ANEXO

Cuantificación de proteínas totales (PT)

Reactivo de Coomassie

- Preparar 210 mL de solución de ácido perclórico al 3 % (la concentración inicial del ac. perclórico es 70 %)
- Pesar 0.12 g de Coomassie blue G-250, disolver en agitación constante en la solución de ácido perclórico 3 %
- Filtrar la solución
- Leer en el espectrofotómetro a 465 nm utilizando como blanco de lectura un mL de solución de ácido perclórico 3 %, ajustar la absorbancia entre el rango de 1.3 – 1.5 (agregando más solución de ácido perclórico 3 % o agitar/filtrar)
- El reactivo de Coomassie se debe mantener protegido de la luz colocándolo en un frasco ámbar

Stock de Albúmina

Pesar 1 mg de albúmina y disolver en 1 mL de agua destilada

Curva de calibración

Para realizar la cuantificación de PT se debe realizar una cuerva de calibración a 620 nm.

Concentración (µM)	Albúmina (µL)	dH_2O (µL)	Coomassie (µL)
Blanco	0	500	500
1.0	1	499	500
2.5	2.5	497.5	500
5.0	5	495	500
10.0	10	490	500

Cuantificación de nitritos (Método de Griess)

Stock de nitritos

- Pesar 0.069 g de nitritos de sodio y disolver en 1 mL de agua destilada y mezclar perfectamente
- En un tubo adicional colocar 1 µL del Stock de nitritos y diluir en 999 µL de agua destilada y mezclar con agitación

Reactivo de Griess

Solución A

- Pesar 1.3 g de sulfanilamida
- Medir 60 mL de ácido acético glacial
- Medir 39 mL de agua destilada
- Mezclar perfectamente y almacenar en un frasco ámbar a 4 ºC

Solución B

- Pesar 0.1 g de N-naftil-etilendiamina
- Medir 100 mL de agua destilada
- Mezclar perfectamente y almacenar a 4 ºC en un frasco ámbar

Las soluciones (A y B) se mezclan en el momento que realicen las determinaciones evitando que el reactivo de Griess entre en contacto con la luz.

El reactivo de Griess se prepara en una proporción 1:1.

Para realizar las cuantificaciones se debe llevar a cabo una curva de calibración y leer a 540 nm.

Concentración (µM)	Nitrito de sodio (µL)	dH_2O (µL)	Reactivo de Griess (µL)
Blanco	0	900	100
1.0	1	899	100
2.5	2.5	897.5	100
5.0	5	895	100
10.0	10	890	100

Cuantificación de malonildialdehído y 4-hidroxialquenales (MDA & 4-HDA) (Método de Gerard-Monier)

Solución I

- Pesar 38 mg de N-metil-2-fenil-indol
- Disolver en 18 mL de acetonitrilo y mezclar perfectamente
- Completar hasta un volumen de 24 mL con 6 mL de etanol

Solución II

Stock de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (10 µM)

Disolver 1.65 µL de 1,1,3,3-tetrametoxipropano en 1 mL de agua destilada

Stock de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (0.1 µM)

Diluir 50 µL del Stock (10 µM) en 50 mL de agua destilada

Para realizar las cuantificaciones, se debe realizar una curva de calibración.

Los tubos se incuban a 45 ºC durante una hora, en caso de que los tubos presenten mucho sobrenadante, se requerirá un ciclo de centrifugación a 12 500 rpm por 15 min. Las reacciones se leen a 586 nm.

