



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

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

Posgrado en Ciencias Químicas

“Efecto de la administración de cerebrolisina sobre el patrón de expresión de microRNAs en un modelo de encefalopatía hipóxico-isquémico (EHI) neonatal en rata”

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

TESIS QUE PRESENTA:

Biol. Sandra Andrea Quintero Gutiérrez

Director:

Dra. Bertha Alicia León Chávez
Laboratorio de Investigaciones
Químico Clínicas
Facultad de Ciencias Químicas, BUAP

Codirector:

Dr. Juan Antonio González Barrios
Laboratorio de Medicina Genómica
Hospital Regional “1° de Octubre”, ISSSTE

PUEBLA, PUE.

20 de Octubre 2020

DEDICATORIA

A mi esposo Miguel Ángel, quien ha estado apoyándome en cada decisión que he tomado, quien ha estado a mi lado todo este tiempo apoyándome con paciencia y entrega y por creer en mi capacidad para poder culminar una meta más. Gracias mi amor por estar siempre sosteniéndome y animándome a ser siempre mejor.

A ti mi vida por ser una gran motivación para conseguir lo mejor para ti.

A mis padres Olga y Carlos que siempre me inculcaron a luchar por mis sueños, gracias por creer en mí y ser parte de esta etapa.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Bertha Alicia León Chávez por haberme aceptado a formar parte de su laboratorio y de su equipo, por haber creído en mí, por sus consejos y tiempo.

Agradezco al Dr. Juan Antonio González Barrios, por la dirección de esta tesis, consejos y enseñanzas durante el desarrollo de esta tesis.

Gracias a la comisión revisora formada por la Dra. Irma Pilar Herrera Camacho, Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta, Dr. Víctor Manuel Blanco Álvarez y el cDr. Manuel Lara Lozano por los aportes en la mejora de esta tesis en seminarios, escritura y revisión.

Agradezco al Dr. Daniel Martínez Fong por permitirnos desarrollar el modelo y realizar las pruebas conductuales en su laboratorio de Terapia Génica y Enfermedades Neurodegenerativas, en el CINVESTAV, Zacatenco. Al auxiliar Biol. José Ayala por su apoyo durante el desarrollo del proyecto.

Al bioterio del CINVESTAV por proporcionar a los animales de experimentación.

A CONACyT por la beca otorgada.

A mis amigos de generación Nadia, Olivia, Laura, Kenia, Rene y Erick, por su amistad .

A mis compañeros del laboratorio de Investigación Químico Clínicas gracias por sus consejos, apoyo y por siempre demostrar que el trabajo en equipo es muy importante, gracias: Kary, Ale, Tino, Pedro, Aleyda.

A mis compañeros del laboratorio de Medicina Genómica del Hospital “1° de Octubre”: Hayde, Celia, Manuel, Nancy, Cesar, Gina, por compartir su experiencia y consejos.

A mis compañeros del laboratorio de Terapia Génica y Enfermedades Neurodegenerativas: Claudia, Ernesto, Bismark, por hacerme sentir parte del laboratorio.

A mis hermanos Susana, Carlos y Emmanuel por estar siempre ahí cuando lo requerimos, por mantenernos unidos.

Finalmente, a mis padres Olga Gutiérrez Cruz y Carlos Quintero Castillo por apoyarme en todo, por su fortaleza y perseverancia.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SIGLAS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	13
ÍNDICE DE TABLAS	14
1. RESUMEN	16
2. INTRODUCCIÓN	17
2.1 DESARROLLO CEREBRAL NEONATAL	17
2.2 ENCEFALOPATÍA HIPÓXICO-ISQUÉMICO (EHI) NEONATAL	20
2.2.1 Fisiopatología de la EHI	21
2.2.2 Daño neurológico	24
2.3 CEREBROLISINA	25
2.4 miRNAs	28
2.4.1 Biogénesis de los miRNAs	29
2.4.2 microRNAs en el neurodesarrollo	31
2.5 MODELO DE EHI	33
2.6 JUSTIFICACIÓN	35
2.7 HIPÓTESIS	38
2.8 OBJETIVOS	38
2.8.1 OBJETIVO GENERAL	38
2.8.2 OBJETIVOS PARTICULARES	38
3. METODOLOGÍA	39
3.1 DIAGRAMA DE TRABAJO 1	39
3.2 DIAGRAMA DE TRABAJO 2	40
3.3 ANIMALES	41
3.3.1 Administración de cerebrolisina	41
3.4 MODELO DE ENCEFALOPATÍA HIPÓXICO-ISQUÉMICA EN RATAS	41
3.5 TINCIÓN DE VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE TTC	42
3.6 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD MOTORA	43
3.6.1 Prueba de giro dorsal	43
3.6.2 Prueba de inversión	43
3.6.3 Prueba de suspensión de las patas delanteras	43
3.6.4 Prueba del ángulo de caminata	43
3.7 OBTENCIÓN DE TEJIDO CEREBRAL	44
3.8 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL	44
3.9 ANÁLISIS DE miRNAs	45
3.9.1 Análisis bioinformático	47
3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	48
4. RESULTADOS	49
4.1 GENERACIÓN Y EVALUACIÓN DEL MODELO DE EHI	49
4.1.1 Evaluación anatómica	50

4.1.2 Evaluación conductual	52
4.1.2.1 Giro dorsal	52
4.1.2.2 Inversión	53
4.1.2.3 Suspensión de patas delanteras	54
4.1.2.4 Ángulo de caminata	55
4.1.2.5 Peso corporal	57
4.1.2.6 Apertura palpebral	58
4.1.2.7 Ptosis palpebral	59
4.2 MICROARREGLOS DE miRNAs	60
4.2.1 Frecuencia absoluta	66
4.2.2 miRNAs desregulados en el día P8	67
4.2.2.1 Corteza cerebral	67
4.2.2.2 Hipocampo	68
4.2.3 miRNAs desregulados en el día posnatal P21	71
4.2.3.1 Corteza cerebral	71
4.2.3.1 Hipocampo	73
4.3 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	76
4.3.1 MirPath v3 y TargetScan	76
4.3.1 Mapas de calor	76
4.3.1.1 Posnatal 8	76
4.3.1.1 Posnatal 21	79
TargetScan	82
4.3.3 Genes blanco que codifican para factores de crecimiento	82
4.3.3.1 miRNAs sobreexpresados en corteza cerebral en P8	82
4.3.3.2 miRNAs inhibidos en corteza cerebral en P8	83
4.3.3.5 miRNAs sobreexpresados en corteza cerebral en P21	86
4.3.3.6 miRNAs inhibidos en corteza cerebral en P21	88
4.3.3.7 miRNAs sobreexpresados en el hipocampo en P21	88
4.3.3.8 miRNAs inhibidos en el hipocampo en P21	89
4.3.4 Genes blanco que codifican para ciclinas	90
4.3.4.1 miRNAs sobreexpresados en la corteza cerebral en P8	90
4.3.4.2 miRNAs inhibidos en la corteza cerebral en P8	91
4.3.4.3 miRNAs sobreexpresados en el hipocampo en P8	92
4.3.4.4 miRNAs inhibidos en el hipocampo en P8	93
4.3.4.5 miRNAs sobreexpresados en la corteza cerebral P21	95
4.3.4.6 miRNAs inhibidos en la corteza cerebral en P21	96
4.3.4.7 miRNAs sobreexpresados en el hipocampo en P21	96
4.3.4.8 miRNAs inhibidos en el hipocampo en P21	97
4.3.5 MirPath	98
4.3.5.1 Vía del TGF- β	98
4.3.5.2 Vía de las MAPK	99
4.3.5.3 Vía del RAp1	100
4.3.5.5 Vía del WNT	101
4.3.5.4 Vía del TNF	102
5. DISCUSIÓN	104
6. CONCLUSIÓN	128
7. PERSPECTIVAS	129
8. BIBLIOGRAFIA	130

Lista de abreviaturas, acrónimos y siglas

AGO-2	Argonauta
AC	Adenilato Ciclasa
ACC	Arteria carótida común
ACCP	Arteria carótida común primitiva
AID	Corteza insular agranular dorsal
AIV	Corteza insular agranular ventral
AMPc	Monofosfato de Adenosina Cíclico
ARCV	Miocardipatía Arritmogénica del Ventrículo Derecho
ATP	Trifosfato de Adenosina
BAMBI	BMP y activina inhibidor unido a la membrana
BDNF	Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro
CA	<i>Cornu ammonis</i>
Ca ²⁺	Calcio
CAMs	Moléculas de Adhesión Celular
CAP 5'	Caperuza en la región 5'
CBF	Flujo sanguíneo cerebral
CCNA2	Ciclina A2
CCNB1	Ciclina B1
CCNB1IP1	Proteína 1 Interactuante de Ciclina B1, Proteína Ligasa de Ubiquitina E3
CCNB2	Ciclina B2
CCNC	Ciclina C
CCND1	Ciclina D1
CCND2	Ciclina D2
CCND3	Ciclina D3
CCNDBP1	Proteína de Unión de Tipo Ciclina D 1
CCNE	Ciclina E1
CCNE2	Ciclina E2
CCNF	Ciclina F
CCNG1	Ciclina G1
CCNG2	Ciclina G2
CCNH	Ciclina H
CCNI	Ciclina I
CCNI2	Miembro 2 de la Familia Ciclina I
CCNJ	Ciclina J
CCNJL	Ciclina Tipo J
CCNK	Ciclina K
CCNL1	Ciclina L1
CCNL2	Ciclina L2
CCNO	Ciclina O

CCNT1	Ciclina T1
CCNT2	Ciclina T2
CCNY	Ciclina Y
CCNYL1	Ciclina Y tipo 1
CDK1	Cinasa Dependiente de Ciclina 1
CDK2	Cinasa Dependiente de Ciclina 2
CDK3	Cinasa Dependiente de Ciclina 3
CDK4	Cinasa Dependiente de Ciclina 4
CDK5	Cinasa Dependiente de Ciclina 5
CDK6	Cinasa Dependiente de Ciclina 6
CDK7	Cinasa Dependiente de Ciclina 7
CDK8	Cinasa Dependiente de Ciclina 8
CDK9	Cinasa Dependiente de Ciclina 9
CDK12	Cinasa Dependiente de Ciclina 12
CDK13	Cinasa Dependiente de Ciclina 13
CDK14	Cinasa Dependiente de Ciclina 14
CDK15	Cinasa Dependiente de Ciclina 15
CDK16	Cinasa Dependiente de Ciclina 16
CDK17	Cinasa Dependiente de Ciclina 17
CDK18	Cinasa Dependiente de Ciclina 18
CDK19	Cinasa Dependiente de Ciclina 19
CDK2AP1	Proteína 1 asociada a la Cinasa Dependiente de Ciclina
CDK2AP2	Proteína 2 asociada a la Cinasa Dependiente de Ciclina
CDK5R1	Subunidad Reguladora 1 de la Cinasa Dependiente de Ciclina 5
CDK5R2	Subunidad Reguladora 2 de la Cinasa Dependiente de Ciclina 5
CDKL1	Cinasa Similar a la CDK1
CDKL2	Cinasa Similar a la CDK2
CDKL3	Cinasa Similar a la CDK3
CDKL4	Cinasa Similar a la CDK4
CDKN1A	Inhibidor de la CDK1A
CDKN1B	Inhibidor de la CDK1B
CDKN1C	Inhibidor de la CDK1C
CDKN2B	Inhibidor de la CDK2B
CDKN2C	Inhibidor de la CDK2C
CDKN3	Inhibidor de la CDKN3
Cereb	Cerebrolisina
Cg1	Área 1 de la Corteza de Cíngulo
Cg2	Área 2 de la Corteza de Cíngulo
CINP	Proteína de Interacción de Cinasa 2 Dependiente de Ciclina
CINVESTAV	Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
CNNM1	Ciclina y mediador 1 de transporte de cationes metálicos divalentes de dominio CBS
CNNM2	Ciclina y mediador 2 de transporte de cationes metálicos divalentes de dominio CBS

CNNM3	Ciclina y mediador 3 de transporte de cationes metálicos divalentes de dominio CBS
CNNM4	Ciclina y mediador 4 de transporte de cationes metálicos divalentes de dominio CBS
CNPPD1	Ciclina Pas1 / PHO80 conteniendo el dominio 1
CNTD1	Ciclina N-terminal conteniendo el dominio 1
CNTF	Factor Neurotrófico Ciliar
CoA	Coenzima A
cPLA2	Fosfolipasa A2 citosólica
CRK	Proto-oncogén CRK
CTGF	Factor de Crecimiento del Tejido Conectivo
CTNNB1	Beta-Catenina 1
Ctrl	Control
CUL1	Culina 1
Cx	Corteza
DEn	Núcleo Endopiriforme Dorsal
DGCR8	Región Cromosómica del Síndrome de DiGeorge 8
DHA	Ácido Docosahexaenoico
DI	Corteza Insular Disgranular
DMTF1	Factor de Transcripción de tipo myb de Unión a Ciclina D 1
dsRNA	RNA de doble cadena
DUSP2	Fosfatasa 2 de Doble Especificidad
DUSP8	Fosfatasa 8 de Doble Especificidad
E2F5	Factor de Transcripción E2F isoforma 5
ECM	Matriz Extracelular
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
EGFR	Receptor para EGF
EHI	Encefalopatía Hipóxico Isquémica
ELK4	Factor de transcripción ETS
EPS15	Sustrato 15 de la vía del receptor del EGF
EPS15L1	Sustrato de vía del receptor del EGFL1
EPS8	Sustrato de la vía del receptor del EGF 8
ERK-1/2	Cinasas Reguladas por Señales Extracelulares 43862
FGF1	Factor de Crecimiento de Fibroblastos 1
FGF2	Factor de Crecimiento de Fibroblastos 2
FGF3	Factor de Crecimiento de Fibroblastos 3
FGF4	Factor de Crecimiento de Fibroblastos 4
FGF5	Factor de Crecimiento de Fibroblastos 5
FGF7	Factor de Crecimiento de Fibroblastos 7
FGF8	Factor de Crecimiento de Fibroblastos 8
FGF9	Factor de Crecimiento de Fibroblastos 9
FGF10	Factor de Crecimiento de Fibroblastos 10
FGF11	Factor de Crecimiento de Fibroblastos 11
FGF12	Factor de Crecimiento de Fibroblastos 12
FGF13	Factor de Crecimiento de Fibroblastos 13

FGF14	Factor de Crecimiento de Fibroblastos 14
FGF16	Factor de Crecimiento de Fibroblastos 16
FGF17	Factor de Crecimiento de Fibroblastos 17
FGF18	Factor de Crecimiento de Fibroblastos 18
FGF19	Factor de Crecimiento de Fibroblastos 19
FGF20	Factor de Crecimiento de Fibroblastos 20
FGF22	Factor de Crecimiento de Fibroblastos 22
FGF23	Factor de Crecimiento de Fibroblastos 23
FGFBP1	Proteína de Unión al FGF1
FGFBP3	Proteína de Unión al FGF3
FGFR1	Receptor 1 del FGF
FGFR2	Receptor 2 del FGF
FGFR3	Receptor 3 del FGF
FGFR4	Receptor 4 del FGF
FGFRL1	Factor 1 de Receptor de FGF
FIBP	Proteína de Unión intracelular del FGF
FIGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular D
FRS2	Sustrato del Receptor 2 del FGF
FRS3	Sustrato del Receptor 3 del FGF
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GAK	Cinasa Asociada a Ciclina G
GBM	Grado Biología Molecular
GDNF	Factor Neurotrófico Derivado de Células Gliales
GFER	Factor de Crecimiento, Aumentador de la Regeneración Hepática
GFI1	Represor Transcripcional Independiente del Factor de Crecimiento 1
GFI1B	Represor Transcripcional Independiente del Factor de Crecimiento 1B
GI	Corteza Insular Granular
GLUT4	Transportador de Glucosa Tipo 4
GNAO1	Subunidad Alfa de la Proteína G de Unión a Nucleótidos de Guanina
GRB2	Proteína 2 Unida al Receptor del Factor de Crecimiento
GRB7	Proteína 7 Unida al Receptor del Factor de Crecimiento
GRB10	Proteína 10 Unida al Receptor del Factor de Crecimiento
GRB14	Proteína 14 Unida al Receptor del Factor de Crecimiento
HBEGF	Factor de Crecimiento de Unión a Heparina Similar al EGF
HDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Hepatoma
HDGFL1	Factor de Crecimiento 1 Similar HDGF
HDGFRP3	Proteína 3 Relacionada con el HDGF
HGF	Factor de Crecimiento de Hepatocitos
HGS	Sustrato de la Tirosina Cinasa Regulado por HGF
Hp	Hipocampo
ICj	Isla de Calleja
IEn	Núcleo endopiriforme Intermedio
IG	<i>Indusium griseum</i>
IGF1	Factor de Crecimiento Similar a la Insulina 1

IGF1R	Receptor del Factor de Crecimiento Similar a la Insulina 1
IGF2	Factor de Crecimiento Similar a la Insulina 2
IGF2BP1	Proteína 1 de Unión a ARNm del IGF2
IGF2BP2	Proteína 2 de Unión a ARNm del IGF2
IGF2BP3	Proteína 3 de Unión a ARNm del IGF2
IGF2BPL1	Proteína similar a la proteína 1 a ARNm del IGF2
IGF2R	Receptor de IGF2
IGFALS	Subunidad Ácida Lábil de la Proteína de Unión al IGF
IGFBP1	Proteína de Unión al IGF1
IGFBP2	Proteína de Unión al IGF2
IGFBP3	Proteína de Unión al IGF3
IGFBP4	Proteína de Unión al IGF4
IGFBP5	Proteína de Unión al IGF5
IGFBP7	Proteína de Unión al IGF7
IGFBPL1	Proteína 1 Similar al IGFB
INHBB	Subunidad Beta B de la Inhibina
iNOS	Sintasa de Óxido nítrico inducible
K ⁺	Potasio
KDa	Kilodalton
LAcSh	Escudo del <i>accumbens</i> lateral
lo	Tracto olfatorio lateral
LSS	Franja lateral del cuerpo estriado
LTBP1	Proteína 1 de Unión al TGFβ Latente
LTBP2	Proteína 2 de Unión al TGFβ Latente
LTBP3	Proteína 3 de Unión al TGFβ Latente
LTBP4	Proteína 4 de Unión al TGFβ Latente
M1	Corteza motora primaria
M2	Corteza motora secundaria
MAP Cinasa	Proteína Cinasa Activada por Mitógeno
MAP2K3	Proteína Cinasa 2 Activada por Mitógeno 3
MAP3K2	Proteína Cinasa 3 Activada por Mitógeno 2
MAP3K8	Proteína Cinasa 3 Activada por Mitógeno 8
MAP3K14	Proteína Cinasa 3 Activada por Mitógeno 14
Mg ²⁺	Magnesio
miRNA	microRNA
miRNAs	microRNAs
miRNP	Complejo de Ribonucleoproteína que Contiene miRNA
MKNK2	MAPK que Interactúa con Serina / Treonina Cinasa 2
Na ⁺	Sodio
NGF	Factor de Crecimiento Nervioso
NGFR	Receptor del NGF
NGFRAP1	Proteína 1 Asociada al NGFR
nNOS	Sintasa del Óxido Nítrico Neuronal
NO	Óxido Nítrico

NOS	Sintasa de Óxido Nítrico
NTF	Factores Neurotróficos
NUCKS1	Sustrato 1 para la Caseína-Cinasa Nuclear y CDK1
OGFRL1	Receptor 1 Similar al Factor de Crecimiento Opiode
ONOO-	Peroxinitritos
P1-P21	Posnatal1-Posnatal21
PC	Parálisis cerebral
PCP	Placa Celular Piramidal
PDGFA	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas A
PDGFB	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas B
PDGFC	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas C
PDGFD	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas D
PDGFRA	Receptor para el PDGFA
PDGFRB	Receptor para el PDGFB
PGF	Factor de Crecimiento Placentario
PI3K-Akt	Fosfatidilinositol 3 Cinasa
Pir1	Capa 1 de la Corteza Piriforme
Pir2	Capa 2 de la Corteza Piriforme
Pir3	Capa 3 de la Corteza Piriforme
PITX2	Factor de Transcripción de Homeodominio Pareado 2
PLA2	Fosfolipasa A2
PPP2CA	Subunidad Catalítica Alfa de la Proteína-Fosfatasa 2
PPP3R1	Subunidad Regulatoria B, Alfa de la Proteína-Fosfatasa 3
PROM	Ruptura Prematura de Membranas
PTPRR	Receptor de Tipo R para la Proteína-Tirosina-Fosfatasa
RanGTP	Proteína Nuclear Ran de Unión a GTP
Rap1	Proteína 1 Relacionada con Ras
RAP1B	Proteína relacionada con Ras Rap-1B
RASGRF1	Factor de Liberación de Nucleótido de Guanina Específico de Proteína RAS 2
RC3H1	Restricción de Crecimiento Intrauterino
RISC	Complejo RNA Inductor de Silenciamiento
RNAse III	Ribonucleasas III
RNAseH	Ribonucleasa H
RPM	Revoluciones por Minuto
RPS6KA1	Proteína Ribosómica S6 Cinasa A1
RPS6KA4	Proteína Ribosómica S6 Cinasa A4
RPS6KA5	Proteína Ribosómica S6 Cinasa A5
S1DZO	Corteza somatosensorial primaria oral-disgranular
S1FL	Corteza somatosensorial primaria de la extremidad anterior
S1J	Corteza somatosensorial primaria de la región mandibular
S1ULp	Corteza somatosensorial primaria del labio superior
SCAPER	Proteína Asociada a la Ciclina A en Fase S en el Retículo Endoplásmico
SEM	Error estándar de la media

SHH	Sonic hedgehog
SIDZ	Corteza somatosensorial disgranular
SMAD1	Miembro de la familia "Smilrity Mothers Against Decantaplegic 1"
SMAD2	Miembro de la familia "Smilrity Mothers Against Decantaplegic 2"
SMAD7	Miembro de la familia "Smilrity Mothers Against Decantaplegic 7"
SNC	Sistema Nervioso Central
SOS1 SOS Ras / Rac	Factor de Intercambio de Nucleótidos de Guanina 1
Spla2	Fosfolipasa A2 de Secreción
ssRNA	RNA de cadena sencilla
TBRG1	Regulador Beta del Factor de Crecimiento Transformante 1
TBRG4	Regulador Beta del Factor de Crecimiento Transformante 4
TGFA	Factor de Crecimiento Transformante Alfa
TGFB1	Factor de Crecimiento Transformante Beta 1
TGFB2	Factor de Crecimiento Transformante Beta 2
TGFB3	Factor de Crecimiento Transformante Beta 3
TGFBI	Factor de Crecimiento Transformante Beta Inducible
TGFBR1	Receptor para el TGFB1
TGFBR2	Receptor para el TGFB2
TGFBR3	Receptor para el TGFB3
TGFBR3L	Receptor Similar al TGFB3
TGFBRAP1	Proteína Asociada al TGFBR1
TGF- β	Factor de Crecimiento Transformante Beta
TRBG1	Regulador del TGFB1
TRBG4	Regulador del TGFB4
TRBP	Proteína de Unión a los Repetidos en Tandem
TTC	Tinción de cloruro de trifeniltetrazolio
Tu	Tubérculo olfatorio
UTR	Región No Traducida
VEGFA	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular A
VEGFB	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular B
VEGFC	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular C
VGf	Factor de Crecimiento Nervioso
VP	Pálido ventral
XPO5	Complejo Exportina 5
ZFYVE9	Proteína que Contiene el Dominio FYVE del Dedo de Zinc 9

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Diagrama de la comparación del desarrollo del sistema nervioso central durante la gestación de ratas y humanos	19
Figura 2.2. Biogénesis de los miRNAs..	30
Figura 3.1. El protocolo experimental resumido en el diagrama de trabajo 1	39
Figura 3.2. El protocolo experimental del diagrama de trabajo 2	40
Figura 4.1. Protocolo experimental de la estandarización del modelo deEHI	49
Figura 4.2. Lesión macroscópica en cerebros de ratas sometidas a EHI.	51
Figura 4.4. Resultados de la evaluación de la prueba de inversión	54
Figura 4.5. Resultados de la evaluación de la prueba de suspensión de patas delanteras	55
Figura 4.6. Resultados de la evaluación de la prueba de ángulo de caminata	57
Figura 4.7. Resultados del curso temporal del peso.....	58
Figura 4.8. Ptosis palpebral que desarrollaron las ratas sometidas a EHI.....	59
Figura 4.9. Mapa de calor de los mirnas sobreexpresados e inhibidos de corteza cerebral e hipocampo a los días posnatal 8 y 21	62
Figura 4.10. Frecuencia absoluta de los miRNAs	66
Figura 4.11. miRNAs sobreexpresado e inhibidos en corteza cerebral e hipocampo en ratas con EHI y cerebrolisina al posnatal 8 (p8). L.....	71
Figura 4.12. miRNAs sobreexpresado inhibidos en corteza cerebral e hipocampo en ratas con ehi y el tratamiento con cerebrolisina al posnatal 21 (p21).....	75
Figura 4.13. Mapas de calor de las vías afectadas por los miRNAs sobreexpresados e inhibidos durante el p8.....	78
Figura 4.14. Mapas de calor de las vías afectadas por los miRNAs sobreexpresados e inhibidos durante el p21	81
Figura 4.15. Vía de señalización TGF- β	99
Figura 4.16. Vía de señalización MAPK.....	100
Figura 4.17. Vía de señalización RAP1	101
Figura 4.18. Vía de señalización WNT	102
Figura 4.19. Vía de señalización TNF	103

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. miRNAs involucrados en los procesos de EHI y procesos que promueven la neurogénesis, angiogénesis y neuroreparación.....	31
Tabla 4.1. Días de la apertura del ojo en ratas que fueron sometidas a EHI por la obliteración de la ACP por 30 minutos e hipoxia por 100 minutos.....	59
Tabla 4.2. miRNAs que modificaron su expresión: 56 sobreexpresados y 49 inhibidos.	60
Tabla 4.3. miRNAs sobreexpresados en corteza cerebral en ratas con EHI comparadas con EHI + Cereb al posnatal 8 (P8).....	67
Tabla 4.4. miRNAs inhibidos en corteza cerebral en ratas con EHI comparadas con EHI + Cereb al posnatal 8 (P8).	68
Tabla 4.5. miRNAs sobreexpresados en hipocampo en ratas con EHI comparadas con EHI + Cereb al posnatal 8 (P8)	69
Tabla 4.6. miRNAs inhibidos en corteza cerebral en ratas con EHI comparadas con EHI + Cereb al posnatal 8 (P8).	70
Tabla 4.7. miRNAs sobreexpresados en corteza cerebral en ratas con EHI y el tratamiento con cerebrolisina al posnatal 21 (P21).	72
Tabla 4.8. miRNAs inhibidos en corteza cerebral en ratas con EHI y el tratamiento con cerebrolisina al posnatal 21 (P21).	73
Tabla 4.9. miRNAs sobreexpresado en hipocampo en ratas con EHI y el tratamiento con cerebrolisina al posnatal 21 (P21).	74
Tabla 4.10. miRNAs inhibidos en hipocampo en ratas con EHI y el tratamiento con cerebrolisina al posnatal 21 (P21).	74
Tabla 4.11. Factores de crecimiento que interactúan con los miRNAs sobreexpresados en corteza cerebral por el tratamiento de EHI con cerebrolisina al día P8.	82
Tabla 4.12. Factores de crecimiento que interactúan con los miRNAs inhibidos en corteza cerebral por el tratamiento de EHI con cerebrolisina al día P8.....	83
Tabla 4.13. Factores de crecimiento que interactúan con los miRNAs sobreexpresados en hipocampo por el tratamiento de EHI con cerebrolisina al día P8.....	84
Tabla 4.14. Factores de crecimiento que interactúan con los miRNAs inhibidos en hipocampo por el tratamiento de EHI con cerebrolisina al día P8.....	85
Tabla 4.15. Factores de crecimiento que interactúan con los miRNAs sobreexpresados en corteza cerebral por el tratamiento de EHI con cerebrolisina al día P2.	87
Tabla 4.16. Factores de crecimiento que interactúan con los miRNAs inhibidos en corteza cerebral por el tratamiento de EHI con cerebrolisina al día P21.....	88
Tabla 4.17. Factores de crecimiento que interactúan con los miRNAs sobreexpresados en hipocampo por el tratamiento de EHI con cerebrolisina al día P21.....	89
Tabla 4.18. Factores de crecimiento que interactúan con los miRNAs inhibidos en hipocampo por el tratamiento de EHI con cerebrolisina al día P21.....	90

Tabla 4.19. Ciclinas que interactúan con los miRNAs sobreexpresados en corteza cerebral por el tratamiento de EHI con cerebrolisina al día P8. 91

Tabla 4.20. Ciclinas que interactúan con los miRNAs inhibidos en corteza cerebral por el tratamiento de EHI con cerebrolisina al día P8..... 92

Tabla 4.21. Ciclinas que interactúan con los miRNAs sobreexpresados hipocampo por el tratamiento de EHI con cerebrolisina al día P8..... 93

Tabla 4.22. Ciclinas que interactúan con los miRNAs inhibidos en por el tratamiento de EHI con cerebrolisina al día P8. 94

Tabla 4.23. Ciclinas que interactúan con los miRNAs sobreexpresados en corteza cerebral por el tratamiento de EHI con cerebrolisina al día P21. 95

Tabla 4.24. Ciclinas que interactúan con los miRNAs inhibidos en corteza cerebral por el tratamiento de EHI con cerebrolisina al día P21 96

Tabla 4.25. Ciclinas que interactúan con los miRNAs sobreexpresados en por el tratamiento de EHI con cerebrolisina al día P21. 97

Tabla 4.26. Ciclinas que interactúan con los miRNAs inhibidos en hipocampo por el tratamiento de EHI con cerebrolisina al día P21 98

1. RESUMEN

El estudio del perfil de microRNAs es de suma importancia ya que permite conocer y predecir los mecanismos moleculares y biológicos involucrados en el desarrollo de una patología y de sus posibles tratamientos. En esta tesis estandarizamos un modelo de encefalopatía hipóxico-isquémico (EHI) en grupos de ratas neonatas para identificar los cambios del perfil de expresión de los miRNAs asociados al tratamiento con cerebrolisina. Mediante la obliteración de la arteria carótida común primitiva (ACCP) izquierda durante 30 minutos y la hipoxia de 100 minutos con mezcla de oxígeno de 8% y 92% de nitrógeno a un flujo constante de 1 L/minuto, se logró generar un daño neurológico controlado en ratas Sprague-Dawley neonatas de 7 días de nacidas. El daño se caracterizó por la presencia de tres tipos de convulsiones: tónicas, clónica y tónico-clónicas. Utilizando la tinción de cloruro de tetrazolio (TTC) se observó un daño severo en el tejido localizado en la corteza temporo-parietal ipsilateral a la oclusión de la ACCP, que conlleva a deficiencias en los reflejos primarios, resistencia y locomoción. Mediante pruebas motoras se evaluó el reflejo de enderezamiento, fuerza de las extremidades, coordinación y locomoción. Los resultados obtenidos son consistentes con lo reportado con la literatura. Para evaluar los mecanismos involucrados a nivel molecular se realizó un análisis de microarreglos con muestras de ARN total correspondientes a los grupos Intacto, Ctrl + EHI y EHI + Cereb a dos edades, posnatal 8 (P8) y posnatal 21 (P21) en machos. El resultado del análisis de microarreglos muestra un patrón de expresión de 105 miRNAs sobreexpresados e inhibidos en ratas con EHI y el tratamiento de EHI con cerebrolisina. Los genes blanco asociados a cada miRNA fueron obtenidos mediante análisis bioinformático en la plataforma TargetScan, sin embargo, en nuestro estudio fue de interés enfocarnos en factores de crecimiento y ciclinas como genes blanco. Utilizando la plataforma mirPath se determinaron las vías de señalización intracelulares en las que interactúan los miRNAs encontrados. De un grupo de miRNAs se seleccionaron los estadísticamente significativos: rno-miR-494-3p, rno-miR-21-3p, rno-miR-93-5p (corteza), rno-miR-93-5p (hipocampo), rno-miR-106b y rno-miR-17-5p. Estos miRNAs principalmente están asociados a tres vías de señalización TGF- β , RAP1 y MAPK, implicadas en procesos de neurorestauración. De esta manera identificamos procesos moleculares y biológicos que están específicamente asociados a la acción del tratamiento con cerebrolisina en el daño neurológico ocasionado por la EHI.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Desarrollo cerebral neonatal

El desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC) comienza con la formación del tubo neural, a partir del ectodermo neural **[Semple, et al 2013; Elshazzly y Caban, 2018; Silbereis, et al 2016]** y posteriormente da lugar a la formación del cerebro, a este proceso se le conoce como neurulación **[Elshazzly y Caban, 2018]**. Tanto en humanos como en ratas el desarrollo del cerebro comienza a partir de este momento (Figura 2.1). Este proceso comienza a mitad de la gestación en ratas (8-11 semanas de gestación), mientras que en humanos comienza en la semana 2 de gestación **[Schepanski, et al 2018; Semple et al, 2013]**. En ratas, a partir de la semana 11 de gestación comienza el proceso de neurogénesis, mientras que en humanos comienza en la semana 4 de gestación. En esta etapa también comienza la migración neuronal a las diferentes regiones del cerebro incluyendo corteza, en el caso de humanos este proceso dura hasta la semana 28 **[Schepanski, et al 2018; Rakic, 1990]**. Posteriormente, se produce la muerte celular o apoptosis que tiene origen a partir de las 24 semanas de gestación hasta después del nacimiento en humanos, en ratas comienza en la semana 15 **[Schepanski, et al 2018; Sharon et al, 2016]**. Durante la mitad el segundo trimestre y hasta después del nacimiento, comienzan los procesos de glicogénesis, sinaptogénesis y mielinización **[Schepanski, et al 2018]**. La mielinización comienza en el tallo cerebral y se da en la semana 29 de gestación **[Sharon et al, 2016]**. En esta misma etapa se da lugar a la invasión de células gliales. En ratas, estos procesos comienzan a mitad del embarazo, debido a que la gestación murina es más corta que en el humano **[Schepanski, et al 2018]**. En la semana 30 de gestación, se da origen a la formación de cuatro estratos de Placas Celulares Piramidales (PCP) PCP1-PCP4. En la PCP4 se originan las dendritas basales y las dendritas apicales, estas últimas se mantienen inmaduras y sin espinas **[Marin-Padilla, 2011]**. Por otra parte, en

la corteza motora se originan cinco estratos de células piramidales: PCP1, PCP2, PCP3, PCP4 y PCP5 **[Marin-Padilla, 2011]**. A partir de la semana 40 en la corteza motora se da origen al PCP6 y se caracteriza por presentar mayor número de células piramidales, es gruesa y está compuesta de materia gris. La formación de este estrato ayuda a desarrollar habilidades motoras únicas en el humano conseguidas después del nacimiento **[Marin-Padilla, 2011]**. Después del nacimiento el cerebro sigue creciendo y para los primeros 2 años de vida alcanza el 80% de su peso, mientras que, a los 5 años el tamaño del cerebro es del 90% del tamaño del adulto **[Dekaban, 1978]**. Debido a que el cerebro del recién nacido es inmaduro y aún hay procesos en desarrollo como neurogénesis, gliogenesis, sinaptogénesis y mielinización el cerebro es vulnerable a presentar diferentes problemas debido a las complicaciones durante el embarazo. Entre las patologías que se desarrollan están: parálisis cerebral, microcefalia, hemorragias cerebrales y encefalopatía hipóxico isquémica. Esta última fue de nuestro interés estudiarla debido a la alta incidencia y tasa de mortalidad.

2.2 Encefalopatía hipóxico-isquémico (EHI) neonatal

La encefalopatía hipóxico isquémico (EHI) es una de las principales causas de lesión cerebral en la etapa neonatal, debido a la privación de oxígeno por la reducción del flujo sanguíneo al cerebro en recién nacidos. La incidencia de EHI varía de 1 a 8 por cada 1000 nacidos vivos en los países desarrollados, y es tan alta como 26 por cada 1000 nacidos vivos en países subdesarrollados **[Douglas-Escobar y Weiss, 2015; Kurinczuk, et al 2010; Zaitoun, et al 2018]**. Del 15% al 20% de los recién nacidos afectados con EHI mueren en el periodo posnatal y un 25% sufrirán diferentes discapacidades **[Shankaran, 2012; Selway, 2010]** infantiles como: deficiencia visual en la que se encuentran lesiones en las estructuras visuales neurales, nervio óptico y área de la corteza visual; déficits neurológico permanente, discapacidad de aprendizaje y memoria, parálisis cerebral, retraso mental y epilepsia **[Zaitoun, et al 2018; Otani, et al 2019]**. La encefalopatía puede presentarse de forma leve, moderada y severa, por su parte la encefalopatía leve no causa problemas de déficit motor o cognitivo. Sin embargo, la encefalopatía severa es la causa de la muerte de hasta el 85% de los recién nacidos que la padecen **[Shankaran, 2012]**. No obstante, la encefalopatía moderada provoca la pérdida de diferentes funciones a largo plazo como son: problemas de memoria y aprendizaje, déficits motores y de coordinación, retraso en el desarrollo, déficits verbales e hiperactividad aumentada **[Shankaran, 2012; Teo, et al 2017]**.

Las causas más comunes y factores de riesgo que generan EHI son:

- Preclamsia.
- Embarazo post-término.
- Restricción de crecimiento intrauterino (RCIU).
- Ruptura prematura de membranas (PROM).
- Corioamnionitis y villitis.

- Aspiración de meconio.
- Macrosomía.
- Desprendimiento prematuro de la placenta.
- Placenta previa.
- Ruptura uterina.
- Doble circular del cordón umbilical.
- Prolapso del cordón umbilical.
- Distocia fetal.
- Cesárea de emergencia retrasada.
- Hipotensión materna severa.
- Hipertensión materna.
- Hemorragia fetomaterna.
- Hemorragia intracraneal o intraventricular.
- Parto distócico, (distocia cefálica), distocia de hombro, distocia de posición pélvica y podálica.
- Hipertonía uterina.
- Diabetes gestacional, especialmente cuando se acompaña de RCIU grave.
- Accidente cerebrovascular en el momento del nacimiento **[American Baby and Child]**.

2.2.1 Fisiopatología de la EHI

La EHI involucra dos cascadas separadas de eventos en humanos, una dentro de las primeras 72 horas posteriores a la lesión llamada fase aguda a subaguda y una fase que persiste semanas después llamada fase crónica. En la fase aguda, hay una falla de energía primaria en el cerebro, a causa del déficit del flujo sanguíneo cerebral que conlleva a una disminución de oxígeno y glucosa, lo que disminuye la producción de trifosfato de adenosina (ATP) y conlleva a una mayor producción de lactato, debido a que el cerebro utiliza metabolismo anaeróbico en un esfuerzo por mantener

su capacidad funcional. La depleción de ATP causa la falla de múltiples mecanismos que mantienen la integridad celular, particularmente las bombas y los mecanismos de Sodio/Potasio (Na^+/K^+) que resulta en la “despolarización membranal”. El Na^+ y K^+ son los encargados de mantener el calcio intracelular bajo, por lo que, al ser afectada la bomba Na^+/K^+ ATPasa conlleva a la acumulación de sodio, calcio y agua en las células cerebrales, produciendo edema tisular. Además, de una acumulación de ácidos grasos y aumentando radicales libres de oxígeno que induce a muerte celular por apoptosis **[Otani, *et al* 2019; Allen y Brandon, 2011; Selway, 2010]**.

A esta cascada de eventos se le conoce como permeabilidad alterada de la membrana celular, seguida de la liberación de neurotransmisores al espacio extracelular. Entre los principales neurotransmisores liberados se encuentra el glutamato, este provoca un efecto tóxico sobre las neuronas conocido como excitotoxicidad, la cual es mediada por el incremento de Ca^{2+} intracelular. En cuanto a la liberación de otros neurotransmisores se encuentra la noradrenalina y adenosina que activan al adenilato ciclasa (AC) unido a la membrana y provoca aumenten los niveles de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) en las células gliales, lo que contribuye al desarrollo de edema astrocítico perivascular y perineuronal. Por otra parte, el Mg^{2+} juega un papel regulador en el potencial de membrana impidiendo la entrada de Ca^{2+} hacia el citoplasma de la célula, a causa de la despolarización inducida por la activación del receptor a glutamato, por lo tanto, el magnesio (Mg^{2+}) es desplazado de su localización original y el canal queda libre para la entrada masiva de Ca^{2+} hacia el citoplasma célula **[Volpe, 2001; Morales, *et al* 2008]**.

