



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Posgrado en Ciencias Químicas

área de:

Bioquímica y Biología Molecular

Nombre de la Tesis:

**Participación del óxido nítrico en la neurogénesis causada por la
administración subaguda de zinc durante un proceso hipóxico-isquémico
cerebral en rata**

Para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias Químicas

Área de Bioquímica y Biología Molecular

Presenta:

M.C. Víctor Manuel Blanco Álvarez

Director del proyecto

Dra. Bertha Alicia León Chávez

Profesor titular del Posgrado en Ciencias Químicas

Área de Bioquímica y Biología Molecular,

Facultad de Ciencias Químicas, BUAP

Co-Director del proyecto

Dr. Juan Antonio González Barrios

Jefe del Laboratorio de Medicina Genómica,

Hospital Regional. "1° de Octubre", ISSSTE

Heroica Puebla de Zaragoza, Puebla, México

Diciembre de 2017

DEDICATORIA

Noemí Álvarez Linares

Mi madre que siempre está a mi lado

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis representa 4 años de trabajo logrando cada objetivo cumplido, tanto académico, personal y profesional, por lo que requiere ser agradecido.

En primer lugar a quién ha dirigido este proyecto Dra. Bertha Alicia León Chávez, gracias por confiar en mí y permitirme desarrollar este trabajo que me ha aportado tantos conocimientos y satisfacciones.

Al Dr. Juan Antonio González Barrios, gracias por el compromiso que ha mantenido en mi formación al aceptar la co-dirección de este proyecto y recordarme que siempre queda mucho que aprender y por hacer.

A los Doctores que han participado en la evaluación de este trabajo Dr. Daniel Martínez Fong, Dra. Lourdes Millán Pérez Peña, Dra. Carmen Vivar Estudillo, Dra. Guadalupe Soto Rodríguez, Dr. Eduardo Miguel Brambila Colombres y Dr. José Ramón Eguibar Cuenca. Gracias a todos por su colaboración en el proyecto, aportes, consejos, sugerencias y compartir conmigo en todo momento su experiencia y conocimiento.

Agradezco al CONACyT por la beca y a la VIEP por su apoyo en la asistencia a congresos.

Dentro de estos cuatro años he podido desarrollarme en diferentes laboratorios. Primero agradezco a mis compañeros del Laboratorio de Investigaciones Químico Clínicas mi casa, chicos gracias por todo el apoyo tantos momentos y todo el cariño, definitivamente sin ustedes todo esto no hubiera sido igual; Kary, Ale, Tino, difícilmente existirá un mejor equipo de trabajo que este que logramos formar, siempre juntos y con los que migraron Richi, Lupitas, Omar, May y por quienes llegan Viry, Karla, Pedro, Jhonatan. Son un gran equipo.

A mis compañeros del laboratorio de Medicina Genómica del Hospital Regional 1° de Octubre, Hayde, Celia y Manuel; gracias por siempre compartir sus tips y conocimientos, ustedes son el mejor ejemplo de que los conocimientos se comparten.

A mis compañeros del laboratorio de Terapia génica y enfermedades neurodegenerativas del CINVESTAV por siempre hacerme sentir como en casa y el permitirme aprender de ustedes, Monse, Oskar, Clau, José, Ernesto, Adrian, Nachito, Mine, Azu, Lulú. Gracias por todo.

También tuve la oportunidad de aprender en el Laboratorio de Neurogénesis y Neuroplasticidad del CINVESTAV agradezco a Soco, Armando, Belén, Ana, Fanny, por su ayuda, confianza y los grandes ratos en esos largos periodos de incubación.

Me toco ser hijo único sin embargo he logrado encontrar personas a los que veo como hermanos y siempre han estado moralmente y vaya que ha hecho falta gracias!!! Russ, Manu, Nishi, Lalo, Gas, José, Pariz, Yorch, Richi, Yaya, Jorge, Lau, Juliet, Martha, Jaz, Gabi, Beto, Charly, Mire, Viry, Adi, Koss, Luz, Mary, San, Josh, Rock, Mike, Vicky, Paco, Tepe, Ari, Erick, Max, Angel, Vic, Yam, Dari, Helen Espero no olvidar a nadie gracias por estar.

Finalmente a mis padres Miguel Guillermo Blanco Quiroz y Noemí Álvarez Linares por apoyarme en todo y con todo por siempre estar conmigo y permitirme realizar mis sueños gracias por tanto

Gracias a todos.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS | 6 |
| RESUMEN | 11 |
| INTRODUCCIÓN | 13 |
| Enfermedad Cerebrovascular | 13 |
| Terapéutica Farmacológica..... | 18 |
| Zinc (Zn ²⁺)..... | 21 |
| Óxido Nítrico (NO) | 24 |
| Factores de Crecimiento..... | 26 |
| Vías de Señalización (ERK, NF-kB) | 29 |
| Polarización de la microglia M1 y M2 en la isquemia cerebral | 34 |
| Neurogénesis..... | 36 |
| PLANTEAMIENTO..... | 43 |
| HIPOTESIS..... | 43 |
| OBJETIVOS..... | 44 |
| Objetivo general..... | 44 |
| Objetivos específicos..... | 44 |
| PROTOCOLO EXPERIMENTAL..... | 46 |
| METODOLOGÍA..... | 47 |
| Animales..... | 47 |
| Cirugía | 47 |
| Cuantificación de proteínas totales | 47 |
| Ensayo inmunoenzimático (ELISA)..... | 48 |
| Extracción de RNA total..... | 48 |
| Retrotranscripción- PCR | 49 |
| PCR tiempo real | 49 |
| Inyección de BrdU..... | 49 |
| Inmunohistoquímica vs BrdU y conteo de células..... | 50 |
| Inmunofluorescencia para determinar colocalización..... | 50 |
| Análisis estadístico | 51 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 52 |
| La administración profiláctica induce la transcripción de quimiocinas y factores de crecimiento, promoviendo la supervivencia celular..... | 52 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| La administración profiláctica de zinc promueve la vasodilatación en la fase temprana del proceso hipóxico isquémico a través de la transcripción de eNOS | 61 |
| La administración profiláctica de zinc promueve la activación de ERK y NFκB | 70 |
| La administración profiláctica de zinc disminuye el proceso inflamatorio causado por la isquemia | 73 |
| El proceso isquémico en la fase temprana y tardía causa una disminución de genes involucrados en el proceso de neurogénesis | 77 |
| La administración profiláctica de zinc regula negativamente genes que participan en la funcionalidad sináptica, proliferación y migración..... | 85 |
| La administración profiláctica subaguda de zinc en la fase temprana del proceso hipóxico isquémico cerebral promueve la transcripción de genes involucrados en la neurogénesis. | 87 |
| La administración profiláctica de zinc promueve la transcripción de genes involucrados en la neurogénesis en la fase tardía del proceso hipóxico isquémico cerebral..... | 89 |
| La inhibición de la producción de óxido nítrico y la neurogénesis en la fase temprana y tardía del proceso hipóxico isquémico cerebral..... | 96 |
| Efecto de la inhibición de NO en la isquemia cerebral | 96 |
| Participación del óxido nítrico sobre la maduración celular causado por la administración profiláctica de zinc durante un proceso hipóxico isquémico cerebral | 102 |
| RESUMEN | 104 |
| CONCLUSIÓN..... | 105 |
| PERSPECTIVAS..... | 105 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 106 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--------------------------------------------------------------|
| 4-HDA | 4-Hidroxi alquenes |
| 4-HNE | 4-Hidroxi nonenales |
| Ache | Acetilcolinesterasa |
| Adora1 | Receptor de Adenosina A1a |
| Adora2a | Receptor de Adenosina A2a |
| Alk | Cinasa anaplástica de linfoma |
| AMPA | Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico |
| Apbb1 | Proteína de unión al amiloide beta 1 |
| Apoe | Apolipoproteína E |
| App | Proteína precursora amiloide beta A4 |
| Artn | Artemina |
| Ascl1 | Complejo homólogo "Achaete-scute" 1 (Drosophila) |
| ATP | Adenosin trifosfato |
| Bcl2 | Linfoma de células B tipo 2 |
| Bdnf | Factor neurotrófico derivado del cerebro |
| Bmp2 | Proteína morfogénica de hueso tipo 2 |
| Bmp4 | Proteína morfogénica de hueso tipo 4 |
| Bmp8a | Proteína morfogénica de hueso tipo 8a |
| BUAP | Benemérita Universidad Autónoma de Puebla |
| CA1 | Cornu Ammonis 1 |
| Ca ²⁺ | Calcio |
| CAM | Calmodulina |
| CCL12 | Ligando de quimiocinas 12 |
| CCL2 | Ligando de quimiocinas 2 |
| CCR2 | Receptor de quimiocinas tipo 2 |
| Cdk5r1 | Cinasa dependiente de ciclina 5, subunidad reguladora 1 |
| Cdk5rap2 | Proteína asociada a la subunidad reguladora CDK5 tipo 2 |
| Chat | Colina acetiltransferasa |

| | |
|------------------|----------------------------------------------------------|
| Chrm2 | Receptor colinérgico, muscarínico tipo 2 |
| CINVESTAV | Centro de Investigación y de Estudios Avanzados |
| Creb1 | Proteína de unión a elementos de respuesta CAMP tipo 1 |
| Cu | Cobre |
| Cxcl1 | Ligando de quimiocina 1 (motivo C-X-C) |
| Dcx | Doble cortina |
| DIO | Yodotironina desiodinasas |
| DL ₅₀ | Dosis letal 50 |
| Dlg4 | Homólogo largo Discs 4 (Drosophila) |
| Dll1 | Delta tipo 1 (Drosophila) |
| Drd2 | Receptor de dopamina D2 |
| Dvl3 | Homologo dsh 3 (Drosophila) |
| E | Este (cuadrante) |
| Efnb1 | Efrina B1 |
| Egf | Factor de crecimiento epidermal |
| Ep300 | Proteína de unión E1A p300 |
| EPM | Laberinto elevado en cruz |
| ErbB2 | Oncogen homólogo derivado de neuro/glioblastoma (avian) |
| FDA | Administración de alimentos y medicamentos |
| Fe | Hierro |
| Fgf2 | Factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 |
| Flna | Alfa filamina A |
| Gdnf | Factor neurotrófico derivado de la glia |
| Gpi | Glucosa 6 fosfato isomerasa |
| GPx | Glutación peroxidasa |
| GPx1 | Glutación peroxidasa 1 |
| GPx4 | Glutación peroxidasa 4 |
| GPx6 | Glutación peroxidasa 6 |
| Grin1 | Receptor de glutamato ionotrópico, N-metil D-aspartato 1 |
| GSH | Glutación |

| | |
|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrogeno |
| Hdac4 | Histona desacetilasa 4 |
| Hes1 | Potenciador del crecimiento de pelo split 1 (Drosophila) |
| Hey1 | Potenciador del crecimiento de pelo split 1 relacionado con YRPW motivo 1 |
| Hey2 | Potenciador del crecimiento de pelo split 1 relacionado con YRPW motivo 2 |
| Heyl | Potenciador del crecimiento de pelo split 1 relacionado con YRPW |
| ICAM-1 | Molécula de adhesión celular 1 |
| Il3 | Interleucina 3 |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IL-8 | Interleucina 8 |
| IL-β | Interleucina 1- Beta |
| IPN | Instituto Politécnico Nacional |
| Kmt2a | Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 1 |
| LAM | Laberinto acuático de Morris |
| Lif | Factor inhibitorio de leucemia |
| LIQC | Laboratorio de Investigaciones Químico Clínicas |
| LTP | Potenciación a largo plazo |
| Map2 | Proteína asociada a los microtúbulos tipo 2 |
| MDA | Malonildialdehido |
| Mdk | Midcina |
| Mef2c | Factor potenciador de miocitos 2C |
| N | Norte (cuadrante) |
| Na ⁺ | Sodio |
| Na ₂ SeO ₃ | Selenito de sodio |
| NaNO ₂ | Nitrito de sodio |
| Ndn | Homólogo de nectina (mouse) |
| Ndp | Enfermedad Norrie (pseudoglioma) (human) |
| Neurod1 | Diferenciación neurogénica 1 |
| Neurog1 | Neurogenina 1 |

| | |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Neurog2 | Neurogenina 2 |
| Nf1 | Neurofibromina 1 |
| Nm | Nanómetro |
| NMDA | N-Metil-D-Aspartato |
| nNOS | Sintasa del óxido nítrico neuronal |
| NO | Óxido nítrico |
| NO ₂ ⁻ | Nitrito |
| Nog | Nogina |
| Notch1 | Homólogo de Notch 1, asociado a la translocación (Drosophila) |
| Notch2 | Homólogo de Notch 2 (Drosophila) |
| Nrcam | Molécula de adhesión de células neuronales |
| Nrg1 | Neuregulina 1 |
| Nrp1 | Neuropilina 1 |
| Nrp2 | Neuropilina 2 |
| Ntf3 | Neurotrofina 3 |
| Ntn1 | Netrina 1 |
| O | Oeste (cuadrante) |
| O ₂ ⁻ | Anión superóxido |
| OACP | Obliteración de la arteria carótida primitiva |
| -OH | Radical hidroxilo |
| Olig2 | Factor de transcripción de linaje de oligodendrocitos tipo 2 |
| ONOO ⁻ | Anión peroxinitrito |
| P450 | Citocromo P450 |
| Pafah1b1 | Factor activador de plaquetas acetilhidrolasa isoforma 1b, subunidad 1 |
| Pard3 | Homólogo Par-3 (C. elegans) |
| Pax2 | Caja pareada 2 |
| Pax3 | Caja pareada 3 |
| Pax6 | Caja pareada 6 |
| PBS | Solución buffer de fosfatos |
| Pou3f3 | Dominio POU 3 clase 3 |

| | |
|---------------|--------------------------------------------------------------|
| Pou4f1 | Dominio POU 4 clase 1 |
| Ptn | Pleiotrofina |
| Rac1 | Sustrato de la toxina botulínica C3 relacionado a Ras tipo 1 |
| RNS | Especies reactivas de nitrógeno |
| Robo1 | Homólogo Roundabout 1 (Drosophila) |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| Rtn4 | Reticulon 4 |
| S100a6 | Proteína de unión a calcio S100 tipo A6 |
| S100b | Proteína de unión a calcio S100 tipo B |
| SelK | Selenoproteína K |
| SelM | Selenoproteína M |
| SelP | Selenoproteína P |
| SEM | Error estándar de la media |
| Shh | Sonic hedgehog |
| Slit2 | Homólogo de Slit 2 (Drosophila) |
| SNC | Sistema nervioso central |
| SOD | Superoxido dismutasa |
| Sod1 | Superoxido dismutasa 1, soluble |
| Sox2 | Región determinante del sexo Y (SRY) caja 2 |
| Sox8 | Región determinante del sexo Y (SRY) caja 8 |
| Stat3 | Transductor de señal y activador de transcripción 3 |
| Tgfb1 | Factor de crecimiento transformante beta 1 |
| Th | Tirosina hidroxilasa |
| TNF- α | Factor de necrosis tumoral α |
| Tnr | Tenacina R |
| tPA | Activador tisular del plasminógeno |
| TrxR | Tiorredoxina reductasa |
| TrxR1 | Tiorredoxina reductasa 1 |
| TrxR2 | Tiorredoxina reductasa 2 |
| Vegfa | Factor de crecimiento vascular endothelial tipo A |

RESUMEN

Las enfermedades cerebrovasculares son la tercera causa de muerte y la primera causante de discapacidad de personas económicamente activas. Los agentes involucrados en el daño celular son: el estrés nitrosativo, estrés oxidativo y el proceso inflamatorio. En estudios previos hemos demostrado que la administración profiláctica aguda y subaguda de zinc producen un efecto protector ante un daño causado por la obliteración de la arteria carótida primitiva (OACP), previniendo la producción de óxido nítrico (NO) y la lipoperoxidación, así como el incremento de quimiocinas, sus receptores, y de factores de crecimiento (factor de crecimiento semejante a la insulina y el factor de crecimiento de fibroblastos) relacionados con la neuroprotección durante un proceso hipóxico-isquémico cerebral en rata. Mientras que la inhibición de la producción de NO en ratas tratadas con zinc incrementa el daño neuronal, incrementando la producción de NO y la lipoperoxidación en la fase tardía (7 días). Existen evidencias de que el NO incrementa el zinc y que el zinc estabiliza las sintasas de NO (NOS) constitutivas e inhibe la expresión de la NOS inducible. En este trabajo se valoró si el NO está involucrado en la inducción de la neurogénesis a través de la expresión de factores de crecimiento inducidos por la administración profiláctica de zinc de forma subaguda durante un proceso Hipóxico isquémico cerebral en rata, a través de las vías de señalización de NF κ B o ERK. Ratas Wistar Macho entre 180-230 g se dividieron en: grupo 1 control sin tratamiento, grupo 2 control con tratamiento subagudo de zinc (administración de ZnCl₂ 2.5 mg/kg cada 24 h durante 4 días [Zn96h]), grupo 3 Zn96h+Isquemia; grupo que se le administró ZnCl₂ de forma subaguda y se le realizó el proceso hipóxico isquémico cerebral por la obliteración de la arteria carótida primitiva (OACP) por 10 min, grupo 4 Zn96h+L-NAME+Isquemia; ratas tratadas con ZnCl₂ de forma subaguda y la administración de L-NAME (10 mg/kg) una hora antes del proceso Hipóxico isquémico cerebral, grupo 5 control Zn96h y L-NAME. Los cerebros fueron extraídos a las 8 h, 24 h, 96 h y 168 h post-reperfusion, se evaluó el cambio en la transcripción a través de su ácido ribonucleico mensajero (mRNA) por RT-qPCR y la expresión de las proteínas por el método de ELISA. Se evaluaron los cambios en la neurogénesis

mediante el estudio de la maduración de células nuevas por medio de la administración de BrdU y la colocación con un marcador de neuronas (NeuN). Estos resultados proporcionaron evidencias de que la administración subaguda de zinc induce la expresión de factores de crecimiento, vías de señalización NF κ B y ERK y sintasas de óxido nítrico mediados por la presencia o ausencia de NO durante un proceso hipóxico isquémico cerebral en rata y su participación en el proceso de regeneración celular.

INTRODUCCIÓN

Enfermedad Cerebrovascular

La enfermedad cerebrovascular (ECV), es la tercera causa de muerte a nivel mundial. Se produce generalmente a causa del accidente cerebrovascular (ACV) que puede ser de tipo isquémico el cual surge principalmente debido a la oclusión de un vaso sanguíneo (80 % de los casos), o del tipo menos frecuente que es el hemorrágico (20 % de los casos); Independientemente de la etiología ambos culminan en la disminución inmediata de oxígeno y glucosa, produciendo isquemia (Figura 1) [1]. La ECV engloba a todos los procesos que causen isquemia cerebral y es la principal causa de discapacidad física y mental en los humanos.[2]

Los factores de riesgo de la ECV ocasionan disfunción endotelial y son clasificados como no modificables, modificables y nuevos factores de riesgo. El endotelio vascular participa en la regulación del tono vascular, el aporte de nutrientes, la inflamación, la trombosis y la coagulación [3]. El endotelio regula la producción de mediadores parácrinos y autócrinos, incluyendo, NO, prostaglandinas, factores de hiperpolarización derivados del endotelio, endotelina y angiotensina tipo II, que regulan la vasodilatación, la vasoconstricción, la trombosis, la anticoagulación, y la modulación del proceso inflamatorio.

La disminución del flujo sanguíneo causa un menor aporte de nutrientes y el incremento de la respuesta inflamatoria, donde las células endoteliales participan en el reclutamiento, adhesión y diapédesis de leucocitos en la pared vascular, por medio de la producción de quimiocinas, citocinas y de factores de transcripción intracelular como el factor nuclear B (NF- κ B) y la proteína activadora-1 (AP-1) [4].

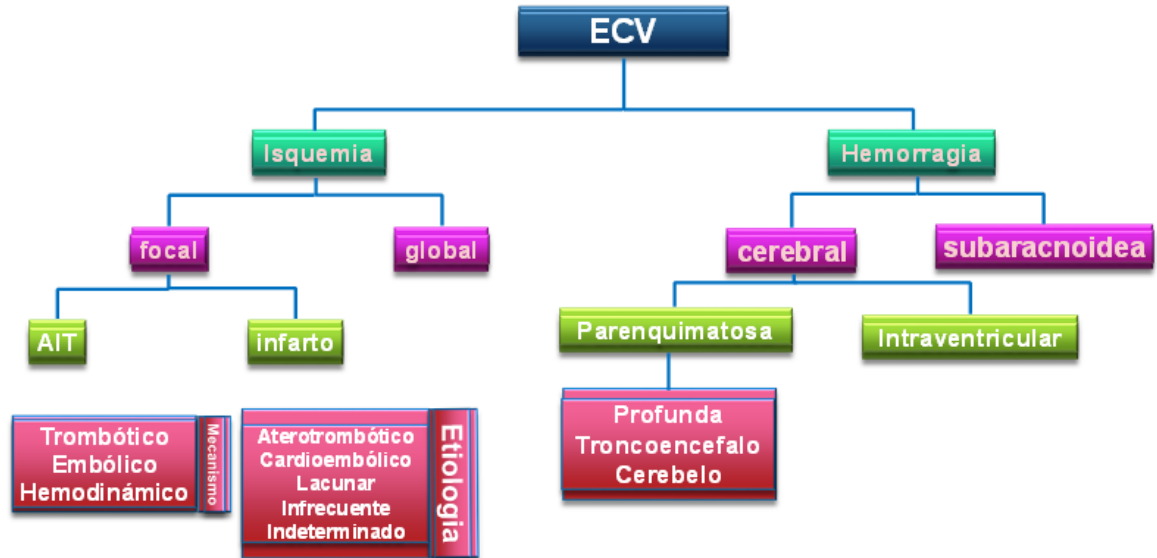


Figura 1. La enfermedad cerebrovascular aguda se clasifica en dos grandes grupos: isquémica y hemorrágica. La enfermedad cerebrovascular isquémica puede ser global o focal; dentro de esta última, a su vez, destacan dos grandes grupos: el AIT y el infarto cerebral.

La ECV puede presentarse a cualquier edad, aunque es más frecuente después de los 60 años ya se han reportado casos en adultos jóvenes, y cada día están siendo más recurrentes. Los estudios epidemiológicos documentan que después de los 60 años se incrementa por cada década el riesgo de sufrir una ECV tanto isquémica como hemorrágica [5]. La prevalencia en la población con dos o más factores de riesgo para el ACV se incrementa con la edad. Los estrógenos tienen un factor protector en la mujer para el ACV, los cuales en la etapa menopáusica disminuyen y se incrementa la incidencia del ACV igualando a la del hombre. La terapia de reemplazo hormonal que se creía disminuía el riesgo de accidentes cardiovasculares, se ha reconocido recientemente como un factor que incrementa el riesgo de padecerla [6]. Las personas afrodescendientes, los hispanos y los asiáticos tienen un mayor riesgo para sufrir un ACV [5].

En los dos primeros años siguientes a un ACV isquémico, el riesgo relativo de recurrencia incrementa de tres a cuatro veces comparado al infarto del miocardio. Las muertes tempranas de causa cardíaca (primeros 30 días) ocurren en cerca del 1 por ciento de los pacientes con ECV. De los pacientes con accidente isquémico transitorio (AIT), el 10 % desarrollarán la ECV en los

siguientes tres meses y de estos el 50 % lo harán en los próximos dos días, los factores de riesgo en pacientes con AIT para desarrollar la ECV son: edad mayor de 60 años, historia de diabetes, presentar afasia y síntomas motores. En los 90 días posteriores a un AIT del 2 al 6 % de los pacientes sufre un ataque cardíaco y muere por una causa cardiovascular [7]. La ECV aterotrombótica es una de las causas más importantes de muerte y discapacidad en todo el mundo, más de 25 millones de personas en Estados Unidos tienen al menos una de las manifestaciones clínicas de aterosclerosis y en la mayoría de los casos, permanece silente convirtiéndose en uno de los principales factores de riesgo del ACV [8]. De esta manera, la edad, la historia familiar, la dislipidemia, el tabaquismo, la hipertensión arterial y la diabetes constituyen los principales factores de riesgo por aterosclerosis y por ende para el ACV [9]. La aterosclerosis se produce por una interrelación muy estrecha de múltiples mecanismos fisiopatológicos, que incluyen disfunción del metabolismo de los lípidos, activación plaquetaria, trombosis, disfunción endotelial, inflamación, estrés oxidativo, activación de células musculares lisas vasculares, alteración de la matriz metabólica y factores genéticos [8]. La trombosis se presenta en los sitios donde ocurre erosión y ruptura de la placa, el colágeno subendotelial, los lípidos y los factores pro-coagulantes como el factor tisular y el factor de Von Willebrand se liberan al torrente sanguíneo y las plaquetas se adhieren rápidamente a la pared del vaso a través de las glicoproteínas [5].

Los recientes avances en la comprensión de la patogénesis de la ECV aterosclerótica han permitido clasificar y entender nuevos factores de riesgo. En los últimos 15 años se ha encontrado que las placas de colesterol de más de 4 mm de diámetro en el cayado aórtico constituyen un factor de riesgo para el ACV [10]. Existe un marcado interés en evaluar los biomarcadores circulantes relacionados con el proceso aterosclerótico, también en las nuevas modalidades imagenológicas y pruebas de función arterial. Los factores de riesgo condicionantes, llamados así porque incrementan el riesgo de enfermedad vascular en presencia de los factores tradicionales son la homocisteína, el fibrinógeno, la proteína C reactiva ultrasensible (PCR-us) entre otros [11].

El patrón de daño cerebral isquémico varía si la isquemia es global o focal. El daño provocado por la isquemia y los modelos animales se dividen tradicionalmente en dos tipos: global y focal. La anoxia global induce el daño predominantemente en neocorteza, ganglios basales, hipocampo y cerebelo. Aunque no se puede esperar una recuperación funcional completa después de más de 7 minutos de anoxia global en condiciones de normotermia a diferencia de la hipotermia que en la investigación básica favoreció la recuperación de los sujetos de estudio[12]. Mientras que 10 min de isquemia global son letales en el humano. La isquemia focal que sigue a la reducción transitoria o permanente del flujo en el territorio de una arteria cerebral surge por ateroma, embolia, enfermedad inflamatoria o traumatismo. La cantidad de daño depende del estado de la circulación sistémica o colateral, y aumentará por la actividad convulsiva, la hipoxemia y la hipotensión sistémica. La isquemia focal también puede desarrollarse durante los episodios de presión intracraneal elevada después de una lesión craneal grave y se caracteriza por la formación de una penumbra isquémica [5].

Los mecanismos bioquímicos tras el proceso isquémico (cascada isquémica) conducen a la disminución de ATP y por consiguiente la privación de energía por el inadecuado metabolismo oxidativo de la glucosa, generando acidosis láctica que favorece el daño al sistema nervioso central (SNC), inicia con una falla energética acompañada de la pérdida de la homeostasis; aumentando la concentración extracelular de K^+ , y disminuyendo las concentraciones extracelulares de Na^+ y Cl^- . Tras la despolarización anóxica se desencadenan varios procesos de daño secundario; intracelularmente la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la desregulación de los niveles de Ca^{2+} a causa de la liberación extracelular de glutamato estimulan al receptor AMPA, la despolarización de la membrana es mayor incrementando el Na^+ intracelular retroalimentando la liberación de más glutamato y exacerbando el edema celular, así mismo la estimulación de los receptores AMPA sensibilizan los receptores NMDA [13]. Todos estos procesos dañan la membrana mitocondrial conduciendo así a la activación del proceso inflamatorio [14].

La inflamación provocada por el daño isquémico cerebral impulsa predominantemente la activación de la microglía residente, astrocitos y células inmunológicas infiltradas, que liberan una gran cantidad de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y especies reactivas de oxígeno en el SNC [14]. Además, existe la liberación de mediadores inflamatorios como citocinas y quimiocinas que tienen efectos en la neurogénesis, actuando sobre: proliferación de células progenitoras neurales, migración, diferenciación, supervivencia e incorporación de neuronas nuevas a los circuitos del SNC [15].

Existe evidencia de la recuperación neurológica después de la EVC presentando un patrón logarítmico no lineal (Figura 2), la recuperación se da en los primeros 3 meses después de la EVC. Sin embargo, no está limitada a ese período de tiempo; la recuperación de la mano y la extremidad superior ha sido reportada años después de la ECV. La reparación neurológica a través de la reorganización cerebral por compensación, se lleva a cabo en la fase subaguda y crónica después de la ECV, sin embargo, esto se lleva a cabo en muy pocos casos y por ello para asegurar el restablecimiento de la funcionalidad del paciente se debe recurrir a la terapéutica[16].

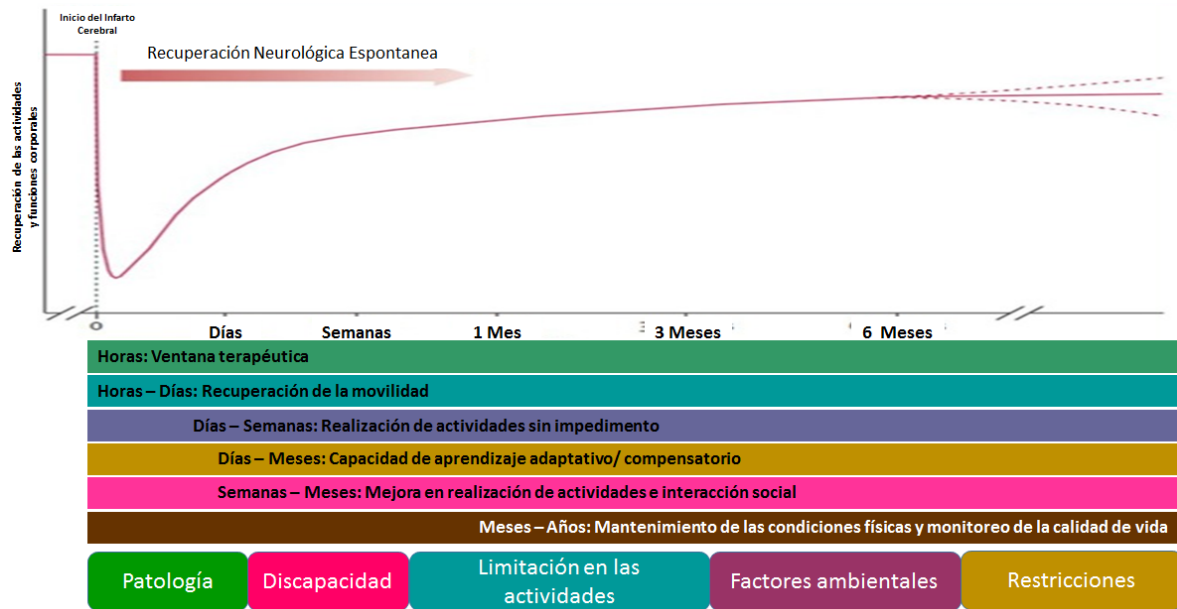


Figura 2. Patrón de recuperación posterior a la ECV con el tiempo tras las estrategias de intervención. La recuperación neurológica después del accidente cerebrovascular muestra un patrón logarítmico no lineal. La mayor parte de la recuperación tiene lugar en los primeros tres meses después de la ECV. Las intervenciones de rehabilitación dirigidas a mejorar el rendimiento de un paciente con accidente cerebrovascular deben implementarse de acuerdo con la fase de recuperación neurológica.

Terapéutica Farmacológica

En la mayoría de los casos se recomienda la trombólisis con rt-PA endovenosa administrado en las primeras 3 horas en pacientes seleccionados (0.9 mg/kg, 90 mg como dosis máxima): 10 % de la dosis al momento de daño y el resto durante 60 minutos, según los criterios del estudio NINDS (National Institute of Neurological Disorders and Stroke). Para el tratamiento de la oclusión aguda de la ACM (arteria cerebral media) se utiliza prourocinasa intraarterial, con una ventana terapéutica de 6 horas, mientras que la estreptocinasa, está contraindicada para uso rutinario, sólo es justificable su empleo bajo condiciones estrictas en ensayos clínicos. Dentro de los antitrombóticos se utiliza aspirina

(100-300 mg/día) en las primeras 48 horas, excepto que se administren trombolíticos (en ese caso se retarda 24 horas su administración). Existe un grupo de fármacos neuroprotectores entre los que se encuentran piracetam utilizado 12 g/d vía intravenosa en las primeras 7 h después de haber ocurrido el ACV [17], pentoxifilina 400 mg cada 8 horas [18] y nimodipino administrado dentro de las primeras 24 h con una dosis oral de 120 mg [19] sin embargo, en el ictus isquémico agudo, se encuentran contraindicados por el efecto deletéreo observado sobre la evolución de los pacientes.

Una vez que un paciente es trasladado a algún nosocomio tras un ACV una de las acciones inmediatas dentro del área de urgencias es controlar el proceso inflamatorio para evitar que se exacerbe, de las estrategias de elección están los glucocorticoides (GC).

Los GC son los fármacos más potentes y efectivos en la prevención y supresión de la inflamación causada por estímulos mecánicos, químicos, infecciosos e inmunológicos. La mayor parte de la actividad glucocorticoide está relacionado con la molécula del cortisol (o hidrocortisona). Ejemplos de fármacos glucocorticoides son: la budesonida, el dipropionato de beclometasona, el acetato de triamcinolona, el propionato de fluticasona, la flunisolida o el furoato de mometasona; empleados principalmente en enfermedades inflamatorias. El mecanismo de acción de los GC se basan en la inhibición de la transcripción de numerosos genes que codifican proteínas proinflamatorias, entre las que se incluyen citocinas: interleucinas (IL) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11 y 13, factor de necrosis tumoral alfa, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), quimiocinas (IL-8, CCL5, proteína 1 α inflamatoria de los macrófagos, proteínas quimiotácticas de monocitos 1, 2, 3 y 4, eotaxina), moléculas de adhesión (molécula 1 de adhesión intracelular, molécula 1 de adhesión de células vasculares, E-selectina) y enzimas reguladoras de la síntesis de mediadores (sintasa de óxido nítrico inducible, ciclooxigenasa 2, fosfolipasa A2 [PLA2] citoplasmática [20]).

El efecto inhibitorio de los GC parece ser en gran medida secundario a interacciones proteína-proteína entre un GR activado y factores de transcripción nuclear, tipo AP-1 [21], NF- κ B [22] o algunas proteínas STAT (signal transducer and activator of transcription) como la STAT-3, STAT-5 y STAT-6 [23]. Estudios recientes proponen que los GC tienen efectos sobre la estructura de la cromatina del ADN [24].

En la investigación básica la cerebrolisina ha mostrado tener no solo efectos neuroprotectores sino que también regenerativos y actualmente es utilizado es el NEURO AID, fármaco que estimula la expresión de BDNF, con la desventaja que la comercialización es en la unión europea que, aunado a su alto costo, resulta de difícil acceso para América Latina [25]. Existe la propuesta de utilizar agentes antioxidantes tal es el caso de la administración subaguda de zinc, que causa un preconditionamiento el cual modula el proceso inflamatorio, disminuyendo el estrés celular y promoviendo el restablecimiento de las capacidades neurológicas que se pierden tras un proceso isquémico, como por ejemplo las capacidades cognitivas [26].

Actualmente, no se cuenta con un tratamiento preventivo establecido para la enfermedad cerebrovascular (ECV). En la actualidad la terapéutica de la isquemia cerebral se ha encaminado a la utilización de agentes neuroprotectores que tratan de controlar los efectos agudos de la cascada isquémica. La modulación de los acontecimientos posteriores, como inflamación, conducen a una terapia neuroprotectora exitosa [3]. La administración de factores de crecimiento se ha probado en la investigación básica en un modelo de encefalopatía isquémica, donde se ha visto que los factores de crecimiento administrados conjuntamente como FGF2 e IGF-1 atraviesan la barrera hematocefálica, y actúan en neuronas en el hipocampo, teniendo un efecto en la sobrevivencia de las neuronas colinérgicas de las células madre [27] y en la proliferación celular, mejorando las funciones cognitivas. Mientras que la administración de IGF-1 antes y después de un daño isquémico disminuye la apoptosis en la corteza cerebral e hipocampo, el volumen de la lesión y la diferenciación de células precursoras neuronales. El pretratamiento con factores tróficos como el IGF-1 mejora las

funciones neurológicas en la fase aguda del ictus, destacando la utilidad de los tratamientos preventivos, un elemento que ha demostrado tener un efecto benéfico utilizado de forma profiláctica al daño es la administración subaguda de zinc que además recientemente ha demostrado favorecer la liberación de factores de crecimiento como IGF-1 y FGF2 [28, 29].

Zinc (Zn²⁺)

El Zn es un oligoelemento que tiene un efecto dual; puede ser citotóxico o citoprotector. Las funciones propuestas del Zn son:

- 1) Actúa como cofactor enzimático (más de 300 enzimas)
- 2) Neuromodulador e inmunomodulador
- 3) Actúa como anti-oxidante

Dentro del SNC se encuentra en múltiples regiones, principalmente en hipocampo, amígdala, hipotálamo, neocorteza, y bulbo olfatorio [30], del cual del 80- 90% del Zn está unido a proteínas, 15% del zinc se encuentra almacenado en vesículas cuya región más rica en éstas es el hipocampo, principalmente acompañado de glutamato en las llamadas neuronas zinc-glutamatérgicas mejor conocidas como neuronas granulares [31]; sin embargo, también se encuentra presente en neuronas GABAérgicas y glicinérgicas. Tras la despolarización de estas neuronas se provoca la liberación del contenido de dichas vesículas que contienen el zinc, que está íntimamente implicado en la modulación de la actividad neuronal a través de receptores de aminoácidos tanto inhibitorios como excitatorios, así como de la transmisión sináptica. Se ha demostrado que el zinc tiene efecto modulando receptores GABA, receptores AMPA (AMPA_Rs), kainato, de glicina, dopamina, serotonina, acetilcolina, y P2X así mismo receptores ion voltaje dependientes como Na⁺, K⁺, Ca²⁺ y Cl⁻ [31].

Se ha descrito que el Zn previene la muerte celular y modula la neurotoxicidad del glutamato a través del bloqueo de receptores NMDA [32].