Concentración (µM)	Solución II (µL)	Solución I (µL)	dH_2O (µL)	Ácido metanosulfónico (µL)
Blanco	0	650	200	150
0.5	5	650	195	150
1.0	10	650	190	150
2.5	25	650	175	150
5.0	50	650	150	150
10.0	100	650	100	150

Cuantificación de la actividad enzimática de catalasa

Solución buffer de fosfatos (50 mM)

- Pesar 0.816 g de KH_2PO_4
- Pesar 0.696 g de K_2HPO_4
- Disolver perfectamente ambas sales en 200 mL de agua destilada

Solución de peróxido de hidrógeno (30 mM)

- Disolver 50 g de peróxido de hidrogeno 30 % en 50 mL de agua destilada

La actividad enzimática CAT es cuantificada en 75 µL del sobrenadante en una celda de cuarzo en un espectrofotómetro **(Aebi, 1984)**. Después de agregar 330 µL H_2O_2 (30 mM) y ajustar a 1mL con buffer de fosfatos, el cambio de absorbancia de H_2O_2 fue monitoreada continuamente a 240nm cada 30 s con un espectrofotómetro. Los resultados de la actividad enzimática se reportan como la U min^{-1}/mg de proteína.

Cuantificación de la actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD)

Solución de TRIS

- Pesar 1.21 g de TRIS
- Disolver en 50 mL de agua destilada

Solución de HCl

- Tomar 0.23 mL de ácido clorhídrico concentrado
- Disolver en 21.9 mL de agua destilada

Buffer de TRIS-HCl

- Mezclar las soluciones de TRIS y HCl
- Aforar a 200 mL
- Ajustar el pH de la solución a 8.2

Solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)

- Pesar 223.3 mg de ácido etilendiaminotetraacético disódico
- Disolver perfectamente en 10 mL de agua destilada

Solución de Pirogallol

- Pesar 18.6 mg de pirogalol
- Disolver perfectamente en 20 mL de agua destilada
- Proteger la solución en un frasco ámbar

La actividad enzimática de SOD total de muestras se mide usando pirogalol como sustrato y registrando su producto de degradación a 420 nm **(Gao, 1998)**. En una celda de cuarzo, se añaden 100 µL de muestras y complementado con 700 µL de un buffer de Tris-HCl solución, pH 8,2 y 50µL de EDTA. Posteriormente, se añade 50µL de pirogalol, y después de 10 s de reacción, los cambios de densidad óptica (OD) se determinan durante un minuto a 420nm con un espectrofotómetro. Al lograr un cambio de absorbancia de 0.020 ± 0.001, la absorbancia es evaluada continuamente durante dos minutos más. Los

resultados de la actividad enzimática se portan como U min^{-1}/mg de proteína usando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad enzimática} = (AV\ \Delta ODs * 100AV\ \Delta ODb - 100)\ X\ 0.6,$$

donde AV es el valor promedio, ΔODs es la diferencia de DO de la muestra, ΔODbis la diferencia de DO en blanco de la reacción, y 0.6 es el factor constante.

Cuantificación del glutatión total (GSH + GSSG)

Buffer de fosfato de postasio (0.1 M) con EDTA disódico (5mM), pH = 7.5. Buffer KPE

Solución A

- Pesar 6.5 g de KH_2PO_4
- Disolver perfectamente en 500 mL de agua destilada
- Almacenar a 4 °C

Solución B

- Pesar g de K_2HPO_4 o 11.4 g de K_2HPO_4 3H2O
- Disolver perfectamente en 500 mL de agua destilada
- Almacenar a 4°C

Buffer 0.1 M de fosfatos (KPE)

- Mezclar 16 mL de Solución A y 84 mL de Solución B
- Ajustar el pH a 7.5
- Agregar 0.327 g de EDTA disódico

Buffer de extracción 0.1 %Tritón X-100 y 0.6 % de ac. Sulfosalicílico en KPE

- Tomar 20 µL de Tritón X-100
- Pesar 120 mg de ac sulfosalicílico
- Disolver el Tritón y el ácido sulfosaicílico en 20 mL de KPE
- Mantener en hielo. ***El ac sulfosalicílico inhibe la actividad de la γGT y previene la perdida de GSH.***

Solución de DNTB en KPE

- Pesar 2 mg de 2-nitro-5-tiobenzoico (DNTB)
- Disolver perfectamente en 3 mL de KPE

