

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

REGULACIÓN EPIGENÓMICA DE ASTROCITOS EN RESPUESTA A HIPOXIA Y RECUPERACIÓN

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO

PRESENTA

ALFREDO ISAAC PONCE ARIAS

DIRECTOR DE TESIS: LUIS B. TOVAR Y ROMO

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, MÉXICO, NOVIEMBRE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice

Resumen	I
Reconocimientos oficiales	II
Agradecimientos	III
Abreviaturas	IV
1. Introducción	1
1.1 <i>Características generales de las modificaciones epigenéticas; el caso de la metilación del DNA</i>	1
1.2 <i>Regulación de la expresión genética mediada por la metilación del DNA</i>	2
1.3 <i>Fisiopatología de la isquemia cerebral</i>	4
1.4 <i>La importancia de los astrocitos en condiciones fisiológicas y en la isquemia cerebral</i>	6
2. Antecedentes	8
2.1 <i>La metilación del DNA en enfermedades neurodegenerativas</i>	8
2.1.1 <i>Enfermedad de Alzheimer</i>	8
2.1.2 <i>Lesiones en médula espinal y sistema nervioso periférico</i>	9
2.1.3 <i>Enfermedad de Parkinson</i>	11
2.1.4 <i>Esclerosis múltiple</i>	12
2.1.5 <i>Depresión y esquizofrenia</i>	13
2.2 <i>La metilación del DNA en la isquemia cerebral</i>	15
2.2.1 <i>Evidencias clínicas</i>	15
2.2.2 <i>Evidencias experimentales in vivo e in vitro</i>	17
2.2.3 <i>La metilación del DNA de astrocitos en la isquemia cerebral</i>	19
3. Objetivo	20
3.1 <i>Objetivos particulares</i>	20
4. Material y métodos	21
4.1 <i>Células y condiciones experimentales</i>	21

4.2	<i>Western blot</i>	22
4.3	<i>Inmunofluorescencia</i>	22
4.4	<i>Ensayo de viabilidad LIVE-DEAD</i>	22
4.5	<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	23
4.6	<i>Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa en tiempo real (RT-qPCR)</i>	25
4.7	<i>Extracción y secuenciación de RNA (RNA-seq)</i>	26
4.8	<i>Análisis de RNA-seq</i>	27
4.9	<i>Precipitación de DNA metilado y secuenciación (MeDIP-seq)</i>	27
4.10	<i>Análisis de MeDIP-seq</i>	29
5.	Resultados	30
5.1	<i>Inducción de la privación de oxígeno y glucosa en células astrocíticas</i>	30
5.2	<i>Cambios en la expresión genética</i>	33
5.3	<i>Cambios en la metilación del DNA</i>	41
5.4	<i>Correlación entre expresión genética y metilación del DNA</i>	45
5.5	<i>Vías de señalización y procesos celulares regulados diferencialmente</i>	48
6.	Discusión y conclusión	52
6.1	<i>El papel de los astrocitos en la fisiopatología de la isquemia cerebral</i>	52
6.1.1	<i>Los transportadores de la familia SLC</i>	52
6.1.2	<i>Genes reguladores de la sobrevivencia y muerte celular</i>	55
6.1.3	<i>Fosfatasa de especificidad dual y MAP cinasas</i>	58
6.1.4	<i>Genes involucrados en la producción de ROS y el sistema antioxidante</i>	59
6.1.5	<i>Genes reguladores de la metilación del DNA</i>	60
6.1.6	<i>Regulación metabólica en respuesta a OGD y recuperación</i>	61
6.2	<i>Conclusiones y perspectivas</i>	63
7.	Bibliografía	64

Resumen

La regulación de la expresión genética es de primordial importancia en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas y actualmente existen evidencias científicas que indican de qué manera la neurodegeneración crónica es modulada por factores epigenéticos. Sin embargo, en el caso de daños agudos del sistema nervioso central, como el infarto cerebral isquémico, la regulación de la expresión genética no está tan bien entendida. Los cambios súbitos en el medio vascular y celular contribuyen a la modificación de las respuestas endógenas que pueden permitirle al sistema tener respuestas adaptativas. Los mecanismos epigenéticos como la metilación del DNA modulan la regulación transcripcional, sin embargo, pocos estudios han abordado con resolución molecular los cambios en expresión y epigenéticos de eventos como la privación de oxígeno y glucosa (OGD) y la recuperación posterior. En este trabajo determinamos el perfil de metilación del DNA en astrocitos humanos cultivados bajo distintas condiciones experimentales que mimetizan los daños causados por isquemia y reperfusión y analizamos la relación de estos con la expresión genética por medio del análisis de RNA-seq e inmunoprecipitación y secuenciación de DNA metilado (MeDIP-seq). Encontramos que la recuperación constituye un estado distinto a la normoxia tanto a nivel transcripcional como epigenético. Diversas vías de señalización se regulan de forma diferencial en OGD, principalmente vías de muerte, de producción de ROS y del sistema antioxidante, vías de control del ciclo celular y reparación de DNA, transportadores metabólicos y enzimas reguladoras de distintas señalizaciones por lo que pudimos describir detalladamente cuáles genes se transcriben y cuáles se dejan de transcribir. En el caso de la recuperación, observamos alteraciones en la regulación de vías de muerte y de sobrevivencia, además de mecanismos moleculares de adaptabilidad después del insulto, y una compleja regulación de los genes involucrados en el ciclo celular, como en OGD. Es muy importante entender los mecanismos celulares y moleculares que subyacen estos fenómenos para explorar nuevas alternativas terapéuticas para la fase de recuperación después de un infarto cerebral isquémico.

Reconocimientos oficiales

Este proyecto fue realizado con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CB219542) del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (PAPIIT IN226617). Para la realización de este trabajo de tesis se contó con una beca de PAPIIT-DGAPA (IN226617).

Reconozco las facilidades brindadas para la realización del trabajo experimental de la Q.F.B. Cristina Aranda Fraustro, de la Dra. Ruth Rincón Heredia de la Unidad de Imagenología, de los Mtros. Gerardo Coello Coutiño y Ana María Escalante Gonzalbo de la Unidad de Cómputo y de la Dra. Laura Ongay Larios de la Unidad de Biología Molecular del I.F.C.

Agradecimientos
THE AESTHETICS OF FEELINGS,
RESPONSABILIDAD AFECTIVA
O EL RETABLO DE LAS MARAVILLAS

Eso ya se ha visto, la metilación, líneas celulares ficticias y oscuras conclusiones. Nadie me ha dado nada nunca, porque no tengo nada. Otro soliloquio en el que se muestran y demuestran los pocos avatares de (sobre)vivir en las esquinas de una neuralgia en el trigémino, eso ya se ha visto. Sin embargo, todos debemos/tenemos/necesitamos repetirlo otra vez para que el cuerpo nos sea entendido como nuestro y mío, porque yo soy esto y no lo entiendo, aprehender.

No soy yo quien escribió esto, ni fueron ustedes. Fueron los líquenes, el otro simbiote que coconstruye, codibuja y coperforma el aliento que me da la capacidad y apetito de hacerle sentido a 4 años de estar en el laboratorio, ya sea el acto de decirse *estoy aquí*, o sólo dormir con los cacomixtles libertarios que se saltan todos los muros que tuve que saltar y brincar para llegar al tercer piso del instituto. Nobody asked me out today. I have never had a pet. *Smooth bridges.*

No le voy a agradecer a nadie, sería como agradecerle a ti mismo por hacer lo que siempre y lo que sin ningún recatamiento logras hacer. El gran líquen que somos, policorpóico y multiconsciente, sabe lo que pasa en cualquiera de sus células, ya sea alga o bacteria u hongo o esperma. Tú deshaces los nudos y las ataduras de mis manos que me constriñen y me impelen de aventarme de todas las camas e innumerables sillas donde escribí la tesis. No hay tal cosa como agradecerse de caminar hacia un lugar inconsecuente, lo natural es conocerse y *reconocerse* como el universo lo hace cada vez que existe. Afecta a otros. Nos organizamos y logré escribir la tesis después de cualquier cantidad de años. Gracias.

Siguiente negación. Demando desaparecer. Es inadmisibile e insufrible el sufrir del otro y estar acrisolándome con la sangre y los gritos de todos los muertos que no se pueden dar el *lujo* de escribir, ni de hablar ni de dormir. ¡Vaya vida que se abandona a sí misma cuando la catarsis transmuta en lo cotidiano, las arritmias no paran y la ansiedad deja de anhelar algo que no entiende ni posee, una búsqueda violenta que extraña lo agreste y lo pasivo del pasado, allá en el Hadeano!

Sí general, esto es guerra, ~~exclamé sudoroso y con frío~~. Todo está en juego, sobre la mesa están todos los derechos, la ciencia tiene el deber de crear condiciones mejores para todas, todes, todxs y todos. El discurso científico debe ampliar todas las posibilidades que las personas tengan para curar y cuidar la identidad y el cuerpo que somos, nuestro deber es que el líquen pueda crecer bajo el lado donde sale el sol en la roca que no escogió y que escogió para vivir. ¿Cómo evolucionó el microbioma en su amorío con el sistema nervioso central? Si sabes leer el corazón, eres un buen lector. Ciencia es lo que los científicos hacen. *Be proud, fight, embody the other, love.*

Gracias a todos, whatever.

Abreviaturas

A20 : *TNF Alpha Induced Protein 3*
AIP : *Apoptosis Inhibitor Protein*
AK : *Adenylate Kinase*
AKNA : *AT-Hook Transcription Factor*
AKT : *AKT serine/threonine kinase 1, Protein kinase B*
ALDOC : *Aldolase C*
ALS2CL : *ALS2 C-Terminal-Like Protein*
AMPK : *AMP Kinase*
APC : *Adenomatosis Polyposis Coli Tumor Suppressor, WNT Signaling Pathway Regulator*
APOE ϵ 4 : *Apolipoprotein E allele epsilon 4*
ASK1 : *Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1*
A β : *Amyloid Beta*
BAD : *Bcl-XL/Bcl-2-Associated Death Promoter*
BAX : *BCL2 Associated X Protein*
BCAA : *Branched-Chain Amino Acid*
Bcl2 : *B-cell lymphoma 2 Protein*
BCL2L2 : *Bcl2-Like Protein 2*
Bcl6 : *B-cell lymphoma 5 Protein*
Bcl-X_L : *B-cell lymphoma-extra large*
BCOR : *BCL6 Corepressor*
BEGAIN : *Brain Enriched Guanylate Kinase Associated*
BEX2 : *Brain Expressed X-Linked 2*
BIN1 : *Bridging Integrator 1, Amphiphysin II*
BIRC5 : *Baculoviral IAP Repeat Containing 5, Survivin Variant 3 Alpha*
BMF : *Bcl2 modifying factor*
c-Jun : *Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit*
c-Fos : *Fos Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit*
C9orf72 : *Chromosome 9 Open Reading Frame 72, Guanine Nucleotide Exchange C9orf72*
CaMKII γ : *Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase II Subunit Gamma*
CASP3/6/7/9/10 : *Caspase, Apoptosis-Related Cysteine Peptidase*
CASP8AP2 : *Caspase 8 Associated Protein 2*
CBP : *CREB Binding Protein*
CD38 : *ADP-Ribosyl Cyclase 1*
CDKN1A/2A : *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor*
CFLAR : *CASP8 And FADD Like Apoptosis Regulator, C-FLIP*
CGI : *CpG Island*
CHD3 : *Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 3*
CITED2 : *Cbp/P300 Interacting Transactivator With Glu/Asp Rich Carboxy-Terminal Domain 2*
COMT : *Catechol-O-Methyltransferase*
COX/1 : *Prostaglandin-Endoperoxide Synthase, Cyclooxygenase*
CPC : *Chromosomal Passenger Complex*
CREB : *CAMP Responsive Element Binding Protein*
CTNBP1 : *Catenin Beta Interacting Protein 1*
CTSZ : *Cathepsin Z*
CUBN : *Intrinsic Factor-Cobalamin Receptor, Cubilin*
DAZA : *2'-deoxy-5-azacytidine, decitabine*
DDIT3 : *DNA Damage Inducible Transcript 3*
DHFR2 : *Dihydrofolate Reductase 2*
DISC : *Death-inducing signaling complex*
DLL1 : *Delta Like Canonical Notch Ligand 1*
DNMT1/3A/3B : *DNA Methyltransferase*

DNMT3L : DNA Methyltransferase Like 3
DUSP5/8/10/14 : *Dual Specificity Protein Phosphatase*
EEA1 : *Early Endosome Antigen 1*
EFNA5 : *Ephrin A5*
Egr-1 : *Early Growth Response 1*
ETNK1 : *Ethanolamine Kinase 1*
ETS : *Transcription Factor ETS Proto-Oncogene*
EZH2 : *Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit, Lysine N-Methyltransferase 6*
FATP1 : *Solute Carrier Family 27 Member 1, Fatty Acid Transport Protein 1, SLC27A1*
FSC-A : *forward scatter-area*
FSC-H : *forward scatter-height*
FDR : *false discovery rate*
FOLR3 : *Folate Receptor 3 (Gamma)*
FPKM : *fragments per kilobase of exon per million reads mapped*
GADD45A : *Growth Arrest And DNA Damage Inducible Alpha*
GAPDH : *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*
GAT-3 : *Sodium- And Chloride-Dependent GABA Transporter 3, SLC6A11*
GDNF : *Glial erived neurotrophic factor*
GLuR2 : *AMPA-Selective Glutamate Receptor 2*
GPCR : *G Protein-Coupled Receptor*
GRIK2 : *Glutamate Ionotropic Receptor Kainate Type Subunit 2*
H3K9ac : *Histone H3 acetyl lysine 9*
H3K19ac : *Histone H3 acetyl lysine 19*
H3K27ac : *Histone H3 acetyl lysine 27*
H3K122ac : *Histone H3 acetyl lysine 122*
H3K4me3 : *Histone H3 trimethyl lysine 4*
H3K36me3 : *Histone H3 trimethyl lysine 36*
HDAC1/II : *Histone Deacetylase*
HIF1 : *Hypoxia Inducible Factor 1*
HRK : *BH3-Interacting Domain-Containing Protein 3, Harakiri*
HSP25 : *Heat Shock Protein Family B (Small) Member 1*
HTR1A/2A : *5-Hydroxytryptamine Receptor*
IAP : *Intracisternal A-particle retrotransposon*
IL10RB : *Interleukin 10 Receptor Subunit Beta*
IL17RD : *Interleukin 17 Receptor Subunit Delta*
IL-18 : *Interleukin 18*
IL-18R β : *Interleukin 17 Receptor Subunit Beta*
IL-6 : *Interleukin 6*
iNOS : *Inducible NO Synthase*
IRF8 : *Interferon Regulatory Factor 8*
JNK/3 : *C-Jun N-Terminal Kinase*
KCNA2 : *Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily A Member 2*
KEGG : *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
LAT1 : *Large neutral amino acid transporter, CD98*
LINE1 : *Long Interspread Element 1*
MAGEA1 : *Melanoma Antigen Family A, 1 (Directs Expression Of Antigen MZ2-E)*
MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase, ERK*
MBD1/2/4 : *Methyl-CpG Binding Domain Protein*
MeCP2 : *Methyl-CpG Binding Protein 2*
MMP2/3/9/12 : *Matrix Metalloproteinase*
MnSOD : *Manganese-Containing Superoxide Dismutase*
MT : *Mouse transcript retrotransposon*
MTA1 : *Metastasis Associated 1*

MTHFR : *5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase (NADPH)*
mTOR : *Mechanistic Target Of Rapamycin*
MXD3 : *MAX Dimerization Protein 3*
MYC : *MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor*
NETO1 : *Neuropilin And Tolloid Like 1*
NF- κ B : *Nuclear Factor Kappa B*
NGFR : *Nerve growth factor receptor*
NHLH2 : *Nescient Helix-Loop-Helix 2*
NHSS : *NIH Stroke Scale*
NMDAR : *N-Methyl-D-aspartic acid receptor*
nNOS : *Neuronal NO Synthase, NOS1*
NOX : *NADPH Oxidase*
NR2B : *Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 2B*
NUAK2 : *NUAK Family, SNF1-Like Kinase, 2*
NUCKS1 : *Nuclear Casein Kinase And Cyclin Dependent Kinase Substrate 1*
NuRD : *Nucleosome Remodeling Deacetylase Complex*
OGD : *Oxygen and glucose deprivation*
ORR1 : *Origin-Region Repeat 1 retrotransposon*
p300 : *E1A Binding Protein P300*
p32 : *Complement Component 1, Q Subcomponent Binding Protein, Mitochondrial*
p53 : *P53 Tumor Suppressor, TP53*
p66 α : *GATA Zinc Finger Domain-Containing Protein 2A*
PARP1 : *Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1*
PCNA : *Proliferating Cell Nuclear Antigen*
PDH2 : *Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase 1*
PGE₂ : *Prostaglandin E2*
PI3K : *Phosphoinositide 3-kinase*
PM20D1 : *Peptidase M20 Domain Containing 1*
PPAR α : *Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha*
PRC2 : *Polycomb repressive complex 2*
PSEN1 : *Presenilin 1*
PTK2B : *Protein Tyrosine Kinase 2 Beta*
pVHL : *phosphoryl Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor*
Rab5 : *RAS-Associated Protein RAB5*
RbAp46 : *RB Binding Protein 7, Chromatin Remodeling Factor*
RET : *Rearranged during transfection*
ROS : *Reactive oxygen species*
SAH : *S-Adenosyl-L-homocysteine*
SAM : *S-Adenosylmethionine*
SDHA : *Succinate Dehydrogenase Complex Flavoprotein Subunit A*
SFRP1 : *Secreted Frizzled Related Protein 1*
SINE B1/B2 : *Short Interspersed Nuclear Element*
SLC1A5 : *Solute Carrier Family 1 (Neutral Amino Acid Transporter), Member 5*
SLC2A1 : *Solute Carrier Family 2 Member 1, GLUT1*
SLC2A3 : *Solute Carrier Family 2 Member 3, GLUT3*
SLC3A2 : *Solute Carrier Family 3 Member 2, 4F2HC*
SLC6A3 : *Solute Carrier Family 6 Member 3, DAT1*
SLC6A9 : *Solute Carrier Family 6 Member 9, GLYT1*
SLC7A5 : *Solute Carrier Family 7 Member 5, CD98LC*
SLC16A1 : *Solute Carrier Family 16 Member 1, MCT1*
SLC16A10 : *Solute Carrier Family 16 Member 10, MCT10*
SLC25A1 : *Solute Carrier Family 25 (Mitochondrial Carrier; Citrate Transporter), Member 1*
SLC38A2 : *Solute Carrier Family 38 Member 2, SNAT2*

SLC40A1 : *Solute Carrier Family 40 Member 1, FPN1*
SLC43A1 : *Solute Carrier Family 43 Member 1, LAT3*
SMAD3/6 : *SMAD Family Member*
SNARE : *Soluble NSF(N-ethylmaleimide-sensitive factor) Attachment Protein) Receptor*
SNCA : *Synuclein Alpha*
SOD3 : *Superoxide Dismutase 3*
SORL1 : *Sortilin Related Receptor 1*
SOX10 : *SRY-Box 10*
SSC-A : *side scatter-area*
STAT3 : *Signal Transducer And Activator Of Transcription 3*
STEAP2 : *STEAP Family Member 2, Metalloreductase*
SUZ12 : *SUZ12 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit*
TAK1 : *TGF-Beta Activated Kinase 1, MAP3K7*
TBOA : *DL-threo-beta-Benzoyloxyaspartate*
TCN2 : *Transcobalamin 2*
TE : *Transposable element*
TET1/3 : *Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 3*
TIE : *TGF- β inhibitory element*
TLR-4 : *Toll-like receptor 4*
TNFR2 : *Tumor Necrosis Factor Receptor Type II*
TP73 : *Tumor Protein P73*
TRAF1/6 : *TNF Receptor Associated Factor*
TRE : *TGF- β response element*
TRPA : *Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily A Member 1*
TSP-1 : *Thrombospondin 1*
TSS : *Transcription start site*
TXNIP : *Thioredoxin Interacting Protein*
UHRF1 : *Ubiquitin Like With PHD And Ring Finger Domains 1*
VL30 : *Viral-like 30 element retrotransposon*
WDR81 : *WD Repeat Domain 81*
WNT : *Wingless-Type MMTV Integration Site*
xCT : *Cystine/Glutamate Transporter, SLC7A11*
ZBTB4/38 : *Zinc Finger And BTB Domain Containing 38*
ZO-1 : *Zona Occludens 1*

1. Introducción

1.1 Características generales de las modificaciones epigenéticas;

la metilación del DNA

Las modificaciones epigenéticas son todas las características heredables de una célula que no dependen de la secuencia del DNA (Bird, 2002; Handy, Castro, y Loscalzo, 2011; Helin y Dhanak, 2013; Portela y Esteller, 2010; Wolffe y Matzke, 1999) y que regulan la expresión genética, por lo que pueden ser afectadas por el ambiente en el desarrollo, mantenerse hasta la etapa adulta e incluso heredarse a la prole por medio de la línea germinal (Prokopuk, Western, y Stringer, 2015). Estas modificaciones se pueden transmitir en enfermedades como el cáncer sin que existan mutaciones en los genes clave para la formación de éste (Chan et al., 2006). Por otro lado, la existencia de diversos linajes celulares con la misma información genética dentro de un mismo organismo puede explicarse en parte por los mecanismos epigenéticos que permiten variabilidad en la expresión genética. Estos mecanismos son establecidos *de novo* en el desarrollo y perduran hasta el estado adulto (Law y Jacobsen, 2010). Involucran principalmente las marcas de histonas, RNAs pequeños, la estructura tridimensional de la cromatina y modificaciones a las bases nitrogenadas del DNA.

Una de las marcas epigenéticas más estudiadas es la 5-metilcitosina (5me-C) en el DNA que es, como la gran parte de este tipo de modificaciones a nivel genómico, heredable a la siguiente generación (Rakyan et al., 2003) ya que se ha comprobado que existen alelos que mantienen su estado de metilación durante la gametogénesis e inclusive después de la fecundación. La metilación *de novo* es normalmente establecida en el desarrollo y está mediada por las DNA metiltransferasas 3A-B (DNMT3A-B) (Law y Jacobsen, 2010), que dirige la expresión genética de una célula indiferenciada hacia una célula tejido-específica. La metilación *de novo* ocurre en una doble cadena de DNA no metilada y es establecida en sitios CpG (dinucleótido citosina-guanina) de manera dinámica desde la fecundación hasta la formación de células germinales primordiales. Se sabe que los patrones de metilación entre el óvulo y el espermatozoide son diferentes, además de que contribuyen de manera también diferente al patrón de metilación del cigoto, el cual experimenta una desmetilación genómica total mediada por la *ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 3* (TET3), excepto en la mayoría de los sitios con impronta, que resisten la desmetilación (L. Wang et al., 2014). Los patrones de metilación son reestablecidos *de novo* a partir del embrión de dos células y se mantienen de manera dinámica

durante todo el desarrollo en la mayoría de los tejidos. Cuando las células germinales primordiales ya se han polarizado y migrado para formar lo que serán más adelante los gametos, éstas se desmetilan completamente de nuevo, incluyendo algunos sitios improntados (Hajkova et al., 2002; Lee et al., 2002; Li, Lees-Murdock, Xu, y Walsh, 2004), y se establecen ahora las marcas de metilación específicas de la línea germinal, que están mediadas por DNMT3L (*DNA Methyltransferase Like 3*), así como la metilación que refiere al silenciamiento de los elementos transponibles (TE) (Kobayashi et al., 2012).

La DNA metiltransferasa 1 (DNMT1) es la isoforma que se expresa en mayor abundancia en los tejidos mitóticos en organismos adultos y, es la enzima que cataliza la incorporación del grupo metilo a la citosina. Esta enzima es reclutada por el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) y su unión a la cromatina está mediada por la proteína *ubiquitin-like plant homeodomain and RING finger domain 1* (UHRF1). La reacción es catalizada de manera semiconservativa después de la duplicación del DNA debido al reclutamiento de proteínas de unión a metilcitosina que reclutan los complejos proteicos necesarios para la metilación, por lo que una doble cadena de DNA previamente metilada seguirá siendo completamente metilada a la siguiente generación (Law y Jacobsen, 2010).

1.2 Regulación de la expresión genética mediada por la metilación del DNA

La regulación de la expresión genética mediada por la metilación del DNA está asociada a la metilación o desmetilación en las islas CpG (CGI), que se encuentran distribuidas en todo el genoma humano y normalmente en un estado de hipometilación (Deaton y Bird, 2011). Las CGI son, por definición, sitios mayores a 500 bp, alto contenido de CG a nivel global ($\geq 55\%$) y también alto contenido de sitios CpG en relación al contenido esperado de CpG ($\text{CpG}_{\text{observado}}/\text{CpG}_{\text{esperado}} \geq 0.65$) (Takai y Jones, 2002). Se ha comprobado que por lo menos el 50% de las CGI se encuentran cerca del sitio de inicio de la transcripción (TSS), algunas otras en promotores intragénicos y la mayoría de los promotres que contienen CGIs no poseen cajas TATA, lo que nos lleva a decir que son sitios transcripcionales “permissivos”, además de que estructuralmente son deficientes en nucleosomas (Fenouil et al., 2012).

Existen diversos mecanismos por los cuales la metilación del DNA regula la transcripción genética. Se sabe que la metilación modifica la estructura tridimensional de la cadena de DNA; específicamente los ángulos entre cada enlace fosfodiéster, la rotación del anillo de desoxiribosa, así como la amplitud de las hendiduras mayores y menores por lo que factores de transcripción como los de la familia ETS (*Transcription Factor ETS Proto-Oncogene*) tienen desde 12 hasta 160 veces menos afinidad por el DNA metilado (Stephens y Poon, 2016). Otros factores de transcripción como Egr-1 (*Early Growth Response 1*) no tienen afinidad diferencial al DNA metilado, por lo que se han propuesto otros modelos para explicar cómo es que la proteína se une con mayor frecuencia a sus sitios de unión no metilados respecto a los que sí están metilados. Uno de estos modelos está basado en que proteínas de unión a DNA que contienen el dominio metil-CpG de unión a DNA como MBD1, MBD2, MBD4 y MeCP2, pueden bloquear los sitios de unión a Egr-1 metilados que se encuentran en sitios CpG fuera de las CGIs, aumentando la disponibilidad de Egr-1 para unirse a sus sitios de unión funcionales no metilados dentro de las CGIs, por lo que indirectamente la metilación del DNA estaría favoreciendo la transcripción de genes mediada por Egr-1 (Kemme, Marquez, Luu y Iwahara, 2017).

Por otro lado, algunas proteínas pueden unirse de preferentemente a DNA metilado de manera secuencia-específica (Sasai, Nakao y Defossez, 2010), principalmente las que contienen el dominio metil-CpG de unión a DNA, el dominio *SET- and Ring finger-associated* (UHRF1 y UHRF2) o algunos represores transcripcionales con dominio dedo de zinc (Kaiso, ZBTB4 [*Zinc Finger And BTB Domain Containing 4*] y ZBTB38) que, por ejemplo, su expresión se encuentra alterada en enfermedades como cáncer, por lo que sus blancos como el RNA no codificante H19 que participa en procesos proliferativos, estarían alterados también (Bohne et al., 2016). Las proteínas que poseen el dominio metil-CpG de unión a DNA tienen una manera específica de reprimir la transcripción mediante el reclutamiento de NuRD, un complejo remodelador de cromatina que está compuesto por las histona desacetilasas HDACI/II (*Histone Deacetylase*), las proteínas de unión a histonas RbAp46/48 (*RB Binding Protein 7, Chromatin Remodeling Factor*), las proteínas asociadas a metastasis MTA1/2 y la helicasa con cromodominio de unión a DNA CHD3. Este complejo aumenta la densidad nucleosomal, así como elimina marcas de activación transcripcional como H3K9ac (*Histone H3 acetyl lysine 9*), H3K19ac (*Histone H3 acetyl lysine 19*), H3K27ac (*Histone H3 acetyl lysine 27*) y H3K122ac (*Histone H3 acetyl lysine 122*) y por

lo tanto la facilidad con la que la RNA Pol II puede transcribir el DNA (Y. Zhang et al., 1999). Además, se ha reportado que NuRD puede reclutar al complejo PRC2 (*Polycomb repressive complex 2*), aumentando la inhibición de la transcripción por medio de la metilación de H3K27 de manera locus específica (Reynolds et al., 2012).

La metilación del DNA también puede regularse dentro de los genes, se ha reportado que la DNMT3B1 puede metilar *de novo* los cuerpos génicos que, a su vez, tienen marcas de transcripción activa como H3K36me3 (*Histone H3 trimethyl lysine 36*), RNA Pol II y mRNA. Este tipo de metilación ocurre preferencialmente en los exones y se asocia a la regulación del *splicing* y a la estabilidad nucleosomal del cuerpo del gen (Jones, 2012; Wolf, Jolly, Lunnen, Friedmann y Migeon, 1984). Asimismo, se ha visto que la metilación global en regiones dentro de los genes aumenta y en regiones no génicas disminuye significativamente para establecer la metilación tejido específica (Maunakea et al., 2010), así como en patologías (Dębski et al., 2016; Shenker et al., 2015) y en el desarrollo (Kobayashi et al., 2012).

Dada la importancia de la regulación de la transcripción mediada por la actividad de las CGIs, son necesarios estudios detallados que permitan entender los cambios dinámicos entre la metilación y la transcripción y así ofrecer explicaciones más robustas para fenómenos complejos como el cáncer (Bailey et al., 2016; Rhee et al., 2013), evolución (Dixon, Bay, y Matz, 2016; Keller, Han y Yi, 2016) y procesos neurodegenerativos como la isquemia cerebral. Esta es una de las fisiopatologías neurodegenerativas que provocan más muertes y discapacidad en adultos en el mundo (Benjamin et al., 2017) por lo que es importante conocer a detalle los procesos celulares y moleculares que la subyacen, incluyendo la epigenética y en particular la metilación del DNA.