Altas concentraciones de Zn inhiben el metabolismo celular y activan la vía de PKC, resultando en la inducción y activación de enzimas como la NADPH-oxidasa y de la iNOS, las cuales generan superóxido, óxido nítrico y peroxinitrito [33]. Sin embargo, el zinc también estabiliza las NOS constitutivas participando así en la formación de NO. Varios estudios sugieren que en condiciones de daño neuronal, el Zn medía la activación de proteínas de la familia de las MAPK, particularmente p38 y las cinasas reguladas por señalización extracelular (ERK), que regulan la sobrevivencia celular, proliferación y muerte, en varias condiciones de estrés incluyendo la isquemia [34]. El Zn también regula la respuesta inmunológica ante un daño ya que es crucial para la desgranulación de los mastocitos, así como en la producción de citocinas y quimiocinas [35]. Se ha propuesto que el Zn participa en la producción de ATP en el astrocito después de procesos isquémicos, además disminuye la recaptura de glutamato, efecto que incrementa significativamente los componentes excitotóxicos durante la isquemia [36]. El Zn también regula la activación de la microglia, principalmente en la fase tardía después de un proceso isquémico [37], con todo esto remarcamos que para que el zinc lleve a cabo su efecto protector, primero se debe realizar un acondicionamiento para lograr un balance de los niveles del zinc en el SNC tras su administración, posteriormente llevará a cabo su actividad como cofactor y activador enzimático, favorecerá la transcripción de moléculas neuroprotectoras como quimiocinas y factores de crecimiento, de esta manera al generarse un daño en el parénquima cerebral el tejido se encontrará activado para poder responder inmediatamente a los efectos antioxidantes, antiinflamatorios y regenerativos disminuyendo la respuesta inflamatoria, el daño, la muerte neuronal y favoreciendo la neuroregeneración [38].

La suplementación de zinc en el agua de bebida (4 mmol/L) a ratones gestantes dio como resultado un aumento aparente en el número de células en proliferación que capturaron BrdU en la SVZ de las crías recién nacidas [39], sugiriendo un vínculo entre la disponibilidad de zinc y la proliferación de células madre neuronales en el cerebro en desarrollo. Por otra parte, la suplementación de zinc (100 mg/kg) aumentó la expresión del marcador nestina de células

precursoras neuronales en el cerebelo y la corteza en desarrollo, comparado con una dieta normal de zinc (30 mg / kg) [40].

La deficiencia de zinc reduce la proliferación de células madre durante el desarrollo del cerebro. La alimentación de ratones hembra con una dieta deficiente (5 mg de Zn/kg) o marginalmente deficiente (1 mg de Zn/kg) de zinc desde el primer día de gestación, redujo las células nestina positivas en las crías comenzando en embriones desde el día 10.5 hasta el día 10 post-natal. Este déficit no se puede revertir mediante la adición posterior de zinc a la dieta después del destete [40].

La deficiencia de zinc durante la lactancia disminuyó la diferenciación dendrítica de las células cerebelosas y de Purkinje en ratas de 21 días de edad [41, 42]. Los niveles elevados de glucocorticoides retrasan la migración radial de las neuronas durante el desarrollo de la corteza cerebral [43]. Por lo tanto, es probable que las altas concentraciones de glucocorticoides mediadas por zinc perjudiquen la migración de las células que se diferencian durante el desarrollo.

La deficiencia de zinc dio como resultado la translocación nuclear de p53 con la regulación posterior de los genes río abajo, que inducen el arresto del ciclo celular [44]. Del mismo modo, la deficiencia de zinc también dio como resultado un aumento de p53 en células de neuroblastoma IMR-32. Esto fue acompañado por una reducción en los niveles de ciclina D1 y proteína E, así como por la fosforilación de ERK y MAPK, lo que llevó al arresto celular en la fase G0/G1 del ciclo celular [40, 45].

La deficiencia de zinc induce la producción mitocondrial de especies reactivas de oxígeno, la translocación del factor apoptótico Bcl-2 asociado a la proteína promotora de muerte (BAD) a la mitocondria, la liberación de citocromo c en el citosol, la activación de caspasa-3 y poli (ADP-ribosa) la división de la polimerasa (PARP). En conjunto, estos mecanismos tienen un efecto importante en la reducción del número de células precursoras neuronales y por ende la inhibición de la neurogénesis [46].

Óxido Nítrico (NO)

El óxido nítrico (NO) es un gas simple que se libera por la conversión del aminoácido L-arginina en L-citrulina [47, 48] y NO, además de la L-arginina se requiere de la presencia de calcio-calmodulina (CaM) y de 4 cofactores: flavin mononucleótido (FMN), flavin adenina dinucleótido (FAD), tetrahydrobiopterina (BH₄) y de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) [49]. Esta reacción es catalizada por las sintasas de óxido nítrico (NOS) y puede ser inhibida por derivados estructurales de dicho aminoácido: la N-mono-metil-L-arginina (LN₂MA) y la N-nitro-L-arginina metiléster (L-NAME) entre otras [50-52]. El NO, una vez formado, puede difundir hacia las células subyacentes, donde activa a la enzima guanilato ciclasa (Gc) la cual provoca el aumento intracelular de GMPc, mediador de los efectos fisiológicos. La síntesis de óxido nítrico es regulada por glucocorticoides y agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINES) que reducen la producción de este gas, así como por los propios niveles de NO a través de mecanismos de retroalimentación negativa.

Se han identificado más de una isoforma de NOS [53] constituidas por subunidades homodiméricas con pesos moleculares entre 125 y 155 KDa:

1. Dos isoformas constitutivas calcio-dependientes (cNOS): la endotelial (eNOS) o tipo III y la neural (nNOS) o tipo I, presentes en diferentes tejidos (células endoteliales, neuronas, neuroglia y otras) que producen concentraciones fisiológicas de NO al actuar como señalizador molecular.
2. Una isoforma calcio-independiente (iNOS) o tipo II, inducible en un número de tipos celulares como macrófagos, hepatocitos, neutrófilos, células de músculo liso y de endotelio en respuesta a diferentes estímulos inmunológicos tales como: interferón gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y lipopolisacárido bacteriano (LPS), los cuales generan gran cantidad de NO que puede ser tóxico en células tumorales o infectadas por virus. El conocimiento de esta amplia distribución de las NOS ayudan a explicar algunos de los efectos en el organismo asociados con la liberación de NO (Figura 3).

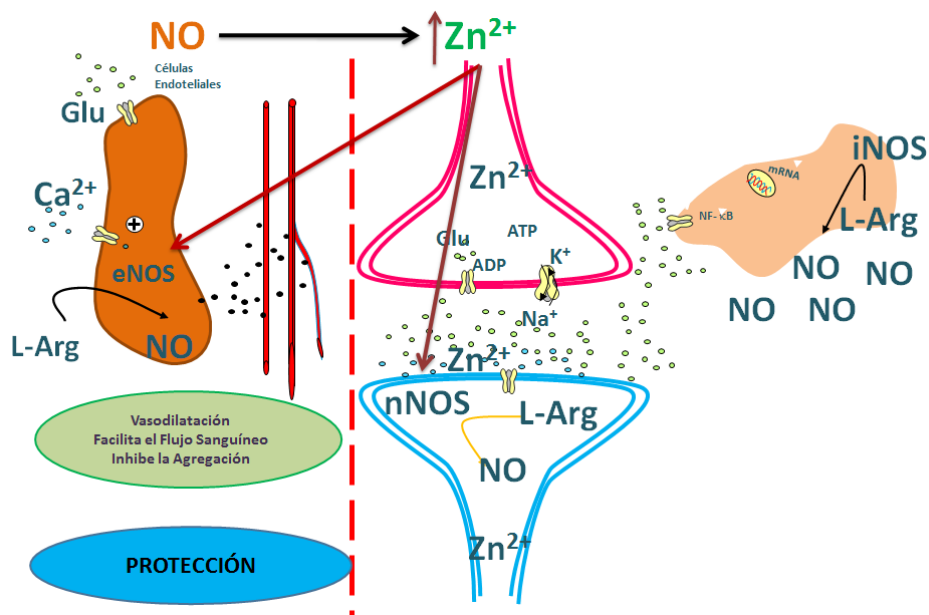


Figura 3. El zinc estabiliza las NOSc favoreciendo la vasodilatación, el flujo sanguíneo e inhibiendo la agregación plaquetaria, además es capaz de favorecer la inducción de la iNOS exacerbando la producción de NO en la fase tardía del proceso isquémico, proceso que se conoce que está implicado en la producción de factores de crecimiento.

De esta manera se entiende que el NO tiene un efecto dual, por un lado, puede reducir el daño después de la ECV, ayudando a restablecer el suministro de sangre al área isquémica, pero también forma peroxinitrito al reaccionar el anión superóxido con el nitrito [54, 55]. Estos radicales contribuyen a la peroxidación de lípidos y proteínas; así como al desequilibrio entre los mecanismos de transducción de señales y a la toxicidad celular [56-58]. Por otra parte, el NO puede estimular la expresión de mediadores inflamatorios y moléculas de adhesión e inhibir las enzimas de replicación del DNA [59-61].

Por lo que, el NO actúa tanto de manera autócrina como parácrina en diferentes tejidos (Figura 2), principalmente en el sistema inmunológico, cardiovascular y nervioso [53, 62]. Los efectos del NO son a través de su interacción sobre proteínas que contienen metales de transición, como en la activación de guanilato ciclasa, la inhibición del citocromo oxidasa y la S-nitrosilación en residuos de cisteína, de esta forma se considera al NO como un agente regulador en el mecanismo postraduccional [63-65].

El NO está implicado en procesos patológicos del sistema nervioso central tales como la muerte neuronal isquémica y la neurodegeneración [66, 67]. También ejerce acciones anti proliferativas en una amplia variedad de tipos de células [68], incluyendo las células del linaje neuronal [69].

La producción de NO mediado por la nNOS participa como un neuromodulador de la actividad sináptica y tiene un efecto importante en la diferenciación neuronal, la supervivencia y la plasticidad sináptica durante la neurogénesis tanto en el desarrollo como en adultos [70-72]. El efecto del NO en la diferenciación neuronal es que varias líneas de células tumorales, incluyendo los neuroblastomas humanos, expresan diferentes isoformas de las NOS cuando están expuestos a factores de diferenciación y de supervivencia como factores de crecimiento [73, 74]. Además, la inhibición de la actividad de las NOS previene o retrasa la diferenciación celular [75] en las células progenitoras neurales [76-78]. La expresión de nNOS es durante el desarrollo prenatal durante la embriogénesis y postnatal en la placa cortical [79, 80]. La nNOS también se expresa en las poblaciones de los nichos neuronales en roedores adultos [81, 82].

Factores de Crecimiento

En 1947, Rita Levi-Montalcini descubre el primer factor de crecimiento, estos se identificaron como molécula de naturaleza proteica necesaria para la supervivencia, desarrollo, direccionamiento del ciclo celular, así como de vías de señalización. De igual forma se conoce que también participan en la plasticidad sináptica, aprendizaje, neurogénesis, etc.

Actualmente, los factores neurotróficos se agrupan en tres familias principales: neurotrofinas, familia de ligandos relacionados con el factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF) y neuroquinas [83, 84].

En los mamíferos, la familia de las neurotrofinas está integrado por: NGF, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3) y neurotrofina 4 (NT-4, también conocido como NT-4/5) [85, 86].

Las neurotrofinas se sintetizan como proneurotrofinas inactivas, que se empaquetan en vesículas secretoras. Las proneurotrofinas experimentan escisión proteolítica, liberando un péptido del prodominio N-terminal y una proteína madura C-terminal [83]. La escisión de las proneurotrofinas ocurre tanto en el medio intracelular como en el extracelular. Activan la vía de apoptosis por la activación del receptor de neurotrofina p75 (p75NTR) [87, 88]. De esta forma, las proneurotrofinas median la retracción del cono de crecimiento neuronal y las acciones proapoptóticas, principalmente durante el desarrollo y las condiciones patológicas [89, 90].

Las actividades de las neurotrofinas y las proneurotrofinas están mediadas por su unión a los sistemas de receptores transmembrana: familia de receptores de tropomiosina cinasa (Trk) y p75NTR. Todas las neurotrofinas y proneurotrofinas maduras se unen al receptor p75NTR. Sin embargo, las proneurotrofinas activan más eficazmente p75NTR, mientras que los receptores Trk solo se activan mediante neurotrofinas maduras [83, 91]. En la actualidad en mamíferos se conocen tres Trks diferentes: TrkA, TrkB y TrkC, donde se unen diferentes ligandos. Al receptor TrkA se unen NGF, BDNF y NT-4. Mientras que BDNF y NT-3 tienen mayor afinidad por TrkB, y TrkC (Figura 4).

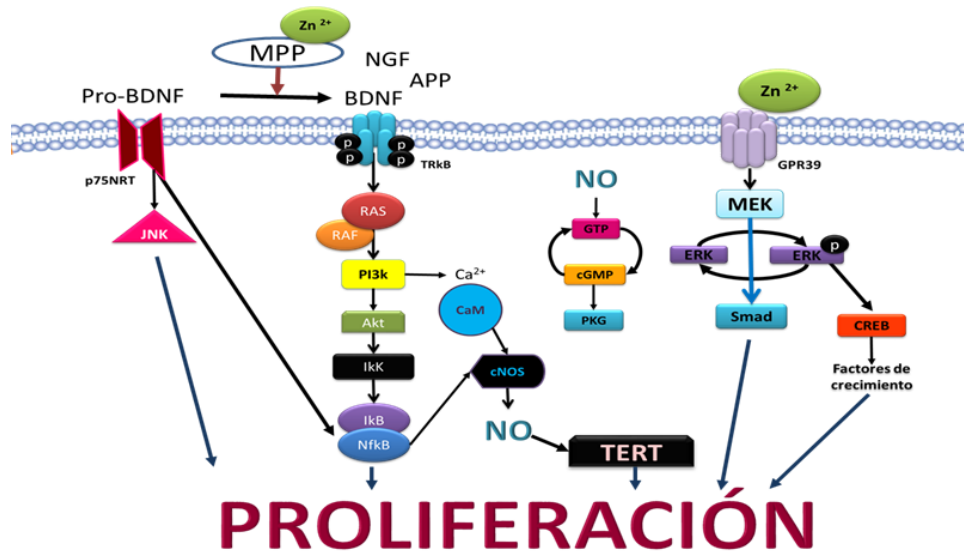


Figura 4. El zinc liberado de las fibras musgosas entra en los axones presinápticos y estimula la señalización de ERK 1 / 2 al inhibir directamente la actividad de la tirosina fosfatasa, de este modo es capaz de favorecer factores de crecimiento que de forma inmadura activaran los receptores p75NRT o bien además favorecer su maduración para que activen su receptor TRK y activar la vía de NFκB.

Varios factores son liberados por el tejido isquémico que son responsables de la proliferación, diferenciación y migración de células madre neurales. La comprensión de sus roles puede permitir futuras terapias. Aunque las células dañadas liberan una variedad de factores, algunos de ellos son activadores, mientras que otros son inhibidores para la neurogénesis, es interesante observar que factores como el factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 puede inducir la proliferación de células progenitoras neurales en presencia del factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2), y promover la diferenciación en ausencia de FGF-2. Mientras tanto, factores como el factor de crecimiento transformante-β puede inducir la diferenciación de las neuronas al mismo tiempo que inhibe la proliferación de células madre neurales [92].

La función de IGF-1 es activar la vía de señalización Akt que está relacionada con la supervivencia celular y la de FGF2 es activar la vía de señalización ERK que está relacionada con la activación del ciclo celular, a través de la inducción de la expresión de la ciclina D1 [93, 94]. Otros factores de

crecimiento como BDNF y NGF también activan la vía Akt, promoviendo la supervivencia de neuronas en cultivo de hipocampo [95].

Existen evidencias de que FGF2, NGF e IGF-1 promueven efectos de sobrevivencia a través de la vía NO-cGMP-PKG en cultivo celular, resaltando la importancia del NO sobre la sobrevivencia neuronal [96]. La exposición de IGF-1 indujo la proliferación de células madres neuronales (NSCs) en presencia de EGF, pero no de FGF2, a través de la secreción autócrina de IGF-1. Mostrando que IGF-1 es un factor clave en la regulación de la activación de las NSC y que EGF y FGF2 controlan la proliferación de las NSC estriatales [97].

Vías de Señalización (ERK, NF- κ B)

Una amplia variedad de estímulos extracelulares son capaces de activar la cascada ERK 1/2. La proteína cinasa activada por mitógeno/cinasa regulada por señal extracelular (MEK) 1 y 2 son las cinasas río arriba inmediatas que fosforilan y activan ERK1/2. MEK1 y 2 son proteínas cinasas de doble especificidad que median la fosforilación de residuos de tirosina y treonina. La actividad de MEK1/2 también está regulada por fosforilación, ya que MEK 1 y 2 son fosforilados por las cinasas activadas por mitógenos (MAP3K). Las MAP3K más estudiados son las proteínas Raf, que incluyen A-Raf, B-Raf, C-Raf y Raf-1 [98]. Son activados por las proteínas MAP4K, tales como Rap1, Ras, PKA y Rho. ERK 1/2 es una proteína hidrofílica de expresión ubicua que participa en la cascada de transducción de señales Ras-Raf-MEK-ERK [99].

Hasta la fecha, se han identificado más de 50 sustratos citoplásmicos, incluida la familia de proteínas cinasas ribosómicas S6 cinasa (RSK), proteínas apoptóticas y proteínas del citoesqueleto. La familia RSK consta de cuatro isoformas humanas (RSK1-4), cinasas activadas por mitógeno y estrés (MSK) 1 y 2, que se activan directamente por ERK 1/2 en respuesta a estímulos. RSK1-4 son componentes clave río abajo de la cascada de señalización Raf-MEK-ERK. La familia RSK regula la transcripción mediando la fosforilación de diversos tipos de factores de transcripción, incluido el factor nuclear κ B (NF- κ B), el factor de

respuesta sérica (SRF) y el factor de iniciación de la transcripción (TIF) en miocitos de ratón [99, 100].

La activación de la vía ERK 1/2 desempeña papeles tanto fisiológicos como patológicos después del desarrollo, se sugiere que ERK 1/2 también contribuyen a la regulación de respuestas inflamatorias, citocinas y apoptosis en lesiones cerebrales isquémicas y hemorrágicas [101, 102]. La supresión de la activación de ERK 1/2 reduce el daño neurológico después del ictus [103]. La sobreexpresión de citocinas proinflamatorias microvasculares después de la isquemia focal en modelos de oclusión de la arteria media cerebral (MCAO) también implica la vía ERK 1/2 [104]. ERK 1/2 tiene un efecto determinante en la neurogénesis después de la isquemia cerebral. La vía ERK 1/2 está involucrada en la regulación de los cambios en la inflamación, citotoxicidad y vasoespasmo cerebral que ocurren después del accidente cerebrovascular hemorrágico [105]. Sin embargo, las señales de Ras/Raf/ERK también participan en la apoptosis neuronal observada en el hipocampo tras la lesión cerebral hemorrágica postsubaracnoidea. De esta manera se debe entender que la activación de ERK 1/2 requiere ser determinada en un tiempo y espacio específico para poder llevar a cabo efectos benéficos en el daño isquémico [106].

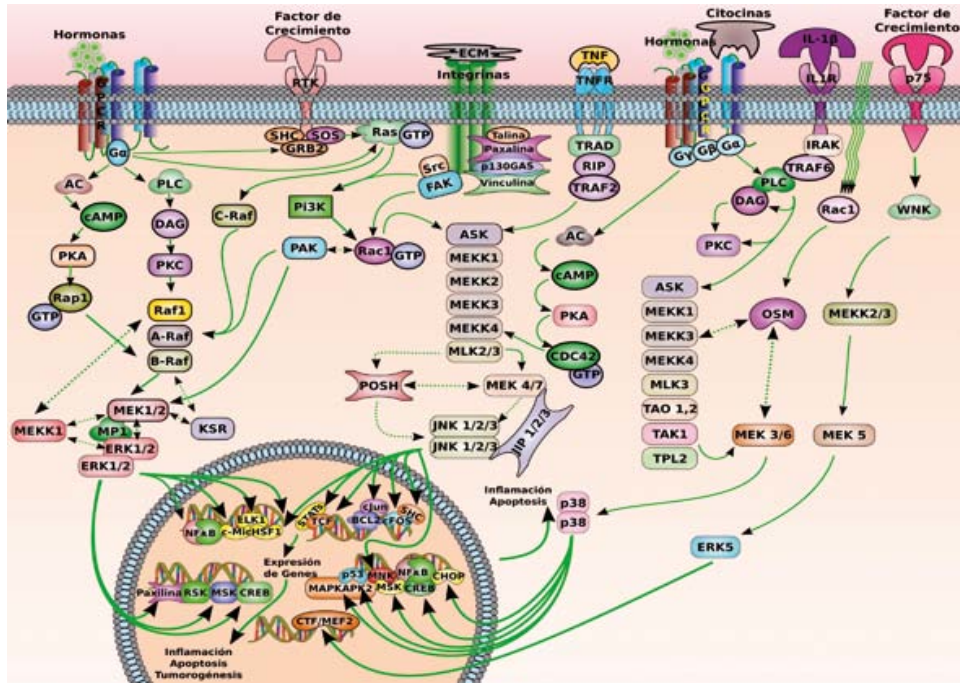


Figura 5. Vía de señalización de quimiocinas y factores de crecimiento. Los factores de crecimiento activan la vía de Raf o Rac para activar MEK1/2 y se lleve a cabo la expresión de genes a través de factores de transcripción como son NFκB, CREB o por la vía de JNK para activar cFos. Por otro lado, las citocinas se unen a sus receptores acopladas a proteínas G que activan la vía de MEKK4, JNK. TNF se une a su receptor acoplado a TRAD, RIP y TRAF2 que activan ASK y la vía de MEKK. La IL-1β a través de su receptor activa la vía de IRAK, TRAF6, PLC.

ERK 1/2 están implicadas en eventos importantes del desarrollo cerebral, incluida la proliferación de células progenitoras, la migración neuronal, la diferenciación y la muerte celular apoptótica. El zinc es un modulador importante de la señalización ERK 1/2. Las condiciones de la deficiencia de zinc y el exceso afectan a la fosforilación de ERK 1/2 en SNC fetal y adulto. La hipofosforilación de ERK 1/2 se acompaña de una proliferación disminuida y paro del ciclo celular en la fase G0/G1 asociada a una menor disponibilidad de zinc en cultivos celulares. Se ha demostrado que tanto Zinc como ERK 1/2 modulan la proliferación de células progenitoras neuronales y la muerte celular en el cerebro. Además, el déficit conductual que resulta por la deficiencia de zinc durante el desarrollo es similar a lo observado en ratones con señalización disminuida de ERK 1/2 [107].

La regulación de ERK 1/2 por zinc puede estar involucrada en los mecanismos de plasticidad sináptica que contribuyen al aprendizaje y la memoria, un déficit genético del transportador de zinc ZnT3 no afecta el comportamiento en ratones [108]. Sin embargo, existe una alteración de la memoria espacial dependiente del hipocampo y la discriminación contextual acompañada por la disminución de la fosforilación de ERK 1/2 en el hipocampo [109]. El zinc y ERK 1/2 están implicados en mecanismos de plasticidad sináptica, como la potenciación a largo plazo en el hipocampo [110]. Además, los inhibidores farmacológicos de la señalización ERK 1/2 interrumpen la potenciación a largo plazo en la región CA1 del hipocampo, pero no en la región CA3 [111].

La administración de suplementos de zinc aumenta los niveles de fosforilación de TrkB y ERK 1/2 [34]. El zinc se une al receptor de zinc acoplado a la proteína G39 (GPR39); La cual es un miembro de la familia de receptores de grelina inicialmente fue propuesto como el receptor de la obestatina, un péptido derivado de la prorelina [112, 113]. Además, existen las metaloproteinasas (MMP) en las neuronas corticales de rata (RCN), y el zinc causa la activación de MMP-2 y MMP-9 extracelulares. Las MMP activadas estimulan la escisión del pro-BDNF a la forma activa [114]. De esta forma, el zinc puede regular ERK 1/2 a través de varios mecanismos y puede aumentar la fosforilación de ERK 1/2 y a su vez la proliferación de progenitores neurales.

El factor de transcripción NF- κ B (factor nuclear cadena ligera κ potenciador de células B activadas) es un regulador pleiotrópico de múltiples vías de señalización intracelular, que proporciona un mecanismo para las células en respuesta a una amplia variedad de estímulos relacionados a la inflamación [115].

En mamíferos, hay cinco miembros diferentes de la familia NF- κ B: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- κ B1) y p52/p100 (NF- κ B2) [116].

Las células estimuladas se regulan no solo por las vías canónicas sino también por las vías no canónicas del NF- κ B. Para iniciar estas dos vías, la degradación de I κ B desencadena la liberación de NF- κ B y el heterodímero translocado al núcleo (u homodímero) puede asociarse con los sitios κ B del promotor para regular la

transcripción. NF- κ B se expresa ubicuamente en las neuronas y la activación constitutiva de NF- κ B se asocia con el procesamiento de la información neuronal. NF- κ B regula la transcripción de genes tales como quimiocinas, citocinas, enzimas proinflamatorias, moléculas de adhesión, factores de transcripción proinflamatorios y otros factores para modular la supervivencia neuronal [115].

También NF- κ B regula la expresión de casi 500 genes diferentes, incluyendo enzimas como: Ciclooxygenasa (COX), 2, 5-lipoxigenasa (LOX) y sintasa de NO inducible (iNOS), citocinas [como interleucina (IL) -1, IL-6, IL-8, quimiocinas y factor de necrosis tumoral (TNF)], moléculas de adhesión, moléculas reguladoras del ciclo celular y factores angiogénicos [117-119].

En condiciones de daño neuronal, la expresión constitutiva NF- κ B activo protege a las neuronas contra lesiones y regula el proceso inflamatorio. Además de las neuronas, los factores de transcripción NF- κ B son abundantes en las células gliales y los vasos sanguíneos cerebrales y las diversas funciones de NF- κ B también regulan la reacción inflamatoria alrededor del entorno neuronal. Los factores de transcripción NF- κ B son abundantes en el cerebro y exhiben diversas funciones. Varias enfermedades del SNC están relacionadas con NF- κ B activado por mediadores inflamatorios. La expresión de RelA y c-Rel produce efectos opuestos sobre la supervivencia neuronal. Es importante destacar que la expresión de c-Rel en el SNC genera un efecto antiapoptótico. Además, las diferentes subunidades de formación del dímero de NF- κ B son moduladores de la neuroinflamación, la neuroprotección y la neurotoxicidad [120].

El NF- κ B se encuentra constitutivamente activado en las neuronas glutamatérgicas, así como en las capas 2, 4 y 5 de la corteza cerebral células granulares y neuronas piramidales de la región CA1 y CA3 del hipocampo [121-123]. Así mismo se encuentra en otras regiones como amígdala, cerebelo, hipotálamo y bulbos olfatorios [124]. Entre los miembros de NF- κ B, todos los complejos del heterodímero c-Rel/p65, p50/p65 y homodímeros p50 se detectan en el cerebro en desarrollo [124]. En el cerebro en desarrollado, la variante heterodimérica p50/p65 de NF- κ B se convierte en el complejo principal de unión a

NF- κ B [124, 125]. NF- κ B participa desde la transducción de señales sinápticas de corta duración a cambios persistentes en la expresión génica [121, 126].

En el SNC, los factores de transcripción NF- κ B son actores clave en una serie de procesos fisiológicos como la neurogénesis [127, 128], la neuritogénesis [129] y la plasticidad sináptica relacionada con el aprendizaje y la memoria [130]. NF- κ B protege las neuronas contra las diferentes lesiones, como la excitotoxicidad [131] y el estrés oxidativo [132]. Se ha observado que la sobreexpresión de p65 en las neuronas corticales genera un efecto antiapoptótico, mientras que aumenta el daño por superrepresión de I κ B o NIK [133].

El NF κ B [134]. Se ha demostrado que la respuesta de la glía a la lesión desencadenada por la señalización de TLR está mediada a través de NF κ B [135]. Además, la inhibición de la señalización astrogliar de NF κ B conduce a una expresión reducida de quimiocinas y a la entrada de leucocitos al SNC lesionado [136]. Se ha demostrado que NF κ B desempeña el papel regulador de los astrocitos en la respuesta inmune e inflamatoria [137].

NF κ B es un importante transductor de señales que afecta la permeabilidad celular, la endocitosis y el tráfico intracelular a nivel de la barrera hematoencefálica [138, 139].

Polarización de la microglia M1 y M2 en la isquemia cerebral

Estudios recientes han comenzado a investigar la polarización de microglia y macrófagos, identificando dos tipos principales la microglia tipo M1 y la microglia tipo M2. Los genes de tipo M1 (iNOS, CD11b, CD16, CD32 y CD86) aumentan gradualmente desde el día 3 y permanecen elevados durante 14 días después de la isquemia, la expresión génica que identifica al tipo M2 se encuentra asociada principalmente a CD206, Arg1, CCL22, Ym1 / 2, IL-10 y TGF- β . La expresión temprana de los genes M2 puede contribuir a la neuroprotección potenciando la fagocitosis de las células muertas, eliminando los restos de tejido y promoviendo la recuperación. En etapas posteriores, las células que muestran un fenotipo M1 inducen mediadores proinflamatorios y exacerban la muerte neuronal [140, 141].

Se conoce que las quimiocinas y factores de crecimiento se pueden utilizar como marcadores para predecir si el efecto de la microglia está siendo protector o inflamatorio, se ha reportado que la quimiocina CCL2 favorece la expresión de factores de crecimiento como FGF2 [142] y de IFG-1 [143], por otra parte, CXCL1 se ha reportado que también induce la expresión de CXCL12 que además de ser una quimiocina también tiene efectos tróficos y ha sido denominado factor de crecimiento estromal 1 (SDF-1) [144]. Estos factores de crecimiento favorecerán la supervivencia después del proceso isquémico y en los últimos años se ha sugerido que también estarán participando en el proceso de regeneración también conocido como neurogénesis.

Neurogénesis

La generación continua de nuevas neuronas en el cerebro adulto de mamífero se lleva a cabo en regiones discretas llamadas nichos neurogénicos. El nicho neurogénico es usado para definir una región en la cual la citoarquitectura y los factores de señalización dentro de su medio ambiente son capaces de mantener una población de células madre neurales (NSCs). Las células madre son identificadas, caracterizadas y localizadas a través de las señales específicas de su microambiente o nicho, que en el cerebro pueden ser clasificados como "típico" o "no típico". Los tres nichos NSC típicos que se encuentran en el SNC son la zona subventricular (SVZ), la zona subgranular (SGZ) y el canal central (CC) de la médula espinal [145, 146]. Los nichos "no típicos" se han identificado en el hipotálamo, órganos circunventriculares (CVO), las meninges y la capa subpial del cerebelo [147]. Además, los nichos atípicos (no germinales) se pueden encontrar en todo el parénquima del cerebro corteza, cerebelo y la médula espinal, y se componen principalmente de precursores de neuroglia [148]. El concepto de nichos atípicos surgió recientemente y hace referencia al microambiente formado alrededor de las células madre exógenas [149].

En el cerebro adulto los nichos neurogénicos principales son la zona subventricular (SVZ) y la zona subgranular del giro dentado (DG) del hipocampo. La ZVS se encuentra a lo largo de las paredes de los ventrículos laterales [150-152], y en contraste con lo que ocurre en el hipocampo, donde las neuronas nacen y se diferencian en el mismo lugar, los neuroblastos de la SVZ migran a lo largo de la corriente migratoria rostral (RMS) para alcanzar el bulbo olfatorio (OB) y a la corteza cerebral, donde maduran en interneuronas locales [153].

Los procesos básicos de las células madre neurales que incluyen la autorenovación, la proliferación/diferenciación y la migración se ven afectados por ciertos estímulos como la excitotoxicidad, isquemia y el proceso inflamatorio [154]. Se sabe que el accidente cerebrovascular isquémico estimula el aumento la proliferación de células madre neuronales [155]. Sin embargo, en la isquemia en la zona subgranular (SGZ), actúa preferentemente sobre la proliferación de células progenitoras tipo I y II, y en menor medida sobre los neuroblastos, promoviendo

principalmente la diferenciación en células gliales [156]. La actividad mitótica alcanza su punto máximo entre el 7° y el 10° día postisquemia y luego regresa a los niveles basales de proliferación entre la 3a y 5a semana postictal [157].

En el modelo utilizado en este trabajo, el sitio de daño se encuentra en la zona temporoparietal, ya que es de las áreas más comunes y susceptibles ante un accidente cerebrovascular (ACV); en esta zona en un área más ventral a la corteza se encuentra el giro dentado (DG) del hipocampo, en el cual se ha demostrado que en la zona subgranular (SGZ) se lleva a cabo el proceso de neurogénesis donde antes de generar una neurona madura, capaz de formar conexiones, sus progenitoras atraviesan seis estadios diferentes de células a lo largo de su diferenciación hasta alcanzar su madurez (Figura 6).

La primera clase de células progenitoras en la SGZ está representada por células positivas a la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) y Nestina. Presentan un soma triangular sus núcleos residen en la SGZ; y extienden procesos simples o dobles con terminaciones muy finas semejantes a ramas muy delgadas organizadas radialmente a través de la capa granular [158].

La tasa de división para este tipo de células corresponde al 2 % por ello se consideran progenitores neuronales en reposo (QNP), listas para activar su estado proliferativo ante un estímulo, aunque se ha descrito que estas células son capaces de presentar divisiones tanto simétricas como asimétricas; se conoce que preferentemente se dividen de manera asimétrica [159].

La segunda clase, que deriva de la división asimétrica de las QNP está representada por células de núcleo pequeño que puede ser redondo u ovalado de aproximadamente 10 μm de diámetro, situadas sobre la SGZ, aunque morfológicamente se parecen a las células de clase 1, las células de clase 2 muestran una considerable disminución a la marca de Nestina y han perdido por completo la marca de GFAP, además de que aún no expresan Doblecortina DCX ni NeuN, a esta clase de células se les conoce como amplificadores de los progenitores neuronales (ANP) [160].

De 1 a 3 días después de las ANP se diferencia la tercer clase celular, ésta aún se mantiene en la SGZ, ya no expresa Nestina, expresa DCX y NCAM, morfológicamente son muy similares a los ANP, presentan un leve movimiento horizontal, muestran un diámetro somático de 10 μm , se encuentran en proceso de diferenciación aunque pueden expresar Tubulina bIII, aún no expresan NeuN; al presentar estos marcadores ya se trata de precursores neuronales denominados como neuroblastos tipo 1 (NB1) [159].

Dentro de los siguientes 20 días los NB1 darán lugar a los siguientes dos tipos celulares (NB2 y NI); la cuarta clase de células corresponde a los neuroblastos de tipo 2 (NB2), son más grandes que los NB1 con un diámetro somático de 15 μm , permanecen en la SGZ. La longitud de sus procesos se extiende de 20 a 40 μm horizontalmente sobre la capa granular, este tipo de células deja de expresar marcadores de QNP y ANP, mantiene la expresión de DCX y además ya expresa NeuN [161].

La quinta clase de células corresponde a neuronas inmaduras (IN) su diámetro llega a ser hasta de 20 μm mostrándose de mayor tamaño que sus antecesoras y su morfología, se llega a semejar a neuronas maduras del giro dentado. Su soma es redondo u ovalado, este tipo de células se pueden encontrar tanto en la SGZ como en la capa granular y mantiene la expresión de los mismos marcadores que NB2 [162].

Por último, 10 días después de la presencia de IN se puede observar la presencia de la sexta clase de células que corresponde a neuronas granulares diferenciadas con un desarrollo apical de dendritas y axones formando las fibras musgosas, ya no presenta expresión de DCX, únicamente marcadores de neuronas maduras Tubulina bIII, NeuN y marcadores específicos de neuronas granulares maduras como calbindina [163, 164].

Son varios los factores más estudiados involucrados en la migración, posicionamiento, diferenciación y maduración neuronal, sin embargo estos mecanismos dependen del grado de diferenciación en que se encuentran: GFAP, Nestina, Sox1, Sox2 (células NG2 o tipo I), BLBP, Mash1, Prox1, NeuroD1

(Células Precursoras Tipo II), DCX, PSA-NCAM (Células Precursoras Tipo III) y NeuN (Células Maduras)[165]. Además, participan factores de crecimiento tales como ARTN, BDNF, EGF, GDNF, GPI, LIF, MDK, NDP, NRG1, PTN, y VEGFA que ayudan a la diferenciación neuronal y S100a6 para astrocitos [160, 166, 167] (Figura 6).

Durante el desarrollo del sistema nervioso central de los mamíferos, las células madre neurales y sus células progenitoras generan neuronas por divisiones simétricas produciendo células gliales y asimétricas que generan tanto células gliales y neuronas. La diferenciación de estas células está estrechamente vinculado a sus características epiteliales (apical-basal), al tipo de división y su polaridad. Estas características cambian durante el desarrollo del neuroepitelio radial de células gliales, y esta transición afecta tanto el destino celular como la neurogénesis [168].

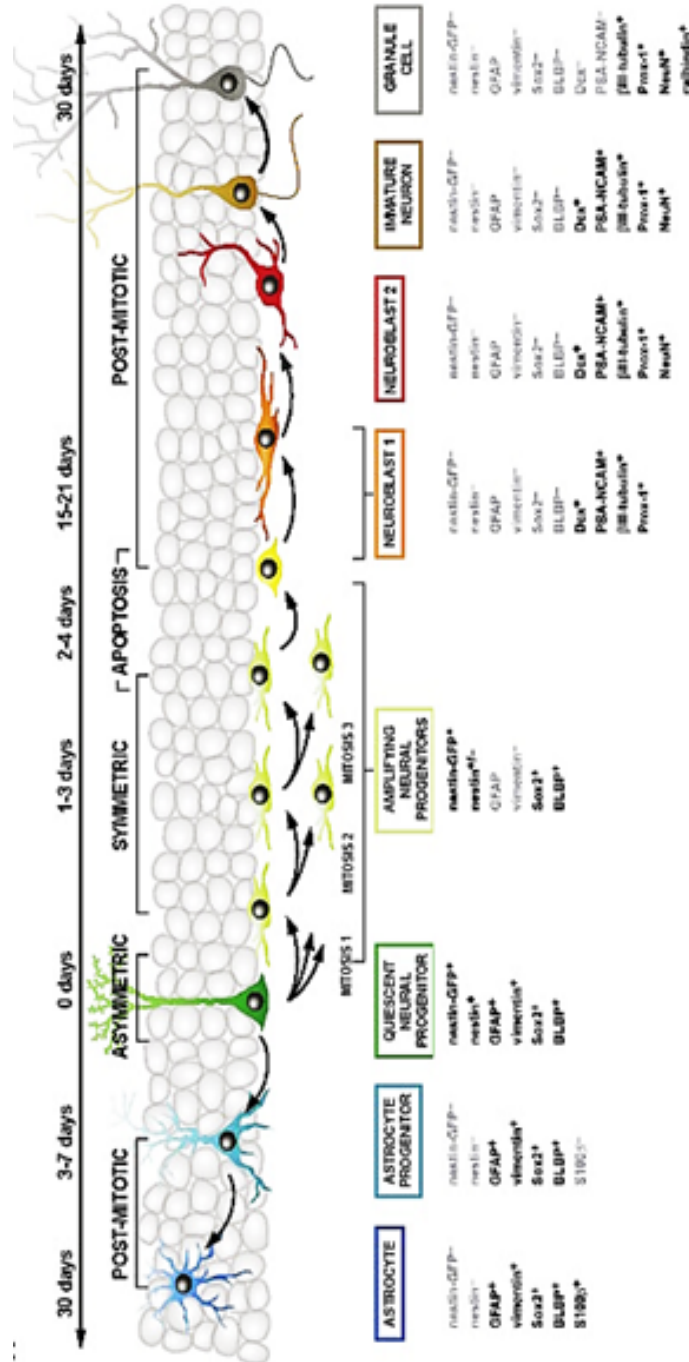


Figura 6. Cascada de diferenciación neuronal y astrocítica. Las QNP generan, a través de ~3 divisiones asimétricas, las ANP, después de ~2 divisiones simétricas, salen del ciclo celular y dan lugar a células NB1. Las células NB1 maduran en NB2 y luego en IN y finalmente a neuronas maduras diferenciadas; esto se acompaña de una pérdida masiva de ANP. Por otra parte después de una rápida sucesión de varias divisiones, las QNP salen del ciclo celular y comienzan a adquirir la morfología astrocítica. Se indican los intervalos de tiempo de los principales pasos de la cascada.