Por otra parte, se ha demostrado que la isquemia cerebral causa la sobreproducción de Óxido Nítrico (NO), debido a la sobreproducción de las

tres isoformas de la Sintasa de Óxido Nítrico (NOS). Así mismo, la activación de dos de las isoformas, la Sintasa de Óxido Nítrico Endotelial (eNOS) y la Sintasa de Óxido Nítrico Neuronal (nNOS), se produce por el incremento de Calcio (Ca^{2+}). Por el contrario, la activación de la isoforma Inducible de la Sintasa de Óxido Nítrico (iNOS) es independiente de Ca^{2+} . La sobreproducción del NO tiene efectos tóxicos como la formación de Peroxinitritos (ONOO^-), la cual induce cariorrexis, inhibición enzimática e intensificación de la excitotoxicidad **[Montaner, 2007]**.

Así mismo, la alta concentración de Ca^{2+} durante la fase aguda de la isquemia activa la isoforma A2 de la Fosfolipasa Citosólica (cPLA2) dependiente de Ca^{2+} , si esta sobreestimulada y se prolonga durante suficiente tiempo, se induce la activación de la Fosfolipasa A2 de Secreción (sPLA₂). La sobreactivación de las Fosfolipasas A2 (PLA2) provocan la acumulación de productos de degradación de fosfolípidos de la membrana, como son el ácido araquidónico (AA) y el ácido docosahexaenoico (DHA), causando muerte celular **[Montaner, 2007]**.

Con este panorama del desarrollo de la fisiopatología de la EHI se puede entender cómo se desarrolla el daño a partir de la reducción del flujo sanguíneo y oxígeno en el cerebro del neonato. La EHI se puede clasificar en leve en donde los síntomas no son detectables, moderada en donde desarrolla letargo y el tono muscular es bajo, reflejos lentos o ausentes y presencia de convulsiones **[Amerian Baby and Child]**. Finalmente, EHI severa conduce al desarrollo de discapacidades permanentes y severas, ausencia de reflejos, falta de reacción a los estímulos y el desarrollo de convulsiones clasificadas como sutiles, tónicas, mioclónicas de tipo focal, multifocal o generalizada **[Amerian Baby and Child; Panayiotopoulos, 2005]**.

2.2.2 Daño neurológico

La isquemia cerebral se define estrictamente como la privación de O₂ secundaria a la detención del flujo sanguíneo cerebral (CBF), por su parte, la hipoxia es la reducción de oxígeno en el cerebro, provocando daño generalizado. Por tanto, la isquemia cerebral es generalmente más severa que la hipoxia, debido a que el suministro de oxígeno y glucosa se ve afectado y, por lo tanto, se detiene la eliminación de los productos de desecho metabólico generados en el cerebro **[Schmidt-Kastner, 2015]**.

En estudios neuropatológicos de modelos animales se ha observado un patrón de vulnerabilidad selectiva con el aumento de la duración de la isquemia. En ratas, la repercusión de la isquemia ha sido ampliamente caracterizado en el área *Cornu Ammonis* (CA1) del hipocampo es generalmente la estructura más sensible a la isquemia, seguida por la neocorteza y por el núcleo estriado o *caudate-putamen*, dentro de las células más vulnerables también se incluyen las células del cerebelo. Por lo tanto, el daño inducido experimentalmente puede calibrarse en un modelo de estudio, específicamente en rata para que el hipocampo se vea afectado de forma selectiva, mientras que ocurra una pérdida celular menor en la neocorteza y que el cuerpo estriado permanezca intacto **[Northington, et al 2011]**. En base a los datos morfológicos y bioquímicos se ha establecido que la degeneración se clasifica de acuerdo al tipo de muerte celular por apoptosis-necrosis, autofagia, necroptosis (necrosis celular programada) y muerte por excitotoxicidad tienen una contribución prominente en la neurodegeneración inducida por la EHI en modelos animales. Es probable que la EHI neonatal provoque una amplia gama de mecanismos que se activan según el tipo y la dinámica de la lesión **[Northington, et al 2011; Badr Zahr y Purdy, 2006]**.

En infantes algunos mecanismos investigados provienen de partos distócicos, desprendimiento prematuro de placenta, pH del cordón <7, falla

multiorgánica, entre otros **[Logitharajah, et al 2009]**. Así mismo, el nivel de daño depende de elementos como la severidad, patrón temporal y tipo de lesión, así como de la edad gestacional y estatus metabólico del infante **[Inder y Volpe, 2000]**. En cuanto a la progresión y tipo de daño, se requiere identificar mecanismos como estrés oxidativo y los diferentes fenotipos de muerte celular **[Gill y Perez-Polo, 2008]**. Debido al daño ocasionado por la EHI y otras enfermedades cerebrovasculares se ha propuesto el uso de tratamientos con propiedades neuroprotectoras y neuroreparadoras como es el caso de la cerebrolisina.

2.3 Cerebrolisina

La cerebrolisina es un preparado de péptidos parentales, producidos por digestión controlada de cerebros porcinos libres de lípidos, que actúan como factores neurotróficos, teniendo efecto neuroprotector y neurorestaurador, que previene la apoptosis o necrosis prematura de las neuronas y promoviendo el crecimiento neuronal. Consiste de aproximadamente 25% de péptidos de bajo peso molecular menor a 10 Kilo Dalton (KDa) y una mezcla de aproximadamente 75% de aminoácidos libres **[Gromova, et al 2014; Zhang, et al 2013]**.

La cerebrolisina está compuesta por diferentes fragmentos activos de factores neurotróficos dentro de los que se incluyen: Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro (BDNF), Factor de Crecimiento Nervioso (NGF), Factor Neurotrófico Derivado de la línea Celular Glial (GDNF) y Factor Neurotrófico Ciliar (CNTF), así como por neuropéptido VF, encefalinas, orexinas y galaninas **[Gevaert, et al 2015; Gromova, et al 2014]**.

Debido a su potencial como tratamiento sintomático y como agente modificante de la lesión traumática, los Factores Neurotróficos (NTF) son de suma importancia en las intervenciones terapéuticas de múltiples enfermedades neurodegenerativas. A pesar de que aún se desconoce el

papel que juegan los NTF en enfermedades neurológicas, varias neurotrofinas que pertenecen a la familia de NTF, han sido descritas en varios experimentos, tanto *in vitro* como *in vivo* de diferentes patologías con el objetivo de obtener prevención y eficacia terapéutica en supervivencia neuronal. Estas moléculas, debido a sus distintas propiedades neuroprotectoras, demostraron un efecto acumulativo para frenar la progresión de la enfermedad y disminuir las secuelas neurológicas, mostrando un alto potencial en neurorestauración **[Zhang, et al 2013; Plosker y Gauthier, 2009; Sharma, 2007]**.

Además, la cerebrolisina incrementa la proliferación de células progenitoras neuronales, así como su diferenciación, es decir induce neurogénesis y oligodendrogénesis, efectos relacionados con la activación de la vía Sonic Hedgehog (SHH) **[Zhang, et al 2013; Zhang, et al 2019]**. También se demostró que la cerebrolisina activa el crecimiento de las células progenitoras neurales mediante la activación de la vía de señalización del fosfatidilinositol 3 cinasa Akt (PI3K/Akt) y en consecuencia induce mejoría en el desempeño de las pruebas neurológicas **[Gromova, et al 2016]**. Se sabe que la ruta de señalización de PI3K/Akt es activada por el factor de crecimiento nervioso (NGF) y por la orexina, ambos componentes activos de la cerebrolisina **[Gevaert, et al 2015; Gromova, et al 2014]**. Además, el NGF promueve el ciclo de división celular que involucra ciclinas y cinasas dependientes de ciclina, por otro lado, la orexina estimula la captación de glucosa en el tejido neural mediante la translocación del Transportador de Glucosa Tipo 4 (GLUT4) a la membrana celular **[Gromova, et al 2016]**.

Es importante resaltar que el NGF y la orexina estimulan la síntesis y secreción del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF), otro de los componentes activos de la cerebrolisina, el cual activa la vía de señalización PI3K/Akt. Por otro lado, el NGF activa la ciclina dependiente de

cinasa 5 (cdk5) a través de la síntesis de AMPc, activando de esta forma los procesos de crecimiento celular y neuro-protección. El NGF regula la expresión del BDNF mediante la inducción de la vía de las proteínas cinasas activadoras de mitogenesis (MAPK) reguladas extracelularmente (ERK-1/2). El péptido neuro-protector orexina suprime la tolerancia post isquémica a la glucosa y el daño neuronal, aumentando la actividad de BDNF **[Zhang, et al 2013; Plosker y Gauthier, 2009; Sharma, 2007]**.

Las posibles estrategias para el tratamiento del accidente cerebrovascular isquémico incluyen la administración de agentes trombolíticos por vía intravenosa, neuroprotección y reparación neuronal. Aunque la trombólisis ha sido el único tratamiento aprobado para el accidente cerebrovascular isquémico, existe el riesgo de hemorragia y su ventana de tratamiento es estrecha (4–5 horas) lo cual limita el número de pacientes (5 a 10%) que reciben dicho tratamiento **[Liu, et al 2013]**. Otros agentes neuroprotectores que se han desarrollado y probado en ensayos clínicos hasta ahora tampoco han logrado resultados favorables. A pesar de que la terapia de reparación neuronal se ha vuelto viable, su progreso se ha visto obstaculizado debido a la falta de comprensión completa de los mecanismos de acción moleculares. Por ello, se propone el estudio de los miRNAs ya que están involucrados en la activación de diferentes procesos moleculares y que, además, controlan la expresión génica uniéndose a los ARNm y promoviendo su degradación y/o represión traduccional. Desde el descubrimiento del primer miRNA, lin-4, los estudios sobre miRNAs han crecido exponencialmente. A la fecha, los roles de los miRNAs han sido demostrados en numerosos procesos fisiopatológicos, incluyendo la enfermedad cerebrovascular, cáncer, enfermedades autoinmunes y crónico-degenerativas. El perfil de expresión de miRNAs en tejido cerebral isquémico y sangre fue reportada por primera vez en el año 2013 **[Liu, et al 2013]**.

2.4 miRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son pequeñas moléculas de ARN de cadena sencilla y corta, que no codifican para ninguna proteína, su tamaño varía desde 18 hasta los 22 nucleótidos, son importantes para la regulación postranscripcional de la expresión de genes. Su mecanismo de acción es por su unión complementaria a la región 3' no traducida (UTR) del ARNm, esta unión puede conducir tanto a la degradación del ARNm como a la inhibición de la traducción, esto dependerá de su complementariedad con el ARNm diana [Ponnusamy, *et al* 2016; Huntzinger y Izaurralde, 2011]. Si la complementariedad es elevada o total se producirá la degradación del ARNm, en cambio si la complementariedad es parcial se producirá la inhibición de la traducción por secuestro del ARNm. Poseen un papel importante como reguladores genéticos en el desarrollo, la diferenciación celular, el crecimiento y la neurogénesis [Lang y Shi, 2012; Kawahara y Okano, 2012; Taouis, 2016]. Los microRNAs están altamente conservados y se expresan en diferentes organismos como plantas, hongos, mamíferos, bacterias, levaduras e incluso en virus [Cardin y Borchert, 2017], la cantidad de miRNAs en los organismos aún no ha sido determinada completamente.

Los primeros genes que codifican para los microRNAs que fueron descubiertos son: *lin-4* y *let-7* en *Caenorhabditis elegans*, estos miRNAs están encargados de controlar el tiempo de desarrollo en nematodos al modular la expresión de otros genes a nivel postranscripcional [Bhaskaran y Mohan, 2014]. A partir de este descubrimiento se pensó que este proceso de regulación de la expresión génica era exclusivo de este nematodo. Posteriormente, se realizaron investigaciones y mediante la clonación e identificación, se encontró que muchos estaban conservados evolutivamente entre especies y exhibían especificidad de tipo celular. Desde entonces se han reportado genes de miRNAs en una gran cantidad de especies [Bhaskaran y Mohan, 2014; Inui, *et al* 2010].

2.4.1 Biogénesis de los miRNAs

Los genes que codifican para los miRNAs están localizados principalmente en las regiones intrónicas de genes que codifican para una proteína, aunque también se pueden encontrar en regiones intergénicas o exónicas tanto en el UTR 5' como en el UTR 3' [Lee, et al 2004; Zeng, 2006; Rodriguez, et al 2004]. La biogénesis de los miRNAs comienza (Figura 2.2) con la transcripción de los genes de miRNA, los cuales se transcriben mediante la RNA polimerasa II en forma de transcritos primarios (pri-miRNAs) con una longitud que puede ser hasta de un kilobase [Lamadrid-Romero, et al 2014]. Esta forma es una estructura de horquilla-tallo-bucle ("hairpin stem-loop"). La mayoría de los pri-miRNAs presentan una protección en la región 5' por metilación denominada cap 5' y una cola de poliadenilación en la región 3', similar a la de los ARNm [Lee, et al 2004; Davis-Dusenbery y Hata, 2010]. Un pri-miRNA está compuesto por una región central o troncal ("stem") de una longitud aproximada de 30-40 nucleótidos, un lazo u horquilla terminal ("loop") y dos regiones de RNA de cadena sencilla (ssRNA) localizadas en cada extremo opuesto a la región central. Las regiones ssRNA y la región central son reconocidas por la endoribonucleasa tipo III (RNAsa III) conocida como Drosha (mamíferos), que está asociada con la proteína *Digeorge Syndrome Chromosomal Region 8* DGCR8 (mamíferos). Ambas proteínas se localizan en el núcleo celular formando el denominado complejo microprocesador (microprocessor complex) [Denli, et al 2004; Han, et al 2004]. Drosha corta de forma asimétrica ambas cadenas en la base de la región central generando un producto de 60-100 nucleótidos [Davis-Dusenbery y Hata, 2010], que se asemeja a una horquilla, denominado precursor de miRNA (pre-miRNA). Una vez generado el pre-miRNA, es exportado al citoplasma de forma activa por un complejo exportina 5 / Proteína nuclear Ran de unión a GTP (XPO5) / RanGTP y luego es procesado por la endoribonucleasa tipo III (RNAsa III) Dicer. Por su parte, Dicer se asocia

a la Proteína de Unión a RNA del Elemento de Respuesta de Transactivación (TRBP) [Taouis 2016]. Este procesamiento implica la eliminación del bucle terminal, lo que resulta en un dúplex de miRNA conformado por 22 nucleótidos. Después de este procesamiento el dúplex de miRNA interacciona con un complejo multiproteico conocido como RISC (“RNA-inducing silencing complex) formado por la asociación del miRNA maduro al complejo Dicer/TRBP en el que se une la proteína de la familia Argonauta (AGO2), una endonucleasa de tipo ribonucleasa H (RNAsaH). Esta asociación es esencial para el ensamblaje y la función del complejo RISC. RISC guiará al miRNA maduro a la secuencia diana de ARNm (3'-UTR) que conducen a la degradación del ARNm y por ende a la represión de la traducción [O'Brien, et al 2018; Davis-Dusenbery y Hata, 2010; Taouis 2016].

Se ha demostrado que los miRNAs juegan un papel muy importante en la neurogénesis, plasticidad y conexión sináptica [Hohjoh y Fukushima, 2007; Oslen, et al 2009; Schrott, et al 2006].

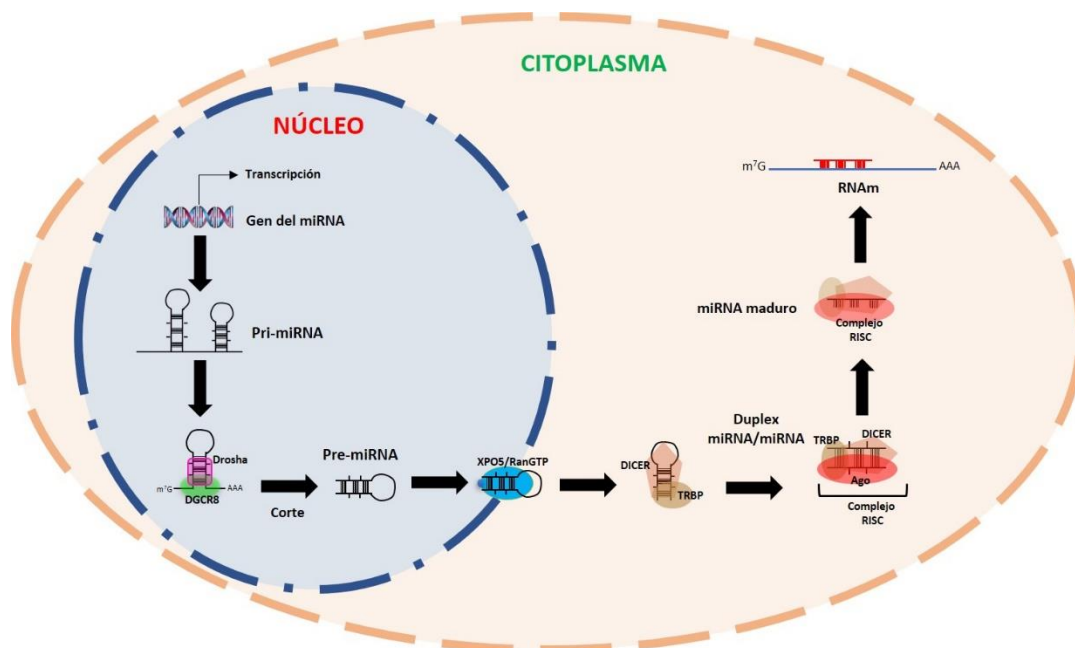


Figura 2.2. Biogénesis de los miRNAs. Muestra el proceso de maduración de los miRNAs y las diferentes etapas (modificado de Wilson, 2014 y He, et al 2016).

2.4.2 microRNAs en el neurodesarrollo

La neurogénesis se puede definir como la generación de neuronas nuevas maduras y funcionales a partir de las células madre neuronales y de células progenitoras [Shi, *et al* 2010; Lang y Shi, 2012]. Este proceso es fundamental para el desarrollo embrionario del sistema nervioso central, así como para la plasticidad cerebral en la edad adulta [Shi, *et al* 2010]. La neurogénesis conlleva varios pasos, en los que incluye la proliferación, autorrenovación, migración, integración, maduración y diferenciación neuronal [Shi, *et al* 2010; Lang y Shi, 2012; Taleisnik, 2012]. Durante el desarrollo embrionario las redes neuronales comienzan a organizarse mientras que en el adulto están completamente establecidas y las neuronas nuevas deben integrarse a un ambiente altamente complejo [Taleisnik, 2012].

Por otro lado, se ha demostrado que los miRNAs juegan un papel importante en los procesos biológicos, incluyendo neurogénesis, ya que participan en múltiples pasos de este último proceso. Los miRNAs también tienen un papel crítico en la maduración de los oligodendrocitos y en su mielinización [Cho *et al.*, 2019; Ponnusamy y Yip 2019]. Los estudios de expresión de microRNAs en ratones y humanos han demostrado que aproximadamente el 70% de los miRNAs identificados se expresan en el tejido cerebral [Cao, *et al* 2006; Motti, *et al* 2012]. Existen diferentes miRNAs que han sido reportados en los procesos fisiopatológicos de la EHI y en los procesos que promueven la neurogénesis, angiogénesis y neuroprotección (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. miRNAs involucrados en los procesos de EHI y procesos que promueven la neurogénesis, angiogénesis y neuroreparación. Se muestra el miRNA involucrado en el proceso y la referencia de cada uno.

Proceso	miRNA	Ref.
miRNAs en EHI	miR-9	Sempere, <i>et al</i> 2004
	miR-21	Motti, <i>et al</i> 2012
	miR-210	Qiu, <i>et al</i> 2013
	miR-124	Krichevsky, <i>et al</i> 2006

miRNAs en neurogénesis, angiogénesis y neuroreparación	miR-210	Kawahara, <i>et al</i> 2012
	miR-106b-25	Cho, <i>et al</i> 2019
	miR-137	Silber, <i>et al</i> 2008
	miR-184	Liu, <i>et al</i> 2010

La expresión del miR-9 en toda la pared cortical con una mayor expresión en la zona ventricular fue encontrada al inicio de la neurogénesis en cultivos de células madre neurales en ratón adulto. También se observó que tiene una correlación inversa entre la expresión del miR-9 y el miembro 1 del receptor nuclear de la subfamilia 2 y del grupo E (NR2E1) o TLX durante la diferenciación del sistema nervioso central y también regula la proliferación de células madre neuronales en la edad adulta, es decir el miR-9 inhibe la expresión de NR2E1. Esto sugiere que el miR-9 regula la proliferación y diferenciación de células madre neuronales **[Zhao, *et al* 2009]**. Por otra parte, se demostró que la regulación positiva de miR-21 en neuronas corticales cultivadas *in vivo* previenen sustancialmente el daño causado por la privación de oxígeno y la muerte celular apoptótica inducida en accidentes cerebrovasculares, por a la deprivación de glucosa. Sin embargo, en condiciones de privación de oxígeno y glucosa la inhibición del miR-21 endógeno mediante una sonda antisentido, exacerba la muerte celular. Estos datos indican que la sobreexpresión de miR-21 protege contra la muerte neuronal post isquémica **[Motti, *et al* 2012]**. Por otra parte, se observó que el miR-210 protege a las células de la apoptosis provocada por la hipoxia en un modelo de EHI neonatal en rata. Se sabe que el miR-210 tiene múltiples funciones en la regulación celular en respuesta a bajos niveles de oxígeno, además de tener efectos neuroprotectores mediante la inhibición de la apoptosis en un modelo de EHI **[Qiu, *et al* 2013]**. Además, la sobreexpresión de miR-210 induce neurogénesis en el cerebro del ratón adulto, lo que está asociado con la regulación positiva de VEGF **[Kawahara, *et al* 2012]**.

Por su parte, el grupo de miRNAs integrado por: miR-17-92, miR-106a-363 y miR-106b-25 son esenciales para el desarrollo apropiado de las células embrionarias pluripotenciales del blastocito humano [Cho, et al 2019]. Estudios previos revelan que la sobreexpresión de miR-17-92 en los axones de las células corticales embrionarias modula los niveles de la proteína PTEN y aumenta el crecimiento axonal [Zhang, et al 2013]. También se ha observado que la expresión de miR-124 aumenta en el desarrollo del cerebro [Krichevsky, et al 2006]. Se ha observado que el miR-9 y miR-124 se expresan de forma exclusiva en el cerebro [Krichevsky, et al 2006; Sempere, et al 2004]. La expresión del miR-137 inhibe la proliferación y promueve la diferenciación de las células madre neuronales (NSC: Neural Stem Cells) derivadas de la zona subventricular (SVZ: Subventricular Zone) de cerebros de ratones adultos [Silber, et al 2008]. Por el contrario, el miR-184 promueve la proliferación celular de NSC e inhibe su diferenciación [Liu, et al 2010]. Para poder entender los procesos en los cuales están involucrados los miRNAs en la EHI es importante generar un modelo con características clínicas semejantes que presentan los bebés recién nacido.

2.5 Modelo de EHI

La fisiopatología de la EHI neonatal es difícil de estudiar en seres humanos, por lo que se han requerido de la utilización de modelos animales inducidos en roedores, siendo éstos los animales más utilizados en investigaciones de EHI, seguido de lechones y ovejas [Vanucci y Vanucci, 2005].

El modelo más usado en la literatura es el de crías de rata descrito por Ricce-Vannuci [Volpe, 2012]. Es un modelo que evolucionó del modelo de daño cerebral que propuso Levine en 1960. En este modelo se realiza la oclusión unilateral de la carótida, y posteriormente se somete al animal a un ambiente hipóxico (8-12% O₂) con nitrógeno (88-92%) durante un tiempo variable (90-150 minutos), mientras se mantiene en un ambiente

termoestable (37°C). Este método produce una lesión unilateral que abarca los ganglios basales, el hipocampo y parte de la corteza [Volpe, 2012]. El daño isquémico durante el desarrollo de la rata produce alteraciones en la neurogénesis, afectando los procesos de proliferación, migración, diferenciación y maduración de las neuronas, donde participan múltiples procesos como la regulación de la traducción por miRNAs.

El desarrollo de fármacos para neonatos es una necesidad imperante tanto para la medicina clínica como para la investigación, lo cual significa la realización de estudios del cerebro en desarrollo. Sin embargo, su implementación en humanos conlleva riesgos inherentes, lo cual requiere de la implementación de modelos animales. Existen también ciertas limitantes en la aplicación del conocimiento generado en modelos animales a seres humanos como son la maduración del cerebro, la bioseguridad y la comorbilidad. Los resultados de estudios en modelos animales requieren un conocimiento específico sobre la traducción entre especies, en particular cuando el fármaco está orientado como un agente terapéutico para el cerebro neonatal.

Los roedores son utilizados frecuentemente en investigación terapéutica y experimentos traslacionales, no obstante, la determinación del equivalente exacto del desarrollo entre especies es aún un problema abierto. Aun cuando se realizan estudios que utilizan roedores de diferentes edades, las diferencias de especies en etapas críticas del desarrollo del SNC pueden manifestar vulnerabilidad y en particular procesos regenerativos difíciles de interpretar. Sin embargo, los estudios en animales han proporcionado un aumento sustancial en el conocimiento y la interpretación de la traducción entre especies.

Estudios de lesión cerebral han empleado roedores en los días postnatales 7-10 como una aproximación equivalente a un neonato humano de término

(40 semanas de gestación), basado históricamente en la medición de los pesos cerebrales post mortem durante la década de los 70's [Semple, et al 2013]. Aun cuando la escala de tiempo es considerablemente diferente, la secuencia de eventos clave en la maduración del cerebro es sistemáticamente consistente entre humanos y roedores. Adicionalmente, es posible trazar paralelos en la interpretación de vulnerabilidades locales, así como en manifestaciones funcionales consecuentes a lesiones cerebrales.

2.6 JUSTIFICACIÓN

La encefalopatía hipóxico isquémico (EHI) es una de las principales causas de lesión cerebral en la etapa neonatal, debido a la privación de oxígeno secundaria a la reducción del flujo sanguíneo al cerebro en el recién nacidos. La incidencia de EHI no ha disminuido incluso con los avances en la atención obstétrica (es decir, la monitorización fetal) dirigida a prevenir el evento hipóxico-isquémico. Por lo tanto, gran parte de la investigación neonatal actual sobre EHI se enfoca en minimizar el daño cerebral y el desarrollo posterior de secuelas tardías.

En el pasado, las opciones de tratamiento se limitaron a la terapia médica de apoyo para mantener la función cardiopulmonar y controlar la actividad convulsiva. Actualmente, la terapéutica se concentra en la preservación de la vida dejando de lado la neuroprotección y neurorestauración. Diferentes estrategias para el tratamiento del EHI incluyen la trombólisis, neuroprotección y reparación neuronal mediante neuropéptidos. Aunque, la trombólisis ha sido el único tratamiento aprobado para el accidente cerebrovascular isquémico trombótico, existe el riesgo de hemorragia y su ventana terapéutica es estrecha (4–5 horas), lo cual limita el número de pacientes (5 a 10%) que pueden recibir dicho tratamiento [Lui, et al 2013]. Se han desarrollado diferentes fármacos con acción neuroprotectora, los cuales ya han sido probados en ensayos clínicos, sin embargo, hasta ahora,

tampoco han logrado resultados favorables. A pesar de que la terapia de reparación neuronal se ha vuelto viable, su traslación clínica se ha visto obstaculizada debido a la falta de comprensión completa de los mecanismos de acción molecular. Otro elemento fundamental es el hecho de que los efectos del daño hipóxico-isquémico son complejos y evolucionan con el tiempo. El desarrollo de signos y síntomas dificulta que los proveedores de atención médica determinen las opciones de tratamiento oportunas y apropiadas. Los eventos patológicos de EHI ocurren en dos fases: falla de energía primaria y falla de energía secundaria [**Allen y Brandon, 2011**].

La mayoría de los tratamientos emergentes para mejorar los efectos de la falla de energía secundaria en EHI incluyen: disminución del agotamiento de energía, inhibición de la liberación de glutamato, mejora de la absorción de glutamato, bloqueo de los receptores de glutamato, inhibición de la inflamación y bloqueo de los eventos intracelulares posteriores. Los principales tratamientos emergentes que se están explorando ya en la clínica incluyen: hipotermia moderada, eritropoyetina, trasplante de células madre hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical, medicamentos antiepilépticos, xenón, Ácido Docosahexaenoico (DHA) y agonistas cannabinoides. Algunas de estas terapias se exploran de forma aislada, mientras que otras se combinan con hipotermia moderada u otros tratamientos con la esperanza de que los efectos sinérgicos mejoren los resultados para los neonatos. Sin embargo, los mecanismos exactos de las acciones de los tratamientos emergentes siguen siendo desconocidos [**Lui, et al 2013**].

La cerebrolisina es un agente farmacológico neuroprotector con resultados prometedores, la cerebrolisina, consiste de una preparación peptídica parenteral, producida por digestión controlada de cerebros porcinos sin

lípidos. Numerosos estudios clínicos basados en evidencia indicaron un efecto positivo del fármaco para el tratamiento del accidente cerebrovascular en pacientes adultos, lesión cerebral traumática, demencia y encefalopatía hipóxico-isquémica perinatal. Aunque la eficacia terapéutica es alta y la acción multimodal de cerebrolisina ya ha sido comprobada, los mecanismos moleculares de acción farmacológica de cerebrolisina aún no están completamente descritos **[Gromova, et al 2014]**.

Es conocido que los miRNAs están involucrados en la modulación de los procesos de neurogénesis. Se ha encontrado que los miRNAs son un elemento clave para identificar los mecanismos implicados en el daño por EHI producido a nivel molecular. Hasta la fecha, los roles de los miRNAs han sido demostrados en numerosos procesos fisiopatológicos, incluyendo el accidente cerebrovascular, cáncer, enfermedades autoinmunes y en enfermedades crónico-degenerativas. El perfil de expresión de miRNAs después de la isquemia cerebral y sangre fue reportada por primera vez por en 2013 **[Lui, et al 2013]**. En la presente investigación consideramos que el estudio del perfil de miRNAs de tejido cerebral, en un modelo de EHI en ratas neonatas tratadas con cerebrolisina, es de gran importancia para contribuir a determinar los mecanismos de acción moleculares implicados en los procesos de neurorestauración promovidos por cerebrolisina.

2.7 HIPÓTESIS

La cerebrolisina, administrada por vía intraperitoneal a ratas neonatas con EHI, induce cambios en los patrones de expresión de miRNAs relacionados con el desarrollo neuronal.

2.8 OBJETIVOS

2.8.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de cerebrolisina sobre el perfil de la expresión de los miRNAs asociados a neurorestauración en un modelo de EHI.

2.8.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto de la cerebrolisina en un modelo de EHI neonatal en ratas de 7 días de nacidas sobre:
 - Disfunción motora
 - El perfil de expresión de los miRNAs
2. Analizar bioinformáticamente los genes regulados por miRNAs relacionados en el desarrollo neuronal.

3. METODOLOGÍA

3.1 DIAGRAMA DE TRABAJO 1

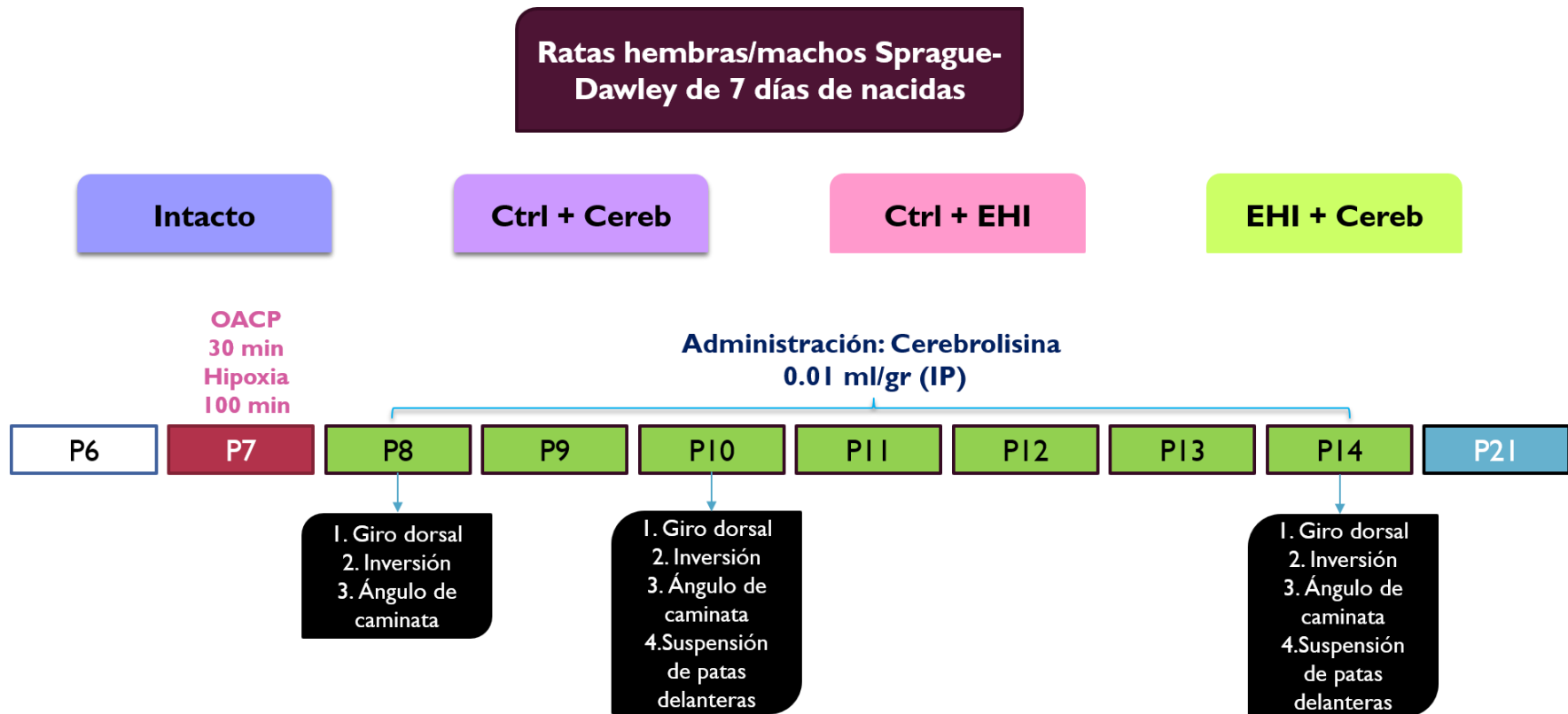


Figura 3.1. El protocolo experimental resumido en el diagrama de trabajo 1, muestra los grupos de estudio (4) y la línea cronológica de las edades de los grupos de experimento. En color vino en la edad P7 fue el día que se realizó la cirugía, seguido de los días del tratamiento desde P8 hasta P14 (color verde) y las pruebas motoras (color negro).

3.2 Diagrama de trabajo 2

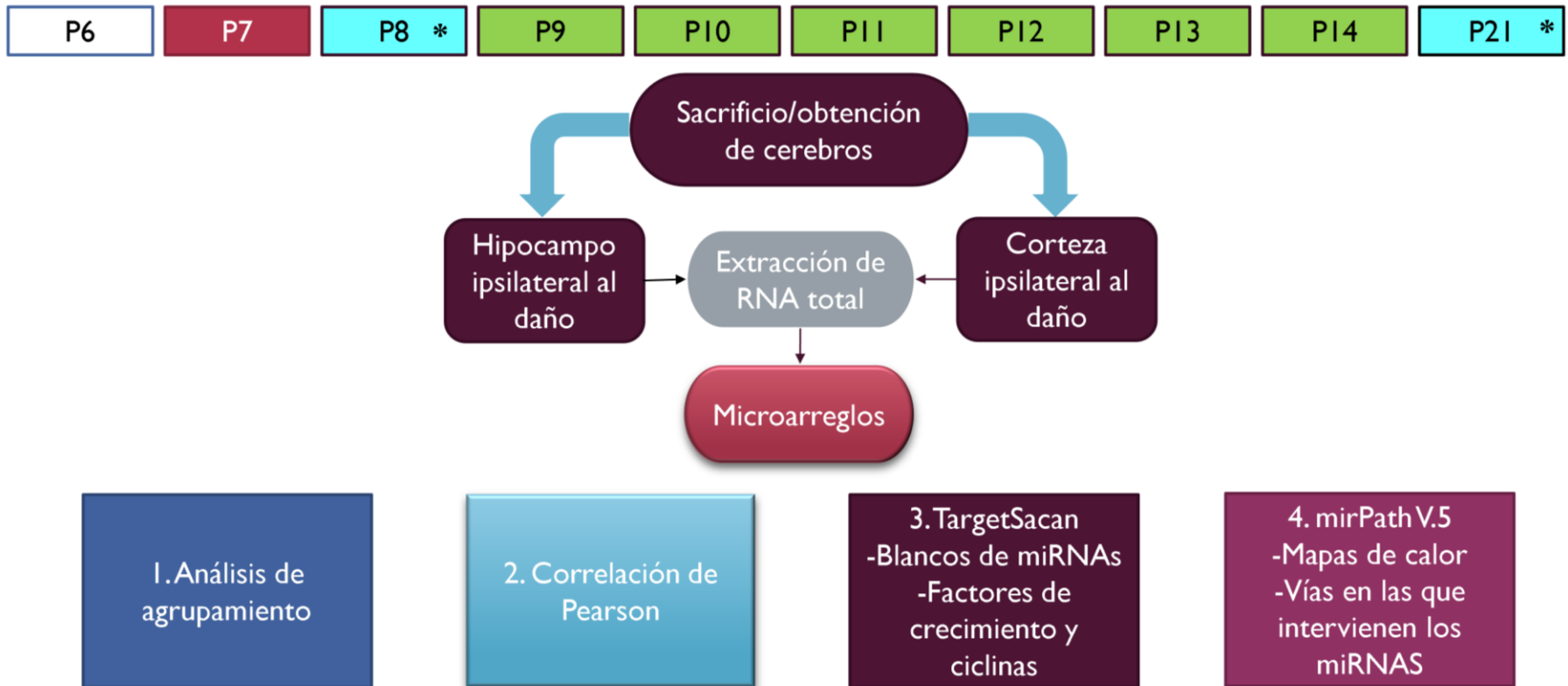


Figura 3.2. El protocolo experimental del diagrama de trabajo 2, muestra la edad en la que se obtuvieron las muestras (en color azul y asterisco *) y el cronograma de experimento del P7 al P21, seguido del análisis que se realizó.

3.3 Animales

Se emplearon 48 ratas neonatas (machos y hembras) de la cepa Sprague-Dawley de 7 días posnatal, con peso mayor a 12 gr, las cuales fueron proporcionadas por la Unidad de Producción y Experimentación Animal (UPEAL) CINVESTAV bajo el proyecto no. 12236. Las ratas fueron divididas en 4 grupos experimentales aleatorios: 1) **Intacto** (n=12); 2) **control intacto administradas con 10 μ L/Kg (0.01 ml/kg) de Cerebrolisina** (n=12); 3) **grupo control con EHI** (n=12); y 4) **grupo experimental con EHI tratadas con 10 μ L/Kg (0.01 ml/kg) de Cerebrolisina** (n=12). La cerebrolisina se administró durante 7 días cada 24 horas. El estudio se realizó con estricto apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-zoo-1999 "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio". Los animales se mantuvieron bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (06:00 - 18:00), con acceso a alimento y agua *ad libitum* y en condiciones controladas de temperatura (22 ± 2 °C) y humedad relativa (60 ± 5 %).

3.3.1 Administración de cerebrolisina

Los animales de experimentación fueron administrados por vía intraperitoneal con una solución de cerebrolisina (RENANCENZ®) a dosis de 10 μ L /gr (0.01 mL/gr) de peso, cada 24 horas durante 7 días consecutivos.

3.4 Modelo de encefalopatía hipóxico-isquémica en ratas

Para generar el modelo de Encefalopatía Hipóxico Isquémico (EHI) neonatal se utilizaron crías de ratas Sprague-Dawley de 7 días de vida extrauterina, previamente anestesiados con una preparación de Xilacina (8 μ L) a una concentración de 20 mg/mL con Ketamina (8 μ L) a una concentración de 50 mg/mL, mezclada con 484 μ L de solución salina fisiológica (NaCl al 0.9 %), esta mezcla se administró a una dosis de 1 μ L/gr de peso corporal por vía intraperitoneal. Una vez que las ratas neonatas se encontraban en planos anestésicos, fueron colocadas en un equipo de cirugía estereotáxica y se

les realizó una incisión de 5 a 7 mm de longitud utilizando equipo de blefaroplastia (Fine Science Tools Inc, Foster City, CA) para exponer la arteria carótida común primitiva (ACCP) izquierda, la cual se obliteró durante 30 minutos, utilizando un Micro Clip recto de la marca Roboz con una fuerza de presión de 50-110 gramos y con una anchura de 0.75 mm y una mandíbula de 5 mm. Una vez completado el periodo de isquemia, incisión fue suturada con seda 6(0) de (Beckton Dikins) y cubierta con cinta adhesiva (Hypafix) para iniciar la recuperación anestésica. Las crías fueron colocadas en una caja de recuperación durante 1-3 horas. Después, fueron transferidas a una cámara de hipoxia durante 100 minutos a 37°C con flujo constante de una mezcla equilibrada de 8% de oxígeno con 92% de nitrógeno (Infra). Al término del tiempo de hipoxia las crías se colocarán en una caja de recuperación, una vez recuperadas fueron colocadas nuevamente con su madre para su alimentación.

