

GENÓMICA APLICADA EN LA ENFERMEDAD VASCULAR CEREBRAL

Hugo Sánchez Hernández¹, Alma Ortiz Plata², Iris A. Nava Jiménez³, Febe E. Cázares Raga⁴, Álvaro Hernández-Hernández⁵, Fidel de la Cruz Hernández-Hernández⁶

RESUMEN

La enfermedad vascular cerebral (EVC) involucra alteraciones producidas por procesos patológicos de los vasos sanguíneos. La EVC, es la tercera causa de mortalidad en el mundo y de mayor prevalencia. La EVC induce cambios en la expresión genética en la unidad neurovascular, ocasionando cambios inmediatos y notables en el estrés oxidante y en la entrada de calcio a las células, ocasionando la activación de vías de señalización en respuesta al daño, donde intervienen proteínas que actúan como intermediarios y ocasionando la activación de genes de expresión temprana como proto-oncogenes y distintos factores de transcripción. Es importante conocer la relación entre los cambios de la expresión genética en los distintos tipos de células de la unidad neurovascular y la consecuencia durante el proceso de daño y/o recuperación cerebral. Este conocimiento permite diagnosticar el nivel de gravedad y proponer mecanismos terapéuticos para moderar o evitar los efectos adversos ocasionados por la EVC.

Palabras clave: Enfermedad vascular cerebral, Expresión genética, Angiogénesis, neurovascular.

Enfermedad vascular cerebral

La Enfermedad Vascular Cerebral (EVC) es cualquier alteración en el cerebro producida por un proceso patológico de los vasos sanguíneos (1). El término clínico del latín "ictus" que significa "golpe", se aplica a todas estas patologías, especialmente cuando los síntomas empiezan de forma súbita y aguda (2). Según su naturaleza, la EVC puede ser una deficiencia en la irrigación causada por trombosis o embolia (isquemias), también conocida de forma general como enfermedad cerebrovascular isquémica o bien, como enfermedad cerebral hemorrágica, ya sea ocasionada en el parénquima o en el interior de los ventrículos cerebrales (hemorragia cerebral), o en el espacio subaracnoideo (hemorragia subaracnoidea), con una proporción en torno al 85% y 15% respectivamente (2, 3, 4). La EVC es la tercera causa de mortalidad en el mundo (5) y en el caso de México, se colocó en este mismo lugar recientemente (6), solo tras la enfermedad cardíaca y el cáncer. Además, es la patología neurológica con mayor prevalencia y una de las primeras causas de discapacidad a nivel mundial (7, 8).

¹ Sánchez Hernández Hugo. Profesor Investigador del Programa Educativo de Ingeniería en Biotecnología. Universidad Politécnica de Quintana Roo. Avenida Arco Bicentenario, SM 255, M11, Lote 1119-33. C.P.77519. Benito Juárez, Quintana Roo. México. Correo: hugo.sanchez@upqroo.edu.mx (Autor corresponsal).

2) Ortiz Plata Alma. Investigadora en Ciencias Médicas del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez. Av. Insurgentes Sur 3877, Col. La Fama, Delegación Tlalpan, Ciudad de México. Código postal 14269. Correo: aortizplata@yahoo.com.mx

3) Nava Jiménez Iris A. Directora del Programa Educativo de Ingeniería en Biotecnología. Universidad Politécnica de Quintana Roo. Avenida Arco Bicentenario, SM 255, M11, Lote 1119-33. C.P.77519. Benito Juárez, Quintana Roo. México. Correo: inava@upqroo.edu.mx

4) Febe E. Cázares Raga. Profesor investigador del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Delegación Gustavo A. Madero, Ciudad de México. Código Postal 07360. Correo: fczares@cinvestav.mx

5) Hernández-Hernández Álvaro, Estudiante del Programa Educativo de Ingeniería en Biotecnología. Universidad Politécnica de Quintana Roo. Avenida Arco Bicentenario, SM 255, M11, Lote 1119-33. C.P.77519. Benito Juárez, Quintana Roo. México. Correo: alvaro.h200495@gmail.com