1.3 Fisiopatología de la isquemia cerebral

La isquemia cerebral es la interrupción del aporte sanguíneo al cerebro debido a una hipoperfusión del tejido o a un bloqueo del flujo en el caso del infarto cerebral isquémico, lo que provoca que no se cumpla la alta demanda energética del cerebro (Peters et al., 2004) y ocurran procesos de neurodegeneración que pueden provocar la muerte (Moskowitz, Lo e Iadecola, 2010). Estos procesos se desarrollan secuencialmente y afectan diferencialmente a

las distintas células del cerebro. Las primeras células en morir son las neuronas por necrosis debido a la falla energética súbita que hace que el potencial de membrana se pierda y en consecuencia los canales dependientes de voltaje alteren su funcionalidad (Weilinger et al., 2013). La despolarización neuronal provoca una liberación masiva de glutamato en las células, lo que activa los receptores de NMDA y AMPA principalmente, llevando a una entrada no controlada de Ca^{+2} hacia la célula y a la posterior activación de calpaínas que son un factor esencial en la necrosis (Harwood, Yaqoob y Allen, 2005). Otra proteína que es activada por Ca^{+2} es la calmodulina y ésta a su vez activa a la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) que produce NO que al reaccionar con el ion O_2^- produce ONOO^- , un radical libre que oxida el esqueleto de desoxirribosa del DNA y en menor medida nitrila guanina (Tretyakova et al., 2000). El daño masivo al DNA activa a la PARP1 (*Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1*), enzima dependiente de ATP que repara cortes de cadena sencilla de DNA, su activación aumenta la falla energética al acabar con gran parte del ATP celular y se produce la necrosis (Weilinger et al., 2013). En la zona que directamente se afecta por el bloqueo del flujo sanguíneo se mueren tanto las neuronas como todas las demás células, lo que se le denomina pannecrosis (Baron, Yamauchi, Fujioka, y Endres, 2014), en contraposición a la muerte selectiva y mediada por otros mecanismos como la apoptosis y la inflamación.

La apoptosis ocurre principalmente en una zona periférica a donde ocurrió el bloqueo, llamada penumbra. En esta zona de lesión los procesos neurodegenerativos dependen tanto de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la señalización dependiente de HIF1 (*Hypoxia Inducible Factor 1*) y los procesos inflamatorios subsecuentes. Por ejemplo, se sabe que el ONOO^- puede activar a p38 MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase, ERK*) y a caspasa 3 y que la fuente de O_2^- es la NADPH oxidasa, que se incrementa sustancialmente después de un infarto (Manzanero, Santro, y Arumugam, 2013). Para entender con detalle el papel de la apoptosis en la isquemia cerebral es necesario estudiar a la par el papel de los astrocitos en la regulación del metabolismo y sobrevivencia neuronal. Después del bloqueo ocurre la reperfusión y otros procesos tanto de recuperación como de neurodegeneración pueden llevarse a cabo. Una molécula que puede efectuar un proceso de recuperación es VEGFA, que se sabe está implicado en la angiogénesis, neurogénesis y neuroprotección después de la isquemia cerebral (Sun et al., 2003). Además, se sabe que se sobreexpresa en neuronas, astrocitos, microglía y células

endoteliales en la zona de lesión y alrededor de ésta después del infarto en humanos (Mărgăritescu, Pirici y Mărgăritescu, 2011)

1.4 La importancia de los astrocitos en condiciones fisiológicas y en la isquemia cerebral

Uno de los tipos celulares más importantes en el sistema nervioso central son los astrocitos, que tienen una gran variabilidad morfofuncional posicional tanto en la médula espinal ventral (Hochstim, Deneen, Lukaszewicz, Zhou y Anderson, 2008) como en el cerebro. Se han detectado no sólo distintas morfologías astrocíticas sino también electrofisiologías específicas a las distintas regiones cerebrales como el hipocampo y el estriado, en las que a pesar de compartir algunas características, difieren en la magnitud de las corrientes de K^+ sensibles a Ba^+ . Otras diferencias encontradas son en el acoplamiento con las uniones *gap*, las corrientes de Ca^{2+} mediadas por receptores de proteína G (GPCRs) tanto espontáneas como evocadas eléctricamente y en el efecto del benciloxiaspartado (TBOA) en las corrientes evocadas por glutamato (Chai et al., 2017), así como en nivel de transcriptoma y proteoma.

Esta diversidad puede deberse a que son de las células más abundantes del sistema nervioso central (CNS) y a que se encuentran regionalizadas para regular el metabolismo del glutamato y lactato, la sinapsis y la circuitería neuronal (Khakh y Sofroniew, 2015). Se ha reportado que los astrocitos pueden inducir corrientes de Ca^{2+} por medio de canales TRPA-1 (*Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily A Member 1*) en microdominios que contribuyen al potencial en reposo de Ca^{2+} y que éstos pueden modificar la concentración de GABA extracelular por medio de su transportador GAT-3 (*Sodium- And Chloride-Dependent GABA Transporter 3, SLC6A11*) y así modificar la eficiencia de las corrientes inhibitoras sinápticas en interneuronas de hipocampo de ratón (Shigetomi, Tong, Kwan, Corey y Khakh, 2012). Igualmente, se ha reportado que los astrocitos pueden favorecer la formación de sinapsis *in vitro* aumentando hasta 4 veces el número de sinapsis en un cocultivo de astrocitos humanos y células ganglionares de retina de rata comparado con un cultivo sólo de neuronas. Además, los astrocitos en cocultivo con neuronas pueden aumentar la amplitud y frecuencia de las corrientes excitadoras posinápticas, así como la sobrevivencia neuronal en condiciones basales (Zhang et al., 2016). Este acoplamiento neurona-astrocito va de la mano con un fenómeno conocido como hiperemia funcional que se describe por medio de la dilatación de

arteriolas dependiente de la liberación de prostaglandina E2 (PGE₂). Este fenómeno proviene de la activación de ciclooxigenasa (COX) de manera Ca⁺²-dependiente por parte de los pies astrocíticos que estén en contacto con corrientes aferentes neuronales (Zonta et al., 2003). Además, se ha reportado que este fenómeno sucede *in vivo* y que la vasodilatación mediada por astrocitos puede inhibirse con bloqueadores de COX-1 (*Prostaglandin-Endoperoxide Synthase, Cyclooxygenase*, Takano et al., 2006). Estos estudios demuestran que existe una integración neuro-astro-vascular que regula el flujo sanguíneo cerebral dadas las demandas de nutrientes y de O₂ en respuesta a la actividad neuronal, así como en otros procesos (LeMaistre y Anderson, 2009).

La compleja regulación metabólica entre los astrocitos y neuronas se ve comprometida después del infarto cerebral, disminuyendo tanto de la actividad mitocondrial astrocítica como en el transporte de glutamato hacia la neurona (Morken et al., 2014). Esta regulación también implica la sobrevivencia neuronal después de eventos neurotóxicos. Se ha reportado que los astrocitos pueden liberar ROS después de la privación de oxígeno y glucosa (OGD, R. Zhang et al., 2014), y su inhibición mejora la viabilidad celular por lo que la sobrevivencia neuronal también se vería beneficiada.

Por otra parte, se ha demostrado que la endotelina-1, expresada por los astrocitos, favorece la ruptura de la barrera hematoencefálica, la formación de edema, perjudica la recuperación funcional después del infarto y favorece la expresión de TNF- α y de caspasa-3 activada, por lo que los astrocitos podrían estar mediando la demencia vascular que en algunas veces se presenta después del infarto (Hung et al., 2015). De manera concordante, la señalización de los astrocitos por medio de las proteínas SNARE (*Soluble NSF(N-ethylmaleimide-sensitive factor) Attachment Protein) Receptor*) tiene un papel neurodegenerativo después de la isquemia cerebral, como lo reportaron Hines y Haydon (2013). La inhibición de SNARE provoca una mayor recuperación funcional y un menor tamaño de infarto respecto a cuando este complejo está activo y esto podría estar mediado por una reducción en el tráfico de NMDARs (*N-Methyl-D-aspartic acid receptor*) hacia las neuronas. La plasticidad neuronal también se modifica después de la isquemia cerebral y los astrocitos pueden regularla por medio de EFNA5 (*Ephrin A5*), que limita la regeneración de los axones y dendritas en la zona del periinfarto y puede detener la recuperación neurológica (Overman et al., 2012)

Los astrocitos también pueden favorecer la recuperación después del establecimiento de la lesión. Está reportado que células neurales troncales de la zona subventricular pueden diferenciarse a astrocitos que migran hacia la zona que delimita el foco isquémico (periinfarto) y desarrollar una cicatriz glial que tiene como funciones la delimitación de la lesión, la reestructuración de la barrera hematoencefálica y la regulación de la sobrevivencia neuronal (Faiz et al., 2015). Por otra parte, la liberación de TGF- β por parte de los astrocitos en la zona del periinfarto está relacionada con una reducción en la activación de la microglía, así como una disminución en la expresión de marcadores inflamatorios como MHC II e iNOS (*Inducible NO Synthase*) y una mejor recuperación funcional con respecto a astrocitos que no expresan TGF- β (Cekanaviciute et al., 2014). Asimismo, los astrocitos ya diferenciados pueden producir neuroblastos en etapas crónicas después de la lesión; mecanismo mediado por la inhibición de la vía de Notch1 ya que tanto los receptores Notch1/2/3 como los ligandos DLL1 (*Delta Like Canonical Notch Ligand 1*), Jagged1 y Jagged2 se encuentran subexpresados en períodos crónicos después del infarto tanto en el estriado como en la corteza (Magnusson et al., 2014). Recientemente, se ha descrito que los astrocitos pueden liberar mitocondrias al espacio extracelular y ser recaptadas por neuronas después de la isquemia cerebral por medio de un mecanismo mediado por CD38 (*ADP-Ribosyl Cyclase 1*), lo que les permite tener una mejor respuesta al daño y aumentar la sobrevivencia y la plasticidad neuronal (Hayakawa et al., 2016)

2. Antecedentes

2.1 La metilación del DNA en enfermedades neurodegenerativas

2.1.1 Enfermedad de Alzheimer

Dentro del contexto de las enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas, la metilación del DNA tiene un papel sustancial y está ampliamente reportado en diversos tipos de neurodegeneración. Está demostrado que en la capa III de la corteza entorrinal de pacientes con Alzheimer, los niveles de 5me-C disminuyen tanto en microglía como en astrocitos, así como la expresión del complejo MeCP1/MBD2. En esta misma zona también disminuye p66 α (*GATA Zinc Finger Domain-Containing Protein 2A*), una proteína que forma parte del complejo NuRD, en neuronas que expresan Tau [pS396] (Mastroeni *et al.*, 2010). En un estudio a nivel

epigenómico realizado por Bennet y colaboradores (2014) se reportó que en la corteza prefrontal dorsolateral de pacientes con Alzheimer existen cambios en la metilación de DNA y estos cambios se observan en pacientes que presentaron una expresión alterada de los genes que normalmente se asocian a una susceptibilidad a la enfermedad como BIN1 (*Bridging Integrator 1, Amphiphysin II*), SORL1 (*Sortilin Related Receptor 1*) y PTK2B (*Protein Tyrosine Kinase 2 Beta*). Por medio de análisis de promotores por medio de espectrometría de masas se sabe que en la corteza prefrontal de pacientes con la enfermedad hay cambios en la metilación del DNA de genes que están directamente involucrados en la enfermedad como hipometilación de tanto de PSEN1 (*Presenilin 1*), un componente de la γ -secretasa, como de APOE ϵ 4 (*Apolipoprotein E allele epsilon 4*), el factor de riesgo más importante para Alzheimer después de los 65 años y, contrariamente se encontró una hipermetilación de DNMT1 (Wang *et al.*, 2008). Inclusive se han propuesto terapéuticas basadas en la administración de S-adenosilmetionina (SAM) para tratar la enfermedad; SAM es el sustrato donador del grupo metilo en la reacción de las DNMTs, y está demostrado que al tratar neuronas con SAM aumenta la metilación de una de las CGIs del promotor de PSEN1, lo que lleva a una reducción en la producción de A β (*Amyloid Beta*, Scarpa *et al.*, 2003). Congruentemente, en neuronas *in vitro* se demostró que la disminución de la concentración de SAM intracelular por medio de la privación parcial de vitamina B12 y B9, cofactores y donadores de metilo participantes en el ciclo de síntesis de SAM/S-adenosilhomocisteína (SAH), aumenta la expresión de PSEN1 y de A β (Fuso, Seminara, Cavallaro, D'Anselmi y Scarpa, 2005). En conjunto, los datos ofrecen una hipótesis que puede dar cuenta de algunos aspectos etiológicos de la enfermedad; una hipometilación en genes regulatorios de la síntesis de A β que podría ser debida a una deficiencia en vitamina B12 y B9 que se sabe ocurre en el envejecimiento (Baik y Russell, 1999), y aunado a esto una falla en la maquinaria de reconocimiento y mantenimiento de la metilación del DNA que provocaría igualmente una sobreproducción de A β .

2.1.2 Lesiones en médula espinal y sistema nervioso periférico

La metilación del DNA se ha estudiado en neuronas periféricas y de la médula espinal principalmente en fenómenos como el dolor, la neurodegeneración por lesiones y en enfermedades como esclerosis lateral amiotrófica (ALS). En modelos experimentales de dolor provocado por inflamación crónica se ha visto que miR-129 se hipermetila en las CGIs de su

promotor, lo que lleva la sobreexpresión de dos de sus blancos, CaMKII γ (*Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase II Subunit Gamma*) y p-NMDAR1, activadores de la sensibilización neuronal relacionada con el dolor. Administrando inhibidores de la metilación como 5'-aza-2'-desoxicitidina (DAZA) la expresión de miR-129 aumenta y se inhibe la expresión de CaMKII γ y p-NMDAR1, disminuyendo la hiperalgesia y el dolor (Pan et al., 2014). En otros modelos, como el de dolor provocado por cáncer de hueso, se ha visto que aumenta la expresión de DNMT3A en la médula espinal y esto provoca la metilación de KCNA2 (*Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily A Member 2*), un canal de potasio dependiente de voltaje, que al estar subexpresado disminuye el potencial de membrana neuronal y el umbral de voltaje necesario para un potencial de acción, provocando hipersensibilidad al dolor. Utilizando DAZA o shRNAs contra DNMT3A, tanto la alodinia como la hiperalgesia provocada por el cáncer disminuyen significativamente, así como el restablecimiento de la expresión normal de KCNA2 (Miao et al., 2017).

En células NSC34 (híbrido de células de médula espinal y neuroblastoma utilizadas como modelo de motoneuronas) se ha visto que la inhibición de la expresión de DNMT3A por medio de RNAs de interferencia (siRNA) aumenta la sobrevivencia neuronal en un modelo de apoptosis mediada por daño a DNA debida a camptotecina (antiproliferativo usado en tratamientos contra el cáncer). Asimismo, en ratones C57BL/6J a las que se les aplicó una avulsión unilateral del nervio ciático, tanto la metilación de DNA como la expresión de DNMT3A aumentaron significativamente. Además, la muerte provocada por la lesión se ve revertida por la inhibición farmacológica de DNMT3A y este comportamiento también se observa en muestras de motoneuronas espinales de pacientes con ALS tanto de DNMT1, DNMT3 y de 5me-C (Chestnut et al., 2011). Una de las posibles causas genéticas de ALS familiar es la expansión $G_4C_2 > 30$ del gen *C9orf72* (*Chromosome 9 Open Reading Frame 72, Guanine Nucleotide Exchange C9orf72*), y en un estudio en el que se analizó la metilación de la CGI en el 5' de dicha mutación en pacientes con ALS que la poseían o no la expansión se mostró que el 73% de los pacientes con la expansión tenían algún nivel de metilación en la CGI analizada, mientras que sólo el 2% de los pacientes que no tenían la expansión presentaban la CGI con algún grado de metilación. Además de que en los pacientes con hipermetilación de la CGI, la severidad de la enfermedad era mayor (Xi et al., 2013). Finalmente, la evidencia muestra que varios procesos que suceden en la médula espinal y en el sistema nervioso periférico como el

dolor y enfermedades como ALS tienen un componente epigenético que se modifica en los distintos genes que regulan dichos procesos con respecto a las condiciones fisiológicas normales.

2.1.3 Enfermedad de Parkinson

En la enfermedad de Parkinson se sabe que el gen de la α -sinucleína SNCA (*Synuclein Alpha*) está sobrerregulado y que la agregación de su producto proteico contribuye a la formación de cuerpos de Lewis. Se ha demostrado que el gen contiene dos CGI y que particularmente la segunda CGI, localizada en el intrón 1, se encuentra hipometilada en pacientes con la enfermedad tanto en la sustancia nigra, putamen y corteza y que la metilación del intrón 1 disminuye la expresión de SNCA (Jowaed, Schmitt, Kaut y Wüllner, 2010). Más recientemente, se han asociado polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) en el mismo intrón 1 de SNCA con la metilación de éste en pacientes con Parkinson tanto en corteza cerebral, así como una hipometilación en sangre periférica (Pihlstrøm, Berge, Rengmark y Toft, 2015). Igualmente, se han analizado muestras de sangre de pacientes en los que la metilación aumentó mientras aumentaba la dosis de L-DOPA, que es un fármaco usado para tratar la enfermedad ya que es un precursor de catecolaminas y que podría tener además *off-targets* epigenéticos y, asimismo, *in vitro* se demostró que la administración de L-DOPA aumenta la metilación del intrón 1 de SNCA en células linfocíticas de pacientes con la enfermedad (Schmitt et al., 2015).

Por medio de análisis poblacionales a nivel genómico de SNPs combinado con análisis de metilación de DNA y de expresión de mRNA proximales a los SNPs, se han detectado decenas de alelos de riesgo cuyos genes proximales tienen cambios en metilación y expresión con respecto a controles en corteza y cerebelo de pacientes con la enfermedad (Nalls et al., 2014). En particular se encontró el SNP rs199347 cuyo gen proximal NUCKS1 (*Nuclear Casein Kinase And Cyclin Dependent Kinase Substrate 1*) se encontraba hipermetilado y subexpresado y aunque no se conoce la relación funcional entre este gen y la enfermedad se han detectado alelos de riesgo de este gen en otras poblaciones (Liu et al., 2011; Zhu et al., 2018). La sobreexpresión de SNCA es un componente etiológico de la enfermedad y los datos muestran que la metilación de su promotor esta directamente relacionada con su sobreexpresión y además de que la

enfermedad tiene una marca epigenética característica que se ha analizado en distintas poblaciones, por lo que la metilación del DNA es un buen blanco para futuras terapéuticas.

2.1.4 Esclerosis múltiple

Con respecto a la enfermedad desmielinizante autoinmune, esclerosis múltiple (MS), se sabe que existe una sobreexpresión de DNMT1/3A/B en el hipocampo afectado con la enfermedad. Además, TET1-TET3 que desmetilan el DNA, se encuentran sobreexpresadas en su mRNA y existe un patrón general de metilación diferente a hipocampos no afectados por la esclerosis múltiple. Entre los genes hipermetilados se encuentran WDR81 (*WD Repeat Domain 81*), que está involucrado en la supervivencia neural y NHLH2 (*Nescient Helix-Loop-Helix 2*) que regula los receptores de melanocortina y por lo tanto el aprendizaje y memoria; entre los genes hipometilados se encontró a SFRP1 (*Secreted Frizzled Related Protein 1*), un inhibidor de WNT (*Wingless-Type MMTV Integration Site*), que se sabe promueve la plasticidad neuronal y a AKNA (*AT-Hook Transcription Factor*), que puede aumentar la expresión de TNF- α , haciendo que la supervivencia neuronal disminuya (Chomyk et al., 2017). En ensayos con sangre periférica de pacientes con MS, se han detectado concentraciones más altas de DNA libre en plasma que en controles sanos. El análisis de metilación de algunos promotores implicados en la supervivencia y apoptosis celular ofreció un panorama general de hipermetilación en dichos promotores presentes en el DNA libre en plasma; entre ellos TP73 (*Tumor Protein P73*) y CDKN2A (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor*, Liggett et al., 2010).

Con el uso de secuenciación de mRNA y microarreglos de metilación de DNA se ha descrito el metiloma y transcriptoma de materia blanca normal de pacientes diagnosticados con MS. Se mostró que los niveles de metilación no se modifican más allá de < 0.2 ó > 0.8 valores de β (siendo 0 un locus no metilado y 1 uno completamente metilado) pero si se detectan cambios en expresión de mRNA. Entre estos genes encontramos al secuestrador de BAX (*BCL2 Associated X Protein*), BCL2L2, hipermetilado y subexpresado. CTSZ (*Cathepsin Z*) fue encontrado hipometilado y sobreexpresado y se sabe que esta proteinasa esta sobreexpresada en procesos inflamatorios y neurodegenerativos (Huynh et al., 2014).

A pesar de ser una enfermedad de etiología desconocida, los cambios en la metilación del DNA ofrecen explicaciones acerca de cómo es la dinámica de la enfermedad. En general, los cambios en la expresión derivados en cambios en la metilación parecen ser dirigidos a genes relacionados con la sobrevivencia neuronal y éstos, aunque no sean abruptos como en el caso del cáncer, sí pueden describir de alguna manera la regulación genética de la enfermedad. La importancia de la metilación del DNA libre en plasma nos puede llevar a hipotetizar una señalización entre el sistema nervioso central y el sistema inmune que se sabe esta directamente relacionado con la enfermedad (Kumagai, Kalman, Middleton, Vyshkina y Massa, 2012).

2.1.5 Depresión y esquizofrenia

Los trastornos psicoafectivos y psiquiátricos son fenómenos que son difíciles de explicar molecularmente y/o genéticamente debido al aporte ambiental que los subyace (Christiani, Byles, Tavener y Dugdale, 2015; van Os, Kenis y Rutten, 2010), por lo que estudios en las interacciones entre los genes y el ambiente son necesarios para comprender cómo funcionan estas enfermedades, y la epigenética es uno de los mecanismos conocidos en los que el genoma responde a un determinado estímulo ambiental. Recientemente, utilizando secuenciación masiva de sitios de unión a metil-CpG (MBD2-seq), se han detectado genes que podrían estar involucrados en la etiología de la depresión. En un estudio realizado por Nagy et al. (2015), se demostró que en corteza prefrontal de pacientes que murieron por suicidio (durante un evento depresivo) existe una hipometilación generalizada en los sitios MBD2 y particularmente en genes como *GRIK2* (*Glutamate Ionotropic Receptor Kainate Type Subunit 2*) que se sabe están relacionados con enfermedades psicopatológicas. Otros genes como *BEGAIN* (*Brain Enriched Guanylate Kinase Associated*), relacionados con la inflamación cerebral y las sinapsis (Yao, Iida, Nishimura y Hata, 2002), se encontraron hipermetilados en células no neurales, por lo que el papel de los astrocitos y la glia en general pudiera ser preponderante en este tipo de patologías. Otro de los genes que regula las sinapsis y la plasticidad neuronal es *BDNF* y se sabe que en pacientes con depresión los niveles de expresión protéica son bajos en comparación con individuos sanos (Allen et al., 2015). En un estudio poblacional se demostró que dos CGI del promotor de *BDNF* se encuentran hipermetiladas en pacientes con depresión en DNA bucal. Asimismo, se encontró una

asociación en el SNP rs6265 con la hipermetilación de BDNF (Januar, Ancelin, Ritchie, Saffery y Ryan, 2015); esta variante esta asociada a su vez con un mayor riesgo de suicidio (Hosang, Shiles, Tansey, McGuffin y Uher, 2014) y de manera concordante, en pacientes con suicidio consumado se ha visto a BDNF hipermetilado.

En estudios de metilación de DNA en corteza cerebral de pacientes con esquizofrenia se han visto genes tanto hiper como hipometilados con respecto a personas sanas. Genes directamente relacionados con la metilación como DNMT1 se encontraron hipometilados, además de NOS1, SOX10 (*SRY-Box 10*) y GDNF (*Glial derived neurotrophic factor*), que están involucrados en el desarrollo neuronal, sinapsis y en procesos neurodegenerativos, también se encontraron hipometilados en pacientes (Wockner et al., 2014). En otro estudio realizado en sangre periférica de pacientes con esquizofrenia mostró un panorama general de hipometilación a lo largo del genoma. Destacan genes relacionados con el metabolismo de la dopamina como HTR1A (*5-Hydroxytryptamine Receptor*), HTR2A y COMT (*Catechol-O-Methyltransferase*), así como el transportador de dopamina SLC6A3 (*Solute Carrier Family 6 Member 3*, *DAT1*, Nishioka et al., 2013). En un modelo de esquizofrenia por medio de activación inmune maternal se ha detectado, niveles de hipometilación en elementos repetitivos con actividad retrotransposicional a lo largo de todo el genoma (*Long Interspread Element 1*, LINE1) y en el promotor de la proteína de unión a metil-CpG 2 (MECP2) en el hipocampo de ratones adolescentes C57BL/6N (6 semanas de vida). La activación de LINE1 mediada por hipometilación se ha asociado a diversos procesos que afectan al sistema nervioso como defectos en el desarrollo del tubo neural (L. Wang et al., 2010), decrementando la estabilidad cromosomal e incrementando la recombinación no controlada, además que esto puede deberse a una malnutrición maternal ya que los sujetos analizados con alguna malformación del tubo neural tenían niveles menores de vitamina B12, cuya participación en el ciclo de producción de SAM haría tener una incorrecta metilación a nivel genómico. También se ha descrito en glioma multiforme (Lai et al., 2014) una hipometilación de LINE1 en los tumores de clase I y además que la metilación de LINE1 es un factor favorable en el diagnóstico de este tipo de tumores. Se piensa que la movilidad de sitios LINE1 provoca que se alteren los marcos de lectura dentro de los genes, o una posible promoción la hipometilación de regiones genómicas vecinas, lo que lleva a inestabilidad estructural y a un neurodesarrollo deteriorado (Basil et al., 2014).

Podemos asegurar que la metilación del DNA es una herramienta de análisis para comprender enfermedades tan complejas como las psiquiátricas. Los datos muestran cambios en la metilación y asociaciones tanto a depresión como esquizofrenia de genes que normalmente no se asociarían funcionalmente a la enfermedad como GDNF, BEGAIN o sitios LINE1, por lo que encontrar patrones epigenéticos en este tipo de fenómenos es importante para poder desarrollar biomarcadores y posibles terapéuticas.

2.2 La metilación del DNA en la isquemia cerebral

2.2.1 Evidencias clínicas

En el caso particular de la isquemia cerebral, por medio de análisis de metilación de DNA a nivel genómico en pacientes con infarto cerebral, se ha reportado que en hombres blancos ancianos; existe hipometilación de sitios LINE1 y que éstos son un factor de riesgo para el infarto cerebral (Baccarelli et al., 2010). Otro estudio estableció una relación entre la metilación del DNA, la obesidad y el infarto isquémico y se encontró a sitios CpG asociados a ambas condiciones en sangre periférica (Gómez-Úriz et al., 2015) Estos se encuentran en genes que regulan la actividad metabólica y la sobrevivencia celular como PM20D1 (*Peptidase M20 Domain Containing 1*), una enzima que recientemente se elucidó su papel en el desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Long et al., 2016) cuyo gen se encontró hipermetilado en los pacientes con infarto cerebral (Gómez-Úriz et al., 2015). En genes cuyos roles en la isquemia están caracterizados como la metaloproteinasa de matriz MMP-2, también se han detectado cambios en la metilación de sus promotores. En un estudio poblacional se comprobó que la sobreexpresión de MMP-2 en el infarto está correlacionada con su hipometilación en sangre periférica de pacientes con infarto lacunar en todos sus sitios CpG (Lin et al., 2017).

Dada la relevancia del ciclo SAM/SAH en la actividad de las DNMTs, se realizó un estudio clínico en pacientes con infarto cerebral isquémico que recibieron un suplemento de vitaminas B6, B12, B9 para la búsqueda de SNPs asociados a la interacción entre los niveles de estas vitaminas y el infarto. Se encontró a varios SNPs asociados a genes implicados en el metabolismo y absorción de B12 y como CUBN (Intrinsic Factor-Cobalamin Receptor, Cubilin) y

TCN2 (*Transcobalamin 2*, Keene et al., 2014). Además, estos pacientes presentaban antes del estudio altos niveles de homocisteína, un conocido factor de riesgo de infarto que es acumulado cuando el ciclo SAM/SAH se encuentra dañado. Concordantemente, en otro estudio se encontró que niveles altos de B12 están asociados a una mejor recuperación funcional (Markišić, Pavlović y Pavlović, 2017). Por medio de metaanálisis de todos los estudios publicados con relación al infarto cerebral y la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) se demostró que la mutación C667T en la enzima es un factor de riesgo para desarrollar un infarto isquémico (Abhinand, Manikandan, Mahalakshmi y Ragunath, 2017). Esta mutación disminuye la eficiencia catalítica de la enzima y al ser un paso limitante en la conversión de metionina a homocisteína se cree que pueda afectar los niveles de metilación del DNA (Nojima et al., 2018).

Usando marcadores basados en la metilación de DNA para determinar la “edad biológica” de un individuo, se ha detectado que este parámetro es un predictor de la recuperación funcional después del infarto isquémico igual de efectivo que el *NIH Stroke Scale* (NHSS) y tabaquismo, dos de los mejores predictores de recuperación funcional que se conocen, además de que la edad biológica es mejor predictor que la edad cronológica (Soriano-Tárraga et al., 2017).