3.5 Tinción de viabilidad celular mediante TTC

El TTC es una sal de tetrazolio soluble en agua, es un indicador redox que se utiliza para diferenciar tejido metabólicamente activo del inactivo. Debido a que la enzima deshidrogenasa reduce el TTC a formazán, que es de color rojo intenso e insoluble al agua. Por lo tanto, el formazán tiñe los tejidos viables en rojo y los tejidos muertos se observarán en blanco. 48 horas después del daño (EHI), las ratas fueron anestesiadas y perfundidas intracardialmente con buffer PBS 1X a pH=7.4 y paraformaldehído al 4%, los cerebros fueron extraídos y seccionados de forma coronal a intervalos de 2 mm, posteriormente las secciones fueron incubadas por 15 minutos a 37 °C en solución de 2, 3, 5-cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) al 1%, posteriormente los tejidos fueron colocados toda la noche en solución de paraformaldehído al 4%.

3.6 Evaluación de la actividad motora

3.6.1 Prueba de giro dorsal

En la prueba de giro dorsal se evaluó la habilidad de la rata de cambiar de posición supina o dorsal hacia una posición prono o ventral. Se colocó a la rata sobre una superficie plana en posición dorsal y se mantuvo con los cuatro miembros inmóviles durante 5 segundos. Después de transcurrido este tiempo se liberó a la rata y se registró el tiempo en el que regresó a la posición prono. Esta prueba se realizó 3 veces y se obtuvo la media por animal, se realizó en las edades postnatales 8 y 10.

3.6.2 Prueba de inversión

En la prueba de inversión se evaluó la fuerza de agarre de las 4 extremidades de los neonatos al medir el tiempo en el que se mantenía sujeta de una malla metálica que se inclinó hasta un ángulo de 180°, suspendiendo a la rata a 25 cm de altura de la mesa. El tiempo total de la prueba fue de 60 segundos y se realizaron 3 ensayos. Esta prueba se realizó en las edades postnatales 8, 10 y 14.

3.6.3 Prueba de suspensión de las patas delanteras

Se evaluó la fuerza de las extremidades delanteras al suspender a la rata de una barra metálica. Se sostuvo al individuo firmemente por el cuerpo, permitiéndole agarrar la barra con ambas patas delanteras. Se soltó a la rata y se registró el tiempo que permaneció sujeto a la barra, antes de caer. Se realizaron 3 ensayos. Esta prueba se realizó en las edades postnatales 10 y 14.

3.6.4 Prueba del ángulo de caminata

En la prueba de ángulo de caminata se colocó a la rata sobre una caja abierta de acrílico y se registró la caminata que realizó en individuo durante 3 minutos. Se usó un empujón suave tocando la cola de la rata para

motivarlo a caminar, en caso de que el sujeto de experimentación se encontrara detenido sobre la caja. Se grabo durante 3 minutos.

De los registros videográficos, se midió el ángulo de las extremidades traseras durante la caminata, trazando una línea desde el final del talón hasta la punta del dedo más largo (medio). Solo se tomaron medidas del individuo cuando estaba dando una zancada completa en línea recta y ambos pies estaban apoyados sobre la superficie. Las mediciones no se realizaron cuando la rata estaba inmóvil o realizando giros. Se midieron 3 ángulos por sujeto de experimentación para obtener una media por animal. Esta prueba se realizó en las edades postnatales 8, 10 y 14.

3.7 Obtención de tejido cerebral

4 ratas control y 8 ratas sobrevivientes del modelo EHI fueron incluidas en tres grupos de estudio (Intacto, Ctrl + EHI y EHI + Cereb). Se extrajeron los cerebros completos por disección roma. El hemisferio izquierdo se utilizó para obtener la corteza y el hipocampo, las muestras fueron almacenadas a -80°C , para la extracción de RNA total y su posterior análisis mediante microarreglos.

3.8 Extracción de RNA total

El RNA total se extrajo a partir de 20 a 50 mg de parénquima de corteza cerebral e hipocampo, utilizando 1 mL de TRIzol® (ThermoFisher Scientific, USA) por cada 100 mg de tejido. Las muestras se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA; $22-23^{\circ}\text{C}$), posteriormente, se le agregaron 200 μL de cloroformo, la mezcla se agitó fuertemente durante 15 segundos, para después incubar durante 5 minutos a TA. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó a 12,000 RPM durante 15 minutos a 4°C , después se separó y transfirió la fase acuosa a un tubo microtubo nuevo de 1.5 ml y se le agregaron 500 μL de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubó por 10 minutos a TA, después se centrifugó a 12,000 RPM durante 10 minutos a 4°C .

A continuación, se desechó el sobrenadante y al *pellet* se le agregó 1 ml de etanol al 75 %, se lavó la pastilla con un sólo golpe de vórtex, para después centrifugar a 7,500 RPM durante 5 minutos a 4 °C, se decantó y se dejó secar al aire. El RNA obtenido fue resuspendido en agua grado biología molecular (GBM) y se colocó inmediatamente en hielo. Consecutivamente, el RNA se cuantificó por espectrofotometría digital (NanoDrop, TM 8000, ThermoFisher Scientific, USA) y se determinó su pureza utilizando las relaciones 260 /280 nm, y finalmente se corroboró su integridad por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % preteñido con bromuro de etidio.

3.9 Análisis de miRNAs

A partir del RNA total se aislaron los RNA de bajo peso molecular (RNA-BPM), utilizando una solución de polietilenglicol 6000 (PEG 6000) método de precipitación según el protocolo de Watanabe **[Watanabe, et al 2005]**. Posteriormente, los RNA-BPM fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para evidenciar el resultado del aislamiento de RNA-BPM. El marcaje del RNA fue realizado mediante la utilización de la ligasa T4 **[Thomson, et al 2004]**, utilizando 4 µg de RNA-BPM marcados con 500 ng de 5'-fosfato-citidina-uridina-cy3-3' (CU-Cy3, [Dharmacon] con 2 U de ligasa de RNA T4 (NEB). La hibridación se realizó mediante kit LifterSlip™ (Erie Company) en un microchip de 22 × 22 mm (Afimetrix), el cual permite la distribución uniforme del buffer sobre la superficie de la matriz del microarreglo, se colocaron 15 µL del buffer sobre el microarreglo dicho buffer contiene 3.4 µL de formaldehído al 15%, 1.6 µL de 5X Denhardt, 3.4 µL de 3X SSC (citrato de solución salina de sodio), 2.2 µL SDS al 0.2 % y 5.4 µL de DEPC-H₂O.

El proceso de hibridación se realizó mediante una hibridación de rotación tridimensional en una estación de trabajo BioMixer™ II (CapitalBio Corp) para facilitar la circulación de los microfluidos dentro del microarreglo. La

hibridación se realizó a 42 °C durante toda la noche. El corrimiento de los microarreglos se realizó en el laboratorio de Huella Génica, S.A de C.V., a cargo del Dr. Jaime Berumen Campos.

La matriz se lavó consecutivamente con dos soluciones de lavado diferentes SDS al 0.2%, SSC al 2X durante 5 minutos, y 0.2% de SSC durante 5 minutos en la cámara de temperatura, posteriormente el microarreglo se centrifugó a 1200 r.p.m. durante 10 minutos, para proceder a su escaneo.

El escaneo de la matriz del microarreglo se realizó con un escáner confocal LuxScan™ 10K-A (CapitalBio Corp). La configuración de escaneo fue ajustada para obtener una intensidad visualizada igual en los puntos U6 a través de toda la matriz del microarreglo. El análisis de datos de todas las imágenes TIFF obtenidas se realizó con el software SpotData™ Pro Microarray Image Analysis (CapitalBio Corp). Un punto de datos debe tener más de 30% del valor de intensidad de señal del punto U6 \pm 2 SD más alto que el valor del fondo del chip de microarreglo, solo si se alcanzó este nivel, se consideró un punto de señal positivo, todos los puntos que no pasaron este control de calidad fueron eliminados y considerados como una mancha la cual fue eliminada del análisis de datos. En general se utilizó el valor medio de todas las señales validas en cada sonda de chip del microarreglo para normalizar los datos sin procesar generados por el software de análisis de datos obtenidos durante el escaneo, esto se realizó para asegurarse de que las comparaciones entre cada uno de los 24 chips procesados fueran equiparables.

Para la identificación de los miRNAs expresados diferencialmente entre los chips se utilizó el método de análisis SAM. Este análisis consiente en poner en pantalla la condición que se estableció como control por debajo del 5%, estableciéndose un índice de cambio mayor a 2.0 [Raghavendra, et al 2003]. En este caso el nivel de referencia que se estableció fue el obtenido

en las muestras de ratas sanas sin intervención quirúrgica y se comparó contra las muestras que presentaron EHI y el tratamiento con cerebrolisina.

Se eligió un índice de cambio de 2 veces como punto de corte para clasificar y determinar el cambio en el nivel de expresión como significativo. Según la mayoría de los estudios publicados, un cambio del doble en el nivel puede distinguir de manera confiable las señales reales con respecto al ruido de fondo para la mayoría de los experimentos de expresión **[Ding, et al 2002; Geiss, et al 2008; Mariani, et al 2003]**. Se estableció un patrón jerárquico y para la vinculación de los datos se realizó un análisis de agrupamiento utilizando el software Cluster 3.0 mediante correlación de Pearson no centrada. La construcción de los dendrogramas y mapas de patrones de expresión fueron generados en el software TreeView (Universidad de Stanford) bajo un OS Debian 10 (Linux) **[Eisen, et al 1998]**.

3.9.1 Análisis bioinformático

Los sitios blanco de inhibición sobre los diferentes genes se realizó en la plataforma TargetScan v-7.1 (http://www.targetscan.org/vert_71/), bajo los siguientes criterios de búsqueda.

1. Buscar en la especie "Rata"
2. Familias de miRNAs altamente conservadas
3. Familias de miRNAs conservadas
4. Familias de miRNAs pobremente conservadas
5. Otras anotaciones de familias de miRNAs
6. Ingresar nombre del miRNA

Las vías en la que se encuentran involucrados los genes identificados como blancos de inhibición fueron analizadas mediante la plataforma mirPath v.3, bajo los criterios de KEGG que incluyen:

1. Especie: *Rattus norvegicus*

2. miRNAs específicos
3. Base de datos: TarBase v-7.0
4. Base de datos: microT-CDS v-5.0
5. Base de datos: TargetScan
6. Umbral del valor $P = 0.05$
7. Umbral de MicroT = 0.8
8. Intersección de vías

Para la generación de los mapas de calor se utilizó un análisis de enriquecimiento mediante una prueba exacta de Fisher, con una distribución hipergeométrica con una corrección FDR, utilizando la opción unión de vías.

3.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico que se utilizó en las pruebas motoras fue ANOVA de dos vías para datos no paramétrica con posthoc Turkey. Para el peso corporal se utilizó ANOVA de una vía para datos paramétricos con posthoc Dunett. Cada barra representa la media \pm el error estándar de la media (SEM) $n=4$.

Para identificar los subgrupos definidos por los perfiles de expresión de miRNAs, se utilizó un análisis de agrupamiento no supervisado utilizando la correlación de Spearman y el enlace promedio en las plataformas de análisis TargetScan y mirPath V.3 (<http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr/>), con la que se obtuvieron los blancos de los miRNAs en las vías de neurogénesis, diferenciación celular, proliferación y sinaptogénesis.

4. RESULTADOS

4.1 Generación y evaluación del modelo de EHI

El modelo de EHI se realizó mediante la obliteración de la arteria carótida común primitiva durante 30 minutos, seguida de hipoxia por 100 minutos en ratas neonatas de 7 días de nacidas (Figura 4.1). Se observó una alta tasa de mortalidad del 80%. En las ratas sobrevivientes se desarrolló crisis convulsivas de tres tipos: convulsiones tónicas con distribución cefálica, convulsiones clónicas en el tronco y convulsiones tónico-clónicas en la cola. Estas convulsiones se observaron en la mayoría de las ratas sobrevivientes. Para evaluar los núcleos de infarto ocasionados por EHI, a las ratas sobrevivientes que presentaron algún tipo de convulsión, se les realizó la tinción de cloruro de trifeníl tetrazolio (TTC).

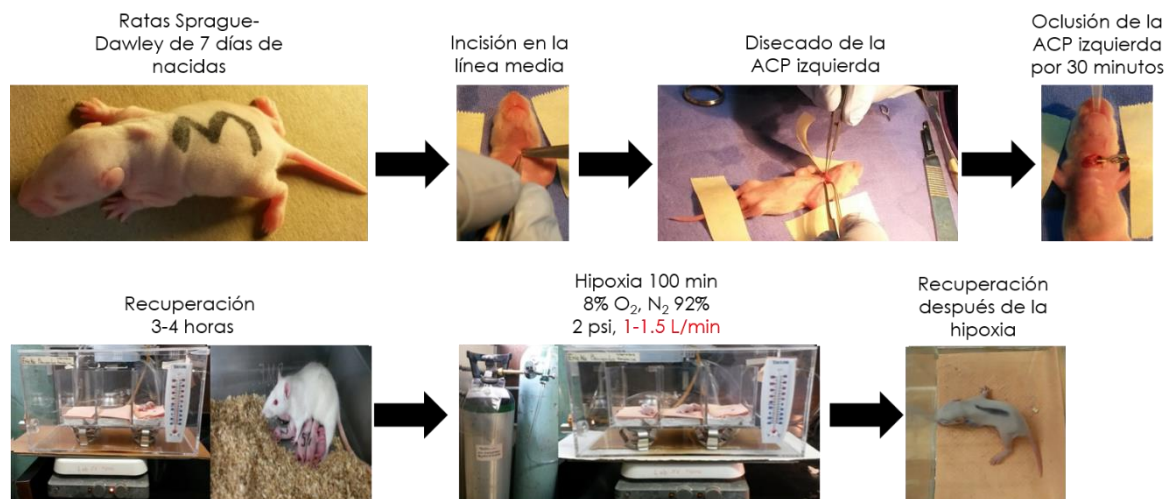


Figura 4.1. Protocolo experimental de la estandarización del modelo de EHI. Todas las ratas fueron operadas al día posnatal 7. Después de la cirugía fueron mantenidas en observación para determinar las que desarrollaron convulsiones.

4.1.1 Evaluación anatómica

Se observaron zonas de necrosis corticales en la región temporo-parietal (Figura 4.2 zona marcada con rojo) extendiéndose hasta el núcleo estriado, las cuales son rodeadas por zonas hipóxicas (Figura 4.2, marcada con color amarillo). Estas regiones abarcan desde la coordenada 2.76 hasta la -1.8 a partir del bregma del atlas de Paxinos & Watson (Figura 4.2, zonas marcadas en color rojo), en donde encontramos las siguientes áreas:

1. IG (Indusium Griseum)
2. Cg1 (Área 1 de la Corteza de cíngulo)
3. Cg2 (Área 2 de la Corteza de cíngulo)
4. M1 (Corteza motora primaria)
5. M2 (Corteza motora secundaria)
6. S1FL (Corteza somatosensorial primaria de la extremidad anterior)
7. SIDZ (Corteza somatosensorial Disgranular)
8. S1J (Corteza somatosensorial primaria de la región mandibular)
9. S1DZO (Corteza somatosensorial primaria Oral-Disgranular)

Mientras que, las regiones hipóxicas (Figura 4.2, zonas en color amarillo) afectadas por privación parcial de la irrigación nutricia y funcional son:

1. S1ULp (Corteza somatosensorial primaria del labio superior)
2. GI (Corteza insular granular)
3. DI (Corteza insular disgranular)

En la tinción con TTC se observa una amplia zona de penumbra en donde se presenta una privación parcial de oxígeno secundaria a la reducción del 50 al 65% de la irrigación nutricia y funcional, en esta zona de penumbra

(Figura 4.2, zonas marcadas en color gris) encontramos a las siguientes estructuras:

1. AID (Corteza insular agranular dorsal)
2. AIV (Corteza insular agranular ventral)
3. Pir1 (Capa 1 de la corteza piriforme)
4. Pir2 (Capa 2 de la corteza piriforme)
5. Pir3 (Capa 3 de la corteza piriforme)
6. lo (Tracto olfatorio lateral)
7. DEn (Núcleo endopiriforme dorsal)
8. VP (Pálido ventral)
9. ICj (Isla de Calleja)
10. Tu (Tubérculo olfatorio)
11. LAcbSh (Escudo del accumbens lateral)
12. LSS (Franja lateral del cuerpo estriado)
13. IEn (Núcleo endopiriforme intermedio)

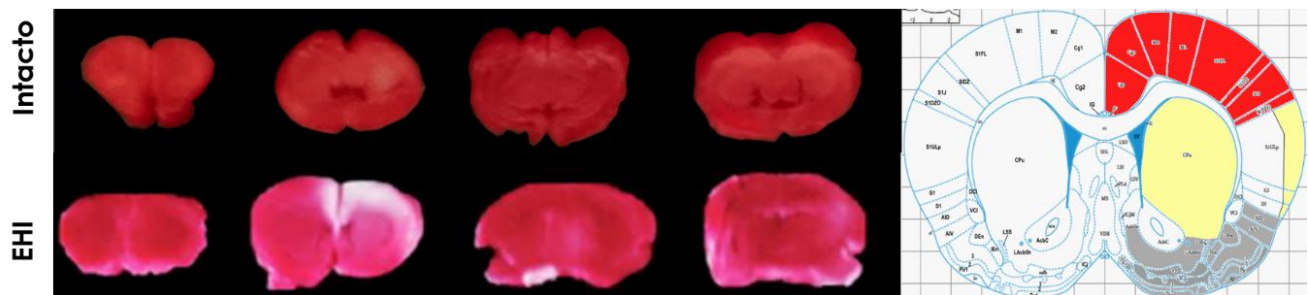


Figura 4.2. Lesión macroscópica en cerebros de ratas sometidas a EHI por la obliteración de la ACCP por 30 minutos e hipoxia por 100 min. La imagen muestra cortes coronarios de cerebro de 1 mm de grosor teñidos con TTC, las zonas blancas indican la lesión isquémica que evoluciona a EHI clínica.

4.1.2 Evaluación conductual

La EHI provoca el desarrollo de lesiones de tipo motor, debido a que se observó en la tinción de TTC que se ve afectada la corteza motora. Para evaluar este daño, se utilizó un grupo de pruebas motoras, en donde se evaluaron los reflejos primarios, resistencia y la locomoción. La prueba de giro dorsal evalúa los reflejos primarios, la prueba inversión y suspensión de patas delanteras evalúa la resistencia y finalmente, la locomoción se evaluó mediante la magnitud del ángulo de caminata. Estas pruebas se realizaron a cada uno de los grupos de estudio, para comparar el daño ocasionado por la EHI.

4.1.2.1 Giro dorsal

Se evaluó el tiempo de latencia en la prueba de giro dorsal realizada al día posnatal 8 (P8), observándose que en ratas hembras del grupo intacto tuvieron un tiempo de latencia de 1.0825 ± 0.082 s. Sin embargo, la EHI incrementa dicho valor a 1.54 ± 0.057 s, logrando una disminución substancial con el tratamiento de cerebrolisina de 1.154 ± 0.064 s (ANOVA de dos vías posthoc Turkey $P = 0.0037$). Mientras que en las ratas macho del grupo intacto este parámetro fue de 1.4125 ± 0.082 s. En cambio, la EHI incrementa dicho valor a 1.705 ± 0.105 s, logrando una disminución significativa con el tratamiento con cerebrolisina a 1.4154 ± 0.249 s ($P = 0.0675$). Por el contrario, los grupos Ctrl + Cereb no mostraron diferencia con respecto al grupo intacto (Figura 4.3). Del mismo modo, la evaluación del giro dorsal en ratas hembra en el P10, la EHI incrementó el tiempo de latencia a 1.4075 ± 0.088 s y el tratamiento con cerebrolisina lo disminuyó a valores basales observados en los grupos intacto y Ctrl + Cereb 1.075 ± 0.075 s, 1.050 ± 0.050 s, respectivamente ($P = 0.0069$). Además, en las ratas macho en P10 la EHI mantiene valores altos en el tiempo de latencia 1.54 ± 0.128 s,

y el tratamiento con cerebrolisina logra disminuir dicho valor a 0.83 ± 0.098 s ($P = 0.0017$; Figura 4.3).

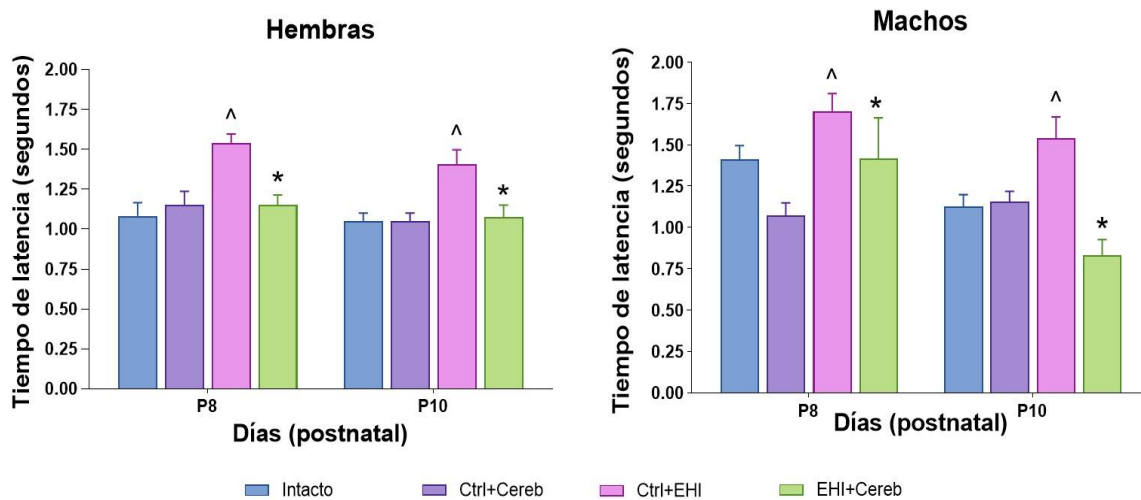


Figura 4.3. Resultados de la evaluación de la prueba de giro dorsal en machos y en hembras sometidas a EHI por obliteración de la ACP por 30 minutos e hipoxia por 100 minutos. Cada barra representa el promedio \pm SEM ($n = 4$). Datos analizados con ANOVA de dos vías para datos no paramétricos post hoc Turkey, $P < 0.05$, δ vs Intacto; θ vs EHI.

4.1.2.2 Inversión

El tiempo de latencia evaluado que presentaron las ratas hembra en los grupos Intacto y Ctrl + Cereb fue de 19.05 ± 4.43 s y 15.40 ± 3.44 s en el P8, mientras que en el P10 fue de 15.70 ± 2.84 s y 15.2 ± 3.84 s, respectivamente. Además, en P14 el tiempo de latencia fue de 18.95 ± 5.2 s y 20.15 ± 5.36 s, respectivamente ($P = 0.25702$). Sin embargo, durante el P8, P10 y P14 la EHI aumento el tiempo de latencia a 22.55 ± 3.51 s, 24.33 ± 2.64 s y 16.66 ± 3.04 s respectivamente ($P = 0.4029$). Pero, el tratamiento con cerebrolisina disminuyo dicho tiempo de latencia a 18.48 ± 3.94 s (P8), 16.23 ± 2.33 s (P10) y 11 ± 1.73 s (P14). En P14 se observó diferencia estadísticamente significativa cuando se compra EHI + Cereb con el tiempo de latencia incrementado por la EHI ($P = 0.0255$).

Sin embargo, en ratas macho no se observa diferencia estadística significativa en los tres tiempos evaluados P8 ($P = 0.2374$), P10 ($P = 0.1822$) y P14 ($P = 0.9533$) (Figura 4.4).

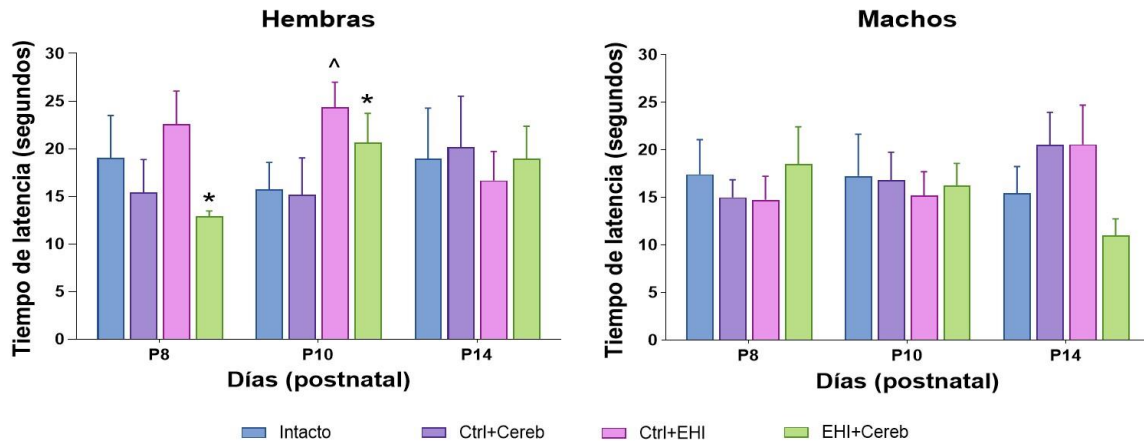


Figura 4.4. Resultados de la evaluación de la prueba de inversión en machos y en hembras sometidas a EHI por obliteración de la ACP por 30 minutos e hipoxia por 100 minutos. Cada barra representa el promedio \pm SEM ($n = 4$). Datos analizados con ANOVA de dos vías post hot Turkey, $P < 0.05$, [^] vs Intacto; * vs EHI.

4.1.2.3 Suspensión de patas delanteras

La suspensión de las patas delanteras en ratas hembra a los 10 días posnatales mostró un valor similar en los grupos Intacto y Ctrl +Cereb de 12.25 ± 1.25 s y 12.16 ± 1.03 s, respectivamente. La EHI incrementó el tiempo de latencia a 18.25 ± 1.65 s, y la administración con cerebrolisina disminuyó este tiempo a 13.30 ± 1.74 s. Mientras que en posnatal 14 los valores en los grupos Intacto y Ctrl + Cereb fueron 11.07 ± 2.11 s y 12.5 ± 1.5 s respectivamente. Sin embargo, la EHI incrementó el tiempo de latencia a 16.8 ± 2.29 s, y el tratamiento con cerebrolisina disminuyó este último a valor a 11.32 ± 0.93 s ($P = 0.4073$).

En los machos no se observó diferencias significativas entre los cuatro grupos experimentales (Figura 4.5) en cada uno de los tiempos de latencia en P10, los valores obtenidos en los grupos fueron: Intacto 17.08 ± 1.85 s, Ctrl + Cereb

14.58 ± 2.68 s, Ctrl + EHI 12.73 ± 3.71 s y EHI + Cereb 12.81 ± 2.08 s ($P = 0.6403$). De la misma forma, en P14 no se observaron diferencias significativas en el tiempo de latencia entre los cuatro grupos (Figura 4.5), observándose los siguientes valores: Intacto 13.91 ± 2.51 s, Ctrl + Cereb 16.83 ± 1.45 s, Ctrl + EHI 12.41 ± 2.39 s y EHI + Cereb 16.24 ± 2.79 s ($P = 0.5331$).

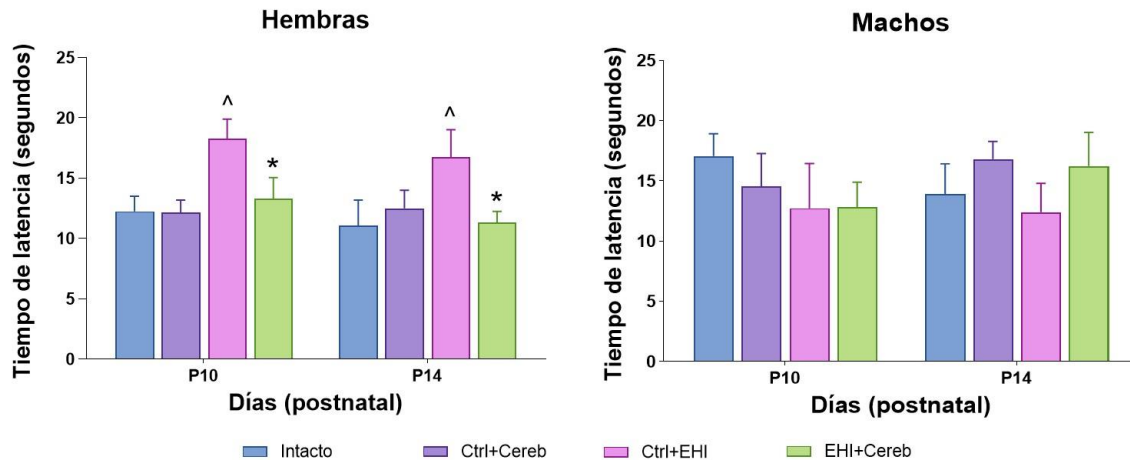


Figura 4.5. Resultados de la evaluación de la prueba de suspensión de patas delanteras en machos y en hembras sometidas a EHI por obliteración de la ACP por 30 minutos e hipoxia por 100 minutos. Cada barra representa el promedio ± SEM ($n = 4$). Datos analizados con ANOVA de dos vías post hot Turkey, $P < 0.05$, [^] vs Intacto; * vs EHI.

4.1.2.4 Ángulo de caminata

Al evaluar el tamaño del ángulo de caminata al P8 en ratas hembras se observó un valor basal del ángulo en el grupo intacto de $96.25 \pm 5.32^\circ$ y $92.75 \pm 5.79^\circ$ en el grupo Ctrl + Cereb. Sin embargo, EHI incrementa el tamaño de ángulo a $118.5 \pm 2.5^\circ$, mientras que, el tratamiento de la EHI con cerebrolisina lo disminuyó a $95.75 \pm 6.90^\circ$ ($P = 0.0191$) (Figura 4.6). De igual forma, en P8 para machos se observó un valor basal del tamaño de ángulo de caminata del grupo Intacto de $86.97 \pm 9.53^\circ$ y $75.52 \pm 5.22^\circ$ para el grupo Ctrl + Cereb. No obstante, EHI incremento el tamaño de ángulo a $141.2 \pm 6.82^\circ$, sin embargo, el tratamiento de la EHI con cerebrolisina, disminuyó el ángulo a $110.4 \pm 9.31^\circ$ ($P = 0.0003$) (Figura 4.6).

Por otro lado, para ratas hembras en P10 se observó un valor basal en el grupo Intacto de $71.25 \pm 9.70^\circ$ y $68.75 \pm 7.73^\circ$ en el grupo Ctrl +Cereb. Sin embargo, EHI incrementa el ángulo a $88.12 \pm 4.71^\circ$, mientras que, el tratamiento con cerebrolisina no lo modificó significativamente el tamaño mostrando un valor de $76.25 \pm 6.88^\circ$ ($P = 0.3123$) (Figura 4.6). Para el caso de ratas macho a la misma edad se observó un valor basal del tamaño del ángulo de caminata de $71.25 \pm 4.26^\circ$ en el grupo Intacto y $59.5 \pm 4.92^\circ$ en el grupo Ctrl + Cereb. El tamaño del ángulo incremento considerablemente a $102.5 \pm 12.15^\circ$ en ratas con EHI, aunque el tratamiento con cerebrolisina disminuye a $74.65 \pm 5.23^\circ$ ($P = 0.0091$) (Figura 4.6).

En la evaluación de ángulo de caminata a la edad de P14 en ratas hembras mostró un valor basal del tamaño de ángulo de $72.97 \pm 5^\circ$ en el grupo Intacto y $69.5 \pm 3.32^\circ$ en el grupo Ctrl + Cereb. El ángulo incremento substancialmente a $94.15 \pm 11.09^\circ$ en el grupo Ctrl + EHI y disminuye a rangos normales de $69.9 \pm 3.52^\circ$ en el grupo de EHI + Cereb, sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P = 0.0605$) (Figura 4.6). Mientras que en machos a la misma edad se observó un valor basal del tamaño del ángulo de $60.07 \pm 5.15^\circ$ correspondiente al grupo Intacto y $71.75 \pm 3.91^\circ$ en el grupo Ctrl + Cereb. Sin embargo, EHI incremento el tamaño del ángulo a $82.275 \pm 5^\circ$ y el tratamiento de la EHI con cerebrolisina disminuyó el ángulo a $63.4 \pm 5.81^\circ$, teniendo diferencia estadística significativa con una $P = 0.0373$ (Figura 4.6).

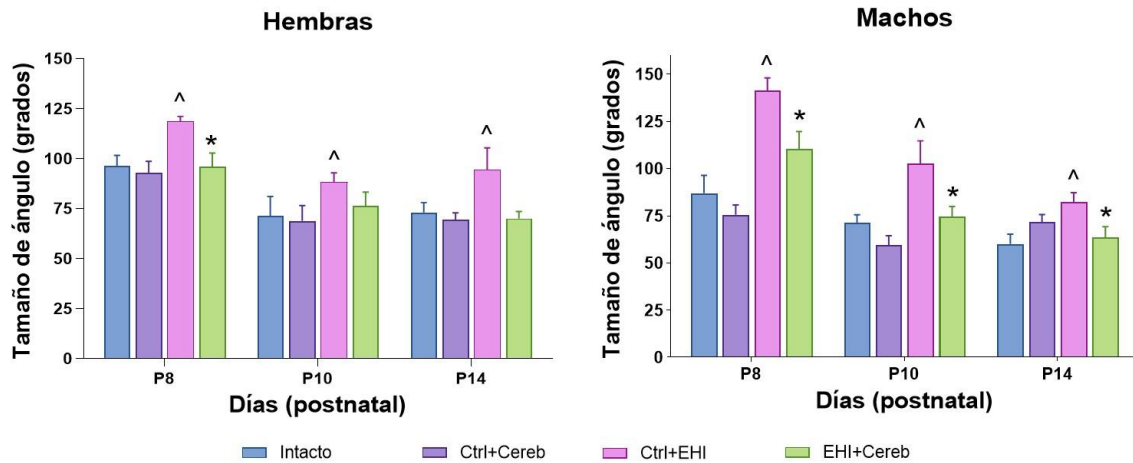


Figura 4.6. Resultados de la evaluación de la prueba de ángulo de caminata en machos y en hembras sometidas a EHI por obliteración de la ACP por 30 minutos e hipoxia por 100 minutos. Cada barra representa el promedio \pm SEM ($n = 4$). Datos analizados con ANOVA de dos vías posthoc Turkey, $P < 0.05$, [^] vs Intacto; ^{*} vs EHI.

4.1.2.5 Peso corporal

Tanto las ratas macho como las hembras que desarrollaron la EHI, presentaron una ganancia de peso similar desde el P7 al P14. Mientras que, no hubo diferencias de ganancia de peso entre los grupos intacto (2.2 ± 0.24 g) y Ctrl + Cereb (1.75 ± 0.14 g) en machos y hembras. La ganancia de pesos diario para el grupo Ctrl + EHI fue de 2.05 ± 0.46 g, sin embargo, la ganancia de peso para el grupo EHI + Cereb fue menor que el grupo con daño siendo este 1.6 ± 0.15 g. Por otro lado, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos, para hembras ($P = 0.6344$) y machos ($P = 0.8952$).

Hay que mencionar, además que al comparar la ganancia de peso en P21, para machos, se observaron diferencias estadísticamente significativas obteniendo una $P = 0.0322$. Para los cuatro grupos se obtuvieron los siguientes pesos finales: Intacto de 53.5 ± 1.5 g, Ctrl + Cereb de 45.5 ± 2.5 g, Ctrl + EHI de 40.5 ± 1.5 g y EHI + Cereb de 50 ± 2 g. Sin embargo, aunque en ratas hembras se observó el mismo comportamiento no se encontraron

diferencias estadísticamente significativas ($P= 0.1267$). Obteniendo los siguientes pesos finales en los cuatro grupos: Intacto 52 ± 7 g, Ctrl + Cereb 33.5 ± 2.5 g, Ctrl + EHI 48.5 ± 3 g y EHI + Cereb 41 ± 3 g (Figura 4.7).

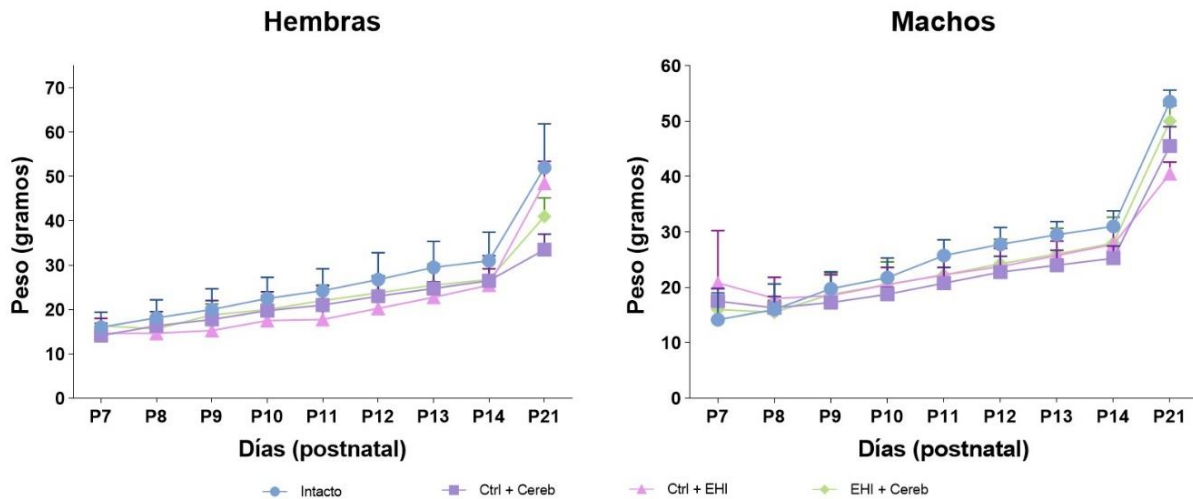


Figura 4.7. Resultados del curso temporal del peso en machos y en hembras, desde P7 a P14 y P21. En ratas sometidas a EHI por obliteración de la ACP por 30 minutos e hipoxia por 100 minutos. Cada barra representa el promedio \pm SEM ($n = 4$). Datos analizados con U de Mann-Whitney, $P < 0.05$, \wedge vs Intacto; * vs EHI.

4.1.2.6 Apertura palpebral

En las ratas de los grupos Intacto y Ctrl + Cereb la apertura de ambos ojos se presentó en el día posnatal 12 (P12). Mientras que, en las ratas con EHI la apertura del ojo derecho se retrasó un día, observándose en el P13 y el ojo izquierdo se retrasó dos días, es decir, se abrió al P14. Sin embargo, el tratamiento de la EHI con cerebrolisina el ojo derecho se abrió al P12 y el ojo izquierdo lo hizo al P13 (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Días de la apertura del ojo en ratas que fueron sometidas a EHI por la obliteración de la ACP por 30 minutos e hipoxia por 100 minutos.

Grupos	Ojos	
	Derecho	Izquierdo
Intacto	P12	P12
Ctrl + Cereb	P12	P12
Ctrl + EHI	P13	P14
EHI + Cereb	P12	P13

4.1.2.2.7 Ptosis palpebral

Las ratas que desarrollaron EHI presentaron parálisis palpebral, es decir, descenso permanente del párpado superior que les impide la apertura completa del ojo. Se observó que aproximadamente el 60% de los individuos que desarrollaron EHI presentaron afectación de la apertura del párpado comparadas con ratas Intactas y Ctrl + Cereb. También se observó que el grupo EHI + Cereb desarrolló ptosis palpebral, pero en menor grado (Figura 4.8).

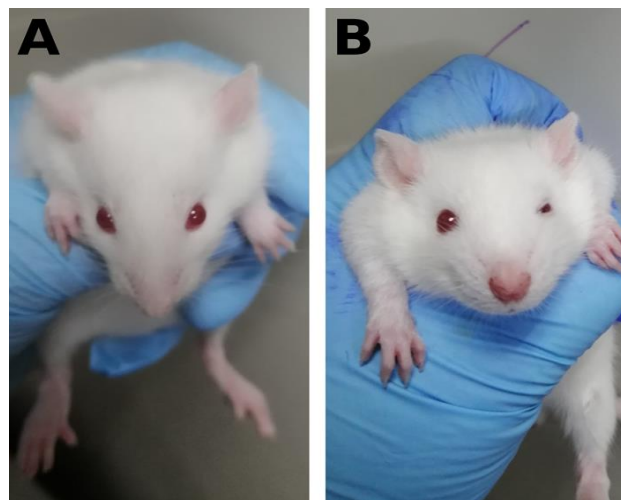


Figura 4.8. Ptosis palpebral que desarrollaron las ratas sometidas a EHI por la obliteración de la ACP por 30 minutos e hipoxia por 100 minutos. A) rata intacta y B) rata con EHI y ptosis palpebral izquierda.