6) Hernández-Hernández Fidel de la Cruz. Profesor Investigador del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Delegación Gustavo A. Madero, Ciudad de México. Código Postal 07360. Correo: cruzcruz@cinvestav.mx

Isquemia cerebral

En la enfermedad cerebrovascular isquémica se produce la disminución de la disponibilidad de glucosa y oxígeno en el tejido cerebral. Ésta puede ser en todo el órgano, conocida como isquemia cerebral global o en puntos localizados conocida como isquemia cerebral focal o multifocal si existen varios puntos. En el caso de la isquemia cerebral focal, dependiendo de la duración del proceso isquémico, puede surgir solo como un ataque isquémico transitorio (2 a 15 min) o como infarto cerebral donde ya existe muerte celular y restauración del flujo sanguíneo dentro de las primeras 24h después del evento. La recuperación de la circulación sanguínea posterior al ataque isquémico es denominada reperfusión sanguínea, la cual, en algunos casos, agrava el daño, debido a que las células han iniciado los mecanismos necesarios para la adaptación ante la hipoxia y no soportan el cambio brusco del restablecimiento de oxígeno, aumentando la formación de especies reactivas de oxígeno y el estrés oxidante originado en la zona.

Con el cese del flujo sanguíneo se altera el equilibrio regulado entre los componentes de la unidad neurovascular, y a nivel celular, se desencadenan principalmente la excitotoxicidad, el estrés oxidante, la inflamación, la señalización intracelular y la muerte neuronal (10, 11). Todos estos eventos provocan cambios directa e indirectamente en la expresión de genes y en la mayoría de los casos como consecuencia, en la expresión de proteínas (12, 13).

Genética en la isquemia cerebral

La EVC induce cambios en la expresión de genes relacionados con la reparación y recuperación celular (14). Bajo condiciones de isquemia, el metabolismo energético falla y ocurre una severa reducción en los niveles de mRNA en el foco isquémico (12, 15). En contraparte, se activan los genes de expresión temprana que favorecen la supervivencia neuronal como c-fos, c-jun, jun-B, jun-D, krox-20, zif268 y homer 1a (16-20), los cuales disparan la expresión de otros genes a través de la proteína-1 y del elemento de respuesta al AMPc principalmente, para que posteriormente se expresen las proteínas HSP70 (Proteína de choque térmico 70, por sus siglas en inglés *heat shock protein*) y varias citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF α), interleucina 1 β (IL1 β), interleucina 6 (IL6) y el péptido quimiotáctico 1 del monocito (10, 21, 22). Estas citocinas inducen la expresión de moléculas de adhesión como la molécula de adhesión intercelular 1, molécula de adhesión al endotelio del leucocito 1 y la P-secretina en la vascularización cerebral, la cual inicia la reacción inflamatoria. Como consecuencia a esta reacción, también cambia la expresión de genes en distintos compartimentos como la fosfodiesterasa 4D (PDE4D) que aumenta en células mononucleares de sangre periférica (23). Las citocinas también activan la expresión de otros genes relacionados con la inflamación como la sintetasa de óxido nítrico inducible y la ciclooxigenasa 2. Con respecto al óxido nítrico, éste ha sido relacionado con los mecanismos de neuroprotección precondicionados por la expresión de un nuevo gen identificado como un posible factor de neurogénesis, Idua (diosa de la protección y juventud eterna), denominado así por los efectos protectores que ocasiona al expresarse (19).

Con la isquemia cerebral se activan también genes relacionados con la apoptosis como p53 y bax (17), factores proapoptóticos como los de necrosis tumoral Fas y Apo-2L, el receptor de muerte TR3, el factor nuclear κ B (NF κ B) y los genes ligados a la apoptosis 2 (ALG2) y Pip92 (24, 25). En este proceso también se ha detectado la expresión de factores antiapoptóticos como la proteína Bcl, el factor de crecimiento tumoral β_1 (TGF- β_1), el factor de crecimiento y transformación α (TGF α), la eritropoyetina y el factor de crecimiento asociado a la insulina. La capacidad de una neurona de expresar uno u otro de estos factores está relacionada con su vulnerabilidad específica a la isquemia y a la muerte necrótica o apoptótica (24).