Los Marcadores de NSC usados comúnmente incluyen nestina, proteína fibrilar acídica de la glia (GFAP), Asch 1/2, y la alta movilidad de los factores relacionados con Shy caja de transcripción 2 (Sox2) [169]. Nestina está vinculada a un filamento intermedio clase VIa con células mitóticamente activas en el SNC

[170, 171]. GFAP se expresa en células ependimales multipotenciales, en la glia radial, y en astrocitos maduros [172]. La expresión de Asch 1 y 2 se pueden encontrar en las células neuroepiteliales embrionarias [173]. Las NSC indiferenciadas poseen capacidades de auto-renovación y pueden existir en forma quiescente o en un estado mitóticamente activo. Las células quiescentes se han demostrado para expresar Sox2 y FOXO3A [174].

Las células mitóticamente activas expresan diversos marcadores de entrada/progresión del ciclo celular: Mcm2, Ki67, ciclina D1 y E (fase G1), ciclina A (fase S), ciclina B1 (fase G2), y H3 fosfohistona (fase M). Las células precursoras son reconocidas a través de la expresión de doblecortina (DCX) y PSA-NCAM [175, 176].

El NO endógeno actúa como un regulador negativo de la neurogénesis adulta en condiciones fisiológicas [177], mostrado por la inhibición de la síntesis de NO con L-NAME, un inhibidor competitivo no selectivo de la actividad de NOS [53].

La reducción de la actividad de la nNOS aumenta la neurogénesis en la SVZ como en el DG del hipocampo. En contraste con los resultados obtenidos con la administración intracerebroventricular de L-NAME, la administración sistémica no afectó la neurogénesis en el DG del hipocampo [178]. Lo cual se debe a una diferencia en la disponibilidad de NO endógeno en las dos regiones, o a una sensibilidad a NO. Las células precursoras en la SVZ aumentan su proliferación en respuesta al factor de crecimiento epidermal (EGF), mientras que los precursores de DG no lo hacen [179]. La expresión del receptor de EGF (EGFR) es mucho más prominente en la SVZ que en el DG [180]. El NO ejerce acciones antiproliferativas en varias líneas de células mediante la inhibición directa de la actividad tirosina cinasa del EGFR [181]. Todos estos datos sugieren que el EGFR puede ser una de las dianas moleculares para el efecto antiproliferativo de NO en los precursores neuronales SVZ.

Además, se han reportados genes involucrados en el proceso de neurogénesis que participan en cada una de las funciones clave de este proceso entre los que se encuentran:

- Migración neuronal: *Ascl1*, *Cdk5r1*, *Dcx*, *Drd2*, *Ndn*, *Neurog2*, *Nrcam*, *Ntn1*, *Pafah1b1*, *Robo1*, *Slit2*.

Diferenciación celular:

- Diferenciación Neuronal: *Ascl1*, *Bdnf*, *Bmp2*, *Bmp4*, *Cdk5r1*, *Cdk5rap2*, *Chat*, *Hes1*, *Heyl*, *Lif*, *Mef2c*, *Neurod1*, *Neurog1*, *Neurog2*, *Nog*, *Nrcam*, *Olig2*, *Pafah1b1*, *Pax3*, *Pou4f1*, *Rtn4*, *Sox2*.
- Determinación del destino celular neuronal: *Ascl1*, *Ntf3*, *Olig2*, *Sox2*.
- Otros reguladores de diferenciación celular: *Hdac4*, *Mdk*, *Nrg1* (*Hgl*), *Pax6*.

Funciones sinápticas:

- Regulación de la plasticidad sináptica: *Adora1*, *ApoE*, *Bdnf*, *Drd2*, *Grin1*, *Nf1*, *S100b*.
- Transmisión sináptica: *ApoE*, *Chat*, *Chrm2*, *Creb1*, *Dlg4* (*Psd95*), *Drd2*, *Fgf2* (*Bfgf*), *Grin1*, *Pafah1b1*, *Sod1*, *Th*.
- Sinaptogénesis: *Ache*, *Nrcam*, *Pou4f1*.
- Axonogénesis: *Apbb1*, *App*, *Dcx*, *Drd2*, *ErbB2* (*Her2*), *Map2*, *Notch1*, *Nrcam*, *Pard3*, *Pou4f1*, *S100a6*, *S100b*.

Factores de crecimiento y citoquinas:

- Factores de crecimiento: *Artn*, *Bdnf*, *Egf*, *Fgf2* (*Bfgf*), *Gdnf*, *Gpi*, *Lif*, *Mdk*, *Ndp*, *Nrg1* (*Hgl*), *Ptn*, *S100a6*, *Vegfa*.
- Citocinas: *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp8a*, *Cxcl1*, *Gpi*, *Il3*, *Mdk*, *Ptn*, *Tgfb1*.
- Apoptosis: *Adora1*, *Adora2a*, *Alk*, *ApoE*, *Bcl2*, *Ep300*, *Gdnf*, *Notch2*, *Ntn1*, *Pax2*, *Pax3*, *Rtn4*, *S100b*, *Vegfa*.
- Moléculas de Adhesión celular: *Dll1*, *Efnb1*, *Nrcam*, *Nrp1*, *Nrp2*, *Rac1*, *Robo1*, *Slit2*, *Tnr*.
- Ciclo celular: *Apbb1*, *Ep300*, *Hdac4*, *Mdk*, *Kmt2a*, *Ndn*, *Pard3*, *Ptn*.

Transducción de señales:

- Vía de Señalización Notch: *Ascl1*, *Dll1*, *Hes1*, *Hey1*, *Hey2*, *Heyl*, *Notch1*, *Notch2*, *Nrg1* (*Hgl*).
- Vía de Señalización WNT: *Dvl3*, *Ndp*, *Shh*.
- Vía de Señalización de TGF β : *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp8a*, *Tgfb1*.
- Vía de Señalización de receptores acoplado a proteínas G: *Adora1*, *Adora2a*, *Chrm2*, *Cxcl1*, *Drd2*.
- Factores de transcripción y cofactores: *Apbb1*, *Ascl1*, *Creb1*, *Ep300*, *Flna*, *Hes1*, *Hey1*, *Hey2*, *Heyl*, *Mef2c*, *Kmt2a*, *Ndn*, *Neurod1*, *Neurog1*, *Neurog2*, *Pax2*, *Pax3*, *Pax6*, *Pou3f3*, *Pou4f1*, *Sox2*, *Sox8*, *Stat3*.

PLANTEAMIENTO

Los antecedentes muestran que la administración subaguda de zinc tiene un efecto protector, disminuyendo el estrés nitrosativo, la lipoperoxidación y la muerte celular tanto apoptótica como necrótica, y por otro lado induce la expresión de quimiocinas y sus receptores, así como factores de crecimiento (IGF-1 y FGF2). Sin embargo, el efecto protector puede involucrar la expresión de otras quimiocinas y sus receptores involucrados en la polarización microglial, la transcripción de enzimas antioxidantes como SOD y GPx, otros factores de crecimiento (NGF, BDNF, EGF y VEGFA) involucrados en la sobrevivencia de neuronas y en la proliferación, migración y diferenciación de células precursoras neuronales, a través de varias vías de señalización, ya sea la vía de NF- κ B o la vía de ERK. Sin embargo, su efecto protector puede estar relacionado por la presencia o ausencia de NO mediada de forma diferencial por las diferentes NOS (I, II y III), que han mostrado tener un efecto sobre la neurogénesis.

Por tal motivo, en este trabajo se estudió el efecto de la administración subaguda de zinc sobre la neurogénesis mediada por la presencia de NO durante un proceso Hipóxico isquémico cerebral en rata.

HIPOTESIS

El NO participa en la inducción de la expresión de factores de crecimiento y a través de vías de señalización (NF- κ B o ERK) que promueve la neurogénesis causada por la administración profiláctica de zinc de forma subaguda durante un proceso hipóxico isquémico cerebral en rata.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la participación del NO sobre la neurogénesis (a través de la inducción de la expresión de factores de crecimiento a través de las vías de NF- κ B o ERK) causados por la administración profiláctica de zinc de forma subaguda durante un proceso hipóxico isquémico cerebral en rata

Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la administración subaguda de zinc sobre la neurogénesis (proliferación, migración y maduración de células precursoras a través de la administración de BrdU) durante el proceso hipóxico isquémico cerebral.
- Determinar la participación del NO sobre la neurogénesis causada por la administración subaguda de zinc durante el proceso hipóxico isquémico cerebral.
- Determinar el efecto de la administración subaguda de zinc en presencia o ausencia de óxido nítrico sobre la transcripción y expresión de factores de crecimiento: IGF-1, FGF2, EGF, BDNF, VEGFA, NGF y GDNF durante un proceso hipóxico isquémico cerebral.
- Determinar el efecto de la administración subaguda de zinc en presencia o ausencia de óxido nítrico sobre la transcripción quimiocinas y sus receptores: CXCL12, CXCR4, CCL2, CCR2, CCL4, CXCL13 y CXCR5 durante un proceso hipóxico isquémico cerebral.
- Determinar el efecto de la administración subaguda de zinc en presencia o ausencia de óxido nítrico sobre la transcripción de enzimas antioxidantes: SOD1, SOD3 y GPX durante un proceso hipóxico isquémico cerebral.
- Evaluar la expresión de las NOS (I, II, y III) modificadas por la administración subaguda de zinc en presencia o ausencia de NO durante un proceso hipóxico isquémico cerebral en rata.

- Evaluar la vía de señalización (ERK y NF- κ B) mediada por la administración subaguda de zinc en presencia o ausencia de NO durante un proceso hipóxico isquémico cerebral.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

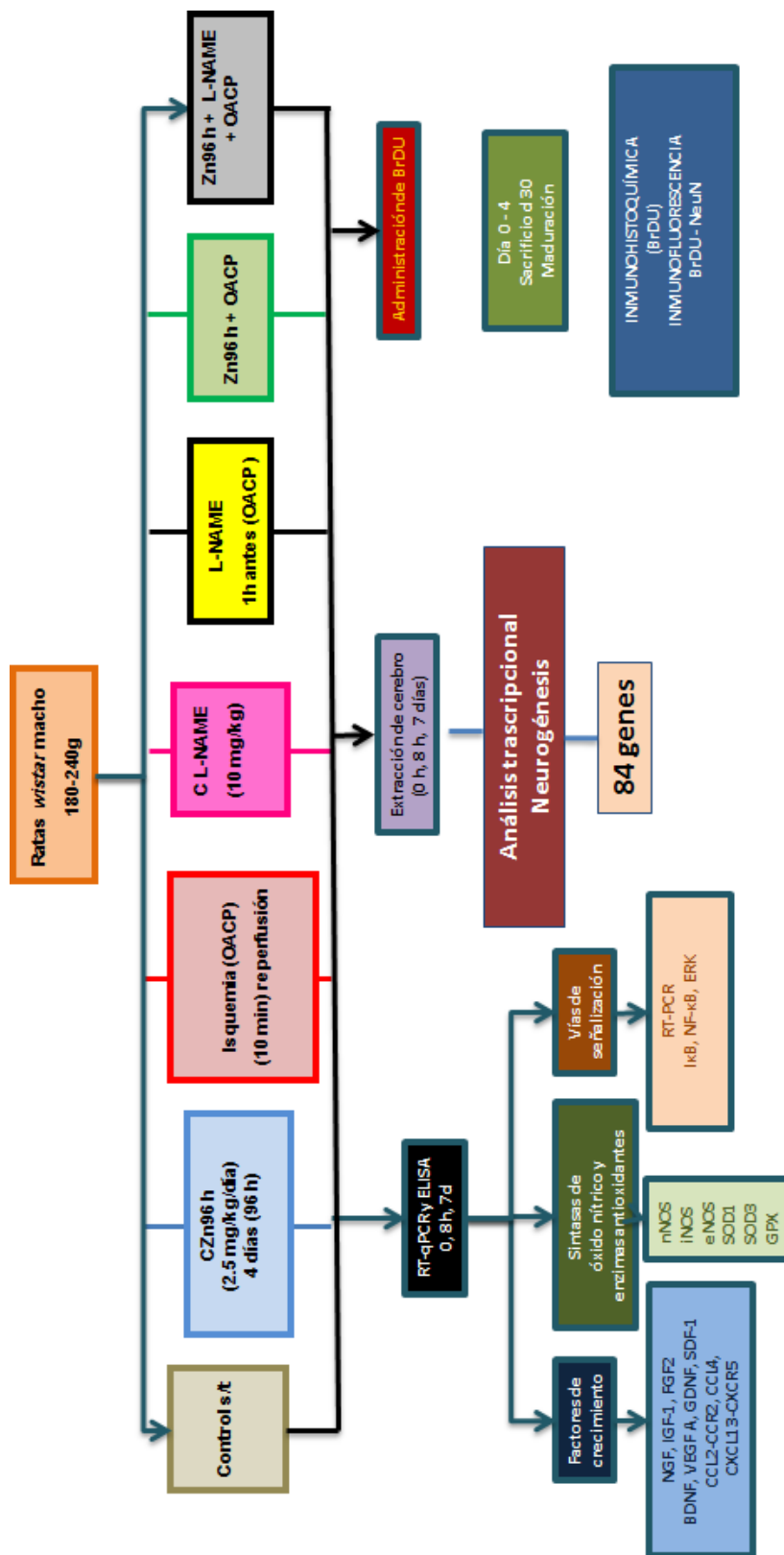


Figura 7. Protocolo general de trabajo para llevar a cabo cada uno de los objetivos planteados

METODOLOGÍA

Animales

Se utilizaron ratas *Wistar* macho, obtenidas del bioterio del CINVESTAV, las cuales fueron divididas en: 1) grupo control sin tratamiento [C s/tx], 2) grupo control con administración subaguda de zinc (2.5 mg/Kg de peso durante 4 días) [C Zn96h], 3) grupo de obliteración de la arteria carótida primitiva (OACP) por 10 min. [Isquemia] , 4) grupo con administración subaguda de zinc y la OACP [Zn96h + Isquemia], 5) grupo con administración superaguda de L-NAME (inhibidor inespecífico de las sintasas de óxido nítrico Nitro-L-arginina metil ester una hora antes) + OACP [L-NAME + Isquemia], 6) grupo con administración subaguda de zinc, la administración superaguda de L-NAME y la OACP [Zn96h + L-NAME + Isquemia].

Cirugía

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (80 mg/kg)/xilacina(10 mg/kg v.i.p), una vez anestesiados se realizó una incisión con el objetivo de identificar la arteria carótida primitiva izquierda, una vez disecada se obstruyó por 10 minutos con ayuda de una pinza de presión arterial y posteriormente al proceso hipóxico isquémico se suturó la incisión, se esperó hasta que se recuperara el sujeto de experimentación. Después de 8 h y 7 días post-OACP, fueron sacrificados.

Cuantificación de proteínas totales

Las proteínas totales fueron cuantificadas por el método de Sedmak y Grossberg (1977) [182]. El producto de reacción fue leído en un espectrofotómetro (Bio-Rad SmartSpect 3000) a 620 nm. La concentración de proteínas fue determinada interpolando la densidad óptica de las muestras en una curva estándar de albumina de suero bovino (1 a 10 µg), la cual fue determinada paralelamente al ensayo.

Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Cinco μg de proteínas totales del homogenado de las diferentes muestras se completaron a un volumen final de 100 μL con buffer de carbonatos para sensibilizar las placas de ELISA, los sitios inespecíficos se bloquearon con albúmina de suero bovino 0.5 %. Se utilizaron los anti- anticuerpos monoclonales para las proteínas de interés: BDNF, NGF, SDF-1 (CXCL12/CXCR4), NOS (I, II, y III), ERK, NF- κ B e I κ B. Se utilizaron anticuerpos secundarios peroxidados, se reveló con el sustrato ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbencil-tiazolina-6-sulfónico) y se cuantificó la absorbancia de la placa en un lector de ELISA (Bio-Rad Benchmark) a 415 nm.

Extracción de RNA total

Se extrajo el RNA total de 100 mg de tejido de la región temporo parietal de la corteza cerebral e hipocampo, por medio de la técnica de TRizol (1000 μL de TRizol por cada 100 mg de tejido) [Chomczynski y Sacchi, 1987 [183]]. Las muestras fueron incubadas por 5 min a temperatura ambiente, se agregaron 200 μL de cloroformo por cada mL de TRizol, se agitó vigorosamente por 15 segundos y se incubó por 5 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 12,500 rpm. por 15 min a 4°C y a la fase acuosa, se le agregó 0.5 mL de isopropanol por cada mL de TRizol y se mezcló por inversión, se incubó por 10 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 12,000 r.p.m. por 10 min a 4°C y se desechó el sobrenadante, se agregó 1 mL de etanol al 75% por cada mL de TRizol, se lavó la pastilla con un sólo golpe de vórtex, se centrifugó a 7,500 r.p.m. por 5 min a 4 °C, se decantó se dejó secar, y se resuspendió con agua grado biología molecular (GBM). El RNA se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm, se determinó su pureza utilizando las relaciones 260 nm/280 nm y se corroboró su integridad por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Retrotranscripción- PCR

La reacción de retro-transcripción se realizó con la matriz RT2 PCR Kit first Strand de SABiosciences (Qiagen). La PCR en tiempo real se llevó a cabo en un arreglo de qPCR de 384 pozos para neurogénesis RT2 Profiler PCR de rata (PARN-404Z, Qiagen), que contiene los oligonucleótidos sentido y antisentido que permiten evaluar la expresión de 84 genes involucrados en el proceso de neurogénesis. La amplificación se realizó en un termociclador 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) con los siguientes parámetros: después de una desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 min, la amplificación se realizó con 40 ciclos a 95 °C durante 15 s (desnaturalización) y 60 °C durante 60 s (extensión). Los resultados fueron analizados por la herramienta bioinformática protein-protein interaction networks disponible en STRING-DB.org.

PCR tiempo real

Se utilizaron sondas TaqMan (ThermoFisher Scientific) para identificar los genes: BDNF, GDNF, VEGF, NGF, IGF-1, FGF2, SOD1, SOD3, GPX4, NNOS, INOS, ENOS, NF κ B, I κ B, CCL2, CCR2, CXCL12, CXCR4, CXCL13, CXCR5. Las reacciones de PCR fueron conformadas con 0.25 μ L de sonda (0.4 mM), 2.5 μ l de Master Mix (TaqMan 2X Universal Master Mix, Life Technologies) y 2.25 μ L de cDNA. Las condiciones de termociclado para la qPCR fueron: 10 minutos de desnaturalización inicial y activación de la enzima a 95 °C por 45 ciclos, dos para la desnaturalización y amplificación de 15 segundos a 95° C y 1 minuto a 60 ° C.

Inyección de BrdU

La Bromodesoxiuridina (BrdU, Sigma) fue disuelta en 0.9 % de NaCl estéril, y posteriormente fue filtrada. Cada uno de los grupos fue administrado vía intraperitoneal con una dosis de 50 mg/ Kg de peso a una concentración de 10 mg/mL. Se realizaron dos esquemas de administración de BrdU, el primero para marcar células en proliferación; se administró desde el momento de la OACP cada 4 horas durante 12 h y 24 h después del proceso de daño a cada

grupo se le realizó perfusión intracardiacal con SSI y PFA 4%. El segundo protocolo de administración se realizó para el grupo de diferenciación y maduración durante 4 días iniciando el día de OACP; el grupo de diferenciación se sacrificó a los 7 días post OACP y el de maduración a los 30 días post OACP.

Inmunohistoquímica vs BrdU y conteo de células

El cerebro de cada uno de los grupos, fue crioprotegido con sacarosa al 30% y se realizaron cortes sagitales de 40 μm ; para determinar el número y distribución de células BrdU +, el inmunoensayo se realizó a una serie de cortes de 40 μm equidistantes 1:6 que se lavaron con TBS-1X y preincubando con H_2O_2 0.6% por 30 min. Para bloquear peroxidasa endógenas. Después de lavar las rebanadas de cerebro, se incubaron en HCl 2 N a 37 °C por 30 min para desnaturalizar el DNA y se neutralizó con buffer de boratos 0.1 M TA. Después de lavar las rebanadas fueron bloqueadas con TBS ++ (TBS plus,plus) a 30 min TA. e incubadas con el anticuerpo primario anti-BrdU (Rat polyclonal 1:100. Accurate Chemical) toda la noche a 4°, posteriormente, usando el método de peroxidasa [sistema ABC, con el anticuerpo secundario conjugado a biotina Donkey anti rat (1:250, Jackson ImmunoResearch), y 3,3'-diaminobenzidina (DAB) como cromógeno, Vector Laboratories]. Las células BrdU⁺DAB son digitalizadas con un objetivo 10X para su conteo posterior [184, 185].

Inmunofluorescencia para determinar colocalización

Después de la desnaturalización, neutralización y bloqueo descritos anteriormente, las rebanadas fueron coincubadas con anticuerpos primarios BrdU (Rat polyclonal 1:100, Accurate Chemical), en los grupos de maduración con NeuN (Mouse monoclonal 1:100 Abcam.) por 72 h a 4 °C. Posteriormente, las rebanadas fueron coincubadas con un anticuerpo secundario hecho en Burro (donkey) anti-rat Alexa Fluor 488 (1:250, Thermo Fisher) y donkey anti-mouse Cy3 (1:250, Jackson ImmunoResearch) respectivamente, por 2 h TA. [184, 185].

Análisis estadístico

Los valores se analizaron con una ANOVA de una vía acompañado de una prueba post Dunnet, estableciendo el valor estadísticamente significativo a $P \leq 0.05$. Los valores corresponden al promedio \pm SEM obtenidos de 3 experimentos independientes.

Para el arreglo de la qPCR se analizó la diferencia entre los grupos con respecto al control sin tratamiento en cada uno de los ensayos. Las diferencias entre grupos se determinaron con test t de Student no pareado. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, EE.UU.). Valores $P \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos. Análisis de los datos de la qPCR se realizó sobre una plataforma basada en el análisis de datos de los protocolos de PCR (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) proporcionado por SABiosciences (Qiagen) y los resultados son expresados como: índice de cambio ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis que se realizó por qPCR, del transcriptoma neurogénico mediante Syber Green como base intercalar de las cadenas de DNA comprendió de 84 genes, además de 21 genes que fueron evaluados por sondas TaqMan a las 8 h y 7 d para cada grupo, para elegir estos tiempos se realizó un análisis temporal por PCR punto final en los grupos problema y estos mostraron ser puntos clave, las 8 h refleja la síntesis de novo en los genes evaluados tras el proceso isquémico, mientras que los 7 d generan la evidencia del desenlace tras el daño, ya que en procesos isquémicos es a los 7 días cuando se puede declarar el estado de supervivencia o de muerte neuronal todo esto en corteza (cx) e hipocampo (h) ya que evaluamos así el sitio de daño que es corteza y el nicho neurogénico de nuestro interés. Además, se analizó la expresión de 10 proteínas por el método de ELISA. Del mismo modo los análisis de neurogénesis por histología se muestran los 30 d una doble marca de BrdU + NeuN darán la evidencia de aquellas neuronas que han logrado madurar e integrarse.

La administración profiláctica induce la transcripción de quimiocinas y factores de crecimiento, promoviendo la supervivencia celular

Ya hemos demostrado por PCR en punto final que la administración subaguda de zinc favorece la transcripción y expresión de CCL2 y CCR2, favoreciendo la supervivencia y recuperando la plasticidad que se pierde por el daño isquémico esto acompañado de la expresión de factores de crecimiento como IGF-1 y FGF2 por ello en este trabajo fue de nuestro interés evaluar otros factores de crecimiento para determinar si la administración subaguda de zinc es capaz de favorecer la expresión de otros factores tróficos.

La transcripción de Cxcl12 también conocido como factor derivado de células estromales 1 (SDF-1) y su receptor Cxcr4 no fueron modificados por

ningún tratamiento en los tiempos de estudio tanto en la fase temprana como tardía (Figura 8).

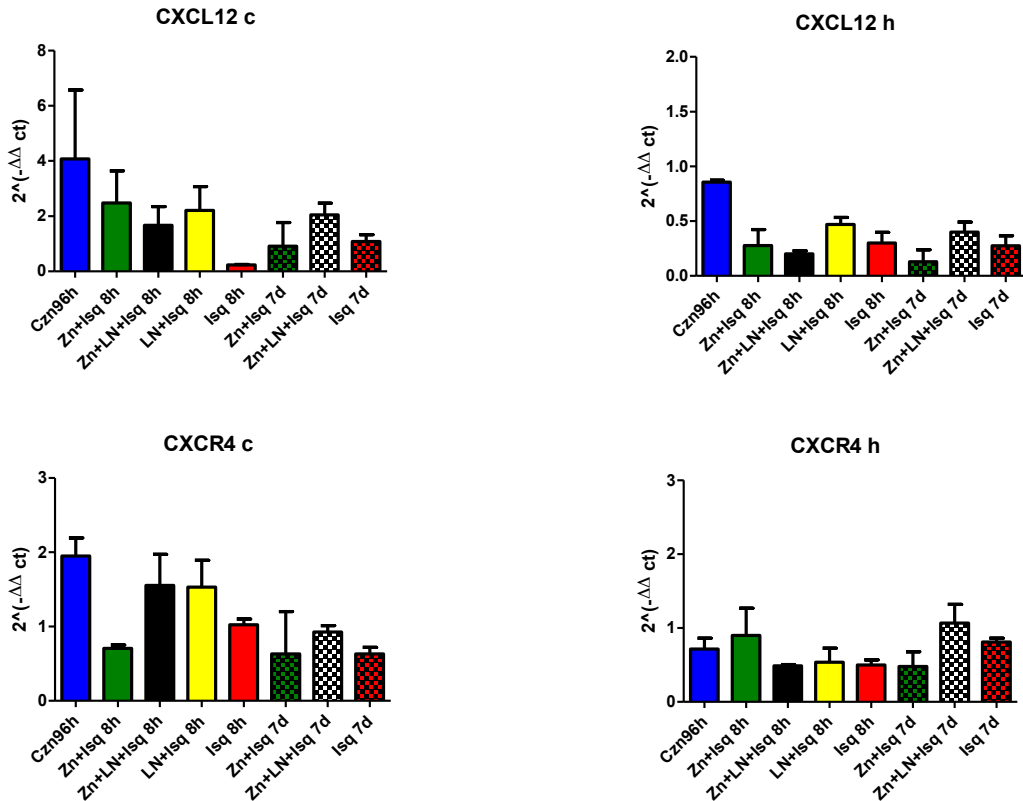


Figura 8. Evaluación de la Transcripción de CXCL12/CXCR4 en los diferentes grupos, en corteza (c) e hipocampo (h). Se observa la evaluación de la transcripción por RT-qPCR. Promedio (\pm SEM) de 3 ratas. * $p=0.05$, Valores estadísticamente significativos analizados por ANOVA de una vía post-prueba con Dunnet.

Sin embargo, en la Figura 9, al evaluar los niveles proteicos de CXCL12 en corteza no encontramos diferencias significativas, mientras que en hipocampo se observó un incremento de la expresión en el grupo Zn+ISQ 8h ($35.73\% \pm 0.69\%$), al evaluar la expresión de su receptor CXCR4 se observó incremento en los grupos Zn+LN+ISQ 8h ($39.25\% \pm 11.75\%$) e ISQ 7d ($36.50\% \pm 12.50\%$), mientras que en hipocampo se encontró incremento en el grupo ZN+ISQ 8h ($40.07\% \pm 3.97\%$).

SDF-1 y su receptor (CXCL12/CXCR4) se encuentra relacionado con protección, recuperación de capacidades neurológicas y activación de la neurogénesis tras procesos de isquemia cerebral tanto en adultos como en neonatos [186]. Además, que está relacionado en el preconditionamiento, se sabe que evita la infiltración de leucocitos en el parénquima cerebral [187], por ello ha sido empleado como un marcador de buen pronóstico en procesos isquémicos agudos [188]. Un estudio de puntuación de riesgo genético multi-locus basado en una combinación de 27 loci, incluido el gen CXCL12, identificó individuos con mayor riesgo de eventos de enfermedad coronaria tanto incidental como recurrente, así como un beneficio clínico mejorado del tratamiento con estatinas. El estudio se basó en un estudio de cohorte comunitario (the Malmo Diet and Cancer study) y cuatro ensayos controlados aleatorios adicionales de cohortes de prevención primaria (JUPITER and ASCOT) y cohortes de prevención secundaria (CARE and PROVE IT-TIMI 22) [189].

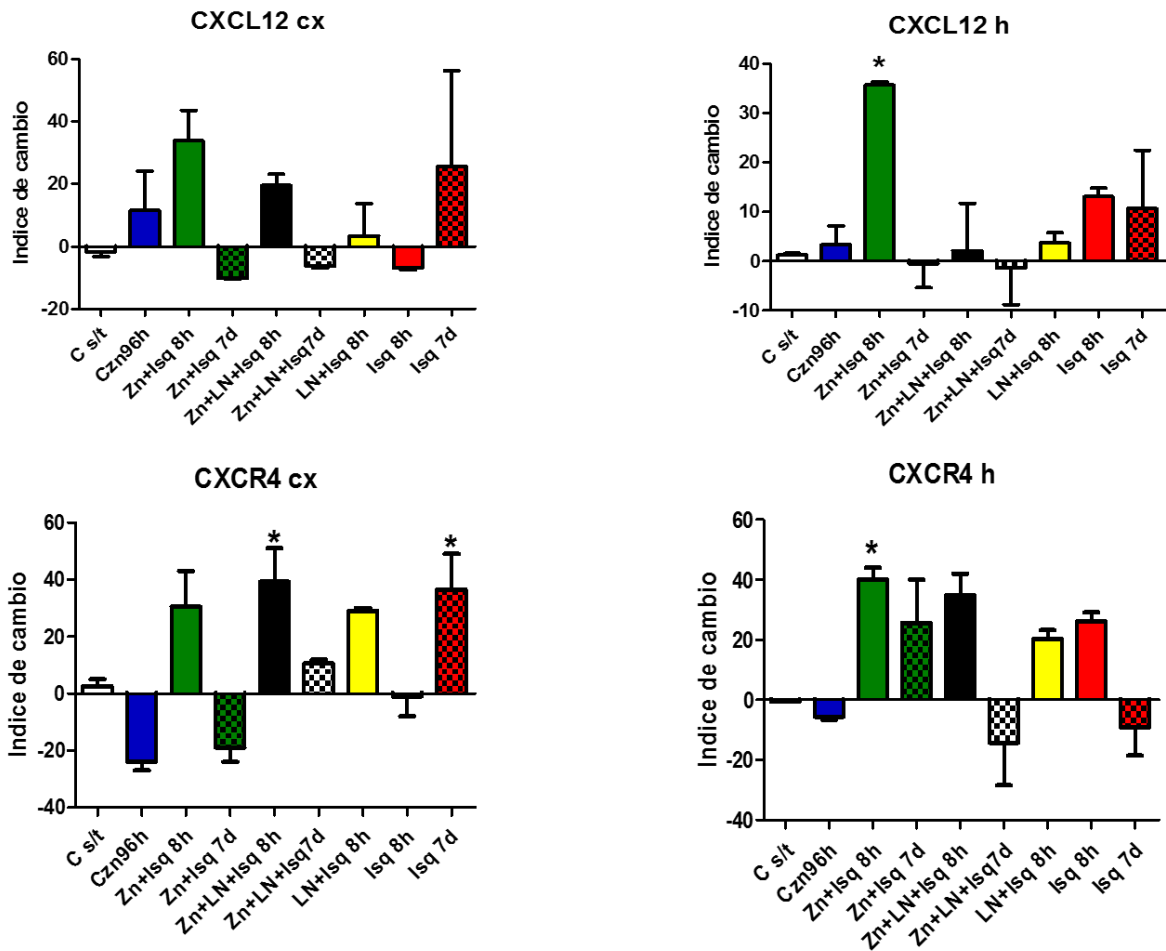


Figura 9. Evaluación de la Expresión de CXCL12/CXCR4 en los diferentes grupos, en corteza (c) e hipocampo (h). Se observan los valores proteicos mediante el ensayo de ELISA. Promedio (\pm SEM) de 3 ratas. * $p=0.05$, Valores estadísticamente significativos analizados por ANOVA de una vía post-prueba con Dunnet.

En La Figura 10, se muestra la evaluación de la transcripción por qPCR para BDNF se observó una regulación positiva en el grupo Zn+Isq 7d (16.22% \pm 12.81%). Al evaluar los niveles proteicos de BDNF en corteza se observó un incremento de su expresión en el grupo Zn+ISQ 8h (62.33% \pm 20.84%), mientras que en hipocampo el grupo donde se encontró incrementado fue en el grupo Zn+ISQ7d (48.90% \pm 19.61%).

Se sabe que BDNF y VEGF están relacionados con el proceso de pre-condicionamiento, causando neuroprotección, angiogénesis y neurogénesis a través de HIF-1 disminuyendo el volumen de infarto y la apoptosis, causando así la recuperación de las funciones neurológicas [190].

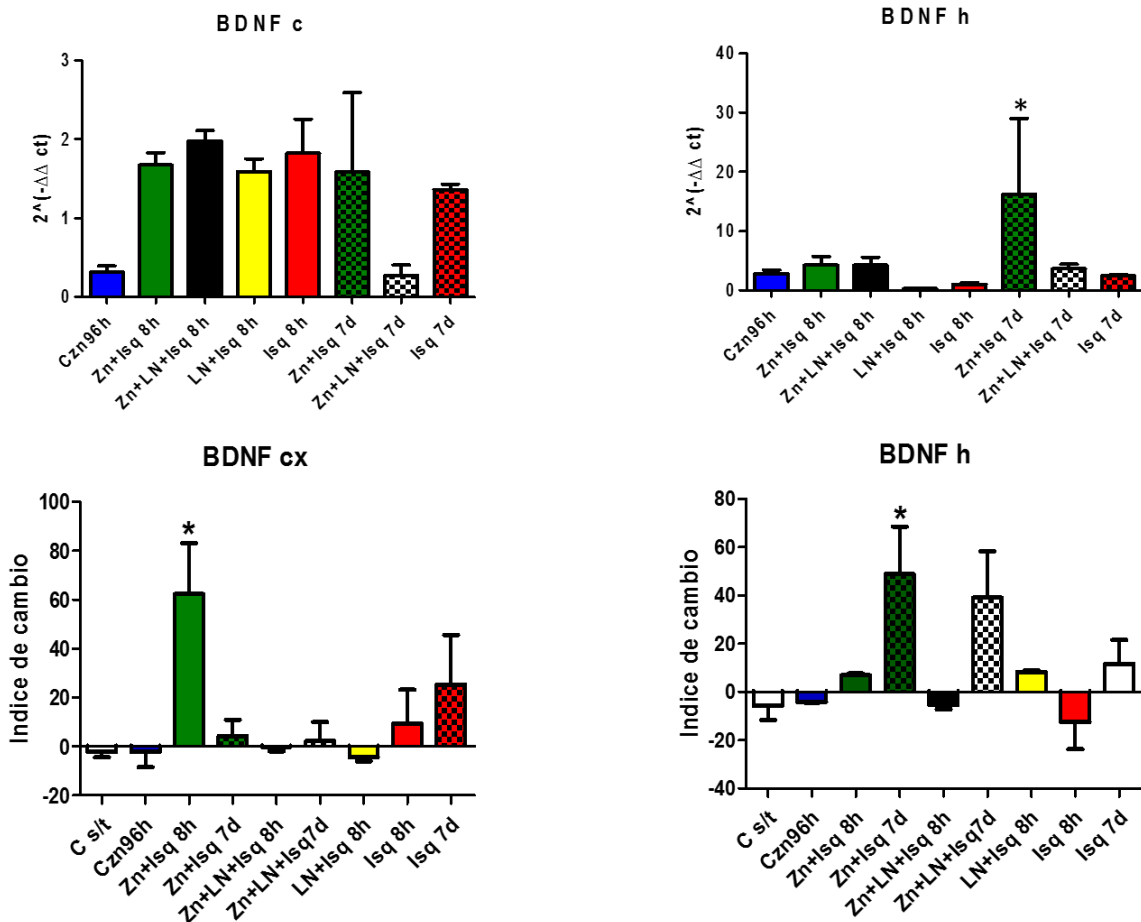


Figura 10. Evaluación de la expresión de BDNF en los diferentes grupos, en corteza (c) e hipocampo (h). Se observa la evaluación de la transcripción por RT-qPCR y los valores proteicos mediante el ensayo de ELISA. Promedio (±SEM) de 3 ratas. * p=0.05, Valores estadísticamente significativos analizados por ANOVA de una vía post-prueba con Dunnet.

Al evaluar NGF en los transcritos no se encontraron cambios en los tiempos de estudio, al evaluar la expresión en corteza se observó un incremento en los grupos CZn96h (31.55% ± 5.61%), Zn+ISQ 8h (31.55% ± 5.61%), mientras que en hipocampo se observó un decremento en todos los grupos CZn96h (-35.22% ±1.30%), Zn+ISQ 8h (-33.48% ±1.73%), Zn+ISQ 7d

(-47.61% ± 1.52%), Zn+LN+ISQ 8h (-31.96% ±3.69%), Zn+LN+ISQ 7d (-53.04% ±0.86%), LN+ISQ 8h (-44.13% ±0.21%), ISQ 8h (-48.91% ±0.65%) e ISQ 7d (-47.17% ±1.52%).