Uno de los factores causales para el desarrollo de la isquemia cerebral es la estenosis por aterosclerosis y por lo tanto se han estudiado reguladores de las vías de síntesis y homeostasis de lípidos. miR-233 se ha estudiado en pacientes con infarto cerebral por aterosclerosis y se sabe que su promotor se desmetila después del infarto y su expresión aumenta en sangre periférica (Z. Li et al., 2017). miR-233 está implicado en la regulación negativa de la síntesis de colesterol (Vickers et al., 2014) y además se sabe que puede regular la expresión de GLuR2 (*AMPA-Selective Glutamate Receptor 2*) y NR2B (*Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 2B*, Harraz, Eacker, Wang, Dawson y Dawson, 2012), por lo que la excitabilidad neuronal también puede moldearse después del infarto. En su conjunto, los datos clínicos muestran que existen cambios en la metilación del DNA después del infarto cerebral y que la maquinaria responsable de la metilación y su regulación también modifican su actividad y expresión, sin embargo aún con esta información no es posible establecer un panorama epigenómico definitivo de todos los cambios en la metilación y su relación con la expresión genética que expliquen los procesos neurodegenerativos en el infarto y reperfusión así como los de reparación y neurogénesis.

2.2.2 Evidencias experimentales

Para estudiar cómo se regulan epigenómicamente los procesos neurodegenerativos hay que tener en cuenta que el cerebro posee distintos linajes celulares que tienen una alta especialización en la función cerebral. Existen distintos modelos experimentales para el infarto cerebral en animales de laboratorio. Se sabe que la cantidad de DNA metilado aumenta en el cerebro después de la isquemia provocada por la oclusión transitoria de la arteria cerebral media (Endres et al., 2000). La actividad de DNMT1 ha sido evaluada por medio de inhibición con DAZA en modelos murinos de infarto, donde se observa una disminución en el tamaño de la lesión con respecto a un animal control. Además, en el mismo modelo; la viabilidad celular y el tamaño de la lesión son menores en un ratón heterócigo para esta enzima (*Dnmt*^{s/+} en un fondo 129/SV) (Endres et al., 2000). A la misma conclusión se llega si se utiliza un modelo con la enzima parcialmente suprimida exclusivamente en neuronas (*Camk2a-cre:Dnmt*^{1lox/+}) y una tendencia hacia una mejor evaluación neurológica (Endres, Fan, Meisel, Dirnagl y Jaenisch, 2001). Estudiando el efecto de la reperfusión sanguínea, en un modelo de infarto cerebral en jerbo, se ha demostrado que los niveles de expresión de DNMT1 disminuyen significativamente después de la hipoxia en neuronas piramidales hipocampales de la CA1 a partir de 96 horas después de infarto (Lee et al., 2013).

En los modelos *in vitro*, la isquemia se puede disectar en sus dos principales componentes fisiológicos: la privación de oxígeno (hipoxia) y/o la de glucosa. Se ha observado que en cultivos neuronales de hipocampo de ratón existen cambios en la metilación que pueden permanecer hasta 96 horas después de un evento hipóxico (Hartley et al., 2013). Estos correlacionan con la sobreexpresión de algunos genes de la vía Wnt como APC (*Adenomatosis Polyposis Coli Tumor Suppressor, WNT Signaling Pathway Regulator*) y CTNNBIP1 (*Catenin Beta Interacting Protein 1*), que son reguladores negativos de β -catenina y que además tenían sus promotores hipometilados después de hipoxia. En el mismo modelo, se ha documentado que la inhibición de la metilación en el DNA contrarresta la vulnerabilidad neuronal dada por la exposición a nicotina (Zhiping Hu et al., 2017). Asimismo, existe evidencia de que en procesos como la regeneración axonal y la plasticidad neuronal podrían ser promovidos por la desmetilación activa después de un ataque isquémico por medio de la expresión de factores

de crecimiento (Felling y Song, 2015). En genes que específicamente se expresan al alza debido a la hipoxia como eritropoyetina, se sabe que la cantidad de citosinas metiladas en las regiones reguladoras (promotor proximal y 5' UTR) disminuye en relación con la hipoxia y que ésta es tejido-dependiente (Yin y Blanchard, 2000), lo que permite la unión de HIF1 y su que transcripción sea inducida por hipoxia (Wenger, Kvietikova, Rolfs, Camenisch y Gassmann, 1998). Respecto a los TEs y su regulación por metilación, se ha reportado que diversos retrotransposones (IAP [*Intracisternal A-particle retrotransposon*], LINE1, MT [*Mouse transcript retrotransposon*], ORR1 [*Origin-Region Repeat 1 retrotransposon*], SINE B1 [*Short Interspersed Nuclear Element*], SINE B2 y VL30 [*Viral-like 30 element retrotransposon*]) aumentan su expresión después de la isquemia cerebral en ratones. En particular, IAP se expresó hasta 20 veces más con respecto a los ratones control y además su 5' LTR se encontraba hipometilado (S. Wang y Kelly, 2013)

El estrés oxidante es un importante componente de la isquemia cerebral (Chouchani et al., 2014; Sanderson, Reynolds, Kumar, Przyklenk y Hüttemann, 2013; L.-J. Wu et al., 2012) y se sabe que el daño provocado por H₂O₂ en neuronas cerebelares es exacerbado por la inhibición TET1 por medio de siRNA o knockout y, congruentemente, el daño es reducido con la administración de DAZA (Xin et al., 2015). La fuente más importante de ROS en la célula es la mitocondria, y está demostrado que la producción de éstos aumenta desde 2 h después del infarto cerebral provocado por la oclusión de la arteria cerebral media en rata. En congruencia con la producción de ROS, las mitocondrias pierden el potencial de membrana y se determina un aumento en la expresión de ciclofilina D (J. Li et al., 2012).

Las células endoteliales son otro tipo celular importante en la regulación de los procesos neurodegenerativos en la isquemia cerebral; dada su capacidad de regular el flujo sanguíneo y la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Se sabe que después del infarto ocurre un proceso de angiogénesis (Ergul, Alhusban y Fagan, 2012), y una de las proteínas que regula de manera negativa este fenómeno es la trombospondina 1 (TSP-1). Además, está reportado que después de 4 h de OGD, el promotor de TSP-1 se hipermetila y su expresión disminuye y congruentemente, después de 8 h de recuperación, el promotor se hipometila y su expresión aumenta. (Hu et al., 2006).

El conjunto de estudios experimentales nos muestra aspectos más detallados de lo que ocurre en el cerebro después de isquemia u OGD y su relación con la metilación del DNA. Claramente podemos sugerir que estos fenómenos patológicos modifican de manera genómica la metilación del DNA, tanto en genes como en regiones no génicas y éstas pueden explicar varios procesos que se sabe que ocurren por la isquemia/OGD y reperfusión/recuperación como la producción de ROS, angiogénesis, activación de la vía de HIF1, transcripción de TEs, etc. Como la metilación del DNA es tejido-específica, aún es necesario saber cómo cambia en cada tipo celular del cerebro, en este trabajo nos centraremos en los astrocitos dada su importancia fisiológica y patológica.

2.2.3 La metilación del DNA de astrocitos en la isquemia cerebral

De manera contrastante con respecto a la evidencia en neuronas; en cultivos de astrocitos murinos se ha evidenciado una hipermetilación global en el DNA bajo condiciones de baja glucosa y oxígeno (Yang, Wu, Sun, Cui y Li, 2016), y además una expresión al alza de DNMT1, DNMT3 y MBD2. Otra marca epigenética importante, la trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3), que normalmente se asocia a cromatina con transcripción activa, se regula al alza en astrocitos de animales sometidos a un modelo de infarto cerebral tanto a nivel genómico como en la expresión de las enzimas responsables de la reacción de metilación de histonas, como la H3K4 metiltransferasa (Chisholm et al., 2015). También se ha demostrado que los niveles de expresión de algunos miRNAs (miR-21, miR-29b, miR-30b, miR-107, miR-137 y miR-210) aumentan después de OGD en cultivos de astrocitos corticales de rata. En particular miR-29b aumentó su expresión de manera significativa a partir de 8 h de recuperación (Ziu, Fletcher, Rana, Jimenez y Digicaylioglu, 2011). Este miRNA está implicado en la regulación de DNMT3A, ya que está reportado que se une a su 3'UTR y su expresión es inversamente correlacionada a la de miR-29b (Fabbri et al., 2007). No existen hasta ahora más reportes publicados acerca del papel de la metilación del DNA en los astrocitos en el infarto o cualquier modelo de isquemia cerebral. Sin embargo, los datos reportados hasta ahora nos hacen llegar a la conclusión de que los astrocitos juegan un papel preponderante en la regulación de la función nerviosa y en la integración neurovascular, por lo que es necesario investigar los mecanismos por los cuales éstos pueden favorecer o empeorar la sobrevivencia neuronal en condiciones patológicas como la isquemia/reperfusión. Los mecanismos

epigenéticos como la metilación del DNA pueden modificar radicalmente la expresión genética y por lo tanto el potencial neuroprotector o neurodegenerativo de estas células, pero se desconoce a detalle la relación entre la metilación y la expresión genética en astrocitos humanos cuando experimentan isquemia/reperfusión. Se sabe que en otros procesos neurodegenerativos la metilación del DNA es un factor clave en la regulación de la sobrevivencia y muerte celular tanto a nivel de genes como en regiones reguladoras. Además, se sabe que la metilación del DNA cambia en los astrocitos después de OGD; por lo que el objetivo de este trabajo es establecer en un modelo de isquemia/recuperación en cultivos de astrocitos humanos para determinar los cambios en los niveles de metilación del DNA y los de expresión genética, a escala genómica y con un nivel de detección que evalúe la mayoría de las distintas regiones del genoma.

3. Objetivo

Determinar los cambios en la metilación y transcripción del DNA en astrocitos en respuesta a la privación de oxígeno y glucosa (OGD) y su posterior recuperación.

3.1 Objetivos particulares

- Determinar los niveles de metilación de DNA a escala genómica en astrocitos en respuesta a la privación de oxígeno y glucosa/recuperación por medio de inmunoprecipitación y secuenciación de DNA metilado (MeDIP-seq).
- Determinar los niveles de transcripción genética a escala genómica en astrocitos en respuesta a la privación de oxígeno y glucosa/recuperación por medio la secuenciación de mRNA (RNA-seq).
- Determinar en qué genes existe una correlación entre hipo- e hipermetilación del DNA y sub- y sobreexpresión de la expresión genética en astrocitos en respuesta a la privación de oxígeno y glucosa/recuperación.
- Identificar los principales genes, vías y redes de señalización que se alteran en relación a la privación de oxígeno y glucosa/recuperación.

4. Material y métodos

4.1 Células y condiciones experimentales

Se utilizaron astrocitos de glioblastoma no tumorigénicos (*Human Glioblastoma*, HGBM, ATCC® CRL-1620) cultivados en placas de 100 mm con medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12* (DMEM/F12) (Gibco) 10% suero fetal bovino (FBS) con un pasaje <10 en todos los experimentos. La normoxia está definida como el cultivo basal (95% aire, 5% CO₂) al alcanzar una confluencia de ~80%, la privación de oxígeno y glucosa (OGD) fue realizada con una cámara modular de hipoxia (STEMCELL 27310) con 100% N₂ durante 4 h y la recuperación se realizó después de las 4 h de OGD, reemplazando el medio sin glucosa con medio basal fresco e incubando durante 8 h para la recuperación de las células.

4.2 Western blot

Se colectó proteína total de células HGBM de pasaje <10 con buffer de radioinmunoprecipitación (RIPA; PBS, NP-40 1%, desoxicolato de sodio 0.5%, dodecil-sulfato de sodio (SDS) 0.1%, inhibidor de proteasas cOmplete™ (Roche)) y se cuantificó por medio del método de Lowry implementado en el kit *DC Protein Assay* (BIO-RAD). Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10% con 35 µg de proteína total y se transfirió el gel a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF), se bloqueó con leche descremada liofilizada 3% y se incubó con anticuerpos contra el factor en respuesta a hipoxia 1α, α-HIF1A 1:1000 (GTX30105), el factor de crecimiento vascular endotelial A, α-VEGFA 1:2000 (GTX16027) o la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, α-GAPDH 1:3000 (GTX627408) durante 16 h a 4°C. Posteriormente se incubó con un anticuerpo α-mouse acoplado a peroxidasa (*HRP*) 1:5000 (GTX26789) durante 1 h a temperatura ambiente. Se reveló la membrana en un fotodocumentador *C-DiGit*® *Blot Scanner* (LI-COR), se determinaron las intensidades de las bandas con Fiji (Schindelin et al., 2012) y se analizaron los datos en R 3.4.1 con una prueba ANOVA.

4.3 Inmunofluorescencia

Se evaluó la morfología típica de los astrocitos de las células HGBM y los cambios que se producen en respuesta a OGD y recuperación por inmunofluorescencia usando un anticuerpo contra el marcador de astrocitos GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*). Brevemente, células HGBM cultivadas en portaobjetos de vidrio en placas de 35 mm de pasaje <10 con una confluencia ~70% fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) 3.7% durante 15 min, permeabilizadas con 0.5% NP-40 durante 10 min y después incubadas con α -GFAP (Sigma G3893) 1:1000 durante 16 h a 4°C y ulteriormente con *Alexafluor 488 goat α -mouse* (Invitrogen A21121) y con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) 1 μ g/ml. Las células inmunofluorescentes fueron observadas con un microscopio de epifluorescencia Leica. Se determinó el largo de los procesos celulares y el diámetro de los núcleos de 100 células de tres experimentos independientes en Fiji y se analizaron estadísticamente con una prueba ANOVA y una prueba posthoc de Tukey-Kramer en R.

4.4 Ensayo de viabilidad LIVE-DEAD

Se colectaron células HGBM de pasaje <10 con una confluencia ~80% en condiciones de normoxia, OGD o recuperación con tripsina 0.25% y se realizó el ensayo de viabilidad con el kit *LIVE-DEAD Viability/Cytotoxicity Kit *for mammalian cells** (Molecular Probes) con las especificaciones del fabricante. Brevemente, se preparó una suspensión de células a una concentración de 1×10^6 células por ml y se incubó con calceína-AM-DMSO y/o homodímero de etidio durante 20 min. Se pasaron las células por un citómetro de flujo *Attune™ Acoustic Focusing Cytometer* (Thermo Scientific) con una banda de 530/30 nm de fluorescencia para la calceína-AM y una banda de 610/20 nm de fluorescencia para el homodímero de etidio. Se hizo un *gating* (separación y selección de partículas para crear subconjuntos de éstas con base en parámetros de la refracción de la luz en relación a un voltaje aplicado que indican el tamaño, granularidad y fluorescencia de las partículas en el citómetro, referido en la literatura académica en español e inglés como *gating*) de las partículas encontradas por FSC-A, FSC-H y SSC-H y una compensación con muestras teñidas con cada uno de los fluoróforos individualmente y un control sin teñir (Figura 1). Los resultados fueron graficados en el software del citómetro y el análisis estadístico en R con una ANOVA y una prueba posthoc de Tukey-Kramer.

4.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Como control para la inmunoprecipitación de DNA metilado se amplificó la secuencia del promotor de MAGEA1 (*Melanoma Antigen Family A, 1 (Directs Expression Of Antigen MZ2-E)*) que se encuentra hipermetilado en células de astrocitoma grado I (Yu et al., 2004) y que además está indicado como control positivo en el protocolo del *Roadmap Epigenomics Project* (2010) y en Maunakea et al. (2010). El DNA sonificado (Input) y el DNA inmunoprecipitado con α -5-metilcitosina (MeDIP) se amplificaron por medio de PCR punto final usando los siguientes *primers*: F: GTTCCCGCCAGGAAACATC; R: GAACTCTACGCCGTCCCTCAG. Como control negativo se utilizó el promotor de GAPDH que se encuentra no metilado en todos los tejidos (Wu, Ding, Li, Zhu y Xiong, 2013) y además indicado como control negativo en el protocolo *Roadmap Epigenomics Project* (2010) y en Maunakea y colaboradores (2010). El DNA sonificado (input) y el DNA inmunoprecipitado con α -5-metilcitosina (MeDIP) se amplificó por medio de PCR punto final usando los siguientes *primers*: F: CGTAGCTCAGGCCTCAAGAC; R: GCTGCGGGCTCAATTTATAG. El PCR se realizó con el kit *PCR Master Mix* (Thermo Scientific) con los siguientes parámetros de corrida: 1 ng de DNA, 1 μ M de cada primer, desnaturalización inicial a 95°C por 2 min, desnaturalización a 95°C por 30 s, alineamiento a 62°C por 30 s, extensión a 72°C por 1 min por 40 ciclos y extensión final a 72°C por 10 min. Los productos de la reacción fueron analizados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2% y el DNA marcado con bromuro de etidio 10 mg/ml. Las densitometrías de las bandas fueron determinadas en Fiji, se calculó el enriquecimiento relativo con respecto al *input* (Figura 2A-C) y se realizó una ANOVA para evaluar su significancia estadística en R 3.4.1.

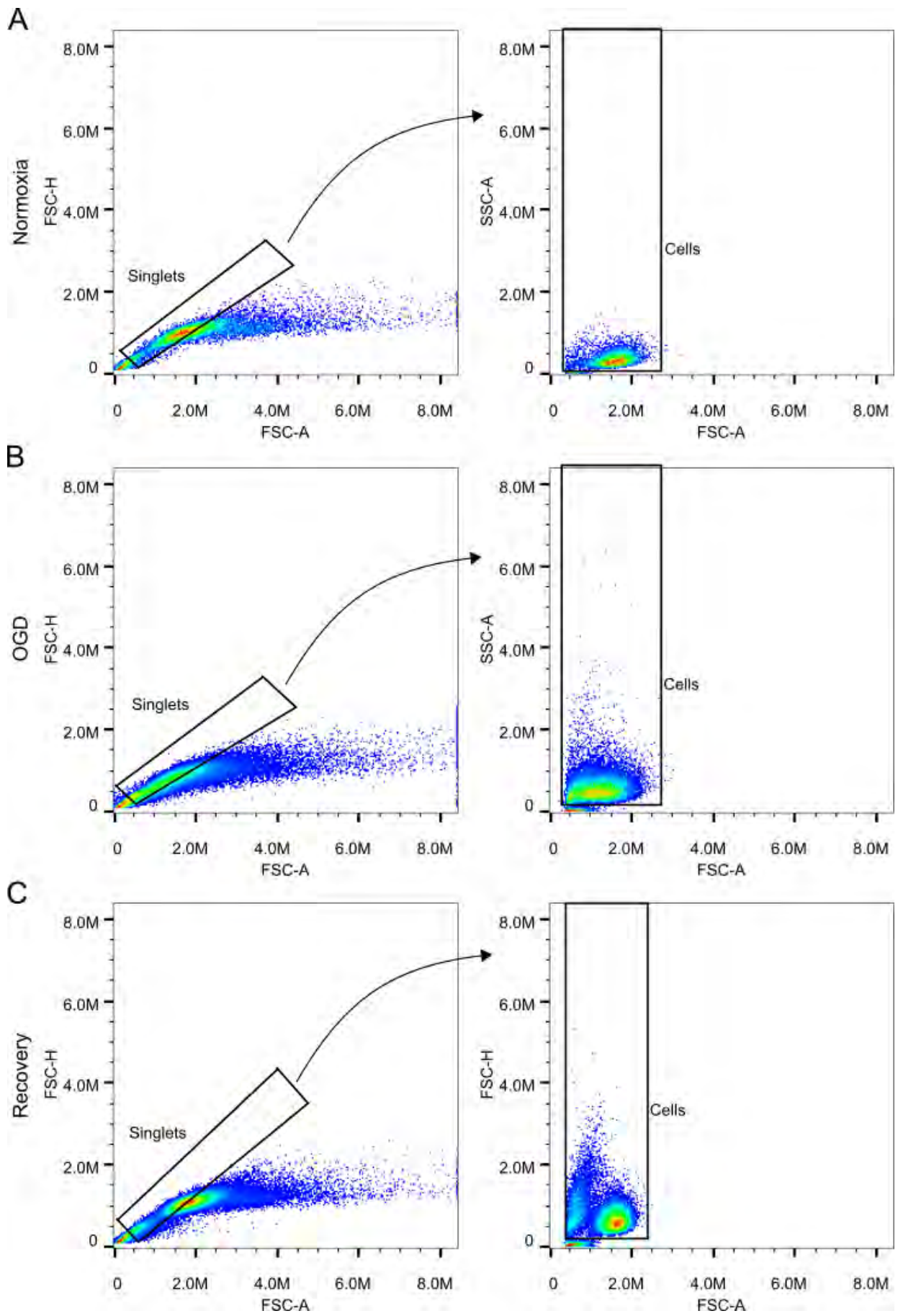


Figura 1. Imágenes representativas de 8 réplicas del *gating* de las células previo al ensayo de viabilidad LIVE-DEAD. Se muestra el *gate* en FCS-A y FCS-H y después el *gate* en FCS-A y SSC-A en A) Normoxia, B) OGD y C) Recuperación. FCS-A: *forward scatter-area*, FCS-H: *forward scatter-height*, SSC-A: *side scatter-area*. Los parámetros de refracción a una longitud de onda dada permiten conocer qué partículas son células individuales y de un tamaño definido. Existe una relación lineal entre FCS-A y FCS-H cuando las células son individuales, por lo que el primer *gate* se hace con esta selección. El segundo *gate* consta de un rango de FCS-A (0.25M-2.25M AU), que habla acerca del tamaño de las células individuales, y otro de SSC-A que indirectamente informa de la granularidad de la población celular que tiene un mínimo de ~0.125M AU y se extiende para abarcar diferentes estados celulares con diferente granularidad que se sabe cambian con respecto al estado metabólico y fase de ciclo celular.

4.6 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa en tiempo real (RT-qPCR)

Para determinar el nivel de expresión de mRNA de genes normalmente sobreexpresados en respuesta a isquemia y validar el modelo se amplificaron los mensajeros de VEGFA y HIF1A. Brevemente, se extrajo RNA total de cultivos de células HGBM de pasaje <10 a una confluencia ~80% en condiciones de normoxia, OGD o recuperación por medio del kit *PureLink™ RNA Mini Kit* (Ambion) con las especificaciones del fabricante. El RNA total fue cuantificado por medio de absorbancia UV a 260 nm en un espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) y su pureza evaluada con el cociente de absorbancia 260/280 nm ~ 2.0 y 260/230 nm ≥ 2.0. El RNA fue convertido a cDNA por medio del kit *Verso SYBR Green 1-Step qRT-PCR Kit* (Thermo Fisher) con las especificaciones del fabricante, 10 ng de RNA total fueron utilizados para cada reacción con 100 nM de los siguientes *primers*: para VEGFA; F: ATGAGCTTCCTACAGCACAAC; R: CACCAACGTACACGCTCC, para HIF1A; F: GAAAGCGCAAGTCTTCAAAG; R: TGGGTAGGAGATGGAGATGC, y para GAPDH; F: CATGTTCGTCATGGGGTGAACCA; R: AGTGATGGCATGGACTGTGGTCAT. El PCR se realizó con los siguientes parámetros de corrida: síntesis de cDNA 50°C por 15 min, inactivación de la transcriptasa reversa 95°C por 15 min, desnaturalización a 95°C por 15 s, alineamiento a 60°C (VEGFA), 58°C (HIF1A) ó 62°C (GAPDH) por 30 s, extensión a 72°C por 30 s por 40 ciclos en un *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). El cambio en los niveles de expresión fue determinado por medio de la comparación de los Ct de cada reacción con la fórmula: $fold\ change = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{experimental} - \Delta Ct_{control} = (Ct_{target\ gene\ experimental} - Ct_{housekeeping\ gene\ experimental}) - (Ct_{target\ gene\ control} - Ct_{housekeeping\ gene\ control})$. La significancia estadística de los *fold change* fue evaluada con una ANOVA en R 3.4.1.

4.7 Extracción y secuenciación de RNA (RNA-seq)

Se extrajo RNA de cultivos de células HGBM de pasaje <10 a una confluencia ~80% en condiciones de normoxia, OGD o recuperación por medio del kit *PureLink™ RNA Mini Kit* (Ambion) con las especificaciones del fabricante. El RNA total fue cuantificado por medio de absorbancia UV a 260 nm en un espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) y su pureza evaluada con el cociente de absorbancia 260/280 nm ~ 2.0 y 260/230 nm ≥ 2.0, la integridad del RNA fue estimada por medio de un gel de agarosa al 2% observando las bandas correspondientes al 28S y 18 rRNA (Figura 2B). Se enviaron 1000 ng de RNA de muestras que pasaron las pruebas de calidad al *DNA Sequencing Center* de la *Brigham Young University*, en la cual el mRNA total fue seleccionado con perlas magnéticas acopladas a oligo-dT por medio del kit *KAPA stranded mRNA-Seq Kit* (KAPA BIOSYSTEMS), se fragmentó con calor y Mg²⁺, se sintetizó la primera cadena de cDNA con *primers* aleatorios y la segunda convirtiendo el RNA:cDNA a cDNA de doble cadena (dscDNA) además de reemplazar los dTTPs por dUTPs en la nueva cadena de cDNA. Posteriormente se adicionó dAMP a los extremos 3' del dscDNA y se ligaron los adaptadores de secuenciación con un *overhang* de 3'-dTMP y se amplificó por medio de PCR de alta fidelidad y se secuenció una plataforma Illumina HiSeq 2500 con una corrida *High Output v4 single-end* de 50 ciclos.

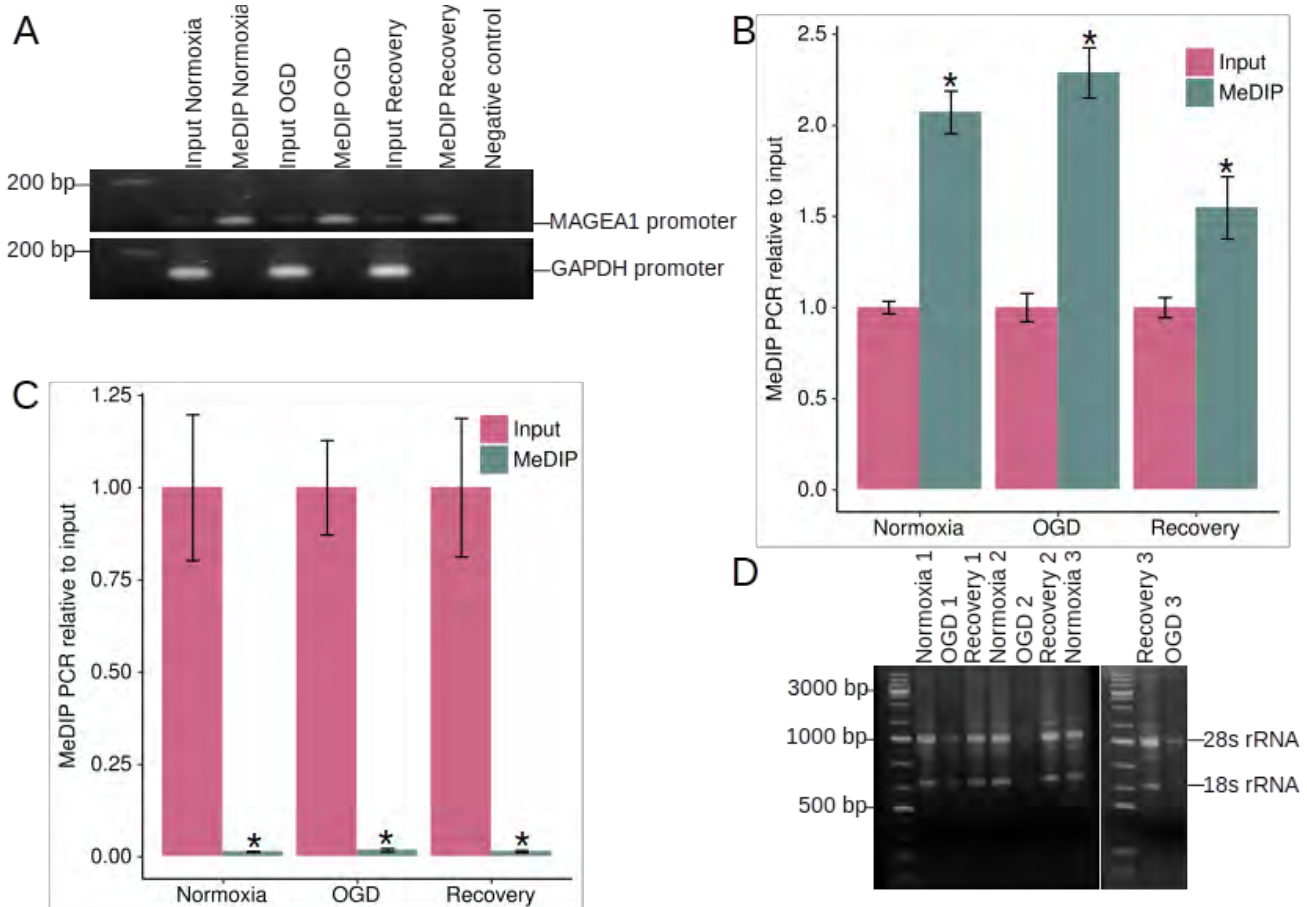


Figura 2. Controles calidad de la inmunoprecipitación de DNA metilado y de RNA. A) PCR que muestra la amplificación del promotor de (B) MAGEA1 y de (C) GAPDH y la cuantificación de su enriquecimiento con respecto al input por cada condición experimental, imagen representativa de 3 experimentos independientes. D) Geles de agarosa 2% de las muestras de RNA con un marcador de peso molecular de DNA. Se muestran las bandas correspondientes al rRNA 28S y 18S. * $p < 0.05$ con respecto a su *input* correspondiente.