Estudios de la enfermedad vascular cerebral con microarreglos

Recientemente, en diferentes modelos experimentales de isquemia cerebral, se han realizado estudios de expresión de genes de forma masiva con microarreglos (15, 28-31). En un estudio se usaron células de corteza cerebral de ratón cultivadas *in vitro*, sometidas a hipoxia durante 24 h y se analizó la expresión de 11, 200 genes, de los cuales 1, 405 cambiaron sus niveles de expresión (12.5%), de los cuales 26 se indujeron y 20 se dejaron de expresar, entre los primeros se encuentran varios que codifican para proteínas involucradas en el proceso de muerte celular, debido a la vulnerabilidad que presentan las neuronas ante la hipoxia. De otros genes en los que se vio modificada su expresión, tienen funciones en el transporte de proteínas en el retículo endoplásmico por el cambio que se presenta en la síntesis de proteínas ante la isquemia. También cambiaron genes que codifican para proteínas involucradas en vías de ubiquitinación; para su degradación o para la activación de vías de señalización. Por último, se encontraron además cambios en la expresión de genes que codifican proteínas que se inducen bajo condiciones de hipoxia en sistemas no neuronales, algunos involucrados en la neuroprotección y otros al daño del tejido isquémico indirectamente (32).

También se han realizado estudios de microarreglos con distintos periodos de hipoxia e isquemia neonatal en ratones (4, 20). En total se observaron 343 genes expresados de forma diferencial en la corteza, hipocampo, tálamo y estriado, de los cuales 283 genes aumentaron su expresión y 60 la disminuyeron. Entre los que aumentaron de forma significativa, fueron genes que codifican para factores de transcripción y genes relacionados con el metabolismo intermediario, mientras que los que disminuyeron su expresión fueron genes que codifican para transportadores iónicos y vesiculares, de transmisión sináptica y neurotransmisores, seguidos de los genes involucrados en señalización celular. Cabe mencionar que los genes expresados tempranamente después del daño isquémico están involucrados en la transcripción y apoptosis, haciéndolos de principal interés como blancos terapéuticos en la EVC (33).

En un modelo de neuronas obtenidas de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo sometidas a estrés oxidante, se realizó un estudio de microarreglos. Los resultados mostraron que la región CA1 exhibió una mayor actividad transcripcional en respuesta al estrés oxidante, a la inflamación, a los transportadores de metales, a la ferroxidasa y a la actividad de señalización pre-sináptica. Mientras que la región CA3 mostró mayor actividad transcripcional para los canales de potasio y calcio. Evidenciando que cada región cerebral, responde de forma diferente bajo la misma condición isquémica y que dependiendo de su vulnerabilidad resultará o no dañada (34). En el año 2007 Mitsios (35) con esta tecnología, estudió la expresión de genes en cerebros de rata con 1h de oclusión arterial y varios días de reperfusión sanguínea (1h a 21 días) y en humanos con 6h de muerte y de 2 a 37 días de supervivencia (reperfusión), encontrando disminución de la expresión de 335 genes en rata y 126 genes en humano; 393 genes coincidieron en el cambio de expresión en ambos casos. Mientras que, 184 genes cambiaron su expresión sólo en la rata, 36 sólo en el humano y 41 genes disminuyeron su expresión en ambos casos, mostrándonos este estudio un análisis cualitativo y cuantitativo entre los modelos experimentales utilizados.