El incremento de NGF después de un proceso isquémico se sabe que está relacionado con la reparación de los nervios que son dañados por el estrés oxidativo y la excitotoxicidad favoreciendo la neuroprotección [191].

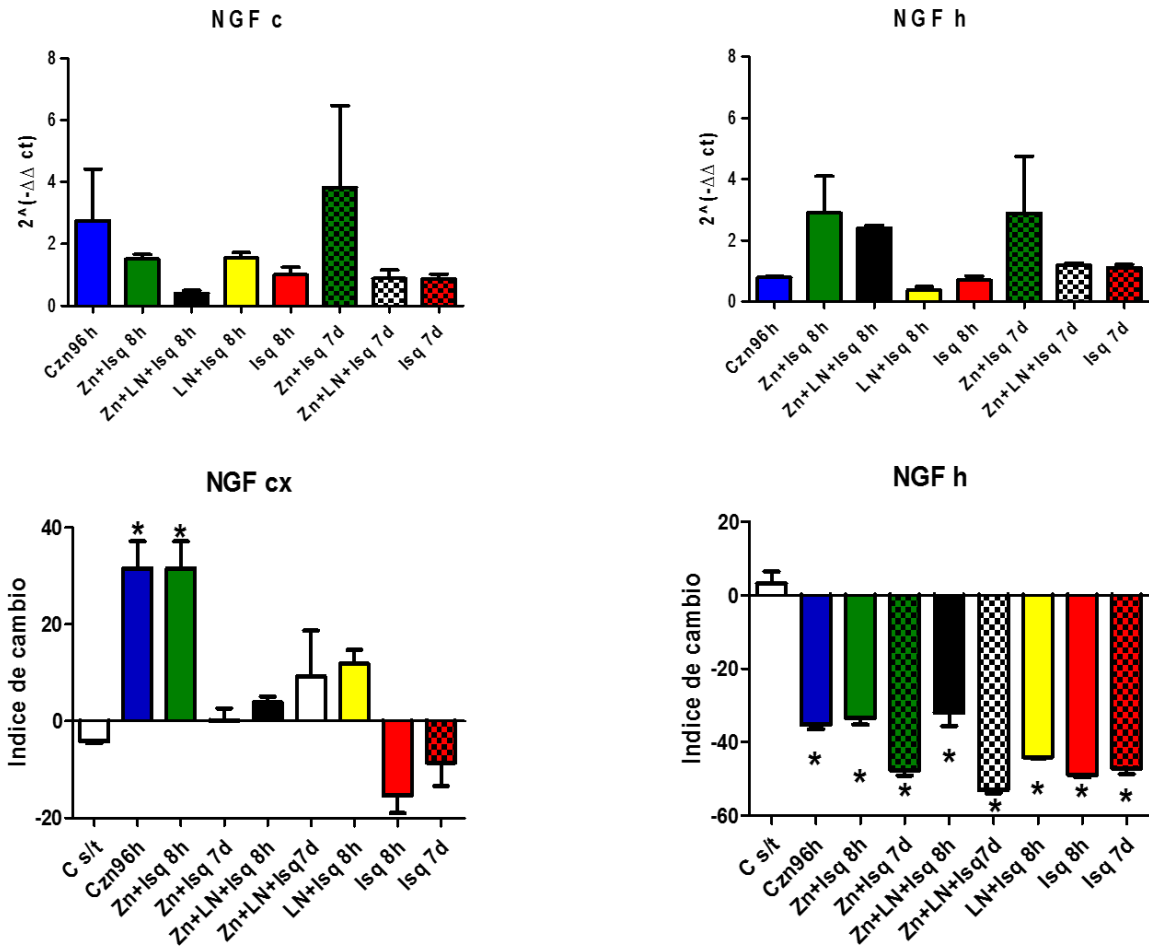


Figura 11. Evaluación de la expresión de NGF en los diferentes grupos, en corteza (c) e hipocampo (h). Se observa la evaluación de la transcripción por RT-qPCR y los valores proteicos mediante el ensayo de ELISA. Promedio (±SEM) de 3 ratas. * p=0.05, Valores estadísticamente significativos analizados por ANOVA de una vía post-prueba con Dunnet.

En la Figura 12, se muestra la evaluación de la transcripción para VEGF y factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) en el que no se observaron cambios significativos a los tiempos de estudio. Al realizar la evaluación de la transcripción de VEGF en corteza, al comparar todos los grupos contra el control sin tratamiento no se muestran diferencias con respecto al control sin tratamiento; sin embargo, al realizar la comparación entre grupos existe diferencia solamente entre el grupo Isq8h y el grupo LN+Isq 8h ($2.967\% \pm 1.54\%$) evidenciando que la activación de las sintasas de óxido nítrico participa en la transcripción de VEGF en la fase temprana del daño isquémico. Al realizar el análisis en hipocampo se observa un incremento en el grupo Zn+Isq 7d al compararlo con el grupo Zn+LN+Isq 7d ($2.582\% \pm 3.06\%$) y con el grupo Isq 7d ($1.789\% \pm 1,39\%$). VEGF es un factor de crecimiento que participa en la angiogénesis necesaria para el restablecimiento del flujo sanguíneo, además se sabe que la formación de nuevos vasos está relacionada con el proceso de remoción del tejido dañado, y también está relacionado con la inducción de la expresión del BDNF [192].

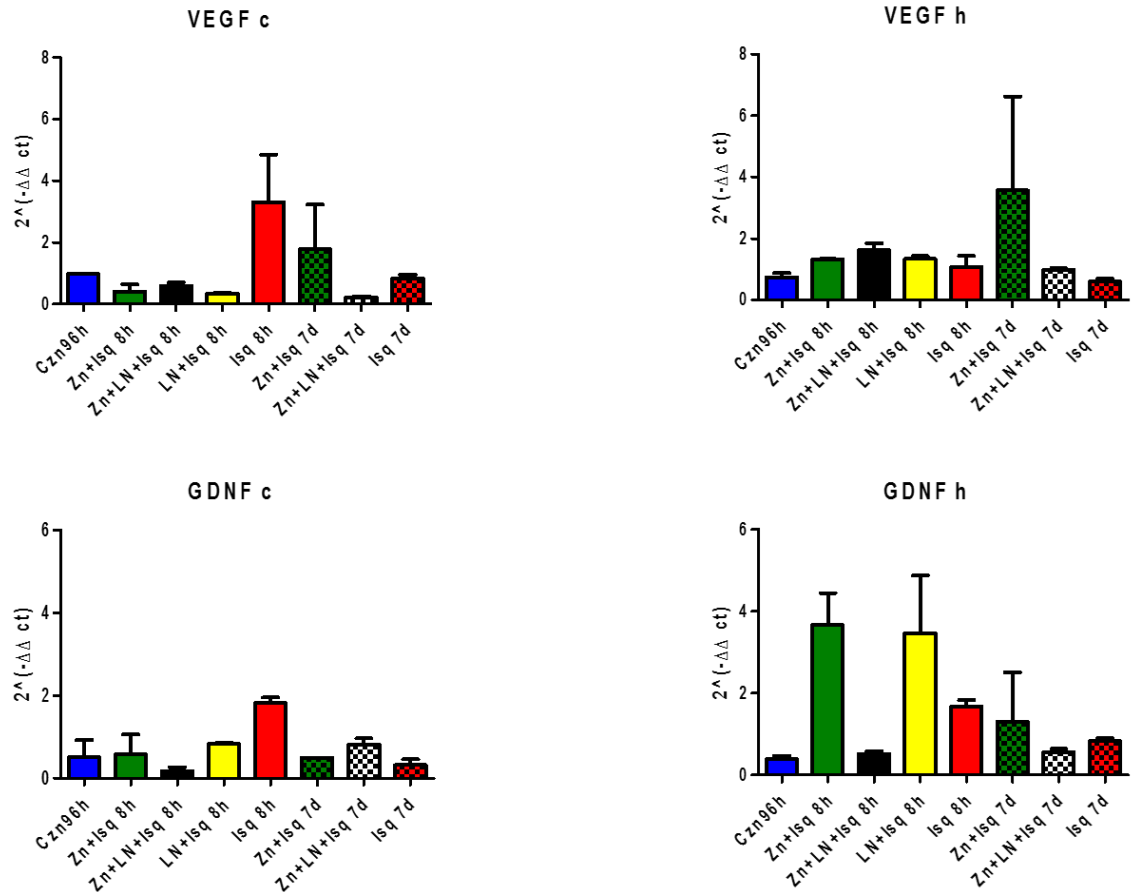


Figura 12. Evaluación de la Transcripción de VEGF e GDNF en los diferentes grupos, en corteza (c) e hipocampo (h). Se observa la evaluación de la transcripción por RT-qPCR. Promedio (\pm SEM) de 3 ratas. * $p=0.05$, Valores estadísticamente significativos analizados por ANOVA de una vía post-prueba con Dunnet.

En la Figura 13 se observa que existe una regulación negativa al evaluar FGF2 en corteza por parte del grupo Zn+Isq 8h ($0.14\% \pm 0.05\%$). Se había evaluado la expresión de FGF2 e IGF1, sin embargo, esos análisis se realizaron combinando corteza con hipocampo y al observar las diferencias entre las dos regiones de estudio nos interesaba saber a qué región se debía el incremento, en corteza podría estar favoreciendo a la disminución del proceso inflamatorio que se lleva a cabo por el daño isquémico.

Al realizar el análisis de IGF1 en corteza y comparar el grupo Isq 8h muestra una regulación positiva con respecto al grupo Zn+Isq 8h ($1.28\% \pm 0.038\%$) y se observa una disminución al comparar en hipocampo, en la fase temprana el grupo Zn+Isq 8h muestra una regulación positiva con respecto al grupo Isq 8h ($1.48\% \pm 0.47\%$) y en la fase tardía, el grupo Zn+Isq 7d muestra una regulación positiva con respecto al grupo Isq7d ($1.75\% \pm 1.445\%$). Durante procesos isquémicos se ha determinado que FGF2 tiene un efecto protector ya que participa en la disminución del proceso inflamatorio; además en hipocampo se conoce que FGF2 cuenta con un efecto mitogénico activando el proceso de proliferación, ha sido reportado que cuando FGF2 e IGF1 se encuentran incrementados se promueve la proliferación celular y cuando se disminuyen los niveles de FGF2 y se incrementan los niveles de IGF1 se favorece la diferenciación celular [193].

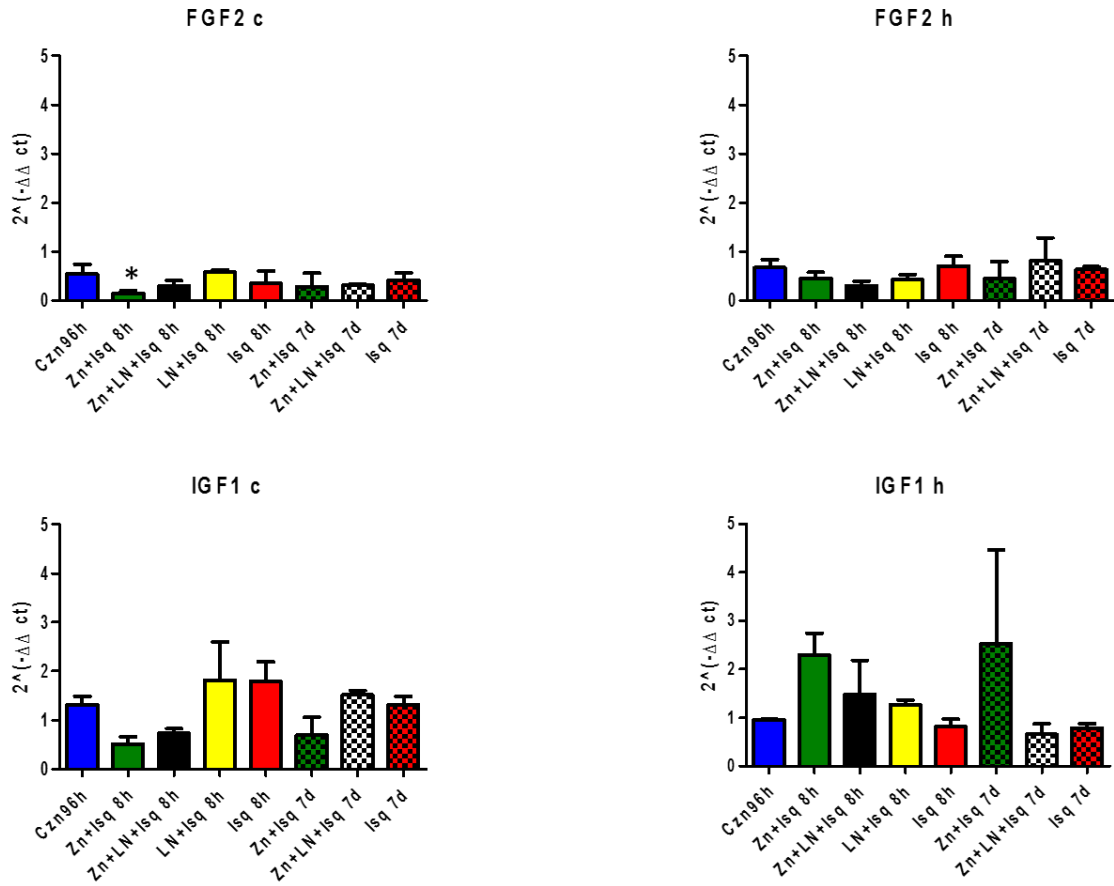


Figura 13. Evaluación de la Transcripción de FGF2 e IGF1 en los diferentes grupos, en corteza (c) e hipocampo (h). Se observa la evaluación de la transcripción por RT-qPCR. Promedio (\pm SEM) de 3 ratas. * $p=0.05$, Valores estadísticamente significativos analizados por ANOVA de una vía post-prueba con Dunnet.

La administración profiláctica de zinc promueve la vasodilatación en la fase temprana del proceso hipóxico isquémico a través de la transcripción de eNOS

Durante el proceso de obliteración, la primera respuesta que genera el organismo es la de restablecer el flujo sanguíneo para lo cual activa varias enzimas, entre ellas las sintasas de óxido nítrico (NOS), las cuales al producir NO a partir de la L-arginina favorecen la vasodilatación, por ello es que se evaluaron sus 3 isoformas.

En la Figura 14, se muestra que el mRNA de nNOS no se modificó en los grupos de estudio. Mientras que la expresión de nNOS cuantificada por el método de ELISA, en corteza cerebral se observa que existe una disminución en la expresión de nNOS en los grupos Zn+ISQ 7d ($-16.24\% \pm 2.09\%$), Zn+LN+ISQ 7d ($-12.70\% \pm 1.295\%$), LN+ISQ 8h ($-11.92\% \pm 1.48\%$), ISQ 8h ($-12.54\% \pm 0.37\%$) e ISQ 7d ($-13.16\% \pm 3.94\%$), con esto se observa que el proceso isquémico disminuye la expresión de nNOS y la administración subaguda de zinc evita la regulación negativa en la fase temprana, ya que en los grupos CZn96h, Zn+ISQ 8h y Zn+LN+ISQ 8h no se observa la disminución.

En hipocampo, la regulación negativa de nNOS se presentó en los grupos CZn96h ($-16.7\% \pm 4.12\%$), Zn+ISQ 8h ($-17.57\% \pm 1.51\%$), Zn+ISQ 7d ($-19.63\% \pm 0.56\%$), Zn+LN+ISQ 8h ($-17.52\% \pm 2.44\%$), Zn+LN+ISQ 7d ($-21.15\% \pm 0.31\%$), LN+ISQ 8h ($-25.27\% \pm 2.06\%$) e ISQ 7d ($-18.33\% \pm 0.75\%$). Únicamente el grupo ISQ 8h no mostró cambios en su expresión comparado con el grupo control sin tratamiento.

La administración profiláctica de zinc no causó la disminución de los niveles proteicos de nNOS como lo hicieron los demás protocolos, sugiriendo que preserva la funcionalidad de la enzima. Por lo que podría ser que nNOS participa en la translocación de Sox2 al núcleo, lo cual favorecería el primer paso del proceso de neurogénesis mediado por el óxido nítrico como ha sido reportado en la fase temprana al daño isquémico [194, 195].

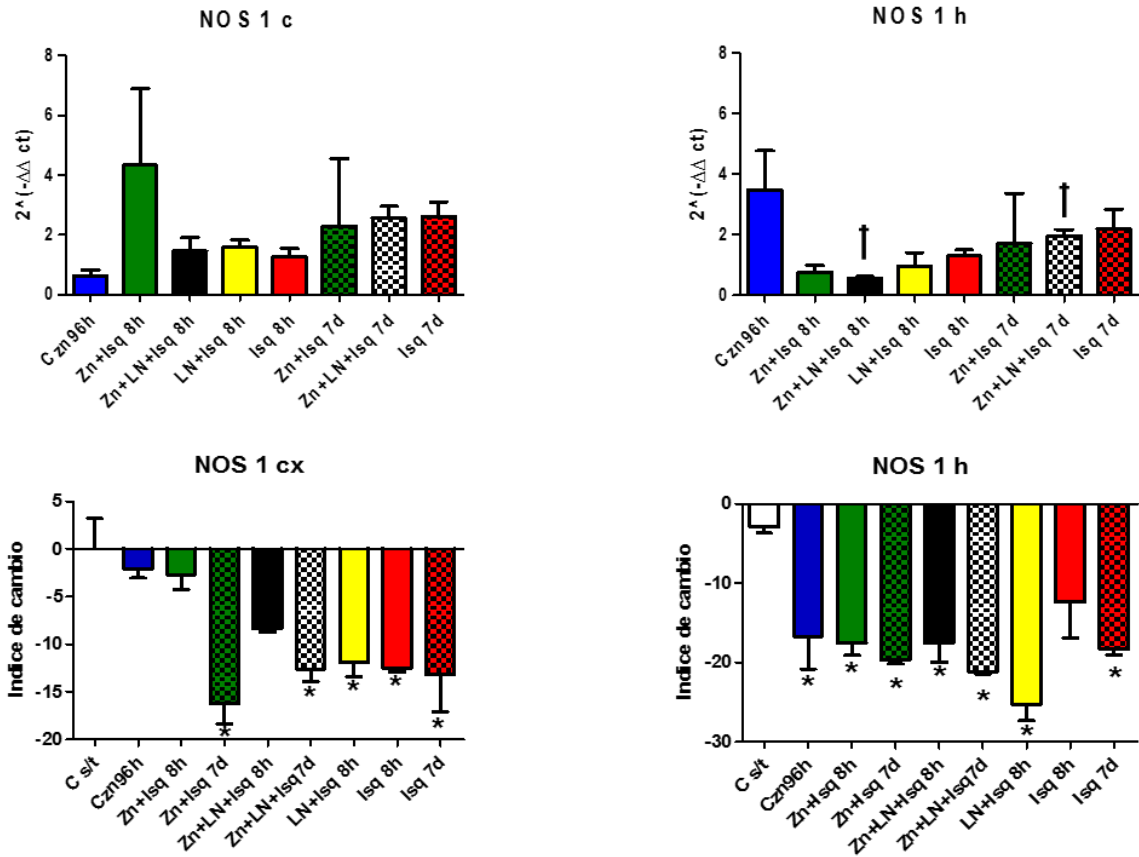


Figura 14. Evaluación de la expresión de NNOS en los diferentes grupos, en corteza (c) e hipocampo (h). Se observa la evaluación de la transcripción por RT-qPCR y los valores proteicos mediante el ensayo de ELISA. Promedio (\pm SEM) de 3 ratas. * $p=0.05$, Valores estadísticamente significativos analizados por ANOVA de una vía post-prueba con Dunnet.

En la Figura 15, se muestra la expresión de la iNOS cuantificada por el método de qPCR y ELISA, al evaluar los niveles del transcrito en corteza cerebral se observa que existe una regulación positiva en el grupo Zn+LN+Isq 8h ($7.157\% \pm 2.07\%$), la evaluación proteica mostró disminución en la expresión de iNOS en los grupos Zn+ISQ 8h ($-10.10\% \pm 5.67\%$), Zn+ISQ 7d ($-21.94\% \pm 1.01\%$), Zn+LN+ISQ 8h ($-12.94\% \pm 1.66\%$), Zn+LN+ISQ 7d ($-20.53\% \pm 0.33\%$), LN+ISQ 8h ($-14.47\% \pm 1.04\%$), ISQ 8h ($-19.17\% \pm 0.39\%$) e ISQ 7d ($-26.47\% \pm 1.04\%$), con esto se observa que el proceso isquémico disminuye la expresión de la iNOS en los tiempos de estudio en Zn+LN+ISQ 8h se está iniciando la transcripción y posiblemente la expresión se estaría llevando a

cambio en horas posteriores, solamente en el grupo con la administración subaguda de zinc sin el proceso isquémico (CZn96h) no se observa la disminución.

En hipocampo, la evaluación de la transcripción de iNOS mostró una regulación positiva en el grupo Zn+LN+Isq 7d ($0.018 \% \pm 0.005\%$), la evaluación de la expresión mostró regulación negativa en todos los grupos CZn96h ($-18.39\% \pm 1.20\%$), Zn+ISQ 8h ($-21.49\% \pm 1.01\%$), Zn+ISQ 7d ($-22.57\% \pm 0.40\%$), Zn+LN+ISQ 8h ($-21.65\% \pm 1.48\%$), Zn+LN+ISQ 7d ($-22.06\% \pm 0.98\%$), LN+ISQ 8h ($-23.07\% \pm 0.31\%$), ISQ 8h ($-28.45\% \pm 1.39\%$) e ISQ 7d ($-29.65\% \pm 0.31\%$).

Se ha reportado en modelos de isquemia cerebral que la inhibición de iNOS denota un efecto protector, ya que se acompaña de la disminución tanto de COX2 como de TNF α favoreciendo la disminución del proceso inflamatorio [196] además, la disminución de la expresión de iNOS después de un proceso isquémico atenúa los cambios morfológicos en las neuronas corticales, causando una mejora de los procesos neurológicos conductuales, así como la disminución de la apoptosis [197].

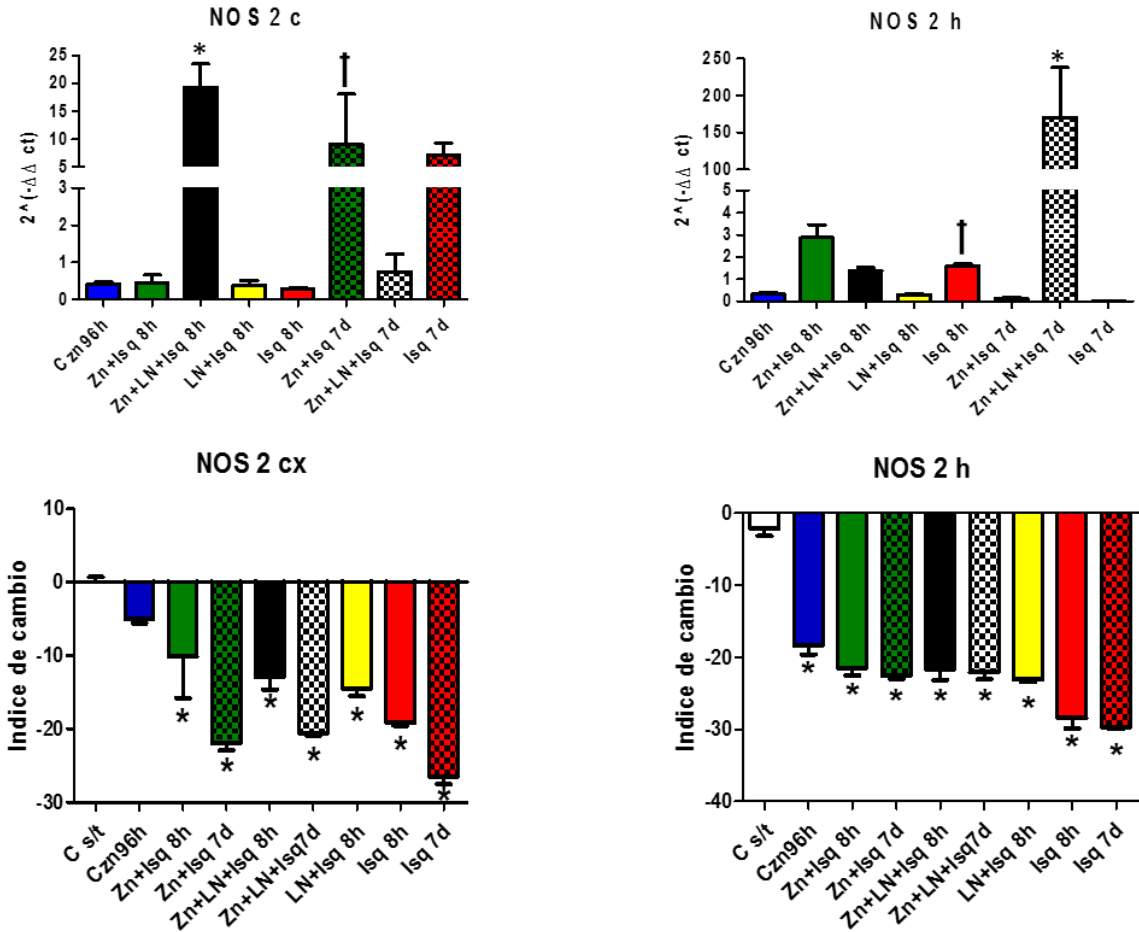


Figura 15. Evaluación de la expresión de INOS en los diferentes grupos, en corteza (c) e hipocampo (h). Se observa la evaluación de la transcripción por RT-qPCR y los valores proteicos mediante el ensayo de ELISA. Promedio (±SEM) de 3 ratas. * p=0.05, Valores estadísticamente significativos analizados por ANOVA de una vía post-prueba con Dunnet.

En la Figura 16, se muestra la expresión de la eNOS cuantificada por el método de ELISA, en corteza cerebral se observa que existe un incremento en la expresión en los grupos CZn96h (12.56% ± 1.88%) y Zn+ISQ 8h (12.56% ±1.88%) que corresponde a la fase temprana del proceso Hipóxico isquémico cerebral, eNOS podría estar realizando un efecto vasodilatador disminuyendo el daño por la oclusión de la arteria carótida primitiva [198]. Mientras, que se observó una regulación negativa en los grupos Zn+ISQ 7d (-13.87% ±1.00%), Zn+LN+ISQ 8h (-26.00% ±1.35%), Zn+LN+ISQ 7d (-17.05% ±1.82%), LN+ISQ

8h (-31.84% \pm 5.41%), ISQ 8h (-34.54% \pm 0.23%) e ISQ 7d (-15.93% \pm 1.17%). Este decremento en los grupos que recibieron el inhibidor de la NOS, podría causar una vasoconstricción y ser el causante de incrementar el daño en la fase temprana del proceso hipóxico isquémico cerebral.

En hipocampo, se observó una regulación positiva en el grupo Isq 7d (2.806 % \pm 0.72%), mientras que en la evaluación proteica no se encontró ninguna diferencia significativa de eNOS. Se ha reportado que la eNOS genera un efecto protector ya que es la responsable de la disminución de la presión arterial en las primeras horas tras un proceso isquémico [199] ;además se ha reportado que la activación de eNOS evita la apoptosis [200], disminuye los procesos trombolíticos, angiopatías y discapacidades cognitivas [201, 202].

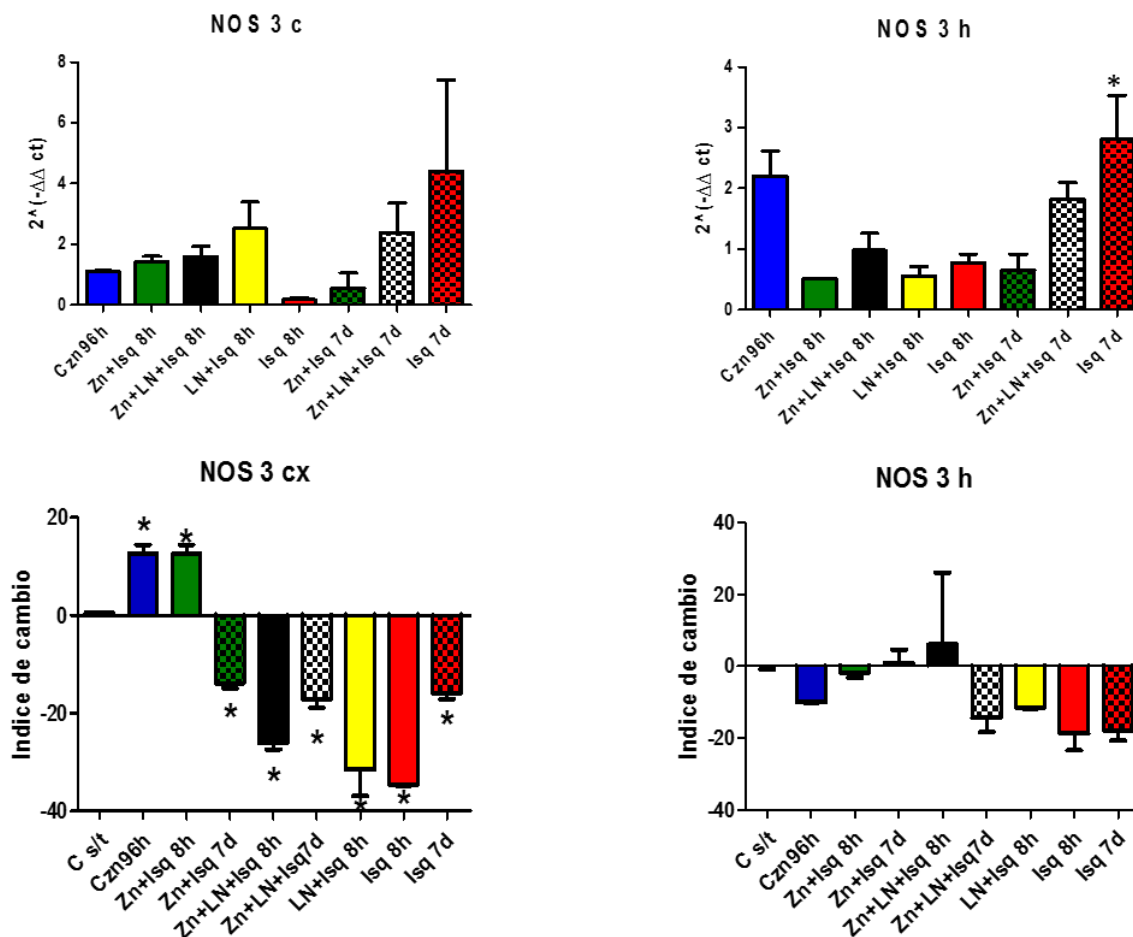


Figura 16. Evaluación de la expresión de eNOS en los diferentes grupos, en corteza (c) e hipocampo (h). Se observa la evaluación de la transcripción por RT-qPCR y los valores proteicos mediante el ensayo de ELISA. Promedio (±SEM) de 3 ratas. * p=0.05, Valores estadísticamente significativos analizados por ANOVA de una vía post-prueba con Dunnet.

Otras enzimas que se activan tras el proceso isquémico son las enzimas antioxidantes, las cuales se encargan de regular el sistema redox que ha sido descompensado por el daño por ello se evaluaron SOD1, 3 y GPx.

En la Figura 17, se muestra el análisis de la evaluación de la transcripción por qPCR para SOD 1 en corteza, se puede observar el efecto

precondicionante del zinc en el grupo CZn96h mostrando una regulación positiva ($3.41 \% \pm 2.05 \%$), mientras que en hipocampo el grupo Zn+Isq 7d mostró una regulación negativa ($-0.37\% \pm 0.17\%$), se ha reportado que SOD1 está relacionada con la disminución del volumen de infarto durante procesos isquémicos [203].

Cuando se realizó el análisis para SOD 3 se observó en corteza una regulación negativa tanto en el grupo Zn+Isq 8h ($0.38\% \pm 0.08\%$) como en el grupo Isq 8h ($0.30 \% \pm 0.11 \%$), lo cual indica que la regulación negativa se muestra en la fase temprana por el daño isquémico, pero únicamente en presencia de NO, ya que con la administración de L-NAME no se observaron diferencias al compararlas con el control. Se ha reportado que SOD3 se encuentra incrementada cuando el daño se exagera a las células vecinas, además se conoce que SOD3, la isoforma extracelular está relacionada con la viabilidad del NO para ayudar a restablecer el flujo sanguíneo tras la oclusión y al mismo tiempo contrarrestar el estrés oxidativo que se lleva en la célula tras la reperfusión.

La evaluación de la transcripción de GPx mostró una regulación negativa por los grupos LN+Isq 8h ($-0.52 \% \pm 0.06\%$) e Isq 8h ($-0.49\% \pm 0.01\%$), efecto que ha sido reportado después de un proceso isquémico [204], la administración subaguda de zinc a las 8 h post-reperfusión previno la disminución de la transcripción en la fase temprana, encontrándose una regulación negativa de GPx en la fase tardía en el grupo de Zn+Isq 7d ($-0.26 \% \pm 0.14\%$), se ha reportado que durante el daño mitocondrial, el cual se da en las primeras horas del daño isquémico, es necesaria la presencia de GPx para poder así evitar el daño oxidativo [205].

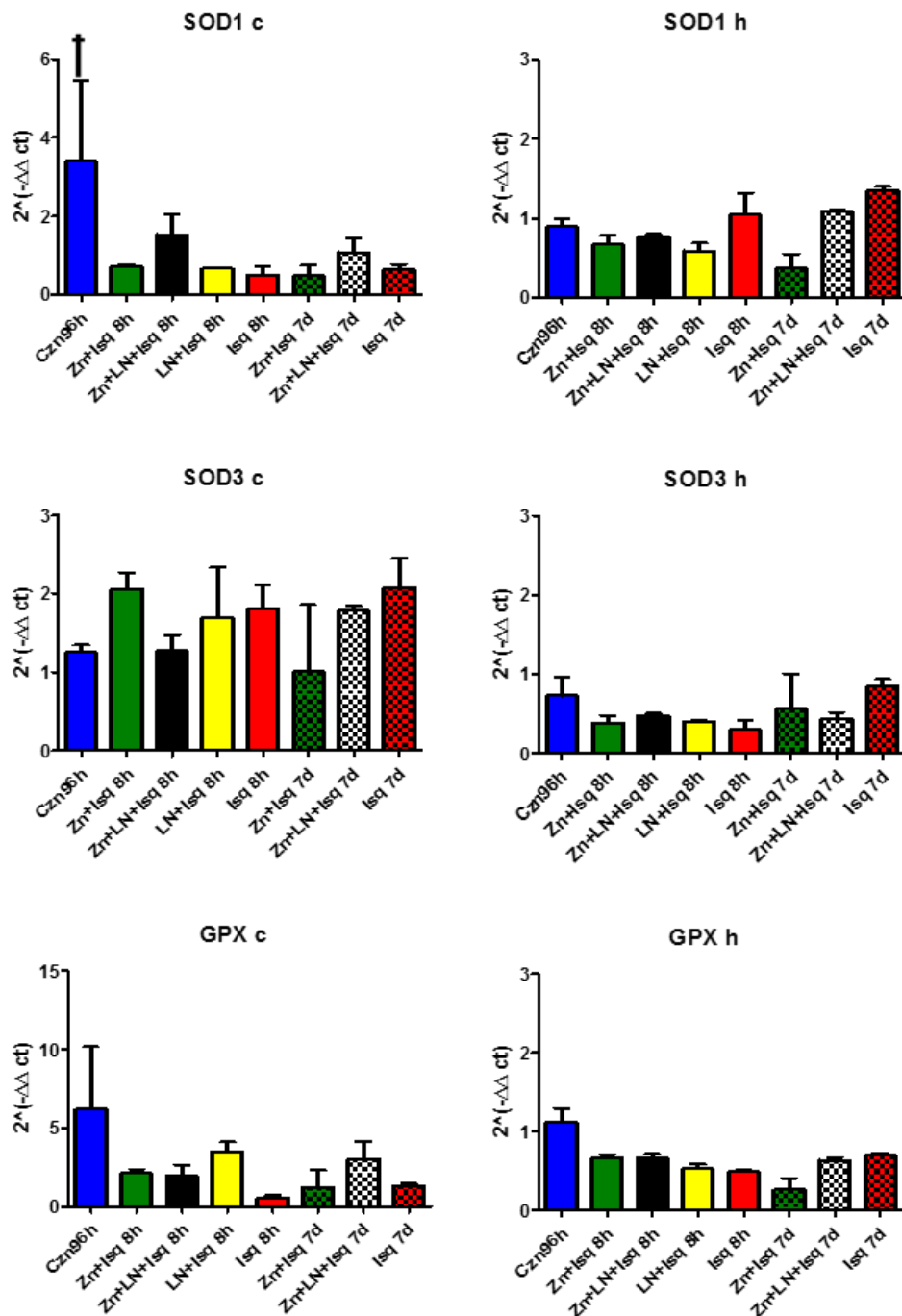


Figura 17. Evaluación de la transcripción de Sod1, 3 y GPx en los diferentes grupos, en corteza (c) e hipocampo (h). Se observa la evaluación de la transcripción por RT-qPCR. Promedio (±SEM) de 3 ratas. * p=0.05, Valores estadísticamente significativos analizados por ANOVA de una vía post-prueba con Dunnet.

La administración profiláctica de zinc promueve la activación de ERK y NFκB

Una vez que se determinó el estado de la célula se estudió la activación de las vías de señalización que determinen el destino final, ya sea la supervivencia o muerte; por otra parte, también se activa la respuesta inflamatoria aguda como un mecanismo de defensa ante el daño. Dentro de las principales vías de señalización que determinan estos procesos tras el daño isquémico están las vías de NFκB y ERK, las que además se sabe que están reguladas por el zinc.

En la Figura 18, se muestra la expresión de las formas activas de ERKp 1/2 y de IκBp en corteza cuantificada por el método de ELISA, donde se observa que existe una disminución en la expresión de ERKp 1/2 en los grupos Zn+LN+ISQ 8h (-26.60% ± 3.31%), Zn+LN+ISQ 7d (-23.99% ± 5.92%), LN+ISQ 8h (-23.82% ± 4.38%), ISQ 8h (-39.64% ± 0.74%) e ISQ 7d (-35.36% ± 1.38%), con esto se observa que el proceso isquémico disminuye la expresión de ERKp 1/2 mientras que la administración de zinc en presencia de óxido nítrico previene la disminución. El mantenimiento de los niveles de ERKp 1/2 por el zinc podrían estar asociados al desarrollo cerebral, promueven la proliferación de células progenitoras, la migración neuronal, la diferenciación y participan en las funciones conductuales [34].