4.8 Análisis de RNA-seq

Se obtuvieron entre 20-25 millones de *reads* por muestra de RNA (triplicados por tratamiento) que fueron primeramente filtrados por *score* Phred ≥ 30 y por presencia de adaptadores de Illumina en FASTQC 0.11.5 (Babraham Bioinformatics) para obtener alrededor de 20 millones de *reads* con calidad suficiente para los análisis posteriores. Las secuencias fueron alineadas a GRCh38.90 por medio de HISAT2 2.1.0 con opciones predeterminadas y se obtuvo la matriz de expresión por medio de HTSeq 0.8.0 con la opción *-intersection-nonempty* con la anotación de ENSEMBL para GRCh38.90. El análisis de expresión diferencial fue realizado en R 3.4.1 por medio de DESeq2 con la opción del test de Wald y las gráficas de volcán (*volcano plot*) que se construyeron con el paquete *ggplot2* con los cambios en expresión y el $-\log_{10}$ del valor de *p* y posteriormente anotados los genes de interés con expresión diferencial significativa por medio de Inkscape 0.92. Los *heatmaps* fueron realizados por medio del paquete *pheatmap* con una transformación de la matriz de expresión \log_2 para normalizar las cuentas de genes y con un agrupamiento (*clustering*) con el método de Ward (Murtagh y Legendre, 2014) y un agrupamiento por distancias euclidianas de los tratamientos. Los diagramas de Venn fueron realizados en Inkscape 0.92 con la información proporcionada por los conjuntos de Venn en el paquete *VennDiagram* de los genes diferencialmente expresados al alza y a la baja. Los análisis de ontología fueron realizados en *clusterProfiler* en R con la matriz de expresión promediada por tratamientos donde se obtuvieron los enriquecimientos de vías KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) y del *Reactome Pathway Database*.

4.9 Precipitación de DNA metilado y secuenciación (MeDIP-seq)

Se realizó el MeDIP-seq basado en los protocolos de Taiwo y colaboradores (2012) y de Borgel, Guibert y Weber (2012). Se extrajo DNA total de células HGBM con pasaje < 10 a una confluencia $\sim 80\%$ por medio de fenol-cloroformo y precipitación en etanol en condiciones de normoxia, OGD o recuperación. El DNA total fue cuantificado por medio de absorbancia UV a 260 nm en un espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) y su pureza evaluada

con el cociente de absorbancia $260/280 \text{ nm} \sim 1.8$ y $260/230 \text{ nm} \geq 2.0$, la integridad del DNA fue estimada por medio de un gel de agarosa al 1% observando no degradación del DNA y corrimiento nulo o poco del mismo. Después el DNA fue sonicado aleatoriamente en un sonicador ultrasónico (Cole Palmer) para generar fragmentos de entre 200-600 bp con opciones de amplitud 50, switch 25 durante 5 pulsos de 15 s y 30 s entre pulso para evitar calentamiento. El DNA sonicado fue corrido en un gel de agarosa al 1% para comprobar un enriquecimiento en fragmentos de entre 200 a 600 bp y que no hubiera fragmentos mayores a 1000 bp. Se alicuotaron 100 ng de DNA para la inmunoprecipitación en 135 μl de H_2O . Brevemente, se desnaturalizó el DNA sonicado a 95°C durante 10 min e inmediatamente después se colocó en hielo para evitar la renaturalización. Se incubó con 10 μl de α -5-metilcitosina (GeneTex GTX629448) y 15 μl buffer de inmunoprecipitación 10X (100 mM NaH_2PO_4 , 1.4 M NaCl, 0.5% Triton X-100, pH 7.0) durante 12 h a 4°C en un rotador de cabeza, después se incubó con 100 μl perlas magnéticas α -mouse (Dynabeads M-280 11201D) previamente prebloqueadas con 0.05% PBS-BSA en una gradilla magnética (MagnaRack CS15000) y resuspendidas en buffer de inmunoprecipitación 1X durante 12 h a 4°C en el rotador de cabeza.

Posteriormente se colectaron los inmunocomplejos en la gradilla magnética con tres lavados de buffer de inmunoprecipitación y posteriormente se incubaron a 65°C durante 1 h para eluir el DNA de las perlas y el anticuerpo y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min y se colectó el sobrenadante. El DNA inmunoprecipitado fue purificado por medio del kit *ChIP DNA Clean & Concentrator* (ZYMO RESEARCH) con las especificaciones del fabricante. Se enviaron 10 ng de DNA inmunoprecipitado de muestras que pasaron las pruebas de calidad antes mencionadas, al *DNA Sequencing Center* de la *Brigham Young University*, en la cual se evaluó nuevamente la integridad y cantidad de DNA por medio de electroforesis de microfluidos en un Bioanalyzer 2100 (Agilent) y se seleccionaron las bandas de 200-400 bp (Figura 3) para la construcción de las bibliotecas de secuenciación de genoma completo con el kit *Illumina TruSeq DNA*. Las bibliotecas fueron secuenciadas en una plataforma Illumina HiSeq 2500 con una corrida *single-end* de 50 ciclos.

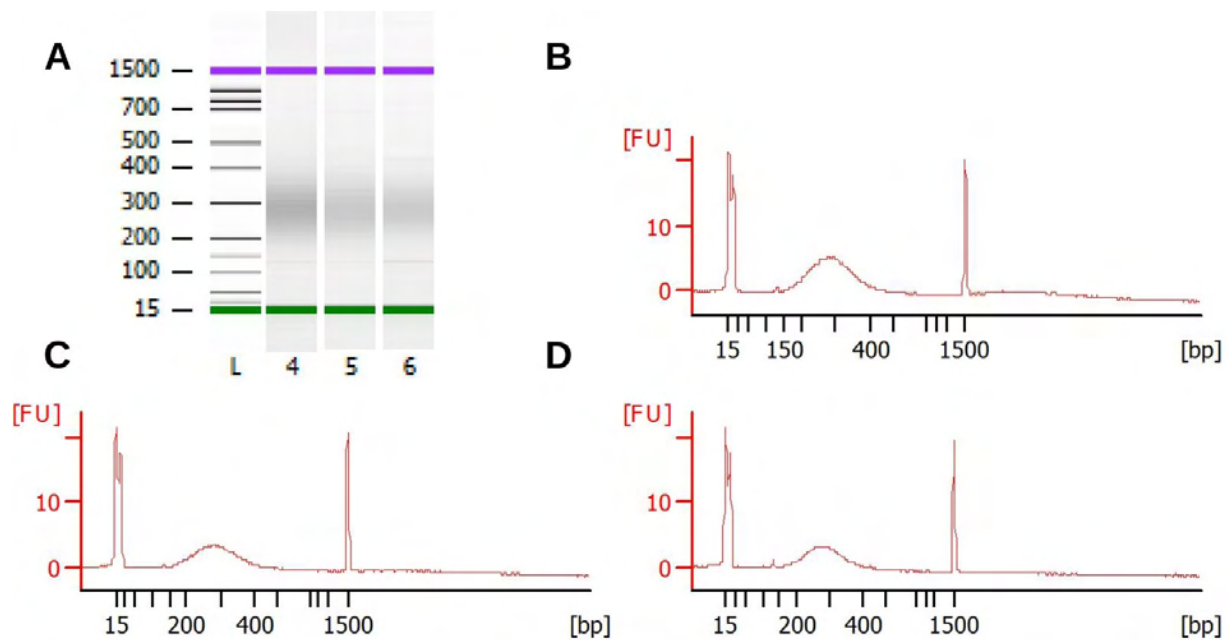


Figura 3. Prueba de calidad de las muestras de MeDIP-seq. A) Electroforesis en microfluidos de las muestras de MeDIP-seq. Enriquecimiento en la banda entre 200-400 bp, línea 4 normoxia, línea 5 OGD, línea 6 recuperación. B) Intensidad de fluorescencia de los electroferogramas de cada condición con tamaños determinados (15, 150, 400 y 1500 bp) en normoxia, C) OGD y D) Recuperación. La calidad de las muestras se observa al estar concentrado la mayor parte del DNA entre las bandas de 200-400 bp y poca abundancia en los demás tamaños.

4.10 Análisis de MeDIP-seq

Se obtuvieron entre 25-45 millones de *reads* por muestra de DNA que fueron primeramente filtrados por *score* Phred ≥ 30 y por presencia de adaptadores de Illumina en FASTQC 0.11.5 (Babraham Bioinformatics) para obtener alrededor de 25 millones de *reads* con calidad suficiente para los análisis posteriores. Las secuencias fueron alineadas a GRCh38.90 por medio de HISAT2 2.1.0 con la opción *--no-spliced-alignment*. Para comprobar que existe un enriquecimiento de las muestras de DNA inmunoprecipitado por parte del *input*, se analizó el enriquecimiento de *reads* a lo largo del genoma dividido en *bins* en Repitools (Figura 4). Para la correlación entre los datos de expresión con los de metilación se modificó el protocolo de Klein y Schäfer (2016). Después del alineamiento, se marcaron los *reads* duplicados en Picard y se utilizó el paquete de R Epigenomix para calcular una medida de correlación (*z-score*) en un modelo bayesiano mixto que provee una clasificación basada en componentes ponderados mixtos para evaluar los genes sobremetilados o submetilados en las distintas condiciones. El modelo proporciona un estadístico (*z-score*) que permite conocer si existe una relación entre la expresión y la metilación y de qué tipo es esta relación (positiva, negativa o nula), además se graficaron los *z-score*, el cambio en expresión de RNA y el cambio de metilación en R con la función *scatter3D* y las figuras fueron estilizadas en Inkscape 0.92. Para obtener los cambios

en metilación de las islas CpG se analizaron las muestras alineadas por medio de bootstraps generados por IsoEM2 y las diferencias entre muestras con un algoritmo esperanza-maximización en IsoDE2 (Mandric et al., 2017). El panorama general de las islas CpG fue graficado en un *heatmap* con el paquete de R *pheatmap* con una transformación \log_2 de los FPKM de cada isla CpG para normalizar cada sitio y con un agrupamiento con el método de Ward un agrupamiento por distancias euclidianas de los tratamientos. Para conocer la localización genómica de la metilación se obtuvieron picos de metilación por medio de MACS 2.1.0 con la opción *--broad* y analizados por medio del paquete de R *CHIPseeker* en el que se obtuvieron las distancias a los sitios de inicio de la transcripción (TSS), y la clasificación por regiones genómicas de los sitios metilados con la anotación de GRCh38.90.

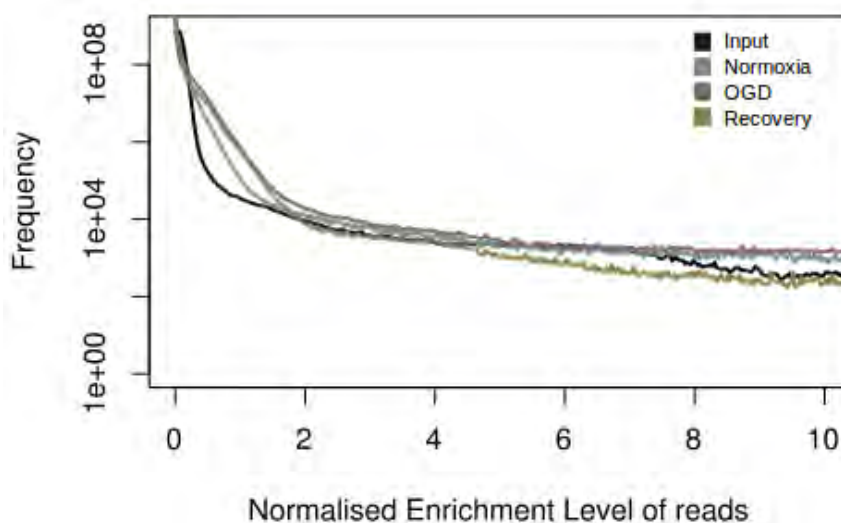


Figura 4. Enriquecimiento de DNA metilado con respecto al input por parte de las muestras de MeDIP-seq a lo largo del genoma. Se cuantifica el número de *reads* que cubren cada bp del genoma para saber la cobertura de secuenciación para saber si los *reads* están dispersos a lo largo de todo el genoma o se agrupan. Se observa en las muestras de MeDIP un enriquecimiento con respecto al *input* ya que hay una gran cantidad de *reads* con niveles >0 de cobertura, a diferencia del *input*, donde la mayoría de los *reads* tienen una cobertura de ~0.

5. Resultados

5.1 Respuestas celulares a OGD y recuperación en astrocitos

Para conocer los cambios en el patrón de metilación de DNA y la expresión génica inducidos por OGD y su recuperación se utilizó un modelo de isquemia *in vitro*. Utilizamos cultivos de

células astrocíticas expuestas a un ambiente de 100% N₂ durante 4 h con medio sin glucosa ni piruvato y 8 h de recuperación en medio con glucosa y piruvato en condiciones de cultivo normales. Comprobamos que este modelo corresponde a los cambios normalmente asociados *in vivo* después de la isquemia cerebral como son la entrada a la apoptosis y necrosis celular, determinada por el ensayo *LIVE-DEAD* con citometría de flujo (Figura 5A), en el que se marcan las células metabólicamente activas con calceína-AM, que es metabolizada por esterasas intracelulares a calceína, un fluoróforo con una alta emisión en verde (~495/515 nm). Las células con la membrana plasmática comprometida son marcadas con homodímero de etidio ya que éste es normalmente impermeable, pero si la célula está muerta o en estado de apoptosis, el fluoróforo entrará al núcleo y se unirá al DNA emitiendo fluorescencia en rojo (~528/617 nm). Si una célula presenta ambos marcadores se considera como apoptótica ya que contiene aún metabolismo relativamente activo pero una membrana comprometida (Figura 5A, Palma et al., 2008). Podemos observar que hay una entrada masiva a la apoptosis en OGD que disminuye considerablemente en la recuperación, pero aun así es significativamente mayor con respecto a la apoptosis basal en normoxia en ambas condiciones. Igualmente, observamos un aumento en las células necróticas tanto en OGD como en recuperación con respecto a normoxia, sin embargo, no es estadísticamente significativo este cambio ($n = 3$, con al menos 10 000 células por experimento).

Por medio de inmunofluorescencia contra GFAP, podemos observar cambios morfológicos después de la OGD (Figura 5B-D) como una condensación nuclear y una disminución en el tamaño de los procesos celulares que normalmente están presentes en la normoxia (Figura 5D), observamos que después de la recuperación (Figura 5B, panel derecho) las células aún tienen el núcleo condensado y algunas prolongaciones siguen retraídas y otras comienzan a recuperarse. Otro de los marcadores de isquemia es la estabilización de HIF1A (Figura 5E-F) que normalmente se expresa constitutivamente y es continuamente degradado por la vía proteosomal por medio de PHD2 (*prolyl hydroxylase domain-containing protein 2*), enzima que hidroxila a HIF1 en P564 y P402, marcándolo para su ubiquitinación por pVHL (*phosphoryl Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor*, Maxwell et al., 1999). La reacción de PHD2 es dependiente de O₂ por lo que en un estado hipóxico HIF1 se estabilizará y no se degradará y llevará a cabo su papel como factor de transcripción. Asimismo, la sobreexpresión de VEGFA (Figura 5E-F; Iijichi, Sakuma y Tofilon, 1995) es uno de los marcadores de isquemia que más se reportan

tanto en astrocitos como en otro tipo de células dado que su expresión es en parte regulada por HIF1 y efectivamente se vio regulado al alza tanto en proteína como en mRNA y con una tendencia a mantenerse elevado aún después de 24 h de reperfusión (Figura 5F). Bajo las condiciones experimentales a las que sometimos a las células comprobamos ambos marcadores de isquemia están presentes.

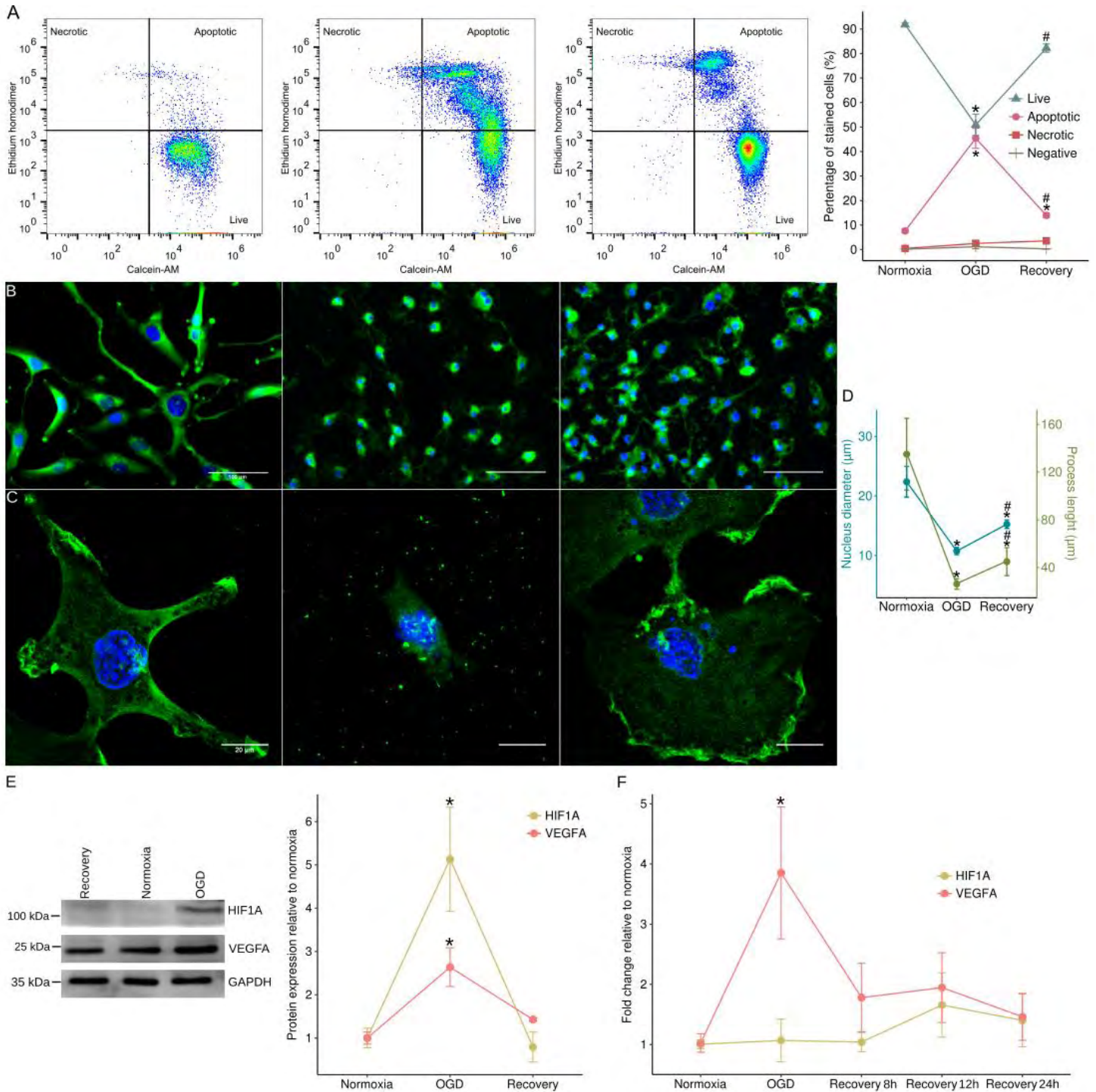


Figura 5. Los astrocitos experimentan una serie de cambios morfofuncionales en respuesta a la privación de oxígeno y glucosa y recuperación. A) Imágenes representativas de la clasificación celular individual por marcaje de calceína-AM y homodímero de etidio por medio de citometría de flujo en normoxia, OGD y recuperación respectivamente, y su cuantificación. (B,C) Inmunofluorescencia que muestra la expresión de GFAP en normoxia (derecha). Se observan cambios morfológicos después de 4 h de OGD (centro) y 8 h de recuperación (izquierda) en epifluorescencia (B, barra de escala: 100 μm) y en microscopía confocal (C, barra de escala: 20 μm) y la cuantificación del largo de los procesos celulares, así como del diámetro de los núcleos (D) de 100 células de tres experimentos independientes. E) Western blot contra HIF1A y VEGFA y su cuantificación en los distintos tratamientos. F) RT-qPCR en el que se amplificó mRNA de HIF1A y VEGFA y su cuantificación en los distintos tratamientos. * $p < 0.05$ con respecto a normoxia. # $p < 0.05$ con respecto a OGD. $n = 3$ para todos los experimentos.

5.2 Cambios en la expresión genética

Una vez establecido el modelo con OGD y habiendo observado las diferencias morfológicas y marcadores canónicos de isquemia procedimos al análisis del transcriptoma por medio de RNA-seq. Se obtuvieron de 18 a 25 millones de *reads* por réplica, de las cuales el 80-85% se alineó una vez a un sitio único en el genoma. En la figura 6A se muestra el agrupamiento de las muestras analizadas que demuestra una concordancia de las réplicas con su respectivo tratamiento. En la figura 6B podemos observar el patrón general de expresión del transcriptoma y se pueden discernir diferencias en la expresión de algunos genes. Igualmente, las réplicas se agrupan con sus respectivos tratamientos. Identificamos 154 genes regulados al alza y 69 genes regulados a la baja con un *log fold-change* ≥ 2 ó ≤ -2 respectivamente en OGD con respecto a normoxia (1326 y 1343 regulados diferencialmente totales respectivamente), 182 al alza y 292 a la baja en recuperación con respecto a OGD (2570 y 2713 genes en total) y 65 al alza y 26 a la baja en recuperación con respecto a normoxia (651 y 555 totales) con un FDR (*false discovery rate*) < 0.1 .

En la figura 7A-C se muestran los *heatmaps* de las cuentas de los genes diferencialmente expresados y se aprecia cómo cambia la expresión en las distintas comparaciones de cada tratamiento por réplica. En la figura 7D-F se muestran las gráficas de volcán correspondientes a cada comparación entre condiciones, así como algunos genes de interés que mostraron un incremento o decremento (*fold-change*) significativo (FDR > 0.1) y se observa cómo se distribuyen los genes según su significancia estadística relativo a su cambio en la expresión.

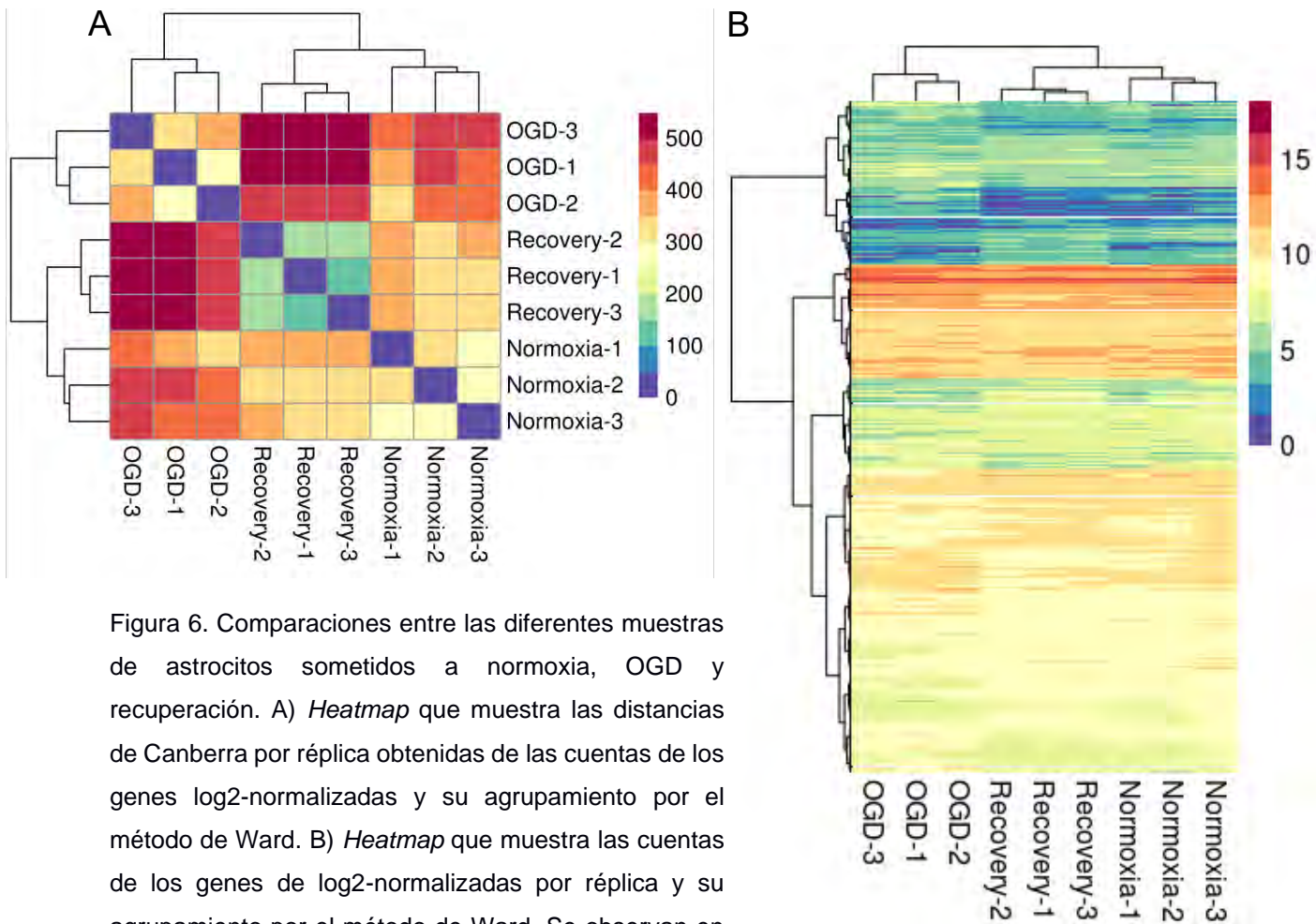


Figura 6. Comparaciones entre las diferentes muestras de astrocitos sometidos a normoxia, OGD y recuperación. A) *Heatmap* que muestra las distancias de Canberra por réplica obtenidas de las cuentas de los genes log2-normalizadas y su agrupamiento por el método de Ward. B) *Heatmap* que muestra las cuentas de los genes de log2-normalizadas por réplica y su agrupamiento por el método de Ward. Se observan en ambos paneles los grupos formados por los tratamientos y además un grupo formado por los tratamientos recuperación y normoxia.

Entre los genes regulados al alza encontramos a FLCN que se sabe que puede ser un blanco efector de fosforilación de las vías de mTOR/AMPK y regular las vías de señalización de sensado de energía y nutrientes (Baba et al., 2006); otro de los genes encontrados es SLC3A2 (*Solute Carrier Family 3 Member 2, 4F2HC*) que es un transportador de aminoácidos cuya proteína CD98 se asocia con otros transportadores y asegura la presencia un contenido balanceado a aminoácidos en la célula que a su vez permite regular el estrés oxidativo vía CD98/xCT además de incrementar la síntesis de proteínas y la proliferación celular (Ballina et al., 2016). HRK (*Harakiri, BCL2 Interacting Protein*) también se encuentra regulado al alza después de la OGD con respecto a la normoxia y es un miembro de la familia BCL-2 que promueve la muerte celular por medio de la vía mitocondrial por medio de la interacción con BAD (*Bcl-XL/Bcl-2-*

Associated Death Promoter) y p32 (*Complement Component 1, Q Subcomponent Binding Protein, Mitochondrial*; Rizvi, Heimann, Herrnreiter y O'Brien, 2011).

Entre los genes que encontramos regulados a la baja después de la OGD con respecto a la normoxia tenemos a TXNIP (*Thioredoxin Interacting Protein*) que es un regulador negativo de la tioredoxina y uno de los principales moduladores del sistema redox de la célula (J. Zhou y Chng, 2013). Otro de los genes regulados a la baja es ETNK1, que es una etanolamina cinasa que cataliza la formación de fosfoetanolamina, que es el primer paso en la síntesis de fosfatidiletanolamina. SMAD6 (*SMAD Family Member 6*) también fue encontrado regulado a la baja después de OGD con respecto a la normoxia y se sabe que es un regulador negativo de la vía no canónica TGF- β 1-TRAF6-TAK1-p38 MAPK/JNK reclutando a la enzima desubiquitinizadora A20 (*TNF Alpha Induced Protein 3*) e inhibiendo la poliubiquitinación de TRAF6 (*TNF Receptor Associated Factor 6*) inducida por TGF- β 1 (Jung et al., 2013).

Entre los genes encontrados regulados al alza en la recuperación con respecto a OGD tenemos a BEX2 (*Brain Expressed X-Linked 2*) que cuya proteína regula la proliferación y migración celular en gliomas (Meng et al., 2014; X. Zhou et al., 2012). RET (*Rearranged during transfection*) también fue regulado al alza y se sabe que es un receptor de tirosina cinasa del factor derivado de células gliales (GDNF), cuya activación por fosforilación tiene como efecto la diferenciación y sobrevivencia neuronal mediada por GDNF en las vías Ras/MAPK y PI3K/AKT (Coulpier, Anders y Ibáñez, 2002). Entre los genes regulados a la baja encontramos a NETO1 (*Neuropilin And Tolloid Like 1*) que es un componente del complejo del receptor de NMDA y está reportado que ratones deficientes de este gen tienen un decremento en el número de receptores de NMDA en las sinapsis con respecto a ratones *WT*, además de que presentan un déficit en la potenciación a largo plazo así como el aprendizaje espacial y de memoria (Ng et al., 2009); otro de los genes encontrados regulados a la baja en la recuperación con respecto a OGD es BIRC5 (*Baculoviral IAP Repeat Containing 5*) que forma parte del complejo *Chromosomal Passenger Complex* (CPC) que conforma y regula la maquinaria necesaria para el movimiento de los cromosomas que lleva a la citocinesis (Carmena, Wheelock, Funabiki, y Earnshaw, 2012). Además, pertenece a las proteínas inhibidoras de la apoptosis (AIPs) ya que interactúan físicamente con las caspasas. EZH2 (*Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit, Lysine N-Methyltransferase 6*) es otro de los genes que

se encontraron al grupo de genes regulados a la baja en la recuperación con respecto a OGD, y es una lisina-N-metiltransferasa de histonas y está reportado que su inhibición farmacológica o genética disminuye la viabilidad y disminuye el crecimiento celular en glioma humano (Jin et al., 2017).