Se ha observado que los genes con cambio de expresión en el proceso isquémico están involucrados en la transcripción, apoptosis, inflamación y en la neuroprotección (11, 31, 36). Algunos de los más representativos se muestran en la tabla 1. Mitsios (31) analizó 13 reportes, en donde se aplicó la tecnología de los microarreglos para el estudio del *ictus*. Estos estudios se realizaron en el modelo de isquemia en rata, en sangre de pacientes y en tejido cerebral *post mortem*, permitiendo una comparación analógica para predecir, la probabilidad de que dicho fenómeno ocurra, en un porcentaje cercano al humano, validando también así los modelos animales de estudio de la EVC.

Genes	Tiempo de reperfusión sanguínea	
	Rata	Humano(días)
HSP70 ^a	1h- 24 h	2-6
Transportador de glucosa I ^b	4 h- 21 días	26-37
Acuaporina 4 ^b	3 días	9-20
Traductor de señal y activador de la transcripción 3 ^b	4 h- 3 días	9-20
Interleucina 10 ^c	21 días	2-20 y de 26-37
Matriz metaloproteinasas 14	24 h- 3 días	2-6

Factor beta de maduración de la glía	21 días	2-6
Protooncogen c-jun	1 h -24 h	9-20

Tabla 1. Genes que disminuyen su expresión en la rata y en el humano, bajo distintas condiciones de isquemia cerebral y reperfusion sanguínea. Se señala la función de algunas proteínas para las que codifican: de estrés (a), para receptores, transportadores y canales (b), y los involucrados en respuesta inmune (c). Modificada de Mitsios, 2007 (49).

Con la tecnología de microarreglos se han analizado alrededor de 115, 347 genes con distintos tiempos de isquemia con y sin reperfusion sanguínea. En estos estudios se seleccionaron alrededor de 28 moléculas para ser estudiadas de forma más detallada, y en todos los casos se confirmó el cambio de expresión de los genes y su localización con hibridación *in situ*. Con respecto a las proteínas que codificaban, se analizaron con diferentes técnicas como, western blot, inmunohistoquímica, RT-PCR, inmunofluorescencia, northern blot, entre otras para caracterizar y encontrar la función que desempeñan estas moléculas frente a distintas condiciones experimentales de isquemia, hipoxia y reperfusion sanguínea (9, 35).

Recientemente, se analizó mediante microarreglos el cambio de la expresión genética en el cerebro anterior y posterior de ratones, observando que los cambios en dicha expresión se intensifican después de 3h de hipoxia y después de 1h de reoxigenación. Los genes que aumentaron su expresión fueron los de respuesta a la hipoxia en el cerebro posterior, y estos mismos genes disminuyeron en el cerebro anterior. En el caso específico del cerebelo 1241 transcritos fueron regulados por hipoxia, de los cuales 642 tienen por lo menos un sitio de unión al receptor nuclear hepático 4A (HNF4A) y 381 tienen por lo menos dos sitios de unión a este mismo factor en sus promotores, indicando que HNF4A es el principal factor de transcripción de respuesta a la hipoxia en el cerebelo (37), además se sabe que este factor regula la expresión de la eritropoyetina de la cual ya se ha comprobado su efecto neuroprotector ante el daño isquémico (38). Las diferencias de expresión de los genes de respuesta a la hipoxia en el cerebro anterior y posterior podrían relacionar la supresión de las funciones cognitivas del cerebro anterior y la activación de las funciones de sobrevivencia del cerebro posterior (37).

Genómica de la angiogénesis en la isquemia cerebral

La angiogénesis es un mecanismo por el cual se generan nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes (36, 39). La isquemia cerebral es capaz de inducir angiogénesis dentro de la primera hora en que se presenta. Los nuevos vasos formados proporcionarán el soporte trófico para las nuevas neuronas generadas (40) y su inducción podría formar parte del tratamiento de pacientes que han sufrido un *ictus* (41). Por lo tanto, surge la importancia de estudiar los genes que cambian su expresión para inducir o inhibir la angiogénesis (36), conocer su regulación y los productos funcionales de estos (42, 43). La malformación de vasos nuevos, junto con la vulnerabilidad por el daño isquémico de los preexistentes podría ocasionar una hemorragia cerebral agravando el daño, esto dependerá directamente del tiempo que transcurra a partir del evento isquémico y del inicio del tratamiento (39, 44).