4.2 Microarreglos de miRNAs

Se realizó un análisis de microarreglos para identificar el perfil de expresión de miRNAs. Para ello, se utilizó RNA de tejido de hipocampo y corteza del lado ipsilateral al daño de los grupos: Intacto, Ctrl + EHI y EHI + Cereb, en dos edades diferentes P8 y P21 en machos. En total se procesaron 24 muestras, 12 muestras para P8 y 12 para P21.

Se utilizó el análisis general de neuromiRNAs cortical e hipocampal de la rata, compuesto por 1789 miRNAs. Este análisis reveló un total de 105 miRNAs modificados, tanto sobreexpresados como inhibidos. Todos estos miRNAs presentaron un índice de cambio ($2^{-\Delta\Delta CT}$) mayor a + 2.0 y menor a -2, así como una $P < 0.05$ al ser comparado con la expresión del tejido control. Cabe mencionar, que de los 105 miRNAs 56 se sobreexpresaron y 49 fueron inhibidos (Tabla 4.2), estos miRNAs también se muestran en el mapa de calor general (Figura 4.9).

Tabla 4.2. miRNAs que modificaron su expresión: 56 sobreexpresados y 49 inhibidos.

56 miRNAs sobreexpresados	rno-miR-30a-5p	rno-miR-191
	rno-miR-143	rno-miR-22
	rno-miR-101a	rno-miR-30b
	rno-miR-126	rno-miR-101b
	rno-let-7c	rno-miR-185
	rno-miR-7d	rno-miR-138
	rno-miR-181a	rno-miR-212
	rno-miR-24	rno-miR-335
	rno-miR-30c	rno-miR-145
	rno-miR-132	rno-miR-27a
	rno-miR-7a	rno-miR-27b
	rno-miR-7i	rno-miR-195
	rno-miR-107	rno-miR-451
	rno-miR-221	rno-miR-100
	rno-miR-125a	rno-miR-2018
	rno-miR-7e	rno-miR-26b
	rno-miR-122	rno-miR-130
	rno-miR-129*	rno-miR-34a

	rno-miR-23a rno-miR-7h rno-miR-23b rno-miR-127 rno-miR-103 rno-miR-30d rno-miR-130a rno-miR-338 rno-miR-99a rno-miR-16	rno-miR-101b rno-miR-130 rno-miR-26b rno-miR-29c rno-miR-21 rno-miR-494 rno-miR-136 rno-miR-352 rno-miR-15b rno-miR-181c
49 miRNAs inhibidos	rno-miR-181b rno-miR-140* rno-miR-382 rno-miR-17 rno-miR-140 rno-miR-20a rno-miR-204 rno-miR-422b rno-miR-210 rno-miR-223 rno-miR-409-5p rno-miR-17a rno-miR-106b rno-miR-20b rno-miR-300 rno-miR-186 rno-miR-148b rno-miR-337 rno-miR-181a* rno-miR-196 rno-miR-543 rno-miR-146 rno-miR-99b rno-miR-324-5p rno-miR-451	rno-miR-342 rno-miR-361 rno-miR-344 rno-miR-93 rno-miR-7 rno-miR-379 rno-miR-30c rno-miR-369-5p rno-miR-381 rno-miR-7* rno-miR-93 rno-miR-139 rno-miR-193 rno-miR-25 rno-miR-28 rno-miR-92 rno-miR-199a rno-miR-7 rno-miR-539 rno-miR-331 rno-miR-326 rno-miR-345 rno-miR-98 rno-miR-137

4.2.1 Frecuencia absoluta

El análisis del miRNoma neurogénico permitió identificar la frecuencia absoluta de miRNAs afectados en corteza cerebral a los 8 días posnatal. En el grupo Ctrl + EHI se observaron 12 miRNAs desregulados, mientras que, en el grupo EHI + Cereb se identificaron 14 miRNAs desregulados. En el hipocampo, para el grupo Ctrl + EHI se encontraron modificados 14 miRNAs y en el grupo EHI + Cereb solo se modificaron 11 miRNAs.

Además, al P21 en la corteza del grupo EHI se alteraron 4 miRNAs, mientras que, en el grupo EHI + Cereb se obtuvieron 11 miRNAs desregulados. En hipocampo, en el grupo Ctrl + EHI se identificaron 23 miRNAs modificados y en el grupo EHI + Cereb se identificaron solo 6 miRNAs desregulados (Figura 4.10).

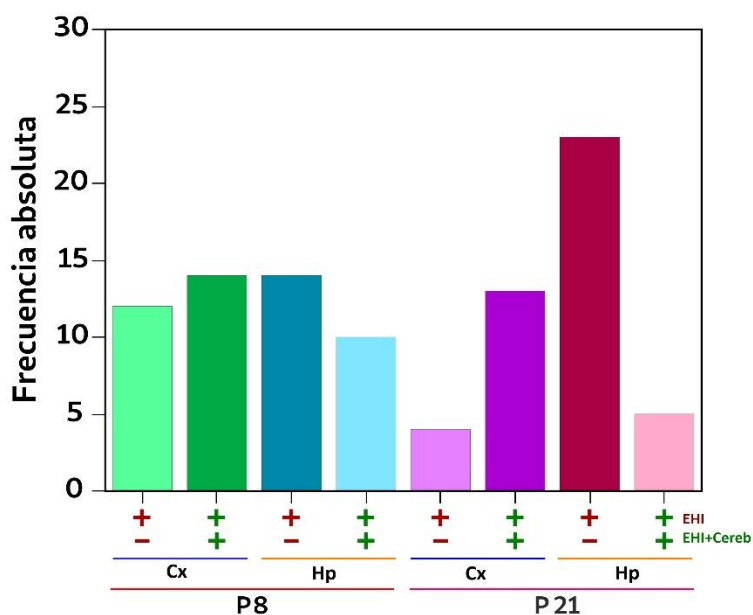


Figura 4.10. Frecuencia absoluta de los miRNAs que fueron modificados por el tratamiento de EHI con cerebrolisina (EHI + Cerebrolisina) en corteza (Cx) e hipocampo (Hp) comparado con los miRNAs modificados por EHI (EHI), en ratas neonatas de 8 días de nacidas y ratas jóvenes de 21 días. Todas las ratas sometidas a EHI por la obliteración de la ACP por 30 minutos e hipoxia por 100 minutos.

4.2.2 miRNAs desregulados en el día P8

4.2.2.1 Corteza cerebral

Bajo las condiciones de EHI y EHI + Cereb encontramos una sobreexpresión de 12 miRNAs para ambos casos, en la corteza cerebral (Tabla 4.3). Del total de miRNAs, 3 fueron inhibidos (Predicted miR-189, rno-miR-495, rno-miR-21-3p) durante el tratamiento de la EHI con cerebrolisina. Sin embargo, 9 miRNAs presentaron un incremento substancial de la sobreexpresión (Predicted miR-191, rno-miR-342-5p, rno-miR-99b-3p, rno-miR-411-3p, rno-miR-140-3p, rno-miR-191b, rno-miR-223-3p, rno-miR-213, rno-miR-192-3p,) en EHI + Cereb.

Tabla 4.3. miRNAs sobreexpresados en corteza cerebral en ratas con EHI comparadas con EHI + Cereb al posnatal 8 (P8).

miRNA (gen)	Coeficiente correlación de Pearson	Índice de cambio		P
		EHI	EHI + Cereb	
Predicted miR-189	11.34	50	4.37	0.0000
Predicted miR-191	10.92	33.51	43.18	0.0003
rno-miR-342-5p	9.95	6.07	29.75	0.0266
rno-miR-99b-3p	9.19	1.64	3.06	0.0403
rno-miR-411-3p	6.43	3.14	10.3	0.0000
rno-miR-140-3p	5.86	7.15	22.39	0.0000
rno-miR-191b	5.76	61.75	1448.79	0.0000
rno-miR-223-3p	5.46	2.99	10.79	0.0000
rno-miR-495	4.05	874.44	4.87	0.0000
rno-miR-213	3.68	51.1	391.89	0.0000
rno-miR-192-3p	3.61	30.12	106.83	0.0000
rno-miR-21-3p	2.47	8.15	5.56	0.0167

Por otro lado, se observó que 14 miRNAs en total fueron inhibidos al desarrollar EHI y EHI + Cereb (Tabla 4.4). Del total de miRNAs, 9 aumentaron la inhibición en condiciones de EHI + Cereb (rno-miR-139-3p, rno-miR-7-3p, rno-miR-137-3p, rno-let-7g-3p, rno-miR-376b-3p, rno-miR-345-3p, rno-let-7-3p, rno-miR-26a-3p, rno-miR-138-5p). De los 14, 5 miRNAs disminuyeron la

inhibición (rno-miR-451-3p, rno-miR-29a-5p, rno-let-7f-2-3p, rno-miR-29b-5p, rno-miR-29c-5p) al tratar EHI con cerebrolisina (Figura 4.11).

Tabla 4.4. miRNAs inhibidos en corteza cerebral en ratas con EHI comparadas con EHI + Cereb al posnatal 8 (P8).

miRNA (gen)	Coeficiente correlación de Pearson	Índice de cambio		P
		EHI	EHI + Cereb	
rno-miR-139-3p	-11.07	0.13	0.36	0.0424
rno-miR-7-3p	-9.36	0.07	0.67	0.0000
rno-miR-137-3p	-8.98	0.18	0.39	0.0378
rno-let-7g-3p	-8.71	0.03	0.42	0.0018
rno-miR-376b-3p	-7.34	0.24	0.6	0.0387
rno-miR-345-3p	-7.01	0.07	0.25	0.0089
rno-let-7-3p	-6.84	0.13	0.2	0.0478
rno-miR-451-3p	-5.56	0.69	0.06	0.0001
rno-miR-26a-3p	-5.61	0.04	0.77	0.0067
rno-let-7f-2-3p	-5.37	0.81	0.05	0.0000
rno-miR-29b-5p	-5.11	0.88	0.45	0.0298
rno-miR-29a-5p	-4.99	0.63	0.02	0.0000
rno-miR-138-5p	-4.76	0.04	0.42	0.0051
rno-miR-29c-5p	-4.23	0.73	0.29	0.0093

4.2.2.2 Hipocampo

En el Hipocampo la EHI y EHI + Cereb incrementó la sobreexpresión de 4 miRNAs en total (Tabla 4.5). De estos miRNAs, 3 incrementaron su sobreexpresión (Predicted miR-189, Predicted miR-191, rno-miR-21-3p) en condiciones de EHI + Cereb. Sin embargo, el rno-miR-494-3p disminuyó la sobreexpresión con el tratamiento de EHI + Cereb.

Tabla 4.5. miRNAs sobreexpresados en hipocampo en ratas con EHI comparadas con EHI + Cereb al posnatal 8 (P8)

miRNA (gen)	Coeficiente correlación de Pearson	Índice de cambio		P
		EHI	EHI + Cereb	
Predicted miR-189	20.13	16.32	64.79	0.0000
Predicted miR-191	19.72	12.9	5.72	0.0253
rno-miR-494-3p	9.09	5.93	1.83	0.0398
rno-miR-21-3p	4.6	2.09	9.95	0.0259

Además, en la corteza cerebral se encontraron 23 miRNAs en total que se modificaron en las dos condiciones, EHI y EHI + Cereb (Tabla 4.6). De los cuales, 12 miRNAs aumentaron la inhibición (rno-miR-344, rno-miR-497-39, rno-miR-301-3p, rno-miR-343, rno-miR-137-5p, rno-miR-324-5p, rno-miR-186-3p, rno-miR-361-3p, miR-409-5p, rno-miR-379-3p, rno-miR-204-3p, rno-miR-106-3p) al tratamiento de EHI + Cereb. Además, con esta misma condición (EHI + Cereb) se inhibieron 11 miRNAs (rno-miR-7-3p, rno-miR-148a-5p, rno-miR-17-5p, rno-miR-434-3p, rno-miR-411-3p, rno-miR-210-5p, rno-miR-199-3p, rno-miR-139-3p, rno-miR-9-5p, rno-miR-98-3p) (Figura 4.11).

Tabla 4.6. miRNAs inhibidos en corteza cerebral en ratas con EHI comparadas con EHI + Cereb al posnatal 8 (P8).

miRNA (gen)	Coeficiente correlación de Pearson	Índice de cambio		P
		EHI	EHI + Cereb	
rno-miR-344	-19.57	0.22	0.69	0.0000
rno-miR-7-3p	-12.71	0.28	0.04	0.0000
rno-miR-497-3p	-9.87	0.51	0.81	0.0266
rno-miR-301-5p	-7.89	0.24	0.88	0.0403
rno-miR-343	-7.45	0.04	0.63	0.0000
rno-miR-148a-5p	-7.09	0.54	0.54	0.0253
rno-miR-137-5p	-6.89	0.15	0.7	0.0398
rno-miR-324-5p	-6.34	0.01	0.36	0.0387
rno-miR-186-3p	-6.01	0.19	0.67	0.0089
rno-miR-361-3p	-5.67	0.52	0.39	0.0478
rno-miR-17-5p	-6.14	0.71	0.42	0.0001
rno-miR-409-5p	-5.91	0.26	0.6	0.0067
rno-miR-434-3p	-5.52	0.71	0.25	0.0000
rno-miR-411-3p	-4.94	0.31	0.2	0.0298
rno-miR-379-3p	-4.64	0.22	0.62	0.0000
rno-miR-210-5p	-3.78	0.23	0.05	0.0051
rno-miR-204-3p	-3.53	0.24	0.45	0.0093
rno-miR-210-5p	-3.01	0.26	0.02	0.0000
rno-miR-199-3p	-2.95	0.86	0.42	0.0000
rno-miR-139-3p	-2.63	0.67	0.29	0.0424
rno-miR-106-3p	-2.31	0.02	0.2	0.0000
rno-miR-9-5p	-2.24	0.65	0.35	0.0378
rno-miR-98-3p	-1.26	0.46	0.12	0.0018

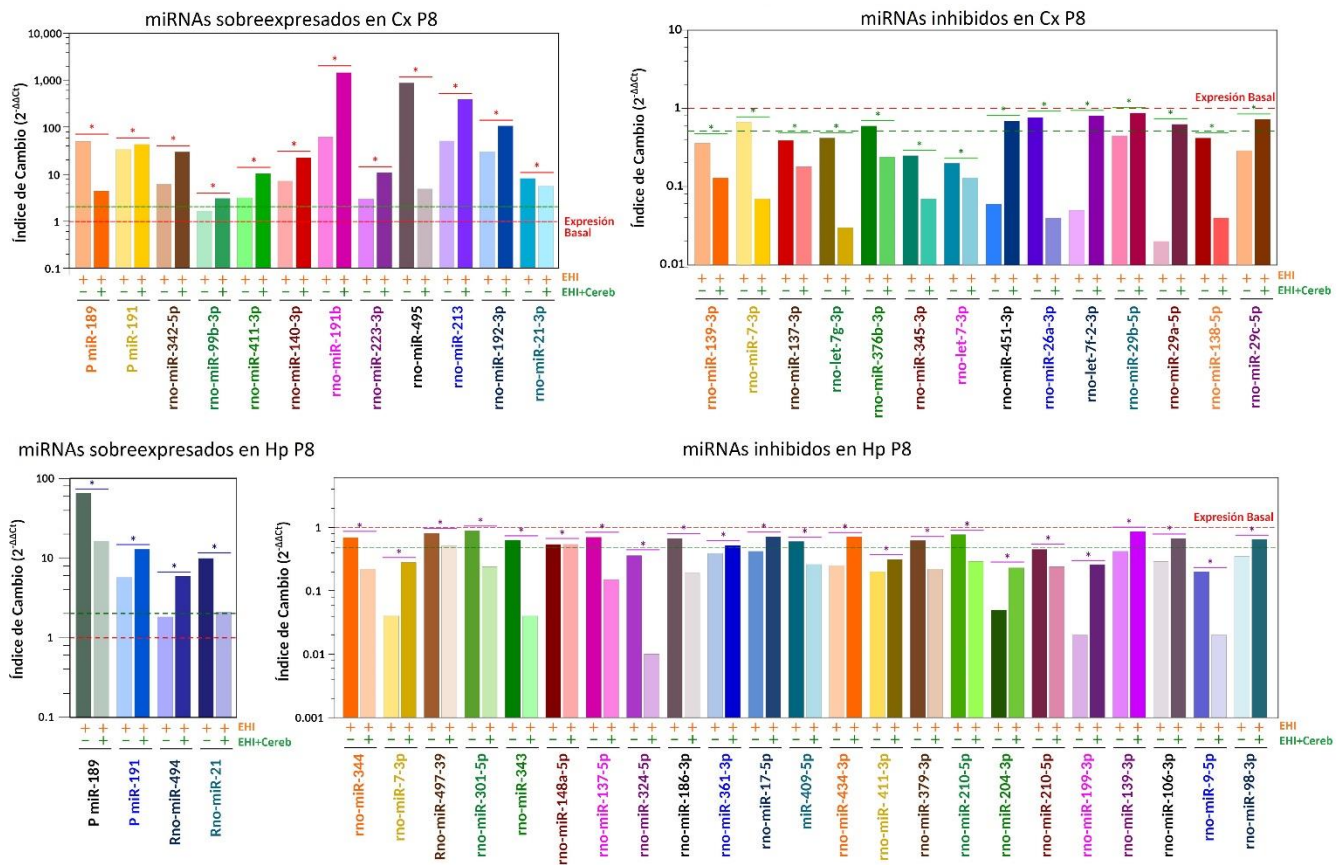


Figura 4.11. miRNAs sobreexpresado e inhibidos en corteza cerebral e hipocampo en ratas con EHI y Cerebrolisina al posnatal 8 (P8). Los cambios de la expresión de miRNAs se evaluaron mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

4.2.3 miRNAs desregulados en el día posnatal P21

4.2.3.1 Corteza cerebral

La EHI y EHI + Cereb causaron la sobreexpresión de 14 miRNAs (Tabla 4.7). De estos, 11 miRNAs fueron inhibidos (rno-miR-350, rno-miR-21-3p, rno-miR-99b-3p, rno-miR-411-3p, rno-miR-191-5p, rno-miR-140-3p, rno-miR-130a-5p, rno-miR-25-3p, miR-129-3p, rno-miR-325-3p, rno-miR-199a-3p) durante el tratamiento de la EHI con cerebrolisina. Sin embargo, todos permanecen sobreexpresados al compararlos con la expresión basal observada en el grupo Intacto. 3 miRNAs no presentaron modificación con respecto a la

expresión observada en el grupo EHI (rno-miR-223-3p, rno-miR-93-3p, rno-miR-93-5p).

Tabla 4.7. miRNAs sobreexpresados en corteza cerebral en ratas con EHI y el tratamiento con cerebrolisina al posnatal 21 (P21).

miRNA (gen)	Coeficiente correlación de Pearson	Índice de cambio		P
		EHI	EHI + Cereb	
rno-miR-350	8.12	5.56	4.44	0.0012
rno-miR-21-3p	7.58	2.31	2.07	0.0061
rno-miR-99b-3p	7.34	5.16	2.14	0.0082
rno-miR-411-3p	6.32	3.45	2.09	0.0000
rno-miR-191-5p	5.86	6.19	2.34	0.0263
rno-miR-140-3p	5.27	2.43	2.11	0.0000
rno-miR-223-3p	4.89	4.67	4.72	0.0475
rno-miR-130a-5p	4.67	9.02	2.69	0.0441
rno-miR-25-3p	4.50	10.04	2.15	0.0000
rno-miR-93-3p	3.91	2.65	2.61	0.0466
rno-miR-129-3p	3.83	18.57	4.53	0.0000
rno-miR-325-3p	3.48	6.25	2.61	0.0025
rno-miR-199a-3p	2.74	8.15	2.66	0.0000
rno-miR-93-5p	2.27	2.14	2.31	0.0000

Por otro lado, se observó que 10 miRNAs fueron inhibidos por EHI y EHI + Cereb (Tabla 4.8). De estos, 7 miRNAs aumentaron la inhibición cuando están en condiciones de EHI + Cereb (rno-miR-7-3p, rno-miR-5-5p, rno-miR-29a-3p, rno-miR-29b-3p, rno-miR-26a-3p, rno-miR-138-5p, rno-miR-338-3p) y 3 disminuyeron la inhibición (rno-miR-451-3p, rno-miR-29c-3p, rno-miR-376b-3p) en EHI + Cereb (Figura 4.12).

Tabla 4.8. miRNAs inhibidos en corteza cerebral en ratas con EHI y el tratamiento con cerebrolisina al posnatal 21 (P21).

miRNA (gen)	Coeficiente correlación de Pearson	Índice de cambio		P
		EHI	EHI + Cereb	
rno-miR-7-3p	-9.91	0.38	0.23	0.0001
rno-miR-5-5p	-8.96	0.29	0.14	0.0008
rno-miR-451-3p	-6.53	0.44	0.65	0.0005
rno-miR-29a-3p	-5.41	0.47	0.02	0.0304
rno-miR-29b-3p	-5.23	0.41	0.15	0.0000
rno-miR-29c-3p	-4.98	0.46	0.31	0.0416
rno-miR-376b-3p	-4.67	0.45	0.79	0.0000
rno-miR-26a-3p	-4.36	0.48	0.39	0.0316
rno-miR-138-5p	-4.82	0.49	0.32	0.0000
rno-miR-338-3p	-4.41	0.51	0.23	0.0167

4.2.3.1 Hipocampo

La EHI y EHI + Cereb incrementaron la expresión de 13 miRNAs en total (Tabla 4.9). De estos, 4 miRNAs (rno-miR-233, rno-miR-122a, rno-miR-20b, rno-miR-25-3p) disminuyeron su expresión por el tratamiento de EHI con cerebrolisina. Sin embargo, los otros 9 miRNAs (rno-miR-93-3p, rno-miR-20a, rno-miR-106a, rno-miR-93-5p, rno-miR-17-5p, rno-miR-324-5p, rno-miR-106b, rno-miR-21-3p, rno-miR-142-5p) incrementaron su expresión en condiciones de EHI + Cereb.

Por otra parte, EHI y EHI + Cereb inhibieron 5 miRNAs en total (Tabla 4.10), de los cuales, 3 miRNAs (rno-miR-432, rno-miR-183, rno-miR-520c) aumentaron la inhibición con el tratamiento de EHI con cerebrolisina. Sin embargo, el tratamiento de EHI con cerebrolisina disminuyó el grado de inhibición del rno-miR-182. Cabe mencionar, que la expresión del rno-miR-96 no fue afectada por el tratamiento de la EHI con cerebrolisina (Figura 4.12).

Tabla 4.9. miRNAs sobreexpresado en hipocampo en ratas con EHI y el tratamiento con cerebrolisina al posnatal 21 (P21).

miRNA (gen)	Coeficiente correlación de Pearson	Índice de cambio		P
		EHI	EHI + Cereb	
rno-miR-233	13.09	6.97	1.83	0.0000
rno-miR-93-3p	12.38	5.05	4.37	0.0004
rno-miR-20a	11.64	3.21	43.18	0.0000
rno-miR-106a	10.13	2.19	29.75	0.0007
rno-miR-122a	9.88	31.35	3.06	0.0045
rno-miR-93-5p	9.24	2.83	10.3	0.0001
rno-miR-17-5p	8.75	2.28	22.39	0.0009
rno-miR-324-5p	8.54	2.19	64.79	0.0147
rno-miR-106b	8.05	2.84	5.00	0.0003
rno-miR-20b	7.91	2.09	1.83	0.0283
rno-miR-21-3p	7.62	2.74	9.95	0.0000
rno-miR-25-3p	5.81	2.31	1.57	0.0285
rno-miR-142-5p	3.01	3.21	14.34	0.0003

Tabla 4.10. miRNAs inhibidos en hipocampo en ratas con EHI y el tratamiento con cerebrolisina al posnatal 21 (P21).

miRNA (gen)	Coeficiente correlación de Pearson	Índice de cambio		P
		EHI	EHI + Cereb	
rno-miR-96	-17.59	0.04	0.04	0.0322
rno-miR-183	-14.67	0.04	0.03	0.0233
rno-miR-182	-10.83	0.01	0.51	0.0034
rno-miR-432	-9.17	0.49	0.42	0.0053
rno-miR-520c	-3.92	0.44	0.18	0.0006

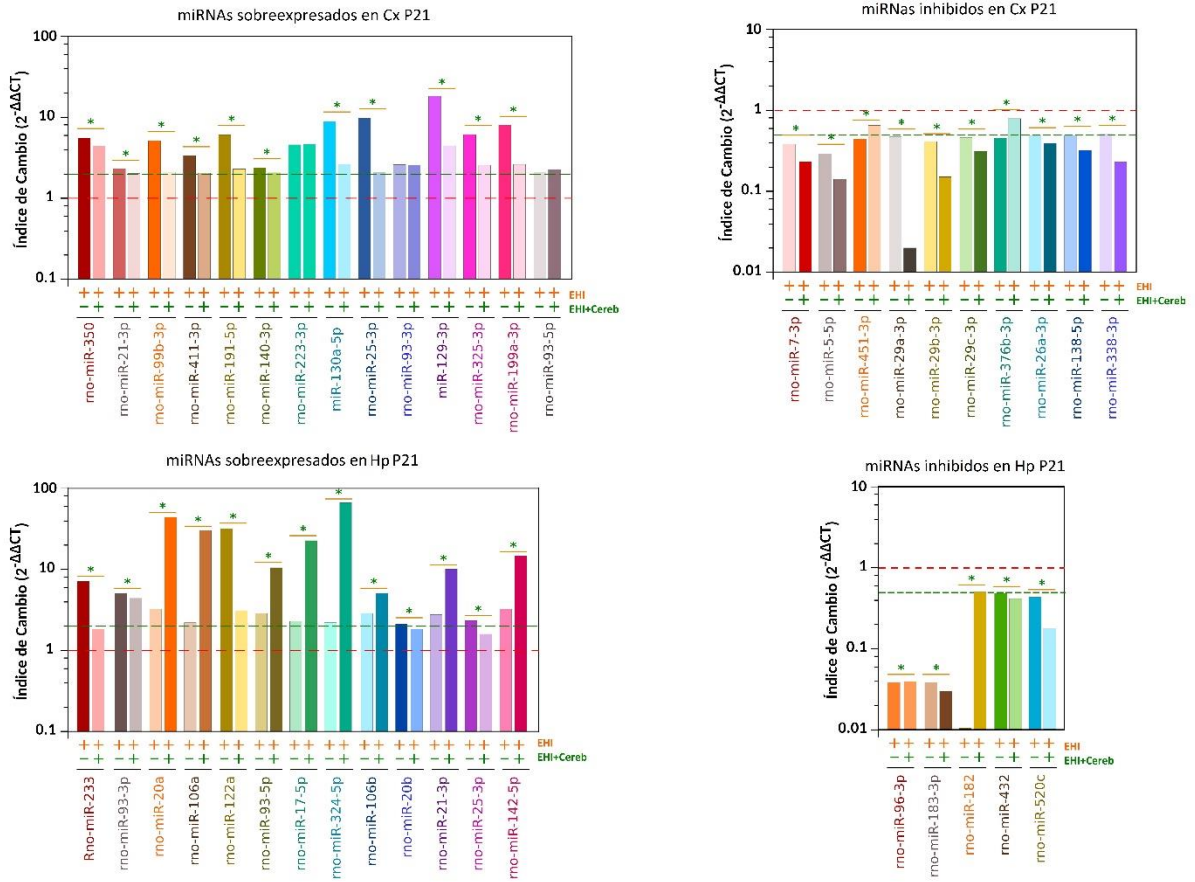


Figura 4.12. miRNAs sobreexpresado inhibidos en corteza cerebral e hipocampo en ratas con EHI y el tratamiento con cerebrolisina al posnatal 21 (P21). Los cambios de la expresión de miRNAs se evaluaron mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

4.3 Análisis bioinformático

4.3.1 MirPath v3 y TargetScan

Se realizó un análisis bioinformático en la plataforma de mirPath v3, con la finalidad de determinar en qué vía o proceso celular se encuentran implicados los miRNAs desregulados por la EHI y su tratamiento con cerebrolisina. Para ello se obtuvieron ocho mapas de calor, cuatro correspondientes a P8 y los otros cuatro a P21.

4.3.1 Mapas de calor

4.3.1.1 Posnatal 8

Se obtuvieron 4 mapas de calor para los miRNAs desregulados al día P8 por el tratamiento de EHI con cerebrolisina (Figura 3-13). Se encontró que los principales miRNAs sobreexpresados en la corteza cerebral están directamente asociados a las siguientes vías:

1. Moléculas de adhesión celular (CAMs).
2. Diabetes en los jóvenes con inicio de madurez.
3. Biosíntesis de O-Glicanos de tipo mucina.
4. Biosíntesis de ácidos grasos insaturados (Figura 4.13 A).

Por otro lado, los miRNAs inhibidos en la corteza se encuentran relacionados directamente con:

1. Biosíntesis de N-Glicanos.
2. Procesamiento de proteínas en el retículo endoplásmico.
3. Miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho (ARCV) (Figura 4.13 C).

Mientras que, los miRNAs sobreexpresados en hipocampo se encuentran asociados a:

1. Biosíntesis de pantotenato y CoA.
2. Moléculas de adhesión celular (CAMs).
3. Diabetes en los jóvenes con inicio de madurez.
4. MicroRNAs en cáncer
5. Vía de señalización del TGF- β .
6. Vía de señalización de Rap1 (Figura 4.13 B).

Mientras que, los miRNAs inhibidos en hipocampo se encuentran relacionados directamente con:

1. Moléculas de adhesión celular (CAMs).
2. Interacción del receptor ECM (Figura 4.13 D).

Posnatal 8

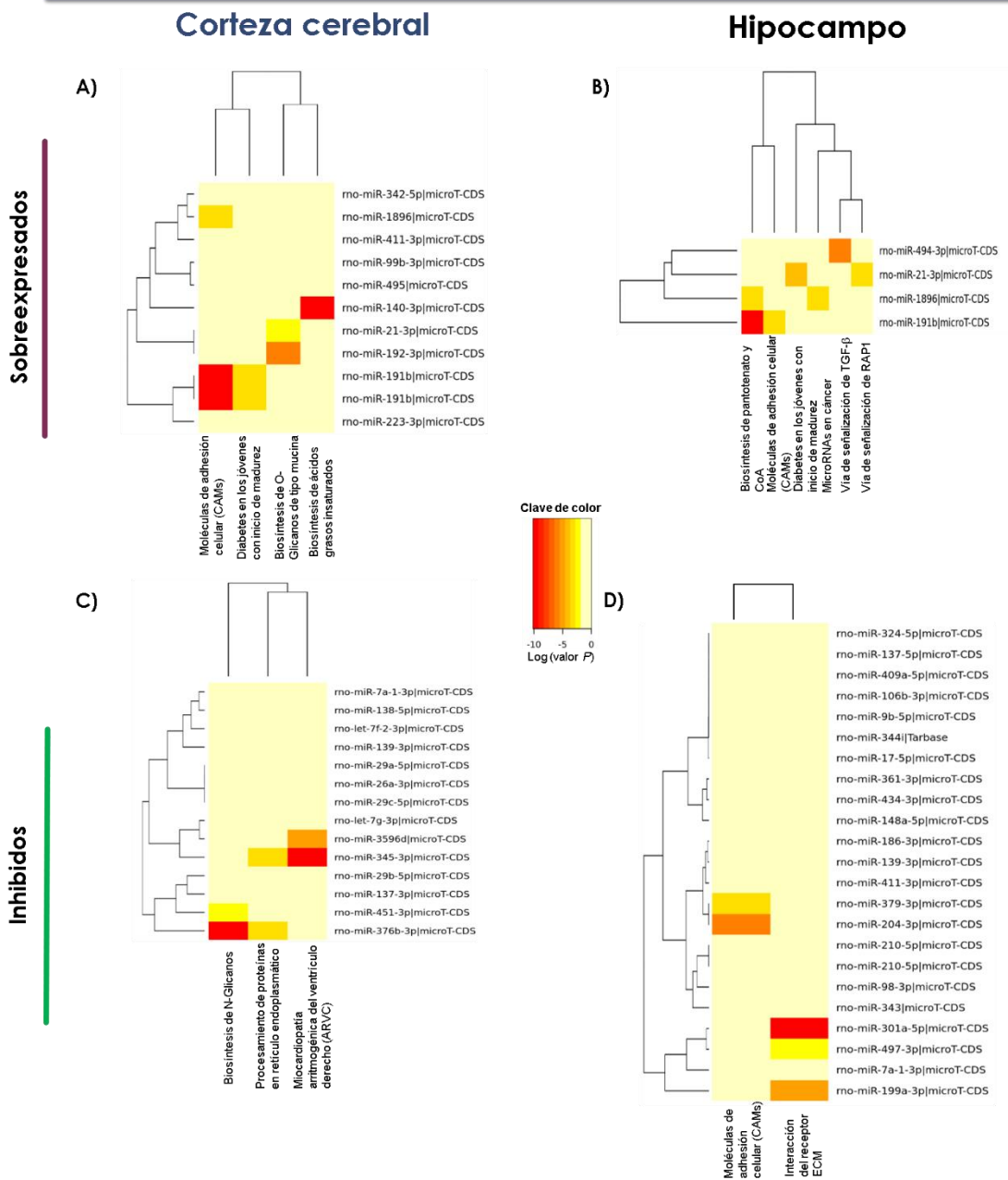


Figura 4.13. Mapas de calor de las vías afectadas por los miRNAs sobreexpresados e inhibidos durante el P8 por el tratamiento de EHI con cerebrolisina de ratas sometidas a la OACP por 30 minutos e hipoxia por 100 minutos. A) miRNAs sobreexpresados en corteza, B) miRNAs inhibidos en corteza, C) miRNAs sobreexpresados en hipocampo y D) miRNAs inhibidos en hipocampo.

4.3.1.1 Posnatal 21

Se obtuvieron 4 mapas de calor de los miRNAs desregulados al día P21, que fueron afectados por EHI + Cereb (Figura 4.14). Se encontró que los principales miRNAs sobreexpresados en la corteza cerebral están directamente asociados a las siguientes vías:

1. Carcinoma de células renales.
2. Desregulación transcripcional en cáncer.
3. Vías de señalización de las MAP cinasas.
4. Enfermedad de Parkinson
5. Biosíntesis de ácidos grasos insaturados (Figura 4.14 A).

Por otro lado, los miRNAs inhibidos en corteza se encuentran relacionados directamente con:

1. Biosíntesis de N-Glicanos.
2. Biosíntesis de Glicoesfingolípidos.
3. Vía de señalización dePI3K-Akt.
4. Proteoglicanos en cáncer.
5. Interacción del receptor ECM.
6. Amebiasis.
7. Digestión y absorción de proteínas.
8. Adhesión local (Figura 4.14 C).

Mientras que, los procesos celulares afectados por los miRNAs sobreexpresados en hipocampo son:

1. Desregulación transcripcional en cáncer.

2. MicroRNAs en cáncer
3. Vías de señalización de las MAP cinasas.
4. Carcinoma de células renales
5. Enfermedad de Parkinson.
6. Crecimiento axonal.
7. Vía de señalización del TGF- β .
8. Vías en cáncer (Figura 4.14 B).

Finalmente, los miRNAs inhibidos en hipocampo se encuentran relacionados directamente con las siguientes vías:

1. MicroRNAs en cáncer.
2. Biosíntesis de Glucosaminoglicanos queratán sulfato (Figura 4.14 D).

Posnatal 21

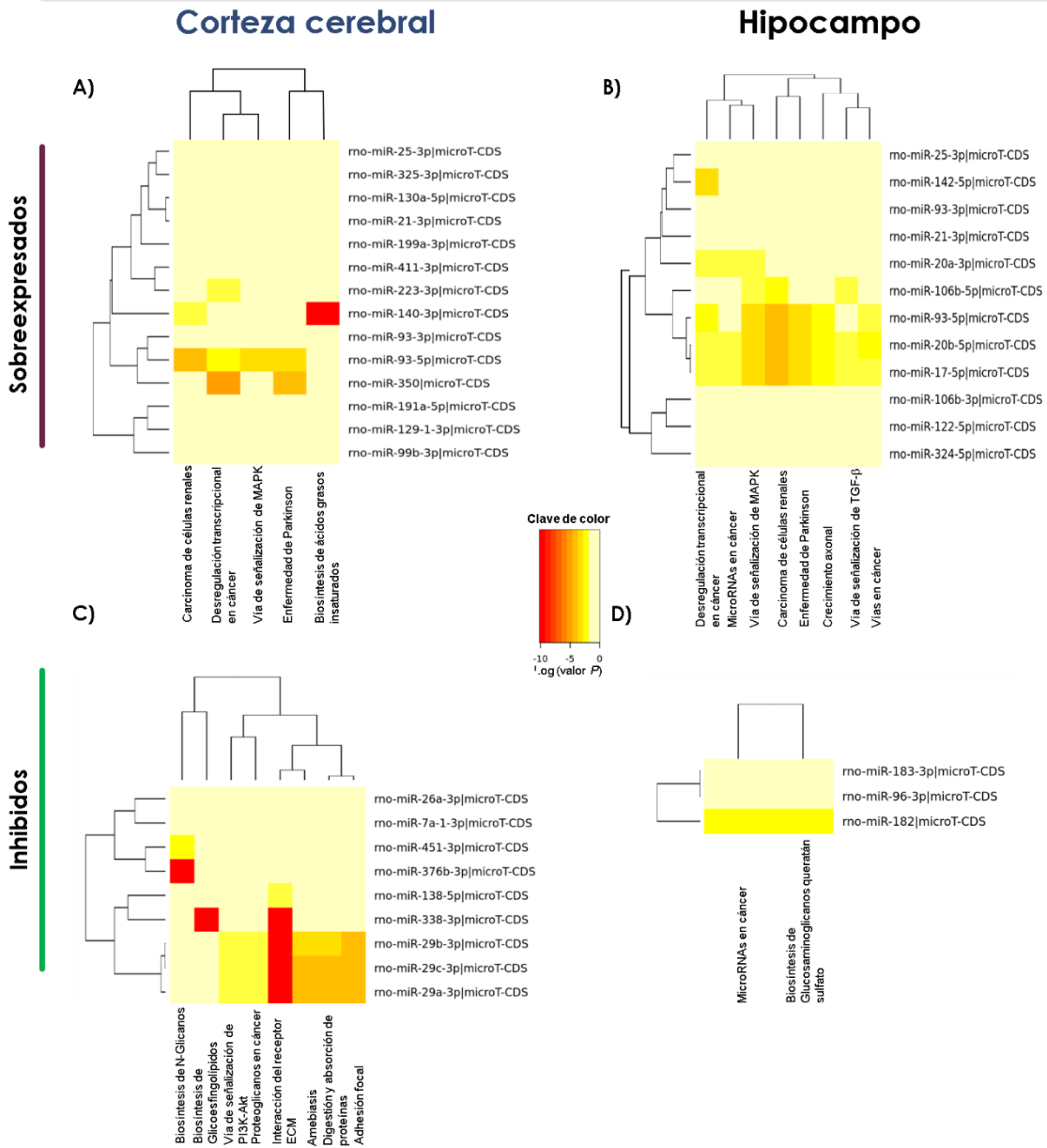


Figura 4.14. Mapas de calor de las vías afectadas por los miRNAs sobreexpresados e inhibidos durante el P21 por el tratamiento de EHI con cerebrolisina de ratas sometidas a la OACP por 30 minutos e hipoxia por 100 minutos. A) miRNAs sobreexpresados en corteza, B) miRNAs inhibidos en corteza, C) miRNAs sobreexpresados en hipocampo y D) miRNAs inhibidos en hipocampo.

miRNA (continuación)	IGF1	IGF1R	IGF2	IGF2R	IGF2BP1	IGF2BP2	IGF2BP3	IGFBP2	IGFBP3	IGFBP5	LTBP2	LTBP3	NGFR	NGFRAP1	PDGFA	PDGFB	PDGFC	PDGFD	PDGFRA	PDGFRB	PGF	TBRG1	TGFA	TGFB1	TGFB2	TGFB3	TGFBI	TGFBR1	TGFBR2	TGFBR3	TGFRAP1	VEGFA	VEGFC	
Predicted miR-189																																		
Predicted miR-191																																		
rno-miR-342-5p																																		
rno-miR-99b-3p																																		
rno-miR-411-3p																																		
rno-miR-140-3p																																		
rno-miR-191b																																		
rno-miR-223-3p																																		
rno-miR-495																																		
rno-miR-213																																		
rno-miR-192-3p																																		
rno-miR-21-3p																																		

4.3.3.2 miRNAs inhibidos en corteza cerebral en P8

En la corteza cerebral se encontraron 13 miRNAs inhibidos, estos tienen como genes blanco 72 factores de crecimiento en corteza cerebral con EHI + Cereb: CTGF, EGF, EGFR, EPS8, EPS15, EPS15L1, FGFBP1, FGFBP3, FGF1, FGFR1, FGF2, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FGF5, FGF7, FGF9, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF16, FGF18, FGF19, FGF20, FGF22, FGF23, FRS2, GFER, GF11, GRB2, GRB7, GRB10, HBEGF, HDGFL1, HDGFRP3, HGS, IGFBP1, IGFBP3, IGFBP4, IGFBP5, IGF1, IGF1R, IGF2, IGF2R, IGFBPL1, IGF2BP1, IGF2BP2, IGF2BP3, LTBP2, LTBP3, LTBP4, NGFR, OGFRL1, PDGFC, PDGFD, PDGFRA, PDGFRB, PGF, TBRG1, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB3, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3, TGFBR3L, TGFBRAP1, VEGFA y VEGFC (Tabla 4.12)

Tabla 4.12. Factores de crecimiento que interactúan con los miRNAs inhibidos en corteza cerebral por el tratamiento de EHI con cerebrolisina al día P8.

miRNA	CTGF	EGF	EGFR	EPS8	EPS15	EPS15L1	FGF1	FGF2	FGF5	FGF7	FGF9	FGF11	FGF12	FGF13	FGF14	FGF16	FGF18	FGF19	FGF20	FGF22	FGF23	FGFBP1	FGFBP3	FGFR1	FGFR2	FGFR3	FGFR4	FRS2	GFER	GF11	GRB2	GRB7	GRB10	HBEGF	HDGFL1	HDGFRP3
rno-miR-139-3p																																				
rno-miR-7-3p																																				
rno-miR-137-3p																																				
rno-let-7g-3p																																				
rno-miR-376b-3p																																				
rno-miR-345-3p																																				
rno-let-7-3p																																				
rno-miR-451-3p																																				
rno-miR-26a-3p																																				
rno-let-7f-2-3p																																				
rno-miR-29b-5p																																				
rno-miR-29a-5p																																				
rno-miR-138-5p																																				
rno-miR-29c-5p																																				

miRNA (continuación)	HGF	IGF1	IGF1R	IGF2	IGF2R	IGF2BP1	IGF2BP2	IGF2BP3	IGFBP1	IGFBP3	IGFBP4	IGFBP5	IGFBPL1	LTBP2	LPBP2	LPBP4	NGFR	NGFRAP1	OGFR1	PDGFC	PDGFD	PDGFRA	PDGFRB	PGF	TBRG1	TGFA	TGFB1	TGFB2	TGFB3	TGFBRI	TGFBRII	TGFBRIII	TGFBRIII	VEGFA	VEGFC	
rno-miR-139-3p																																				
rno-miR-7-3p																																				
rno-miR-137-3p																																				
rno-let-7g-3p																																				
rno-miR-376b-3p																																				
rno-miR-345-3p																																				
rno-let-7-3p																																				
rno-miR-451-3p																																				
rno-miR-26a-3p																																				
rno-let-7f-2-3p																																				
rno-miR-29b-5p																																				
rno-miR-29a-5p																																				
rno-miR-138-5p																																				
rno-miR-29c-5p																																				

4.3.3.3 miRNAs sobreexpresados en hipocampo en P8

Igualmente, se identificaron 30 factores de crecimiento que presentaron al menos un sitio de unión a los miRNAs sobreexpresados en hipocampo que desarrollo EHI y fue tratado con cerebrolisina: EGFR, FGF7, FGF8, FGF9, FGF10, FGF12, FGF13, FGF14, FGF20, FGFR1, FGFR2, FRS2, GRB7, HGF, HDGFRP3, IGF1, IGF1R, IGF2BP1, IGF2BP2, LTBP2, NGFR, PDGFRA, PDGFRB, TBRG1, TGFA, TGFB2, TGFBRI, TGFBRII, TGFBRIII y VEGFC (Tabla 4.13).