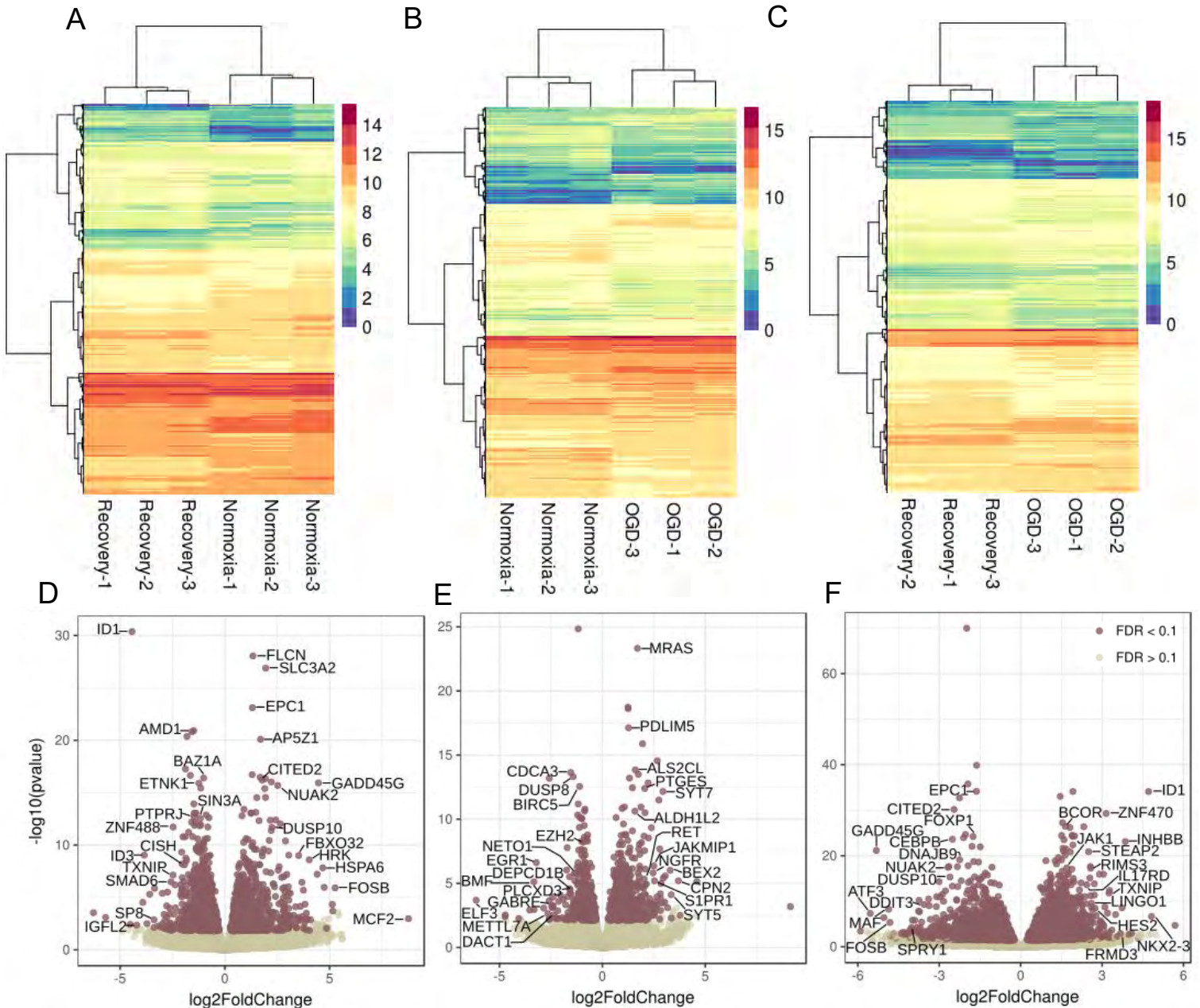


Figura 7. Perfil de expresión de células astrocíticas sometidas a normoxia, OGD y recuperación. (A, B, C) Heatmap de los genes diferencialmente expresados, valores en cuentas por gen log₂-normalizadas por réplica, con agrupamiento por el método de Ward en A) OGD vs normoxia, B) recuperación vs OGD y C) recuperación vs normoxia. (D, E, F) Se muestran las gráficas de volcán con los valores de *fold-change* y el valor de *p* con algunos genes de interés resaltados de OGD vs normoxia (D), recuperación vs OGD (E) y recuperación vs normoxia (F), los puntos de color representan los genes con FDR < 0.1.

Entre los genes encontrados regulados al alza en la recuperación con respecto a la normoxia tenemos a IL17RD que es el receptor D de la interleucina 17 y se sabe que está sobrerregulado en procesos inflamatorios asociándose con TNFR2 (*Tumor Necrosis Factor Receptor Type II*) para activar la vía NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa B*) a través de la proteína adaptadora TRAF2, provocando la agregación de los receptores TNFR2-IL17RD (Yang et al., 2015); BCOR (*BCL6 Corepressor*) fue otro de los genes encontrados y su producto proteico inhibe la expresión de Bcl6 (*B-cell lymphoma 5 Protein*) uniéndose a su promotor y está reportado que interactúa con el C-terminal de IRF8 (*Interferon Regulatory Factor 8*) formando un complejo que aumenta la represión transcripcional de Bcl6 en el proceso de diferenciación de células B (Yoon et al., 2014). STEAP2 (*STEAP Family Member 2, Metalloreductase*) también fue encontrado como regulado al alza en la recuperación con respecto a la normoxia y es una metaloreductasa reductora de hierro e incrementa la captura de hierro no unido a transferrina y de cobre en distintos tipos celulares (Ohgami, Campagna, McDonald y Fleming, 2006).

En el grupo de genes regulados a la baja encontramos a CITED2 (*Cbp/P300 Interacting Transactivator With Glu/Asp Rich Carboxy-Terminal Domain 2*) que es una proteína de unión a CBP/p300 y se sabe que una reducción en CITED2 resulta en un incremento en la apoptosis mediada por p53 (*P53 Tumor Suppressor, TP53*), así como un aumento en la expresión de CDKN1A y un decremento en Bcl2 (*B-cell lymphoma 2 Protein*). Además, se ha descrito que puede bloquear la actividad de HIF1- α y NF- κ B compitiendo por p300 (*E1A Binding Protein P300*) y contrariamente, facilitar la progresión del ciclo celular mediada por MYC (*MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor*) y PPAR α (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha*, Mattes, Berger, Geugien, Vellenga y Schepers, 2017); DDIT3 fue otro de los genes regulados a la baja en la recuperación con respecto a la normoxia. Este gen es el transcrito 3 inducible por daño a DNA y es un factor de transcripción que se sabe puede formar complejos con JUN y otros miembros de la familia AP-1 que provocan la apoptosis mediada por BAX. Su deficiencia puede mejorar la sobrevivencia neuronal en modelos de degeneración axonal (Syc-Mazurek, Fernandes, Wilson, Shrager y Libby, 2017). NUA2 (*NUAK Family, SNF1-Like Kinase, 2*) también pertenece a este grupo y es una cinasa que cuando es silenciada por medio de shRNAs se inhibe la proliferación de células de glioma y que miR-143 puede degradar el transcrito de NUA2 y provocar igualmente una inhibición de la proliferación, migración e invasión de células tumorigénicas (Fu, Wang, Li, Li y Li, 2016).

En la figura 8 observamos conjuntos de genes que se agrupan en diagramas de Venn según cómo cambian en las distintas condiciones. En algunos genes, como ALS2CL (*ALS2 C-Terminal Like*), tienen un patrón a sobreexpresarse en todas las comparaciones de cada condición (Figura 8A), y está demostrado que el producto de este gen tiene actividad catalítica contra GTPasas pequeñas y puede unirse a Rab5 (*RAS-Associated Protein RAB5*). ALS2CL funciona como un modulador funcional de las reacciones mediadas por Rab5 y se localiza en las vesículas Rab5 positivas/EEA1 (*Early Endosome Antigen 1*) negativas y en los subcompartimientos endosomales (Hadano et al., 2004). MXD3 (*MAX Dimerization Protein 3*) tiene un patrón hacia subexpresarse en todas las comparaciones de los tratamientos (Figura 8B), y es un miembro de la familia de genes Mad, que son interactores de las proteínas Max. Se sabe que cuando se hace un *knockdown* de MXD3 por medio de siRNAs se produce apoptosis y disminución de la actividad de las caspasas en células de neuroblastoma que tienen una alta expresión de MXD3 (Duong et al., 2017).

Entre los genes con un comportamiento en el que tienden a sobreexpresarse después de OGD y mantener su expresión después de la recuperación encontramos a SLC16A1 (*Solute Carrier Family 16 Member 1, MCT1*) que es un transportador de lactato, piruvato y cuerpos cetónicos (Hong et al., 2016). SLC16A1 es el transportador de monocarboxilatos más abundante en el CNS y entre otras cosas se sabe que el metabolismo aerobio se modifica después de insuficiencia glucémica, por lo que el lactato se vuelve una fuente importante de energía para la conducción nerviosa. Además, está reportado que el lactato estimula la proliferación y la formación de estructuras capilares en células endoteliales de cerebro mediada por AKT (*AKT serine/threonine kinase 1, Protein kinase B*) y AMPK (*AMP Kinase*) así como a la activación de NF- κ B y HIF1- α (Miranda-Gonçalves et al., 2017).

Entre los genes del conjunto que tiende a comportarse tal que disminuye su expresión hasta después de la recuperación encontramos a MBD3 (*Methyl-CpG Binding Domain Protein 3*), que es una proteína de unión a sitios 5-hidroximetilcitosina (5hme-C) preferencialmente sobre 5me-C. Es parte de un asa reguladora (hidroximetilación-desmetilación-metilación-hidroximetilación) en la que MBD3 es necesaria para la hidroximetilación del DNA mediada por TET (*Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 3*) y su posterior desmetilación

(Rasmussen y Helin, 2016). También está involucrada en la metilación mediada por las DNMTs y de nuevo hidroximetilación de TET ya que MBD3 es necesaria para metilación normal porque MBD2, la proteína *reader* de 5me-C, necesita de MBD3 para unirse a 5me-C y viceversa. Además, la localización genómica de DNMT1 requiere de la unión al DNA de MBD3 (Hainer et al., 2016).

También identificamos un subconjunto de genes que se regulan al alza tanto en la recuperación con respecto a OGD como en la recuperación con la normoxia, es decir, su expresión en normoxia y en OGD es la misma y sube en la recuperación. Uno de estos genes es IL10RB (*Interleukin 10 Receptor Subunit Beta*) y es la subunidad del receptor de IL-10 que se expresa constitutivamente en la mayoría de las células, incluyendo a los astrocitos. La vía de activación de IL-10R puede llevar a la fosforilación de STAT3 (*Signal Transducer And Activator Of Transcription 3*) y a la inactivación de NF- κ B por la sobreexpresión de I κ B α (Rothhammer y Quintana, 2015).

El último patrón posible es una regulación a la baja en OGD con respecto a normoxia y en la recuperación con respecto a normoxia, es decir, un gen que baja su expresión en OGD y se mantiene subexpresado en la recuperación. Como ejemplo tenemos a SMAD3 que es uno de los ampliamente documentados efectores de la vía de TGF- β que puede actuar tanto como activador transcripcional uniéndose a los genes con elementos de respuesta a TGF- β (TRE), o como represor uniéndose a los genes con elementos de inhibición por TGF- β (TIE), además de que pueden interactuar con c-Fos (*Fos Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit*) y c-Jun (*Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit*) para incrementar la regulación genética de los blancos de TGF- β (Ying Zhang, Feng y Derynck, 1998).

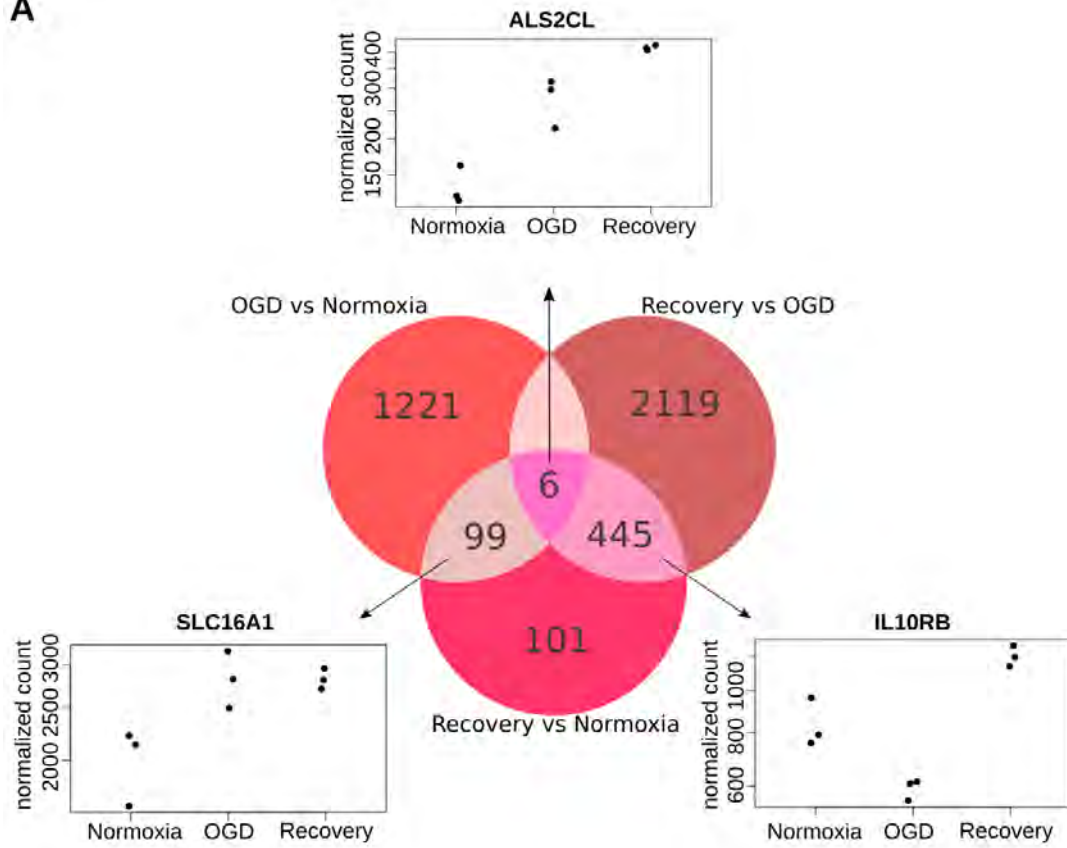
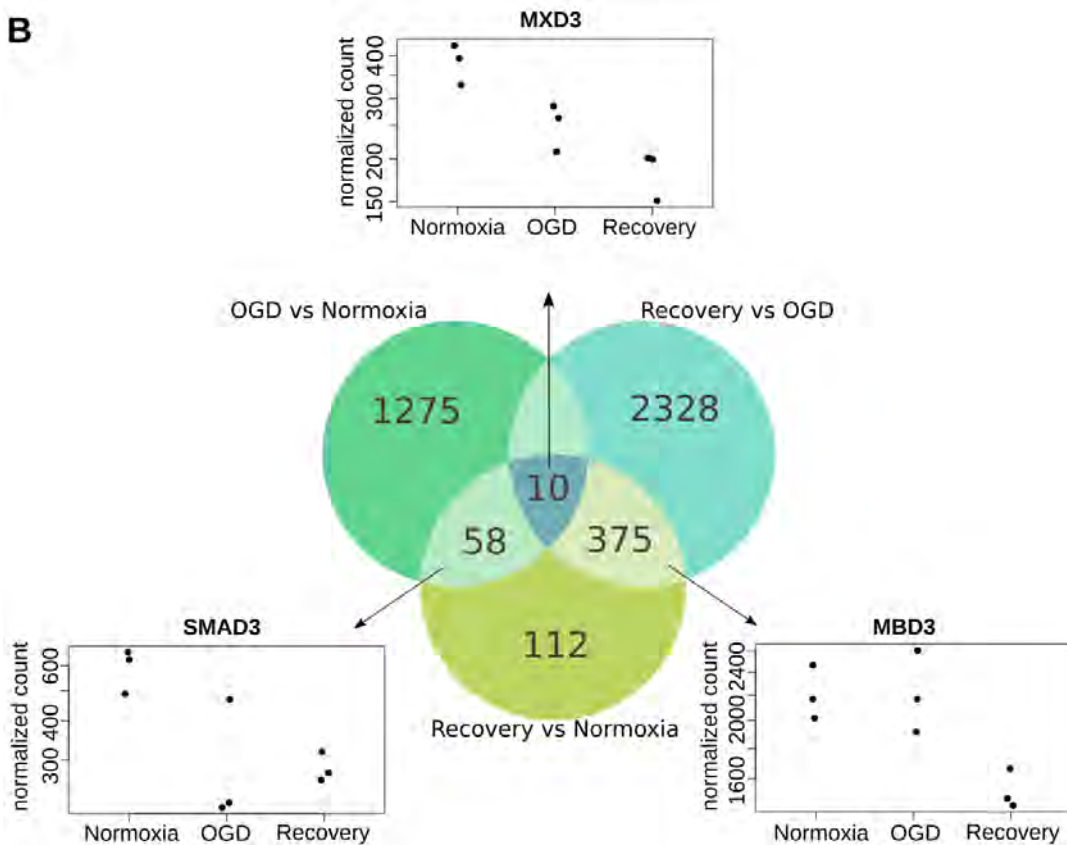
A**B**

Figura 8. Patrones de expresión genética de astrocitos sometidos a normoxia, OGD y recuperación. Diagramas de Venn que agrupan las comparaciones entre los distintos tratamientos de genes regulados al alza (A) y a la baja (B). Se indica cuántos genes se encuentran en cada subconjunto común a dos o tres comparaciones diferentes y se ejemplifica con un gen de interés el patrón de expresión de ese subconjunto con una gráfica de sus cuentas normalizadas por réplica por condición, e.g. SLC16A1 se encuentra en un grupo de 99 genes que están regulados al alza tanto en OGD vs normoxia como en recuperación vs normoxia, por lo que su patrón de expresión es sobreexpresarse en OGD y mantener ese nivel de expresión en la recuperación.

5.3 Cambios en la metilación del DNA

Para conocer el estado de la metilación del DNA se realizó una inmunoprecipitación de DNA metilado, en la cual el DNA metilado fue purificado por medio de un anticuerpo contra 5me-C acoplado a un anticuerpo secundario acoplado a perlas magnéticas. y secuenciado. Por medio de este protocolo pudimos evaluar de manera genómica el estado de la metilación de muchas características genómicas. En la figura 9 podemos observar los distintos sitios en los que está presente la metilación en las diferentes condiciones. Obtuvimos 319 promotores hipometilados y 101 promotores hipermetilados con un $\log \text{fold-change} \leq -2$ ó ≥ 2 respectivamente en OGD con respecto a normoxia (25528 y 25183 regulados diferencialmente totales respectivamente), 176 hipometilados y 273 hipermetilados en recuperación con respecto a OGD (25173 y 25514 totales) y 287 hipometilados y 126 hipermetilados en recuperación con respecto a normoxia (25355 y 25361 totales).

Identificamos una disminución de ~67% en la metilación en OGD y ~23% en recuperación ambos con respecto a normoxia en los sitios 3' UTR (Figura 9A). También hay un decremento de ~27% de metilación en los promotores de $\leq 1\text{kb}$ en OGD y de sólo ~2% en recuperación con respecto a normoxia. En el caso de los promotores de 2-3 kbp hay un incremento en la metilación de ~10% en OGD y del ~30% en recuperación con respecto a normoxia. Centrándonos en los sitios alrededor al TSS representados en la figura 9B entre los que se encuentran, por ejemplo, los promotores proximales definidos arbitrariamente como el sitio alrededor del TSS $\pm 3\text{ kbp}$ (Huminiecki y Horbańczuk, 2017) y los promotores distales encontrados a $> 5\text{ kbp}$ del TSS, se observa que hay una reducción en la metilación de los promotores proximales en OGD con respecto a la normoxia y a la recuperación y respectivamente un aumento en los sitios metilados encontrados en los promotores distales.

En la recuperación se observa que la proporción de sitios metilados en los promotores proximales aumenta no sólo para restablecer el nivel de la normoxia si no que aumenta más que ésta y a su vez la metilación disminuye en los sitios distales tanto con respecto a OGD como con respecto a la normoxia de manera proporcional.

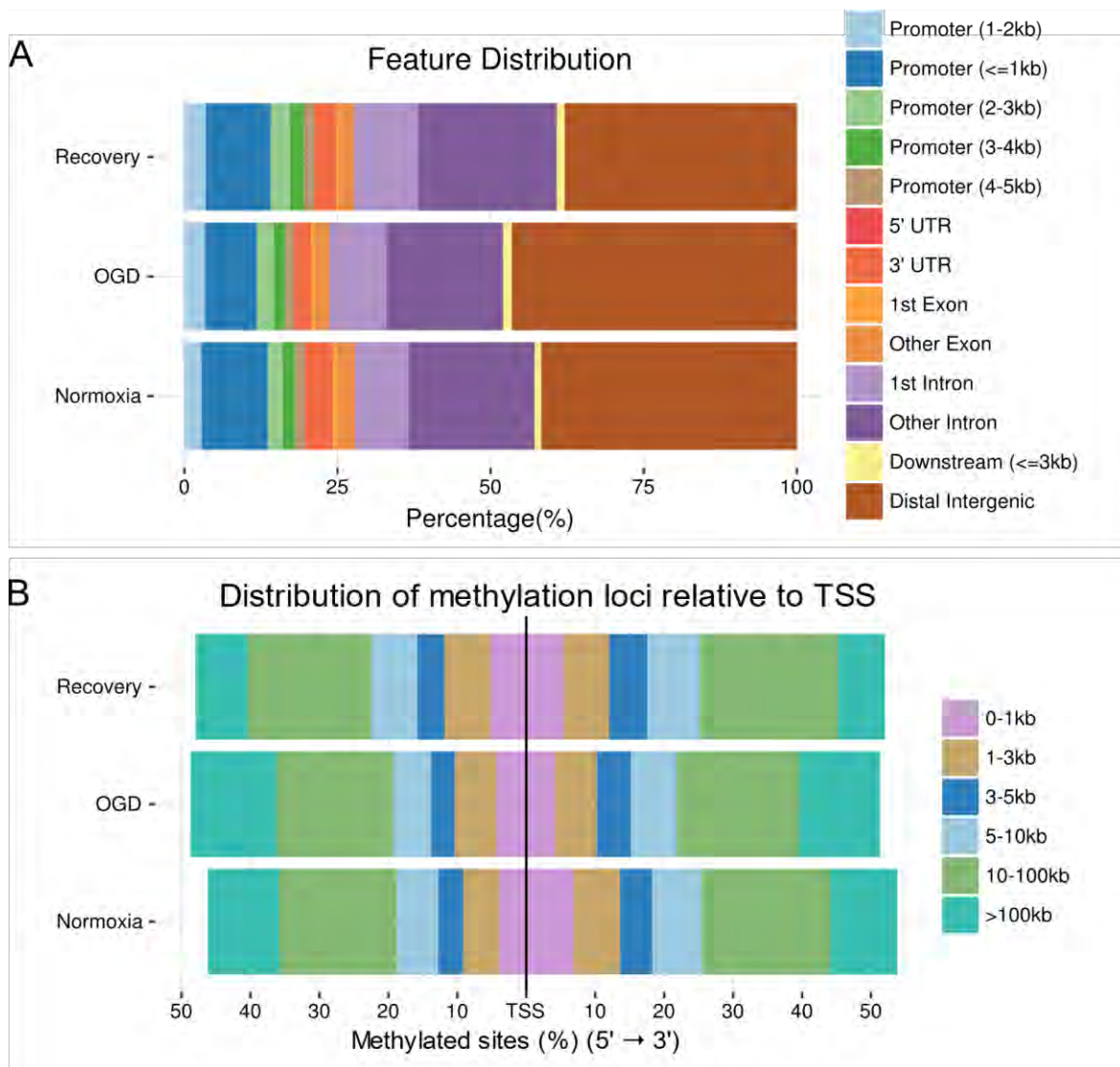
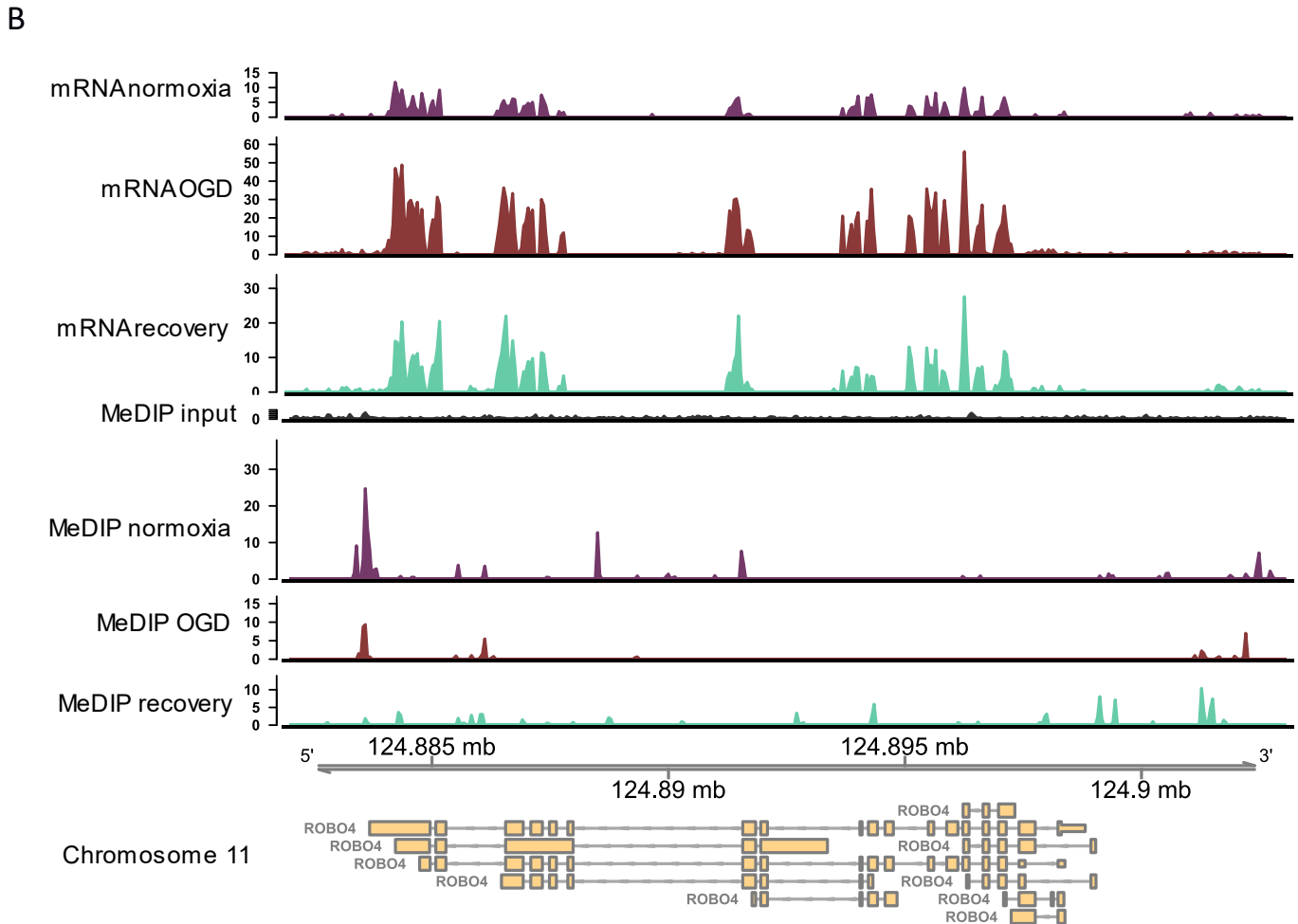
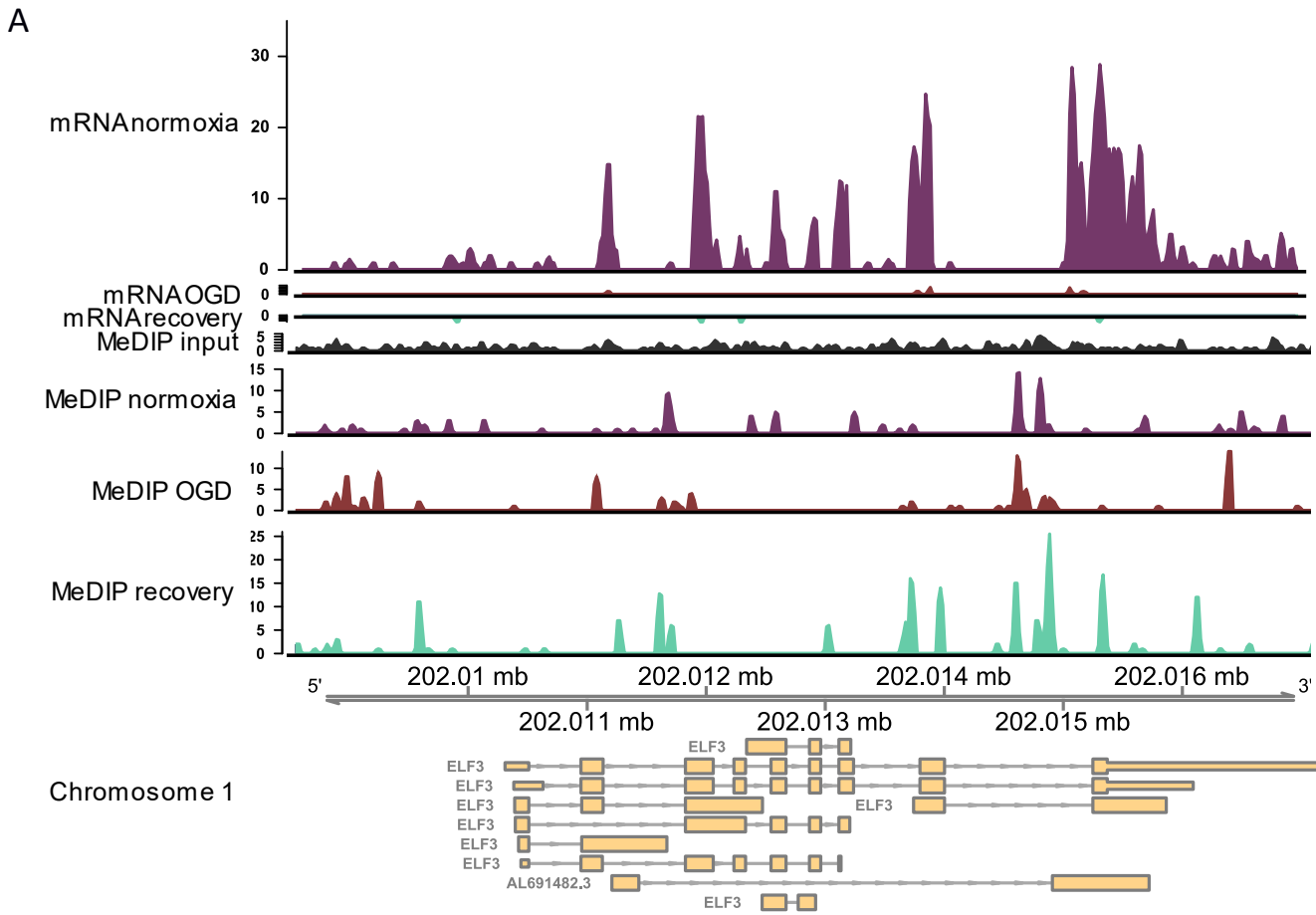


Figura 9. Diferentes sitios característicos a lo largo del genoma y su metilación en normoxia, OGD y recuperación. A) Porcentaje de sitios metilados clasificados por su posición relativa al gen (sitio génico, intergénico, intrón, exón, *upstream*, *downstream* y distal intergénico) encontrados en normoxia, OGD y recuperación. B) Distribución de la metilación alrededor del sitio de inicio de la transcripción (TSS) desde el promotor proximal (0-3 kbp) hasta los promotores distales (> 5 kbp).