Después de la isquemia cerebral, se activa la expresión de múltiples genes relacionados con la angiogénesis (44-45). Esta activación se ha demostrado en cerebros de ratón con 1h de isquemia donde 42 genes relacionados con la angiogénesis aumentan su expresión, de los cuales 29 mantienen elevada su expresión hasta las 24h, además 13 permanecen activados hasta los 21 días tras la isquemia (44) desencadenando la formación de nuevos vasos sanguíneos (36).

La inducción terapéutica de la angiogénesis de los pacientes que han sufrido un ictus podría realizarse mediante factores de crecimiento relacionados, tratamiento con células madre o fármacos de diseño específico (27, 36, 42, 46). En cualquiera de los casos, la estimulación de la angiogénesis puede ser el inicio de una neurogénesis eficaz (42, 47), pero a su vez se debe evitar una estimulación intensa y precoz, ya que se puede generar vasos sanguíneos estructurados anormalmente favoreciendo la aparición o empeoramiento de un edema cerebral, así como hemorragias en áreas ya dañadas (39, 44).

CONCLUSIONES

La respuesta del tejido ante el evento isquémico dependerá de la gravedad del daño inmediato, del tiempo que transcurra a partir del surgimiento de la hipoxia, del tipo celular (siendo las neuronas las células más vulnerables a los procesos de hipoxia/isquemia) y también dependerá de los estímulos que reciba directa o indirectamente de otras regiones cerebrales con diferente intensidad de daño, o bien, de regiones cerebrales sanas. Todos estos factores provocarán que se exprese solo una parte correspondiente del genoma, según el rol que sea necesario desempeñar ante el fenómeno isquémico por las células, traducándose o no los genes a proteínas. Por otro lado, durante el ictus

se expresan genes neuroprotectores para resistir el daño isquémico e inducir la reparación celular, y, por otra parte, se expresan genes que eliminan estructuras celulares dañadas o toda la célula para evitar la reacción en cadena de muerte celular. Actualmente se han descrito una diversidad de mecanismos moleculares desencadenados por la hipoxia/isquemia, entre ellos la expresión genética (27), dando lugar de esta manera a la era postgenómica, donde es importante complementar el conocimiento de los cambios de expresión genética (43) ante la EVC para poderlo correlacionar con la proteómica funcional proponiendo futuras aproximaciones terapéuticas y mejorar los tratamientos de esta enfermedad multifactorial.