Tabla 4.13. Factores de crecimiento que interactúan con los miRNAs sobreexpresados en hipocampo por el tratamiento de EHI con cerebrolisina al día P8.

miRNA	EGFR	FGF7	FGF8	FGF9	FGF10	FGF12	FGF13	FGF14	FGF20	FGFR1	FGFR2	FRS2	GRB7	HGF	HDGFRP3	IGF1	IGF1R	IGF2BP1	IGF2BP2	LTBP2	NGFR	PDGFRA	PDGFRB	TBRG1	TGFA	TGFB2	TGFBRI	TGFBRII	TGFBRIII	VEGFC					
Predicted miR-189																																			
Predicted miR-191																																			
rno-miR-494-3p																																			
rno-miR-21-3p																																			

4.3.3.4 miRNAs inhibidos en hipocampo en P8

En el hipocampo se encontraron 23 miRNAs inhibidos, estos tienen como genes blanco 89 factores de crecimiento que presentan un sitio de unión a algún miRNA: CTGF, EGF, EGFR, EPS15L1, EPS8, EPS15, FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF5, FGF7, FGF8, FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF20, FGF23, FGFBP1, FGFBP3, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4,

miRNA (continuación)	GFER	GFI1	GFI1B	GRB7	GRB10	HBEGF	HDGF	HDGFL1	HDGFRP3	HGF	IGF1	IGF2	IGF1R	IGF2R	IGF2BP1	IGF2BP2	IGF2BP3	IGF2R	IGFALS	IGFBP2	IGFBP3	IGFBP4	IGFBP5	IGFBPL1	LTBP1	LTBP2	LPBP3	LPBP4	NGFR	NGFRAP1	OGFRL1	PDGFA	PDGFB	PDGFC	PDGFD	
rno-miR-344	■	■									■	■			■															■		■				
rno-miR-7-3p				■	■			■	■	■	■		■		■	■	■					■														
Rno-miR-497-39	■	■		■	■			■	■	■	■				■							■	■				■									
rno-miR-301-5p		■	■								■											■		■											■	
Rno-miR-343		■						■							■							■		■	■	■	■						■			
rno-miR-148a-5p								■			■		■										■		■	■	■							■		
rno-miR-137-5p											■				■																					■
rno-miR-324-5p																																				
rno-miR-186-3p	■	■				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
rno-miR-361-3p	■	■				■	■				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
rno-miR-17-5p															■																					
miR-409-5p																																				■
rno-miR-434-3p							■					■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
rno-miR-411-3p												■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
rno-miR-379-3p							■					■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
rno-miR-210-5p											■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
rno-miR-204-3p						■	■				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
rno-miR-210-5p																																				
rno-miR-199-3p																																				
rno-miR-139-3p												■																								■
rno-miR-106-3p											■																									
rno-miR-9-5p																																				
rno-miR-98-3p																																				

miRNA (continuación)	PDGFRA	PDGFRB	PGF	TBRG1	TBRG4	TGFA	TGFB1	TGFB2	TGFB3	TGFB1	TGFB2	TGFB3	TGFB1	TGFB2	TGFB3	TGFB1	TGFB2	TGFB3	TGFB1	TGFB2	TGFB3	TGFB1	TGFB2	TGFB3	VEGFA	VEGFB	VEGFC	VEGFC	VEGFC	VEGFC	VEGFC	VEGFC	VEGFC	VEGFC			
rno-miR-344	■																																				
rno-miR-7-3p	■																																				
Rno-miR-497-39																																					
rno-miR-301-5p																																					
Rno-miR-343																																					
rno-miR-148a-5p																																					
rno-miR-137-5p																																					
rno-miR-324-5p																																					
rno-miR-186-3p																																					
rno-miR-361-3p																																					
rno-miR-17-5p																																					
miR-409-5p																																					
rno-miR-434-3p																																					
rno-miR-411-3p																																					
rno-miR-379-3p																																					
rno-miR-210-5p																																					
rno-miR-204-3p																																					
rno-miR-210-5p																																					
rno-miR-199-3p																																					
rno-miR-139-3p																																					
rno-miR-106-3p																																					
rno-miR-9-5p																																					
rno-miR-98-3p																																					

4.3.3.5 miRNAs sobreexpresados en corteza cerebral en P21

Se identificaron 66 factores de crecimiento que presentaron al menos un sitio consenso para la unión de los miRNAs sobreexpresados en la corteza

cerebral con EHI + Cereb: CTGF, EGF, EGFR, EPS8, EPS15, FGF2, FGF4, FGF5, FGF7, FGF8, FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF20, FGFR1, FGFR2, FRS2, GFER, GF11, GRB2, GRB7, GRB10, HBEGF, HDGF, HDGFL1, HDGFRP3, HGF, IGF1, IGF1R, IGF2R, IGF2BP1, IGF2BP2, IGF2BP3, IGFBP2, IGFBP3, IGFBP4, IGFBP5, IGFBPL1, LTBP1, LTBP2, LPBP3, LPBP4, NGFR, NGFRAP1, OGFRL1, PDGFA, PDGFC, PDGFD, PDGFRA, PDGFRB, PGF, TBRG1, TGFA, TGFB2, TGFB3, TGFB1, TGFR1, TGFR2, TGFR3, TGBRAP1, TRBG4, VEGFA y VEGFC (Tablas 4.15).

Tabla 4.15. Factores de crecimiento que interactúan con los miRNAs sobreexpresados en corteza cerebral por el tratamiento de EHI con cerebrolisina al día P2.

miRNA	CTGF	EGF	EGFR	EPS8	EPS15	FGF2	FGF4	FGF5	FGF7	FGF8	FGF9	FGF10	FGF11	FGF12	FGF13	FGF14	FGF20	FGFR1	FGFR2	FRS2	GFER	GF11	GRB2	GRB7	GRB10	HBEGF	HDGF	HDGFL1	HDGFRP3	HGF	IGF1	IGF1R	IGF2R	IGF2BP1	IGF2BP2	
rno-miR-350																																				
rno-miR-21-3p																																				
rno-miR-99b-3p																																				
rno-miR-411-3p																																				
rno-miR-191-5p																																				
rno-miR-140-3p																																				
rno-miR-223-3p																																				
miR-130a-5p																																				
rno-miR-25-3p																																				
rno-miR-93-3p																																				
miR-129-3p																																				
rno-miR-325-3p																																				
rno-miR-199a-3p																																				
rno-miR-93-5p																																				

miRNA (continuación)	IGF2BP3	IGFBP2	IGFBP3	IGFBP4	IGFBP5	IGFBPL1	LTBP1	LTBP2	LPBP3	LPBP4	NGFR	NGFRAP1	OGFRL1	PDGFA	PDGFC	PDGFD	PDGFRA	PDGFRB	PGF	TBRG1	TGFA	TGFB2	TGFB3	TGFB1	TGFR1	TGFR2	TGFR3	TGBRAP1	TRBG4	VEGFA	VEGFC				
rno-miR-350																																			
rno-miR-21-3p																																			
rno-miR-99b-3p																																			
rno-miR-411-3p																																			
rno-miR-191-5p																																			
rno-miR-140-3p																																			
rno-miR-223-3p																																			
miR-130a-5p																																			
rno-miR-25-3p																																			
rno-miR-93-3p																																			
miR-129-3p																																			
rno-miR-325-3p																																			
rno-miR-199a-3p																																			
rno-miR-93-5p																																			

4.3.3.6 miRNAs inhibidos en corteza cerebral en P21

Del mismo modo, se identificaron 48 factores de crecimiento que presentaron al menos un sitio consenso para la unión de los miRNAs inhibidos en la corteza cerebral con EHI + Cereb: CTGF, EGF, EGFR, EPS15L1, EPS15, FGF1, FGF2, FGF5, FGF7, FGF9, FGF10, FGF12, FGF13, FGF14, FGF23, FGFBP1, FGFR1, FGFR2, FGFR4, FRS2, GFER, GRB7, GRB10, HBEGF, HDGF, HDGFL1, HDGFRP3, HGF, IGF1, IGF1R, IGF2BP1, IGF2BP2, IGF2BP3, IGFBP3, IGFBPL1, NGFR, OGFRL1, PDGFA, PDGFB, PDGFC, PDGFRA, PDGFRB, TBRG1, TGFB2, TGFB3, TGFB3, VEGFA y VEGFC (Tablas 4.16).

Tabla 4.16. Factores de crecimiento que interactúan con los miRNAs inhibidos en corteza cerebral por el tratamiento de EHI con cerebrolisina al día P21.

miRNA	CTGF	EGF	EGFR	EPS15L1	EPS15	FGF1	FGF2	FGF5	FGF7	FGF9	FGF10	FGF12	FGF13	FGF14	FGF23	FGFBP1	FGFR1	FGFR2	FGFR4	FRS2	GFER	GRB7	GRB10	HBEGF	HDGF	HDGFL1	HDGFRP3	HGF	IGF1	IGF1R	IGF2BP1	IGF2BP2	IGF2BP3	IGFBP3	IGFBPL1	
rno-miR-7-3p	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
rno-miR-5-5p	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
rno-miR-451-3p	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
rno-miR-29a-3p	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
rno-miR-29b-3p	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
rno-miR-29c-3p	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
rno-miR-376b-3p	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
rno-miR-26a-3p	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
rno-miR-138-5p	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
rno-miR-338-3p	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

miRNA (continuación)	NGFR	OGFRL1	PDGFA	PDGFB	PDGFC	PDGFRA	PDGFRB	TBRG1	TGFB2	TGFB3	TGFB3	VEGFA	VEGFC
rno-miR-7-3p	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
rno-miR-5-5p	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
rno-miR-451-3p	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
rno-miR-29a-3p	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
rno-miR-29b-3p	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
rno-miR-29c-3p	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
rno-miR-376b-3p	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
rno-miR-26a-3p	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
rno-miR-138-5p	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
rno-miR-338-3p	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

4.3.3.7 miRNAs sobreexpresados en el hipocampo en P21

De la misma forma, se identificaron 64 factores de crecimiento que presentaron al menos un sitio consenso para la unión de los miRNAs sobreexpresados en hipocampo con EHI + Cereb: CTGF, EGF, EGFR, EPS8,

EPS15, FGF1, FGF2, FGF4, FGF5, FGF7, FGF8, FGF9, FGF10, FGF12, FGF13, FGF14, FGF19, FGF20, FGFR1, FGFR2, FIGF, FRS2, GFER, , GFI1, GFI1B, GRB7, GRB10, HGF, IGF1, IGF1R, IGF2R, IGF2BP1, IGF2BP2, IGF2BP3, IGFBP2, IGFBP3, IGFBP4, IGFBP5, IGFBP7, IGFBPL1, LTBP2, LTBP3, NGFR, OGFRL1, PDGFB, PDGFD, PDGFRA, PDGFRB, TBRG1, TGFA, TGFB2, TGFB1, TGFB1R, TGFB2R, TGFB3R, TGFBRAP1, TRBG1, TRBG4, VEGFA, VEGFB y VEGFC (Tablas 4.17).

Tabla 4.17. Factores de crecimiento que interactúan con los miRNAs sobreexpresados en hipocampo por el tratamiento de EHI con cerebrolisina al día P21.

miRNA	CTGF	EGF	EGFR	EPS8	EPS15	FGF1	FGF4	FGF5	FGF7	FGF8	FGF9	FGF10	FGF12	FGF13	FGF14	FGF19	FGF20	FGFR1	FGFR2	FIGF	FRS2	GFER	GFI1	GFI1B	GRB7	GRB10	HBEGF	HDGFL1	HDGFRP3	HGF	IGF1	IGF1R	IGF2R	IGF2BP1			
rno-miR-233																																					
rno-miR-93-3p																																					
rno-miR-20a																																					
rno-miR-106a																																					
rno-miR-122a																																					
rno-miR-93-5p																																					
rno-miR-17-5p																																					
rno-miR-324-5p																																					
rno-miR-106b																																					
rno-miR-20b																																					
rno-miR-21-3p																																					
rno-miR-25-3p																																					
rno-miR-142-5p																																					

miRNA (continuación)	IGF2BP2	IGF2BP3	IGFBP2	IGFBP3	IGFBP4	IGFBP5	IGFBP7	IGFBPL1	LTBP2	LPBP3	NGFR	OGFRL1	PDGFB	PDGFD	PDGFRA	PDGFRB	TBRG1	TGFA	TGFB2	TGFB1	TGFB1R	TGFB2R	TGFB3R	TGFBRAP1	TRBG1	TRBG4	VEGFA	VEGFB	VEGFC								
rno-miR-233																																					
rno-miR-93-3p																																					
rno-miR-20a																																					
rno-miR-106a																																					
rno-miR-122a																																					
rno-miR-93-5p																																					
rno-miR-17-5p																																					
rno-miR-324-5p																																					
rno-miR-106b																																					
rno-miR-20b																																					
rno-miR-21-3p																																					
rno-miR-25-3p																																					
rno-miR-142-5p																																					

4.3.3.8 miRNAs inhibidos en el hipocampo en P21

Finalmente, en hipocampo se identificaron 36 factores de crecimiento que presentaron al menos un sitio consenso para la unión de los miRNAs inhibidos.

De estos miRNAs solo se pudieron identificar los factores de crecimiento de 3 miRNAs (rno-miR-96, rno-miR-183 y rno-miR-182), sin embargo, el análisis bioinformático reveló una gran cantidad de factores de crecimiento: CTGF, EGFR, EPS8, EPS15, EPS15L1, FGF1, FGF2, FGF7, FGF9, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGFR2, FRS2, GRB2, GRB14, HDGFRP3, HGF, IGF1, IGF1R, IGF2, IGF2R, IGFBP3, IGFBPL1, LTBP2, OGFRL1, PDGFB, PDGFD, PDGFRA, TBRG1, TGFB2, TGFB1, TGFB3L (Tablas 4.18).

Tabla 4.18. Factores de crecimiento que interactúan con los miRNAs inhibidos en hipocampo por el tratamiento de EHI con cerebrolisina al día P21.

miRNA	CTGF	EGFR	EPS8	EPS15	EPS15L1	FGF1	FGF2	FGF7	FGF9	FGF11	FGF12	FGF13	FGF14	FGFR2	FRS2	GRB2	GRB14	HDGFRP3	HGF	IGF1	IGF1R	IGF2	IGF2R	IGFBP1	IGFBP3	IGFBPL1	LTBP2	OGFRL1	PDGFB	PDGFD	PDGFRA	TBRG1	TGFB2	TGFB1	TGFB3L		
rno-miR-96																																					
rno-miR-183																																					
rno-miR-182																																					

4.3.4 Genes blanco que codifican para ciclinas

4.3.4.1 miRNAs sobreexpresados en la corteza cerebral en P8

Se identificaron 46 ciclinas que presentaron al menos un sitio consenso para la unión de los miRNAs sobreexpresados en la corteza cerebral con EHI + Cereb: CCNA2, CCNC, CCNDBP1, CCND2, CCNE, CCNG1, CCNG2, CCNF, CCNH, CCNJ, CCNJL, CCNK, CCNO, CCNT1, CCNT2, CCNY, CCNYL1, CDK2, CDK6, CDK8, CDK12, CDK13, CDK14, CDK15, CDK16, CDK17, CDK18, CDK19, CNK11B, CDK2AP1, CDK5R1, CDKL1, CDKL2, CDKL3, CDKL4, CDKN1A, CDKN2C, CNNM1, CNNM2, CNNM3, CNNM4, CNPPD1, CNTD1, DMTF1, GAK y NUCKS1 (Tablas 4.19).

Tabla 4.19. Ciclinas que interactúan con los miRNAs sobreexpresados en corteza cerebral por el tratamiento de EHI con cerebrolisina al día P8.

miRNA	CCNA2	CCNC	CCNDBP1	CCND2	CCNE	CCNG1	CCNG2	CCNF	CCNH	CCNJ	CCNJL	CCNK	CCNO	CCNT1	CCNT2	CCNY	CCNYL1	CDK2	CDK6	CDK8	CDK12	CDK13	CDK14	CDK15	CDK16	CDK17	CDK18	CDK19	CNK11B	CDK2AP1	CDK5R1	CDKL1	CDKL2	CDKL3		
Predicted miR-189																																				
Predicted miR-191																																				
rno-miR-342-5p																																				
rno-miR-99b-3p																																				
rno-miR-411-3p																																				
rno-miR-140-3p																																				
rno-miR-191b																																				
rno-miR-223-3p																																				
rno-miR-495																																				
rno-miR-213																																				
rno-miR-192-3p																																				
rno-miR-21-3p																																				

miRNA (continuación)	CDKL4	CDKN1A	CDKN2C	CNNM1	CNNM2	CNNM3	CNNM4	CNPPD1	CNTD1	DMTF1	GAK	NUCKS1
Predicted miR-189												
Predicted miR-191												
rno-miR-342-5p												
rno-miR-99b-3p												
rno-miR-411-3p												
rno-miR-140-3p												
rno-miR-191b												
rno-miR-223-3p												
rno-miR-495												
rno-miR-213												
rno-miR-192-3p												
rno-miR-21-3p												

4.3.4.2 miRNAs inhibidos en la corteza cerebral en P8

Del mismo modo, se identificaron 68 ciclinas que presentaron al menos un sitio consenso para la unión de los miRNAs inhibidos en la corteza cerebral con EHI + Cereb: CCNA2, CCNB1, CCNB2, CCNC, CCNB1IP1, CCNDBP1, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE, CCNE1, CCNE2, CCNF, CCNG1, CCNG2, CCNH, CCNI, CCNI2, CCNJ, CCNJL, CCNK, CCNL1, CCNL2, CCNO, CCNT1, CCNT2, CCNY, CCNYL1, CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, CDK6, CDK8, CDK11, CDK12, CDK13, CDK14, CDK15, CDK16, CDK17, CDK18, CDK19, CNK11B, CDK2AP1, CDK2AP2, CDK5R1, CDK5R2, CDKL1, CDKL2, CDKL3, CDKL4, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2B, CDKN1C, CDKN2C, CINP, CNNM1, CNNM2, CNNM3, CNNM4, CNPPD1, CNTD1, DMTF1, GAK, NUCKS1 y SCAPER (Tabla 4.20).

Tabla 4.20. Ciclinas que interactúan con los miRNAs inhibidos en corteza cerebral por el tratamiento de EHI con cerebrolisina al día P8.

miRNA	CCNA2	CCNB1	CCNB2	CCNC	CCNB1IP1	CCNDBP1	CCND1	CCND3	CCNE	CCNE1	CCNE2	CCNF	CCNG1	CCNG2	CCNH	CCNI	CCN2	CCNJ	CCNKL	CCNK	CCNL1	CCNL2	CCNO	CCNT1	CCNT2	CCNY	CCNYL1	CDK1	CDK2	CDK3	CDK4	CDK6	CDK8		
rno-miR-139-3p																																			
rno-miR-7-3p																																			
rno-miR-137-3p																																			
rno-let-7g-3p																																			
rno-miR-376b-3p																																			
rno-miR-345-3p																																			
rno-let-7-3p																																			
rno-miR-451-3p																																			
rno-miR-26a-3p																																			
rno-let-7f-2-3p																																			
rno-miR-29b-5p																																			
rno-miR-29a-5p																																			
rno-miR-138-5p																																			
rno-miR-29c-5p																																			

miRNA (continuación)	CDK11	CDK12	CDK13	CDK14	CDK15	CDK16	CDK17	CDK18	CDK19	CNK11B	CDK2AP1	CDK2AP2	CDK5R1	CDK5R2	CDKL1	CDKL2	CDKL3	CDKL4	CDKN1A	CDKN1B	CDKN2B	CDKN1C	CDKN2C	CINP	CNNM1	CNNM2	CNNM3	CNNM4	CNPPD1	CNTD1	DMTF1	GAK	NUCKS1	SCAPER		
rno-miR-139-3p																																				
rno-miR-7-3p																																				
rno-miR-137-3p																																				
rno-let-7g-3p																																				
rno-miR-376b-3p																																				
rno-miR-345-3p																																				
rno-let-7-3p																																				
rno-miR-451-3p																																				
rno-miR-26a-3p																																				
rno-let-7f-2-3p																																				
rno-miR-29b-5p																																				
rno-miR-29a-5p																																				
rno-miR-138-5p																																				
rno-miR-29c-5p																																				

4.3.4.3 miRNAs sobreexpresados en el hipocampo en P8

Por otro lado, se identificaron 32 ciclinas que presentaron al menos un sitio consenso para la unión de los miRNAs inhibidos en la corteza cerebral con EHI + Cereb: CCNA2, CCND2, CCNE1, CCNG1, CCNG2, CCNJ, CCNKL, CCNO, CCNT1, CCNY, CDK2, CDK6, CDK13, CDK14, CDK15, CDK16, CDK17, CDK18, CDK19, CNK11B, CDK5R1, CDKL1, CDKL2, CDKL4, CDKN1A, CDKN2C, CNNM2, CNNM4, CNPPD1, CNTD1, DMTF1 y NUCKS1 (Tablas 4.21).

Tabla 4.21. Ciclinas que interactúan con los miRNAs sobreexpresados hipocampo por el tratamiento de EHI con cerebrolisina al día P8.

miRNA	CCNA2	CCND2	CCNE1	CCNG1	CCNG2	CCNJ	CCNJL	CCNO	CCNT1	CCNY	CDK2	CDK6	CDK13	CDK14	CDK15	CDK16	CDK17	CDK18	CDK19	CNK11B	CDK5R1	CDKL1	CDKL2	CDKL4	CDKN1A	CDKN2C	CNNM2	CNNM4	CNPPD1	CNTD1	DMTF1	NUCKS1	
Predicted miR-189																																	
Predicted miR-191																																	
rno-miR-494-3p																																	
rno-miR-21-3p																																	

4.3.4.4 miRNAs inhibidos en el hipocampo en P8

Igualmente, se identificaron 63 ciclinas que presentaron al menos un sitio consenso para la unión de los miRNAs inhibidos en la corteza cerebral con EHI + Cereb: CCNA2, CCNB2, CCNC, CCNB1IP1, CCNDBP1, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE2, CCNF, CCNG1, CCNG2, CCNH, CCNI, CCNI2, CCNJ, CCNJL, CCNK, CCNL1, CCNL2, CCNO, CCNT1, CCNT2, CCNY, CCNYL1, CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, CDK6, CDK7, CDK8, CDK9, CDK10, CDK12, CDK13, CDK14, CDK15, CDK16, CDK17, CDK18, CDK19, CNK11B, CDK5R1, CDKL1, CDKL2, CDKL3, CDKL4, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2B, CDKN1C, CDKN2C, CNNM1, CNNM2, CNNM3, CNNM4, CNPPD1, CNTD1, DMTF1, GAK, NUCKS1 y SCAPER (Tablas 4.22).

Tabla 4.22. Ciclinas que interactúan con los miRNAs inhibidos en por el tratamiento de EHI con cerebrolisina al día P8.

miRNA	CCNA2	CCNB2	CCNC	CCNB1IP1	CCND1	CCND2	CCND3	CCNE2	CCNF	CCNG1	CCNG2	CCNH	CCNI	CCN2	CCNJ	CCNJL	CCNK	CCNL1	CCNL2	CCNO	CCNT1	CCNT2	CCNY	CCNYL1	CDK1	CDK2	CDK3	CDK4	CDK6	CDK7	CDK8	CDK9	CDK10		
rno-miR-344																																			
rno-miR-7-3p																																			
Rno-miR-497-39																																			
rno-miR-301-5p																																			
Rno-miR-343																																			
rno-miR-148a-5p																																			
rno-miR-137-5p																																			
rno-miR-324-5p																																			
rno-miR-186-3p																																			
rno-miR-361-3p																																			
rno-miR-17-5p																																			
miR-409-5p																																			
rno-miR-434-3p																																			
rno-miR-411-3p																																			
rno-miR-379-3p																																			
rno-miR-210-5p																																			
rno-miR-204-3p																																			
rno-miR-210-5p																																			
rno-miR-199-3p																																			
rno-miR-139-3p																																			
rno-miR-106-3p																																			
rno-miR-9-5p																																			
rno-miR-98-3p																																			

miRNA (continuación)	GDK12	GDK13	GDK14	GDK15	GDK16	GDK17	GDK18	GDK19	CNK11B	GDK9R1	GDKL1	GDKL2	GDKL3	GDKL4	GDKN1A	GDKN1B	GDKN2B	GDKN2C	CNNM1	CNNM2	CNNM3	CNNM4	CNPPD1	CNTD1	DMTF1	GAK	NUCKS1	SCAPER						
rno-miR-344																																		
rno-miR-7-3p																																		
Rno-miR-497-39																																		
rno-miR-301-5p																																		
Rno-miR-343																																		
rno-miR-148a-5p																																		
rno-miR-137-5p																																		
rno-miR-324-5p																																		
rno-miR-186-3p																																		
rno-miR-361-3p																																		
rno-miR-17-5p																																		
miR-409-5p																																		
rno-miR-434-3p																																		
rno-miR-411-3p																																		
rno-miR-379-3p																																		
rno-miR-210-5p																																		
rno-miR-204-3p																																		
rno-miR-210-5p																																		
rno-miR-199-3p																																		
rno-miR-139-3p																																		
rno-miR-106-3p																																		
rno-miR-9-5p																																		
rno-miR-98-3p																																		

4.3.4.6 miRNAs inhibidos en la corteza cerebral en P21

Por otra parte, se identificaron 42 ciclinas que presentaron al menos un sitio consenso para la unión de los miRNAs inhibidos en corteza con EHI + Cereb: CCNA2, CCNB1IP1, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CCNE2, CCNG1, CCNG2, CCNI, CCNJ, CCNJL, CCNL2, CCNO, CCNT1, CCNT2, CCNY, CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, CDK6, CDK8, CDK12, CDK13, CDK14, CDK16, CDK19, CDK5R1, CDKL2, CDKL3, CDKL4, CDKN2B, CDKN1C, CDKN2C, CINP, CNM1, CNM2, CNM4, DMTF1, GAK y NUCKS1 (Tablas 4.24).

Tabla 4.24. Ciclinas que interactúan con los miRNAs inhibidos en corteza cerebral por el tratamiento de EHI con cerebrolisina al día P21.

miRNA	CCNA2	CCNB1IP1	CCND1	CCND2	CCND3	CCNE1	CCNE2	CCNG1	CCNG2	CCNI	CCNJ	CCNJL	CCNL2	CCNO	CCNT1	CCNT2	CCNY	CDK1	CDK2	CDK3	CDK4	CDK6	CDK8	CDK12	CDK13	CDK14	CDK16	CDK19	CDK5R1	CDKL2	CDKL3	CDKL4	CDKN2B	CDKN1C		
rno-miR-7-3p	■	■	■	■					■	■		■		■		■	■	■	■	■					■			■	■	■	■	■	■			
rno-miR-5-5p																																				
rno-miR-451-3p																	■			■					■										■	
rno-miR-29a-3p				■																																
rno-miR-29b-3p				■																																
rno-miR-29c-3p				■																																
rno-miR-376b-3p																																				
rno-miR-26a-3p																																				
rno-miR-138-5p																																				
rno-miR-338-3p																																				

miRNA (continuación)	CDKN2C	CINP	CNNM1	CNNM2	CNNM4	DMTF1	GAK	NUCKS1
rno-miR-7-3p	■							
rno-miR-5-5p								
rno-miR-451-3p								
rno-miR-29a-3p								
rno-miR-29b-3p								
rno-miR-29c-3p								
rno-miR-376b-3p								
rno-miR-26a-3p								
rno-miR-138-5p								
rno-miR-338-3p								

4.3.4.7 miRNAs sobreexpresados en el hipocampo en P21

Por otra parte, se identificaron 54 ciclinas que presentaron al menos un sitio consenso para la unión de los miRNAs sobreexpresados en hipocampo con EHI +Cereb: CCNA2, CCNC, CCNDBP1, CCND1, CCND2, CCNE, CCNE1, CCNE2, CCNF, CCNG1, CCNG2, CCNH, CCNI, CCNI2, CCNJ, CCNJL,

CCNL2, CCNO, CCNT1, CCNT2, CCNY, CCNYL1, CDK2, CDK3, CDK5, CDK6, CDK8, CDK13, CDK14, CDK15, CDK16, CDK17, CDK18, CDK19, CNK11B, CDK2AP2, CDK5R1, CDKL1, CDKL2, CDKL3, CDKL4, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2B, CDKN1C, CDKN2C, CDKN3, CNNB1, CNNM1, CNNM2, CNNM3, CNNM4, DMTF1 y NUCKS1 (Tabla 4.25).

Tabla 4.25. Ciclinas que interactúan con los miRNAs sobreexpresados en por el tratamiento de EHI con cerebrolisina al día P21.

miRNA	CCNA2	CCNC	CCNDBP1	CCND1	CCNE	CCNE1	CCNE2	CCNF	CCNG1	CCNG2	CCNH	CCNI	CCNJ	CCNJL	CCNL2	CCNO	CCNT1	CCNT2	CCNY	CCNYL1	CDK2	CDK3	CDK5	CDK6	CDK8	CDK13	CDK14	CDK15	CDK16	CDK17	CDK18	CDK19		
rno-miR-233																																		
rno-miR-93-3p																																		
rno-miR-20a																																		
rno-miR-106a																																		
rno-miR-122a																																		
rno-miR-93-5p																																		
rno-miR-17-5p																																		
rno-miR-324-5p																																		
rno-miR-106b																																		
rno-miR-20b																																		
rno-miR-21-3p																																		
rno-miR-25-3p																																		
rno-miR-142-5p																																		

miRNA (continuación)	CNK11B	CDK2AP2	CDK5R1	CDKL1	CDKL2	CDKL3	CDKL4	CDKN1A	CDKN1B	CDKN2B	CDKN1C	CDKN2C	CDKN3	CNNB1	CNNM1	CNNM2	CNNM3	CNNM4	DMTF1	NUCKS1	
rno-miR-233																					
rno-miR-93-3p																					
rno-miR-20a																					
rno-miR-106a																					
rno-miR-93-5p																					
rno-miR-17-5p																					
rno-miR-324-5p																					
rno-miR-106b																					
rno-miR-20b																					
rno-miR-21-3p																					
rno-miR-25-3p																					
rno-miR-142-5p																					

4.3.4.8 miRNAs inhibidos en el hipocampo en P21

Finalmente, se identificaron 24 ciclinas que presentaron al menos un sitio consenso para la unión de los miRNAs inhibidos en hipocampo con EHI + Cereb: CCNDBP1, CCND2, CCNG2, CCNI, CCNJ, CCNT1, CCNT2, CCNY,

CDK1, CDK2, CDK6, CDK7, CDK12, CDK13, CDK15, CDK17, CDK18, CDKL1, CDKL2, CNNM2, CNNM3, CNTD1, CNTD2 y NUCKS1 (Tabla 4.26).

Tabla 4.26. Ciclinas que interactúan con los miRNAs inhibidos en hipocampo por el tratamiento de EHI con cerebrolisina al día P21.

miRNA	CCNDBP1	CCND2	CCNG2	CCNI	CCNJ	CCNT1	CCNT2	CCNY	CDK1	CDK2	CDK6	CDK7	CDK12	CDK13	CDK15	CDK17	CDK18	CDKL1	CDKL2	CNNM2	CNNM3	CNTD1	CNTD2	NUCKS1
rno-miR-96																								
rno-miR-183																								
rno-miR-182																								

4.3.5 MirPath

4.3.5.1 Vía del TGF-β

El análisis de los blancos de los genes que conforman la vía de señalización del TGFβ reveló que los genes SMAD1, INHBB, SMAD2, CUL1, PITX2, PPP2CA, SMAD7, BAMBI, ZFYVE9 Y E2F5, son los principales blancos de los miRNAs desregulados positivamente por el tratamiento de la EHI con cerebrolisina (Figura 4.15). El miRNA rno-miR-17-5p interactúa con el gen SMAD7, BAMBI, ZFYVE9 Y E2F5. El rno-miR-106b interactúa con los genes SMAD7, BAMBI, PPP2CA, ZFYVE9 Y E2F5. El rno-miR-20b-5p interactúa con los genes gen SMAD7, BAMBI, ZFYVE9 Y E2F5. Y finalmente el miR-494-3p interactúa con los genes SMAD1, INHBB, SMAD2, CUL1 y PITX2.

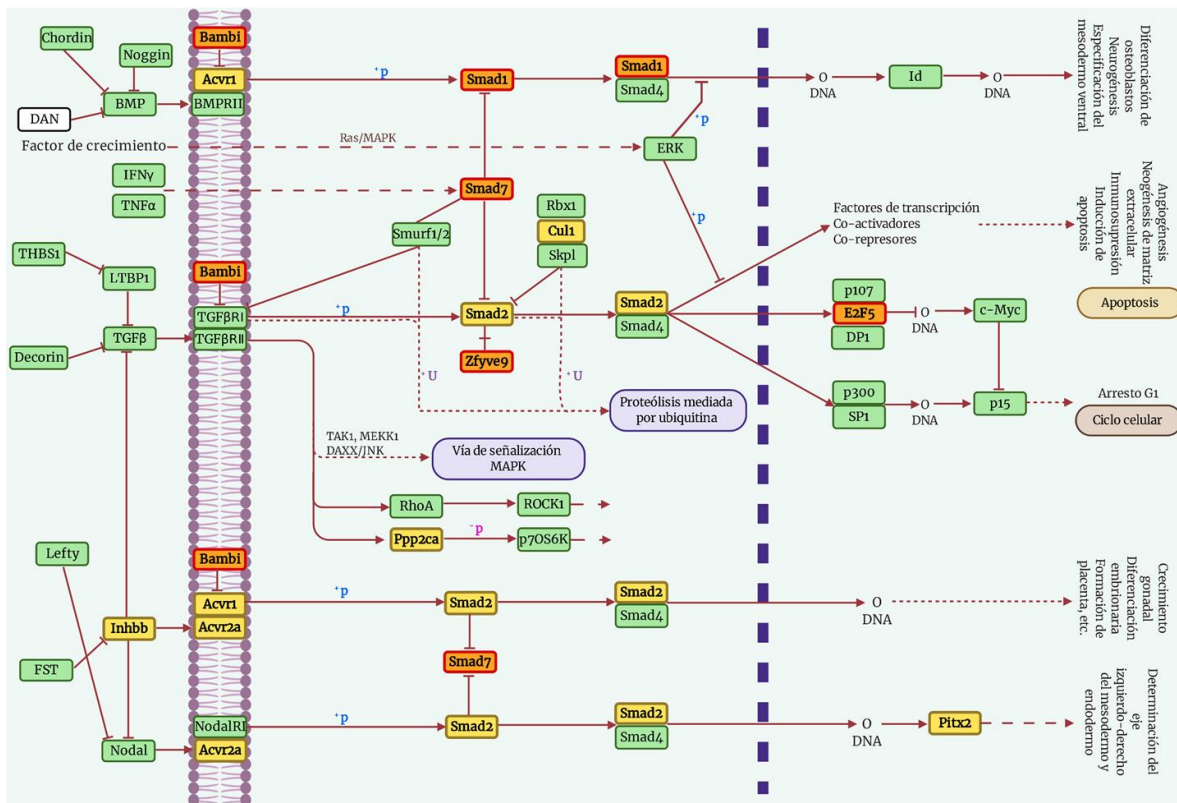


Figura 4.15. Vía de señalización TGF-β en donde se observa los genes blanco de los miRNAs sobreexpresado por la EHI y EHI + Cereb. Los genes en color amarillo son blancos de un miRNA y los genes en color naranja son blancos de dos a tres miRNAs.

4.3.5.2 Vía de las MAPK

El análisis de los blancos de los genes que conforman la vía de señalización de las MAPK reveló que los genes PDGRA, SOS1, MAP3K8, MAP3K2, MAP3K14, MKNK2, RPS6KA1, ELK4, DUSP8, PPP3R1, CRK, RPS6KA5 y DUSP2, son los principales blancos de los miRNAs desregulados positivamente por el tratamiento de la EHI con cerebrolisina (Figura 4.16). Se sabe que la regulación negativa de rno-miR-93-5p y rno-miR-17-5p encienden los siguientes 13 genes: MAP3K2, SOS1, ELK4, MKNK2, MAP3K8, RPS6KA5, RPS6KA1, CRK, DUSP2, MAP3K14, PDGRA, PPP3R1 Y DUSP8. Y finalmente, el rno-miR-106b enciende los siguientes once genes: MAP3K2, SOS1, ELK4, MKNK2, RPS6KA1, CRK, DUSP2, MAP3K14, PDGRA, PPP3R1, DUSP8 y RPS6KA4.