Tomando en cuenta los promotores anotados para cada gen, podemos observar que existen cambios en la metilación de éstos en todas las comparaciones de los tratamientos (Figura 10A) y que hay más cambios hacia la hipometilación en OGD con respecto a normoxia y en la recuperación con respecto a normoxia, lo que nos habla de que la hipometilación provocada por OGD no se restablece en la recuperación y aunado a esto, la metilación de los promotores cambia a un estado distinto que al de la normoxia, tanto en genes hiper como hipometilados. Si bien existen sitios hipermetilados en la recuperación con respecto a OGD, éstos son diferentes a los sitios metilados que se encontraban en la normoxia, lo que abona a una hipótesis en la que la recuperación es un estado con marcas de metilación de DNA nuevas que no se presentan en la normoxia previa a OGD, a pesar de que las células se encuentran en condiciones de normoxia

Analizando las islas CpG a lo largo del genoma (Figura 10B), los datos muestran que existen cambios en la metilación de éstas en las diferentes condiciones, usando FPKM (*fragments per kilobase of exon per million reads mapped*) como medida para cuantificar la metilación en las islas CpG haciendo una equivalencia entre exones y CGIs, podemos ver cambios en la metilación. En particular, una desmetilación en OGD en varias islas y además, como en el caso de los promotores, observamos que la metilación no se restablece completamente en la recuperación, si no que algunos sitios permanecen desmetilados, otros distintos se metilan y otros se desmetilan con respecto a la normoxia.

Tomando como ejemplo algunos genes de interés, podemos observar los cambios en la metilación de DNA y expresión de mRNA a lo largo de estos genes (Figura 11). Tomando en cuenta los promotres proximales 5' río arriba del TSS podemos ver una metilación diferencial en éstos que concuerda con un aumento en la señal en exones en diferntes patrones de expresión, como en ELF3 que se disminuye su expresión después de OGD y mantiene niveles bajos de expresión en la recuperación, ROBO4 que aumenta su expresión después de OGD y continua sobreexpresado en la recuperación, o UCP3 que sólo se expresa en OGD. Estos cambios los podemos ver directamente relacionados con la metilación de sus regiones río arriba 5', que están documentados como promotores funcionales en EFL3 (Figura 11A, Hou et al., 2004), ROBO4 (Figura 11B, Okada et al., 2007) y en UCP3 (Figura 11C, Chen et al., 2016).



C

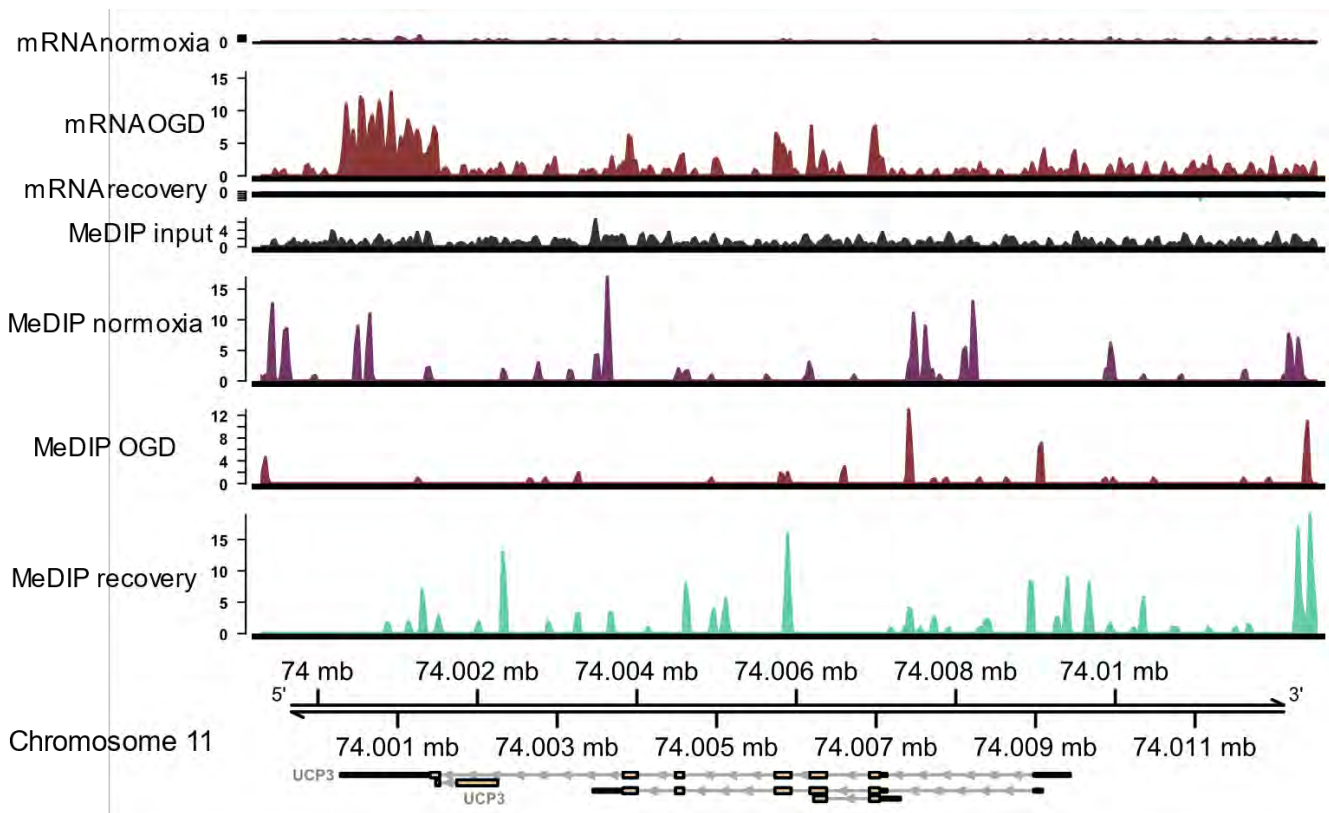


Figura 11. Cobertura de lecturas de mRNA-seq y MeDIP-seq en algunos genes de interés. A) El factor de transcripción ELF3 muestra una clara pérdida de señal después de OGD, principalmente en su último exón, se puede apreciar que existen diferentes isoformas de mRNA, dada la amplitud de las distintas señales de cada exón. La metilación de su promotor aumenta en -2 kbp en OGD y en -1 kbp del TSS en recuperación. B) El receptor ROBO4 presenta sitios diferencialmente metilados tanto a -5 kbp como junto al TSS, su expresión diferencial no es tan acentuada pero significativa y además podemos observar un probable sitio de regulación por metilación de DNA en la región 3' río abajo del gen. C) La proteína desacopladora UCP3 muestra una activación de su expresión en OGD que se pierde en la recuperación. La metilación de su región 5' río arriba a -3 kbp y la inmediata adyacente al TSS se ven claramente con una metilación diferencial.

5.4 Correlación entre expresión genética y metilación del DNA

Para integrar los datos de expresión con los datos de metilación se calculó un *z-score* como valor de correlación obtenido de multiplicar la diferencia estandarizada de los valores de transcripción con la diferencia estandarizada de los valores del MeDIP-seq. Las varianzas de las diferencias fueron calculadas para todos los transcritos y si un determinado transcrito mostró diferencias igualmente dirigidas tanto en los valores de transcripción como en los de metilación, el valor de *z* sería positivo, si son reversamente dirigidas el valor será negativo y si

no existen diferencias el valor será cercano a 0. Entonces, la distribución de los valores de z consiste en tres grupos; una población de valores cercanos a 0 en la que las diferencias entre los tratamientos son ninguna o sólo alguno de los datos ya sea transcripción o metilación, un grupo en eje positivo con diferencias igualmente dirigidas tanto en metilación como en expresión y un grupo en el eje negativo con diferencias inversamente dirigidas entre los tratamientos tanto en metilación como en expresión. Para analizar esta distribución se utilizó un modelo mixto bayesiano en el que se usaron componentes normales hacia el centro de la distribución y componentes exponenciales en las colas de la distribución (véase Klein et al., 2014 para la descripción formal del modelo).

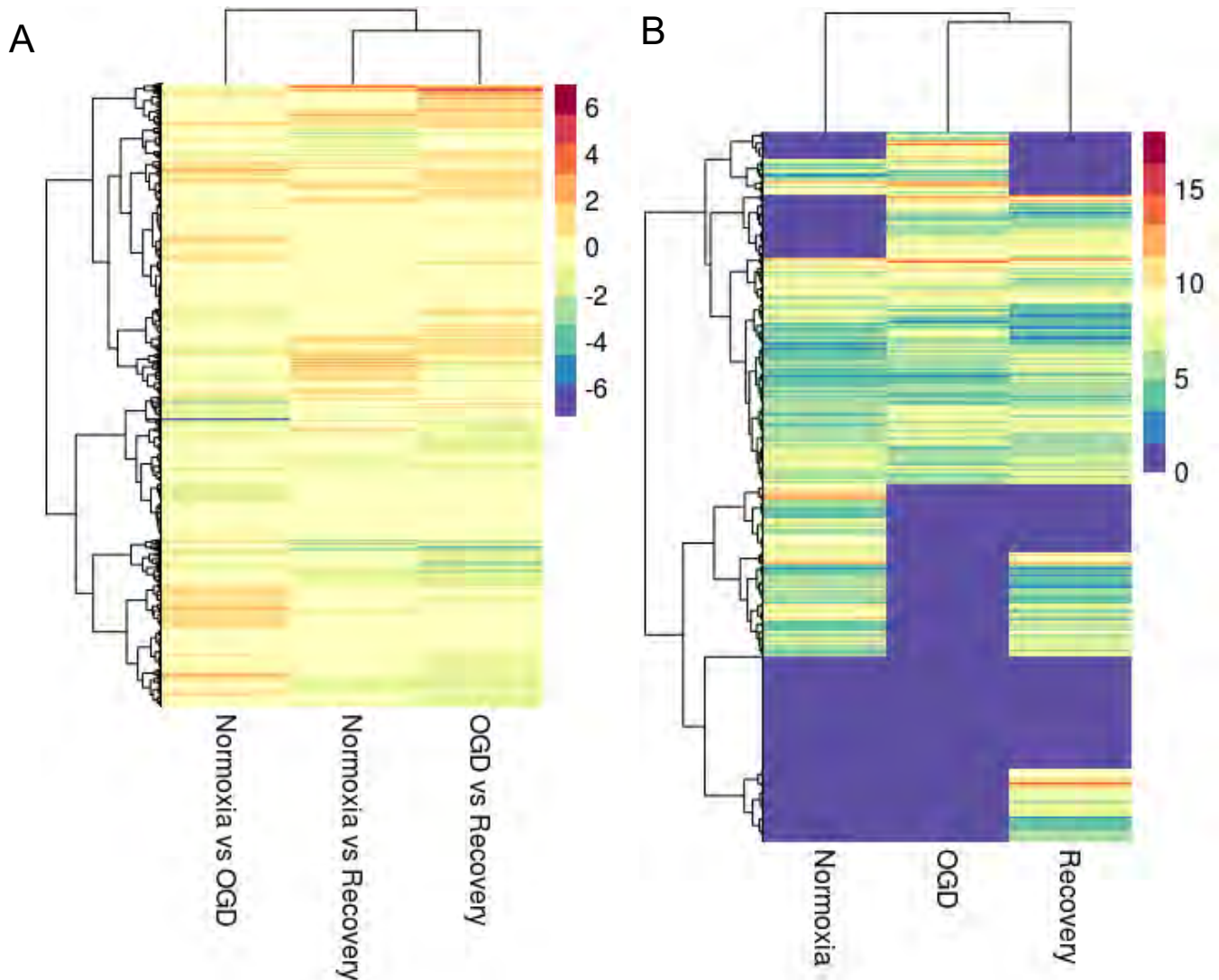


Figura 10. Panorama epigenómico de la metilación del DNA. A) $\text{Log}_2\text{FoldChange}$ de los promotores de cada gen anotado en GRCh38.90 por cada comparación entre tratamientos. B) FPKM de todas las islas CpG a lo largo del genoma en cada condición. *Clusterings* por filas por el método de Ward y por columnas por distancia euclidiana.

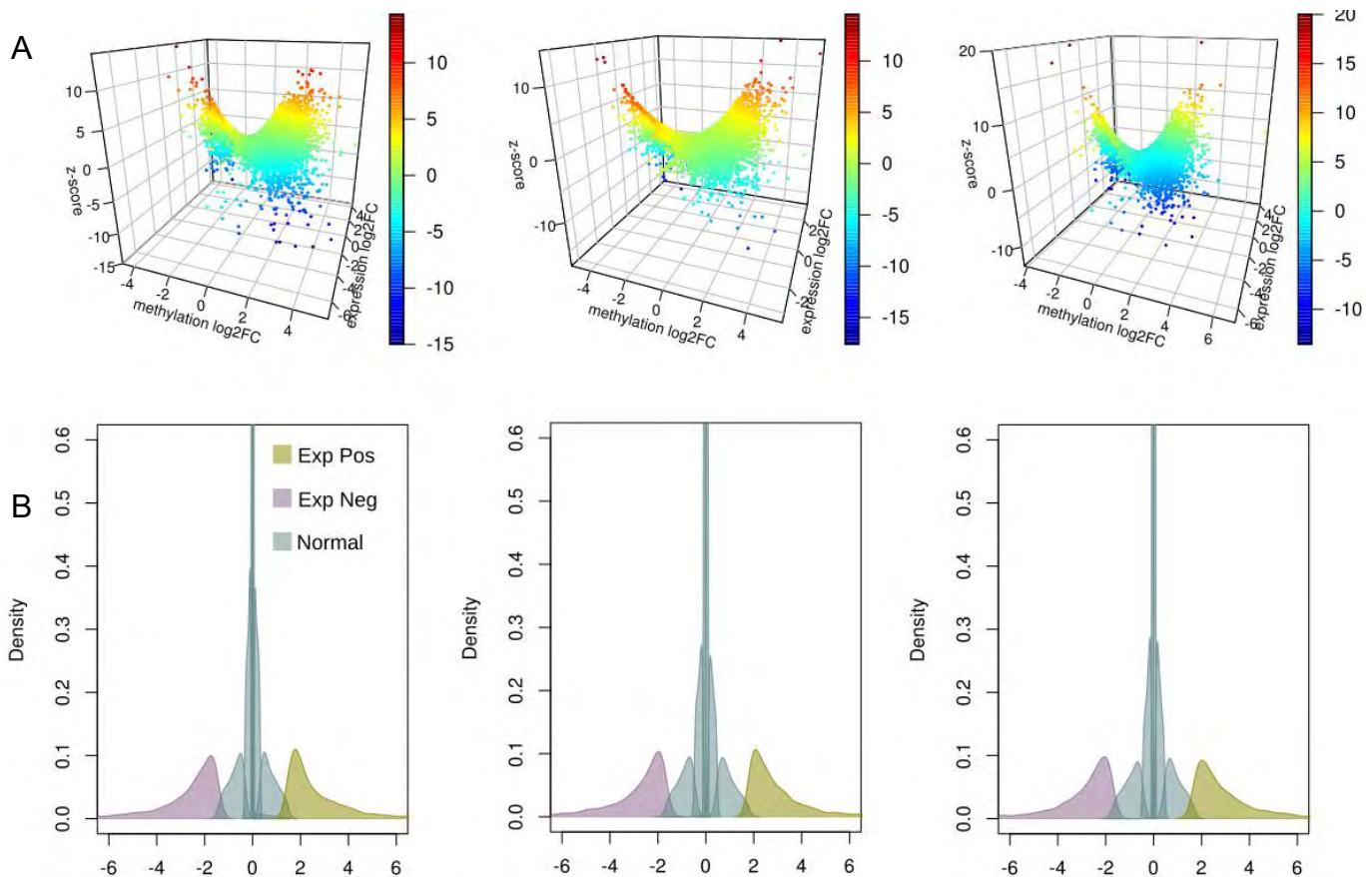
Analizando los valores de z del modelo mixto podemos apreciar en la figura 12A que existen 4 grupos principales de valores de z en cuatro picos de las gráficas; dos positivos que refieren a valores positivos, es decir, en los que la correlación entre metilación y expresión es positiva, y dos negativos en los que la correlación es negativa. Para este trabajo nos enfocaremos en los grupos con valores de z negativos ya que normalmente la metilación del DNA está asociada a la represión de la transcripción y los valores negativos refieren a una correlación inversa entre metilación y expresión, es decir, si el cambio en la metilación es negativo el cambio en la expresión será positivo y viceversa. En el caso de los genes que no cumplen con este perfil, la regulación por otro tipo de marcas epigenéticas (histonas, conformación tridimensional de la cromatina) podría preponderar sobre la metilación, además del error asociado que tiene este trabajo al tener una $n = 1$ en los experimentos de MeDIP.

Podemos ver que existen cambios en la recuperación con respecto a OGD, o sea, que la recuperación es un estado diferente a OGD e igualmente los datos sugieren que es un estado diferente a la normoxia ya que en la gráfica que representa los cambios de la recuperación con respecto a la normoxia podemos observar que existe un mayor número de promotores asociados a genes con valores de z negativos comparado con otros cambios como el de la misma recuperación con OGD y OGD con respecto a normoxia (Figura 12A). En la figura 12B podemos ver las proporciones de promotores asociados a genes que fueron clasificados en un grupo u otro y si bien la mayoría están clasificados dentro de la categoría de correlación cercana a 0 o normal cerca del 20% de los sitios sí tienen tanto una correlación negativa (valores de z negativos) o positiva (valores de z positivos). Dado que la metilación es una marca de represión transcripcional, nos centraremos en los genes en los que se cumple ese criterio. En la figura 12C se muestran algunos genes con valores de z negativos, es decir, en los que la metilación de su promotor y la expresión de su mRNA es inversa. Podemos observar que no hay un efecto lineal entre el cambio en la metilación y en la transcripción, esto se puede deber a que no solo la metilación del DNA regula la expresión genética ya que hay otras marcas epigenéticas que regulan dicho fenómeno, como la acetilación, metilación y fosforilación de histonas (Bannister y Kouzarides, 2011), y que no fueron analizadas en este trabajo. En algunos genes podemos ver cómo cambia la expresión a lo largo de las diferentes condiciones, como HRK, GADD45A (*Growth Arrest And DNA Damage Inducible Alpha*) y MMP12 que se

desmetilan y aumentan su expresión en OGD con respecto a normoxia y después aumenta su metilación y disminuyen su expresión en la recuperación con respecto también a normoxia.

5.5 Vías de señalización y procesos celulares regulados diferencialmente

Para comprender un nivel superior de organización realizamos un análisis de ontología de genes para obtener las principales vías de señalización y rutas metabólicas implicadas en cada una de las condiciones en las que se analizan varios genes a la vez. En la figura 13 podemos observar las distintas rutas encontradas en las bases de datos de KEGG (Figura 13A) y Reactome (Figura 13B) y se reconoce a primera instancia una regulación a la baja de vías de señalización involucradas en el ciclo celular como así como de reparación de DNA, ya sea explícitamente como *cell cycle* o *mismatch repair*, como implícitamente como *fanconi anemia pathway* para reparación de DNA y *pathways in cancer* para evasión de la apoptosis y proliferación, todo esto en OGD con respecto a normoxia.



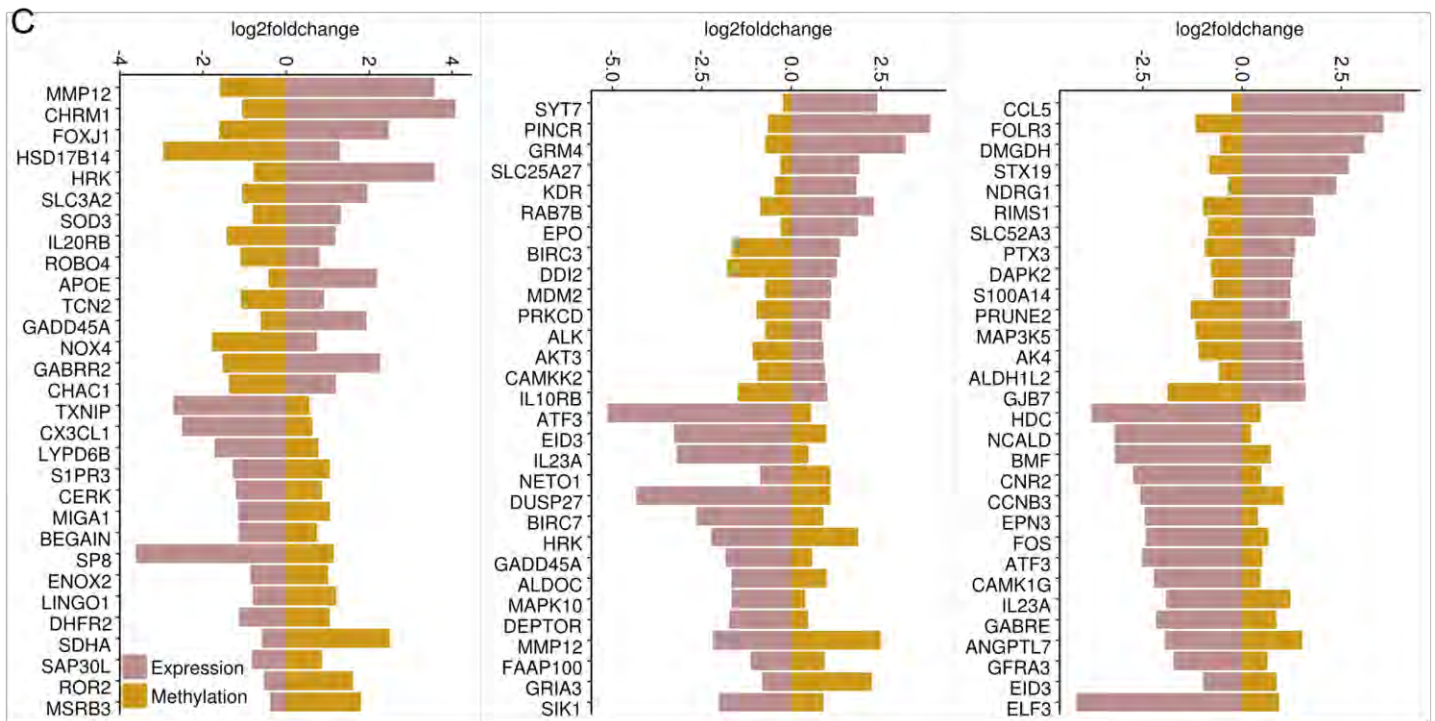
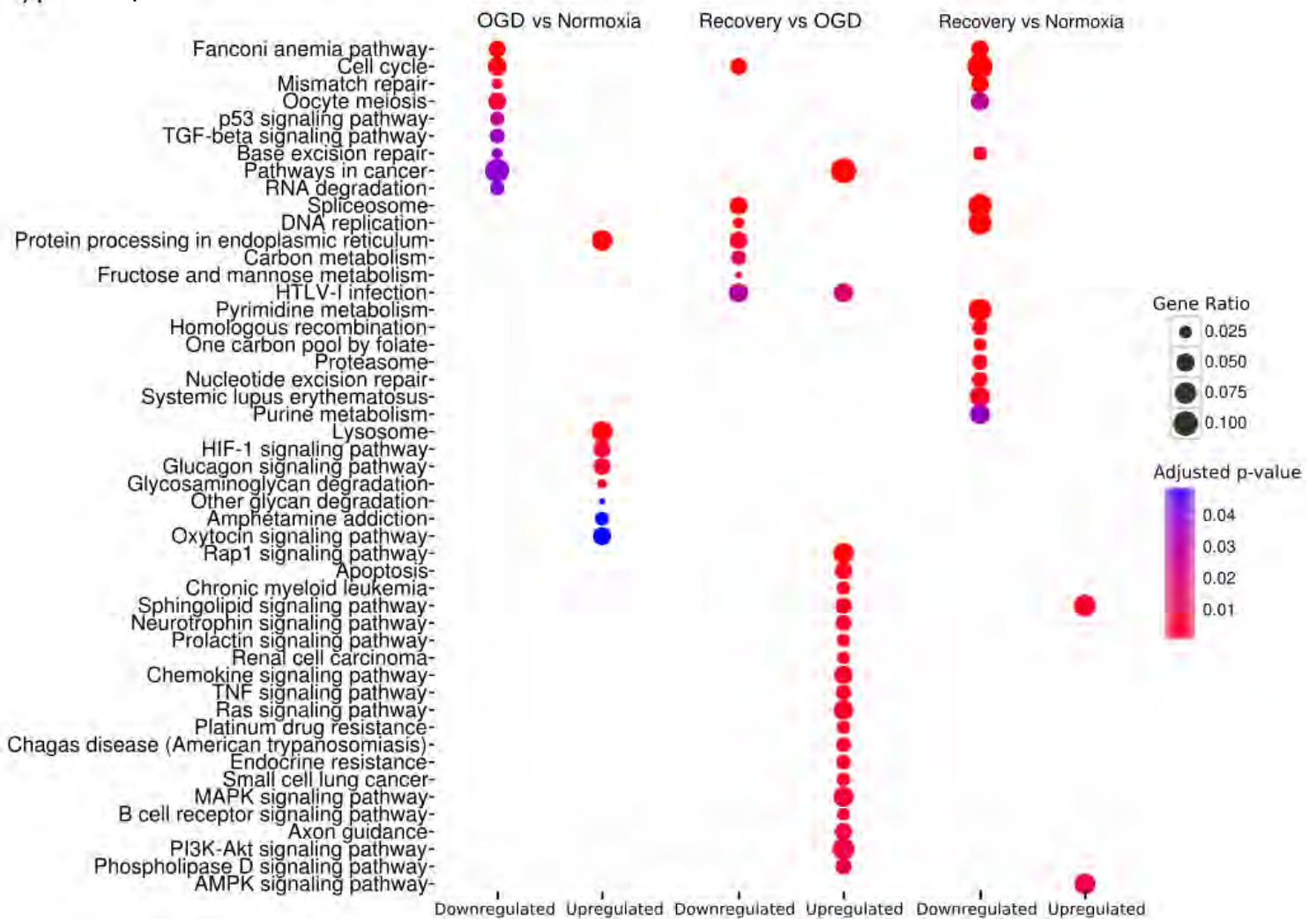


Figura 12. Clasificación de la correlación entre los cambios en la expresión y los cambios en la metilación. A) Panorama epigenómico de las relaciones entre la metilación y la expresión. Se observan todos los genes con su respectivo cambio en expresión y metilación y el z-score asociado a cada uno de ellos en una escala de color. De izquierda a derecha: OGD vs normoxia, recuperación vs OGD y recuperación vs normoxia. B) Modelo mixto bayesiano que clasifica los z-score en 6 grupos según su la relación entre expresión y metilación en el grupo 1 se encuentran los z-score negativos o inversamente correlacionados en una exponencial negativa, en los grupos 2-5 se encuentran los z-score cercanos a 0 que corresponden a una inexistente relación entre expresión y metilación clasificados con una distribución normal y el grupo 6 en los que están los valores de z positivos o correlacionados en una exponencial positiva. De izquierda a derecha: OGD vs normoxia, recuperación vs OGD y recuperación vs normoxia Cada punto es un gen y la clave de color representa el grupo al que están asignados. En el eje x se muestra el valor de z y en el eje y la proporción (densidad) de cada grupo del modelo con respecto a todos los genes y promotores evaluados. C) Genes de interés pertenecientes al grupo exponencial negativo, en el que la metilación correlaciona inversamente a la expresión, de izquierda a derecha: OGD vs normoxia, recuperación vs OGD y recuperación vs normoxia.