En hipocampo, ERKp 1/2 se reguló negativamente en los grupos Zn+ISQ 7d (-14.35% ± 3.02%), LN+ISQ 8h (-35.00% ± 3.13%), ISQ 8h (-31.33% ± 0.97%) e ISQ 7d (-33.06% ± 0.32%).

La regulación negativa de NFκB y ERK inhibe la actividad transcripcional de NFκB, AP-1, y CREB, factores que favorecen la apoptosis celular tras procesos isquémicos [206], se ha reportado que la microglía libera TNF causando una disminución en la fosforilación de ERK para contribuir a la regeneración y neuroprotección en la fase aguda [207].

Al evaluar IκBp en corteza mostró una regulación negativa en los grupos CZn96h (-6.01% ± 1.16%), Zn+ISQ 8h (-5.29% ± 0.44%), Zn+ISQ 7d (-29.49% ± 1.39%), Zn+LN+ISQ 8h (-1.34% ± 1.16%), Zn+LN+ISQ 7d (-31.51% ± 0.77%), LN+ISQ 8h (-12.39% ± 0.35%), ISQ 8h (-12.57% ± 1.97%) e ISQ 7d (-26.66% ±

2.60%). Mientras que en hipocampo disminuyó los niveles de expresión en los grupos Zn+ISQ 7d (-34.71% ± 1.25%), Zn+LN+ISQ 8h (-12.31% ± 2.24%), Zn+LN+ISQ 7d (-36.65% ± 0.29%), ISQ 8h (-20.94% ± 1.20%) e ISQ 7d (-37.95% ± 3.19%).

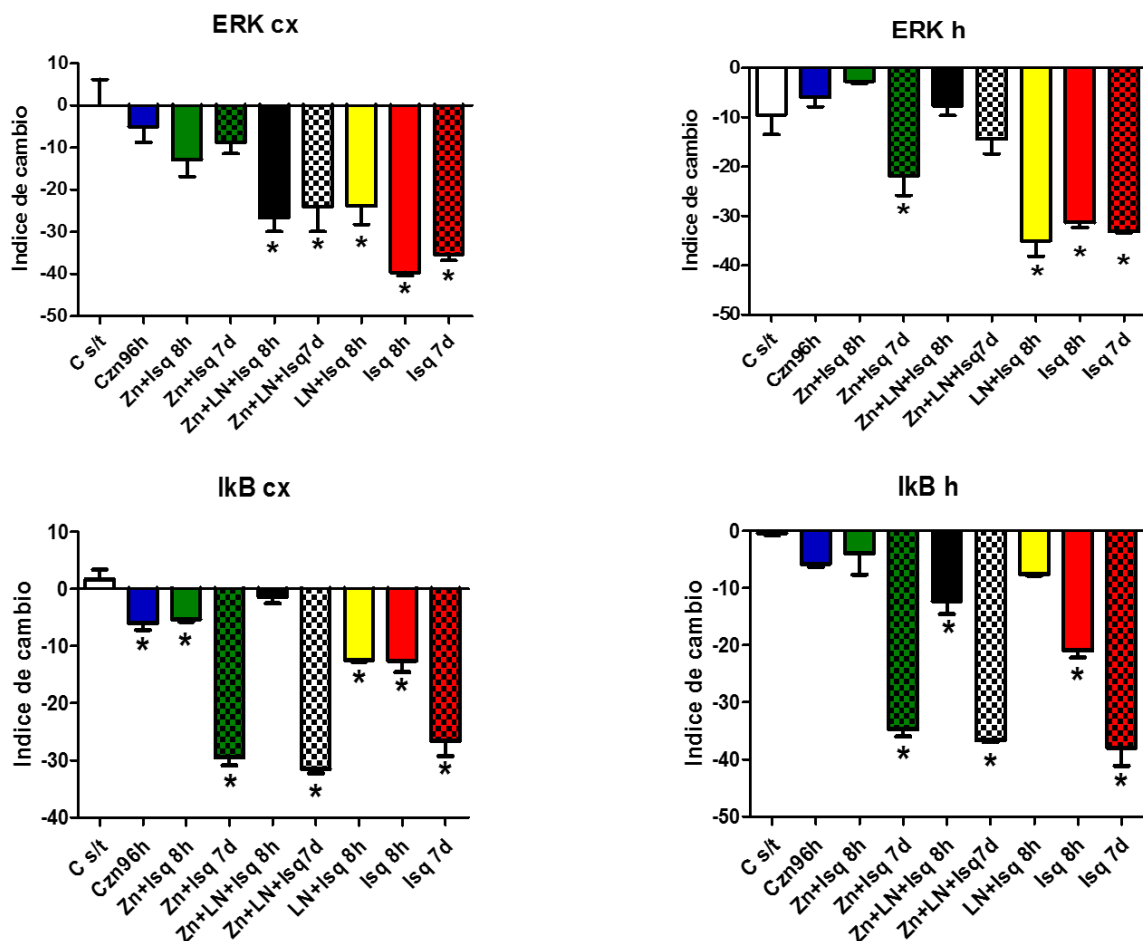


Figura 18. Evaluación de la expresión de ERKp e IκBp en los diferentes grupos, en corteza (c) e hipocampo (h). Se observan los valores proteicos mediante el ensayo de ELISA. Promedio (±SEM) de 3 ratas. * p=0.05, Valores estadísticamente significativos analizados por ANOVA de una vía post-prueba con Dunnet.

En la Figura 19, se muestra la evaluación de la transcripción de NFκB que mostró una regulación positiva en el grupo Zn+Isq 8h (4.067 % ± 1.294 %). Los niveles proteicos de NFκB en corteza mostraron una regulación positiva en los grupos Zn+ISQ 8h (84.85% ± 35.61%) e ISQ 7d (66.67% ± 12.88%) y en

hipocampo en los grupos CZn96h ($40.11\% \pm 18.13\%$), Zn+ISQ 8h ($15.38\% \pm 1.42\%$), Zn+ISQ 7d ($45.67\% \pm 6.79\%$), Zn+LN+ISQ7d ($30.22\% \pm 8.08\%$), LN+ISQ8h ($46.70\% \pm 5.14\%$) e ISQ 7d ($31.46\% \pm 2.06\%$).

La disminución de I κ B estaría favoreciendo la activación de NF κ B, I κ B fosforilado se activa y libera NF κ B para translocarse al núcleo y llevar a cabo su actividad, de manera contraria, la fosforilación de I κ B causa que este se transloque al proteosoma para ser degradado. La activación de NF κ B está involucrada en varios procesos fisiológicos que incluyen supervivencia, proliferación y activación celular, la activación de NF κ B es a través de Fas, favorecería la muerte celular y la inflamación por ser factor de transcripción para citocinas y quimiocinas en procesos isquémicos, sin embargo, la activación de NF κ B también está asociada a la plasticidad neuronal [208].

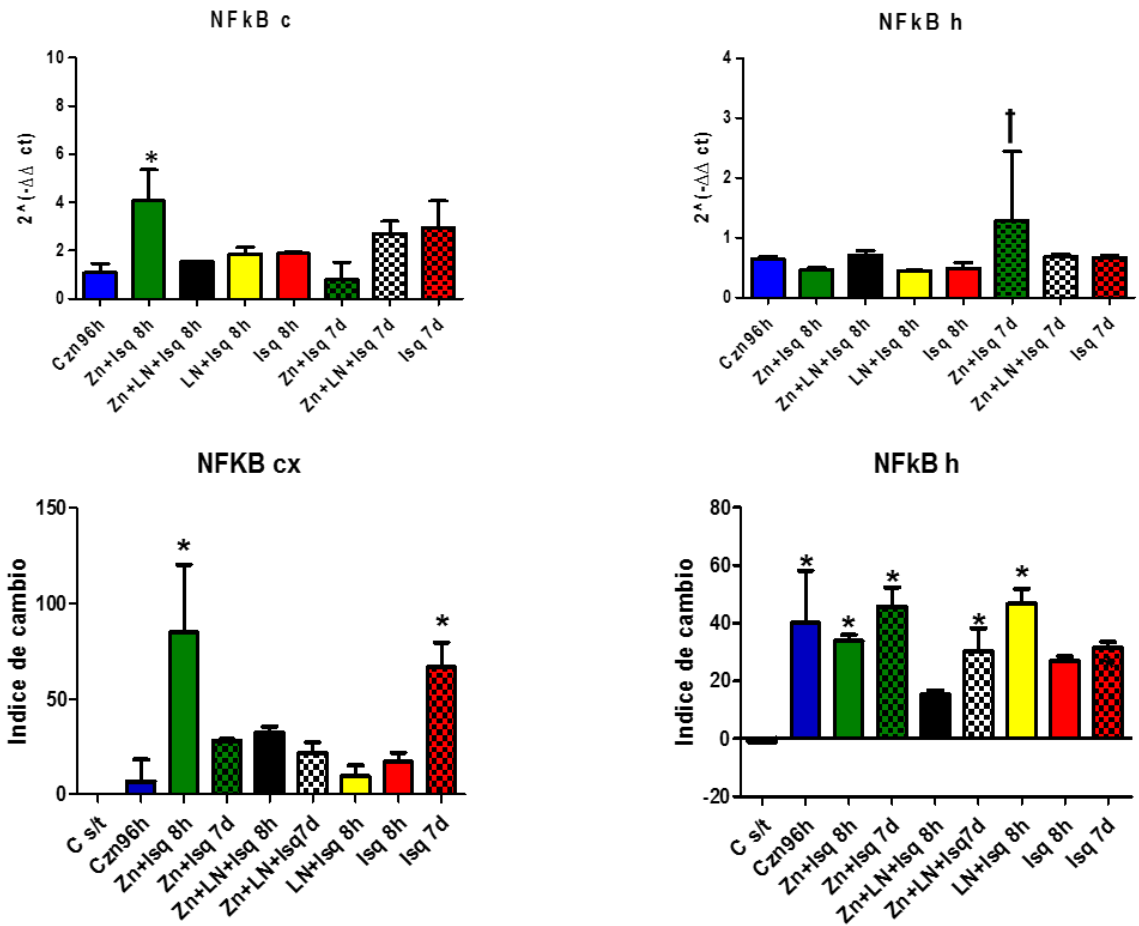


Figura 19. Evaluación de la expresión de NFκB en los diferentes grupos, en corteza (c) e hipocampo (h). Se observa la evaluación de la transcripción por RT-qPCR y los valores proteicos mediante el ensayo de ELISA. Promedio (±SEM) de 3 ratas. * p=0.05, Valores estadísticamente significativos analizados por ANOVA de una vía post-prueba con Dunnet

La administración profiláctica de zinc disminuye el proceso inflamatorio causado por la isquemia

Se realizó la evaluación de la transcripción para la quimiocina CCL2 y su receptor CCR2 en corteza cerebral e hipocampo por RT qPCR, aunque ya las habíamos reportado en punto final quisimos dar un análisis cuantitativo además analizar otras quimiocinas que participan en la determinación de si se está llevando a cabo el proceso inflamatorio o regenerativo, en la Figura 20, se

puede observar que por parte de CCL2 existe una regulación positiva en la corteza a las 8 h después del daño isquémico ($2.86\% \pm 0.39\%$).

Por parte del receptor CCR2 en corteza se encontró una regulación negativa en aquellos grupos que habían recibido la administración subaguda de Zn, CZn96h ($0.54\% \pm 0.05\%$), Zn+Isq 8h ($0.49\% \pm 0.10\%$), ZnLNIsq8h ($0.52\% \pm 0.19\%$) Zn+Isq 7d ($0.45\% \pm 0.03\%$) Zn+LN+Isq 7d ($0.32\% \pm 0.06\%$). Se sabe que CCL2/CCR2 en los procesos isquémicos generan un efecto dual; por una parte, participan en la exacerbación del proceso inflamatorio, así como en la quimioatracción de monocitos y microglía al sitio de daño [209]. Sin embargo, también participa en la quimioatracción de células progenitoras neurales, induce la liberación de factores tróficos tras la activación de su receptor y en procesos isquémicos generan un pre-condicionamiento isquémico, el cual es uno de los mecanismos de neuroprotección que se activan tras procesos isquémico cerebrales [210].

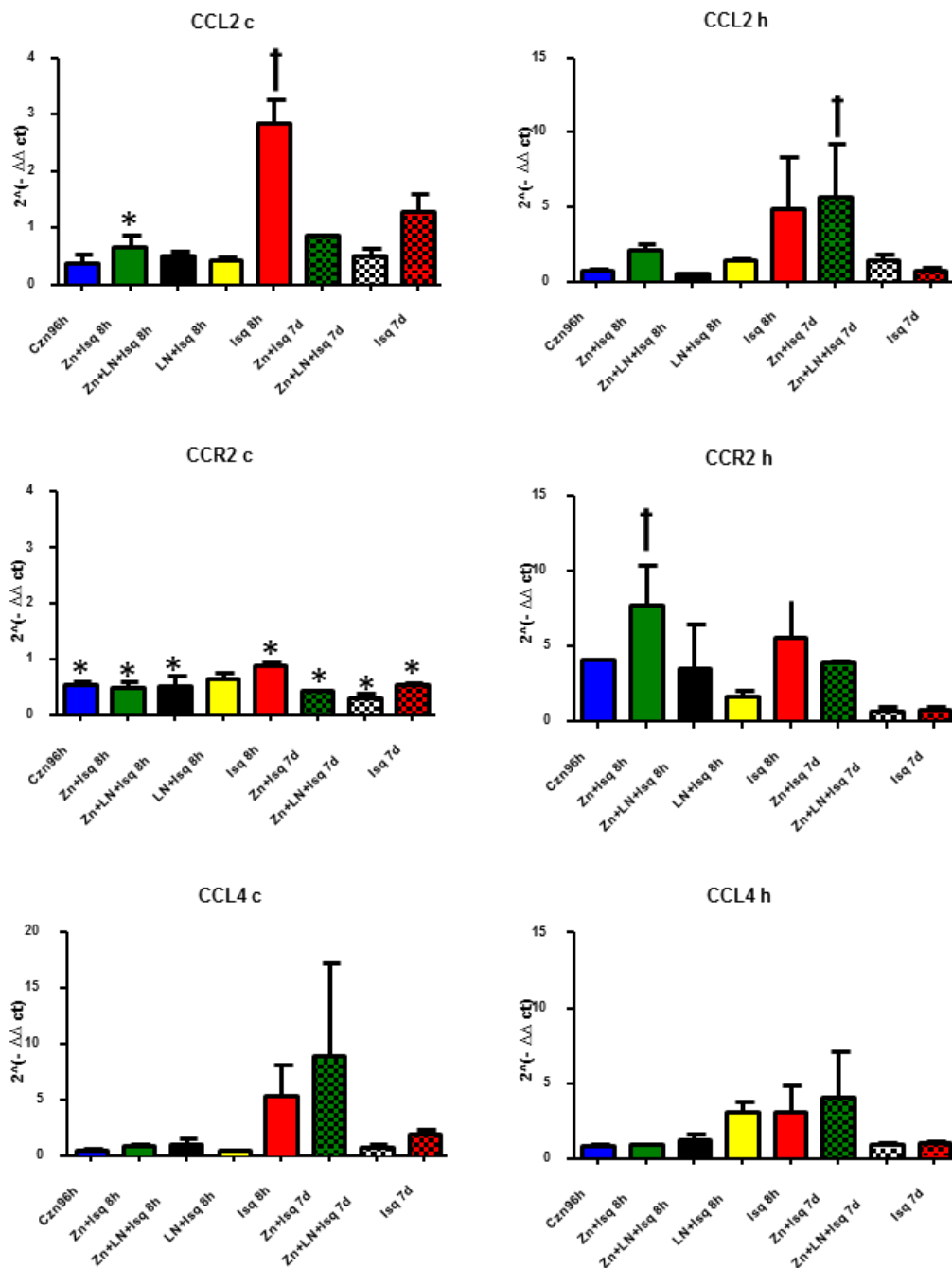


Figura 20. Evaluación de la Transcripción de CCL2/CCR2 y CCL4 en los diferentes grupos, en corteza (c) e hipocampo (h). Se observa la evaluación de la transcripción por RT-qPCR. Promedio (±SEM) de 3 ratas. * p=0.05, Valores estadísticamente significativos analizados por ANOVA de una vía post-prueba con Dunnet

En la Figura 21, se muestra la evaluación de la transcripción de CXCL13 y su Receptor CXCR5; por parte del ligando (CXCL13) en corteza se observó una regulación positiva en el grupo Isq 8h ($6.319 \% \pm 0.91\%$) y en el grupo Zn+LN+Isq 7d ($7.731 \% \pm 3.792 \%$). Al evaluar los niveles transcripcionales en hipocampo se observó una regulación positiva por parte del grupo Isq 7d ($4.187 \% \pm 0.314\%$) al compararlas con el control sin tratamiento, mientras que el receptor CXCR5 al evaluarlo en corteza se observa una regulación positiva por parte de los grupos LN+Isq 8h ($2.9\% \pm 0.87\%$) e Isq 7d ($4.31\% \pm 0.79 \%$). En hipocampo se observó una regulación negativa por parte del grupo ZnIsq 8h ($0.40 \% \pm 0.04\%$) y LN+Isq 8h ($0.42\% \pm 0.07\%$), mientras que en el grupo Isq 7d se observó una regulación positiva de ($1.64 \% \pm 0.21\%$). Se sabe que la quimiocina CXCL13 en procesos isquémicos participa en el proceso inflamatorio por la quimioatracción de leucocitos al sitio de daño ya que CXCR5 se encuentra en la membrana de estas células [211]; sin embargo, CXCR5 participa también en el proceso de neurogénesis [212], ya que CXCR5 en la SVZ del SNC es expresado por la glía radial, para poder dirigirse a través de la vía media rostral al bulbo olfatorio [212].

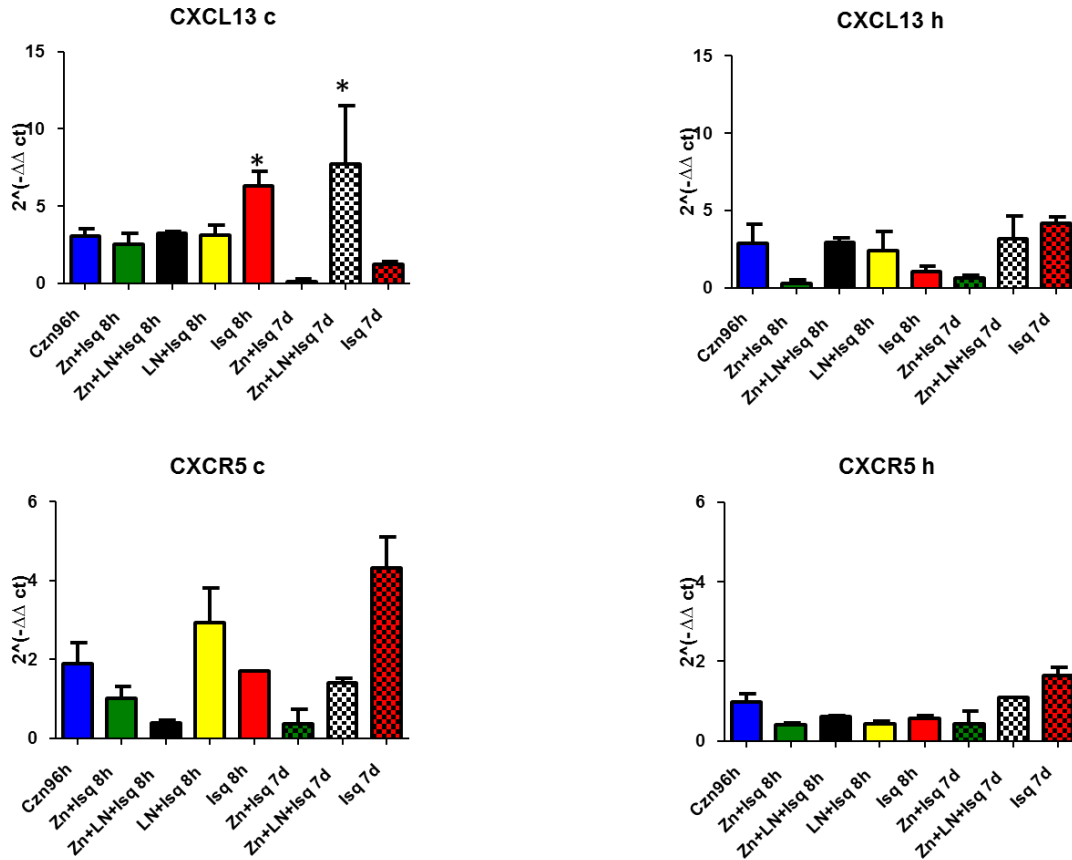


Figura 21. Evaluación de la Transcripción de CXCL13/CXCR5 en los diferentes grupos, en corteza (c) e hipocampo (h). Se observa la evaluación de la transcripción por RT-qPCR. Promedio (±SEM) de 3 ratas. * p=0.05, Valores estadísticamente significativos analizados por ANOVA de una vía post-prueba con Dunnet.

El proceso isquémico en la fase temprana y tardía causa una disminución de genes involucrados en el proceso de neurogénesis

La obliteración de la arteria carótida primitiva en la fase temprana (Figura 22), modificó pocos genes, los cuales participan en las siguientes funciones:

- 1) En el proceso de diferenciación: causó la regulación positiva de Hes1 (2.06, P = 0.02). En la interacción de proteína- proteína de la vía de señalización Notch solo Hes1, asociado a un efecto post-condicionante contribuye a la citoprotección en cardiomiocitos [206] sugiriendo que el sistema responde ante el daño isquémico.

2) En el proceso de apoptosis: Adora2a ($2.36 \pm \text{SEM}$, $P = 0.03$) y de Th (2.05 , $P = 0.06$), [213] Adora2a atenúa el daño isquémico post-reperfusión en el corazón [214].

3) En funciones sinápticas y Factores de Crecimiento: reguló negativamente Apoe (-1.41 , $P = 0.05$) y Bmp2 (-3.25 , $P = 0.001$). En el infarto hemorrágico de Apoe regulado negativamente, se debe a que VLDL y triglicéridos se encuentran asociados en la formación de ateromas cómo factor de riesgo para las enfermedades cerebrovasculares [215]. Sin embargo, la familia de las proteínas morfológicas de hueso (BMPs) afectan la proliferación y diferenciación de astrocitos. La expresión de BMP2 / 4 se ha demostrado que favorece río abajo la fosforilación del efector Smad1 y la expresión de la proteína Hes1 inducida por la ruta de la señal de muesca en neuroesferas en cultivo de SVZ. Noggin antagonista de BMP bloquea la fosforilación de Smad1 y la expresión de Hes1, así reduce el porcentaje de células progenitoras de astrocitos en la SVZ necesarios para la recuperación tisular [216].

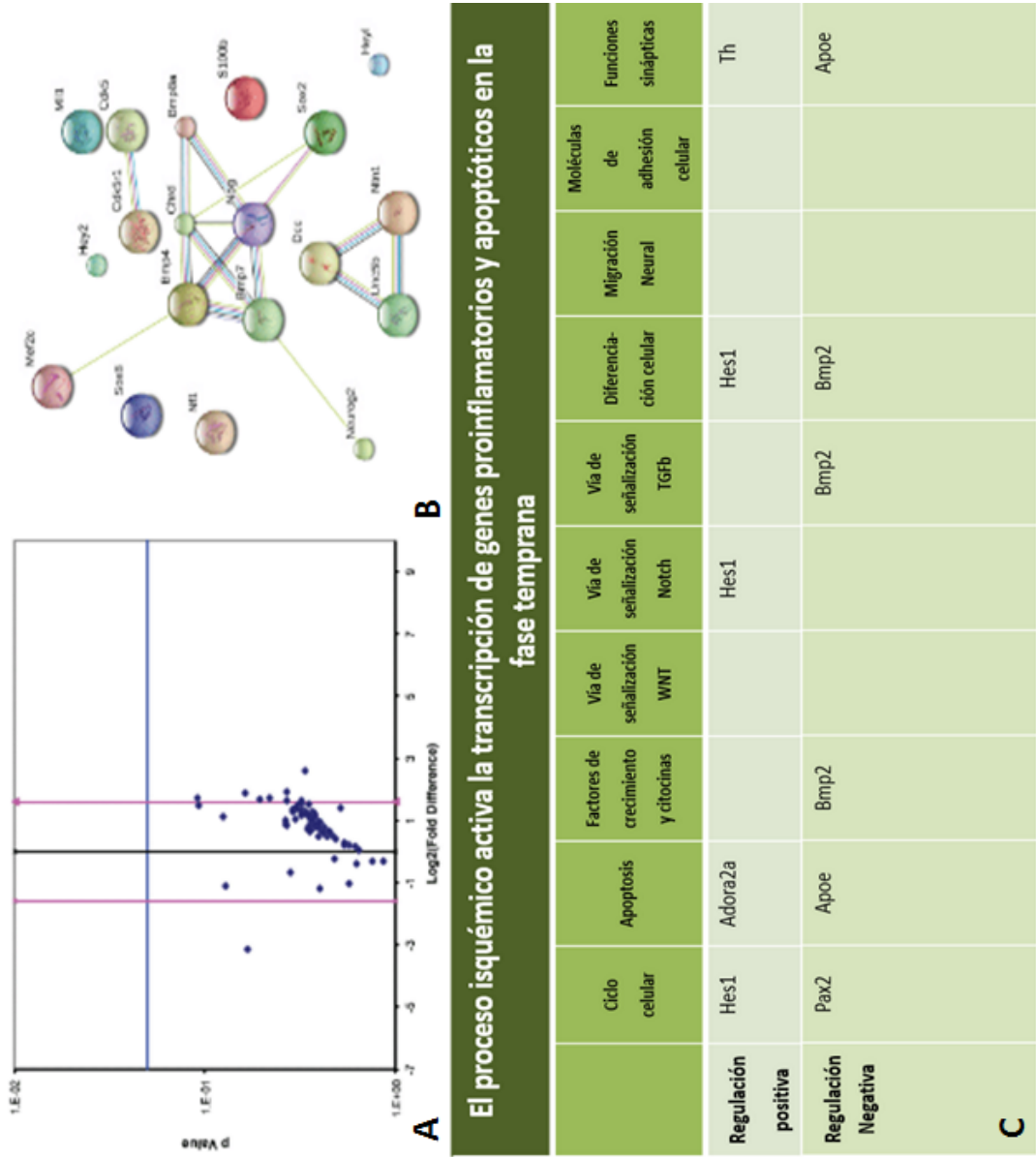


Figura 22. BQ 8h A) Grafico de tipo vulcano para el transcriptoma neurogénico. B) Análisis de interacción proteina-proteina String para los genes con cambios estadísticamente significativos. C). Genes regulados positivamente y negativamente con cambios estadísticamente significativos acomodados por función

Sin embargo, en la fase tardía del proceso hipóxico isquémico cerebral varios genes fueron regulados negativamente (Figura 23) los cuales participan en las siguientes funciones;

1) En el ciclo celular: Ep300 (E1A binding protein p300, -2,67, P = 0.0002), su función como histona acetiltransferasa regula el remodelamiento de la cromatina, y participa en los procesos de proliferación y diferenciación, su disminución sugiere que estos procesos se vean disminuidos en la fase tardía del proceso hipóxico isquémico cerebral cuando se declara la muerte celular, en el análisis de interacción proteica éste gen es el iniciador en la interacción con los demás genes, lo cual explica entonces porque estos se ven disminuidos. Se ha demostrado que la acumulación en el núcleo de Appb1 (-10.02, P = 0.0004), y Hdac4 (-4.03, P = 0.0245) causa la muerte neuronal después del infarto denotando un efecto dañino [217], la regulación negativa de Mdk (-1.84, P = 0.0136), evitaría su efecto protector tras la reperfusión del daño isquémico [218], Kmt2a (-3.40, P = 0.0009), regula a NOTCH1 y NOTCH3, sugiriendo la disminución de la proliferación celular [219], Ndn (-6.22, P = 0.039), controla la señalización de EGFR involucrado en la diferenciación de astrocitos de células precursoras en corteza [220], Pard3 (-2.61, P = 0.038) es un regulador negativo de la diferenciación celular, se une en el extremo N-terminal de los microtúbulos promoviendo la estabilidad celular [221].

2) En apoptosis: Apoe (-9.52, P = 0.0001) participa en el proceso inflamatorio [222], la regulación negativa de Notch2 (-5.50, P = 0.0027) en procesos neurotóxicos denota un efecto protector, sin embargo, también promueve la proliferación y diferenciación de neuroblastos [223], se ha reportado que la disminución de Rtn4 (-2.05, P = 0.0002), contribuye a la regeneración por activación de MMP en la zona periférica a la lesión [224], la regulación negativa de Bcl2 (-1.77, P = 0.0066), afecta la neurogénesis, al igual que Bmp4 (-4.68, P = 0.0206), a través de la vía de señalización Wnt/ β -catenina [225].

3) La expresión de Factores de crecimiento y citocinas: la regulación negativa de Artn (-3,00, P = 0.0067), y Egf (-3.32, P = 0.0341) afectan la supervivencia neuronal [226], Gpi es una isomerasa 6-glucosa-fosfato que participa como

factor neurotrófico, promueve supervivencia en neuronas motoras esqueléticas y sensoriales (Gen card) (-9.20, $P = 0.0024$), Ndp (-11.09, $P = 0.015$), Nrg1 (-3.96, $P = 0.0011$) y Vegfa (-1.45, $P = 0.0299$).

4) La vía de señalización de Wnt: la regulación negativa en Ssh (-2.13, $P = 0.0002$) y Ndp (-11.09, $P = 0.015$) disminuyen las células positivas a doblecortina [227].

5) La regulación negativa en la vía de señalización de Notch ha sido asociado con un incremento de neuronas por su maduración, sin embargo también está asociado con el proceso proliferación celular [228]: App (-3.40, $P = 0.0276$), Dll1 (-46.94, $P = 0.0012$), Heyl (-2.73, $P = 0.0297$), Notch2 (-5.50, $P = 0.0027$) y Nrg1 (-3.96, $P = 0.0011$).

6) la regulación negativa de la vía de señalización de TGF β : Tgfb1 (-2.37, $P = 0.0046$) afecta la neurogénesis en la zona subventricular [229] y la diferenciación de oligodendrocitos prevaleciendo la astroglia a través de la familia de Bmp, Bmp4 (-4.68, $P = 0.0206$), Bmp8a (-1.27, $P = 0.0406$), Tgfb1 ($X \pm SEM$, $P = 0.05$) [230].

7) En diferenciación celular: Bmp4 (-4.68, $P = 0.0206$) está involucrada en la diferenciación de astrocitos, Cdk5r1 (-6.89, $P = 0.0063$), está involucrado en la muerte celular por lo que su inhibición podría ser benéfica tras el proceso isquémico [231], Cdk5rap2 (-3.31, $P = 0.001$) es necesaria para proliferación celular y el desarrollo de la corteza cerebral de mamíferos [232], la regulación negativa de Chat (-1.36, $P = 0.001$) sugiere que se afecta la recuperación post infarto, ya que se disminuirían los niveles de acetilcolina necesaria para que se lleve a cabo dicho proceso [233], la regulación negativa de Mef2c (-3.40, $P = 0.0081$), contribuye a la apoptosis, la regulación negativa Nog (-8.11, $P = 0.0019$), disminuye BMP que inhibe la expresión de Fgf8 activador de la vía Wnt, la regulación negativa de Nrcam (-2.17, $P = 0.0061$) afecta el crecimiento axonal y remodelamiento de espinas dendritas [234], la regulación negativa de Olig2 (-11.8, $P = 0.0097$) afecta la maduración de oligodendrocitos, sin embargo podría favorecer la formación de neuronas inmaduras [235], la regulación negativa de Pafah1b1 (-2.24, $P = 0.0355$) afecta la migración de

neuronas dentro de la zona marginal [236] , Pou4f1 (-6.27, P = 0.0001), la regulación negativa de Sox2 (-8.63, P = 0.0018) afecta la diferenciación de neuroblastos, ya que las células positivas a Sox2 adquieren fenotipo neuronal, durante un infarto el incremento de células Sox2+ S100- afectan la diferenciación glial [237]. Rtn4 (-2.05, P = 0.0002).

8) A las moléculas de adhesión celular: La regulación negativa de Efnb1 (-46.94, P = 0.0012) afecta la adhesión apical de progenitores neurales para el desarrollo del neuroepitelio, además que se encuentra en las espinas dendríticas de la corteza, teniendo efecto en la neuroplasticidad [238], la regulación negativa de Nrp1 (-2.22, P = 0.0061) afectaría la formación de proyecciones axónicas en el cerebro y vasos sanguíneos [239], la regulación negativa de Nrp2 (-3.69, P = 0.0417) afecta el correcto posicionamiento de neuronas durante la neurogénesis del hipocampo [240], la regulación negativa de Rac1 (-1.92, P = 0.0143) sugiere un efecto protector, ya que participa en la cascada patológica isquémica [241], sin embargo, se ha visto que también participa en el desarrollo neuronal [242], la regulación negativa de Slit2 (-5.97, P = 0.0339) o de su receptor Robo afecta la formación de la cicatrización astrogliar y del remodelamiento cerebral tras un proceso isquémico focal de tipo transitorio [243], Tnr (-1.94, P = 0.0051) es expresado en astrocitos y contribuye a la homeostasis de glutamato, por lo que estaría exacerbando la exitotoxicidad post isquemia [244].

9) Con respecto a las funciones sinápticas: La regulación negativa de receptores muscarínicos como Chrm2 (-2.20, P = 0.0132) y Chat (-1.36, P = 0.000), afectan el aprendizaje y la memoria [245], así como la vía de señalización AKT/CREB [246], la regulación negativa de Creb1 (-4.69, P = 0.03), Dlg4(PSD95) (-9.02, P = 0.0138) asociados a la sinapsis, al receptor NMDA y a los canales de potasio su disminución se relaciona con protección después de un infarto [246], la regulación negativa de Grin1 (-4.58, P = 0.0214) una subunidad del receptor de NMDA [247], afectaría su actividad, Th (-1.58, P = 0.0053), la regulación negativa de Pou4f1 (-6.27, P = 0.0001) afectaría la neurogénesis, debido a que es importante en este proceso, actúa como factor

de transcripción, la regulación negativa de *ErbB2* (-2.20, $P = 0.0134$) afectaría la neuroprotección y reparación tras el infarto [248], la regulación negativa de *Map2* (-2.63, $P = 0.0114$), un marcador de neuronas piramidales maduras sugiere una disminución de estas células a causa de la isquemia cerebral [249], *Pard3* (-2.61, $P = 0.0038$), la regulación negativa de *S100b* (-2.11, $P = 0.0012$) podría ser protectora, ya que incrementa durante enfermedades neurológicas debido a la activación astrogliar [250], sin embargo, también tiene un efecto como una proteína de unión a calcio, participa en la progresión del ciclo celular y diferenciación, actúa en la extensión de neuritas, astrocitosis y proliferación axonal e inhibe el ensamble de microtúbulos.

Los genes que se regularon positivamente por el proceso hipóxico isquémico cerebral fueron; en apoptosis *Pax2* (1.47, $P = 0.0487$) y *Pax3* (16.81, $P = 0.0003$), de los factores de crecimiento y citocinas: *Gdnf* (2.51, $P = 0.0123$), el cual tiene un efecto protector en neuronas dopaminérgicas [251], la regulación positiva de *S100a6* (1.50, $P = 0.0016$) regula tanto la degeneración neuronal así como en la regeneración, puesto que mejora los procesos cognitivos [252], y *Bmp2* (2.68, $P = 0.000$) promueve la supervivencia neuronal, sin embargo este proceso es mediado por BDNF que se encuentra disminuido [253] sugiriendo que se favorece la diferenciación glial [254]. De la vía de señalización de Notch, *Hes1* (2.24, $P = 0.0012$) está involucrado en la angiogénesis dentro de la vía de señalización Notch-Dll4 [255]. *Pax3* (16.81, $P = 0.0003$) promueve la inhibición de la apoptosis [256], los genes que participan en la migración celular fueron *Dcx* (1.49, $P = 0.0378$) y *Drd2* (2.26, $P = 0.0013$).