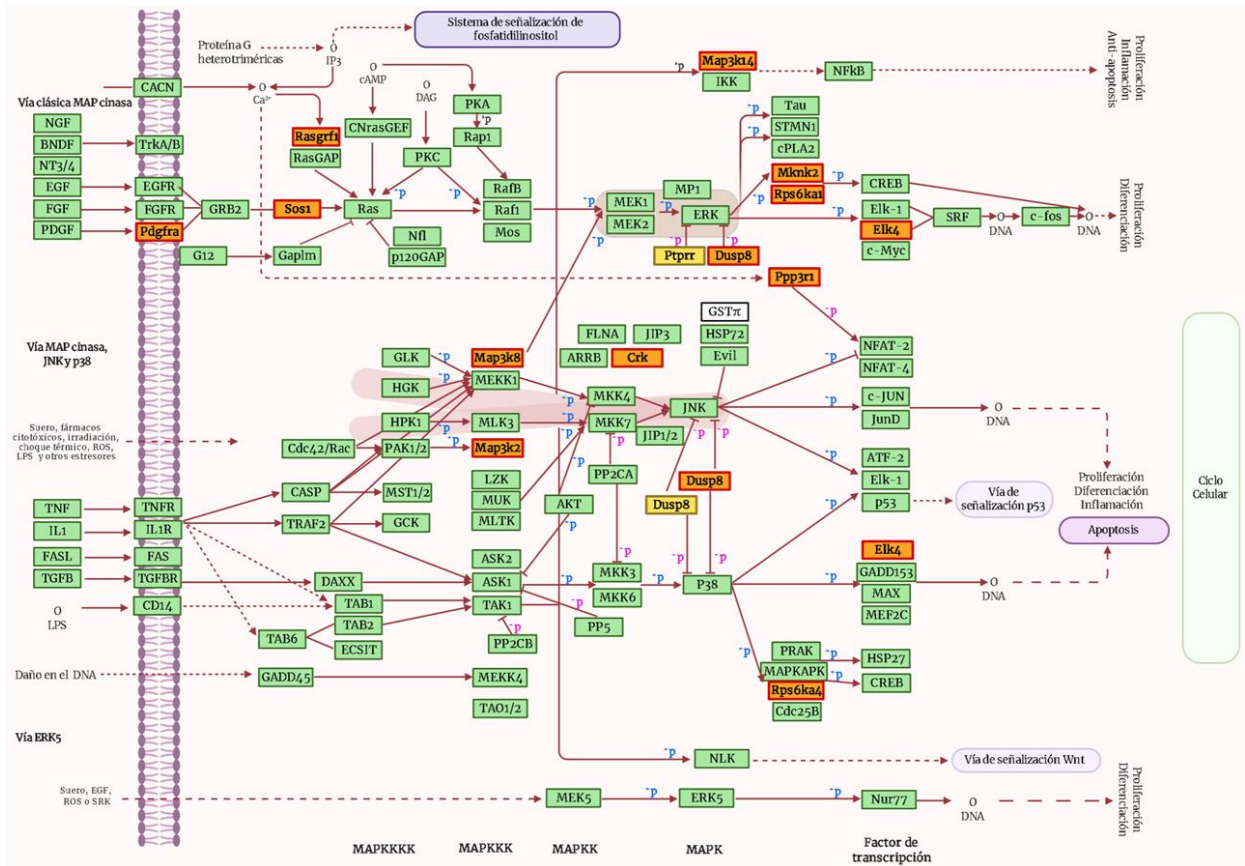


Figura 4.16. Vía de señalización MAPK en donde se observa los genes blancos de los miRNAs sobreexpresados por la EHI y el tratamiento de EHI con cerebrolisina. Los genes en color amarillo son blancos de un miRNA y los genes en color naranja son blancos de dos a cuatro miRNAs.

4.3.5.3 Vía del RAP1

El análisis de los blancos de los genes que conforman la vía de señalización de RAP1 reveló que los genes GNAO1, RAP1B, FGF13, PDGFRA, CTNNB1 y MAP2K3 son los principales blancos de los miRNAs desregulados positivamente por el tratamiento de la EHI con cerebrolisina. El rno-miR-21-3p es el único que regula la expresión diferencial de estos ocho genes (Figura 4.17, genes en amarillo).

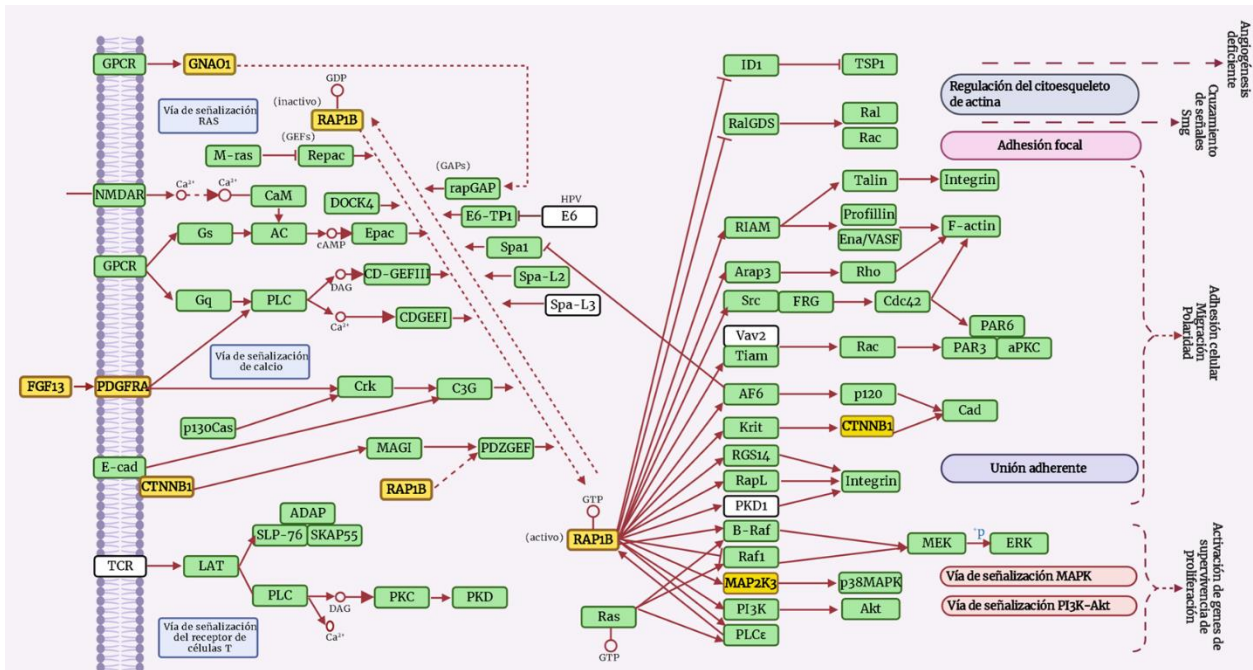


Figura 4.17. Vía de señalización RAP1 en donde se observa los genes blanco de los miRNAs sobreexpresado de por la EHI y el tratamiento de EHI con cerebrolisina. Los genes en color amarillo son blancos de un miRNA.

4.3.5.5 Vía del WNT

El análisis de los blancos de los genes que conforman la vía de señalización de WNT reveló que los genes Nfatc3, Mmp7, Apc2, Prkx, WIF1, Daam1, Fzd6, Cul1, Wnt9a, Gpc4, Tbl1xr1, Prickle1, Nlk, Ctnnb1, Lrp6, Dkk2, Cxxc4, Axin2, Ctbp1, Ppp3r1 y Tcf712, son los principales blancos de los miRNAs desregulados negativamente en corteza cerebral al P8 por el tratamiento de EHI con cerebrolisina. El rno-miR-7-3p interactúa con 5 genes: Prkx, Fzd6, Nlk, Cxxc4 y Pp3r1. Al igual que el rno-miR-137-3p interactúa con 5 genes también: Mmp7, WIF1, Daam1, Cxxc4 y Ctbp1. Mientras que, el rno-miR-7g-3p interactúa con 7 genes: Apc2, Daam1, Gpc4, Tbl1xr1, Lrp6, Cxxc4, Tcf712. Por otro lado, el rno-let-7f-3p interactúa con 3 genes: Prickle1, Nlk y Tcf712, y el rno-miR-3596d interactúa con 3 genes: Cul1, Ctnnb1 y Tcf712. El rno-miR-29b-5p interactúa con 3 genes: Wnt9a, Dkk2 y Axin2. Mientras que, el rno-

miR-138-5p y el rno-miR-376b-3p interactúan con los genes: Mmp7 y Nfatc3, respectivamente (Figura 4.18).

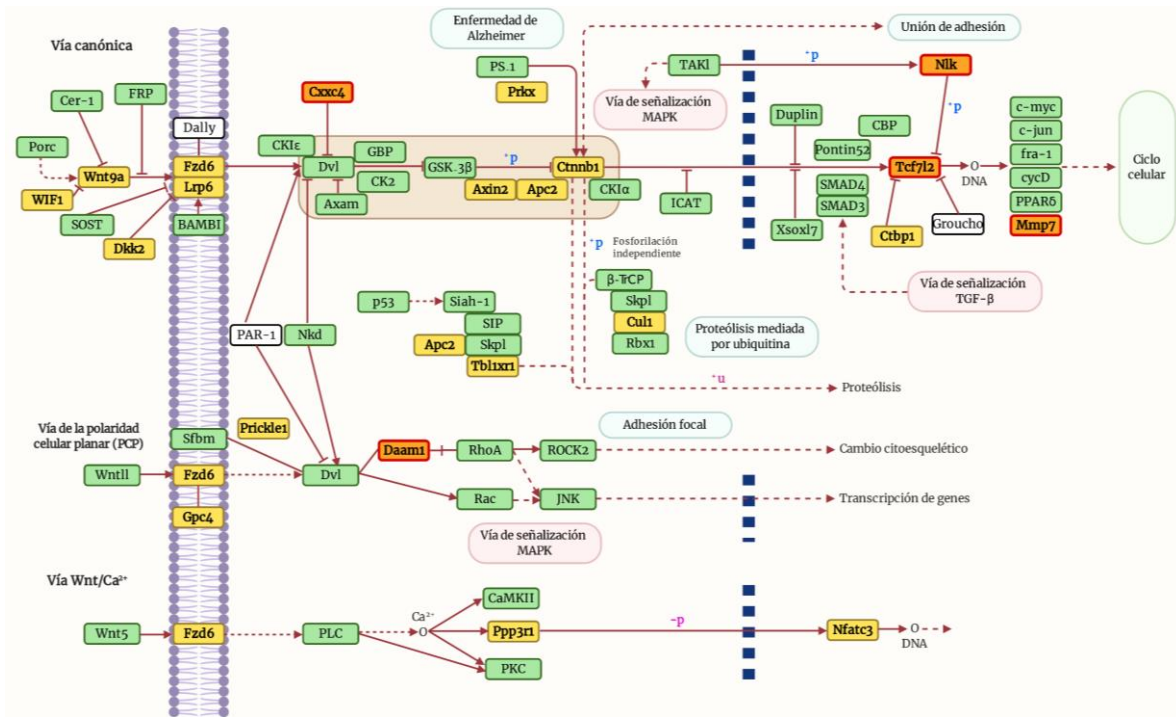


Figura 4.18. Vía de señalización WNT en donde se observa los genes blanco de los miRNAs inhibidos de por la EHI y el tratamiento de EHI con cerebrolisina. Los genes en color amarillo son blancos de un miRNA.

4.3.5.4 Vía del TNF

El análisis de los blancos de los genes que conforman la vía de señalización de TNF reveló que los genes Cx3c11, Ikbkb, Nfkbia, Pgam5, Traf3, Tnfrsf1a, Map2k6 y Rela, son los principales blancos de los miRNAs desregulados negativamente en corteza cerebral en el P21 por el tratamiento de la cerebrolisina en condiciones de EHI. Los miRNAs rno-miR-29a-3p, rno-miR-29b-3p y rno-miR-29c-3p interactúan con 4 genes: Cx3c11, Traf3, Tnfrsf1a y Map2k6. Mientras que, los miRNAs rno-miR-138-5p, rno-miR-338-3p, rno-miR-376b-3p y rno-miR-7a-3p, interactúan con los genes: Rela, Ikbkb, Pgam5 y Nfkbia, respectivamente (Figura 4.19).

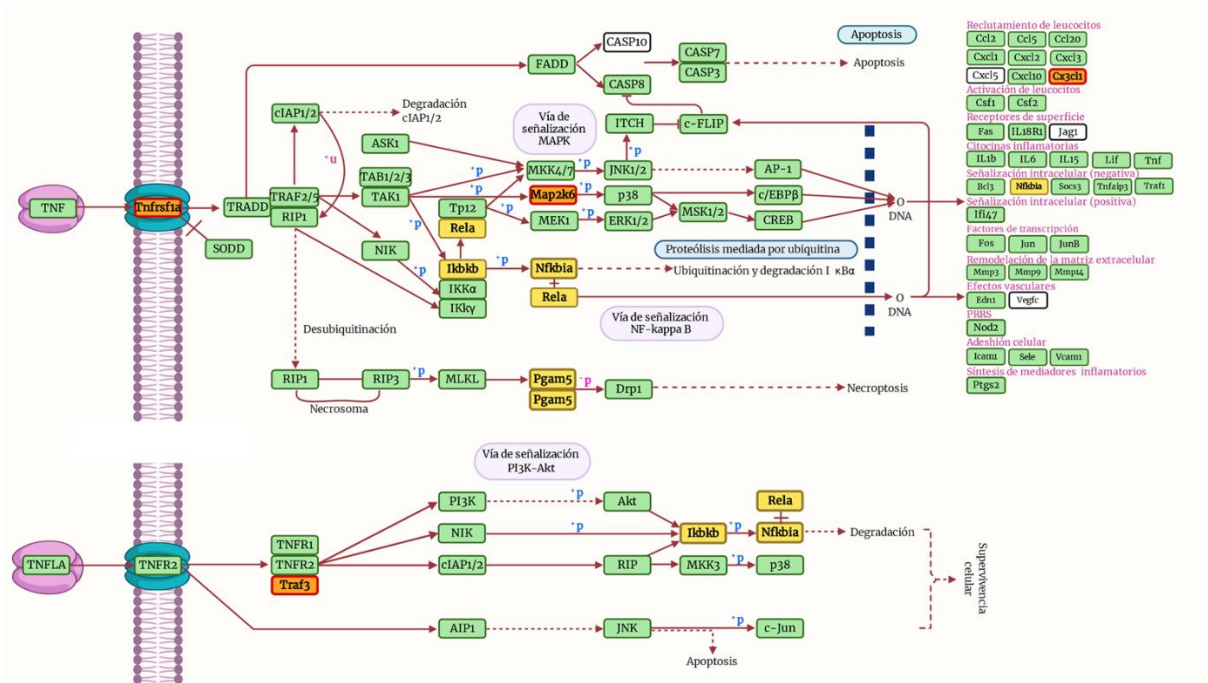


Figura 4.19. Vía de señalización TNF en donde se observa los genes blanco de los miRNAs inhibidos de por la EHI y el tratamiento de EHI con cerebrolisina. Los genes en color amarillo son blancos de un miRNA.

5. DISCUSIÓN

En este trabajo identificamos el perfil de expresión de miRNAs en un modelo animal de EHI y su tratamiento con cerebrolisina en edades P8 y P21 en ratas machos, mediante un análisis de microarreglos de expresión de genes.

Mediante un análisis bioinformático en la plataforma TargetScan se identificaron genes blanco en las familias de factores de crecimiento y ciclinas. Además, de que se obtuvieron las vías de señalización implicadas con los miRNAs mediante la base de datos mirPath.

Los factores de crecimiento desempeñan un papel crítico en la regulación de la neurogénesis en el sistema nervioso central en desarrollo y en adultos **[Cameron, et al 1998]**. Por otro lado, las ciclinas son proteínas que forman complejos con enzimas cinasas dependientes de ciclinas (Cdks) **[Lim y Kaldis, 2013]** y están implicadas en la proliferación, diferenciación y muerte celular **[Xiong, et al 1997]**. Las CDKS son las encargadas de impulsar la progresión del ciclo celular, y son consideradas engranajes que ayudan a la transición entre las fases del ciclo celular. La actividad de los complejos CDK/Ciclina está regulado por una gran cantidad de inhibidores de CDK, que sirven como frenos para detener la progresión celular en condiciones desfavorables **[Lim y Kaldis, 2013]**.

Por otro lado, el modelo de EHI más utilizado es el modelo de ratas neonatas de Ricce-Vannuci en el que utiliza isquemia e hipoxia conjuntamente **[Rice, et la 1981; Vanucci y Vanucci, 2005]**, este modelo evoluciono del de Levine en 1960 en ratas adultas **[Levine, 1960]**. Con este modelo se obtiene una mayor lesión en el hemisferio ipsilateral a la obliteración, que se extiende a la corteza, cuerpo estriado, tálamo e hipocampo. Las lesiones producidas afectan más a la materia gris que a la materia blanca **[Rice, et la 1981]**. La mayoría de los autores optan por regular el tiempo de hipoxia para mejorar la supervivencia y crear modelos con lesiones similares a lo observado en

seres humanos. Sin embargo, la mortalidad y el grado de lesión depende del grado de la hipoxia, en tiempos más cortos de hipoxia se observan lesiones en la corteza cerebral e hipocampo y en tiempos más largos se produce lesiones cavitarias en el hemisferio cerebral **[Vanucci y Vanucci, 2005; Towfighi, et al 1991]**.

Por lo que se refiere al modelo generado en este estudio, la presión del flujo de gas utilizado durante la hipoxia fue de 1 L/min a temperatura constante de 37°C, se observó una alta tasa de mortalidad del 80%, no obstante, los machos presentaron una mayor mortalidad con respecto a las hembras. Esta tasa de mortalidad encontrada en nuestros resultados coincide con lo reportado por Shankaran, 2012 para recién nacidos con una mortalidad del 85% causada por la EHI severa **[Shankaran, 2012]**. Sin embargo, en nuestro estudio uno de los parámetros que no se controló fue la humedad por lo que consideramos que afectó la tasa de mortalidad observada en este estudio, debido a que la variación de estos parámetros (temperatura, humedad y presión) pueden afectar tal parámetro **[Sampath, et al 2014]**. Estudios previos han reportado que la presión constante de la mezcla de gas es de 5-6 L/min y el mantener un ambiente térmico constante les ayudó a mantener una baja tasa de mortalidad que fue de 1 de 20 animales isquémicos durante el periodo de hipoxia **[Baldiuni, et al 2000]**.

En nuestro modelo el tiempo de hipoxia fue de 100 minutos produciendo un daño severo y una mortalidad de más del 80%. En trabajos previos con el mismo modelo en ratas, se ha reportado que el tiempo de hipoxia de 90 minutos (O₂ al 8% y temperatura constante de 36°C) produce un daño moderado del 40% del hemisferio cerebral y una mortalidad del 16-20% **[Sabir, et al 2012; Rice, et al 1981]**. Mientras que, el incremento del tiempo de hipoxia a 120 minutos (O₂ al 8% y 37°C) incrementa la lesión de hasta el 60% del hemisferio ipsilateral al daño y como consecuencia aumenta la

mortalidad del 25-30% **[Vanucci y Vanucci, 2005]**. Nuestro modelo reúne las lesiones reportadas por los autores ajustándose más a las lesiones observadas en pacientes neonatos.

Al someter a los neonatos a hipoxia se observó que morían más del 50%, en trabajos previos se reportó que las ratas neonatas al P6 que fueron sometidas a hipoxia en una cámara con O₂ al 9% y una presión parcial de CO₂ al 20% tuvieron una mayor tasa de mortalidad y una mayor frecuencia de convulsiones **[Boss, et al 2005]**. Como resultado, el insulto de la hipoxia solo produjo convulsiones y generó lesiones sutiles en el cerebro, pero no es comparable con las lesiones observadas en pacientes humanos **[Millar, et al 2017]** debido a que solo se realizó hipoxia.

En nuestro estudio se observó la presencia de convulsiones después de la hipoxia. Entre las convulsiones que se desarrollaron fueron tónicas en la cabeza, clónicas en el tronco y tónico-clónicas en la cola, estas nos indicaron que el modelo de EHI se produjo. Sampath, *et al* observaron en un modelo de EHI neonatal la aparición de convulsiones conductuales después de la exposición a hipoxia. Entre las convulsiones que observaron fueron clónicas, postura tónica del tronco, convulsiones tónico-clónicas, espasmos faciales y rigidez de la cola **[Sampath, et al 2014]**. Los resultados observados por Sampath, *et al*, son consistentes con los obtenidos por nuestro grupo. Las convulsiones observadas después de la hipoxia son similares a las experimentadas en recién nacidos humanos, estas son breves y repetitivas, y consisten en subtipos de convulsiones clónicas, tónicas, mioclónicas y sutiles **[Clancy y Legido, 1987; Seshia, et al, 2011]**. En otro estudio en un modelo de rata por daño perinatal de HI, se observó la progresión y distribución temporal de las convulsiones motoras espontaneas en un periodo latente de 7 meses **[Kadam y Dukek, 2007]**. Además, se ha observado en pacientes humanos con EHI neonatal, convulsiones en las

primeras 6-24 horas después del nacimiento, sin embargo, no hay mejoría y continúan en las horas siguientes [Ahn, *et al*, 1998; Filan, *et al*, 2005]. En nuestro modelo solo se observaron convulsiones horas después de realizar la hipoxia, es decir, a corto plazo.

El modelo estandarizado de EHI permite generar un daño sistemático en la región temporo-parietal extendiéndose hasta el núcleo estriado. Estas regiones están rodeadas por zonas hipóxicas evaluadas mediante la tinción de TTC (Figura 4.2). En la imagen correspondiente a EHI se observa necrosis característica de daño en corteza y áreas en penumbra correspondiente a hipocampo. Sameshima e Ikenoue caracterizaron la severidad del daño en un modelo EHI con ratas Wistar de 7 días de nacidas. El daño ha sido graduado en 4 categorías [Sameshima e Ikenoue, 2013]:

1. Normal equivalente a sin daño
2. Leve abarcando menos del 25%
3. Moderado entre 25%-50%
4. Severo mayor a 50% de la superficie del área.

En nuestro modelo, las lesiones corticales encontradas fueron de tipo 4, es decir, severas, por su parte Lubics, *et al* observaron atrofia severa en cerebros lesionados en un modelo similar al nuestro. El hemisferio ipsilateral total era aproximadamente el 58% del hemisferio contralateral no lesionado. Mientras que, la reducción más severa se observó en el hipocampo, que fue aproximadamente del 11% del lado ipsilateral con respecto al lado contralateral. Además, se observó una reducción aproximada del 50% en la corteza y el cuerpo estriado [Lubics, *et al* 2005].

A nivel anatómico la EHI afecta dramáticamente el desarrollo físico y el rendimiento neuroconductual. Ten, *et al* reportaron que el daño cortical en el cerebro se debe a que EHI genera un déficit en la actividad sensorimotora [Ten, *et al* 2003].

Las afectaciones físicas encontradas en nuestro modelo consisten principalmente en pérdida de peso y apertura palpebral. Mientras que, el daño sobre los reflejos primarios, resistencia y locomoción son secuelas características de efectos neuroconductuales. En nuestro estudio la evaluación de reflejos primarios corresponde a la prueba de giro dorsal. Para el caso de resistencia corresponde a la prueba de inversión y suspensión de patas delanteras. Finalmente, la evaluación de locomoción corresponde a la prueba de ángulo de caminata.

La prueba de giro dorsal (Figura 4.3) para hembras en P8 muestra que EHI incrementa el tiempo de latencia hasta un 42% con respecto al control, mientras que, EHI + Cereb disminuye la latencia a un 35% comparado con EHI. Para el caso de los machos en P8 la EHI aumenta el tiempo de latencia a 21% y la condición de EHI + Cereb disminuye este tiempo a 20%. Durante el P10 en hembras EHI provocó un aumento del 22% del tiempo de latencia, mientras que, EHI + Cereb reduce el tiempo 29%. En esta misma edad en machos la EHI acrecentó el tiempo de latencia un 36% y EHI + Cereb disminuye un 62%. En estudios previos se demostró que la prueba de giro dorsal a corto plazo después de la HI en ratones neonatos se vio afectada a la hora y 24 horas después de la lesión **[Ten et al, 2003]**. Por otro lado, Teo et al, no observaron un déficit en P8, sin embargo, en P14 encontraron un deterioro en el reflejo primario **[Teo et al, 2017]**. Se ha demostrado que hubo diferencia de tiempo entre los animales lesionados y control entre el P10-P20 **[Lubics, et al 2005]**. Es importante señalar que 24 horas después del daño no se observa un déficit en el reflejo primario, sin embargo, de 3 a 14 días después de EHI si provoca un deterioro, sugiriendo que el daño en los reflejos primarios se ve reflejado a largo plazo. En nuestro caso hemos encontrado que en ambas edades tanto P8 como P10 encontramos un déficit importante en el desempeño de la prueba tanto en hembras como en machos. No obstante, al administrar cerebrolisina a ratas con EHI

observamos una mejora en el desempeño de la prueba. Vázquez-Roque, *et al* demostraron que la cerebrolisina mejoró alteraciones conductuales en la locomoción y la interacción social en un modelo de neurodesarrollo similar a la esquizofrenia en ratas **[Vázquez-Roque, *et al* 2012]**. Por lo que nuestro estudio es consistente con los resultados encontrados por este grupo de investigación.

Durante la prueba de inversión, en las hembras el tiempo de latencia incrementó 18% en P8 y 54% en P10 en condiciones de EHI con respecto al grupo intacto (Figura 4.4), mientras que el tratamiento con cerebrolisina disminuyó el tiempo de latencia a 21% y 51% en P8 y P10 respectivamente, en comparación al grupo de EHI. En P14, EHI disminuyó el tiempo de latencia a 22% y cerebrolisina mejoró el tiempo de latencia similar al grupo intacto. Los datos mostraron que el tratamiento con cerebrolisina mejoró el tiempo de latencia en ratas con EHI, similares a lo observado en el grupo control. Esta mejoría se observó solo en las hembras, pero no en los machos. Estudios previos mostraron que ratones neonatos con parálisis cerebral (CP) no pudieron mantener su agarre con las cuatro extremidades, es decir, se observa debilidad específica en las extremidades con respecto al grupo intacto, lo que significa que hay un déficit de la fuerza de agarre en ratones con CP **[Feather-Schussler y Ferguson, 2016]**. Esto sugiere que EHI causó la debilidad de las cuatro extremidades tanto en hembras como en machos, sin embargo, cerebrolisina mejoró esta condición en hembras.

En la evaluación de suspensión de patas delanteras (Figura 4.5) se observó que en hembras en P10, EHI incrementó el tiempo de latencia hasta 49% comparada con el intacto, mientras que, EHI + Cereb disminuye 41% con respecto a EHI. Durante el P14, también EHI aumentó el tiempo de latencia hasta 51% con respecto al intacto y EHI + Cereb disminuyó 49% comparado con EHI. En machos no hubo diferencias significativas entre los 4 grupos en

ambas edades. EHI causa decremento en el tono muscular y déficit en la fuerza como es el agarré, como lo mostro Lubics, *et al* en un modelo de EHI [Lubics, *et al* 2005]. Además, se demostró en un modelo de parálisis cerebral en ratones neonatos que dos días después de la lesión (P8) encontraron déficit en los reflejos de desarrollo, es decir, en el reflejo de agarre entre el grupo lesionado y el control [Feather-Schussler y Ferguson, 2016].

La prueba de ángulo de caminata (Figura 7.6) mostró que en P8 para hembras hubo un aumento del tamaño de ángulo del 28% con respecto al intacto, sin embargo, EHI + Cereb lo disminuye hasta 28%. Mientras que, en P10 se observó que EHI aumentó el tamaño del ángulo 23% con respecto a intacto y EHI + Cereb no modificó el tamaño. Finalmente, en P14 EHI incremento el tamaño del ángulo un 29% con respecto al intacto y EHI + Cereb lo hasta 34%. Para el caso de los machos durante el P8 se observó un aumento del tamaño del ángulo del 62% con respecto a intacto y EHI + Cereb lo disminuye hasta 35%. En P10, hubo un aumento del tamaño del ángulo debido a la EHI hasta 43% y EHI + Cereb disminuye el tamaño hasta 39% con respecto a EHI. Por último, en P14, EHI también aumentó el tamaño del ángulo hasta 29% con respecto al intacto y EHI + Cereb lo disminuye a 34% con respecto a EHI. En ratones neonatos con CP se observó un aumento del tamaño del ángulo de caminata con respecto al intacto. El aumento del ángulo se correlaciona con la inestabilidad de la marcha, al aumentar el ángulo de sus patas traseras para estabilizar su marcha y ayudar a mantener el equilibrio y la coordinación [Feather-Schussler y Ferguson, 2016]. Por otra parte, se ha observado que las pruebas de locomoción en animales hipóxicos con respecto a control no muestran diferencias [Lubics, *et al* 2005; Balduini, *et al* 2000]. Una prueba confiable fue la prueba de falla del pie de la extremidad anterior contralateral, en esta prueba se observan más errores en animales hipóxicos. Ya se ha reportado que las extremidades anteriores

son las más afectadas en este modelo, debido al tamaño de la lesión en la región cortical **[Balduini, et al 2000]**.

Durante el curso temporal del peso corporal (Figura 7.7) que se registró durante P7-P14, hubo una ganancia de peso similar entre machos y hembras en los grupos intactos. Sin embargo, no hay diferencias significativas entre los cuatro grupos. A pesar de ello, para machos en P21 hubo una diferencia significativa de la ganancia de peso entre los cuatro grupos ($P = 0.0322$). En el grupo Ctrl + Cereb hubo una disminución del peso del 15% comparado con el intacto, sin embargo, EHI provocó la caída de peso un 25% con respecto al intacto y EHI + Cereb mejoró 7% la ganancia de peso. Cabe señalar que para hembras en P21 no hubo diferencias de ganancia de peso, con estos datos se puede sugerir que el reflejo de succión se ve afectado en nuestro modelo, situación altamente similar a lo observado en humanos en donde se conserva este reflejo aún en pacientes con EHI grave que induce desarrollo de parálisis cerebral infantil (PCI). En estudios previos se ha reportado que EHI causa un retraso en el desarrollo somático **[Lubics, et al 2005; Balduini, et al 2001; Fan, et al 2005]**. Sin embargo, esta pérdida de peso no está correlacionada con mayor mortalidad como lo observaron Wagner, et al **[Wagner, et al 2002]**. Por otra parte, Balduini, et al, reportaron que en etapas adultas hay una recuperación en el peso corporal, encontrando diferencias entre los grupos **[Balduini, et al 2001]**. En un modelo de separación materna en ratas, se observó que la administración subcrónica (5 ml/kg) de cerebrolisina no afecta directamente el peso corporal **[Sanchez-Olguin, et al 2002]**. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en este estudio, donde observamos que el grupo Ctrl + Cereb no mejora la ganancia de peso.

Por otro lado, en nuestro estudio se observó que la apertura palpebral (Tabla 7.1) del grupo Intacto y Ctrl + Cereb no se vio afectado (P12), por el

contrario, EHI provocó el retraso de un día de la apertura del ojo derecho (P13) y un retraso de dos días del ojo izquierdo (P15). Sin embargo, EHI + Cereb provocó la apertura del ojo derecho en P12 al igual que el intacto y la apertura del ojo izquierdo en el P13. Se ha demostrado en resultados similares que hay un retraso de la apertura de los ojos después del desarrollo de EHI [**Lubics, et al 2005; Fan, et al 2005; Otha, et al 1997**], relacionado con el desarrollo tardío del cerebro [**Reglodi, et al 2003**]. Otha, et al demostraron que la BCCL provoca una reducción del flujo sanguíneo resultando en la contracción de los nervios ópticos [**Otha, et al 1997**]. En un estudio realizado por Chan, et al mostraron que hay una lesión en los efectos estructurales y fisiológicos provocada por EHI y persiste crónicamente en la vía visual del ojo y del cerebro, demostrado por resonancia magnética un año después de la lesión [**Chan, et al 2014**]. En el hemisferio ipsilateral de las ratas adultas que habían sufrido EHI neonatal unilateral, se observaron lesiones quísticas en la corteza cerebral posterior, incluida la corteza visual lo que provocó ceguera. Por otro lado, la apertura temprana del parpado promueve la formación de una red de neuronas maduras en el hipocampo de ratas juveniles [**Dumas T. C. 2004**].

Además, EHI provocó el desarrollo de ptosis palpebral (Figura 7.8) de lado ipsilateral al daño con respecto al intacto, mientras que, EHI + Cereb disminuyó esta parálisis. Kadam y Dudek observaron que las ratas con EHI desarrollaron ptosis palpebral esto atribuido al trauma ipsilateral de los músculos del cuello durante la ligadura de la carótida, también observado por Levine, 1960 [**Kadam y Dudek, 2007; Levine, 2006**].

En este estudio del perfil de expresión de miRNAs se obtuvieron 105 miRNAs sobreexpresados e inhibidos de un total de 1785 del transcriptoma completo de la rata. El análisis bioinformático nos indica que hubo seis miRNAs con una sobreexpresión e inhibición estadísticamente significativa y que a su vez

están involucrados en tres vías de señalización implicadas en neurogénesis y proliferación celular en corteza cerebral e hipocampo. Los miRNAs seleccionados fueron: rno-miR-494-3p, rno-miR-21-3p, rno-miR-93-5p (corteza), rno-miR-93-5p (hipocampo), rno-miR-106b y rno-miR-17-5p.

El miRNA rno-miR-494-3p en hipocampo a la edad de P8, mostró sobreexpresión (Figura 4.11) al tratar con cerebrolisina (EHI + Cereb) con respecto a EHI (Ctrl + EHI). Se ha demostrado que miR-494-3p regula el gen *bcl-2*, es un gen antiapoptótico, el cual disminuye significativamente en la corteza cerebral de la rata 24 horas después de la isquemia cerebral [Zhai, *et al* 2012]. Se encontró que rno-miR-494-3p tiene como posibles genes blanco los siguientes factores de crecimiento: FGF7, FGFR2, IGF1R, IGF2BP2 y PDGFRA (Tabla 7.11), y las siguientes ciclinas: CCND2, CCNT1, CDK6 y CNTD1 (Tabla 7.23). El miRNA rno-miR-493-3p actúa sobre la vía de señalización TGF- β (Figura 7.13). La expresión de miR-494 aumenta transitoriamente durante el estrés agudo en la corteza frontal, pero no en el hipocampo, y forma parte de otros doce miRNAs que desempeñan un papel en la plasticidad neuronal y respuesta al estrés en enfermedades neuropsiquiátricas [Dwivedi, 2014]. Por otro lado, se ha demostrado que la expresión reducida de miR-494-3p está asociada con daño al miocardio en pacientes con shock séptico. Sin embargo, la sobreexpresión de miR-494-3p tiene un efecto protector sobre los cardiomiocitos regulando negativamente la expresión de la proteína PTEN y reduciendo así la liberación de TNF- α e IL-6 [Wu, *et al* 2019].

Por otra parte, Chen *et al* encontraron que miR-494 está altamente expresado en células mesenquimales derivadas de la decidua (dMSC) en preclamsia. Encontraron que la sobreexpresión de miR-494 inhibe el crecimiento celular y detiene la transición de G1/S, enfocándose en CDK6 y CCND1 en dMSC. La sobreexpresión reduce la migración de HTR-8/SVneo, alterando la formación de capilares HUVEC al suprimir VEGF [Chen, *et al*

2015]. En un modelo de reperfusión isquémica (I/R) hepática se encontró que miR-494 mejora las lesiones hepáticas causadas por I/R y ejerce efectos protectores contra estrés oxidativo reduciendo la apoptosis inducida por H₂O₂ en células AML12 mediante la activación de la vía AKT. El miR-494 protegió a las ratas con lesión hepática I/R mediante la regulación de su gen objetivo PTEN que conlleva a la activación de la vía de señalización PI3K/AKT **[Su, et al 2017; Lin et al 2018]**.

Sin embargo, se ha demostrado que miR-494-3p está involucrado en la progresión y pronóstico de carcinoma nasofaríngeo. Por lo tanto, la sobreexpresión de mir-494-3p promueve la proliferación, migración e invasión celular en carcinoma nasofaríngeo a través de Sox7 **[He, et al 2014]**.

La expresión de miR-494-3p esta elevado en gliomas promoviendo la invasión celular y proliferación e inhibiendo la apoptosis, sin embargo, la sobreexpresión inhibe la expresión de PTEN y suprime la señalización Akt reduciendo la invasión y proliferación en líneas celulares de glioma **[Li, et al 2015]**. La unión del miRNA miR-494 a la proteína PTNE se da en la región 3'-UTR del ARNm de PTEN resultando en la represión de su traducción **[Liu, et al 2015]**. Por otro lado, la regulación positiva de miR-494 promueve la viabilidad celular, migración e invasión, disminuyendo la apoptosis y detención del ciclo celular en la fase G1, mediante BIM que es un blanco para este miRNA. Por otra parte, la regulación por disminución de BIL induce resistencia a TRAIL relacionado con TNF en células NSCLC **[Romano, et al 2015]**.

La sobreexpresión de miR-494 regula negativamente la expresión de FGFR2 **[Yu, et al 2018]**, e inhibe la proliferación, migración e invasión de células de cáncer gástrico *in vivo* **[Zhao, et al 2016]**. Sin embargo, miR-494 actúa como un gen supresor de tumores en el cáncer gástrico al ser complementario con en ARNm de c-myc e IGF1R **[He, et al 2014; Zhao, et al 2016]**. El miR-494 está correlacionado negativamente con c-myc y actúa como un antioncogén

[He, *et al* 2014], mientras que, la sobreexpresión de miR-494-3p, reprimiendo la proliferación de osteoblastos a través de Fgfr2 y Rock1 [Chen, *et al* 2017]. En líneas celulares de cáncer de ovario se observó una disminución de la expresión de miR-494, sin embargo, la sobreexpresión de miR-494 inhibe la proliferación celular de cáncer de ovario e induce la apoptosis mediante FGFR2, suprimiendo la proliferación de células de cáncer de ovario e induciendo la apoptosis [Zhao, *et al* 2016]. La sobreexpresión de miR-494-3p regula negativamente los niveles del receptor CXCL12, CXCR4 en PC-3 y DU145 en células de cáncer de próstata [Shen, *et al* 2014]. La inhibición de miR-494 induce la sobreexpresión del gen KIT en GIST, cabe mencionar que la proteína KIT es una tirosina cinasa altamente oncogénica que está involucrada en la vía de señalización PI3K-AKT y en la ruta de transducción de señales de JAK-STAT [Kim, *et al* 2011].

El miR-494-3p reduce la expresión proteica de PGC1- α en adipocitos y atenúa la biogénesis mitocondrial y el consumo de oxígeno. Además, se demostró que miR-494-3p tiene un papel importante en la biogénesis mitocondrial ya que tiene como objetivos a TFAM, FoxJ3 y CREB1 [Lemecha, *et al* 2018].

En hipocampo al P8 se observó también que **rno-miR-21-3p** se expresa en condiciones de EHI, sin embargo, cuando EHI es tratada con cerebrolisina disminuye la expresión de este miRNA. Este miRNA tiene como genes blanco 24 factores de crecimiento (Tabla 7.11) y 23 ciclinas (Tabla 7.23). Los factores de crecimiento con los que interactúan con este miRNA son: EGFR, FGF8, FGF12, FGF13, FGF14, FGF20, FGFR1, FGFR2, FRS2, GRB7, IGF1, IGF1R, IGF2BP1, LTBP2, NGFR, PDGFRA, PDGFRB, TBRG1, TGFA, TGFB2, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3 y VEGFC. Por otro lado, las ciclinas que interactúan con este miRNA son: CCNA2, CCNE1, CCNG1, CCNG2, CCNJL, CCNO, CCNT1, CCNY, CDK2, CDK6, CDK13, CDK15, CDK16, CDK17, CDK18, CDK19, CNK11B, CDKL1,

CDKL4, CDKN1A, CNNM2, DMTF1 y NUCKS1. Se encontró que este miRNA actúa sobre la vía de señalización RAP1 (Figura 7.13). La sobrerregulación de miR-21 proporciona un mejor resultado neurológico en lesiones cerebrales al mejorar la función neurológica, disminuir edema y el volumen de la lesión. Mas aún, el efecto protector fue observado a través de la inhibición de apoptosis y promoción de angiogénesis [Ge, et al 2014]. En ratas macho Wistar afectadas con isquemia, se encontró que miR-21 en conjunto con miR-146a fueron altamente expresados durante la recuperación de la fase aguda de infarto. Sin embargo, miR-21 fue asociado a la prevención de apoptosis por medio del gen *Faslg* mientras que miR-146a fue asociado a neuroprotección por medio de *Irak1*. Ha sido mostrado que las vías de señalización Sonic hedgehog, Notch, Wnt y TGF- β juegan un papel significativo en la recuperación de infarto cerebral y en particular en la reparación neuronal [Liu, et al 2013]. El gen MEG3 junto con la vía miR-21/PDCD4 fue investigado, en ratones, como un nuevo mecanismo regulador de la muerte neuronal por isquemia. Es sabido que dicha vía ejerce efectos antiapoptóticos contra la muerte celular en diversas enfermedades. En particular fue encontrado que MEG3 afecta la expresión de PDCD4, a través de la desregulación de los niveles de miR-21, contrarrestando los efectos inhibitorios de miR-21 en PDCD4, eliminando así el efecto protector de miR-21 en la muerte celular por isquemia [Yan, et al 2017]. En un modelo de células endoteliales microvasculares de cerebros de ratón lesionados con impacto cortical controlado, los niveles de miR-21-3p fueron incrementados después de la lesión. Se encontró que su incremento no fue conveniente para la restauración, ya que se caracterizó por fuga en la barrera hematoencefálica y un decremento en la expresión de proteínas de unión [Ge, et al 2019].