En las vías reguladas al alza encontramos a marcadores de OGD como *HIF1 signaling pathway*, *protein processing in endoplasmic reticulum* y *lysosome*, vías de regulación de la glucosa y glucógeno, implícitamente a vías como Gq/PLC/Ins3 y MAPK en *oxytocin signaling pathway*, vías relacionadas con sensado de calcio y transporte vesicular en *amphetamine addiction* y vías de regulación de la síntesis de proteínas como *unfolded protein response* y *PERK regulates gene expression*. Entre las vías encontradas reguladas a la baja en la recuperación con respecto a OGD tenemos a *carbon metabolism* y *fructose and mannose metabolism* como reguladores energéticos centrales, las vías principales de regulación del

splicing y procesamiento de mRNA y continúan subreguladas algunas vías de ciclo celular y reparación de DNA. Las vías reguladas al alza son principalmente vías proinflamatorias como *chemokine signaling pathway*, implícitamente *chagas disease* y *chronic myeloid leukemia* así como vías de muerte celular como *TNF signaling pathway*, *NF-κB activation through FADD/RIP-1 pathway mediated by caspase 8 and 10* y vías de sobrevivencia como *Ras signaling pathway*, *PI3K-Akt signaling pathway* y *pathways in cancer*, tenemos además vías como la de AMPK que regula la síntesis de proteínas y glucólisis debida a estrés energético y vías de sensado de factores de crecimiento como NGF, FGF, BDNF y NT-3. Si comparamos la recuperación con la normoxia igualmente tenemos reguladas a la baja varias de las vías de señalización de ciclo celular e incluso en la replicación del DNA, además tenemos las rutas de splicing y procesamiento de mRNA y reguladas al alza tenemos la vía de guía axonal, AMPK y la de señalización por esfingolípidos (Figura 13). Observamos que la vía de AMPK se mantiene activa en la recuperación en ambas comparaciones, así como la vía de esfingolípidos, indicando una transformación del ambiente celular en la recuperación que no

A corresponde al de la normoxia ni al de OGD.



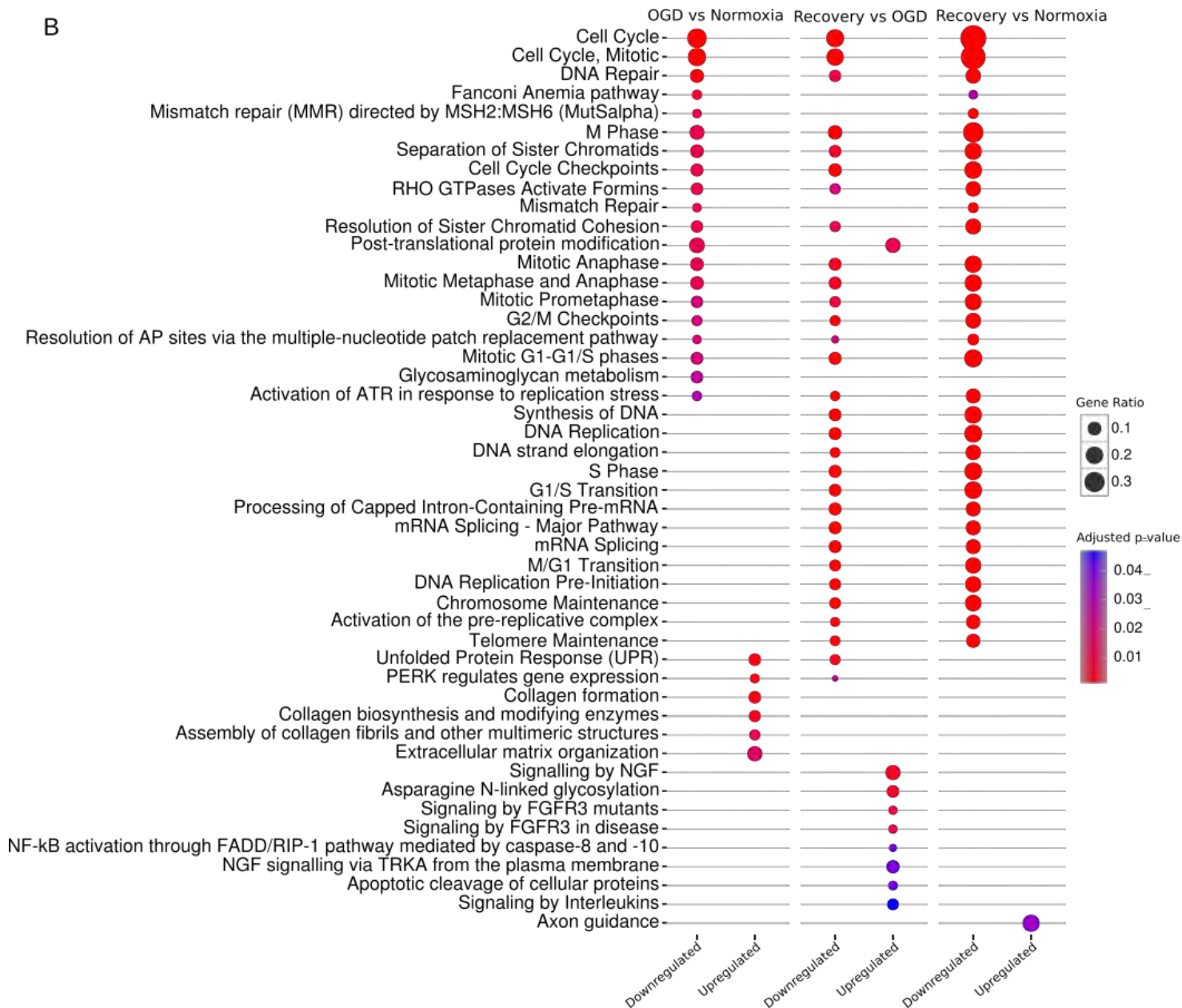


Figura 13. Principales vías de señalización sobrrreguladas y subrreguladas en los distintos tratamientos. Enriquecimiento de vías de señalización por medio de una prueba de sobrerrepresentación con distribución hipergeométrica y un ajuste con FDR. A) Vías de señalización de KEGG y B) Vías de señalización Reactome. El tamaño de los puntos representa la proporción de genes representados en esa vía con respecto a los genes presentes en el análisis y el color el nivel de significancia FDR del enriquecimiento.

6. Discusión y conclusión

6.1 El papel de los astrocitos en la fisiopatología de la isquemia cerebral

La privación de oxígeno y/o glucosa provoca un desencadenamiento de cambios en la expresión de genes (Mense et al., 2006) y en las marcas epigenéticas subyacentes a dicha expresión (Hartley et al., 2013). Sin embargo, no se conoce con exactitud la relación entre estas dos variables en este fenómeno en particular, ni si existen diferencias entre un estado inmediato a la privación de oxígeno y glucosa y estados subagudos después del insulto. En este trabajo mostramos cambios a niveles epigenómicos y transcriptómicos no reportados aún que deben de ser estudiados para entender el fenómeno completo de la isquemia y reperfusión en los astrocitos.

Está ampliamente reportado el papel fundamental de los astrocitos en la fisiopatología del infarto cerebral, se conoce que en modelos de barrera hematoencefálica los pies terminales de los astrocitos se retraen y provocan una disfunción en las uniones estrechas de las células endoteliales de la microvasculatura cerebral, provocando la regulación a la baja de proteínas como ZO-1 (*Zona Occludens 1*), claudina-5 y ocludina en estas células (Shi et al., 2016). Además, la activación de MMP-2, MMP-3 y MMP-9 exagera la pérdida de la estabilidad de la unión vascular-astrocítica-neural (Neuhaus et al., 2014) y nosotros encontramos a MMP12 regulada al alza y su metilación a la baja en OGD con respecto a normoxia, lo que concuerda parcialmente con la literatura existente, sugiriendo expresión de MMPs de manera tejido-específica y contexto-específica.

6.1.1 Los transportadores de la familia SLC

De particular interés para este trabajo encontramos regulados diferencialmente varios genes de la familia de transportadores de solutos SLC (*solute carrier family*) que podemos agrupar según la molécula que transportan y el sitio de intercambio al que pertenecen. Entre los transportadores de aminoácidos encontramos a SLC3A2, SLC38A2 (*Solute Carrier Family 38 Member 2, SNAT2*), SLC6A9 (*Solute Carrier Family 6 Member 9, GLYT1*), SLC7A5 (*Solute Carrier Family 7 Member 5, CD98LC*), SLC43A1 (*Solute Carrier Family 43 Member 1, LAT3*) y SLC1A5

(*Solute Carrier Family 1 (Neutral Amino Acid Transporter), Member 5*) regulados al alza en OGD con respecto a normoxia. SLC3A2 es un transportador de glutamato y otros aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs) que forma el complejo LAT1 (*Large neutral amino acid transporter, CD98*) y se ha encontrado sobrerregulado en células de glioblastoma grado IV en condiciones de hipoxia (Kucharzewska, Christianson y Belting, 2015), además de que este gen es necesario para el mantenimiento metabólico de células T_{reg} dado que activa la vía de mTOR (*Mammalian Target Of Rapamycin*) y promueve la proliferación basal celular (Ikeda et al., 2017). SLC38A2 transporta glutamina preferencialmente y en el cerebro se encuentra expresado tanto en neuronas como en astrocitos, se piensa que es uno de los miembros del sistema que regula el intercambio de glutamina/glutamato/GABA entre neuronas y astrocitos tanto en las membranas postsinápticas como en los procesos astrocitos cercanos a la densidad sináptica (Hellsten, Hägglund, Eriksson y Fredriksson, 2017). SLC6A9 es mejor conocido por su producto GLYT1, el transportador de glicina 1, y está reportado que en células sanguíneas hipóxicas de pacientes con anemia falciforme se encuentra sobrerregulado (Zhang et al., 2014). Se sabe que la OGD provoca la liberación de glicina mediada por GLYT1 en modo inverso en la retina que podría ser un factor de excitotoxicidad en este tipo de células (Hanuska et al., 2016) y un efecto similar en el cerebro ya que en un modelo murino de isquemia cerebral se comprobó que GLYT1 se activa a concentraciones altas de glicina, provocadas por isquemia y que esta activación reduce el tamaño de infarto por medio de la subactivación de NMDARs (Yao et al., 2012).

En otro grupo de SLCs tenemos a los transportadores de fuentes de carbono como SLC2A3 (*Solute Carrier Family 2 Member 3, GLUT3*), SLC2A1 (*Solute Carrier Family 2 Member 1, GLUT1*), SLC27A1 y SLC16A1. SLC2A3 es mejor conocido por su producto proteico GLUT3 que es un transportador de glucosa principalmente y es un gen que normalmente no se expresa en astrocitos en el cerebro, sino que su expresión basal es neuronal pero está reportado que bajo ciertas condiciones como la incubación con lipopolisacárido (LPS) y OGD se sobreexpresa de la misma manera en la que se comportan las neuronas lo que provoca un incremento en la toma de glucosa de manera global (Cidad, Garcia-Nogales, Almeida y Bolaños, 2001). SLC2A1 es otro transportador de glucosa y es conocido también como GLUT1 que se expresa en todos los tejidos y está reportado que se sobreexpresa en astrocitos después de hipoxia durante 24 h al igual que un aumento en la toma de glucosa (Véga, R. Sachleben, Gozal y Gozal, 2006).

SLC27A1 es un transportador de ácidos grasos de cadena larga (FATP1) que es necesario para la entrada de éstos al parénquima cerebral y está expresado tanto en materia blanca como en materia gris (Mitchell, On, Del Bigio, Miller y Hatch, 2011) y además está sobreexpresado en los trofoblastos primarios humanos después de hipoxia junto con otros miembros de la misma subfamilia FATP (Mishima, Miner, Morizane, Stahl y Sadovsky, 2011), al estar sobreexpresado este transportador aumenta la entrada de ácidos grasos y posiblemente la oxidación de éstos al no haber fuentes de carbohidratos disponibles en la célula.

Encontramos a SLC25A1 (*Solute Carrier Family 25 (Mitochondrial Carrier; Citrate Transporter), Member 1*), SLC16A10 (*Solute Carrier Family 16 Member 10, MCT10*) y SLC40A1 (*Solute Carrier Family 40 Member 1, FPN1*) regulados a la baja en OGD con respecto a normoxia de manera significativa. SLC25A1 es un transportador de citrato y mantiene la homeostasis mitocondrial, la proliferación celular y mantiene el nivel de citrato intracelular y su inhibición desestabiliza el potencial de membrana mitocondrial y activación de la autofagia (Catalina-Rodriguez et al., 2012), su deficiencia debida a una delección genética causa un decremento en la actividad de la fosforilación oxidativa (Napoli et al., 2015). Este decremento puede verse beneficiado aún más por la actividad de HIF1A que está estabilizado por la hipoxia en los astrocitos. SLC40A1 es un transportador que exporta hierro también llamado ferroportina y se sabe que tanto en neuronas como astrocitos tratados con LPS o TNF- α , la expresión de éste disminuye significativamente (Urrutia et al., 2013), además de que altera el tráfico y señalización de TLR-4 (*Toll-like receptor 4*) hacia balsas lipídicas e inhibe la respuesta inflamatoria mediada por citocinas en respuesta a LPS (Habib et al., 2015).

Tomando estos resultados en cuenta, podemos decir que existe una sobrrregulación de distintos genes que codifican para transportadores de nutrientes como aminoácidos y fuentes de carbono después de OGD para la adaptación a la privación de glucosa y su sustitución como fuente primaria de energía. En general, los resultados sugieren que existe un cambio metabólico complejo hacia un incremento en la producción de lactato y piruvato. Estos metabolitos son utilizados directamente para la producción de NADH para su utilización en la fosforilación oxidativa que no funciona eficientemente dada la baja en la glucólisis y la ausencia

de oxígeno. Habría que demostrar los niveles de expresión de las enzimas participantes en estas vías para comprobar completamente este hecho.

6.1.2 Genes reguladores de la sobrevivencia y muerte celular

Otro grupo interesante de analizar son los genes involucrados en la regulación de la muerte celular. Observamos que después de la recuperación existen varios genes que promueven la apoptosis como las caspasas (CASP, *Caspase*, *Apoptosis-Related Cysteine Peptidase*) que se encuentran sobre-reguladas en la recuperación después de OGD, lo que hace pensar que la recuperación es un estado adaptativo diferente a la normoxia y que las células aún presentan un daño celular, es poco probable que el tiempo no fue suficiente para recuperarse y estén en un estado entre OGD-normoxia, ya que los genes que se expresan son diferentes y algunos muy fuertemente excluyentes en todas las condiciones (Figura 8). CASP3, CASP10, CASP6, CASP7 y CASP8AP2 (*Caspase 8 Associated Protein 2*) se encontraron sobrerreguladas después de la recuperación con respecto a OGD. CASP3 es una proteína efectora de la apoptosis que se sabe que se activa mediante el corte de CASP9 por efecto de la hipoxia cerebral (Chiang, Ashraf, Ara, Mishra y Delivoria-Papadopoulos, 2007) y esta activación puede prevenirse con un poscondicionamiento de hipoxia moderada después de isquemia prenatal además de reducir la activación astrocítica (Teo, Morris y Jones, 2015). Además, se sabe que su inhibición puede reducir la astrogliosis *in vivo* por medio de vías no relacionadas directamente con la apoptosis como CREB (*CAMP Responsive Element Binding Protein*) y la activación de proteínas de sobrevivencia como HSP25 (*Heat Shock Protein Family B (Small) Member 1*; Aras, Barron y Pike, 2012).

Como anteriormente se dijo, HRK es uno de los genes más sobreexpresados en OGD con respecto a normoxia y además se encuentra regulado a la baja en la recuperación con respecto a OGD y su metilación fue concordante con estos hallazgos. Se sabe además que la muerte neuronal provocada por un modelo de isquemia cerebral es reducida al inhibir farmacológicamente JNK (*C-Jun N-Terminal Kinase*), una de las proteínas que puede llevar a la activación transcripcional de HRK y que se vio reducida su expresión con esta inhibición (Gao et al., 2005). Se sabe que HRK se sobreexpresa en la muerte neuronal mediada por privación de factores tróficos y muerte mediada por axotomía (Coultas et al., 2007) y además promueve

la muerte celular cuando se suprime la expresión de SUZ12 (*SUZ12 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit*) por medio de shRNAs (Li et al., 2012). La inducción de HRK en respuesta a OGD puede ser uno de los genes que provoquen la muerte de los astrocitos,

Uno de los genes reguladores más estudiados e importantes en la regulación de la vida celular es TP53 y en nuestro estudio lo encontramos regulado a la baja tanto en la recuperación con respecto a la normoxia como con respecto a OGD lo que indica que el ciclo celular puede seguir avanzando en la recuperación o que el daño al DNA se ha reparado satisfactoriamente. Se sabe que p53 se regula a la baja en condiciones de hipoxia y esto limita el potencial proapoptótico de este factor de transcripción ante el insulto (Chen, Longtine, Sadovsky y Nelson, 2010). Dado que la proteína tiene efectos pleiotrópicos en la célula no es posible aseverar su rol en la privación de oxígeno y glucosa. Se sabe que puede competir con HIF1A por p300 (Schmid, Zhou, Köhl y Brüne, 2004) y además puede reclutar a E3 ubiquitina ligasas para degradarlo *in vivo* (Ravi et al., 2000).

BEX2, un blanco efector de mTOR, fue regulado al alza en la recuperación con respecto a OGD y la metilación de su promotor a la baja. Se sabe que provoca una sobrerregulación de la vía STAT3/NF- κ B-BEX2-VEGF y además, está sobrerregulado en tejidos de glioma y favorece en éstos la migración y proliferación celular regulando a β -catenina (Hu et al., 2015; Nie et al., 2015). Otro de los genes regulados al alza en la recuperación con respecto a OGD es NGFR que es el receptor del factor de crecimiento nervioso y está reportado que puede inhibir a p53 promoviendo la ubiquitinación y proteólisis de MDM2 y además uniéndose a su sitio de unión al DNA previniendo su actividad de factor de transcripción. La inhibición de NGFR por medio de siRNAs activa a p53 provocando la apoptosis en gliomas (Zhou et al., 2016).

Otra señal antiapoptótica que encontramos fue la regulación a la baja y metilación al alza de BMF (*Bcl2 modifying factor*) en la recuperación con respecto a la normoxia y a OGD. BMF es una proteína que se une a Bcl2 permitiendo la liberación del citocromo c y desencadenar la apoptosis (Happo, Strasser y Cory, 2012). Se ha reportado que un *knockdown* del transcrito por medio de siRNAs puede disminuir la muerte celular, incrementar p-Akt, y contrariamente, un aumento en la expresión de BMF al inducir la muerte celular por agitación y desprendimiento celular de la matriz extracelular (Hausmann et al., 2011). Uno de los reguladores más

importantes de la apoptosis es CFLAR (*CASP8 And FADD Like Apoptosis Regulator, C-FLIP*) que es un inhibidor de la caspasa 8, caspasa 5, FADD y DR5 que forma un complejo inhibidor de la apoptosis y previene la formación del complejo señalizador de la muerte celular (DISC; Safa, 2012) y se encuentra regulado al alza en su expresión y su metilación a la baja en la recuperación con respecto a la normoxia. Se ha demostrado que la muerte por hipoxia/reoxigenación es prevenida por C-FLIP inhibiendo a caspasa 8 y a BAX y provocando la sobreexpresión de Bcl-X_L (*B-cell lymphoma-extra large*) en células endoteliales de pulmón (Xue Wang et al., 2005).

Contrariamente, encontramos una señal antiapoptótica regulada a la baja que podría significar que las células después de la recuperación se encuentran no sólo en un estado favorable para la sobrevivencia celular adaptadas a OGD si no que algunas aún presentan daño o las mismas que expresan los genes proapoptóticos a la baja tienen una regulación más compleja de lo que se piensa, teniendo ambas señales subactivadas; se trata del gen BIRC5, cuyo producto proteico es la survivina, pertenece a la familia de los inhibidores de la apoptosis (AIP) ya que se une a Bcl2 y a Beclin-1 e inhibe el secuestro de Bcl2 por BclxL para provocar autofagia, por lo que la degradación de BIRC5 provoca un aumento en la autofagia y la muerte celular (Hagenbuchner, Kiechl-Kohlendorfer, Obexer y Ausserlechner, 2015). BIRC5 se encuentra regulado a la baja en la recuperación con respecto a la normoxia como con respecto a OGD, así como su metilación al alza en ambas comparaciones. Se ha visto que la expresión de survivina correlaciona con la HIF1A en un modelo de retinopatía en condiciones hipóxicas (Liu, Sun, Zhao, y Chen, 2014), por lo que la subexpresión de survivina después de la recuperación podría deberse a que HIF1A sea el regulador de ésta y al no estar estabilizado en la recuperación su expresión se vea disminuida, por lo que no se trataría de una señal apoptótica del todo.

En su conjunto, las moléculas reguladoras de la vida celular ofrecen señales contradictorias por una parte las caspasas sobrrereguladas en la recuperación y la señal antiapoptótica BIRC5 a la baja y por otra parte C-FLIP al alza y, BMF, p53 y HRK regulados a la baja igualmente en la recuperación nos hace pensar que posiblemente las señales de sobrevivencia estén inhibiendo a las de muerte, pero éstas aún se estén expresando ya que aún existe algún daño en la célula aunque no exista más OGD. Para conocer más a fondo cuál es el destino celular,

si la sobrevivencia o la muerte, de los astrocitos después de OGD, es necesario conocer cómo cambian otros genes reguladores como las DUSP (*Dual Specificity Protein Phosphatase*) y las MAPK que modifican todas las vías de señalización celular. Ya que tenemos subdivisiones dentro de la población celular (Figura 5A), estas señales también podrían explicarse por la activación de la respuesta clásica de la glía reactiva en algunas células y en otras la respuesta general a OGD.

6.1.3 Fosfatasas de especificidad dual y MAP cinasas

Encontramos sobrerreguladas en OGD con respecto a normoxia a las fosfatasas de especificidad dual (DUSP5, DUSP8, DUSP14 y DUSP10) que tienen como principal función desfosforilar a las MAP cinasas como p38 (Kumar, Zettl, Page y Peti, 2013). Se sabe que DUSP8 puede desfosforilar sólo a JNK y p38 MAPK y está reportado que su expresión está sobrerregulada en el hipocampo después de una isquemia cerebral correlacionada con la desfosforilación de JNK y que inhibiendo farmacológicamente ya sea a DUSP8 o a HSP70, proteína involucrada en la sobrerregulación de DUSP8, la actividad de JNK se restablece e incluso aumenta con respecto a una rata no infartada (Huang, Liu, Zhu, Wu, y Guo, 2013). En la recuperación con respecto a OGD observamos una regulación a la baja de los genes de las proteínas DUSP, lo que podría indicar que las MAPK ya no están siendo inactivadas y pueden volver a realizar su función por lo que las células pudieran sobrevivir y adaptarse durante la recuperación. Está demostrado que en la recuperación o reperfusión DUSP14 se regula a la baja en un modelo de isquemia/reperfusión hepática y que esto permite que las vías de NF- κ B y TAK1 (*TGF-Beta Activated Kinase 1, MAP3K7*) se activen y provoquen un daño por reperfusión provocando una inhibición en el crecimiento y proliferación promovidas por DUSP14 y llevando a las células a la muerte (Xiaozhan Wang et al., 2017).

MAPK10, gen codificante para JNK3, fue encontrado regulado a la baja y su metilación al alza en la recuperación con respecto a OGD por lo que consideramos que es una señal antiapoptótica ya que se sabe que ratones JNK3^{-/-} tienen una mayor tasa de sobrevivencia y tamaños menores de lesión después de ser sometidos a un modelo experimental de isquemia cerebral, además de que la protección está mediada por una disminución en la apoptosis debida a la regulación tanto de la liberación de citocromo c, como de la expresión de Bim y

Fas (Kuan et al., 2003). Otro gen de MAPK que encontramos regulado diferencialmente fue MAP3K5, cuya proteína es ASK1 (*Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1*), que se está sobreexpresada en la recuperación con respecto a normoxia, así como su metilación regulada a la baja. Se ha reportado que en un modelo de isquemia/reperfusión de médula espinal su fosforilación (marca de activación) aumenta durante la reperfusión lo que indicaría una señal de daño activo en la célula aún después del término de la isquemia y en nuestro caso de OGD (P. Wang, Cao, Nagel, y Yin, 2007). Estas señales en su conjunto nos indican que después de 8 h de recuperación las células aún tienen activadas las vías de daño celular, sin embargo, esto puede no significar que vayan a morir, sino que existe una adaptación después del insulto que prepara a las células en el posible escenario de otra privación de oxígeno y glucosa.

6.1.4 Genes involucrados en la producción de ROS y el sistema antioxidante

Está bien estudiado que después de la isquemia cerebral existe un daño por reperfusión que, aunque se conocen muchas vías de señalización que son activadas durante este fenómeno, no se sabe exactamente el conjunto de genes que regulan este tipo de daño. Esta reportado que después de 24 h de reperfusión en un modelo murino de infarto cerebral isquémico los niveles de malondialdehído aumentan con respecto al control sin infartar, así como un aumento en la actividad de la MnSOD (*Manganese-Containing Superoxide Dismutase*, Liu et al., 2014) lo que indica que el componente del estrés oxidativo es relevante para el daño por reperfusión como mencionamos antes. SOD3 (*Superoxide Dismutase 3*), que codifica para la superóxido dismutasa 3, es la encargada de regular ROS en la matriz extracelular y en el núcleo. Encontramos un aumento en su expresión y una disminución en la metilación de su promotor en OGD con respecto a normoxia y se sabe que la sobreexpresión de SOD3 por medio de adenovirus en un modelo de isquemia de miembros anteriores en rata disminuye el tamaño de la lesión, fibrosis e inflamación del tejido (Laatikainen et al., 2011). TXNIP, gen cuya proteína es un inhibidor de la tioredoxina, fue encontrado regulado a la baja y su metilación al alza en OGD con respecto a normoxia. Está reportado que este gen se encuentra subexpresado en pacientes con esclerosis múltiple tanto en pacientes sin tratamiento como en pacientes con inmunosupresores y con pacientes con interferón β (Mahmoudian, Khalilnezhad, Gharagozli y Amani, 2017); por lo que su subexpresión es una señal de que el sistema antioxidante se activa cuando ocurre OGD.

También se ha visto que el potencial de membrana mitocondrial permanece alterado hasta después de 48 h de reperfusión en un modelo murino de infarto cerebral (Yue et al., 2015). Se han encontrado moléculas activadas únicamente en la recuperación/reperfusión en el mismo modelo como la neurolisina hasta 7 días después del insulto (Rashid et al., 2014), TRAF1 hasta 72 h (Lu et al., 2013), p-cjun y p-JNK 6 h después del infarto (Chambers, Pachori, Howard, Iqbal, y LoGrasso, 2013), IL-18 (*Interleukin 18*) y IL-18R β (*Interleukin 17 Receptor Subunit Beta*) 6 h posterior al daño (Venkatachalam et al., 2009), IL-6 (*Interleukin 16*), TNF- α e IFN- γ hasta 24 h de reperfusión en el modelo de isquemia hepática (S. Xu et al., 2017), EPO 24 h después (Ryou et al., 2012), entre otras. Recientemente, por medio de análisis metabolómicos se encontró que existen vías de señalización relacionadas con el estrés oxidativo mitocondrial y que se acumula succinato después de la isquemia de distintos tejidos incluido el cerebro y que éste es reoxidado por medio de la cadena de transporte de electrones reversa produciendo una gran cantidad de ROS (Chouchani et al., 2014).

6.1.5 Genes reguladores de la metilación del DNA

Centrándonos en el caso de los cambios epigenómicos vistos después de OGD y en la recuperación podemos notar que hay algunos sitios de metilación intragénicos (Figura 9A) en todas las condiciones y que éstos cambian después de OGD y en la recuperación. Está demostrado que los sitios intragénicos contienen promotores alternativos y además marcas como H3K4me3 que son normalmente asociadas a promotores; este tipo de regulación podría ser una de las que provocan una transcripción tejido-específica (Maunakea et al., 2010), por lo que las marcas de metilación que se presentan en este trabajo que se encuentran en sitios génicos podrían ser igualmente promotores alternativos aún no descritos. Los niveles de metilación global también se modificaron en la reperfusión, específicamente, una hipometilación hasta 10 días después del infarto y una hipermetilación con respecto al control hasta 180 días después del infarto (Wu et al., 2014), coincidiendo con nuestros datos ya que nosotros observamos que la metilación tanto en islas CpG como en promotores es diferente a la de la normoxia. No se conoce al detalle por qué la isquemia causa cambios en la metilación del DNA, pero está reportado que la TET, enzima que se encarga del proceso de desmetilación realizando la oxidación de 5me-C, disminuye su actividad en respuesta a hipoxia y que esta

puede ser la causa de que algunos promotores se hipermetilen (Thienpont et al., 2016). Contrariamente otros estudios como el de Mariani et al. han demostrado que después de hipoxia los niveles de 5hme-C aumentan en los genes con elementos de respuesta a hipoxia en sus promotores y que TET se encuentra sobrerregulada por la acción de HIF1 (Mariani et al., 2014). Estos resultados aparentemente contradictorios podrían significar que en un nivel transcripcional, HIF1 y TET presentan un asa de retroalimentación que hace que los niveles de metilación sean dinámicos y que es importante determinarlos en puntos específicos del ambiente intercelular y del tipo celular, ya sea inmediatamente después de OGD o en la recuperación.