El volumen de este reactivo puede ser ajustado de acuerdo con las necesidades. ***Preparar al momento de su uso en un tubo oscuro o cubrir con aluminio. Exponer a la luz conduce al incrementar su oxidación y por lo tanto a la intensidad de la solución.***

Solución de β-NADPH en KPE

- Pesar 2 mg de dinucleótido fosfato de dihidronicotinamida-adenina (β-NADPH)
- Disolver perfectamente en 3 mL de KPE

El volumen de este reactivo puede ser ajustado de acuerdo con las necesidades. ***Preparar al momento de su uso en un tubo oscuro o cubrir con aluminio.***

Solución de Glutatión Reductasa (GR) en KPE

- Tomar 40 µL de glutatión reductasa (GR) (250 U/mL)
- Disolver en 3 mL de KPE

El volumen de este reactivo puede ser ajustado de acuerdo con las necesidades.
Preparar al momento de su uso en un tubo oscuro o cubrir con aluminio.

Para cuantificar el glutatión total, los tejidos deben ser homogenizados en una solución de Tritón-X y ácido sulfosalicílico al 0.6%.

Centrifugar el tejido homogenizado a 8000 g por 10 min a 2-4 °C

Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo

Medición del Glutatión total (GSH + GSSG)

1. Mantener las muestras y estándares en hielo y cubiertos durante todo el procedimiento.
2. Agregar 20 µL de KPE en el pozo 1A (blanco) _____y 20 µL de cada uno de los estándares en los pozos B-H de la columna 1 ____, adicionar 20 µL de la muestra en los pozos A-H en las columnas 2 y 3____. No llenar la placa completa, ya que se requiere tiempo de consumo y el ensayo es cinético.
3. Mezclar con volúmenes iguales de las soluciones DTNB y GR, agregar 120 µL en cada uno de los pozos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Bco											
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

ETAPA CRÍTICA: los reactivos deben ser recién preparados. El DTNB se puede reducir al contacto con la luz lo que lleva a incrementar la intensidad de su color (el color amarillo es obtenido al final de la reacción). Siempre hay que mantener un tubo que contenga una mezcla de DTNB-GR, también debe estar cubierto con aluminio y evitar la exposición con la luz.

4. Permitir que se lleve a cabo la conversión de GSSG a GSH por 30 s, entonces agregar 60 µL de β-NADPH____. ***El tubo de β-NADPH, debe de mantenerse en un recipiente cubierto con aluminio para protegerlo de la luz.***

5. Inmediatamente leer la absorbancia a 412 nm en el lector de placa y tomar la medición cada 30 s por 2 min (5 lecturas en total desde 120 s). Repetir para cada muestra.

6. Calcular la tasa de formación del ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (cambio en absorbancia min^{-1}).

7. Determinar la concentración de GSH total actual en las muestras por la regresión lineal para calcular los valores obtenidos de la curva estándar.

8. Expresar la concentración total de GSH como µM o nM mg^{-1} de proteínas totales.

Cuantificación del glutatión oxidado (GSSG)

Solución estándar de 2-vinilpiridina

- Diluir 1:10 con KPE
- Almacenar en hielo. ***Preparar en campana de extracción***

Solución de trietanolamina

- Diluir 1:6 con KPE
- Almacenar en hielo

Ensayo en microplaca de 96 pozos para la evaluación de GSSG

1. Adicionar 100 µL de sobrenadante tratado con ácido sulfosalicílico en un tubo de 1.5 mL. Posteriormente agregar 2 µL de 2-vinilpiridina y mezclar bien para derivatizar el GSH.
2. Permitir que la reacción se llevar a cabo por 1 h a temperatura ambiente en campana de extracción.
3. La 2-vinilpiridina debe ser agregada lo más rápido posible, porque la oxidación de GSH a GSSG *in vitro* ocurre rápidamente en tejido dañado.
4. Agregar 6 µL trietanolamina al costado del tubo y mezcle vigorosamente. El pH final debe estar entre 6 – 7.
5. Permitir neutralización por 10 min. El pH alcalino favorece la formación del GSSG.
6. Evaluar las muestras derivatizadas por el método descrito en el Paso 2A, ya sea en una placa de 96 pozos o espectrofotométricamente a 412 nm. El estándar de GSSG (que contiene 2-vinilpiridina y trietanolamina) y las muestras blanco que contiene solo 2-vinilpiridina y trietanolamina deben ser también leídas (Bco).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Bco											
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Curva estándar de GSH