El miR-21-3p regula los mecanismos de viabilidad y proliferación celular mediante el gen diana IGFBP5, el cual está regulado por STAT3 en células

epiteliales mamarias de vaca [Zhang, *et al* 2019]. Por otra parte, estudios del perfil de expresión de miR-21 en malignidades humanas han mostrado que miR-21 mediado por la vía β -catenina y el gen STAT3 inducen proliferación celular e invasión a través del factor STAT3 en células de glioma [Han, *et al* 2012]. En cuanto a los cambios en la expresión del miRNA fueron mayores en los casos en que EGFR presentaba mutaciones, que en los casos sin mutaciones. Una correlación significativa entre el gen fosforilado EGFR y miR-21 en una línea celular de carcinoma pulmonar y la supresión de miR-21 por EGFR-TKI, AG1478 sugiere que la vía de señalización regula positivamente a miR-21. En la línea celular H3255 de carcinoma pulmonar, en no fumadores, con EGFR mutante y altos niveles de P-EGFR y miR-21, la inhibición de este miRNA habilitó la apoptosis inducida por AG1478. En la línea celular H441 de no fumadores, miR21 no solo fue asociado con AG1478 sino que por sí mismo indujo apoptosis [Seike, *et al* 2019]. En líneas celulares de cáncer, el rol de miR-21 también fue investigado como agente regulador de PDCD4. En particular, la sobreexpresión de miR-21 en línea celular HCT-116 conduce a la desregulación de PDCD4 y TGF β R2. La desregulación de TGF β R2 está atribuida a la expresión disminuida del receptor, evidenciado por la reducción en la actividad del gen luciferasa, que construye un sitio de unión directamente ligado a miR-21. La desregulación de dicho miRNA habilita la actividad de TGF β R2 en la región 3'-UTR sugiriendo al factor TGF β R2 como un objetivo directo de miR-21 [Yu, *et al* 2012].

Se ha encontrado que miR-21-3p se encuentra sobreexpresado en tejidos sólidos de cáncer hematológico llevando a la conclusión de que reprime la expresión de supresores tumorales. A su vez, el conjunto de miR-21 junto con el factor TGFBR2 han mostrado una alta afinidad de unión en cáncer de pulmón, mama, colorrectal, pancreático, próstata, estómago y vejiga, indicando una fuerte interacción molecular entre miR-21 y TGFBR2 [Jo y Lee, 2017]. En una línea celular de hepatoma humano HepG2, se encontró un

incremento en la expresión de miR-21-3p como resultado del tratamiento con berberina, un alcaloide de la isoquinolina, el cual reduce directamente la expresión de MAT2A y MAT2B, adicionalmente, su sobreexpresión incrementó los contenidos intracelulares de S-adenosil metionina, que significan una desventaja para el crecimiento de células de hepatoma. En este caso, la sobreexpresión de miR-21-3p suprime el crecimiento e induce apoptosis en la línea celular de HepG2 demostrando así su función antitumoral por medio de MAT2A y MAT2B [Lo, *et al* 2013].

Por otro lado, la sobreexpresión de miR-21-5p ha sido encontrada en muchos tipos de cáncer y muestra actividad oncogénica, como inmortalización replicativa, promoción de la proliferación, inestabilidad genómica, metabolismo anormal, angiogénesis, supervivencia celular, metástasis y resistencia a fármacos [Báez-Vega, *et al* 2016]. En particular, ha sido mostrado que miR-21-5p tiene mayores niveles de expresión que miR-21-3p en un panel de células cancerosas y que la inhibición de cualquiera de los dos ha resultado en un decremento significativo de la proliferación celular en cáncer ovárico y prostático [Báez-Vega, *et al* 2016].

Por otra parte, en hipocampo en P21 el **rno-miR-93-5p** disminuye su expresión en condiciones de daño (EHI) y aumenta su expresión al administrar cerebrolisina (EHI + Cereb) (Figura 7.12). Este miRNA tiene como genes blanco 7 factores de crecimiento (Tabla 7.15) y 7 ciclinas (Tabla 7.21). Los factores de crecimiento que están relacionados con este miRNA son: FGF4, FRS2, IGF2BP1, PDGFRA, TGFBR2, TGBRAP1 y VEGFA. Mientras que, las ciclinas son: CCNC, CCND1, CCNG2, CCNJ, CCNT2, CDKN1A y CNM1. Se encontró que este miRNA actúa sobre la vía de señalización MAPK (Figura 7.14).

Se ha demostrado que el miR-93-5p promueve la proliferación celular [Hazarika, *et al* 2013] y juega un papel importante en la regulación de la angiogénesis [Liang, *et al* 2017], también ha sido asociado fuertemente

como un potencial objetivo farmacológico para promover la angiogénesis en tejido isquémico **[Hazarika, et al 2013]**. En particular se ha encontrado que en ratones con altos niveles de miR-93 en músculo de la extremidad posterior, previo a isquemia, y la habilidad para sobreregular miR-93 en respuesta a isquemia, tuvieron mejores resultados en la recuperación de la perfusión. En células *in vitro*, atenuó la apoptosis inducida por hipoxia en células endoteliales y musculares habilitando la densidad capilar y reperusión de isquemia en extremidades posteriores. En ambos casos, la modulación de miR-93 resultó en la alteración de la expresión de más de una vía de ciclo celular en dos diferentes tipos de células **[Hazarika, et al 2013]**.

En pacientes con infarto isquémico agudo (AIS), un estudio mostró que los niveles de miR-93 en plasma eran adecuados para el diagnóstico. Además, los niveles de miR-93 y los niveles de neutrófilos son un biomarcador pronóstico potencial para pacientes con AIS. En dicho estudio, los niveles de miR-93 en plasma y los neutrófilos de pacientes con AIS se correlacionaron negativamente con la expresión de TNF- α e IL-10, es decir, es un inhibidor potencial de la inflamación. Además, el tratamiento *in vitro* con ago-miR-93 disminuyó la proliferación inducida por OGD de células microgliales BV2, esto significa que miR-93 reduce la inflamación central en AIS. Con esto demostraron que el miR-93 circulante tiene el potencial de facilitar el diagnóstico y la predicción de los resultados neurológicos de accidente cerebrovascular isquémico agudo, y está involucrado en la inflamación posiblemente a través de la proliferación de microglía **[Ma, et al 2019]**.

La expresión de miR-93 decrece durante la infección en células epiteliales bronquiales con fibrosis quística en paralelo con el incremento en la expresión del gen IL-8. Esto significa que miR-93 está involucrado en la regulación post-transcripcional de la expresión del gen IL-8 **[Fabbri, et al 2014]**. Por otra parte, también se demostró que mir-93 juega un potencial rol

regulatorio en la expresión genética de IL-8 y VEGF en líneas celulares de glioma cerebral y esta inversamente correlacionada con la transcripción de IL-8 y VEGF **[Fabbri, et al 2015]**. Por lo que, miR-93-5p modula la expresión de VEGF e IL-8 **[Fabbri, et al 2016]**. La sobreexpresión de miR-93 promovió el crecimiento y migración de células endoteliales. Mas aún, la angiogénesis promovida por miR-93 facilitó la supervivencia celular resultando en una habilitación de crecimiento tumoral. Por lo tanto, miR-93 promueve el crecimiento tumoral y angiogénesis al suprimir parcialmente la expresión de integrina- β 8 en una línea celular de glioblastoma **[Fang, et al 2011]**. También la sobreexpresión de miR-93 promueve la angiogénesis en comparación con las células control en una línea celular de carcinoma de mama, debido a que el supresor tumoral LATS2 es un objetivo de miR-93. Por lo tanto, miR-93 promueve la angiogénesis tumoral y metástasis al suprimir la expresión de LATS2 **[Fang, et al 2012]**. Ha sido mostrado que los genes objetivo de miR-93 están fuertemente relacionados a la transcripción, la desregulación de miR-93 ha sido asociada con una pobre supervivencia en pacientes con cáncer. Por otro lado, los niveles séricos de miR-93 fueron sobre regulados en diversos tipos de cáncer. Esto sugiere que mir-93 puede actuar como un factor de diagnóstico y pronóstico en pacientes con cáncer **[Gao, et al 2019]**. Por otro lado, PTEN es un gen objetivo de miR-93 en células madre embrionarias y la desregulación de miR-93 en estas células suprimió significativamente el crecimiento del tumor en vivo. Esto significa que la expresión ectópica de miR-93 reduce los niveles de la proteína PTEN. Mas aún, miR-93 incrementa la proliferación y reduce la apoptosis en líneas celulares osteosarcoma (OS) mientras que su silenciamiento en dichas células, inhibe el proceso carcinogénico **[Kawano, et al 2015]**. Más aún, PTEN fue desregulada y está inversamente correlacionada con la expresión de miR-93-5p en retinoblastoma (RB). El silenciamiento de PTEN reduce significativamente la proliferación, migración e invasión de células RB transfectadas con

inhibidores de miR-93-5p [Cao, *et al* 2018]. Sin embargo, la sobreexpresión de miR-93-5p promueve la proliferación de las células receptoras en cáncer de esófago, afectando la expresión de PTEN y su flujo descendente de proteínas p21 y ciclina D1 por medio de la vía PTEN/PI3K/Akt. Por lo que, miR-93-5p no afectó la migración celular, invasión, apoptosis y distribución del ciclo, lo cual sugiere que miR-93-5p puede ser específico del tumor y desempeña diferentes funciones en múltiples tumores [Liu, *et al* 2018].

En experimentos *in vivo* e *in vitro* la sobreexpresión de miR-93 puede deprimir la expresión del factor de crecimiento endotelial (VEGF) y sus objetivos moleculares. Los efectos de miR-93 sobre la angiogénesis son dependientes de la interacción de otros genes múltiples y vías de señalización, como P21, E2F1, integrina- β 8 y LATS2 entre otros [Li, *et al* 2014]. Sin embargo, se ha observado una correlación inversa entre los niveles de proteína PDCD4 y miR-93 en tejidos de cáncer gástrico humano. La represión de PDCD4 a través de miR-93 suprime la apoptosis de células en este tipo de cáncer [Liang, *et al* 2016]. Los genes objetivos directos de miR-93 son TP53INP1, TIMP2 y CDKN1A, y están relacionados con la proliferación e invasión de tumores [Xue, *et al* 2018]. La expresión de que miR-93-5p promueve la proliferación celular a través de la regulación negativa de PPARGC1A en células de carcinoma hepatocelular y juega un papel esencial en la inhibición de la expresión de PPARGC1A al dirigirse directamente a la región 3'-UTR de su ARNm [Wang, *et al* 2018]. Sin embargo, en cáncer de colon, miR-93 fue regulado negativamente, y sus objetivos predichos incluyen BAMBI, CCND2, CDKN1A, HDAC8, KIF23, MAP3K9, MAP3K11, MYCN, PPARD, TLE4 y ZDHHC1. La sobreexpresión de miR-93 inhibe significativamente la proliferación, además de regular negativamente el ARNm y los niveles de proteínas HDAC8 y TLE4. Lo que significa que la inhibición de la proliferación por miR-93 en células madre de cáncer de colon puede ocurrir al dirigirse a HDAC8 y TLE4 [Yu, *et al* 2011]. En cambio, miR-93 habilitó la proliferación celular en

carcinoma nasofaríngeo (NPC) apuntando directamente a CDKN1A lo cual sugiere que el eje miR-93/CDKN1A puede presentar un nuevo objetivo para el tratamiento de NPC **[Zhang y Xu, 2018]**. Además, la inhibición de la expresión de miR-93-5p en células HCT-8/VCR desregula fuertemente la expresión del gen MDR1, sobrerregulando la expresión del gen CDKN1A e induciendo el arresto del ciclo celular en fase G1. Por el contrario, la sobreexpresión de miR-93-5p en células HCT-8/VCR sobrerregula la expresión del gen MDR1, desregula la expresión del gen CDKN1A y promueve la transición G1/S **[Wang, et al 2017]**. La expresión de miR-93-5p fue negativamente correlacionada con la de Bcl-w y p21 en muestras de tejido y plasma en pacientes de cáncer pulmonar. Esto significa que miR-93-5p atenúa la senescencia prematura celular al inhibir la vía Bcl-w-p53/Notch2-p21 **[Choi, et al 2018]**.

Por otra parte, en enfermedades autoinmunes, en pacientes con osteoartritis (OA) hay una correlación de expresión negativa entre SNHG16 y miR-93-5p al igual que CCND1 y miR-93-5p. La expresión de SNHG16 fue positivamente correlacionada con la expresión de CCND1 en OA. El silenciamiento de SNHG16 suprimió la viabilidad, habilidad para clonación y progresión celular, pero indujo apoptosis en condrocitos aislados del tejido de cartílago. Sin embargo, el silenciamiento del miRNA invirtió la viabilidad inhibida del silenciamiento de SNHG16. Mientras que, la sobreexpresión de CCND1 invierte el efecto inhibitorio del silenciamiento de SNHG16 en la viabilidad de condrocitos en OA **[Cheng, et al 2019]**. En la enfermedad de Crohn (CD) se ha relacionado a miR-93 con la regulación de autofagia. En particular, fue reportado que miR-106b y miR-93 se dirigen al gen ATG16L1 y disminuyen sus niveles, así como la autofagia, los cuales aumentaron después de la expresión ectópica de ATG16L1. Los niveles de miR-106b aumentaron en los epitelios intestinales de pacientes con CD activa, mientras que los niveles de ATG16L1 se redujeron, en comparación con los controles. En dicho estudio

concluyeron que estas alteraciones podrían perjudicar la eliminación de bacterias asociadas a CD por autofagia [Lu, *et al* 2014].

En hipertensión ocular aguda (AOH) en un modelo de rata, se encontró que miR-93-5p está significativamente desregulado y que sus genes objetivo incluyen MAPK9, MAP3K12, caspasa 3, entre otros. El miR-93-5p es reconocido como un regulador negativo de la respuesta inmune y puede inhibir la activación del factor transcripcional nuclear-kappa B (NF-kB) y citocinas proinflamatorias [Lyu, *et al* 2014; Xu, *et al* 2014]. De particular interés fue la vía inflamatoria señalada por MAPK. De acuerdo con el análisis *in silico*, p38 MAP quinasa, el factor de necrosis tumor al alfa (TNF- α) y proteínas iNOS fueron regulados significativamente en las retinas de AOH [Wang, 2017].

En hipocampo en P21 se encontró que rno-miR-17-5p disminuye su expresión al estar en condiciones de EHI. Chen, *et al* demostraron que después de EHI en el hemisferio ipsilateral la expresión de miR-17-5p se reduce hasta 24 h después del insulto. Demostraron que la vía UPR inducida por IRE1 α puede contribuir a la activación inflamatoria y la lesión cerebral después de la HI neonatal. La activación de IRE1 α , a través de la degeneración de miR-17-5p, estabilizó el ARNm de TXNIP y amplificó el nivel de TXNIP para activar el inflammasoma NLRP3 y deteriorar la lesión cerebral exacerbada después de EHI [Chen, *et al* 2018]. En nuestro estudio, observamos que el tratamiento con cerebrolisina (EHI + Cereb) aumenta la expresión de este miRNA considerablemente (Figura 7.12). Este miRNA tiene como genes blanco 7 factores de crecimiento (Tabla 7.17) y 7 ciclinas (Tabla 7.26). Los factores de crecimiento relacionados con este miRNA son: FGF4, FRS2, IGF2BP1, PDGFRA, TGFBR2, TGBRAP1 y VEGFA. Las ciclinas que interactúan con este miRNA son: CCND1, CCND2, CCNG2, CCNJ, CCNT2, CDKN1A y CNM1. Se encontró que este miRNA actúa sobre dos vías de señalización MAPK y TGF- β (Figura 7.14). Se demostró que la administración intranasal del agonista PPAR- β/δ

(GW0742) atenúa la apoptosis neuronal a través de la vía PPAR- β/δ /miR-17-5p /TXNIP en un modelo de EHI en ratas neonatas **[Gamdzyk, et al 2018]**. El miR-17-5p tiene un papel esencial en la diferenciación de fibroblastos a osteoblastos durante la progresión de AS. La regulación de osteogénica de AS se da mediante el miR-17-5p y su objetivo ANKH. ANKH es un regulador de mineralización en tejidos, huesos y cartílagos **[Qin, et al 2019]**. La sobreexpresión de miR-17-5p promueve la proliferación de células blásticas e inhibe la diferenciación y maduración monocítica. También se observó que suprime la expresión de AML1 a través de la interacción del miR-17-5p con la región 3'-UTR de ARNm, esto lleva a la regulación negativa del receptor M-CSF **[Fontana, et al 2007]**. Por otra parte, la desactivación de este miRNA en ratones conduce a la mortalidad neonatal con defectos en el corazón, pulmones y células B **[Ventura, et al 2008]**. Por lo tanto, la eliminación del miR-106b y miR-17-5p aumentan la apoptosis y la muerte embrionaria a mediados de la gestación **[Ventura, et al 2008]**. Además, miR-17-5p inhibe la expresión Bim, conjuntamente miR17-5p y miR-106b están regulados por E2F1. Estos dos miRNAs están involucrados en la expresión de p21 y la respuesta temprana de TGF β **[Petrocca, et al 2008]**.

Mir-17-5p desempeña un papel en la diferenciación de monocitos a macrófagos y en la función proangiogénica de los macrófagos mediante la focalización de HIF-2 α **[Parker y Visone, 2017]**. Chen, et al mostraron que hay una correlación negativa en la expresión de miR-17-5p y PD-L1 en un modelo de aloinjertos hepáticos tratados con BMSC. El miR-17-5p actúa sobre el sitio Cd274 3'-UTR para regular la expresión de PD-L1 **[Chen, et al 2018]**. Otro de los genes objetivo de miR-17-5p que regula su expresión es la proteína SARA **[Wang, et al 2019]**.

Se ha reportado que este miRNA es un regulador para el ciclo celular en la fase G1/S, al incrementar la expresión de proteína CCND1, y puede actuar

como un oncogén, así como un supresor tumoral en diferentes contextos celulares. La supresión de los inhibidores de proliferación permite a miR-17-5p desacoplar los reguladores negativos de la cascada de señalización de MAPK, promoviendo el crecimiento celular en HEK293T **[Cloonan, et al 2008]**. El miR-17-5p está implicado en la regulación de la proliferación celular, sin embargo, su desregulación está relacionado con cáncer tanto en ratas como en humanos **[Hérbert, et al 2009]**. Se ha demostrado que la expresión de mir-17 disminuye en las células de glioma y la inhibición aumenta la viabilidad y migración de las células de glioma. La disminución de los niveles de miR-17 en células de glioma se correlacionan con una mayor expresión de Ciclina D1, al unirse a la región 3'-UTR del ARNm de Ciclina D1 **[Sun, et al 2018]**. Se ha demostrado que mir-17-5p apunta directamente a TGFBR2 de la vía de señalización TGF- β , modulando así los niveles de p21 **[Concepcion, et al 2012; Mogilyanasky y Rigoutsos, 2013]**.

En hipocampo al P21 en los miRNAs sobreexpresados se encontró que el rno-miR-106b presenta una expresión baja condiciones de daño causado por EHI. En estudios previos se mostró que la desregulación de este miRNA junto con la represión del facilitador de apoptosis BCL2L11, desencadena apoptosis durante el estrés relacionado con el retículo endoplásmico **[Gupta, et al 2012]**. Sin embargo, el tratamiento con cerebrolisina en la misma condición provoca la sobreexpresión de este miRNA (Figura 7.12). El rno-miR-106b tiene como genes blanco 4 factores de crecimiento (Tabla 7.17) y 6 ciclinas (Tabla 7.26). Los factores de crecimiento que interactúan con este miRNA son: EPS15, FGF12, TGFBR1 y VEGFB, mientras que, las ciclinas moduladas por este miRNA son: CCND2, CCNY, CDK14, CDK15, CDKL2 y CDKL3. El rno-miR-106b actúa sobre dos vías de señalización MAPK y TGF- β (Figura 7.14). En estudios previos se determinó que el miR-106b es necesario para el apropiado desarrollo de células embrionarias fetales **[Cho, et al 2019]**. La sobreexpresión de miR-106b promueve la proliferación de NPC,

posiblemente inhibiendo la expresión del inhibidor de quinasa (CDKI) p21. Al bajar la expresión de P21 aumenta la expresión de Sox2 e induce la proliferación de NPC [Liu, *et al* 2018].

Los cambios de expresión de miR-106b puede ser un importante factor de riesgo de deterioro cognitivo en ratas de mediana edad, ya que se identificó que miR-106b regula la expresión de APP en líneas celulares neuronales *in vivo* [Che, *et al* 2014] y en el cerebro [Hérbert, *et al* 2009]. Sin embargo, mir-106b se encuentra desregulado en el cerebro en la enfermedad de Alzheimer (AD) y juega un rol vital en esta patogénesis [Erdal, *et al* 2017]. Este miRNA se une directamente al ARNm de APP y es regulado negativamente en la corteza temporal de pacientes con AD, regulando la expresión del transportador ABCA1, el cual está involucrado en la producción de ApoE, sugiriendo que este puede estar implicado en diferentes funciones en los procesos fisiopatológico de AD [Femminella, *et al* 2015, Kim, *et al* 2012]. La supresión de la expresión de ABCA1 por miR-106b disminuyó el flujo de colesterol celular y aumentó los niveles de A β secretada, esto sugiere que este miRNA regula el metabolismo de A β pudiendo tener implicaciones importantes en la patogénesis AD [Kim, *et al* 2012]. Además, la expresión alterada del mir-106b es encontrado en tejido cerebral postmortem de pacientes con esquizofrenia [Wang, *et al* 2012]. Liu, *et al* identificaron que miR-106b es un potente inhibidor de la fosforilación de tau inducida por Ab1-42 en Tyr18, dirigiéndose al gen *Fyn* en pacientes con AD. Además, miR-106b modula múltiples procesos patológicos, metástasis tumorales, infarto del miocardio y enfermedades neurodegenerativas [Liu, *et al* 2015]. La inhibición de expresión de miR-106b conduce a la detención del ciclo celular en la transición de la fase G0 a la fase G1, restringiendo la proliferación celular y facilitando la apoptosis en la línea celular de carcinoma de células renales de tipo células claras (ccRCC) [Liu, *et al* 2015]. El miR-106b puede estar directamente relacionado con la vía de señalización TGF- β , contribuyendo

así a la patogénesis de AD, afectando la supervivencia neuronal al regular la señalización TGF- β a través de TGF β RII en un modelo de ratones doble transgénico [Prasad, 2016; Wang, et al 2010].

Por otra parte, se ha encontrado que miR-106b está implicado en el desarrollo de diferentes tipos de cánceres como ya lo demostró Schlörmann, et al que miR-106b actúa sobre p21 para promover proliferación celular en adenoma [Schlörmann, et al 2015] a través del gen huésped MCM7 [Zhao, et al 2012] y está directamente regulado por este mismo. MCM7 es un factor de transcripción que controla la transición de G1-S y activa genes involucrados en la replicación del DNA [Zhao, et al 2012; Liu, et al 2015], siendo considerado un indicador de mal pronóstico en muchos tipos de cáncer. Al sobreexpresarse miR-106b se reducen los niveles de ARNm de p21. Además, p21 reprime la proteína río abajo de los complejos ciclina D1-CDK4/6, Ciclina A-CDK2 y Ciclina E-CDK2, que regulan el mantenimiento de las células al regular negativamente la progresión celular a través de la fase G1 [Puri, et al 1997; von Harsdorf, et al 1999; Nishioka, et al 2014]. Así mismo, p21 reprime el gen Sox2 que se expresa en células madre neuronales [Marqués-Torrejón, et al 2013]. Por otra parte, la sobreexpresión de CDK4/Ciclina D1 está relacionada con el acortamiento de la fase G1 [Lange, et al 2009], mientras que, la pérdida de CDK2 y CDK4 en células madre neuronales reduce la duración de la fase S y dirigiéndose a diferenciación neuronal [Lim y Kaldis, 2012].

Por otra parte, la expresión de miR-106b media la supresión de tumores mediante la vía TGF- β a través de p21 y regulando también a Six1 mediante esta vía, cambiando su papel de supresor a promotor tumoral en tumores de mama [Smith, et al 2012].

6. CONCLUSIÓN

Hemos estandarizado un modelo de EHI para generar sistemáticamente un daño neurológico, estudiar sus consecuencias y un posible tratamiento. Este modelo permite estimar una traducción del modelo animal a humano con la finalidad de establecer parámetros de tratamiento.

La cerebrolisina cambia el patrón de expresión de microRNAs en ratas sometidas a EHI.

Los miRNAs encontrados y sus vías asociadas nos permiten comprobar y validar el modelo y la eficacia del tratamiento.

El efecto del tratamiento con cerebrolisina es regular la sobreexpresión e inhibición de un grupo específico de miRNAs que modulan tres principales vías de señalización TGF- β , RAP1 y MAPK, están relacionadas con procesos de neurorestauración, de los cuales los estadísticamente significativos son: rno-miR-494-3p, rno-miR-21-3p, rno-miR-93-5p (corteza), rno-miR-93-5p (hipocampo), rno-miR-106b y rno-miR-17-5p.

En esta tesis identificamos la acción del tratamiento con cerebrolisina sobre el perfil de miRNAs involucrado en procesos moleculares y biológicos específicos, que promueven la neuroprotección después de un daño neurológico ocasionado por la EHI. Estos procesos moleculares consisten en las vías TGF- β , la cual está asociada al gen ACVR1 y su interacción con SMAD1, promoviendo neurogénesis y proliferación. Por otra parte, RAP1 mediante su interacción con PDGFRA y MAP2K3 promueven proliferación celular. Finalmente, MAPK, asociada a PDGFRA, SOS1 y ELK4 promueven proliferación y diferenciación celular.

7. PERSPECTIVAS

En este trabajo hemos determinado que el perfil de expresión de miRNAs, asociados al tratamiento con cerebrolisina, revela una serie de mecanismos moleculares específicos implicados en neurorestauración. Sin embargo, surgen nuevas interrogantes sobre la acción de cerebrolisina como un potencial tratamiento. En particular:

1. Debido a que los principales efectos de eventos hipóxico isquémicos se revelan a largo plazo, resulta importante estudiar si el perfil de expresión presenta una dependencia con la edad, esto es, en ejemplares adultos, y correlacionarlo con los resultados actuales.
2. El análisis bioinformático del perfil de expresión se analizó considerando un conjunto de miRNAs sobreexpresados y estadísticamente significativos asociados a vías de señalización. Sin embargo, es importante estudiar un rango más extenso del perfil, atendiendo aspectos moleculares y de posibles patologías asociadas, que de manera conjunta pueden proporcionar nuevas vías de señalización.
3. Finalmente el estudio del perfil de expresión de los miRNAs contribuye a establecer y aclarar los mecanismos moleculares de la cerebrolisina. No obstante, se requieren mayores estudios para elucidar los alcances y efectos de las vías de señalización ya que existe evidencia del rol que, diversos genes implicados en las vías, tienen en otras patologías asociadas a proliferación como es el caso del cáncer.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M., & Noble-Haeusslein, L. J. (2013). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in neurobiology*, 106-107, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.04.001>
2. Elshazzly, M., & Caban, O. (2018). Embryology, central nervous system.
3. Silbereis, J. C., Pochareddy, S., Zhu, Y., Li, M., & Sestan, N. (2016). The Cellular and Molecular Landscapes of the Developing Human Central Nervous System. *Neuron*, 89(2), 248–268. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.12.008>
4. Schepanski, S., Buss, C., Hanganu-Opatz, I. L., & Arck, P. C. (2018). Prenatal Immune and Endocrine Modulators of Offspring's Brain Development and Cognitive Functions Later in Life. *Frontiers in immunology*, 9, 2186. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02186>
5. Rakic, P. (1990). Principles of neural cell migration. *Experientia*, 46(9), 882–891. <https://doi.org/10.1007/BF01939380>
6. Sharon, G., Sampson, T. R., Geschwind, D. H., & Mazmanian, S. K. (2016). The Central Nervous System and the Gut Microbiome. *Cell*, 167(4), 915–932. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.027>
7. Marín-Padilla, M. (2010). *The human brain: prenatal development and structure*. Springer Science & Business Media.
8. Dekaban, A. S. (1978). Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights to body heights and body weights. *Annals of neurology*, 4(4), 345–356. <https://doi.org/10.1002/ana.410040410>
9. Douglas-Escobar, M., & Weiss, M. D. (2015). Hypoxic-ischemic encephalopathy: a review for the clinician. *JAMA pediatrics*, 169(4), 397–403. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2014.3269>
10. Kurinczuk, J. J., White-Koning, M., & Badawi, N. (2010). Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early human development*, 86(6), 329–338. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.05.010>
11. Zaitoun, I. S., Cikla, U., Zafer, D., Udho, E., Almomani, R., Suscha, A., Cengiz, P., Sorenson, C. M., & Sheibani, N. (2018). Attenuation of Retinal Vascular Development in Neonatal Mice Subjected to Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Scientific reports*, 8(1), 9166. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27525-8>
12. Otani, T., Ochiai, D., Masuda, H., Abe, Y., Fukutake, M., Matsumoto, T., Miyakoshi, K., & Tanaka, M. (2019). The neurorestorative effect of human amniotic fluid stem cells on the chronic phase of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy in mice. *Pediatric research*, 85(1), 97–104. <https://doi.org/10.1038/s41390-018-0131-8>
13. Shankaran S. (2012). Hypoxic-ischemic encephalopathy and novel strategies for neuroprotection. *Clinics in perinatology*, 39(4), 919–929. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2012.09.008>
14. Teo, J. D., Morris, M. J., & Jones, N. M. (2017). Hypoxic postconditioning improves behavioural deficits at 6 weeks following hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Behavioural brain research*, 333, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.06.036>
15. American Baby and Child: Law Centers. Reiter & Walsh, P. C. Hypoxic-Ischemic Encephalopathy (HIE). 2010 [Citado en Enero 2020]; Disponible en:

<https://www.abclawcenters.com/practice-areas/prenatal-birth-injuries/fetus-or-newborn-medical-problems/hypoxic-ischemic-encephalopathy/>

16. Allen, K. A., & Brandon, D. H. (2011). Hypoxic Ischemic Encephalopathy: Pathophysiology and Experimental Treatments. *Newborn and infant nursing reviews: NAINR*, 11(3), 125–133. <https://doi.org/10.1053/j.nainr.2011.07.004>
17. Selway, L. D. (2010). State of the science: hypoxic ischemic encephalopathy and hypothermic intervention for neonates. *Advances in neonatal care: official journal of the National Association of Neonatal Nurses*, 10(2), 60–68. <https://doi.org/10.1097/ANC.0b013e3181d54b30>
18. Volpe, J. J. (2001). Perinatal brain injury: from pathogenesis to neuroprotection. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews*, 7(1), 56–64. [https://doi.org/10.1002/1098-2779\(200102\)7:1<56::AID-MRDD1008>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1098-2779(200102)7:1<56::AID-MRDD1008>3.0.CO;2-A)
19. Morales, P., Fiedler, J. L., Andrés, S., Berrios, C., Huaiquín, P., Bustamante, D., Cardenas, S., Parra, E., & Herrera-Marschitz, M. (2008). Plasticity of hippocampus following perinatal asphyxia: effects on postnatal apoptosis and neurogenesis. *Journal of neuroscience research*, 86(12), 2650–2662. <https://doi.org/10.1002/jnr.21715>
20. Montaner, J. (2007). Fisiopatología de la isquemia cerebral. Marge Design Editors.
21. Panayiotopoulos, C. P. (2005). Neonatal seizures and neonatal syndromes. In *The epilepsies: seizures, syndromes and management*. Bladon Medical Publishing.
22. Schmidt-Kastner, R. (2015). Genomic approach to selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia-hypoxia. *Neuroscience*, 309, 259–279. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.08.034>
23. Northington, F. J., Chavez-Valdez, R., & Martin, L. J. (2011). Neuronal cell death in neonatal hypoxia-ischemia. *Annals of neurology*, 69(5), 743–758. <https://doi.org/10.1002/ana.22419>
24. Badr Zahr, L. K., & Purdy, I. (2006). Brain injury in the infant: the old, the new, and the uncertain. *The Journal of perinatal & neonatal nursing*, 20(2), 163–177. <https://doi.org/10.1097/00005237-200604000-00011>
25. Logitharajah, P., Rutherford, M. A., & Cowan, F. M. (2009). Hypoxic-ischemic encephalopathy in preterm infants: antecedent factors, brain imaging, and outcome. *Pediatric research*, 66(2), 222–229. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181a9ef34>
26. Inder, T. E., & Volpe, J. J. (2000). Mechanisms of perinatal brain injury. *Seminars in neonatology*: SN, 5(1), 3–16. <https://doi.org/10.1053/siny.1999.0112>
27. Gill, M. B., & Perez-Polo, J. R. (2008). Hypoxia ischemia-mediated cell death in neonatal rat brain. *Neurochemical research*, 33(12), 2379–2389. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9649-1>
28. Gromova, O. A., Torshin, I. Yu., & Gogoleva, I. V. (2014). Peptide composition of Cerebrolysin as the basis of molecular mechanisms of action and clinical efficacy of the drug. *Modern therapy in psychiatry and neurology*, (2).
29. Zhang, L., Chopp, M., Meier, D. H., Winter, S., Wang, L., Szalad, A., Lu, M., Wei, M., Cui, Y., & Zhang, Z. G. (2013). Sonic hedgehog signaling pathway mediates cerebrolysin-improved neurological function after stroke. *Stroke*, 44(7), 1965–1972. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.000831>
30. Gevaert, B., D'Hondt, M., Bracke, N., Yao, H., Wynendaele, E., Vissers, J. P., De Cecco, M., Claereboudt, J., & De Spiegeleer, B. (2015). Peptide profiling of Internet-obtained Cerebrolysin using high performance liquid chromatography -

- electrospray ionization ion trap and ultra high performance liquid chromatography - ion mobility - quadrupole time of flight mass spectrometry. *Drug testing and analysis*, 7(9), 835–842. <https://doi.org/10.1002/dta.1817>
31. Zhang, Y., Chopp, M., Meng, Y., Zhang, Z. G., Doppler, E., Mahmood, A., & Xiong, Y. (2013). Improvement in functional recovery with administration of Cerebrolysin after experimental closed head injury. *Journal of neurosurgery*, 118(6), 1343–1355. <https://doi.org/10.3171/2013.3.JNS122061>
 32. Plosker, G. L., & Gauthier, S. (2009). Cerebrolysin: a review of its use in dementia. *Drugs & aging*, 26(11), 893–915. <https://doi.org/10.2165/11203320-000000000-00000>
 33. Sharma H. S. (2007). Neurotrophic factors in combination: a possible new therapeutic strategy to influence pathophysiology of spinal cord injury and repair mechanisms. *Current pharmaceutical design*, 13(18), 1841–1874. <https://doi.org/10.2174/138161207780858410>
 34. Gromova, O., V. Pronin, A., Torshin, I., G. Kalacheva, A., & R. Grishina, T. (2016). Neurotrophic and antioxidant potential of neuropeptides and trace elements. *Nevrologiã, Nejropsihiatriã, Psihosomatika*. 7. 10.14412/2074-2711-2015-4-92-100.
 35. Zhang, Y., Chopp, M., Zhang, Z. G., Zhang, Y., Zhang, L., Lu, M., Zhang, T., Winter, S., Doppler, E., Brandstätter, H., Mahmood, A., & Xiong, Y. (2019). Cerebrolysin Reduces Astrogliosis and Axonal Injury and Enhances Neurogenesis in Rats After Closed Head Injury. *Neurorehabilitation and neural repair*, 33(1), 15–26. <https://doi.org/10.1177/1545968318809916>
 36. Liu, F. J., Lim, K. Y., Kaur, P., Sepramaniam, S., Armugam, A., Wong, P. T., & Jeyaseelan, K. (2013). microRNAs Involved in Regulating Spontaneous Recovery in Embolic Stroke Model. *PLoS one*, 8(6), e66393. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066393>
 37. Ponnusamy, V., Kapellou, O., Yip, E., Evanson, J., Wong, L. F., Michael-Titus, A., Yip, P. K., & Shah, D. K. (2016). A study of microRNAs from dried blood spots in newborns after perinatal asphyxia: a simple and feasible biosampling method. *Pediatric research*, 79(5), 799–805. <https://doi.org/10.1038/pr.2015.276>
 38. Huntzinger, E., & Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature reviews. Genetics*, 12(2), 99–110. <https://doi.org/10.1038/nrg2936>
 39. Lang, M. F., & Shi, Y. (2012). Dynamic Roles of microRNAs in Neurogenesis. *Frontiers in neuroscience*, 6, 71. <https://doi.org/10.3389/fnins.2012.00071>
 40. Kawahara, H., Imai, T., & Okano, H. (2012). MicroRNAs in Neural Stem Cells and Neurogenesis. *Frontiers in neuroscience*, 6, 30. <https://doi.org/10.3389/fnins.2012.00030>
 41. Taouis M. (2016). MicroRNAs in the hypothalamus. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 30(5), 641–651. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2016.11.006>
 42. Cardin, S. E., & Borchert, G. M. (2017). Viral MicroRNAs, Host MicroRNAs Regulating Viruses, and Bacterial MicroRNA-Like RNAs. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1617, 39–56. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7046-9_3
 43. Bhaskaran, M., & Mohan, M. (2014). MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Veterinary pathology*, 51(4), 759–774. <https://doi.org/10.1177/0300985813502820>

44. Inui, M., Martello, G., & Piccolo, S. (2010). MicroRNA control of signal transduction. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(4), 252–263. <https://doi.org/10.1038/nrm2868>
45. Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*, 23(20), 4051–4060. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>
46. Zeng Y. (2006). Principles of micro-RNA production and maturation. *Oncogene*, 25(46), 6156–6162. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209908>
47. Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., & Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome research*, 14(10A), 1902–1910. <https://doi.org/10.1101/gr.2722704>
48. Lamadrid-Romero, M., Díaz-Martínez, F., & Molina-Hernández, A. (2014). MicroRNA: a tool that can be used as a fetal corticogenesis biomarker. *Perinatología y Reproducción Humana*, 28(3), 146-153.
49. Davis-Dusenbery, B. N., & Hata, A. (2010). Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *Journal of biochemistry*, 148(4), 381–392. <https://doi.org/10.1093/jb/mvq096>
50. Denli, A. M., Tops, B. B., Plasterk, R. H., Ketting, R. F., & Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432(7014), 231–235. <https://doi.org/10.1038/nature03049>
51. Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Kim, Y. K., Jin, H., & Kim, V. N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & development*, 18(24), 3016–3027. <https://doi.org/10.1101/gad.1262504>
52. O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in endocrinology*, 9, 402. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
53. Hohjoh, H., & Fukushima, T. (2007). Expression profile analysis of microRNA (miRNA) in mouse central nervous system using a new miRNA detection system that examines hybridization signals at every step of washing. *Gene*, 391(1-2), 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.11.018>
54. Olsen, L., Klausen, M., Helboe, L., Nielsen, F. C., & Werge, T. (2009). MicroRNAs show mutually exclusive expression patterns in the brain of adult male rats. *PLoS one*, 4(10), e7225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007225>
55. Schrott, G. M., Tuebing, F., Nigh, E. A., Kane, C. G., Sabatini, M. E., Kiebler, M., & Greenberg, M. E. (2006). A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature*, 439(7074), 283–289. <https://doi.org/10.1038/nature04367>
56. Wilson, P. D. (2004). Polycystic kidney disease. *New England Journal of Medicine*, 350(2), 151-164.
57. He, J., Zhao, J., Zhu, W., Qi, D., Wang, L., Sun, J., Wang, B., Ma, X., Dai, Q., & Yu, X. (2016). MicroRNA biogenesis pathway genes polymorphisms and cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *PeerJ*, 4, e2706. <https://doi.org/10.7717/peerj.2706>
58. Shi, Y., Zhao, X., Hsieh, J., Wichterle, H., Impey, S., Banerjee, S., Neveu, P., & Kosik, K. S. (2010). MicroRNA regulation of neural stem cells and neurogenesis. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(45), 14931–14936. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4280-10.2010>
59. Lang, M. F., & Shi, Y. (2012). Dynamic Roles of microRNAs in Neurogenesis. *Frontiers in neuroscience*, 6, 71. <https://doi.org/10.3389/fnins.2012.00071>

60. Taleisnik, S. (2012). Neurogenesis. Córdoba-Argentina. Encuentro Grupo Editor.
61. Cho, K., Xu, B., Blenkiron, C., & Fraser, M. (2019). Emerging Roles of miRNAs in Brain Development and Perinatal Brain Injury. *Frontiers in physiology*, 10, 227. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00227>
62. Ponnusamy, V., & Yip, P. K. (2019). The role of microRNAs in newborn brain development and hypoxic ischaemic encephalopathy. *Neuropharmacology*, 149, 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.11.041>
63. Cao, X., Yeo, G., Muotri, A. R., Kuwabara, T., & Gage, F. H. (2006). Noncoding RNAs in the mammalian central nervous system. *Annual review of neuroscience*, 29, 77–103. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112839>
64. Motti, D., Bixby, J. L., & Lemmon, V. P. (2012). MicroRNAs and neuronal development. *Seminars in fetal & neonatal medicine*, 17(6), 347–352. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2012.07.008>
65. Zhao, C., Sun, G., Li, S., & Shi, Y. (2009). A feedback regulatory loop involving microRNA-9 and nuclear receptor TLX in neural stem cell fate determination. *Nature structural & molecular biology*, 16(4), 365–371. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1576>
66. Qiu, J., Zhou, X. Y., Zhou, X. G., Cheng, R., Liu, H. Y., & Li, Y. (2013). Neuroprotective effects of microRNA-210 on hypoxic-ischemic encephalopathy. *BioMed research international*, 2013, 350419. <https://doi.org/10.1155/2013/350419>
67. Kawahara, H., Imai, T., & Okano, H. (2012). MicroRNAs in Neural Stem Cells and Neurogenesis. *Frontiers in neuroscience*, 6, 30. <https://doi.org/10.3389/fnins.2012.00030>
68. Zhang, Y., Ueno, Y., Liu, X. S., Buller, B., Wang, X., Chopp, M., & Zhang, Z. G. (2013). The MicroRNA-17-92 cluster enhances axonal outgrowth in embryonic cortical neurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(16), 6885–6894. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5180-12.2013>
69. Krichevsky, A. M., Sonntag, K. C., Isacson, O., & Kosik, K. S. (2006). Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 24(4), 857–864. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0441>
70. Sempere, L. F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., & Ambros, V. (2004). Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome biology*, 5(3), R13. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-3-r13>
71. Silber, J., Lim, D. A., Petritsch, C., Persson, A. I., Maunakea, A. K., Yu, M., Vandenberg, S. R., Ginzinger, D. G., James, C. D., Costello, J. F., Bergers, G., Weiss, W. A., Alvarez-Buylla, A., & Hodgson, J. G. (2008). miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC medicine*, 6, 14. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-6-14>
72. Liu, C., Teng, Z. Q., Santistevan, N. J., Szulwach, K. E., Guo, W., Jin, P., & Zhao, X. (2010). Epigenetic regulation of miR-184 by MBD1 governs neural stem cell proliferation and differentiation. *Cell stem cell*, 6(5), 433–444. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.02.017>
73. Vannucci, R. C., & Vannucci, S. J. (2005). Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: evolution of an animal model. *Developmental neuroscience*, 27(2-4), 81–86. <https://doi.org/10.1159/000085978>
74. Volpe J. J. (2012). Neonatal encephalopathy: an inadequate term for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Annals of neurology*, 72(2), 156–166. <https://doi.org/10.1002/ana.23647>

75. Allen, K. A., & Brandon, D. H. (2011). Hypoxic Ischemic Encephalopathy: Pathophysiology and Experimental Treatments. *Newborn and infant nursing reviews: NAINR*, 11(3), 125–133. <https://doi.org/10.1053/j.nainr.2011.07.004>
76. Gonzalez-Barrios, J. A., Escalante, B., Valdés, J., León-Chávez, B. A., & Martinez-Fong, D. (2002). Nitric oxide and nitric oxide synthases in the fetal cerebral cortex of rats following transient uteroplacental ischemia. *Brain research*, 945(1), 114–122. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)02746-4](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)02746-4)
77. Watanabe, T., Takeda, A., Mise, K., Okuno, T., Suzuki, T., Minami, N., & Imai, H. (2005). Stage-specific expression of microRNAs during *Xenopus* development. *FEBS letters*, 579(2), 318–324. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.11.067>
78. Thomson, J. M., Parker, J., Perou, C. M., & Hammond, S. M. (2004). A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression. *Nature methods*, 1(1), 47–53. <https://doi.org/10.1038/nmeth704>
79. Raghavendra, V., Tanga, F., & DeLeo, J. A. (2003). Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 306(2), 624–630. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.052407>
80. Ding, W. Q., Kuntz, S. M., & Miller, L. J. (2002). A misspliced form of the cholecystokinin-B/gastrin receptor in pancreatic carcinoma: role of reduced sellular U2AF35 and a suboptimal 3'-splicing site leading to retention of the fourth intron. *Cancer research*, 62(3), 947–952.
81. Geiss, G. K., Bumgarner, R. E., Birditt, B., Dahl, T., Dowidar, N., Dunaway, D. L., Fell, H. P., Ferree, S., George, R. D., Grogan, T., James, J. J., Maysuria, M., Mitton, J. D., Oliveri, P., Osborn, J. L., Peng, T., Ratcliffe, A. L., Webster, P. J., Davidson, E. H., Hood, L., & Dimitrov, K. (2008). Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nature biotechnology*, 26(3), 317–325. <https://doi.org/10.1038/nbt1385>
82. Mariani, R., Chen, D., Schröfelbauer, B., Navarro, F., König, R., Bollman, B., Münk, C., Nymark-McMahon, H., & Landau, N. R. (2003). Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell*, 114(1), 21–31. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00515-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00515-4)
83. Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., & Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25), 14863–14868. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.14863>
84. Cameron, H. A., Hazel, T. G., & McKay, R. D. (1998). Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *Journal of neurobiology*, 36(2), 287–306.
85. Xiong, W., Pestell, R., & Rosner, M. R. (1997). Role of cyclins in neuronal differentiation of immortalized hippocampal cells. *Molecular and cellular biology*, 17(11), 6585–6597. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.11.6585>
86. Lim, S., & Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development (Cambridge, England)*, 140(15), 3079–3093. <https://doi.org/10.1242/dev.091744>
87. Rice, J. E., Vannucci, R. C., & Brierley, J. B. (1981). The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Annals of neurology*, 9(2), 131–141. <https://doi.org/10.1002/ana.410090206>
88. Levine, S. (1960). Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *The American journal of pathology*, 36(1), 1–17.