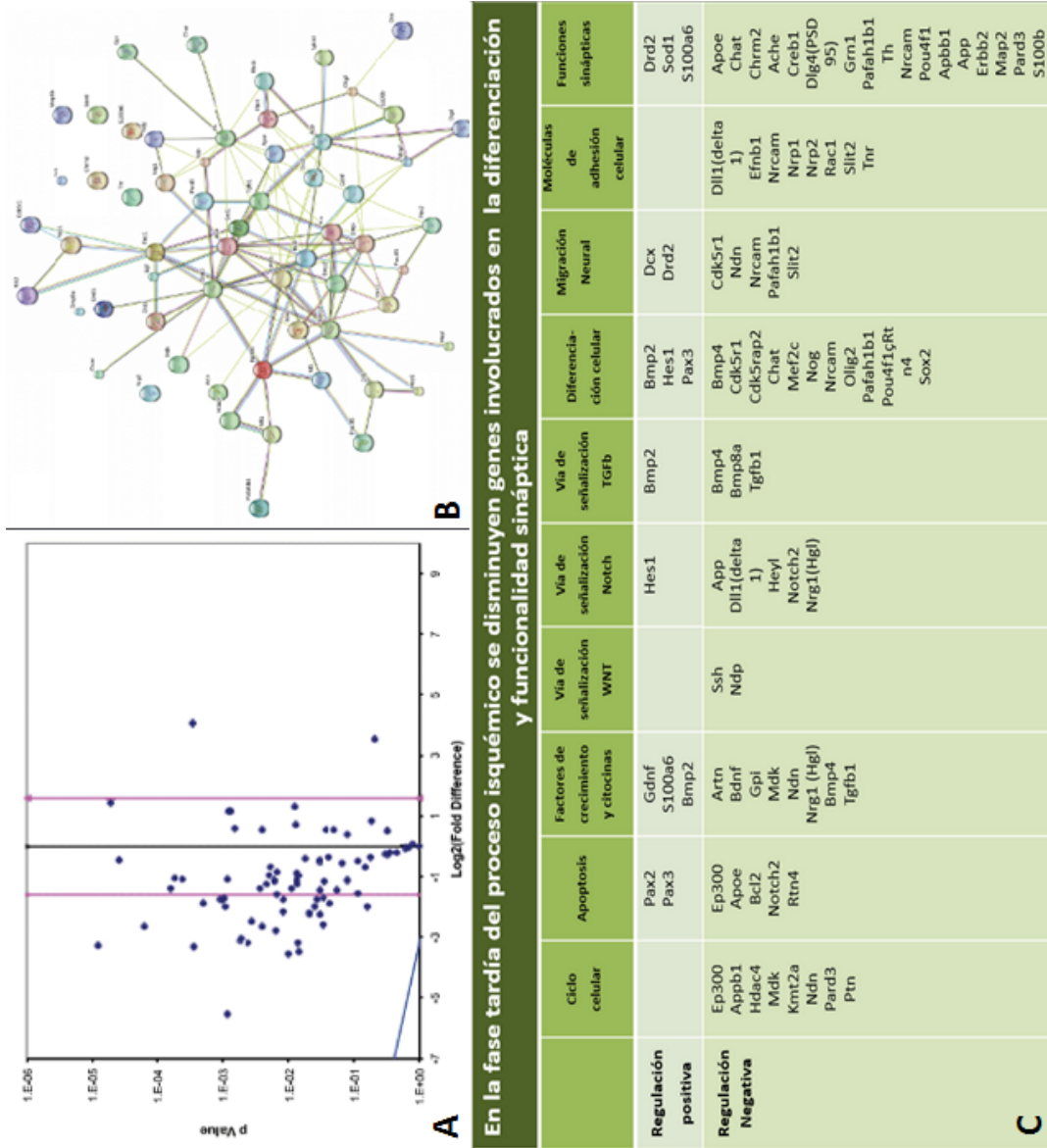


Figura 23. 5Q. 7d A) Grafico de tipo vulcano para el transcriptoma neurogénico. B) Análisis de interacción proteína-proteína String para los genes con cambios estadísticamente significativos. C). Genes regulados positivamente y negativamente con cambios estadísticamente significativos acomodados por función

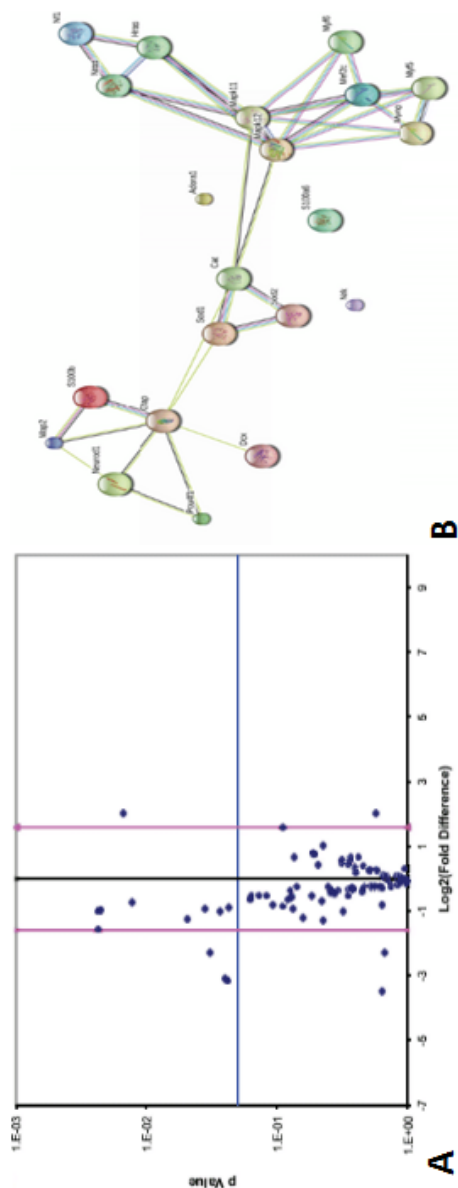
La administración profiláctica de zinc regula negativamente genes que participan en la funcionalidad sináptica, proliferación y migración

Estudios previos en ratones han demostrado que la suplementación de Zn a dosis bajas (15 ppm) revierte la reducción de marcadores sinápticos y de neuroblastos causado por la obesidad, pero a dosis altas (60 ppm) la suplementación con Zn exacerba la reducción de dichos marcadores [257], a dosis bajas aumenta los niveles de BDNF [258] incrementando la proliferación de precursores neuronales en el hipocampo de rata después de una lesión cerebral traumática [40].

La administración profiláctica subaguda de zinc (Figura 24) provocó la regulación negativa de genes que participan en las siguientes funciones:

1) Funcionalidad sináptica: como el gen que codifica para la proteína neurotrófica glial S100b (-1.64, $P = 0.01$) y S100a6 (-4.80, $P = 0.03$), que es liberada después de una lesión cerebral en ratas, lo que sugiere una disminución de la astrogliosis. S100b en concentraciones nanomolares o inferiores se asocia con la activación de la neurogénesis en el hipocampo y mejora la función cognitiva, la proliferación celular temprana en la SGZ, así como la supervivencia celular y la migración a la GCL, además promueve la diferenciación neuronal [259]. Sin embargo, la regulación negativa de S100b evita la disrupción del potencial de membrana mitocondrial y por lo tanto del estado redox de la célula, evitando un fenotipo progenitor neuronal gliocéntrico, asociado a HSA21 y a los niveles de la proteína precursora amiloide (APP) [260]. Mientras que, S100a6 es un marcador específico de células madre neurales y precursores de astrocitos.

2) Diferenciación y Migración: La administración subaguda de zinc causó la regulación negativa de Mef2c (-2.38, $P = 0.02$), Neurod1 (-1.96, $P = 0.00$), Pou4f1 (-8.49, $P = 0.04$), no solo sugerirían una disminución en la diferenciación de neuroblastos sino que se vería disminuida la migración ordenada y dirigida. Nrcam (-2.96, $P = 0.00$), Dcx (-2.00, $P = 0.04$), Map2 (-1.84, $P = 0.04$), Ndp (-8.90, $P = 0.04$).



A

La administración subaguda de zinc genera el preconditionamiento en la fase temprana del proceso isquémico por la inducción de Adora1

B

| | Ciclo celular | Apoptosis | Factores de crecimiento y citocinas | Vía de señalización WNT | Vía de señalización Notch | Vía de señalización TGFb | Diferenciación celular | Migración Neural | Moléculas de adhesión celular | Funciones sinápticas |
|----------------------------|---------------|-----------|-------------------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|------------------|-------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Regulación positiva | | Adora1 | | | | | | | | Adora1 |
| Regulación Negativa | | S100b | Ndp S100a6 | Ndp | | | Mef2c Neurod1 Pou4f1 | Dxc Nrcam | Nrcam | Nf1 S100b Sod1 Nrcam Pou4f1 Dxc Map2 S100a6 |

C

Figura 24. Zn96h A) Grafico de tipo vulcano para el transcriptoma neurogénico. B) Análisis de interacción proteína-proteína String para los genes con cambios estadísticamente significativos. C). Genes regulados positivamente y negativamente con cambios estadísticamente significativos acomodados por función

La administración profiláctica subaguda de zinc en la fase temprana del proceso hipóxico isquémico cerebral promueve la transcripción de genes involucrados en la neurogénesis

Dentro de los genes que fueron regulados positivamente por el proceso isquémico en la fase temprana en ratas tratadas con zinc se encuentran los que participan en las siguientes funciones:

- 1) Precondicionamiento: Adora2a (2.32, $P = 0.01$) además de Adora1 (2.61, $P = 0.07$) la cual había sido regulada positivamente únicamente por la administración subaguda de zinc, Adora1 regula la respuesta inmunológica a través de la expresión de IL-10 después de un proceso isquémico [261]. Adora2a tiene un efecto protector en la isquemia al corazón [214], disminuyendo la producción de TNF.
- 2) Migración neuronal: como Drd2 (2.32, $P = 0.00$). Aunque en esta fase, se encuentra la regulación negativa de genes de diferenciación celular como Nog (-1.98, $P = 0.04$), Nrcam (-1.82, $P = 0.04$), Pou4f1 (-22.44, $P = 0.00$) y Nrg1 (-1.38, $P = 0.05$). Así como de funcionalidad sináptica; Chrm2 (-1.95, $P = 0.02$) y Th (-1.70, $P = 0.01$). La regulación de Dvl3 podría tener un efecto protector ya que la remoción de agregados de DVL3 promueven la activación de la vía de Wnt que participa en la proliferación celular [262].
- 3) Moléculas de adhesión celular: La administración subaguda profiláctica de zinc en la fase temprana del proceso isquémico cerebral causó la regulación negativa de Nrcam (-1.85, $p = 0.04$), que en procesos isquémicos se ha relacionado con el remodelamiento del hipocampo [263].

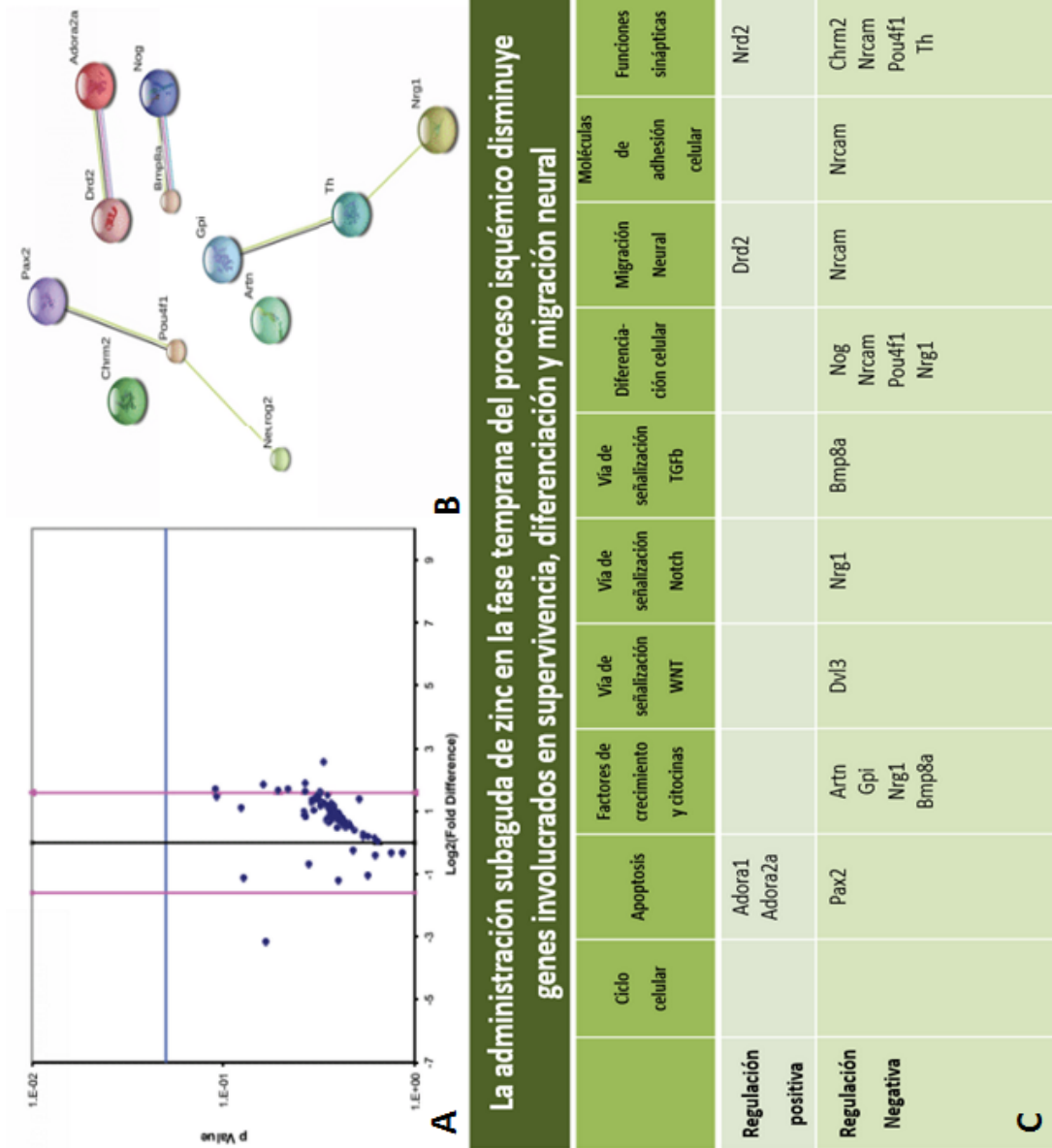


Figura 25. Zn+HSQ 8h A) Grafico de tipo vulcano para el transcriptoma neurogénico. B) Análisis de interacción proteína-proteína String para los genes con cambios estadísticamente significativos. C). Genes regulados positivamente y negativamente con cambios estadísticamente significativos acomodados por función

La administración profiláctica de zinc promueve la transcripción de genes involucrados en la neurogénesis en la fase tardía del proceso hipóxico isquémico cerebral

Hemos utilizado el termino de pre-condicionamiento al referirnos a aquellos procesos que se encuentran activados por la administración subaguda de zinc antes del daño isquémico, sin embargo existen otros procesos cómo la expresión de genes que ocurre después del daño pero sólo en aquellas ratas que fueron tratadas con zinc con lo cual se observa que además existe un proceso de post-condicionamiento a través de la regulación positiva de genes implicados en las siguientes funciones:

1) Diferenciación celular: Bmp2 (5.2852, $P = 0.01$), Hes1 (1.1313, $P = 0.052$) y Pax3 (3.9793, $P = 0.038$). Bmp2 ha demostrado tener efectos neurotróficos en las neuronas DA del mesencéfalo, también las proteínas que codifican estos genes inducen crecimiento de neuritas, dependiente de la activación del receptor de BMP tipo I a través de la señalización Smad 1/5/8 canónica [264] y promueven la regulación positiva de marcadores de diferenciación neuronal como Dlx2, Brn3a y NeuroD6 [265]. La administración de zinc reguló positivamente Hes1, que está asociado con el aumento de células proliferativas, mientras que durante la diferenciación de células progenitoras neuronales, se ha reportado la regulación negativa de Hes1 en células progenitoras neurales isquémicas, que coincidió con un aumento significativo de la población neuronal [266, 267].

La señalización de Notch / Hes y miR-9 tienen interacciones de retroalimentación controlando la proliferación y diferenciación de células progenitoras neurales [268]. Hes1 es un objetivo clásico de la activación de la vía de señalización Notch, considerado cómo el maestro en la neurogénesis, Hes1 controla la diferenciación neuronal al inhibir la interacción lateral célula-célula [269]. La actividad de Hes1 es dinámica participando en funciones cómo el mantenimiento de progenitores neurales, proliferación, gliogénesis y depende de su expresión espacio temporal, oscilatoria versus sostenida [270].

La acetilación de Pax3 en los residuos de lisina C-terminal K437 y K475 regula a Hes1 y a Ngn2 [271], al unirse directamente a su promotor, promueve el mantenimiento de las células madre neurales y la neurogénesis [272]. Otro efecto de Pax3 es inducir la expresión de proteínas del citoesqueleto, regular negativamente la proteína ácida fibrilar glial durante la diferenciación de NSCs en astrocitos e inhibir la expresión de TUBB3, afectando con esto el crecimiento de neuritas [273].

Sin embargo, existen otros genes regulados negativamente que también están relacionados con la diferenciación celular, Mef2c (-2.38 $p=0.02$), neurod1 (-1.96 $p=0.04$), Pou4f1 (-8.49 $p=0.04$) y Nog (-1.42 $p=0.04$). Mef2c tiene un efecto crucial en la programación temprana de la diferenciación neuronal y la adecuada distribución de las capas de la neocorteza [274]. Mientras que, Neurod1 está reportado que contribuye a la reprogramación transcripcional que subyace a la diferenciación neuronal durante el desarrollo embrionario [275].

La administración profiláctica subaguda de zinc en la fase tardía de la hipoxia-isquemia causó la regulación positiva de genes relacionados con el ciclo celular, proliferación (señalización Shh y Tgfb1), diferenciación (señalización Notch y Bmp) y función sináptica en la fase tardía de la isquemia, sugiriendo un proceso de neurogénesis. También reguló positivamente el sustrato 1 de la toxina botulínica C3 relacionado con Ras, Rac1 (1.5173, $P=0.06$), miembro de la pequeña familia Rho de GTPasas, que participa en el desarrollo neuronal, incluida la migración celular, la morfogénesis neuronal, el crecimiento y orientación axonal, la formación de dendritas, la formación de sinapsis y la plasticidad [276-278]. Rac1 se encuentra río abajo tras la activación del receptor NMDA y del receptor TrkB [279] promoviendo la neurogénesis inducida por el aprendizaje [280]. Rac1 promueve la proliferación de células progenitoras a través de c-Jun-AP-1 activo y pCREB.

2) Factores de crecimiento: TGFb1 (2.7824, $P=0.06$) y BDNF (3.394, $P=0.06$) [280]. TGFb1 induce a los progenitores neurales a salir del ciclo celular, inhibiendo la proliferación de progenitores en el hipocampo adulto [281], pero promueve un aumento de células BrdU + y células Dcx + después del accidente cerebrovascular, mostrando neuroprotección, neurogénesis en la SVZ y la

recuperación funcional del cerebro de ratón adulto [229] y desencadenando la inactividad de las células madre, como lo sugiere la presencia de pSmad2 en células Sox2 positivas / GFAP positivas en ratas [281]. Aunque, TGFb1 también se ha encontrado que perjudica el aprendizaje dependiente del hipocampo [281], encontramos que la administración suabaguda de zinc mejora el aprendizaje y la memoria aun despues del daño ocasionado por le proceso isquémico [282]. Por otro lado, BDNF promueve la proliferación de células NP Dcx + y la diferenciación a células Dcx / NeuN + y generando finalmente neuronas maduras NeuN [280].

3) Factores de transcripción: Que están regulados positivamente por la administración profiláctica subaguda de zinc en la fase tardia de la hipoxia-isquemia son Stat3 (1.7785, P =0.05) y Pax6 (1.7997, P =0.05), Stat3 participa en la determinación del destino de las células madre neurales [283]. La transcripción de Stat3 puede iniciarse mediante citocinas (IFN, IL-5, IL-6), factores de crecimiento (EGF, HGF, LIF) y BMP2 [284]. La regulación previa de STAT3 conduce a la activación transcripcional de genes específicos como Bcl2 (1.4754, P =0.01), que está asociada con la astrogliogénesis [283], y esta indirectamente relacionada con la supervivencia neuronal [285]. STAT3 interactúa con la vía Notch y las vías NFkB [283, 286]. Además, la ruta de STAT3 es activada a través de EPO también mantiene la expresión de Bcl-2, que se correlaciona con la supervivencia celular después de la hipoxia / isquemia [285]. Pax6 también está relacionado con la proliferación celular de células madre neurales tras la lesión [287, 288]. Sin embargo, Pax6 se asocia con la diferenciación neurogénica (NeuroD), la expresión secuencialmente es Pax6, Ngn2, Trb2, NeuroD, Trb1 [289]. La regulación positiva de Bcl2 también promueve el mecanismo de supervivencia [290], disminuyendo la muerte celular como se ha informado anteriormente, Bcl2 promueve la generación de células neuronales de una manera mas efectiva [291].

De la misma manera regulados positivamente Bmp2 (5.2852, P =0.01) y Bmp4 (2.6459, P =0.05). La familia de proteínas BMP está reportado que regulan el destino de las NSC tanto en el cerebro en desarrollo como en el cerebro adulto [292]. En el hipocampo adulto BMP4 es el miembro primario de la familia BMP y noggin es su principal inhibidor [293, 294], promoviendo la inactividad NSC / NPC

del hipocampo. Sin embargo, la regulación positiva de Wnt3, BMP4 y ciclopamina promueve la diferenciación cortical [295]. La regulación positiva de Sox2 (2.688, $P = 0.01$) reprime el proceso de diferenciación y es necesario en las madre tanto en el SNC en desarrollo como en el SNC adulto [296-298], pero también actúa como activador transcripcional [299]. La expresión de Sox2 media la desdiferenciación de oligodendrocitos maduros [300]. Mientras que la regulación positiva de Sox8 (1.5542, $P = 0.05$) regula la función melanogénica, neurogénica y condrogénica junto con Sox9 y Sox10, en modelos murinos Sox8 puede reemplazar a algunos factores neurogénicos y gliales (sensoriales y simpáticos) [301]. Pou3f3 (1.5891, $P = 0.07$) regulada positivamente tiene como gen objetivo Shh [302, 303]. Pou3fs suprime al efector Hes5 de la vía de Notch y promueve la expresión de factores de transcripción pro-neuronales como Tbr2 y Tbr1 en la corteza cerebral [304]. Sox2 activa la vía Shh [289, 305]. La regulación positiva de la señalización favorece la autorrenovación, proliferación y migración de las NSC [306], la administración de agonistas de la vía de hedgehog incrementa la supervivencia de las NSCs en el SNC adulto tanto en SVZ como en SGZ, favoreciendo el proceso de angiogénesis y mejorando la recuperación funcional a largo plazo en ratones tras el accidente cerebrovascular [306]. Hes1 y Shh se incrementaron en la SVZ a las 4 y 24 h después de un proceso isquémico cerebral focal [228], la activación de Shh promueve el crecimiento de neuritas en las neuronas corticales bajo estrés oxidativo [307]. Shh puede estar asociado con el efecto antioxidante observado en estudios previos [29], debido a que reduce la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), y aumenta la actividad de SOD [307].

3) Vía de señalización Notch: La administración profiláctica subaguda de zinc en la fase tardía de la hipoxia-isquemia causó la regulación positiva de Notch1 (2.6039, $P = 0.06$) y Notch2 (1.5019, $P = 0.02$), implicados en la neurogénesis adulta tanto en la SVZ [308, 309] como la SGZ [310, 311] y la integración de neuronas nuevas [312] favoreciendo la memoria espacial [313]. Notch1 y Notch2 se incrementan tras el proceso de isquemia [311]. Aunque, Notch tiene un efecto dual en la isquemia, participa tanto en el proceso apoptótico como en la angiogénesis [311] o en la neurogénesis de la SVZ del cerebro de rata normal e isquémico [228]. Encontramos que el zinc disminuyó la muerte celular [282]. Notch1 promueve la

angiogénesis para restablecer el flujo de sangre en el cerebro después de una obstrucción [314].

La administración profiláctica subaguda de zinc en la fase tardía de la hipoxia-isquemia causó la regulación positiva de Dll1 (4.4679, $P = 0.01$) en la fase tardía de la isquemia, ligando del receptor Notch1. La señalización de Dll1 es necesaria para regular la neurogénesis [315]. Dll1 y Hes5 son los principales mediadores río arriba y río abajo, respectivamente, de la señalización Notch en el mesencéfalo ventral en desarrollo [316].

4) Funciones Sinápticas: Otro gen regulado positivamente fue *Apbb1* (1.8984, $P = 0.07$) el cual promueve el crecimiento de neuritas mediante la señalización ARF6-Rac, neurogénesis, migración y el correcto posicionamiento neuronal, formación de sinapsis, plasticidad sináptica, y aprendizaje y memoria [317].

La regulación positiva de *Adora2a*, altamente expresada en el cuerpo estriado del SNC adulto, está asociada a neuritogénesis y proliferación [318]. La activación de A2A conduce a la regulación positiva de la expresión de VEGF. *Ndn* (1.8455, $P = 0.07$) facilita la salida del ciclo celular actuando como supresor del crecimiento [319].

La administración profiláctica subaguda de zinc en la fase tardía de la hipoxia-isquemia causó la regulación positiva de *Rtn4* (1.6394, $P = 0.07$) y *Nrg1* (1.7997, $P = 0.05$), cuya interacción con Nogo-66/NgR1 reduce la proliferación de las NSCs, pero también está implicada en la regulación homeostática de la neurogénesis en la SVZ de ratón adulto y la migración tangencial de neuroblastos a lo largo de la vía media rostral [320].

La administración profiláctica subaguda de zinc en la fase tardía de la hipoxia-isquemia causó la regulación positiva de *Drd2* (4.2386, $P = 0.02$), la neurogénesis en el hipocampo modulada por la dopamina es principalmente a través del receptor D2 [321]. *Drd2* está asociado con la inducción de neuroprotección tras el daño causado por ROS [322] o actuando ellos mismos como secuestradores [323]. Otro efecto neuroprotector de *Drd2* es inducir la expresión de GDNF, NGF y BDNF en astrocitos [324], así como la reducción del tamaño de la lesión y la modulación

del entorno inflamatorio de las células vecinas [325]. Es probable que la acción de BDNF y GDNF sea regulando positivamente el receptor NTR activando factores de transcripción específicos como Brn3, NeuroD1 y GATA3 [326, 327] además estos factores de crecimiento favorecen el crecimiento de neuritas [327] el aumento de BDNF y GDNF en la región CA1 del hipocampo en el accidente cerebrovascular isquémico se asocia con la recuperación de la memoria y el aprendizaje en la rata [328]. Los factores neurofóricos modulan la expresión del transportador de zinc ZIP2 y aumentan su absorción, regulando su homeostasis, ZIPT y ZIP14 incrementaron su expresión por la activación de CNTF y PEDF y ZnT6 por CNTF y GDNF [329].

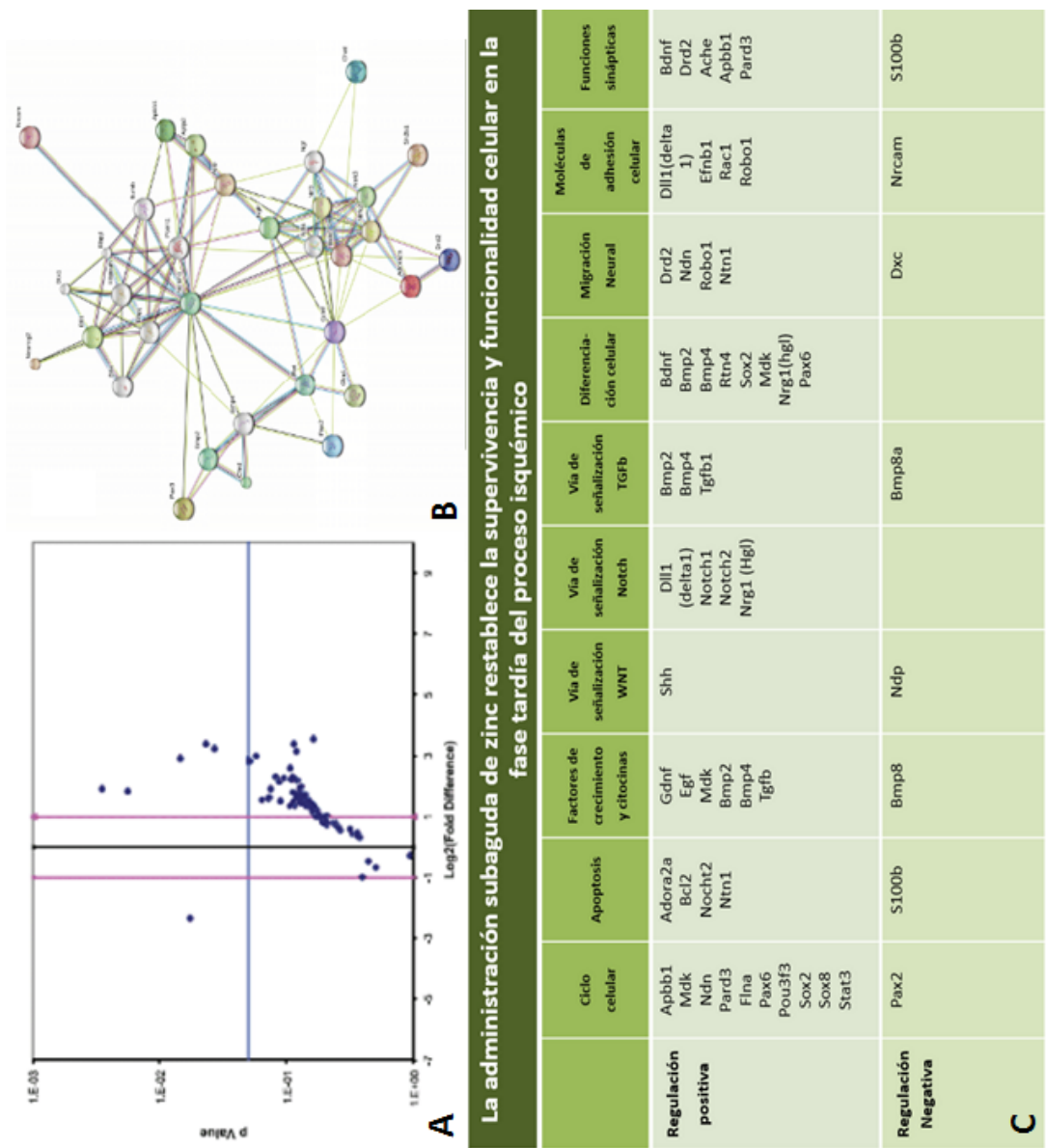


Figura 26. Zn+HSQ 7d A) Grafico de tipo vulcano para el transcriptoma neurogénico. B) Análisis de interacción proteína-proteína String para los genes con cambios estadísticamente significativos. C). Genes regulados positivamente y negativamente con cambios estadísticamente significativos acomodados por función

La inhibición de la producción de óxido nítrico y la neurogénesis en la fase temprana y tardía del proceso hipóxico isquémico cerebral

Efecto de la inhibición de NO en la isquemia cerebral

La administración superaguda del inhibidor inespecífico de las NOS (L-NAME) antes del proceso isquémico reguló positivamente genes en la fase temprana (Figura 27) que participan en los siguientes procesos:

1) Proliferación: Ep300 (1.65, $P = 0.0224$) que no había sido causado por la isquemia en la fase temprana por lo que este efecto se debe absolutamente a la inhibición de la producción del de óxido nítrico durante el daño agudo por la isquemia, de los genes involucrados en la funcionalidad sináptica causó la regulación positiva de Fgf2 (2.19, $P = 0.0026$) activa su receptor FGFR1 y la vía de ERK y promueve el proceso de diferenciación.

2) Diferenciación: Pax6 (1.85, $P = 0.0241$), y Pard3 (2.04, $P = 0.05$) promueve el crecimiento de microtúbulos durante la proliferación. Factores de crecimiento son: S100a6 (1.52, $P = 0.0326$), y citocinas como Cxcl1 (3.51, $P = 0.036$), de Robo1 (1.86 $p = 0.0413$) y la regulación negativa de Nrcam (-1.51 $p = 0.0408$), esto podría sugerir una disminución en la proliferación por la regulación negativa del factor de transcripción Ndn, sin embargo de la baja tasa de proliferación, la regulación negativa de Nrcam sugeriría que la proliferación existente sería simétrica [330]. En la diferenciación celular causó la regulación positiva de Cdkrap2 (1.66, $P = 0.19$), Chat (1.60, $P = 0.0415$), Hes1 (1.60, $P = 0.0311$) y de Heyl (1.85, $P = 0.0161$), Drd2 (4.41, $P = 0.0644$), Fgf2 (2.20, $P = 0.0026$), Pard3 (2.04, ($P = 0.0522$), S100a6 (1.52, $P = 0.0326$), Cxcl1 (3.51, $P = 0.057$), la cual están involucrados en la proliferación de células gliales.

3) Vía de señalización de Wnt: Ssh (1.66, $P = 0.05$). La inhibición de la producción de NO ha sido controversial, ya que se ha encontrado que NO regula la proliferación y migración de progenitores o es antiproliferativo tanto *in vitro* como *in vivo*, pero también está involucrado en la diferenciación neuronal, supervivencia y plasticidad neuronal, por lo que podemos ver con nuestros resultados que el NO en la fase temprana inhibe la transcripción de genes

involucrados en la proliferación y diferenciación celular [75]. Sin embargo, el análisis de proliferación con BrdU nos indica que existe una disminución de la proliferación, debido a que ERK está disminuido al igual que los factores de crecimiento a las 24 h post reperfusión.

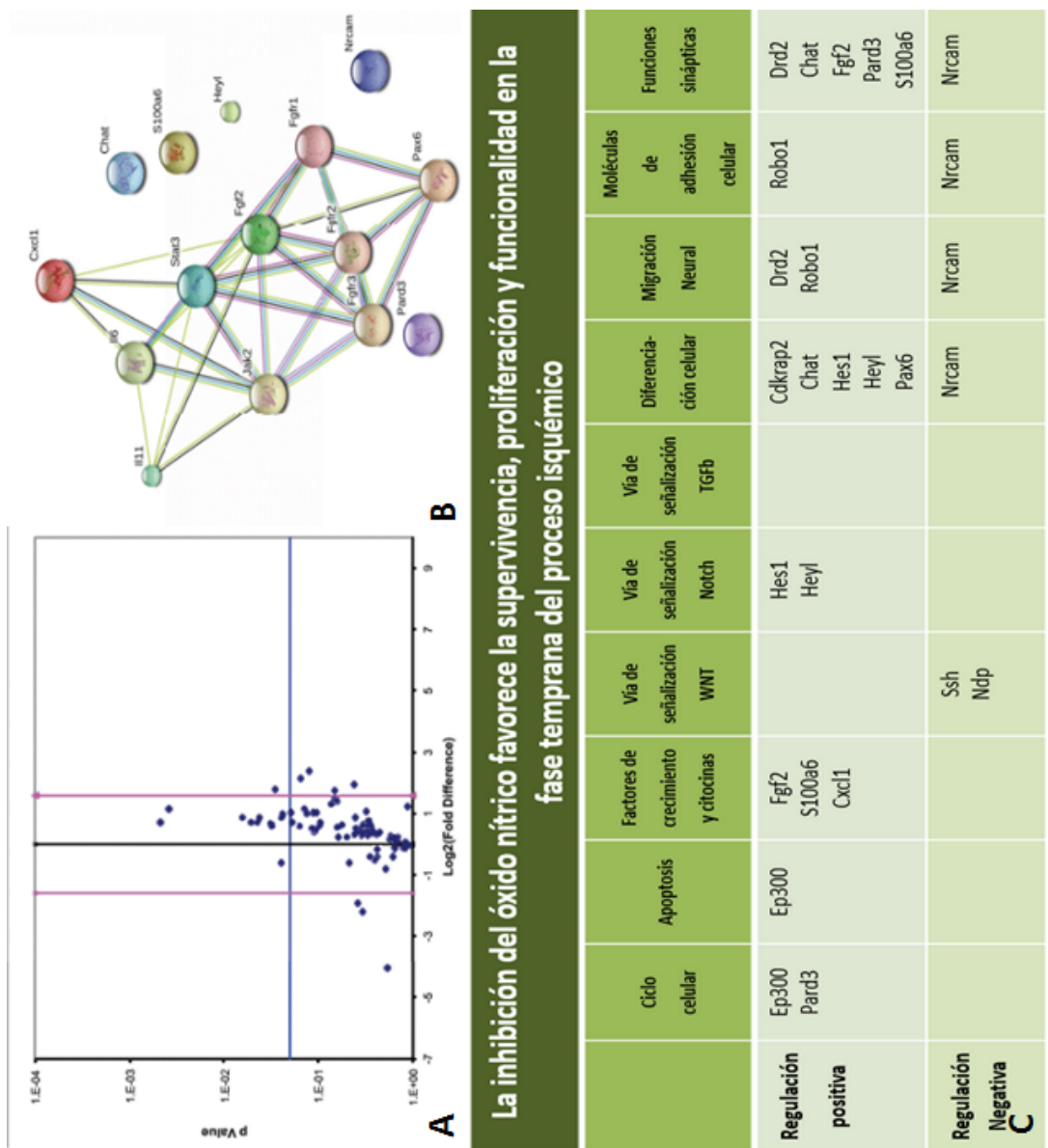


Figura 27. LN+HSQ.8h A) Grafico de tipo vulcano para el transcriptoma neurogénico. B) Análisis de interacción proteína-proteína String para los genes con cambios estadísticamente significativos. C). Genes regulados positivamente y negativamente con cambios estadísticamente significativos acomodados por función

La administración conjunta profiláctica subaguda de zinc (Zn96h) y superaguda de L-NAME en la fase temprana del proceso isquémico cerebral (Figura 28) reguló genes involucrados en las siguientes funciones:

1) Diferenciación neural: reguló positivamente Adora1 (4.77, $P = 0.02$), como lo había inducido la sola administración de zinc, sin embargo, también incrementó Adora2a (5.52, $P = 0.001$), Alk (2.52, $P = 0.04$), como lo encontramos con Zn+Isq8h además de Drd2 (5.48, $P = 0.04$), que están involucrados en los procesos diferenciación [331].

Sin embargo, la inhibición de la producción de NO reguló negativamente genes involucrados en la diferenciación celular como son: Mef2c (-1.83, $p=,0.052$), Neurog1 (-2.90, $p = 0.076$), Nog (-1.55, $p=,0.058$) y Pou4f1 (-7.68, $p = 0.013$). Esto nos sugiere que el NO está involucrado en los procesos de diferenciación celular en la fase temprana.

Aunque en la fase tardía (Figura 29), la inhibición de la producción de NO no modificó algunos genes inducidos por la administración profiláctica de zinc, sí podemos observar que hubo una regulación positiva de genes involucrados en la proliferación celular como es Ep300 (1.17, $P = 0.01$), que había sido regulado negativamente en el proceso isquémico cerebral en la fase tardía, observando que existe un proceso de respuesta tardío al daño isquémico.