1. Preparar una solución stock de GSH por la disolución de 1 mg de GSH en 1 mL de KPE. Alicuotar y almacenar a -20° C (se puede conservar por varias semanas)
2. Diluir el stock 1:100 con KPE para hacer la solución de trabajo de 10 µg/mL
3. Diluir 800 µL de la solución de trabajo con 200 µL de KPE para obtener la concentración estándar superior 264 nM/mL y posteriormente hacer un par de diluciones seriadas para una serie de estándares:

GSH	Diluyente (KPE)	Concentración
		10 µM
200	**800**	**26.4 nM**
500	**500**	**13.2 nM**
500	**500**	**6.6 nM**
500	**500**	**3.3 nM**
500	**500**	**1.65 nM**
500	**500**	**0.825 nM**
500	**500**	**0.4125 nM**
500	500	0.206 nM
500	500	0.103 nM

Curva estándar de GSSG

1. Preparar una solución stock de GSSG

- Pesar 2.01 mg GSSG
- Disolver perfectamente en 1 mL KPE

2. Diluir el stock 1:200 con KPE para hacer la solución de trabajo de 10 µg/mL

3. Diluir 800 µL de la solución de trabajo con 200 µL de KPE para hacer llegar a una concentración de 26.4 nM y hacer un par de diluciones seriadas para tener un rango de concentraciones estándar de 26.4 nM – 0.103 nM como se describe para el estándar de GSH.

GSSG	Diluyente (KPE)	Concentración
		10 µM
200	**800**	**26.4 nM**
500	**500**	**13.2 nM**
500	**500**	**6.6 nM**
500	**500**	**3.3 nM**
500	**500**	**1.65 nM**
500	**500**	**0.825 nM**
500	**500**	**0.4125 nM**
500	500	0.206 nM
500	500	0.103 nM

4. Usar 0.615 – 1.65 nM GSH/GSSG para construir la curva de calibración. El rango de concentraciones se puede modificar para ajustar las concentraciones de GSH/GSSG en muestras con la curva de calibración.

Tinción de Nissl

1.- Montar los cortes de 40 µm en solución PO_4 0.1 M sobre portaobjetos gelatinizados y dejar secar toda la noche _____

2.- Colocar las laminillas en una canastilla y lavar como sigue:

A. Xilol 5 min _____

B. EtOH 95 % 3 min (o 15 baños) _____

C. EtOH 70 % 3 min (o 15 baños) _____

D. Agua desionizada 3 min (o 15 baños)____

E. Cresil violeta 30 min a TA _____

F. Agua destilada 3 min (o 15 baños)_____

G. EtOH 70% 3 min (o 15 baños)___

H. EtOH 95% 2 min (o 10 baños)___

I. EtOH absoluto (de 1 -10 baños dependiendo si se está lavando la tinción)___

J. Xilol 5 min _____

K. Xilol 5 min _____

3.- Montar con Resina de Entellan y dejar secar un día

Notas:

- Para las diluciones de los alcoholes partir de Et-OH absoluto; recordar que se trata de una reacción exotérmica y no se afora, se mide el alcohol y el agua por separado.
- Preparar el cresil violeta con las siguientes indicaciones:

Pesar 0.1 g de violeta de cresilo por cada 100 mL de agua desionizada

Disolver a 60° hasta la completa disolución del violeta de cresilo

Agregar 0.25 mL de ácido acético glacial por cada 100 mL y filtrar

Antes de cada uso la solución se deberá filtrar, esto va a ocasionar que cuando la solución sea reutilizada se deberá de dejar más tiempo el paso E o bien utilizar temperatura 37 °C.