BIBLIOGRAFÍA

1. Haqqani AS, Kelly J, Baumann E, Haseloff RF, Blasig IE, Stanimirovic DB. Protein markers of ischemic insult in brain endothelial cells identified using 2D gel electrophoresis and ICAT-based quantitative proteomics. *J Proteome Res.* 2007 Jan; 6(1):226-39. doi: 10.1021/pr0603811
2. Díez-Tejedor E, Del Brutto O, Álvarez Sabin J, Muñoz M, Abiusi G. Classification of the cerebrovascular diseases. *Iberoamerican Cerebrovascular diseases Society. Rev Neurol* 2001; 33 (5): 455-464.
3. Vinay Kumar, Jon C. Aster, Abul K. Robbins y Cotran, Et. Al. *Patología estructural y funcional.* España. 8ª edición. 2005. Elsevier.
4. Ruigrok YM, Slooter AJC, Rinkel GJE, Wijmenga C, Rosendaal FR. Genes influencing coagulation and the risk of aneurysmal subarachnoid hemorrhage, and subsequent complications of secondary cerebral ischemia and rebleeding. *Acta Neurochir (Wien)* 2010 February; 152(2): 257-262. doi: 10.1007/s00701-009-0505-0.
5. Organización Mundial de la Salud (OMS). Datos y Estadísticas; Porcentajes de muertes al año alrededor del mundo 2004. URL: <http://www.who.int/es/> [03.02.2017].
6. Dirección General de Información en Salud de México. URL: <http://www.conapo.gob.mx/es/CONAPO/Mortalidad> [03.02.2017]
7. Markus HS. Unravelling the Genetics of Ischaemic Stroke. *PLoS Med.* 2010 March; 7(3): e1000225. doi: 10.1371/journal.pmed.1000225.
8. Titov BV, Marveeva NA, Marynov MY, Favorova OO. Ischemic stroke as a complex polygenic disease. *Mol Biol (Mosk).* 2015 Mar-Apr; 49(2):224-48. Review. Russian. doi:10.1134/S0026893315020120.
9. Badr R, Hashemi M, Javadi G, Movafagh A, Mahdian R. Gene Expression Profiles of BAD and Bcl-xL in the CA1 Region of the Hippocampus Following Global Ischemic/Reperfusion and FK-506 Administration. *Iran Red Crescent Med J.* 2015 Dec 26; 17 (12):e23145. doi: 10.5812/ircmj.23145.
10. Zhan X, Ander BP, Jickling G, Turner R, Stamova B, Xu H, Liu D, Davis RR, Sharp FR. Brief focal cerebral ischemia that simulates transient ischemic attacks in humans regulates gene expression in rat peripheral blood. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010 January; 30(1): 110-118. doi: 10.1038/jcbfm.2009.189
11. Lou Z, Wang AP, Duan XM, Hu GH, Song GL, Zuo ML, Yang ZB. Upregulation of NOX2 and NOX4 Mediated by TGF- β Signaling Pathway Exacerbates Cerebral Ischemia/Reperfusion Oxidative Stress Injury. *Cell Physiol Biochem.* 2018 Apr 28;46(5):2103-2113. doi: 10.1159/000489450.
12. Keum S, Douglas A, Marchuk A. Locus Mapping to Mouse Chromosome 7 Determines Infarct Volume in a Mouse Model of Ischemic Stroke. *Circ Cardiovasc Genet.* 2009 December; 2 (6). doi: 10.1161/CIRCGENETICS.109.883231
13. Ayuso MI, García-Bonilla L, Martín ME, Salinas M. Assessment of protein expression levels after transient global cerebral ischemia using an antibody microarray analysis. *Neurochem Res.* 2010 Aug; 35(8):1239-47. doi: 10.1007/s11064-010-0180-9.
14. Zhang H, Prabhakar P, Sealock R, Faber JE. Wide genetic variation in the native pial collateral circulation is a major, determinant of variation in severity of stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010 May; 30(5): 923-934. doi: 10.1038/jcbfm.2010.10