2) Vía de señalización de Wnt: Dvl3 (1.79, P= 0.0079), Ssh (1.13, P= 0.04) cómo de Notch; Dll1 (1.87, P= 0.002), Notch1 (1.63, P= 0.02), Nrg1 (1.09, P= 0.407), y de TGFb; Bmp2 (7.42, P= 0.0001), y genes de diferenciación celular; Bdnf (3.18, P= 0.0264), Chat (1.56, P= 0.001), Hes1 (1.95, P= 0.0034), Heyl (1.70, P= 0.013), Lif (1.93, P= 0.04), Neurod1 (1.60, P= 0.007), Rtn4 (1.15, P= 0.01), Mdk (1.31, P= 0.02), y Pax6 (1.37, P= 0.02), Neurod1 (1.60, P = 0.0007), el cual es iniciador de la diferenciación neuronal, o genes de supervivencia celular cómo S100a6 (1.47, P = 0.001), Ntf3 (5.19, P = 0.0009) y Bmp2 (7.42,

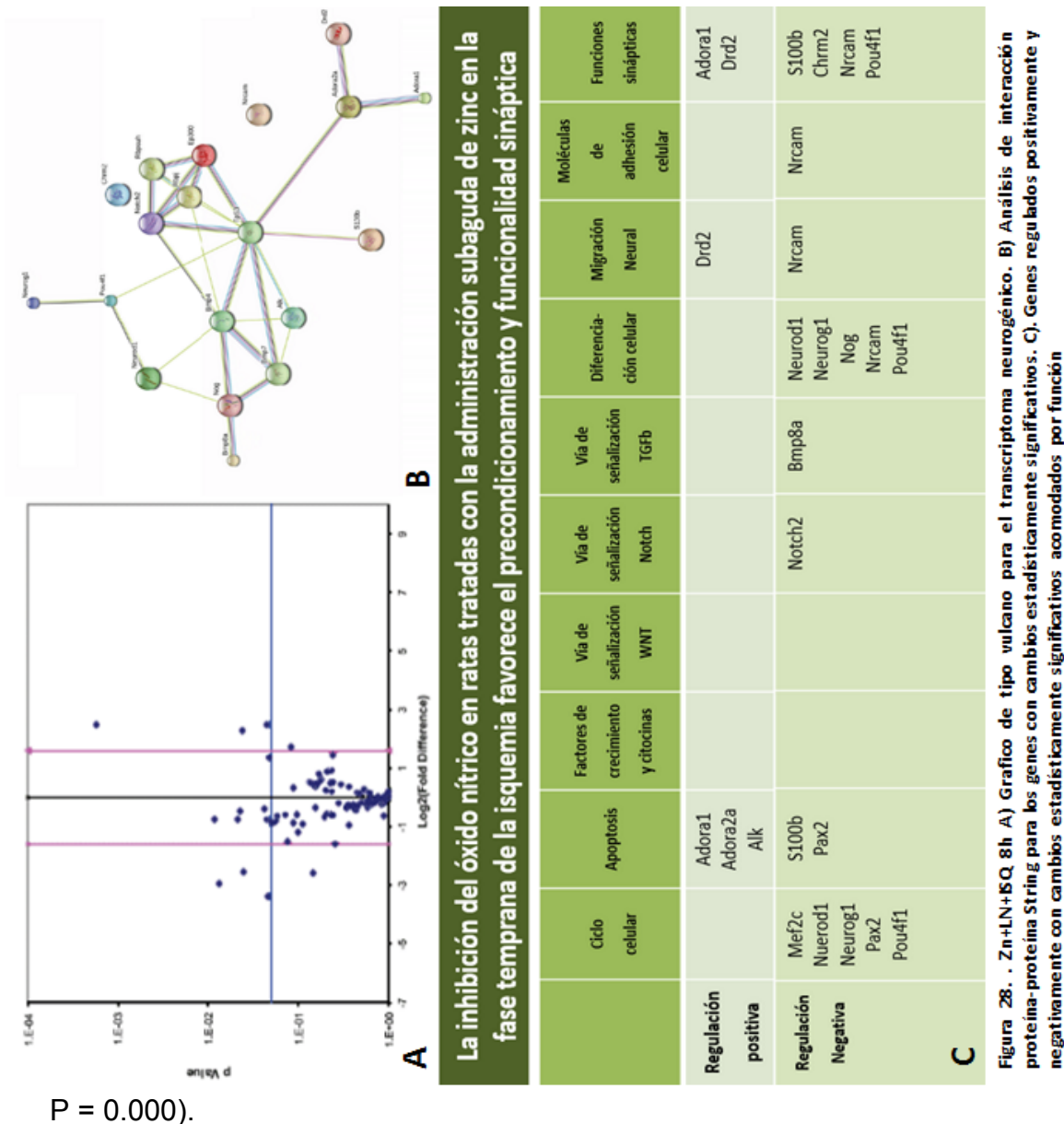
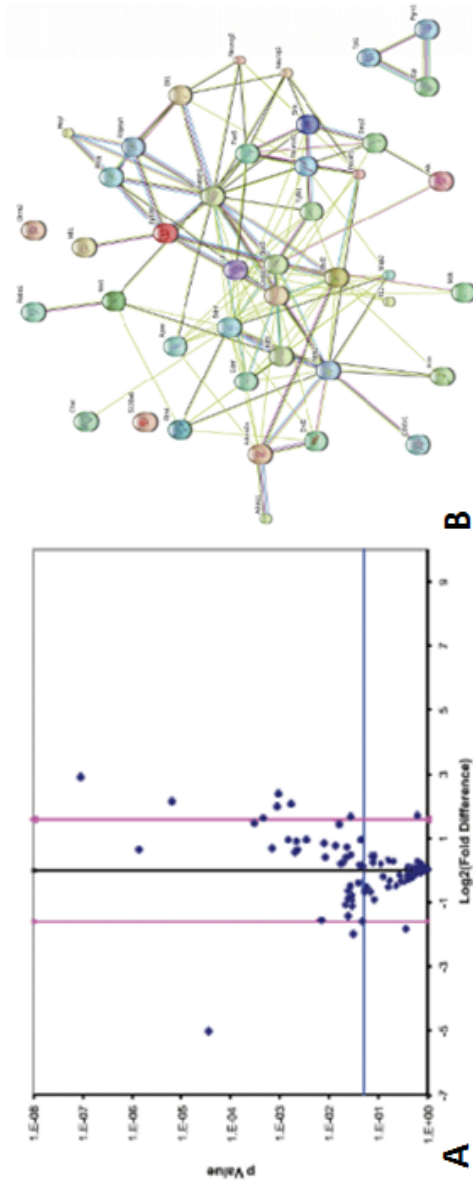


Figura 28. . Zn+LN+SQ 8h A) Grafico de tipo vulcano para el transcriptoma neurogénico. B) Análisis de interacción proteína-proteína String para los genes con cambios estadísticamente significativos. C). Genes regulados positivamente y negativamente con cambios estadísticamente significativos acomodados por función

3) Vía de Notch: Dll1 (1.87, $P = 0.002$), Hes1 (1.95, $P = 0.0034$), Hey1 (1.70, $P = 0.0132$), Notch1 (1.63, $P = 0.022$), Dvl3 (1.79, $P = 0.0079$), Shh (1.13, $P = 0.04$), de la vía de TGF β tenemos Bmp2 (7.42, $P = 0.000$).

4) Diferenciación: Cdk5r1 (-2.14, $P = 0.02$), Cdk5rap2 (-1.38, $P = 0.02$), Mef2c (-2.10, $P = 0.02$), Neurog1 (-3.93, $P = 0.03$), Nrcam (-2.72, $P = 0.02$), Pou4f1 (-32.06, $P = 0.000$), Chrm2 (-1.84, $P = 0.0235$), Creb1 (-3.03, $P = 0.0468$), Apbb1 (-1.31, $P = 0.03$), Map2 (-1.87, $P = 0.02$), Artn (-2.97, $P = 0.006$), Gpi (-1.76, $P = 0.02$). Neurog1 es un factor de transcripción involucrado en la diferenciación neural durante el desarrollo de la corteza cerebral y después del daño para favorecer la diferenciación celular y el crecimiento de neuritas en la zona subventricular (SVZ) después de procesos isquémicos [332], se podría sugerir un proceso de proliferación tardía cuando ya ha pasado el tiempo de vida media del L-NAME [333].



La inhibición del óxido nítrico y la administración subaguda de zinc restablece la supervivencia, diferenciación y funcionalidad celular en la fase tardía del proceso isquémico

| | Ciclo celular | Apoptosis | Factores de crecimiento y citocinas | Vía de señalización WNT | Vía de señalización Notch | Vía de señalización TGFb | Diferenciación celular | Migración Neural | Moléculas de adhesión celular | Funciones sinápticas |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Regulación positiva | Ep300 Mdk Kmt2a Hes1 Hey1 Neurod1 Pax6 Stat3 | Adora1 Adora2a Alk Bcl2 Ep300 Gdnf Ntn1 Ttn4 | Gdnf Egf Mdk Bmp2 Bmp4 Tgfb | Dvl3 Shh | Dll1 (delta1) Notch1 Notch2 Nrg1 (Hgl) | Bmp2 Tgfb1 | Bdnf Bmp2 Chat Hes1 Hey1 Lif Neurod1 Rtn4 Ntf3 Mdk Pax6 | Drd2 Ntn1 | Dll1(delta1) | Adora1 Apoe Bdnf Drd2 Nf1 Nf1 Chat Notch1 S100a6 |
| Regulación Negativa | Appb1 Creb1 Mef2c Neurog1 Neurog2 Pou4f1 Ptn | | Gpl Artn | | | | Cdk5r1 Cdk5rap2 Mef2c Neurog1 Neurog2 Nrcam Pou4f1 | Cdk5r1 Nrcam | Nrcam | Chrm2 Creb1 Nrcam Pou4f1 Appb1 |

Figura 29. Zn+LN+ISQ 7d A) Grafico de tipo vulcano para el transcriptoma neurogénico. B) Análisis de interacción proteína-proteína String para los genes estadísticamente significativos. C). Genes regulados positivamente y negativamente con cambios estadísticamente significativos acomodados por función

Participación del óxido nítrico sobre la maduración celular causado por la administración profiláctica de zinc durante un proceso hipóxico isquémico cerebral

En el protocolo de maduración (Figura 30) podemos observar que la isquemia disminuyó el número de células positivas de BrdU, mientras que el grupo Zn+Isq previno la pérdida de células positivas, sugiriendo que previno la muerte celular de células en proliferación y que maduraron a los 30 días post-reperfusión.

El proceso isquémico disminuyó $71.3 \pm 1.3\%$ las células BrdU positivas a los 30 días post-reperfusión, mientras que la administración profiláctica de zinc en presencia o ausencia de NO no modificó el número de células cuando se compara con el grupo control. La administración profiláctica de zinc previene la pérdida de las células durante un proceso hipóxico-isquémico cerebral.

En estudios previos han sugerido que el zinc es requerido para la diferenciación neuronal, mostrando un efecto en el control epigenético para inducir la proliferación y diferenciación neuronal de células madre en el cerebro adulto [334]. Además, podemos sugerir que el zinc está promoviendo la regulación transcripcional de genes involucrados en la supervivencia celular, proliferación y diferenciación, sin embargo, no observamos cambios en el número de células positivas a BrdU en este protocolo experimental cuando se compara con el grupo control sin tratamiento, pero si hay diferencias con el grupo isquémico.

La participación del NO en el estudio de la transcripción en la fase temprana se observa que tiene un efecto dañino, ya que al inhibir el NO se promueve la proliferación celular, pero en el protocolo de BrdU a las 24 h no se observa que influya en la proliferación celular.

En estudios previos, se ha demostrado que la administración profiláctica de zinc causa un incremento de NO en la fase temprana e inhibe el incremento en la fase tardía después de una isquemia cerebral y la administración de un inhibidor de la producción de NO (L-NAME) causa el incremento de NO a partir de las 72 h, cuando el efecto del inhibidor ya no está presente [282]. Por lo

que, a los 30 días post-reperfusión se observa que se mantiene el número de células positivas a BrdU, sugiriendo que el mayor efecto es debido al zinc, sin embargo, se observa que hay una tendencia a incrementar, sugiriendo que el segundo incremento de NO podría estar participando en el proceso de proliferación, ya que el BrdU mantiene su distribución en el organismo aproximadamente una semana, como se observa en el estudio transcripcional, donde existen genes que son regulados positivamente en el grupo Zn+Isq 7d que se encontraban regulados negativamente en el grupo isquemia 7d.

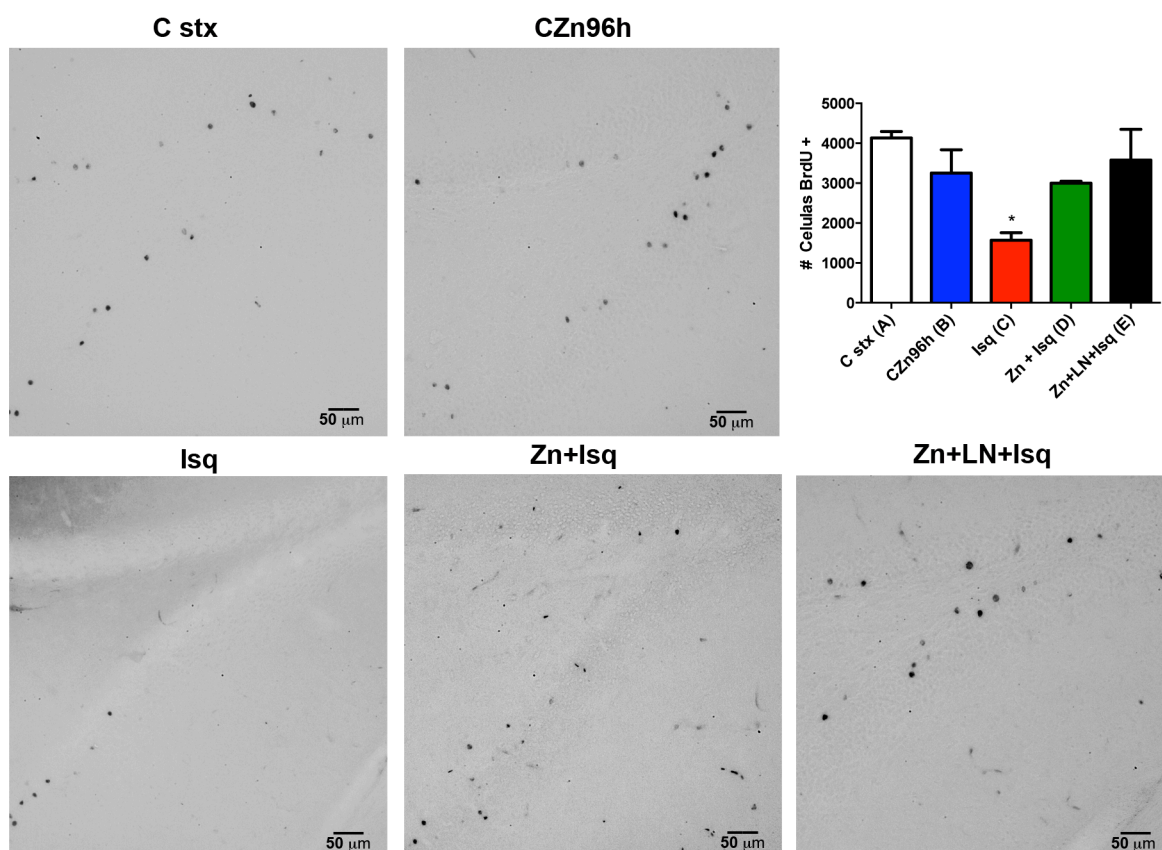


Figura 30. Fase de maduración en el proceso de neurogénesis. Imágenes representativas de la inmunohistoquímica contra BrdU 30 días post isquemia. Se observan las marcas positivas a BrdU para cada uno de los grupos (n = 3).

RESUMEN

- La Administración profiláctica subaguda de zinc en presencia de óxido nítrico promueve la supervivencia celular, mediante la inducción de la expresión de quimiocinas y factores de crecimiento como: BDNF, VEGFA, NGF, SDF-1, CCL2) a través de la vía de señalización de ERK y NF κ B.
- La Administración profiláctica subaguda de zinc en presencia de óxido nítrico previene la disfunción endotelial a través de la expresión de eNOS en la fase temprana.
- La Administración profiláctica subaguda de zinc en presencia de óxido nítrico promueve el proceso regenerativo a través de la expresión de iNOS en la fase tardía.
- La administración profiláctica subaguda de zinc en presencia de óxido nítrico regula el transcriptoma neurogénico.
- La administración profiláctica subaguda de zinc en presencia o ausencia de óxido nítrico evita la pérdida de la proliferación y maduración de células en la zona subgranular causado por la isquemia cerebral.
- El óxido nítrico regula genes involucrados en la diferenciación neuronal a los 7 días post-reperfusión.

CONCLUSIÓN

La administración profiláctica subaguda de zinc en presencia de óxido nítrico tiene un efecto epigenético sobre el transcriptoma de genes neurogénicos, promoviendo factores de crecimiento, quimiocinas, genes de proliferación, diferenciación, migración y maduración, rescatando a la neurona de la muerte celular.

PERSPECTIVAS

1. Evaluar si existe restablecimiento de la funcionalidad neuronal con pruebas de memoria a largo plazo de los grupos estudiados a los 21 d y 30 d post reperusión
2. Evaluar la recuperación de la cito-arquitectura del hipocampo a los 14 d y 21 d por medio de un análisis histopatológico.
3. Analizar la neurogénesis en la zona sub-ventricular y la migración hacia la corteza cerebral
4. Verificar si el efecto protector de la administración profiláctica subaguda de zinc se mantiene en un modelo de isquemia severa.
5. Evaluar el efecto del zinc sobre los genes de metilasas, desmetilasas, acetilasas y desacetilasas que modifican el patrón de expresión del transcriptoma neurogénico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jauch, E.C., et al., *Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association*. Stroke, 2013. **44**(3): p. 870-947.
2. Milionis, H.J., et al., *Risk factors for first-ever acute ischemic non-embolic stroke in elderly individuals*. Int J Cardiol, 2005. **99**(2): p. 269-75.
3. Bonora, M., et al., *Molecular mechanisms of cell death: central implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition*. Oncogene, 2015. **34**(12): p. 1608.
4. Nakamura, A., T. Osonoi, and Y. Terauchi, *Relationship between urinary sodium excretion and pioglitazone-induced edema*. J Diabetes Investig, 2010. **1**(5): p. 208-11.
5. Mozaffarian, D., et al., *Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association*. Circulation, 2015. **131**(4): p. e29-322.
6. Bhattacharyya, N. and E. Abemayor, *Patterns of hospital utilization for head and neck cancer care: changing demographics*. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg, 2015. **141**(4): p. 307-12; quiz 400.
7. Kennedy, J. and A.M. Buchan, *Acute neurovascular syndromes: hurry up, please, it's time*. Stroke, 2004. **35**(2): p. 360-2.
8. Faxon, D.P., et al., *Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Executive summary: Atherosclerotic Vascular Disease Conference proceeding for healthcare professionals from a special writing group of the American Heart Association*. Circulation, 2004. **109**(21): p. 2595-604.
9. Smith, S.C., Jr., et al., *Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group II: risk factors*. Circulation, 2004. **109**(21): p. 2613-6.
10. Amarenco, P., et al., *Atherosclerotic disease of the aortic arch and the risk of ischemic stroke*. N Engl J Med, 1994. **331**(22): p. 1474-9.
11. Kaplan, R.C., et al., *Inflammation and hemostasis biomarkers for predicting stroke in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Observational Study*. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2008. **17**(6): p. 344-55.
12. Dearden, N.M., *Ischaemic brain*. Lancet, 1985. **2**(8449): p. 255-9.
13. Choi, D.W., J.Y. Koh, and S. Peters, *Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists*. J Neurosci, 1988. **8**(1): p. 185-96.
14. Kalogeris, T., et al., *Cell biology of ischemia/reperfusion injury*. Int Rev Cell Mol Biol, 2012. **298**: p. 229-317.
15. Ren, M., et al., *[Effect of basic fibroblast growth factor on endogenous neural stem cell in rat cerebral cortex with global cerebral ischemia-reperfusion]*. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi, 2014. **31**(4): p. 846-9.
16. Hatem, S.M., et al., *Rehabilitation of Motor Function after Stroke: A Multiple Systematic Review Focused on Techniques to Stimulate Upper Extremity Recovery*. Front Hum Neurosci, 2016. **10**: p. 442.
17. Ricci, S., et al., *Piracetam for acute ischaemic stroke*. Cochrane Database Syst Rev, 2012(9): p. CD000419.
18. Vakili, A., et al., *Pentoxifylline attenuates TNF-alpha protein levels and brain edema following temporary focal cerebral ischemia in rats*. Brain Res, 2011. **1377**: p. 119-25.
19. Sandow, N., et al., *Nimodipine Dose Reductions in the Treatment of Patients with Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage*. Neurocrit Care, 2016. **25**(1): p. 29-39.
20. Pelaia, G., et al., *Molecular mechanisms of corticosteroid actions in chronic inflammatory airway diseases*. Life Sci, 2003. **72**(14): p. 1549-61.
21. Jonat, C., et al., *Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone*. Cell, 1990. **62**(6): p. 1189-204.
22. Liou, H.C. and D. Baltimore, *Regulation of the NF-kappa B/rel transcription factor and I kappa B inhibitor system*. Curr Opin Cell Biol, 1993. **5**(3): p. 477-87.
23. Stocklin, E., et al., *Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor*. Nature, 1996. **383**(6602): p. 726-8.
24. Burd, C.J. and T.K. Archer, *Chromatin architecture defines the glucocorticoid response*. Mol Cell Endocrinol, 2013. **380**(1-2): p. 25-31.
25. Bavarsad Shahripour, R., et al., *The effect of NeuroAiD (MLC601) on cerebral blood flow velocity in subjects' post brain infarct in the middle cerebral artery territory*. Eur J Intern Med, 2011. **22**(5): p. 509-13.
26. Blanco-Alvarez, V.M., et al., *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 Plast, 2015. **2015**: p. 375391.
27. Yan, Y.P., et al., *Insulin-like growth factor-1 is an endogenous mediator of focal ischemia-induced neural progenitor proliferation*. Eur J Neurosci, 2006. **24**(1): p. 45-54.
28. Matsushita, K., et al., *Effect of systemic zinc administration on delayed neuronal death in the gerbil hippocampus*. Brain Res, 1996. **743**(1-2): p. 362-5.
29. Blanco-Alvarez, *Prophylactic subacute administration of zinc increases CCL2, CCR2, FGF2, and IGF-1 expression and prevents long-term memory loss in a rat model of cerebral hypoxia ischemia*. Neural plasticity, 2015. **2015**.

30. Blakemore, L.J. and P.Q. Trombley, *Zinc as a Neuromodulator in the Central Nervous System with a Focus on the Olfactory Bulb*. Front Cell Neurosci, 2017. **11**: p. 297.
31. Frederickson, C.J., J.Y. Koh, and A.I. Bush, *The neurobiology of zinc in health and disease*. Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(6): p. 449-62.
32. Zhu, J., et al., *Chronic zinc exposure decreases the surface expression of NR2A-containing NMDA receptors in cultured hippocampal neurons*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e46012.
33. Noh, K.M. and J.Y. Koh, *Induction and activation by zinc of NADPH oxidase in cultured cortical neurons and astrocytes*. J Neurosci, 2000. **20**(23): p. RC111.
34. Nuttall, J.R. and P.I. Oteiza, *Zinc and the ERK kinases in the developing brain*. Neurotox Res, 2012. **21**(1): p. 128-41.
35. Tepaamorndech, S., et al., *ZNT7 binds to CD40 and influences CD154-triggered p38 MAPK activity in B lymphocytes-a possible regulatory mechanism for zinc in immune function*. FEBS Open Bio, 2017. **7**(5): p. 675-690.
36. Suh, S.W., et al., *Zinc inhibits astrocyte glutamate uptake by activation of poly(ADP-ribose) polymerase-1*. Mol Med, 2007. **13**(7-8): p. 344-9.
37. Higashi, Y., et al., *Influence of extracellular zinc on M1 microglial activation*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 43778.
38. Koh, J.Y., et al., *The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia*. Science, 1996. **272**(5264): p. 1013-6.
39. Azman, M.S., et al., *Zinc intake during pregnancy increases the proliferation at ventricular zone of the newborn brain*. Nutr Neurosci, 2009. **12**(1): p. 9-12.
40. Levenson, C.W. and D. Morris, *Zinc and neurogenesis: making new neurons from development to adulthood*. Adv Nutr, 2011. **2**(2): p. 96-100.
41. Kalinowski, M., G. Wolf, and M. Markefski, *Concentration and subcellular localization of zinc in the hippocampal formation, cerebellum, and whole brain during the postnatal development of the rat*. Acta Histochem, 1983. **73**(1): p. 33-40.
42. Dvergsten, C.L., L.A. Johnson, and H.H. Sandstead, *Alterations in the postnatal development of the cerebellar cortex due to zinc deficiency. III. Impaired dendritic differentiation of basket and stellate cells*. Brain Res, 1984. **318**(1): p. 21-6.
43. Saaltink, D.J. and E. Vreugdenhil, *Stress, glucocorticoid receptors, and adult neurogenesis: a balance between excitation and inhibition?* Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(13): p. 2499-515.
44. Zhao, Y., et al., *Exacerbation of diabetes-induced testicular apoptosis by zinc deficiency is most likely associated with oxidative stress, p38 MAPK activation, and p53 activation in mice*. Toxicol Lett, 2011. **200**(1-2): p. 100-6.
45. Adamo, A.M., et al., *The role of zinc in the modulation of neuronal proliferation and apoptosis*. Neurotox Res, 2010. **17**(1): p. 1-14.
46. Kim, H.L., et al., *Poly(ADP-ribosyl)ation of p53 contributes to TPEN-induced neuronal apoptosis*. Mol Cells, 2015. **38**(4): p. 312-7.
47. Palmer, R.M., D.S. Ashton, and S. Moncada, *Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine*. Nature, 1988. **333**(6174): p. 664-6.
48. Cooke, J.P., et al., *Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit*. J Clin Invest, 1992. **90**(3): p. 1168-72.
49. Basudhar, D., et al., *Biological signaling by small inorganic molecules*. Coord Chem Rev, 2016. **306**(Pt 2): p. 708-723.
50. Huang, N.F., et al., *Role of nitric oxide signaling in endothelial differentiation of embryonic stem cells*. Stem Cells Dev, 2010. **19**(10): p. 1617-26.
51. Deep, S.N., et al., *Neuroprotective Role of L-NG-Nitroarginine Methyl Ester (L-NAME) against Chronic Hypobaric Hypoxia with Crowding Stress (CHC) Induced Depression-Like Behaviour*. PLoS One, 2016. **11**(4): p. e0153371.
52. Lo, H.C., et al., *The Nitric Oxide Synthase Inhibitor NG-Nitro-L-Arginine Methyl Ester Diminishes the Immunomodulatory Effects of Parental Arginine in Rats with Subacute Peritonitis*. PLoS One, 2016. **11**(3): p. e0151973.
53. Alderton, W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles, *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 3): p. 593-615.
54. Chen, H.S., et al., *Peroxynitrite Decomposition Catalyst Reduces Delayed Thrombolysis-induced Hemorrhagic Transformation in Ischemia-reperfused Rat Brains*. CNS Neurosci Ther, 2015. **21**(7): p. 585-90.
55. Ozben, T., et al., *Effects of MK-801 on nitrite and cGMP levels during focal cerebral ischemia in rats*. Nitric Oxide, 2005. **13**(3): p. 210-5.
56. Rubbo, H., A. Trostchansky, and V.B. O'Donnell, *Peroxynitrite-mediated lipid oxidation and nitration: mechanisms and consequences*. Arch Biochem Biophys, 2009. **484**(2): p. 167-72.
57. Rubbo, H. and V. O'Donnell, *Nitric oxide, peroxynitrite and lipoxygenase in atherogenesis: mechanistic insights*. Toxicology, 2005. **208**(2): p. 305-17.

58. Mustafa, A.G., et al., *Tempol protects blood proteins and lipids against peroxynitrite-mediated oxidative damage*. *Exp Biol Med* (Maywood), 2015. **240**(1): p. 109-12.
59. Chen, W., et al., *Myricitrin protects against peroxynitrite-mediated DNA damage and cytotoxicity in astrocytes*. *Food Chem*, 2013. **141**(2): p. 927-33.
60. Islam, B.U., et al., *Pathophysiological Role of Peroxynitrite Induced DNA Damage in Human Diseases: A Special Focus on Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP)*. *Indian J Clin Biochem*, 2015. **30**(4): p. 368-85.
61. Khan, M., et al., *Blocking a vicious cycle nNOS/peroxynitrite/AMPK by S-nitrosoglutathione: implication for stroke therapy*. *BMC Neurosci*, 2015. **16**: p. 42.
62. Shibata, K., et al., *Nitric oxide synthases and heart failure - lessons from genetically manipulated mice*. *J UOEH*, 2013. **35**(2): p. 147-58.
63. Martinez-Ruiz, A., et al., *Specificity in S-nitrosylation: a short-range mechanism for NO signaling?* *Antioxid Redox Signal*, 2013. **19**(11): p. 1220-35.
64. Marozkina, N.V. and B. Gaston, *S-Nitrosylation signaling regulates cellular protein interactions*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1820**(6): p. 722-9.
65. Smith, B.C. and M.A. Marletta, *Mechanisms of S-nitrosothiol formation and selectivity in nitric oxide signaling*. *Curr Opin Chem Biol*, 2012. **16**(5-6): p. 498-506.
66. Shahani, N. and A. Sawa, *Protein S-nitrosylation: role for nitric oxide signaling in neuronal death*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1820**(6): p. 736-42.
67. Shahani, N. and A. Sawa, *Nitric oxide signaling and nitrosative stress in neurons: role for S-nitrosylation*. *Antioxid Redox Signal*, 2011. **14**(8): p. 1493-504.
68. Wu, J., et al., *Nitric oxide and interleukins are involved in cell proliferation of RAW264.7 macrophages activated by viili exopolysaccharides*. *Inflammation*, 2013. **36**(4): p. 954-61.
69. Phan Duy, A., et al., *Nitric Oxide Pathway and Proliferation of Neural Progenitors in the Neonatal Rat*. *Dev Neurosci*, 2015. **37**(4-5): p. 417-27.
70. Zhou, L. and D.Y. Zhu, *Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications*. *Nitric Oxide*, 2009. **20**(4): p. 223-30.
71. Luo, C.X., et al., *Reduced neuronal nitric oxide synthase is involved in ischemia-induced hippocampal neurogenesis by up-regulating inducible nitric oxide synthase expression*. *J Neurochem*, 2007. **103**(5): p. 1872-82.
72. Sun, Y., et al., *Neuronal nitric oxide synthase and ischemia-induced neurogenesis*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005. **25**(4): p. 485-92.
73. Todoroki, S., et al., *High concentration of L-arginine suppresses nitric oxide synthase activity and produces reactive oxygen species in NB9 human neuroblastoma cells*. *Mol Med*, 1998. **4**(8): p. 515-24.
74. Shen, J., et al., *Interaction of caveolin-1, nitric oxide, and nitric oxide synthases in hypoxic human SK-N-MC neuroblastoma cells*. *J Neurochem*, 2008. **107**(2): p. 478-87.
75. Carreira, B.P., C.M. Carvalho, and I.M. Araujo, *Regulation of injury-induced neurogenesis by nitric oxide*. *Stem Cells Int*, 2012. **2012**: p. 895659.
76. Luo, C.X., et al., *Bidirectional regulation of neurogenesis by neuronal nitric oxide synthase derived from neurons and neural stem cells*. *Stem Cells*, 2010. **28**(11): p. 2041-52.
77. Cheng, A., et al., *Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain*. *Dev Biol*, 2003. **258**(2): p. 319-33.
78. Matarredona, E.R., et al., *Nitric oxide synthesis inhibition increases proliferation of neural precursors isolated from the postnatal mouse subventricular zone*. *Brain Res*, 2004. **995**(2): p. 274-84.
79. Ling, S., et al., *The expression of neuronal nitric oxide synthase in the brain of the mouse during embryogenesis*. *Anat Rec (Hoboken)*, 2012. **295**(3): p. 504-14.
80. Cazzato, D., et al., *Nitric oxide drives embryonic myogenesis in chicken through the upregulation of myogenic differentiation factors*. *Exp Cell Res*, 2014. **320**(2): p. 269-80.
81. Hilbig, H., et al., *Nitric oxide synthase isoenzymes during in vitro development of rat neuronal and human non-neuronal cells*. *Neurosci Lett*, 2001. **297**(1): p. 9-12.
82. Chen, J., et al., *The localization of neuronal nitric oxide synthase may influence its role in neuronal precursor proliferation and synaptic maintenance*. *Dev Biol*, 2004. **269**(1): p. 165-82.
83. Bothwell, M., *Recent advances in understanding neurotrophin signaling*. *F1000Res*, 2016. **5**.
84. Ibanez, C.F. and J.O. Andressoo, *Biology of GDNF and its receptors - Relevance for disorders of the central nervous system*. *Neurobiol Dis*, 2017. **97**(Pt B): p. 80-89.
85. Huang, E.J. and L.F. Reichardt, *Neurotrophins: roles in neuronal development and function*. *Annu Rev Neurosci*, 2001. **24**: p. 677-736.
86. Lee, R., et al., *Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins*. *Science*, 2001. **294**(5548): p. 1945-8.
87. Teng, H.K., et al., *ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin*. *J Neurosci*, 2005. **25**(22): p. 5455-63.
88. Domeniconi, M., B.L. Hempstead, and M.V. Chao, *Pro-NGF secreted by astrocytes promotes motor neuron cell death*. *Mol Cell Neurosci*, 2007. **34**(2): p. 271-9.

89. Miller, F.D. and D.R. Kaplan, *Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(8): p. 1045-53.
90. Barrett, G.L., *The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis*. Prog Neurobiol, 2000. **61**(2): p. 205-29.
91. Hempstead, B.L., *Deciphering proneurotrophin actions*. Handb Exp Pharmacol, 2014. **220**: p. 17-32.
92. Kalluri, H.S. and R.J. Dempsey, *Growth factors, stem cells, and stroke*. Neurosurg Focus, 2008. **24**(3-4): p. E14.
93. Walker, M.P., et al., *An IGF1/insulin receptor substrate-1 pathway stimulates a mitotic kinase (cdk1) in the uterine epithelium during the proliferative response to estradiol*. J Endocrinol, 2010. **207**(2): p. 225-35.
94. Byun, M.R., et al., *FGF2 stimulates osteogenic differentiation through ERK induced TAZ expression*. Bone, 2014. **58**: p. 72-80.
95. Johnson-Farley, N.N., et al., *Interaction of FGF-2 with IGF-1 and BDNF in stimulating Akt, ERK, and neuronal survival in hippocampal cultures*. Brain Res, 2007. **1154**: p. 40-9.
96. Bonthuis, D.J., et al., *FGF-2, NGF and IGF-1, but not BDNF, utilize a nitric oxide pathway to signal neurotrophic and neuroprotective effects against alcohol toxicity in cerebellar granule cell cultures*. Brain Res Dev Brain Res, 2003. **140**(1): p. 15-28.
97. Supeno, N.E., et al., *IGF-1 acts as controlling switch for long-term proliferation and maintenance of EGF/FGF-responsive striatal neural stem cells*. Int J Med Sci, 2013. **10**(5): p. 522-31.
98. He, Q., P. Harding, and M.C. LaPointe, *PKA, Rap1, ERK1/2, and p90RSK mediate PGE2 and EP4 signaling in neonatal ventricular myocytes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **298**(1): p. H136-43.
99. Sun, J. and G. Nan, *The extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in neurological diseases: A potential therapeutic target (Review)*. Int J Mol Med, 2017. **39**(6): p. 1338-1346.
100. Chang, F., et al., *Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review)*. Int J Oncol, 2003. **22**(3): p. 469-80.
101. Kilic, E., et al., *Brain-derived erythropoietin protects from focal cerebral ischemia by dual activation of ERK1/2 and Akt pathways*. FASEB J, 2005. **19**(14): p. 2026-8.
102. Irving, E.A., et al., *Differential activation of MAPK/ERK and p38/SAPK in neurones and glia following focal cerebral ischaemia in the rat*. Brain Res Mol Brain Res, 2000. **77**(1): p. 65-75.
103. Wang, Z.Q., et al., *Inhibition of MEK/ERK 1/2 pathway reduces pro-inflammatory cytokine interleukin-1 expression in focal cerebral ischemia*. Brain Res, 2004. **996**(1): p. 55-66.
104. Huang, J., U.M. Upadhyay, and R.J. Tamargo, *Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia*. Surg Neurol, 2006. **66**(3): p. 232-45.
105. Li, F., et al., *Cooperative expression of survival p-ERK and p-Akt signals in rat brain neurons after transient MCAO*. Brain Res, 2003. **962**(1-2): p. 21-6.
106. Wang, Z., et al., *Effects of extracellular signal-regulated kinase (ERK) on focal cerebral ischemia*. Chin Med J (Engl), 2003. **116**(10): p. 1497-503.
107. Sindreu, C., R.D. Palmiter, and D.R. Storm, *Zinc transporter ZnT-3 regulates presynaptic Erk1/2 signaling and hippocampus-dependent memory*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(8): p. 3366-70.
108. Besser, L., et al., *Synaptically released zinc triggers metabotropic signaling via a zinc-sensing receptor in the hippocampus*. J Neurosci, 2009. **29**(9): p. 2890-901.
109. Choi, J.S., et al., *Ischemic preconditioning-induced activation of ERK1/2 in the rat hippocampus*. Neurosci Lett, 2006. **409**(3): p. 187-91.
110. Terao, Y., et al., *Macrophage inflammatory protein-3alpha plays a key role in the inflammatory cascade in rat focal cerebral ischemia*. Neurosci Res, 2009. **64**(1): p. 75-82.
111. Alonso, M., J.H. Medina, and L. Pozzo-Miller, *ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons*. Learn Mem, 2004. **11**(2): p. 172-8.
112. Mlyniec, K., et al., *Investigation of the GPR39 zinc receptor following inhibition of monoaminergic neurotransmission and potentialization of glutamatergic neurotransmission*. Brain Res Bull, 2015. **115**: p. 23-9.
113. Mlyniec, K., et al., *GPR39 (zinc receptor) knockout mice exhibit depression-like behavior and CREB/BDNF down-regulation in the hippocampus*. Int J Neuropsychopharmacol, 2014. **18**(3).
114. Hwang, J.J., et al., *Activation of the Trk signaling pathway by extracellular zinc. Role of metalloproteinases*. J Biol Chem, 2005. **280**(12): p. 11995-2001.
115. Shih, R.H., C.Y. Wang, and C.M. Yang, *NF-kappaB Signaling Pathways in Neurological Inflammation: A Mini Review*. Front Mol Neurosci, 2015. **8**: p. 77.
116. Chen, L.F. and W.C. Greene, *Shaping the nuclear action of NF-kappaB*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(5): p. 392-401.
117. Yamada, T. and A. Takaoka, *[NF-kappaB signaling pathway and inflammation]*. Nihon Rinsho, 2012. **70 Suppl 8**: p. 225-30.
118. Verma, I.M., *Nuclear factor (NF)-kappaB proteins: therapeutic targets*. Ann Rheum Dis, 2004. **63 Suppl 2**: p. ii57-ii61.