89. Towfighi, J., Yager, J. Y., Housman, C., & Vannucci, R. C. (1991). Neuropathology of remote hypoxic-ischemic damage in the immature rat. *Acta neuropathologica*, 81(5), 578–587. <https://doi.org/10.1007/BF00310141>
90. Sampath, D., White, A. M., & Raol, Y. H. (2014). Characterization of neonatal seizures in an animal model of hypoxic-ischemic encephalopathy. *Epilepsia*, 55(7), 985–993. <https://doi.org/10.1111/epi.12646>
91. Balduini, W., De Angelis, V., Mazzoni, E., & Cimino, M. (2000). Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain research*, 859(2), 318–325. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)01997-1](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)01997-1)
92. Boss, V., Sola, A., Wen, T. C., & Decker, M. J. (2005). Mild intermittent hypoxia does not induce stress responses in the neonatal rat brain. *Biology of the neonate*, 88(4), 313–320. <https://doi.org/10.1159/000087629>
93. Millar, L. J., Shi, L., Hoerder-Suabedissen, A., & Molnár, Z. (2017). Neonatal Hypoxia Ischaemia: Mechanisms, Models, and Therapeutic Challenges. *Frontiers in cellular neuroscience*, 11, 78. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00078>
94. Clancy, R. R., & Legido, A. (1987). The exact ictal and interictal duration of electroencephalographic neonatal seizures. *Epilepsia*, 28(5), 537–541. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1987.tb03685.x>
95. Seshia, S. S., Huntsman, R. J., Lowry, N. J., Seshia, M., Yager, J. Y., & Sankaran, K. (2011). Neonatal seizures: diagnosis and management. *Zhongguo dang dai er ke za zhi = Chinese journal of contemporary pediatrics*, 13(2), 81–100.
96. Kadam, S. D., & Dudek, F. E. (2007). Neuropathological features of a rat model for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy with associated epilepsy. *The Journal of comparative neurology*, 505(6), 716–737. <https://doi.org/10.1002/cne.21533>
97. Ahn, M. O., Korst, L. M., Phelan, J. P., & Martin, G. I. (1998). Does the onset of neonatal seizures correlate with the timing of fetal neurologic injury?. *Clinical pediatrics*, 37(11), 673–676. <https://doi.org/10.1177/000992289803701105>
98. Filan, P., Boylan, G. B., Chorley, G., Davies, A., Fox, G. F., Pressler, R., & Rennie, J. M. (2005). The relationship between the onset of electrographic seizure activity after birth and the time of cerebral injury in utero. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*, 112(4), 504–507. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2004.00476.x>
99. Sameshima, H., & Ikenoue, T. (2013). Hypoxic-ischemic neonatal encephalopathy: animal experiments for neuroprotective therapies. *Stroke research and treatment*, 2013, 659374. <https://doi.org/10.1155/2013/659374>
100. Lubics, A., Reglodi, D., Tamás, A., Kiss, P., Szalai, M., Szalontay, L., & Lengvári, I. (2005). Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. *Behavioural brain research*, 157(1), 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.06.019>
101. Ten, V. S., Bradley-Moore, M., Gingrich, J. A., Stark, R. I., & Pinsky, D. J. (2003). Brain injury and neurofunctional deficit in neonatal mice with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Behavioural brain research*, 145(1-2), 209–219. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(03\)00146-3](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(03)00146-3)
102. Teo, J. D., Morris, M. J., & Jones, N. M. (2017). Hypoxic postconditioning improves behavioural deficits at 6 weeks following hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Behavioural brain research*, 333, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.06.036>

103. Vázquez-Roque, R. A., Ramos, B., Tecuatl, C., Juárez, I., Adame, A., de la Cruz, F., Zamudio, S., Mena, R., Rockenstein, E., Masliah, E., & Flores, G. (2012). Chronic administration of the neurotrophic agent cerebrolysin ameliorates the behavioral and morphological changes induced by neonatal ventral hippocampus lesion in a rat model of schizophrenia. *Journal of neuroscience research*, 90(1), 288–306. <https://doi.org/10.1002/jnr.22753>
104. Feather-Schussler, D. N., & Ferguson, T. S. (2016). A Battery of Motor Tests in a Neonatal Mouse Model of Cerebral Palsy. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (117), 53569. <https://doi.org/10.3791/53569>
105. Balduino, W., De Angelis, V., Mazzoni, E., & Cimino, M. (2001). Simvastatin protects against long-lasting behavioral and morphological consequences of neonatal hypoxic/ischemic brain injury. *Stroke*, 32(9), 2185–2191. <https://doi.org/10.1161/hs0901.094287>
106. Fan, L. W., Lin, S., Pang, Y., Lei, M., Zhang, F., Rhodes, P. G., & Cai, Z. (2005). Hypoxia-ischemia induced neurological dysfunction and brain injury in the neonatal rat. *Behavioural brain research*, 165(1), 80–90. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.06.033>
107. Wagner, B. P., Nedelcu, J., & Martin, E. (2002). Delayed postischemic hypothermia improves long-term behavioral outcome after cerebral hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Pediatric research*, 51(3), 354–360. <https://doi.org/10.1203/00006450-200203000-00015>
108. Sanchez-Olguin, C. P., Guzman-Velizquez, S., Melo, A. I., Flores, G., De-La-Cruz, F., & Zamudio, S. R. (2014). Sub-chronic cerebrolysin in treatment attenuates the long-lasting behavioral alterations caused by maternal separation in rats. *International Journal of Pharmacology*, 406-417.
109. Ohta, H., Nishikawa, H., Kimura, H., Anayama, H., & Miyamoto, M. (1997). Chronic cerebral hypoperfusion by permanent internal carotid ligation produces learning impairment without brain damage in rats. *Neuroscience*, 79(4), 1039–1050. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(97\)00037-7](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(97)00037-7)
110. Reglodi, D., Kiss, P., Tamás, A., & Lengvári, I. (2003). The effects of PACAP and PACAP antagonist on the neurobehavioral development of newborn rats. *Behavioural brain research*, 140(1-2), 131–139. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(02\)00289-9](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(02)00289-9)
111. Chan, K. C., Kancherla, S., Fan, S. J., & Wu, E. X. (2014). Long-term effects of neonatal hypoxia-ischemia on structural and physiological integrity of the eye and visual pathway by multimodal MRI. *Investigative ophthalmology & visual science*, 56(1), 1–9. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-14287>
112. Dumas T. C. (2004). Early eyelid opening enhances spontaneous alternation and accelerates the development of perforant path synaptic strength in the hippocampus of juvenile rats. *Developmental psychobiology*, 45(1), 1–9. <https://doi.org/10.1002/dev.20011>
113. Zhai, F., Zhang, X., Guan, Y., Yang, X., Li, Y., Song, G., & Guan, L. (2012). Expression profiles of microRNAs after focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Neural regeneration research*, 7(12), 917–923. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-5374.2012.12.007>
114. Dwivedi Y. (2014). Emerging role of microRNAs in major depressive disorder: diagnosis and therapeutic implications. *Dialogues in clinical neuroscience*, 16(1), 43-61.

115. Wu, P., Kong, L., & Li, J. (2019). MicroRNA-494-3p protects rat cardiomyocytes against septic shock via PTEN. *Experimental and therapeutic medicine*, 17(3), 1706–1716. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.7116>
116. Chen, S., Zhao, G., Miao, H., Tang, R., Song, Y., Hu, Y., Wang, Z., & Hou, Y. (2015). MicroRNA-494 inhibits the growth and angiogenesis-regulating potential of mesenchymal stem cells. *FEBS letters*, 589(6), 710–717. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.01.038>
117. Su, S., Luo, D., Liu, X., Liu, J., Peng, F., Fang, C., & Li, B. (2017). miR-494 up-regulates the PI3K/Akt pathway via targetting PTEN and attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury in a rat model. *Bioscience reports*, 37(5), BSR20170798. <https://doi.org/10.1042/BSR20170798>
118. Lin, H., Huang, Z. P., Liu, J., Qiu, Y., Tao, Y. P., Wang, M. C., Yao, H., Hou, K. Z., Gu, F. M., & Xu, X. F. (2018). MiR-494-3p promotes PI3K/AKT pathway hyperactivation and human hepatocellular carcinoma progression by targeting PTEN. *Scientific reports*, 8(1), 10461. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28519-2>
119. He, W., Li, Y., Chen, X., Lu, L., Tang, B., Wang, Z., Pan, Y., Cai, S., He, Y., & Ke, Z. (2014). miR-494 acts as an anti-oncogene in gastric carcinoma by targeting c-myc. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 29(7), 1427–1434. <https://doi.org/10.1111/jgh.12558>
120. Li, X. T., Wang, H. Z., Wu, Z. W., Yang, T. Q., Zhao, Z. H., Chen, G. L., Xie, X. S., Li, B., Wei, Y. X., Huang, Y. L., Zhou, Y. X., & Du, Z. W. (2015). miR-494-3p Regulates Cellular Proliferation, Invasion, Migration, and Apoptosis by PTEN/AKT Signaling in Human Glioblastoma Cells. *Cellular and molecular neurobiology*, 35(5), 679–687. <https://doi.org/10.1007/s10571-015-0163-0>
121. Liu, K., Liu, S., Zhang, W., Jia, B., Tan, L., Jin, Z., & Liu, Y. (2015). miR-494 promotes cell proliferation, migration and invasion, and increased sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma by targeting PTEN. *Oncology reports*, 34(2), 1003–1010. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4030>
122. Romano, G., Acunzo, M., Garofalo, M., Di Leva, G., Cascione, L., Zanca, C., Bolon, B., Condorelli, G., & Croce, C. M. (2012). MiR-494 is regulated by ERK1/2 and modulates TRAIL-induced apoptosis in non-small-cell lung cancer through BIM down-regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(41), 16570–16575. <https://doi.org/10.1073/pnas.1207917109>
123. Yu, Y., Yu, X., Liu, H., Song, Q., & Yang, Y. (2018). miR-494 inhibits cancer-initiating cell phenotypes and reverses resistance to lapatinib by downregulating FGFR2 in HER2-positive gastric cancer. *International journal of molecular medicine*, 42(2), 998–1007. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3680>
124. Zhao, X. Q., Liang, T. J., & Fu, J. W. (2016). miR-494 inhibits invasion and proliferation of gastric cancer by targeting IGF-1R. *European review for medical and pharmacological sciences*, 20(18), 3818–3824.
125. He, W., Li, Y., Chen, X., Lu, L., Tang, B., Wang, Z., Pan, Y., Cai, S., He, Y., & Ke, Z. (2014). miR-494 acts as an anti-oncogene in gastric carcinoma by targeting c-myc. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 29(7), 1427–1434. <https://doi.org/10.1111/jgh.12558>
126. Chen, Z., Zhang, Y., Liang, C., Chen, L., Zhang, G., & Qian, A. (2017). Mechanosensitive miRNAs and Bone Formation. *International journal of molecular sciences*, 18(8), 1684. <https://doi.org/10.3390/ijms18081684>

127. Zhao, X., Zhou, Y., Chen, Y. U., & Yu, F. (2016). miR-494 inhibits ovarian cancer cell proliferation and promotes apoptosis by targeting FGFR2. *Oncology letters*, 11(6), 4245–4251. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4527>
128. Shen, P. F., Chen, X. Q., Liao, Y. C., Chen, N., Zhou, Q., Wei, Q., Li, X., Wang, J., & Zeng, H. (2014). MicroRNA-494-3p targets CXCR4 to suppress the proliferation, invasion, and migration of prostate cancer. *The Prostate*, 74(7), 756–767. <https://doi.org/10.1002/pros.22795>
129. Kim, W. K., Park, M., Kim, Y. K., Tae, Y. K., Yang, H. K., Lee, J. M., & Kim, H. (2011). MicroRNA-494 downregulates KIT and inhibits gastrointestinal stromal tumor cell proliferation. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(24), 7584–7594. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0166>
130. Lemecha, M., Morino, K., Imamura, T., Iwasaki, H., Ohashi, N., Ida, S., Sato, D., Sekine, O., Ugi, S., & Maegawa, H. (2018). MiR-494-3p regulates mitochondrial biogenesis and thermogenesis through PGC1- α signalling in beige adipocytes. *Scientific reports*, 8(1), 15096. <https://doi.org/10.1038>
131. Ge, X. T., Lei, P., Wang, H. C., Zhang, A. L., Han, Z. L., Chen, X., Li, S. H., Jiang, R. C., Kang, C. S., & Zhang, J. N. (2014). miR-21 improves the neurological outcome after traumatic brain injury in rats. *Scientific reports*, 4, 6718. <https://doi.org/10.1038/srep06718>
132. Liu, F. J., Lim, K. Y., Kaur, P., Sepramaniam, S., Armugam, A., Wong, P. T., & Jeyaseelan, K. (2013). microRNAs Involved in Regulating Spontaneous Recovery in Embolic Stroke Model. *PloS one*, 8(6), e66393. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066393>
133. Yan, H., Rao, J., Yuan, J., Gao, L., Huang, W., Zhao, L., & Ren, J. (2017). Long non-coding RNA MEG3 functions as a competing endogenous RNA to regulate ischemic neuronal death by targeting miR-21/PDCD4 signaling pathway. *Cell death & disease*, 8(12), 3211. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0047-y>
134. Ge, X., Li, W., Huang, S., Yin, Z., Yang, M., Han, Z., Han, Z., Chen, F., Wang, H., Lei, P., & Zhang, J. (2019). Increased miR-21-3p in Injured Brain Microvascular Endothelial Cells after Traumatic Brain Injury Aggravates Blood-Brain Barrier Damage by Promoting Cellular Apoptosis and Inflammation through Targeting MAT2B. *Journal of neurotrauma*, 36(8), 1291–1305. <https://doi.org/10.1089/neu.2018.5728>
135. Zhang, X., Cheng, Z., Wang, L., Jiao, B., Yang, H., & Wang, X. (2019). MiR-21-3p Centric Regulatory Network in Dairy Cow Mammary Epithelial Cell Proliferation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(40), 11137–11147. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04059>
136. Han, L., Yue, X., Zhou, X., Lan, F. M., You, G., Zhang, W., Zhang, K. L., Zhang, C. Z., Cheng, J. Q., Yu, S. Z., Pu, P. Y., Jiang, T., & Kang, C. S. (2012). MicroRNA-21 expression is regulated by β -catenin/STAT3 pathway and promotes glioma cell invasion by direct targeting RECK. *CNS neuroscience & therapeutics*, 18(7), 573–583. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2012.00344.x>
137. Seike, M., Goto, A., Okano, T., Bowman, E. D., Schetter, A. J., Horikawa, I., Mathe, E. A., Jen, J., Yang, P., Sugimura, H., Gemma, A., Kudoh, S., Croce, C. M., & Harris, C. C. (2009). MiR-21 is an EGFR-regulated anti-apoptotic factor in lung cancer in never-smokers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(29), 12085–12090. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905234106>

138. Yu, Y., Kanwar, S. S., Patel, B. B., Oh, P. S., Nautiyal, J., Sarkar, F. H., & Majumdar, A. P. (2012). MicroRNA-21 induces stemness by downregulating transforming growth factor beta receptor 2 (TGF β R2) in colon cancer cells. *Carcinogenesis*, 33(1), 68–76. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr246>
139. Jo, A., Lee, H. E., & Kim, H. S. (2017). Genomic Analysis of miR-21-3p and Expression Pattern with Target Gene in Olive Flounder. *Genomics & informatics*, 15(3), 98–107. <https://doi.org/10.5808/GI.2017.15.3.98>
140. Lo, T. F., Tsai, W. C., & Chen, S. T. (2013). MicroRNA-21-3p, a berberine-induced miRNA, directly down-regulates human methionine adenosyltransferases 2A and 2B and inhibits hepatoma cell growth. *PloS one*, 8(9), e75628. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075628>
141. Báez-Vega, P. M., Echevarría Vargas, I. M., Valiyeva, F., Encarnación-Rosado, J., Roman, A., Flores, J., Marcos-Martínez, M. J., & Vivas-Mejía, P. E. (2016). Targeting miR-21-3p inhibits proliferation and invasion of ovarian cancer cells. *Oncotarget*, 7(24), 36321–36337. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9216>
142. Hazarika, S., Farber, C. R., Dokun, A. O., Pitsillides, A. N., Wang, T., Lye, R. J., & Annex, B. H. (2013). MicroRNA-93 controls perfusion recovery after hindlimb ischemia by modulating expression of multiple genes in the cell cycle pathway. *Circulation*, 127(17), 1818–1828. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000860>
143. Liang, L., Zhao, L., Zan, Y., Zhu, Q., Ren, J., & Zhao, X. (2017). MiR-93-5p enhances growth and angiogenesis capacity of HUVECs by down-regulating EPLIN. *Oncotarget*, 8(63), 107033–107043. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22300>
144. Ma, Q., Li, G., Tao, Z., Wang, J., Wang, R., Liu, P., Luo, Y., & Zhao, H. (2019). Blood microRNA-93 as an indicator for diagnosis and prediction of functional recovery of acute stroke patients. *Journal of clinical neuroscience: official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 62, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2018.12.003>
145. Fabbri, E., Borgatti, M., Montagner, G., Bianchi, N., Finotti, A., Lampronti, I., Bezzerri, V., Dehecchi, M. C., Cabrini, G., & Gambari, R. (2014). Expression of microRNA-93 and Interleukin-8 during *Pseudomonas aeruginosa*-mediated induction of proinflammatory responses. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 50(6), 1144–1155. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0160OC>
146. Fabbri, E., Brognara, E., Montagner, G., Ghimenton, C., Eccher, A., Cantù, C., Khalil, S., Bezzerri, V., Provezza, L., Bianchi, N., Finotti, A., Borgatti, M., Moretto, G., Chilosi, M., Cabrini, G., & Gambari, R. (2015). Regulation of IL-8 gene expression in gliomas by microRNA miR-93. *BMC cancer*, 15, 661. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1659-1>
147. Fabbri, E., Montagner, G., Bianchi, N., Finotti, A., Borgatti, M., Lampronti, I., Cabrini, G., & Gambari, R. (2016). MicroRNA miR-93-5p regulates expression of IL-8 and VEGF in neuroblastoma SK-N-AS cells. *Oncology reports*, 35(5), 2866–2872. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4676>
148. Fang, L., Deng, Z., Shatseva, T., Yang, J., Peng, C., Du, W. W., Yee, A. J., Ang, L. C., He, C., Shan, S. W., & Yang, B. B. (2011). MicroRNA miR-93 promotes tumor growth and angiogenesis by targeting integrin- β 8. *Oncogene*, 30(7), 806–821. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.465>
149. Fang, L., Du, W. W., Yang, W., Rutnam, Z. J., Peng, C., Li, H., O'Malley, Y. Q., Askeland, R. W., Sugg, S., Liu, M., Mehta, T., Deng, Z., & Yang, B. B. (2012). MiR-93

- enhances angiogenesis and metastasis by targeting LATS2. *Cell cycle* (Georgetown, Tex.), 11(23), 4352–4365. <https://doi.org/10.4161/cc.22670>
150. Gao, Y., Deng, K., Liu, X., Dai, M., Chen, X., Chen, J., Chen, J., Huang, Y., Dai, S., & Chen, J. (2019). Molecular mechanism and role of microRNA-93 in human cancers: A study based on bioinformatics analysis, meta-analysis, and quantitative polymerase chain reaction validation. *Journal of cellular biochemistry*, 120(4), 6370–6383. <https://doi.org/10.1002/jcb.27924>
 151. Kawano, M., Tanaka, K., Itonaga, I., Ikeda, S., Iwasaki, T., & Tsumura, H. (2015). microRNA-93 promotes cell proliferation via targeting of PTEN in Osteosarcoma cells. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, 34(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s13046-015-0192-z>
 152. Cao, Y., Xia, F., Wang, P., & Gao, M. (2018). MicroRNA 93 5p promotes the progression of human retinoblastoma by regulating the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway. *Molecular medicine reports*, 18(6), 5807–5814. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9573>
 153. Liu, M. X., Liao, J., Xie, M., Gao, Z. K., Wang, X. H., Zhang, Y., Shang, M. H., Yin, L. H., Pu, Y. P., & Liu, R. (2018). miR-93-5p Transferred by Exosomes Promotes the Proliferation of Esophageal Cancer Cells via Intercellular Communication by Targeting PTEN. *Biomedical and environmental sciences: BES*, 31(3), 171–185. <https://doi.org/10.3967/bes2018.023>
 154. Li, F., Liang, X., Chen, Y., Li, S., & Liu, J. (2014). Role of microRNA-93 in regulation of angiogenesis. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(11), 10609–10613. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2605-6>
 155. Liang, H., Wang, F., Chu, D., Zhang, W., Liao, Z., Fu, Z., Yan, X., Zhu, H., Guo, W., Zhang, Y., Guan, W., & Chen, X. (2016). miR-93 functions as an oncomiR for the downregulation of PDCD4 in gastric carcinoma. *Scientific reports*, 6, 23772. <https://doi.org/10.1038/srep23772>
 156. Xue, X., Wang, X., Zhao, Y., Hu, R., & Qin, L. (2018). Exosomal miR-93 promotes proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma by directly inhibiting TIMP2/TP53INP1/CDKN1A. *Biochemical and biophysical research communications*, 502(4), 515–521. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.208>
 157. Wang, X., Liao, Z., Bai, Z., He, Y., Duan, J., & Wei, L. (2018). MiR-93-5p Promotes Cell Proliferation through Down-Regulating PPARGC1A in Hepatocellular Carcinoma Cells by Bioinformatics Analysis and Experimental Verification. *Genes*, 9(1), 51. <https://doi.org/10.3390/genes9010051>
 158. Yu, X. F., Zou, J., Bao, Z. J., & Dong, J. (2011). miR-93 suppresses proliferation and colony formation of human colon cancer stem cells. *World journal of gastroenterology*, 17(42), 4711–4717. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i42.4711>
 159. Zhang, Y., & Xu, Z. (2018). miR-93 enhances cell proliferation by directly targeting CDKN1A in nasopharyngeal carcinoma. *Oncology letters*, 15(2), 1723–1727. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7492>
 160. Wang, S. J., Cao, Y. F., Yang, Z. Q., Jiang, Z. Y., Cai, B., Guo, J., Zhang, S., Zhang, X. L., & Gao, F. (2017). MicroRNA-93-5p increases multidrug resistance in human colorectal carcinoma cells by downregulating cyclin dependent kinase inhibitor 1A gene expression. *Oncology letters*, 13(2), 722–730. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5463>

161. Choi, J. Y., Shin, H. J., & Bae, I. H. (2018). miR-93-5p suppresses cellular senescence by directly targeting Bcl-w and p21. *Biochemical and biophysical research communications*, 505(4), 1134–1140. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.10.010>
162. Cheng, W., Hao, C. Y., Zhao, S., Zhang, L. L., & Liu, D. (2019). SNHG16 promotes the progression of osteoarthritis through activating microRNA-93-5p/CCND1 axis. *European review for medical and pharmacological sciences*, 23(21), 9222–9229. <https://doi.org/10.26355/eurev.201911.19414>
163. Lu, C., Chen, J., Xu, H. G., Zhou, X., He, Q., Li, Y. L., Jiang, G., Shan, Y., Xue, B., Zhao, R. X., Wang, Y., Werle, K. D., Cui, R., Liang, J., & Xu, Z. X. (2014). MIR106B and MIR93 prevent removal of bacteria from epithelial cells by disrupting ATG16L1-mediated autophagy. *Gastroenterology*, 146(1), 188–199. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.09.006>
164. Lyu, X., Fang, W., Cai, L., Zheng, H., Ye, Y., Zhang, L., Li, J., Peng, H., Cho, W. C., Wang, E., Marincola, F. M., Yao, K., Cai, H., Li, J., & Li, X. (2014). TGF β 2 is a major target of miR-93 in nasopharyngeal carcinoma aggressiveness. *Molecular cancer*, 13, 51. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-51>
165. Xu, Y., Jin, H., Yang, X., Wang, L., Su, L., Liu, K., Gu, Q., & Xu, X. (2014). MicroRNA-93 inhibits inflammatory cytokine production in LPS-stimulated murine macrophages by targeting IRAK4. *FEBS letters*, 588(9), 1692–1698. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.03.013>
166. Wang, J., Valiente-Soriano, F. J., Nadal-Nicolás, F. M., Rovere, G., Chen, S., Huang, W., Agudo-Barriuso, M., Jonas, J. B., Vidal-Sanz, M., & Zhang, X. (2017). MicroRNA regulation in an animal model of acute ocular hypertension. *Acta ophthalmologica*, 95(1), e10–e21. <https://doi.org/10.1111/aos.13227>
167. Chen, D., Dixon, B. J., Doycheva, D. M., Li, B., Zhang, Y., Hu, Q., He, Y., Guo, Z., Nowranghi, D., Flores, J., Filippov, V., Zhang, J. H., & Tang, J. (2018). IRE1 α inhibition decreased TXNIP/NLRP3 inflammasome activation through miR-17-5p after neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. *Journal of neuroinflammation*, 15(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1077-9>
168. Gamdzyk, M., Doycheva, D. M., Malaguit, J., Enkhjargal, B., Tang, J., & Zhang, J. H. (2018). Role of PPAR- β/δ /miR-17/TXNIP pathway in neuronal apoptosis after neonatal hypoxic-ischemic injury in rats. *Neuropharmacology*, 140, 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.08.003>
169. Qin, X., Zhu, B., Jiang, T., Tan, J., Wu, Z., Yuan, Z., Zheng, L., & Zhao, J. (2019). miR-17-5p Regulates Heterotopic Ossification by Targeting ANKH in Ankylosing Spondylitis. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 18, 696–707. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.10.003>
170. Fontana, L., Pelosi, E., Greco, P., Racanicchi, S., Testa, U., Liuzzi, F., Croce, C. M., Brunetti, E., Grignani, F., & Peschle, C. (2007). MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopenia through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation. *Nature cell biology*, 9(7), 775–787. <https://doi.org/10.1038/ncb1613>
171. Ventura, A., Young, A. G., Winslow, M. M., Lintault, L., Meissner, A., Erkeland, S. J., Newman, J., Bronson, R. T., Crowley, D., Stone, J. R., Jaenisch, R., Sharp, P. A., & Jacks, T. (2008). Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell*, 132(5), 875–886. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.019>
172. Petrocca, F., Visone, R., Onelli, M. R., Shah, M. H., Nicoloso, M. S., de Martino, I., Iliopoulos, D., Pillozzi, E., Liu, C. G., Negrini, M., Cavazzini, L., Volinia, S., Alder, H., Ruco,

- L. P., Baldassarre, G., Croce, C. M., & Vecchione, A. (2008). E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer cell*, 13(3), 272–286. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.02.013>
173. Parker, M. I., & Palladino, M. A. (2017). MicroRNAs downregulated following immune activation of rat testis. *American journal of reproductive immunology* (New York, N.Y.: 1989), 77(6), 10.1111/ajri.12673. <https://doi.org/10.1111/ajri.12673>
174. Chen, Q., Zhou, R., Zhang, Y., Zhu, S., Xiao, C., Gong, J., Li, K., Tang, H., Sun, C., & Zhang, J. (2018). Bone marrow mesenchymal stromal cells attenuate liver allograft rejection may via upregulation PD-L1 expression through downregulation of miR-17-5p. *Transplant immunology*, 51, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2018.08.004>
175. Wang, J. Q., Dong, Y., Li, S. J., Pan, C. L., Liu, H. Y., Wang, Y. K., Xu, L., Yang, J. H., Cui, Y. X., He, J. T., Mang, J., & Xu, Z. X. (2019). Knockdown of microRNA-17-5p Enhances the Neuroprotective Effect of Act A/Smads Signal Loop After Ischemic Injury. *Neurochemical research*, 44(8), 1807–1817. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02815-3>
176. Cloonan, N., Brown, M. K., Steptoe, A. L., Wani, S., Chan, W. L., Forrest, A. R., Kolle, G., Gabrielli, B., & Grimmond, S. M. (2008). The miR-17-5p microRNA is a key regulator of the G1/S phase cell cycle transition. *Genome biology*, 9(8), R127. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-8-r127>
177. Hébert, S. S., Horr , K., Nicolai, L., Bergmans, B., Papadopoulou, A. S., Delacourte, A., & De Strooper, B. (2009). MicroRNA regulation of Alzheimer's Amyloid precursor protein expression. *Neurobiology of disease*, 33(3), 422–428. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.11.009>
178. Sun, G., SiMa, G., Wu, C., Fan, Y., Tan, Y., Wang, Z., Cheng, G., & Li, J. (2018). Decreased MiR-17 in glioma cells increased cell viability and migration by increasing the expression of Cyclin D1, p-Akt and Akt. *PLoS one*, 13(1), e0190515. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190515>
179. Concepcion, C. P., Bonetti, C., & Ventura, A. (2012). The microRNA-17-92 family of microRNA clusters in development and disease. *Cancer journal* (Sudbury, Mass.), 18(3), 262–267. <https://doi.org/10.1097/PP0.0b013e318258b60a>
180. Mogilyansky, E., & Rigoutsos, I. (2013). The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. *Cell death and differentiation*, 20(12), 1603–1614. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.125>
181. Gupta, S., Read, D. E., Deepti, A., Cawley, K., Gupta, A., Oommen, D., Verfaillie, T., Matus, S., Smith, M. A., Mott, J. L., Agostinis, P., Hetz, C., & Samali, A. (2012). Perk-dependent repression of miR-106b-25 cluster is required for ER stress-induced apoptosis. *Cell death & disease*, 3(6), e333. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.74>
182. Cho, K., Xu, B., Blenkiron, C., & Fraser, M. (2019). Emerging Roles of miRNAs in Brain Development and Perinatal Brain Injury. *Frontiers in physiology*, 10, 227. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00227>
183. Liu, H., Li, G., Ma, C., Chen, Y., Wang, J., & Yang, Y. (2018). Repetitive magnetic stimulation promotes the proliferation of neural progenitor cells via modulating the expression of miR-106b. *International journal of molecular medicine*, 42(6), 3631–3639. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3922>
184. Che, H., Sun, L. H., Guo, F., Niu, H. F., Su, X. L., Bao, Y. N., Fu, Z. D., Liu, H. L., Hou, X., Yang, B. F., & Ai, J. (2014). Expression of amyloid-associated miRNAs in both the forebrain cortex and hippocampus of middle-aged rat. *Cellular physiology and*

- biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 33(1), 11–22. <https://doi.org/10.1159/000356646>
185. Erdal, M. E., Yılmaz, S. G., Gürgül, S., Uzun, C., Dericci, D., & Erdal, N. (2018). miRNA expression profile is altered differentially in the rat brain compared to blood after experimental exposure to 50 Hz and 1 mT electromagnetic field. *Progress in biophysics and molecular biology*, 132, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.08.001>
186. Femminella, G. D., Ferrara, N., & Rengo, G. (2015). The emerging role of microRNAs in Alzheimer's disease. *Frontiers in physiology*, 6, 40. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00040>
187. Kim, J., Yoon, H., Ramírez, C. M., Lee, S. M., Hoe, H. S., Fernández-Hernando, C., & Kim, J. (2012). MiR-106b impairs cholesterol efflux and increases A β levels by repressing ABCA1 expression. *Experimental neurology*, 235(2), 476–483. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.11.010>
188. Wang, W., Kwon, E. J., & Tsai, L. H. (2012). MicroRNAs in learning, memory, and neurological diseases. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 19(9), 359–368. <https://doi.org/10.1101/lm.026492.112>
189. Liu, H., Han, X. H., Chen, H., Zheng, C. X., Yang, Y., & Huang, X. L. (2015). Repetitive magnetic stimulation promotes neural stem cells proliferation by upregulating MiR-106b in vitro. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao. Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao. Yixue Yingdewen ban*, 35(5), 766–772. <https://doi.org/10.1007/s11596-015-1505-3>
190. Prasad K. N. (2017). Oxidative stress and pro-inflammatory cytokines may act as one of the signals for regulating microRNAs expression in Alzheimer's disease. *Mechanisms of ageing and development*, 162, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2016.12.003>
191. Wang, H., Liu, J., Zong, Y., Xu, Y., Deng, W., Zhu, H., Liu, Y., Ma, C., Huang, L., Zhang, L., & Qin, C. (2010). miR-106b aberrantly expressed in a double transgenic mouse model for Alzheimer's disease targets TGF- β type II receptor. *Brain research*, 1357, 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.08.023>
192. Schlörmann, W., Naumann, S., Renner, C., & Gleib, M. (2015). Influence of miRNA-106b and miRNA-135a on butyrate-regulated expression of p21 and Cyclin D2 in human colon adenoma cells. *Genes & nutrition*, 10(6), 50. <https://doi.org/10.1007/s12263-015-0500-4>
193. Zhao, Z. N., Bai, J. X., Zhou, Q., Yan, B., Qin, W. W., Jia, L. T., Meng, Y. L., Jin, B. Q., Yao, L. B., Wang, T., & Yang, A. G. (2012). TSA suppresses miR-106b-93-25 cluster expression through downregulation of MYC and inhibits proliferation and induces apoptosis in human EMC. *PloS one*, 7(9), e45133. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045133>
194. Puri, P. L., Balsano, C., Burgio, V. L., Chirillo, P., Natoli, G., Ricci, L., Mattei, E., Graessmann, A., & Levrero, M. (1997). MyoD prevents cyclinA/cdk2 containing E2F complexes formation in terminally differentiated myocytes. *Oncogene*, 14(10), 1171–1184. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1200941>
195. von Harsdorf, R., Hauck, L., Mehrhof, F., Wegenka, U., Cardoso, M. C., & Dietz, R. (1999). E2F-1 overexpression in cardiomyocytes induces downregulation of p21CIP1 and p27KIP1 and release of active cyclin-dependent kinases in the presence of

- insulin-like growth factor I. *Circulation research*, 85(2), 128–136. <https://doi.org/10.1161/01.res.85.2.128>
196. Nishioka, S., Nakano, D., Kitada, K., Sofue, T., Ohsaki, H., Moriwaki, K., Hara, T., Ohmori, K., Kohno, M., & Nishiyama, A. (2014). The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 is essential for the beneficial effects of renal ischemic preconditioning on renal ischemia/reperfusion injury in mice. *Kidney international*, 85(4), 871–879. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.496>
197. Lange, C., Huttner, W. B., & Calegari, F. (2009). Cdk4/cyclinD1 overexpression in neural stem cells shortens G1, delays neurogenesis, and promotes the generation and expansion of basal progenitors. *Cell stem cell*, 5(3), 320–331. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.026>
198. Lim, S., & Kaldis, P. (2012). Loss of Cdk2 and Cdk4 induces a switch from proliferation to differentiation in neural stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 30(7), 1509–1520. <https://doi.org/10.1002/stem.1114>
199. Smith, A. L., Iwanaga, R., Drasin, D. J., Micalizzi, D. S., Vartuli, R. L., Tan, A. C., & Ford, H. L. (2012). The miR-106b-25 cluster targets Smad7, activates TGF- β signaling, and induces EMT and tumor initiating cell characteristics downstream of Six1 in human breast cancer. *Oncogene*, 31(50), 5162–5171. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.11>