15. Liu C, Zhao L, Han S, Li J, Li D. Identification and Functional Analysis of MicroRNAs in Mice following Focal Cerebral Ischemia Injury. *Int J Mol Sci.* 2015. Oct 14; 16(10):24302-18. doi: 10.3390/ijms161024302.
16. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev.* 1999. Oct; 79(4):1431-568. doi: 10.1152/physrev.1999.79.4.1431
17. Yokota N, Uchijima M, Nishizawa S, Namba H, Koide Y. Identification of differentially expressed genes in rat hippocampus after transient global cerebral ischemia using subtractive cDNA cloning based on polymerase chain reaction. *Stroke.* 2001 Jan; 32(1):168-74. doi:10.1161/01.STR.32.1.168.
18. Montaner Villalonga, Joan. *Avances en patología Neurovascular.* In: Fisiopatología de la isquemia cerebral. España Marge Medica Books; 2007. p. 13-65
19. Rubio Donnadiou F. Efectos del óxido nítrico en el sistema nervioso central. *Gac Méd Méx.* 2007. Vol. 143 No. 5.
20. Koerner IP, Gattling M, Noppens R, Kempinski O, Brambrink AM. Induction of cerebral ischemic tolerance by erythromycin preconditioning reprograms the transcriptional response to ischemia and suppresses inflammation. *Anesthesiology.* 2007 Mar; 106(3):538-47.
21. Dharap A, Bowen K, Place R, Li LC, Vemuganti R. Transient focal ischemia induces extensive temporal changes in rat cerebral microRNAome. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009 Apr; 29(4):675-87. doi: 10.1038/jcbfm.2008.157.
22. Ducruet AF, Gigante PR, Hickman ZL, Zacharia BE, Arias EJ, Grobelny BT, Gorski JW, Mayer SA, Connolly ES. Genetic determinants of cerebral vasospasm, delayed cerebral ischemia, and outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010 April; 30(4): 676-688.25. doi: 10.1038/jcbfm.2009.278.
23. Grond-Ginsbach C, Hummel M, Wiest T, Horstmann S, Pfeleger K, Hergenahn M, Hollstein M, Mansmann U, Grau AJ, Wagner S. Gene expression in human peripheral blood mononuclear cells upon acute ischemic stroke. *J Neurol.* 2008. May; 255(5):723-31. doi: 10.1007/s00415-008-0784-z.
24. Arango-Dávila C, Escobar-Betencourt M., Cardona-Gómez G.P., Pimienta-Jiménez H. Pathophysiology of focal cerebral ischemia: fundamental aspects and its projection on clinical practice. *Rev Neurol.* 2004. 39:156-165.
25. Schneider A, Fischer A, Weber D, von Ahnen O, Scheek S, Krüger C, Rossner M, Klausner B, Faucheron N, Kammandel B, Goetz B, Herrmann O, Bach A, Schwanninger M. Restriction-mediated differential display (RMDD) identifies pip92 as a pro-apoptotic gene product induced during focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004 Feb; 24(2):224-36 doi: 10.1097/01.WCB.0000104960.26014.7A.
26. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 1989 Jan; 20(1):84-91. doi: 10.1161/01.STR.20.1.84.
27. Min XL, Wang TY, Cao Y, Liu J, Li JT, Wang TH. MicroRNAs: a novel promising therapeutic target for cerebral ischemia/reperfusion injury? *Neural Regen Res.* 2015 Nov; 10(11):1799-808. doi: 10.4103/1673-5374.170302.
28. Jin K, Mao XO, Eshoo MW, Nagayama T, Minami M, Simon RP, Greenberg DA. Microarray analysis of hippocampal gene expression in global cerebral ischemia. *Ann Neurol.* 2001 Jul; 50(1):93-103. doi.org/10.1002/ana.1073.