119. Wong, E.T. and V. Tergaonkar, *Roles of NF-kappaB in health and disease: mechanisms and therapeutic potential*. Clin Sci (Lond), 2009. **116**(6): p. 451-65.
120. Zhao, M., et al., *The role of TLR4-mediated PTEN/PI3K/AKT/NF-kappaB signaling pathway in neuroinflammation in hippocampal neurons*. Neuroscience, 2014. **269**: p. 93-101.
121. O'Neill, L.A. and C. Kaltschmidt, *NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function*. Trends Neurosci, 1997. **20**(6): p. 252-8.
122. Kaltschmidt, C., et al., *Constitutive NF-kappa B activity in neurons*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(6): p. 3981-92.
123. Guerrini, L., F. Blasi, and S. Denis-Donini, *Synaptic activation of NF-kappa B by glutamate in cerebellar granule neurons in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(20): p. 9077-81.
124. Schmidt-Ullrich, R., et al., *NF-kappaB activity in transgenic mice: developmental regulation and tissue specificity*. Development, 1996. **122**(7): p. 2117-28.
125. Meffert, M.K., et al., *NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior*. Nat Neurosci, 2003. **6**(10): p. 1072-8.
126. Greer, P.L. and M.E. Greenberg, *From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function*. Neuron, 2008. **59**(6): p. 846-60.
127. Rolls, A., et al., *Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(9): p. 1081-8.
128. Bi, X., et al., *Quetiapine regulates neurogenesis in ischemic mice by inhibiting NF-kappaB p65/p50 expression*. Neurol Res, 2009. **31**(2): p. 159-66.
129. Crampton, S.J. and G.W. O'Keefe, *NF-kappaB: emerging roles in hippocampal development and function*. Int J Biochem Cell Biol, 2013. **45**(8): p. 1821-4.
130. Gilmore, T.D., *Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6680-4.
131. Mattson, M.P., et al., *Activation of NF-kappaB protects hippocampal neurons against oxidative stress-induced apoptosis: evidence for induction of manganese superoxide dismutase and suppression of peroxynitrite production and protein tyrosine nitration*. J Neurosci Res, 1997. **49**(6): p. 681-97.
132. Helenius, M., et al., *Aging-induced up-regulation of nuclear binding activities of oxidative stress responsive NF-kB transcription factor in mouse cardiac muscle*. J Mol Cell Cardiol, 1996. **28**(3): p. 487-98.
133. Beg, A.A. and D. Baltimore, *An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death*. Science, 1996. **274**(5288): p. 782-4.
134. Xie, Q.W., Y. Kashiwabara, and C. Nathan, *Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase*. J Biol Chem, 1994. **269**(7): p. 4705-8.
135. Bales, K.R., et al., *Neuroinflammation and Alzheimer's disease: critical roles for cytokine/Abeta-induced glial activation, NF-kappaB, and apolipoprotein E*. Neurobiol Aging, 2000. **21**(3): p. 427-32; discussion 451-3.
136. Thompson, W.L. and L.J. Van Eldik, *Inflammatory cytokines stimulate the chemokines CCL2/MCP-1 and CCL7/MCP-3 through NFkB and MAPK dependent pathways in rat astrocytes [corrected]*. Brain Res, 2009. **1287**: p. 47-57.
137. Farina, C., et al., *Preferential expression and function of Toll-like receptor 3 in human astrocytes*. J Neuroimmunol, 2005. **159**(1-2): p. 12-9.
138. Wang, Y., et al., *Interleukin-1beta induces blood-brain barrier disruption by downregulating Sonic hedgehog in astrocytes*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e110024.
139. Alvarez, J.I., T. Katayama, and A. Prat, *Glial influence on the blood brain barrier*. Glia, 2013. **61**(12): p. 1939-58.
140. Hu, X., et al., *Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia*. Stroke, 2012. **43**(11): p. 3063-70.
141. Benakis, C., et al., *The role of microglia and myeloid immune cells in acute cerebral ischemia*. Front Cell Neurosci, 2014. **8**: p. 461.
142. Kalehua, A.N., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-2 are involved in both excitotoxin-induced neurodegeneration and regeneration*. Exp Cell Res, 2004. **297**(1): p. 197-211.
143. Hinojosa, A.E., et al., *CCL2/MCP-1 modulation of microglial activation and proliferation*. J Neuroinflammation, 2011. **8**: p. 77.
144. Shin, J.H., et al., *Ischemic brain extract increases SDF-1 expression in astrocytes through the CXCR2/miR-223/miR-27b pathway*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1839**(9): p. 826-36.
145. Ming, G.L. and H. Song, *Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions*. Neuron, 2011. **70**(4): p. 687-702.
146. Zhao, C., W. Deng, and F.H. Gage, *Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis*. Cell, 2008. **132**(4): p. 645-60.
147. Pehlemann, F.W., J. Sievers, and M. Berry, *Meningeal cells are involved in foliation, lamination, and neurogenesis of the cerebellum: evidence from 6-hydroxydopamine-induced destruction of meningeal cells*. Dev Biol, 1985. **110**(1): p. 136-46.

148. Hartfuss, E., et al., *Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia*. Dev Biol, 2001. **229**(1): p. 15-30.
149. Pluchino, S., et al., *Remodelling the injured CNS through the establishment of atypical ectopic perivascular neural stem cell niches*. Arch Ital Biol, 2010. **148**(2): p. 173-83.
150. Shen, Q., et al., *Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions*. Cell Stem Cell, 2008. **3**(3): p. 289-300.
151. Taupin, P., *Adult neural stem cells, neurogenic niches, and cellular therapy*. Stem Cell Rev, 2006. **2**(3): p. 213-9.
152. Vukovic, J., et al., *Activation of neural precursors in the adult neurogenic niches*. Neurochem Int, 2011. **59**(3): p. 341-6.
153. Hack, M.A., et al., *Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis*. Nat Neurosci, 2005. **8**(7): p. 865-72.
154. Horie, N., et al., *Transplanted stem cell-secreted vascular endothelial growth factor effects poststroke recovery, inflammation, and vascular repair*. Stem Cells, 2011. **29**(2): p. 274-85.
155. Widera, D., et al., *MCP-1 induces migration of adult neural stem cells*. Eur J Cell Biol, 2004. **83**(8): p. 381-7.
156. Zhang, R., et al., *Activated neural stem cells contribute to stroke-induced neurogenesis and neuroblast migration toward the infarct boundary in adult rats*. J Cereb Blood Flow Metab, 2004. **24**(4): p. 441-8.
157. Komitova, M., et al., *Enriched environment increases neural stem/progenitor cell proliferation and neurogenesis in the subventricular zone of stroke-lesioned adult rats*. Stroke, 2005. **36**(6): p. 1278-82.
158. Filippov, V., et al., *Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes*. Mol Cell Neurosci, 2003. **23**(3): p. 373-82.
159. Encinas, J.M., A. Vaahtokari, and G. Enikolopov, *Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(21): p. 8233-8.
160. Encinas, J.M., et al., *Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus*. Cell Stem Cell, 2011. **8**(5): p. 566-79.
161. Encinas, J.M. and A. Sierra, *Neural stem cell deforestation as the main force driving the age-related decline in adult hippocampal neurogenesis*. Behav Brain Res, 2012. **227**(2): p. 433-9.
162. Ben-Ari, Y., et al., *Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones*. J Physiol, 1989. **416**: p. 303-25.
163. Sierra, A., et al., *Neuronal hyperactivity accelerates depletion of neural stem cells and impairs hippocampal neurogenesis*. Cell Stem Cell, 2015. **16**(5): p. 488-503.
164. Encinas, J.M. and G. Enikolopov, *Identifying and quantitating neural stem and progenitor cells in the adult brain*. Methods Cell Biol, 2008. **85**: p. 243-72.
165. Ferri, A.L., et al., *Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain*. Development, 2004. **131**(15): p. 3805-19.
166. Urban, N. and F. Guillemot, *Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles*. Front Cell Neurosci, 2014. **8**: p. 396.
167. Zhang, J. and J. Jiao, *Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 727542.
168. Gotz, M. and W.B. Huttner, *The cell biology of neurogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(10): p. 777-88.
169. Hermann, A., et al., *Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 19): p. 4411-22.
170. Zimmerman, L., et al., *Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors*. Neuron, 1994. **12**(1): p. 11-24.
171. Lothian, C., et al., *Identification of both general and region-specific embryonic CNS enhancer elements in the nestin promoter*. Exp Cell Res, 1999. **248**(2): p. 509-19.
172. Doetsch, F., *The glial identity of neural stem cells*. Nat Neurosci, 2003. **6**(11): p. 1127-34.
173. Nakamura, Y., et al., *The bHLH gene hes1 as a repressor of the neuronal commitment of CNS stem cells*. J Neurosci, 2000. **20**(1): p. 283-93.
174. Ro, S.H., et al., *FoxOs in neural stem cell fate decision*. Arch Biochem Biophys, 2013. **534**(1-2): p. 55-63.
175. Zhang, X.M., et al., *Doublecortin-expressing cells persist in the associative cerebral cortex and amygdala in aged nonhuman primates*. Front Neuroanat, 2009. **3**: p. 17.
176. Cai, Y., et al., *Doublecortin expression in adult cat and primate cerebral cortex relates to immature neurons that develop into GABAergic subgroups*. Exp Neurol, 2009. **216**(2): p. 342-56.
177. Forstermann, U. and W.C. Sessa, *Nitric oxide synthases: regulation and function*. Eur Heart J, 2012. **33**(7): p. 829-37, 837a-837d.
178. Reif, A., et al., *Differential effect of endothelial nitric oxide synthase (NOS-III) on the regulation of adult neurogenesis and behaviour*. Eur J Neurosci, 2004. **20**(4): p. 885-95.
179. Bonafe, F., C. Guarnieri, and C. Muscari, *Nitric oxide regulates multiple functions and fate of adult progenitor and stem cells*. J Physiol Biochem, 2015. **71**(1): p. 141-53.

180. Pastrana, E., L.C. Cheng, and F. Doetsch, *Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(15): p. 6387-92.
181. Lo, H.W. and M.C. Hung, *Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival*. Br J Cancer, 2007. **96 Suppl**: p. R16-20.
182. Sedmak, J.J. and S.E. Grossberg, *A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250*. Anal Biochem, 1977. **79**(1-2): p. 544-52.
183. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
184. Vivar, C., B.D. Peterson, and H. van Praag, *Running rewires the neuronal network of adult-born dentate granule cells*. Neuroimage, 2016. **131**: p. 29-41.
185. Stringer, T.P., et al., *Plant-derived flavanol (-)epicatechin mitigates anxiety in association with elevated hippocampal monoamine and BDNF levels, but does not influence pattern separation in mice*. Transl Psychiatry, 2015. **5**: p. e493.
186. Zhao, S., et al., *CXCR4 antagonist AMD3100 reverses the neurogenesis and behavioral recovery promoted by forced limb-use in stroke rats*. Restor Neurol Neurosci, 2015. **33**(6): p. 809-21.
187. Luo, X., et al., *CXCL12/CXCR4 axis: an emerging neuromodulator in pathological pain*. Rev Neurosci, 2016. **27**(1): p. 83-92.
188. Jin, J., W.C. Zhao, and F. Yuan, *CXCR7/CXCR4/CXCL12 axis regulates the proliferation, migration, survival and tube formation of choroid-retinal endothelial cells*. Ophthalmic Res, 2013. **50**(1): p. 6-12.
189. Mega, J.L., et al., *Genetic risk, coronary heart disease events, and the clinical benefit of statin therapy: an analysis of primary and secondary prevention trials*. Lancet, 2015. **385**(9984): p. 2264-2271.
190. Jiang, C., et al., *Progesterone Changes VEGF and BDNF Expression and Promotes Neurogenesis After Ischemic Stroke*. Mol Neurobiol, 2016.
191. Lahiani, A., et al., *Human placental eXpanded (PLX) mesenchymal-like adherent stromal cells confer neuroprotection to nerve growth factor (NGF)-differentiated PC12 cells exposed to ischemia by secretion of IL-6 and VEGF*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1853**(2): p. 422-30.
192. Zhou, L., et al., *Enhanced neuroprotective efficacy of bone marrow mesenchymal stem cells co-overexpressing BDNF and VEGF in a rat model of cardiac arrest-induced global cerebral ischemia*. Cell Death Dis, 2017. **8**(5): p. e2774.
193. Naylor, M., et al., *Preconditioning-induced ischemic tolerance stimulates growth factor expression and neurogenesis in adult rat hippocampus*. Neurochem Int, 2005. **47**(8): p. 565-72.
194. Zhang, D., et al., *nNOS Translocates into the Nucleus and Interacts with Sox2 to Protect Neurons Against Early Excitotoxicity via Promotion of Shh Transcription*. Mol Neurobiol, 2016. **53**(9): p. 6444-6458.
195. Khan, M. and I. Singh, *Inhibition of the AMPK/nNOS pathway for neuroprotection in stroke*. Neural Regen Res, 2016. **11**(3): p. 398-9.
196. Chen, L., et al., *Agrimoniolide from Agrimonia pilosa suppresses inflammatory responses through down-regulation of COX-2/iNOS and inactivation of NF-kappaB in lipopolysaccharide-stimulated macrophages*. Phytomedicine, 2016. **23**(8): p. 846-55.
197. Badshah, H., et al., *Protective Effect of Lupeol Against Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation via the p38/c-Jun N-Terminal Kinase Pathway in the Adult Mouse Brain*. J Neuroimmune Pharmacol, 2016. **11**(1): p. 48-60.
198. Beck, H. and K.H. Plate, *Angiogenesis after cerebral ischemia*. Acta Neuropathol, 2009. **117**(5): p. 481-96.
199. Kinsella, J.P., et al., *Recommendations for the Use of Inhaled Nitric Oxide Therapy in Premature Newborns with Severe Pulmonary Hypertension*. J Pediatr, 2016. **170**: p. 312-4.
200. Su, Z., et al., *Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis*. Mol Cancer, 2015. **14**: p. 48.
201. Freedman, J.E. and J. Loscalzo, *Nitric oxide and its relationship to thrombotic disorders*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(6): p. 1183-8.
202. Tan, X.L., et al., *Partial eNOS deficiency causes spontaneous thrombotic cerebral infarction, amyloid angiopathy and cognitive impairment*. Mol Neurodegener, 2015. **10**: p. 24.
203. Jiang, Y., et al., *SOD1 nanozyme salvages ischemic brain by locally protecting cerebral vasculature*. J Control Release, 2015. **213**: p. 36-44.
204. Thiyagarajan, M. and S.S. Sharma, *Neuroprotective effect of curcumin in middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats*. Life Sci, 2004. **74**(8): p. 969-85.
205. Demarest, T.G., et al., *Sex-dependent mitochondrial respiratory impairment and oxidative stress in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy*. J Neurochem, 2016. **137**(5): p. 714-29.
206. Papaiahgari, S., et al., *Hyperoxia stimulates an Nrf2-ARE transcriptional response via ROS-EGFR-PI3K-Akt/ERK MAP kinase signaling in pulmonary epithelial cells*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(1-2): p. 43-52.
207. Madsen, P.M., et al., *Genetic ablation of soluble tumor necrosis factor with preservation of membrane tumor necrosis factor is associated with neuroprotection after focal cerebral ischemia*. J Cereb Blood Flow Metab, 2016. **36**(9): p. 1553-69.
208. Russo, M.A., T. Magrone, and E. Jirillo, *Role of Immune Cells in the Course of Central Nervous System Injury: Modulation with Natural Products*. Curr Pharm Des, 2016. **22**(6): p. 701-8.

209. Knerlich-Lukoschus, F., et al., *Force-dependent development of neuropathic central pain and time-related CCL2/CCR2 expression after graded spinal cord contusion injuries of the rat*. J Neurotrauma, 2008. **25**(5): p. 427-48.
210. Andres, R.H., et al., *The CCR2/CCL2 interaction mediates the transendothelial recruitment of intravascularly delivered neural stem cells to the ischemic brain*. Stroke, 2011. **42**(10): p. 2923-31.
211. Carlsen, H.S., et al., *B cell attracting chemokine 1 (CXCL13) and its receptor CXCR5 are expressed in normal and aberrant gut associated lymphoid tissue*. Gut, 2002. **51**(3): p. 364-71.
212. Kizil, C., et al., *The chemokine receptor cxcr5 regulates the regenerative neurogenesis response in the adult zebrafish brain*. Neural Dev, 2012. **7**: p. 27.
213. Zhou, X.L., et al., *Hes1 is upregulated by ischemic postconditioning and contributes to cardioprotection*. Cell Biochem Funct, 2014. **32**(8): p. 730-6.
214. Busse, H., et al., *Adenosine A2A and A2B Receptor Substantially Attenuate Ischemia/Reperfusion Injury in Septic rat Hearts*. Cardiovasc Drugs Ther, 2016. **30**(6): p. 551-558.
215. Das, S., et al., *Association of APOE (E2, E3 and E4) gene variants and lipid levels in ischemic stroke, its subtypes and hemorrhagic stroke in a South Indian population*. Neurosci Lett, 2016. **628**: p. 136-41.
216. Xin, H., et al., *Bone marrow stromal cells induce BMP2/4 production in oxygen-glucose-deprived astrocytes, which promotes an astrocytic phenotype in adult subventricular progenitor cells*. J Neurosci Res, 2006. **83**(8): p. 1485-93.
217. Yuan, H., et al., *Nuclear translocation of histone deacetylase 4 induces neuronal death in stroke*. Neurobiol Dis, 2016. **91**: p. 182-93.
218. Horiba, M., et al., *Midkine plays a protective role against cardiac ischemia/reperfusion injury through a reduction of apoptotic reaction*. Circulation, 2006. **114**(16): p. 1713-20.
219. Huang, Y.C., et al., *Epigenetic regulation of NOTCH1 and NOTCH3 by KMT2A inhibits glioma proliferation*. Oncotarget, 2017. **8**(38): p. 63110-63120.
220. Fujimoto, I., et al., *Necdin controls EGFR signaling linked to astrocyte differentiation in primary cortical progenitor cells*. Cell Signal, 2016. **28**(2): p. 94-107.
221. Chen, S., et al., *Regulation of microtubule stability and organization by mammalian Par3 in specifying neuronal polarity*. Dev Cell, 2013. **24**(1): p. 26-40.
222. Dhungana, H., et al., *Western-type diet modulates inflammatory responses and impairs functional outcome following permanent middle cerebral artery occlusion in aged mice expressing the human apolipoprotein E4 allele*. J Neuroinflammation, 2013. **10**: p. 102.
223. Alberi, L., et al., *Neonatal stroke in mice causes long-term changes in neuronal Notch-2 expression that may contribute to prolonged injury*. Stroke, 2010. **41**(10 Suppl): p. S64-71.
224. Nardai, S., et al., *Delayed Gelatinase Inhibition Induces Reticulon 4 Receptor Expression in the Peri-Infarct Cortex*. J Neuropathol Exp Neurol, 2016. **75**(4): p. 379-85.
225. Lei, Z.N., et al., *Bcl-2 increases stroke-induced striatal neurogenesis in adult brains by inhibiting BMP-4 function via activation of beta-catenin signaling*. Neurochem Int, 2012. **61**(1): p. 34-42.
226. Chang, J., et al., *BDNF/PI3K/Akt and Nogo-A/RhoA/ROCK signaling pathways contribute to neurorestorative effect of Houshiheisan against cerebral ischemia injury in rats*. J Ethnopharmacol, 2016. **194**: p. 1032-1042.
227. Spaccapelo, L., et al., *Up-regulation of the canonical Wnt-3A and Sonic hedgehog signaling underlies melanocortin-induced neurogenesis after cerebral ischemia*. Eur J Pharmacol, 2013. **707**(1-3): p. 78-86.
228. Wang, L., et al., *The Notch pathway mediates expansion of a progenitor pool and neuronal differentiation in adult neural progenitor cells after stroke*. Neuroscience, 2009. **158**(4): p. 1356-63.
229. Ma, M., et al., *Intranasal delivery of transforming growth factor-beta1 in mice after stroke reduces infarct volume and increases neurogenesis in the subventricular zone*. BMC Neurosci, 2008. **9**: p. 117.
230. Choe, Y., S.J. Pleasure, and H. Mira, *Control of Adult Neurogenesis by Short-Range Morphogenic-Signaling Molecules*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **8**(3): p. a018887.
231. Tan, X., et al., *The inhibition of Cdk5 activity after hypoxia/ischemia injury reduces infarct size and promotes functional recovery in neonatal rats*. Neuroscience, 2015. **290**: p. 552-60.
232. Issa, L., et al., *CDK5RAP2 expression during murine and human brain development correlates with pathology in primary autosomal recessive microcephaly*. Cereb Cortex, 2013. **23**(9): p. 2245-60.
233. Gu, W., et al., *Neurotransmitter synthesis in poststroke cortical neurogenesis in adult rats*. Stem Cell Res, 2010. **4**(2): p. 148-54.
234. Demyanenko, G.P., et al., *Neural cell adhesion molecule NrCAM regulates Semaphorin 3F-induced dendritic spine remodeling*. J Neurosci, 2014. **34**(34): p. 11274-87.
235. Buffo, A., et al., *Expression pattern of the transcription factor Olig2 in response to brain injuries: implications for neuronal repair*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(50): p. 18183-8.
236. Katayama, K.I., et al., *Enhanced expression of Pafah1b1 causes over-migration of cerebral cortical neurons into the marginal zone*. Brain Struct Funct, 2017.
237. Ahlfeld, J., et al., *Neurogenesis from Sox2 expressing cells in the adult cerebellar cortex*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 6137.

238. Migani, P., et al., *Regional and cellular distribution of ephrin-B1 in adult mouse brain*. Brain Res, 2009. **1247**: p. 50-61.
239. Erskine, L., et al., *VEGF-A and neuropilin 1 (NRP1) shape axon projections in the developing CNS via dual roles in neurons and blood vessels*. Development, 2017. **144**(13): p. 2504-2516.
240. Ng, T., et al., *Neuropilin 2 Signaling Is Involved in Cell Positioning of Adult-born Neurons through Glycogen Synthase Kinase-3beta (GSK3beta)*. J Biol Chem, 2016. **291**(48): p. 25088-25095.
241. Karabiyik, C., et al., *Neuronal Rho GTPase Rac1 elimination confers neuroprotection in a mouse model of permanent ischemic stroke*. Brain Pathol, 2017.
242. Reijnders, M.R.F., et al., *RAC1 Missense Mutations in Developmental Disorders with Diverse Phenotypes*. Am J Hum Genet, 2017. **101**(3): p. 466-477.
243. Jin, X., et al., *Increased Expression of Slit2 and its Robo Receptors During Astroglial Scar Formation After Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats*. Neurochem Res, 2016. **41**(12): p. 3373-3385.
244. Okuda, H., et al., *Chondroitin sulfate proteoglycan tenascin-R regulates glutamate uptake by adult brain astrocytes*. J Biol Chem, 2014. **289**(5): p. 2620-31.
245. Chauhan, P.S., et al., *Memory and learning seems to be related to cholinergic dysfunction in the JE rat model*. Physiol Behav, 2016. **156**: p. 148-55.
246. Clarkson, A.N., et al., *Combined ampakine and BDNF treatments enhance poststroke functional recovery in aged mice via AKT-CREB signaling*. J Cereb Blood Flow Metab, 2015. **35**(8): p. 1272-9.
247. Gomes, F.V., et al., *Cannabidiol attenuates sensorimotor gating disruption and molecular changes induced by chronic antagonism of NMDA receptors in mice*. Int J Neuropsychopharmacol, 2014. **18**(5).
248. Xu, Z. and B.D. Ford, *Upregulation of erbB receptors in rat brain after middle cerebral arterial occlusion*. Neurosci Lett, 2005. **375**(3): p. 181-6.
249. Clausen, M., et al., *Ischemia-induced neural stem/progenitor cells express pyramidal cell markers*. Neuroreport, 2011. **22**(16): p. 789-94.
250. Wu, L., et al., *Functional expression, characterization, and application of human S100B*. Oncol Rep, 2017. **38**(4): p. 2309-2316.
251. Bonde, C., et al., *GDNF and neublastin protect against NMDA-induced excitotoxicity in hippocampal slice cultures*. Neuroreport, 2000. **11**(18): p. 4069-73.
252. Fang, B., et al., *Expression of S100A6 in rat hippocampus after traumatic brain injury due to lateral head acceleration*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(4): p. 6378-90.
253. Pandey, R., et al., *From the Cover: Arsenic Induces Hippocampal Neuronal Apoptosis and Cognitive Impairments via an Up-Regulated BMP2/Smad-Dependent Reduced BDNF/TrkB Signaling in Rats*. Toxicol Sci, 2017. **159**(1): p. 137-158.
254. Huang, Z., et al., *YAP stabilizes SMAD1 and promotes BMP2-induced neocortical astrocytic differentiation*. Development, 2016. **143**(13): p. 2398-409.
255. Lin, F.F., et al., *[Effects of the transplantation of adipose-derived stem cell on the expression of Notch1-Dll4 signaling pathway in brain of rats with focal cerebral ischemia]*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2011. **91**(33): p. 2348-52.
256. Wang, L., et al., *Apoptosis, Expression of PAX3 and P53, and Caspase Signal in Fetuses with Neural Tube Defects*. Birth Defects Res, 2017.
257. Clegg, M.S., et al., *Zinc deficiency-induced cell death*. IUBMB Life, 2005. **57**(10): p. 661-9.
258. Yang, Y., et al., *High dose zinc supplementation induces hippocampal zinc deficiency and memory impairment with inhibition of BDNF signaling*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e55384.
259. Kleindienst, A., et al., *Intraperitoneal treatment with S100B enhances hippocampal neurogenesis in juvenile mice and after experimental brain injury*. Acta Neurochir (Wien), 2013. **155**(7): p. 1351-60.
260. Lu, J., et al., *S100B and APP promote a gliocentric shift and impaired neurogenesis in Down syndrome neural progenitors*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22126.
261. Winerdal, M., et al., *Adenosine A1 receptors contribute to immune regulation after neonatal hypoxic ischemic brain injury*. Purinergic Signal, 2016. **12**(1): p. 89-101.
262. Kadir, R., et al., *ALFY-Controlled DVL3 Autophagy Regulates Wnt Signaling, Determining Human Brain Size*. PLoS Genet, 2016. **12**(3): p. e1005919.
263. Sakurai, T., *The role of NrCAM in neural development and disorders--beyond a simple glue in the brain*. Mol Cell Neurosci, 2012. **49**(3): p. 351-63.
264. Hegarty, S.V., G.W. O'Keefe, and A.M. Sullivan, *BMP-Smad 1/5/8 signalling in the development of the nervous system*. Prog Neurobiol, 2013. **109**: p. 28-41.
265. Du, Y. and H. Yip, *Effects of bone morphogenetic protein 2 on Id expression and neuroblastoma cell differentiation*. Differentiation, 2010. **79**(2): p. 84-92.
266. Wang, Y., et al., *Mesenchymal stem cells regulate the proliferation and differentiation of neural stem cells through Notch signaling*. Cell Biol Int, 2009. **33**(11): p. 1173-9.
267. Zhang, C.X., S.M. Wang, and H.Y. Jin, *[Inhibitory effect and mechanism of (-)-epigallocatechin-3-gallate on HT29 and HCT-8 colorectal cancer cell lines and expression of HES1 and JAG1]*. Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi, 2011. **14**(8): p. 636-9.

268. Roese-Koerner, B., L. Stappert, and O. Brustle, *Notch/Hes signaling and miR-9 engage in complex feedback interactions controlling neural progenitor cell proliferation and differentiation*. Neurogenesis (Austin), 2017. **4**(1): p. e1313647.
269. Kobayashi, T., et al., *Deubiquitinating enzymes regulate Hes1 stability and neuronal differentiation*. FEBS J, 2015. **282**(13): p. 2411-23.
270. Dhanesh, S.B., C. Subashini, and J. James, *Hes1: the maestro in neurogenesis*. Cell Mol Life Sci, 2016. **73**(21): p. 4019-42.
271. Ichi, S., et al., *Folic acid remodels chromatin on Hes1 and Neurog2 promoters during caudal neural tube development*. J Biol Chem, 2010. **285**(47): p. 36922-32.
272. Cao, N., et al., *Clinical-grade human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells reverse cognitive aging via improving synaptic plasticity and endogenous neurogenesis*. Cell Death Dis, 2017. **8**(8): p. e2996.
273. Cao, Y., et al., *Clinical significance of UGT1A1 polymorphism and expression of ERCC1, BRCA1, TYMS, RRM1, TUBB3, STMN1 and TOP2A in gastric cancer*. BMC Gastroenterol, 2017. **17**(1): p. 2.
274. Li, H., et al., *Transcription factor MEF2C influences neural stem/progenitor cell differentiation and maturation in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(27): p. 9397-402.
275. Pataskar, A., et al., *NeuroD1 reprograms chromatin and transcription factor landscapes to induce the neuronal program*. EMBO J, 2016. **35**(1): p. 24-45.
276. Nakayama, A., et al., *Ephrin-B2 controls PDGFRbeta internalization and signaling*. Genes Dev, 2013. **27**(23): p. 2576-89.
277. Nakayama, A.Y., M.B. Harms, and L. Luo, *Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons*. J Neurosci, 2000. **20**(14): p. 5329-38.
278. Tashiro, A. and R. Yuste, *Role of Rho GTPases in the morphogenesis and motility of dendritic spines*. Methods Enzymol, 2008. **439**: p. 285-302.
279. Tejada-Simon, M.V., et al., *NMDA receptor activation induces translocation and activation of Rac in mouse hippocampal area CA1*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **343**(2): p. 504-12.
280. Haditsch, U., et al., *Neuronal Rac1 is required for learning-evoked neurogenesis*. J Neurosci, 2013. **33**(30): p. 12229-41.
281. Kandasamy, M., et al., *Stem cell quiescence in the hippocampal neurogenic niche is associated with elevated transforming growth factor-beta signaling in an animal model of Huntington disease*. J Neuropathol Exp Neurol, 2010. **69**(7): p. 717-28.
282. Blanco-Alvarez, V.M., et al., *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*. Oxid Med Cell Longev, 2013. **2013**: p. 240560.
283. Cao, F., et al., *Conditional deletion of Stat3 promotes neurogenesis and inhibits astroglialogenesis in neural stem cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **394**(3): p. 843-7.
284. Zhang, R., et al., *Transcriptional regulation of BMP2 expression by the PTH-CREB signaling pathway in osteoblasts*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e20780.
285. Dziennis, S. and N.J. Alkayed, *Role of signal transducer and activator of transcription 3 in neuronal survival and regeneration*. Rev Neurosci, 2008. **19**(4-5): p. 341-61.
286. Yang, J. and G.R. Stark, *Roles of unphosphorylated STATs in signaling*. Cell Res, 2008. **18**(4): p. 443-51.
287. Osumi, N., et al., *Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator*. Stem Cells, 2008. **26**(7): p. 1663-72.
288. Tonchev, A.B., et al., *Transcription factor protein expression patterns by neural or neuronal progenitor cells of adult monkey subventricular zone*. Neuroscience, 2006. **139**(4): p. 1355-67.
289. Zhang, C., et al., *Role of transcription factors in neurogenesis after cerebral ischemia*. Rev Neurosci, 2011. **22**(4): p. 457-65.
290. Lee, I.N., et al., *Dexamethasone reduces brain cell apoptosis and inhibits inflammatory response in rats with intracerebral hemorrhage*. J Neurosci Res, 2015. **93**(1): p. 178-88.
291. Xiong, M., et al., *Post-ischemic hypothermia promotes generation of neural cells and reduces apoptosis by Bcl-2 in the striatum of neonatal rat brain*. Neurochem Int, 2011. **58**(6): p. 625-33.
292. Bond, A.M., O.G. Bhalala, and J.A. Kessler, *The dynamic role of bone morphogenetic proteins in neural stem cell fate and maturation*. Dev Neurobiol, 2012. **72**(7): p. 1068-84.
293. Lim, D.A., et al., *Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis*. Neuron, 2000. **28**(3): p. 713-26.
294. Mikawa, S. and K. Sato, *Noggin expression in the adult rat brain*. Neuroscience, 2011. **184**: p. 38-53.
295. Memanishvili, T., et al., *Generation of cortical neurons from human induced-pluripotent stem cells by biodegradable polymeric microspheres loaded with priming factors*. Biomed Mater, 2016. **11**(2): p. 025011.
296. Arnold, K., et al., *Sox2(+) adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice*. Cell Stem Cell, 2011. **9**(4): p. 317-29.
297. Bylund, M., et al., *Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity*. Nat Neurosci, 2003. **6**(11): p. 1162-8.

298. Engelen, E., et al., *Sox2 cooperates with Chd7 to regulate genes that are mutated in human syndromes*. Nat Genet, 2011. **43**(6): p. 607-11.
299. Hoffmann, S.A., et al., *Stem cell factor Sox2 and its close relative Sox3 have differentiation functions in oligodendrocytes*. Development, 2014. **141**(1): p. 39-50.
300. Kondo, T. and M. Raff, *Chromatin remodeling and histone modification in the conversion of oligodendrocyte precursors to neural stem cells*. Genes Dev, 2004. **18**(23): p. 2963-72.
301. Kellerer, S., et al., *Replacement of the Sox10 transcription factor by Sox8 reveals incomplete functional equivalence*. Development, 2006. **133**(15): p. 2875-86.
302. Favaro, R., et al., *Hippocampal development and neural stem cell maintenance require Sox2-dependent regulation of Shh*. Nat Neurosci, 2009. **12**(10): p. 1248-56.
303. Zhao, L., et al., *Disruption of SoxB1-dependent Sonic hedgehog expression in the hypothalamus causes septo-optic dysplasia*. Dev Cell, 2012. **22**(3): p. 585-96.
304. Dominguez, M.H., A.E. Ayoub, and P. Rakic, *POU-III transcription factors (Brn1, Brn2, and Oct6) influence neurogenesis, molecular identity, and migratory destination of upper-layer cells of the cerebral cortex*. Cereb Cortex, 2013. **23**(11): p. 2632-43.
305. Qu, Q. and Y. Shi, *Neural stem cells in the developing and adult brains*. J Cell Physiol, 2009. **221**(1): p. 5-9.
306. Jin, X., et al., *Neuronal Nitric Oxide Synthase in Neural Stem Cells Induces Neuronal Fate Commitment via the Inhibition of Histone Deacetylase 2*. Front Cell Neurosci, 2017. **11**: p. 66.
307. He, W., et al., *Sonic hedgehog promotes neurite outgrowth of cortical neurons under oxidative stress: Involving of mitochondria and energy metabolism*. Exp Cell Res, 2017. **350**(1): p. 83-90.
308. Basak, O., et al., *Neurogenic subventricular zone stem/progenitor cells are Notch1-dependent in their active but not quiescent state*. J Neurosci, 2012. **32**(16): p. 5654-66.
309. Imayoshi, I., et al., *Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains*. J Neurosci, 2010. **30**(9): p. 3489-98.
310. Lugert, S., et al., *Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging*. Cell Stem Cell, 2010. **6**(5): p. 445-56.
311. Alberi, L., et al., *Notch signaling in the brain: in good and bad times*. Ageing Res Rev, 2013. **12**(3): p. 801-14.
312. Sakamoto, M., et al., *Continuous neurogenesis in the adult forebrain is required for innate olfactory responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(20): p. 8479-84.
313. Kempermann, G. and F.H. Gage, *Genetic determinants of adult hippocampal neurogenesis correlate with acquisition, but not probe trial performance, in the water maze task*. Eur J Neurosci, 2002. **16**(1): p. 129-36.
314. Takeshita, K., et al., *Critical role of endothelial Notch1 signaling in postnatal angiogenesis*. Circ Res, 2007. **100**(1): p. 70-8.
315. Ramos, C., et al., *Two Notch ligands, Dll1 and Jag1, are differently restricted in their range of action to control neurogenesis in the mammalian spinal cord*. PLoS One, 2010. **5**(11): p. e15515.
316. Trujillo-Paredes, N., et al., *Regulation of differentiation flux by Notch signalling influences the number of dopaminergic neurons in the adult brain*. Biol Open, 2016. **5**(3): p. 336-47.
317. Ghosal, K., A. Stathopoulos, and S.W. Pimplikar, *APP intracellular domain impairs adult neurogenesis in transgenic mice by inducing neuroinflammation*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11866.
318. Sun, C.N., et al., *The A2A adenosine receptor rescues neuritogenesis impaired by p53 blockage via KIF2A, a kinesin family member*. Dev Neurobiol, 2010. **70**(8): p. 604-21.
319. Minamide, R., et al., *Antagonistic interplay between necdin and Bmi1 controls proliferation of neural precursor cells in the embryonic mouse neocortex*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e84460.
320. Rolando, C., et al., *Distinct roles of Nogo-a and Nogo receptor 1 in the homeostatic regulation of adult neural stem cell function and neuroblast migration*. J Neurosci, 2012. **32**(49): p. 17788-99.
321. Tapia-Bustos, A., et al., *Modulation of Postnatal Neurogenesis by Perinatal Asphyxia: Effect of D1 and D2 Dopamine Receptor Agonists*. Neurotox Res, 2017. **31**(1): p. 109-121.
322. Sawada, H., et al., *Dopamine D2-type agonists protect mesencephalic neurons from glutamate neurotoxicity: mechanisms of neuroprotective treatment against oxidative stress*. Ann Neurol, 1998. **44**(1): p. 110-9.
323. Nishibayashi, S., et al., *Scavenging effects of dopamine agonists on nitric oxide radicals*. J Neurochem, 1996. **67**(5): p. 2208-11.
324. Ohta, K., et al., *The effect of dopamine agonists: the expression of GDNF, NGF, and BDNF in cultured mouse astrocytes*. J Neurol Sci, 2010. **291**(1-2): p. 12-6.
325. Wakabayashi, N., et al., *Regulation of notch1 signaling by nrf2: implications for tissue regeneration*. Sci Signal, 2010. **3**(130): p. ra52.
326. Calella, A.M., et al., *Neurotrophin/Trk receptor signaling mediates C/EBPalpha, -beta and NeuroD recruitment to immediate-early gene promoters in neuronal cells and requires C/EBPs to induce immediate-early gene transcription*. Neural Dev, 2007. **2**: p. 4.
327. Reyes, J.H., et al., *Glutamatergic neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells after transient expression of neurogenin 1 and treatment with BDNF and GDNF: in vitro and in vivo studies*. J Neurosci, 2008. **28**(48): p. 12622-31.

328. Mokhtari, T., et al., *Improvement of memory and learning by intracerebroventricular microinjection of T3 in rat model of ischemic brain stroke mediated by upregulation of BDNF and GDNF in CA1 hippocampal region.* Daru, 2017. **25**(1): p. 4.
329. Leung, K.W., et al., *Expression of ZnT and ZIP zinc transporters in the human RPE and their regulation by neurotrophic factors.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(3): p. 1221-31.
330. Kubota, Y., et al., *Necdin restricts proliferation of hematopoietic stem cells during hematopoietic regeneration.* Blood, 2009. **114**(20): p. 4383-92.
331. Torres, R.J. and J.G. Puig, *Hypoxanthine deregulates genes involved in early neuronal development. Implications in Lesch-Nyhan disease pathogenesis.* J Inherit Metab Dis, 2015. **38**(6): p. 1109-18.
332. Dixit, R., et al., *Neurog1 and Neurog2 control two waves of neuronal differentiation in the piriform cortex.* J Neurosci, 2014. **34**(2): p. 539-53.
333. Lanier, J., et al., *Brn3a regulates the transition from neurogenesis to terminal differentiation and represses non-neural gene expression in the trigeminal ganglion.* Dev Dyn, 2009. **238**(12): p. 3065-79.
334. Gower-Winter, S.D., et al., *Zinc deficiency regulates hippocampal gene expression and impairs neuronal differentiation.* Nutr Neurosci, 2013. **16**(4): p. 174-82.