29. Schmidt-Kastner R, Zhang B, Belayev L, Khoutorova L, Amin R, Busto R, Ginsberg MD. DNA microarray analysis of cortical gene expression during early recirculation after focal brain ischemia in rat. *Brain Res Mol Brain Res*. 2002; Dec; 108(1-2):81-93. doi.org/10.1016/S0169-328X(02)00516-8.
30. Tang Y, Lu A, Aronow BJ, Wagner KR, Sharp FR. Genomic responses of the brain to ischemic stroke, intracerebral haemorrhage, kainate seizures, hypoglycemia, and hypoxia. *Eur J Neurosci*. 2002 Jun; 15(12):1937-52. doi: 10.1046/j.1460-9568.2002.02030.x.
31. White RE, Palm C., Xu L, Ling E, Ginsburg M., Daigle BJ, Han JR, Patterson A., Altman RB., Giffard RG. Mice lacking the μ_2 adrenergic receptor have a unique genetic profile before and after focal brain ischaemia. *ASN Neuro*. 2012. Sep; 4(5). doi: 10.1042/AN20110020.
32. Jin K, Mao XO, Eshoo MW, del Rio G, Rao R, Chen D, Simon RP, Greenberg DA. cDNA microarray analysis of changes in gene expression induced by neuronal hypoxia in vitro. *Neurochem Res*. 2002 Oct; 27(10):1105-12.
33. Hedtjäm M, Mallard C, Eklind S, Gustafson-Brywe K, Hagberg H. Global gene expression in the immature brain after hypoxia-ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004 Dec; 24(12):1317-32. doi: 10.1097/01.WCB.0000141558.40491.75.
34. Wang X, Pal R, Chen XW, Kumar KN, Kim OJ, Michaelis EK. Genome-Wide Transcriptome Profiling of Region-Specific Vulnerability to Oxidative Stress in the Hippocampus. *Genomics*. 2007 August; 90 (2): 201-212. doi: 10.1016/j.ygeno.2007.03.007.
35. Mitsios N, Saka M, Krupinski J, Pennucci R, Sanfeliu C, Wang Q, Rubio F, Gaffney J, Kumar P, Kumar S, Sullivan M, Slevin M. A microarray study of gene and protein regulation in human and rat brain following middle cerebral artery occlusion. *BMC Neurosci*. 2007 Nov 12; 8: 93. doi: 10.1186/1471-2202-8-93.
36. Soufi-Zomorrod M, Hajifathali A, Kouhkan F, Mehdizadeh M, Rad SM, Soleimani M. MicroRNAs modulating angiogenesis: miR-129-1 and miR-133 act as angio-miR in HUVECs. *Tumour Biol*. 2016 Jan 20. doi: 10.1007/s13277-016-4845-0.
37. Xu H, Lu A, Sharp FR. Regional genome transcriptional response of adult mouse brain to hypoxia. *BMC Genomics*. 2011 Oct 11; 12: 499. doi:10.1186/1471-2164-12-499.
38. Meloni B, P., Tilbrook, P. A., Boulos, S., Arthur, P. G. and Knuckey, N. W. Erythropoietin preconditioning in neuronal cultures: Signaling, protection from in vitro ischemia, and proteomic analysis. *J. Neurosci. Res*. 2006. 83: 584-593. doi: 10.1002/jnr.20755.
39. Jih YJ, Lien WH, Tsai WC, Yang GW, Li C, Wu LW. Distinct regulation of genes by bFGF and VEGF-A in endothelial cells. *Angiogenesis*. 2001; 4(4):313-21.
40. Hayashi T, Noshita N, Sugawara T, Chan PH. Temporal profile of angiogenesis and expression of related genes in the brain after ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23: 166-80.
41. Li L, Liu F, Welser-Alves JV, McCullough LD, Milner R. Upregulation of fibronectin and the $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ integrins on blood vessels within the cerebral ischemic penumbra. *Exp Neurol*. 2012 Jan; 233(1):283-91. doi:10.1016/j.expneurol.2011.10.017.
42. Kubo M, Li TS, Kurazumi H, Takemoto Y, Ohshima M, Yamamoto Y, Nishimoto A, Mikamo A, Fujimoto M, Nakai A, Hamano K. Heat Shock Factor 1 Contributes to Ischemia-Induced Angiogenesis by Regulating the Mobilization and Recruitment of Bone Marrow Stem/Progenitor Cells. *PLoS One*. 2012. May; 7(5). doi:10.1371/journal.pone.0037934.
43. Simon RP. Epigenetic modulation of gene expression governs the brain's response to injury. *Neurosci Lett*. 2015 Dec 28. doi:10.1016/j.neulet.2015.12.024.
44. Brea D, Sobrino T, Ramos-Cabrer P, Castillo J. Reorganization of the cerebral vasculature following ischaemia. *Rev Neurol* 2009; 49: 645-54.
45. Mărgăriteșcu O, Pirici D, Mărgăriteșcu C. VEGF expression in human brain tissue after acute ischemic stroke. *Rom J Morphol Embryol*. 2011; 52(4):1283-92.
46. Chu M, Hu X, Lu S, Gan Y, Li P, Guo Y, Zhang J, Chen J, Gao Y. Focal cerebral ischemia activates neurovascular restorative dynamics in mouse brain. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012 Jan 1; 4: 1926-36.
47. Li WL, Fraser JL, Yu SP, Zhu J, Jiang YJ, Wei L. The role of VEGF/VEGFR2 signaling in peripheral stimulation-induced cerebral neurovascular regeneration after ischemic stroke in mice. *Exp Brain Res*. 2011 Oct; 214(4):503-13. doi:10.1007/s00221-011-2849-y.