Encontramos una disminución en la expresión y aumento en la metilación de la dihidrofolato reductasa 2 (DHFR2) en OGD con respecto a normoxia. Esta enzima cataliza la conversión de dihidrofolato a tetrahidrofolato por lo cual esta indirectamente relacionada con la regulación de la poza de SAM y por lo tanto de la disponibilidad de grupos metilo para la metilación del DNA (Maguire et al., 2008), que podría explicar parcialmente el decremento en la metilación en OGD con respecto a la normoxia, ya que se han asociado SNPs de otras enzimas participantes del ciclo SAM/SAH en niveles de metilación de DNA (Moruzzi et al., 2017). No se conoce un efecto directo de esta enzima sobre la isquemia, pero está reportado que la suplementación dietética con vitamina B9 reduce el riesgo de infarto cerebral en pacientes con enfermedades cardiovasculares (Tian, Yang, Cui, Zhou y Zhou, 2017). Asimismo, encontramos un aumento en la expresión y disminución en la metilación de FOLR3 (*Folate Receptor 3 (Gamma)*) en la recuperación con respecto a normoxia. Este gen codifica para un transportador de folato y sus derivados podría explicar la remetilación que ocurre en la recuperación. Recientemente, por medio de metanálisis de datos de expresión genética en pacientes con infarto cerebral, se detectó una regulación al alza de FOLR3 con respecto a individuos sanos, sin embargo, aún no se conoce la relación directa entre el gen y la fisiopatología de la isquemia cerebral (Diao y Liu, 2018).

6.1.6 Regulación metabólica en respuesta a OGD y recuperación

Se sabe que el metabolismo es uno de los procesos más diferencialmente regulados y complejos cuando ocurre isquemia (Kalogeris, Baines, Krenz y Korthuis, 2012). Nuestros datos

muestran que efectivamente gran parte del metabolismo está afectado por OGD desde el nivel de los transportadores de nutrientes, enzimas metabólicas y reguladores transcripcionales en respuesta a hipoxia e hipoglucemia. Encontramos un aumento en la expresión y disminución en la metilación de ALDOC (*Aldolase C*), enzima glucolítica que cataliza la conversión de fructosa-1,6-bisfosfato a dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehido-3-fosfato en OGD con respecto a normoxia, así como una disminución en la expresión y aumento en la metilación en la recuperación respecto tanto a OGD como a normoxia. Está reportado que existe un efecto tóxico de la reintroducción de glucosa después de un evento de hipoglucemia (Suh, Gum, Hamby, Chan y Swanson, 2007), que esta mediado por la activación de NOX (*NADPH Oxidase*). Una hipótesis que explicara la regulación a la baja de ALDOC sería disminuir la glucólisis para disminuir el efecto tóxico de la glucosa, sin embargo, se sabe que este efecto no depende de la metabolización de la glucosa (Balteau et al., 2011) por lo que no podemos ofrecer más explicaciones a este fenómeno.

Otra enzima clave en la regulación metabólica es el complejo succinato deshidrogenasa, cuya subunidad A (SDHA) encontramos regulada a la baja y su metilación al alza en OGD con respecto a normoxia. Se sabe que existe una acumulación de succinato en isquemia debido a que SDHA trabaja de manera reversa durante el insulto. Además, la acumulación de succinato es una fuente de ROS durante la reperfusión (Chouchani et al., 2014). Podríamos pensar que la regulación a la baja de SDHA sería un mecanismo para contrarrestar este efecto dañino del succinato, aunque existen reportes de los niveles proteicos de la enzima después de la isquemia.

Uno de los sensores energéticos más estudiados es la adenilato cinasa (AK) que cataliza la conversión de ATP y AMP en 2ADP, por lo que amplifica los cocientes entre ATP/ADP para que las enzimas que se ven afectadas por este cociente modifiquen su expresión rápidamente, provocando una adaptación a los cambios energéticos celulares (Dzeja y Terzic, 2009). Encontramos a AK4 regulada al alza y su metilación a la baja en la recuperación con respecto a normoxia por lo que esto podría indicar que la célula tiene una regulación energética más estricta después de un evento como el OGD. Se sabe que la inhibición de AK1 resulta en una comunicación ineficiente de los niveles energéticos disminuyendo la generación de AMP y la actividad de la creatina cinasa después de la isquemia cardiaca (Dzeja y Terzic, 2009).

6.2 Conclusiones y perspectivas

Tomando todos los resultados en cuenta, podemos asegurar que la recuperación posee algunas de las características propias de la reperfusión sanguínea y que ésta es un estado claramente distinto a la normoxia tanto a nivel transcripcional como epigenético. Diversas vías de señalización se regulan en OGD, principalmente vías de muerte, de producción de ROS y del sistema antioxidante, vías de control del ciclo celular y reparación de DNA, transportadores metabólicos y enzimas reguladoras de distintas señalizaciones por lo que pudimos describir detalladamente cuales genes son los que se transcriben y cuales se dejan de transcribir. En el caso de la recuperación, observamos un conflicto en la regulación de vías de muerte y de sobrevivencia, además de enzimas que sirven para brindar adaptabilidad al insulto después de éste, además de una compleja regulación de los genes involucrados en el ciclo celular como en OGD, pero también, sorpresivamente, la vía de guía axonal sobrreregulada. Más estudios permitirán conocer con más detalle las isoformas específicas de los genes que se transcriben, ya que distintas eficiencias o incluso funciones podrían estar reguladas por isoformas específicas de un gen, en los que se necesitaría una profundidad de secuenciación y una n mayores. Además, es necesario conocer si OGD es un modelo fiel a lo que sucede en la isquemia cerebral por lo que ensayos en cerebros humanos que hayan sufrido un infarto son necesarios para corroborar los datos presentados en este trabajo ya que *in vivo* existen multitud de procesos no tomados en cuenta aquí como la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, la inflamación periférica y de la microglía y la respuesta neuronal hacia los astrocitos después del infarto. Estudiar y entender los mecanismos celulares y moleculares que subyacen este fenómeno es muy importante si se quieren explorar nuevas alternativas terapéuticas ya que actualmente no existe ningún tratamiento eficaz que pueda salvar el tejido neuronal de la muerte y de la discapacidad funcional.

7. Bibliografía

- Abhinand, P. A., Manikandan, M., Mahalakshmi, R., & Ragunath, P. K. (2017). Meta-analysis study to evaluate the association of MTHFR C677T polymorphism with risk of ischemic stroke. *Bioinformatics*, *13*(6), 214–219. <https://doi.org/10.6026/97320630013214>
- Allen, A. P., Naughton, M., Dowling, J., Walsh, A., Ismail, F., Shorten, G., ... Clarke, G. (2015). Serum BDNF as a peripheral biomarker of treatment-resistant depression and the rapid antidepressant response: A comparison of ketamine and ECT. *Journal of Affective Disorders*, *186*, 306–311. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.06.033>
- Aras, R., Barron, A. M., & Pike, C. J. (2012). Caspase activation contributes to astrogliosis. *Brain Research*, *1450*, 102–115. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.02.056>
- Baba, M., Hong, S.-B., Sharma, N., Warren, M. B., Nickerson, M. L., Iwamatsu, A., ... Zbar, B. (2006). Folliculin encoded by the BHD gene interacts with a binding protein, FNIP1, and AMPK, and is involved in AMPK and mTOR signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(42), 15552–15557. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603781103>
- Baccarelli, A., Wright, R., Bollati, V., Litonjua, A., Zanobetti, A., Tarantini, L., ... Schwartz, J. (2010). Ischemic Heart Disease and Stroke in Relation to Blood DNA Methylation: *Epidemiology*, *21*(6), 819–828. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e3181f20457>
- Baik, H. W., & Russell, R. M. (1999). Vitamin B12 deficiency in the elderly. *Annual Review of Nutrition*, *19*, 357–377. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.19.1.357>
- Bailey, P., Chang, D. K., Nones, K., Johns, A. L., Patch, A.-M., Gingras, M.-C., ... Grimmond, S. M. (2016). Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature*, *531*(7592), 47–52. <https://doi.org/10.1038/nature16965>
- Ballina, L. R. de la, Cano-Crespo, S., González-Muñoz, E., Bial, S., Estrach, S., Cailleteau, L., ... Féral, C. C. (2016). Amino Acid Transport Associated to Cluster of Differentiation 98 Heavy Chain (CD98hc) Is at the Cross-road of Oxidative Stress and Amino Acid Availability. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(18), 9700–9711. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.704254>
- Balteau, M., Tajeddine, N., de Meester, C., Ginion, A., Des Rosiers, C., Brady, N. R., ... Beauloye, C. (2011). NADPH oxidase activation by hyperglycaemia in cardiomyocytes is independent of glucose metabolism but requires SGLT1. *Cardiovascular Research*, *92*(2), 237–246. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr230>
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, *21*(3), 381–395. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
- Baron, J.-C., Yamauchi, H., Fujioka, M., & Endres, M. (2014). Selective neuronal loss in ischemic stroke and cerebrovascular disease. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *34*(1), 2–18. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.188>
- Basil, P., Li, Q., Dempster, E. L., Mill, J., Sham, P.-C., Wong, C. C. Y., & McAlonan, G. M. (2014). Prenatal maternal immune activation causes epigenetic differences in adolescent mouse brain. *Translational Psychiatry*, *4*(9), e434. <https://doi.org/10.1038/tp.2014.80>
- Benjamin, E. J., Blaha, M. J., Chiuve, S. E., Cushman, M., Das, S. R., Deo, R., ... Subcommittee, O. behalf of the A. H. A. S. C. and S. S. (2017). Heart Disease and Stroke Statistics—2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, *CIR.0000000000000485*. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000485>
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development*, *16*(1), 6–21. <https://doi.org/10.1101/gad.947102>
- Bohne, F., Langer, D., Martiné, U., Eider, C. S., Cencic, R., Begemann, M., ... Prawitt, D. (2016). Kaiso mediates human ICR1 methylation maintenance and H19 transcriptional fine regulation. *Clinical Epigenetics*, *8*, 47. <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0215-4>

- Carmena, M., Wheelock, M., Funabiki, H., & Earnshaw, W. C. (2012). The Chromosomal Passenger Complex (CPC): From Easy Rider to the Godfather of Mitosis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(12), 789–803. <https://doi.org/10.1038/nrm3474>
- Catalina-Rodriguez, O., Kolukula, V. K., Tomita, Y., Preet, A., Palmieri, F., Wellstein, A., ... Avantiaggiati, M. L. (2012). The mitochondrial citrate transporter, CIC, is essential for mitochondrial homeostasis. *Oncotarget*, 3(10), 1220–1235.
- Cekanaviciute Egle, Fathali Nancy, Doyle Kristian P., Williams Aaron M., Han Jullet, & Buckwalter Marion S. (2014). Astrocytic transforming growth factor-beta signaling reduces subacute neuroinflammation after stroke in mice. *Glia*, 62(8), 1227–1240. <https://doi.org/10.1002/glia.22675>
- Chai, H., Diaz-Castro, B., Shigetomi, E., Monte, E., Oceau, J. C., Yu, X., ... Khakh, B. S. (2017). Neural Circuit-Specialized Astrocytes: Transcriptomic, Proteomic, Morphological, and Functional Evidence. *Neuron*, 95(3), 531-549.e9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.029>
- Chambers, J. W., Pachori, A., Howard, S., Iqbal, S., & LoGrasso, P. V. (2013). Inhibition of JNK Mitochondrial Localization and Signaling Is Protective against Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *Journal of Biological Chemistry*, 288(6), 4000–4011. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.406777>
- Chan, T. L., Yuen, S. T., Kong, C. K., Chan, Y. W., Chan, A. S., Ng, W. F., ... Leung, S. Y. (2006). Heritable germline epimutation of MSH2 in a family with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nature Genetics*, 38(10), 1178–1183. <https://doi.org/10.1038/ng1866>
- Chen, B., Longtine, M. S., Sadovsky, Y., & Nelson, D. M. (2010). Hypoxia downregulates p53 but induces apoptosis and enhances expression of BAD in cultures of human syncytiotrophoblasts. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 299(5), C968–C976. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00154.2010>
- Chen, W., Xu, H., Chen, X., Liu, Z., Zhang, W., & Xia, D. (2016). Functional and Activity Analysis of Cattle UCP3 Promoter with MRFs-Related Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(5): 682.. <https://dx.doi.org/10.3390%2Fijms17050682>
- Chestnut, B. A., Chang, Q., Price, A., Lesuisse, C., Wong, M., & Martin, L. J. (2011). Epigenetic Regulation of Motor Neuron Cell Death through DNA Methylation. *Journal of Neuroscience*, 31(46), 16619–16636. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1639-11.2011>
- Chiang, M.-C., Ashraf, Q. M., Ara, J., Mishra, O. P., & Delivoria-Papadopoulos, M. (2007). Mechanism of caspase-3 activation during hypoxia in the cerebral cortex of newborn piglets. *Neuroscience Letters*, 421(1), 67–71. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.05.024>
- Chisholm, N. C., Henderson, M. L., Selvamani, A., Park, M. J., Dindot, S., Miranda, R. C., & Sohrabji, F. (2015). Histone methylation patterns in astrocytes are influenced by age following ischemia. *Epigenetics*, 10(2), 142–152. <https://doi.org/10.1080/15592294.2014.1001219>
- Chomyk, A. M., Volsko, C., Tripathi, A., Deckard, S. A., Trapp, B. D., Fox, R. J., & Dutta, R. (2017). DNA methylation in demyelinated multiple sclerosis hippocampus. *Scientific Reports*, 7(1), 8696. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08623-5>
- Chouchani, E. T., Pell, V. R., Gaude, E., Aksentijević, D., Sundier, S. Y., Robb, E. L., ... Murphy, M. P. (2014). Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*, 515(7527), 431. <https://doi.org/10.1038/nature13909>
- Christiani, Y., Byles, J., Tavener, M., & Dugdale, P. (2015). Socioeconomic related inequality in depression among young and middle-adult women in Indonesia's major cities. *Journal of Affective Disorders*, 182, 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.04.042>
- Cidad, P., Garcia-Nogales, P., Almeida, A., & Bolaños, J. P. (2001). Expression of glucose transporter GLUT3 by endotoxin in cultured rat astrocytes: the role of nitric oxide. *Journal of Neurochemistry*, 79(1), 17–24. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00523.x>
- Costello Lab. (2010). MeDIP-seq library construction protocol v2, 5.
- Couplier, M., Anders, J., & Ibáñez, C. F. (2002). Coordinated Activation of Autophosphorylation Sites in the RET Receptor Tyrosine Kinase IMPORTANCE OF TYROSINE 1062 FOR GDNF MEDIATED NEURONAL DIFFERENTIATION AND SURVIVAL. *Journal of Biological Chemistry*, 277(3), 1991–1999. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107992200>

- Coultas, L., Terzano, S., Thomas, T., Voss, A., Reid, K., Stanley, E. G., ... Strasser, A. (2007). Hrk/DP5 contributes to the apoptosis of select neuronal populations but is dispensable for haematopoietic cell apoptosis. *Journal of Cell Science*, *120*(12), 2044–2052. <https://doi.org/10.1242/jcs.002063>
- Deaton, A. M., & Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & Development*, *25*(10), 1010–1022. <https://doi.org/10.1101/gad.2037511>
- Dębski, K. J., Pitkanen, A., Puhakka, N., Bot, A. M., Khurana, I., Harikrishnan, K., ... Kobow, K. (2016). Etiology matters – Genomic DNA Methylation Patterns in Three Rat Models of Acquired Epilepsy. *Scientific Reports*, *6*(1). <https://doi.org/10.1038/srep25668>
- Diao, X., & Liu, A. (2018). Identification of core pathways based on attractor and crosstalk in ischemic stroke. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *15*(2), 1520–1524. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5563>
- Dixon, G. B., Bay, L. K., & Matz, M. V. (2016). Evolutionary Consequences of DNA Methylation in a Basal Metazoan. *Molecular Biology and Evolution*, *33*(9), 2285–2293. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw100>
- Dzeja, P., & Terzic, A. (2009). Adenylate Kinase and AMP Signaling Networks: Metabolic Monitoring, Signal Communication and Body Energy Sensing. *International Journal of Molecular Sciences*, *10*(4), 1729–1772. <https://doi.org/10.3390/ijms10041729>
- Endres, M., Fan, G., Meisel, A., Dirnagl, U., & Jaenisch, R. (2001). Effects of cerebral ischemia in mice lacking Dna methyltransferase 1 in post-mitotic neurons. *Neuroreport*, *12*(17), 3763–3766.
- Endres, M., Meisel, A., Biniszkiwicz, D., Namura, S., Prass, K., Ruscher, K., ... Dirnagl, U. (2000). DNA Methyltransferase Contributes to Delayed Ischemic Brain Injury. *Journal of Neuroscience*, *20*(9), 3175–3181.
- Ergul, A., Alhusban, A., & Fagan, S. C. (2012). Angiogenesis: A Harmonized Target for Recovery after Stroke. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, *43*(8), 2270–2274. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.642710>
- Fabbri, M., Garzon, R., Cimmino, A., Liu, Z., Zanesi, N., Callegari, E., ... Croce, C. M. (2007). MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(40), 15805–15810. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707628104>
- Faiz, M., Sachewsky, N., Gascón, S., Bang, K. W. A., Morshead, C. M., & Nagy, A. (2015). Adult Neural Stem Cells from the Subventricular Zone Give Rise to Reactive Astrocytes in the Cortex after Stroke. *Cell Stem Cell*, *17*(5), 624–634. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.08.002>
- Felling, R. J., & Song, H. (2015). Epigenetic mechanisms of neuroplasticity and the implications for stroke recovery. *Experimental Neurology*, *268*, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.09.017>
- Fenouil, R., Cauchy, P., Koch, F., Descostes, N., Cabeza, J. Z., Innocenti, C., ... Andrau, J.-C. (2012). CpG islands and GC content dictate nucleosome depletion in a transcription-independent manner at mammalian promoters. *Genome Research*, *22*(12), 2399–2408. <https://doi.org/10.1101/gr.138776.112>
- Fu, T.-G., Wang, L., Li, W., Li, J.-Z., & Li, J. (2016). miR-143 inhibits oncogenic traits by degrading NUA2 in glioblastoma. *International Journal of Molecular Medicine*, *37*(6), 1627–1635.
- Fuso, A., Seminara, L., Cavallaro, R. A., D'Anselmi, F., & Scarpa, S. (2005). S-adenosylmethionine/homocysteine cycle alterations modify DNA methylation status with consequent deregulation of PS1 and BACE and beta-amyloid production. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *28*(1), 195–204. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.09.007>
- Gao, Y., Signore, A. P., Yin, W., Cao, G., Yin, X.-M., Sun, F., ... Chen, J. (2005). Neuroprotection against Focal Ischemic Brain Injury by Inhibition of c-Jun N-Terminal Kinase and Attenuation of the Mitochondrial Apoptosis-Signaling Pathway. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *25*(6), 694–712. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600062>

- Gómez-Úriz, A. M., Milagro, F. I., Mansego, M. L., Cordero, P., Abete, I., De Arce, A., ... Campión, J. (2015). Obesity and ischemic stroke modulate the methylation levels of KCNQ1 in white blood cells. *Human Molecular Genetics*, *24*(5), 1432–1440. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu559>
- Habib, A., Polavarapu, R., Karmali, V., Guo, L., Van Dam, R., Cheng, Q., ... Finn, A. V. (2015). Hepcidin-ferroportin axis controls toll-like receptor 4 dependent macrophage inflammatory responses in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*, *241*(2), 692–700. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.06.025>
- Hagenbuchner, J., Kiechl-Kohlendorfer, U., Obexer, P., & Ausserlechner, M. J. (2015). BIRC5/Survivin as a target for glycolysis inhibition in high-stage neuroblastoma. *Oncogene*, *35*(16), onc2015264. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.264>
- Hajkova, P., Erhardt, S., Lane, N., Haaf, T., El-Maarri, O., Reik, W., ... Surani, M. A. (2002). Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mechanisms of Development*, *117*(1–2), 15–23
- Handy, D. E., Castro, R., & Loscalzo, J. (2011). Epigenetic Modifications: Basic Mechanisms and Role in Cardiovascular Disease. *Circulation*, *123*(19), 2145–2156. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.956839>
- Happo, L., Strasser, A., & Cory, S. (2012). BH3-only proteins in apoptosis at a glance. *J Cell Sci*, *125*(5), 1081–1087. <https://doi.org/10.1242/jcs.090514>
- Harraz, M. M., Eacker, S. M., Wang, X., Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2012). MicroRNA-223 is neuroprotective by targeting glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(46), 18962–18967. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121288109>
- Hartley, I., Elkhoury, F. F., Heon Shin, J., Xie, B., Gu, X., Gao, Y., ... Haddad, G. G. (2013). Long-Lasting Changes in DNA Methylation Following Short-Term Hypoxic Exposure in Primary Hippocampal Neuronal Cultures. *PLoS ONE*, *8*(10), e77859. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077859>
- Harwood, S. M., Yaqoob, M. M., & Allen, D. A. (2005). Caspase and calpain function in cell death: bridging the gap between apoptosis and necrosis. *Annals of Clinical Biochemistry*, *42*(6), 415–431. <https://doi.org/10.1258/000456305774538238>
- Hausmann, M., Leucht, K., Ploner, C., Kiessling, S., Villunger, A., Becker, H., ... Rogler, G. (2011). BCL-2 Modifying Factor (BMF) Is a Central Regulator of Anoikis in Human Intestinal Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(30), 26533–26540. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.265322>
- Hayakawa, K., Esposito, E., Wang, X., Terasaki, Y., Liu, Y., Xing, C., ... Lo, E. H. (2016). Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature*, *535*(7613), 551–555. <https://doi.org/10.1038/nature18928>
- Helin, K., & Dhanak, D. (2013). Chromatin proteins and modifications as drug targets. *Nature*, *502*(7472), 480–488. <https://doi.org/10.1038/nature12751>
- Hellsten, S. V., Hägglund, M. G., Eriksson, M. M., & Fredriksson, R. (2017). The neuronal and astrocytic protein SLC38A10 transports glutamine, glutamate, and aspartate, suggesting a role in neurotransmission. *FEBS Open Bio*, *7*(6), 730–746. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12219>
- Hines, D. J., & Haydon, P. G. (2013). Inhibition of a SNARE-Sensitive Pathway in Astrocytes Attenuates Damage following Stroke. *Journal of Neuroscience*, *33*(10), 4234–4240. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5495-12.2013>
- Hochstim, C., Deneen, B., Lukaszewicz, A., Zhou, Q., & Anderson, D. J. (2008). Identification of Positionally Distinct Astrocyte Subtypes whose Identities Are Specified by a Homeodomain Code. *Cell*, *133*(3), 510–522. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.046>
- Hong, C. S., Graham, N. A., Gu, W., Espindola Camacho, C., Mah, V., Maresh, E. L., ... Christofk, H. R. (2016). MCT1 Modulates Cancer Cell Pyruvate Export and Growth of Tumors that Co-express MCT1 and MCT4. *Cell Reports*, *14*(7), 1590–1601. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.057>

- Hosang, G. M., Shiles, C., Tansey, K. E., McGuffin, P., & Uher, R. (2014). Interaction between stress and the BDNF Val66Met polymorphism in depression: a systematic review and meta-analysis. *BMC Medicine*, *12*, 7. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-12-7>
- Hou, J., Wilder, P.J., Bernadt, C.T., Boer, B., Neve, R.M., Rizzino, A. (2004). Transcriptional regulation of the murine Elf3 gene in embryonal carcinoma cells and their differentiated counterparts: requirement for a novel upstream regulatory region. *Gene*, *340*(1):123-31. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.06.007>
- Hu, C.-J., Chen, S.-D., Yang, D.-I., Lin, T.-N., Chen, C.-M., Huang, T. H.-M., & Hsu, C. Y. (2006). Promoter Region Methylation and Reduced Expression of Thrombospondin-1 after Oxygen—Glucose Deprivation in Murine Cerebral Endothelial Cells. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *26*(12), 1519–1526. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600304>
- Hu, Z., Wang, Y., Huang, F., Chen, R., Li, C., Wang, F., ... Zhang, H. (2015). Brain-expressed X-linked 2 Is Pivotal for Hyperactive Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR)-mediated Tumorigenesis. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(42), 25756–25765. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.665208>
- Hu, Z., Zhong, B., Tan, J., Chen, C., Lei, Q., & Zeng, L. (2017). The Emerging Role of Epigenetics in Cerebral Ischemia. *Molecular Neurobiology*, *54*(3), 1887–1905. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9788-3>
- Huang, Z., Liu, Y., Zhu, J., Wu, H., & Guo, J. (2013). Involvement of the dual-specificity phosphatase M3/6 in c-Jun N-terminal kinase inactivation following cerebral ischemia in the rat hippocampus. *International Journal of Neuroscience*, *123*(11), 802–809. <https://doi.org/10.3109/00207454.2013.803477>
- Huminiecki, Ł., & Horbańczuk, J. (2017). Can We Predict Gene Expression by Understanding Proximal Promoter Architecture? *Trends in Biotechnology*, *35*(6), 530–546. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.03.007>
- Hung, V. K., Yeung, P. K., Lai, A. K., Ho, M. C., Lo, A. C., Chan, K. C., ... Chung, S. K. (2015). Selective Astrocytic Endothelin-1 Overexpression Contributes to Dementia Associated with Ischemic Stroke by Exaggerating Astrocyte-Derived Amyloid Secretion. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *35*(10), 1687–1696. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.109>
- Huynh, J. L., Garg, P., Thin, T. H., Yoo, S., Dutta, R., Trapp, B. D., ... Casaccia, P. (2014). Epigenome-wide differences in pathology-free regions of multiple sclerosis-affected brains. *Nature Neuroscience*, *17*(1), 121–130. <https://doi.org/10.1038/nn.3588>
- Ijichi, A., Sakuma, S., & Tofilon, P. J. (1995). Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression in normal rat astrocyte cultures. *Glia*, *14*(2), 87–93. <https://doi.org/10.1002/glia.440140203>
- Ikeda, K., Kinoshita, M., Kayama, H., Nagamori, S., Kongpracha, P., Umemoto, E., ... Takeda, K. (2017). Slc3a2 Mediates Branched-Chain Amino-Acid-Dependent Maintenance of Regulatory T Cells. *Cell Reports*, *21*(7), 1824–1838. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.082>
- Januar, V., Ancelin, M.-L., Ritchie, K., Saffery, R., & Ryan, J. (2015). BDNF promoter methylation and genetic variation in late-life depression. *Translational Psychiatry*, *5*(8), e619. <https://doi.org/10.1038/tp.2015.114>
- Jin, X., Kim, L. J. Y., Wu, Q., Wallace, L. C., Prager, B. C., Sanvoranart, T., ... Rich, J. N. (2017). Targeting glioma stem cells through combined BMI1 and EZH2 inhibition. *Nature Medicine*, *23*(11), nm.4415. <https://doi.org/10.1038/nm.4415>
- Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*, *13*(7), 484–492. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>
- Jowaed, A., Schmitt, I., Kaut, O., & Wüllner, U. (2010). Methylation regulates alpha-synuclein expression and is decreased in Parkinson's disease patients' brains. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *30*(18), 6355–6359. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6119-09.2010>

- Jung, S. M., Lee, J.-H., Park, J., Oh, Y. S., Lee, S. K., Park, J. S., ... Park, S. H. (2013). Smad6 inhibits non-canonical TGF- β 1 signalling by recruiting the deubiquitinase A20 to TRAF6. *Nature Communications*, 4, 2562. <https://doi.org/10.1038/ncomms3562>
- Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M., & Korthuis, R. J. (2012). Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. *International review of cell and molecular biology*, 298, 229–317. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7>
- Keene, K. L., Chen, W.-M., Chen, F., Williams, S. R., Elkhatib, S. D., Hsu, F.-C., ... Sale, M. M. (2014). Genetic associations with plasma B12, B6, and folate levels in an ischemic stroke population from the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) trial. *Frontiers in Public Health*, 2. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00112>
- Kemme, C. A., Marquez, R., Luu, R. H., & Iwahara, J. (2017). Potential role of DNA methylation as a facilitator of target search processes for transcription factors through interplay with methyl-CpG-binding proteins. *Nucleic Acids Research*, 45(13), 7751–7759. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx387>
- Khakh, B. S., & Sofroniew, M. V. (2015). Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nature Neuroscience*, 18(7), 942–952. <https://doi.org/10.1038/nn.4043>
- Klein, H.-U., & Schäfer, M. (2016). Integrative Analysis of Histone ChIP-seq and RNA-seq Data: Integrative Analysis of Histone ChIP-seq and RNA-seq Data. En J. L. Haines, B. R. Korf, C. C. Morton, C. E. Seidman, J. G. Seidman, & D. R. Smith (Eds.), *Current Protocols in Human Genetics* (pp. 20.3.1-20.3.16). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/cphg.17>
- Kobayashi, H., Sakurai, T., Imai, M., Takahashi, N., Fukuda, A., Yayoi, O., ... Kono, T. (2012). Contribution of Intragenic DNA Methylation in Mouse Gametic DNA Methylomes to Establish Oocyte-Specific Heritable Marks. *PLOS Genetics*, 8(1), e1002440. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002440>
- Kuan, C.-Y., Whitmarsh, A. J., Yang, D. D., Liao, G., Schloemer, A. J., Dong, C., ... Rakic, P. (2003). A critical role of neural-specific JNK3 for ischemic apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25), 15184–15189. <https://doi.org/10.1073/pnas.2336254100>
- Kucharzewska, P., Christianson, H. C., & Belting, M. (2015). Global Profiling of Metabolic Adaptation to Hypoxic Stress in Human Glioblastoma Cells. *PLOS ONE*, 10(1), e0116740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116740>
- Kumagai, C., Kalman, B., Middleton, F. A., Vyshkina, T., & Massa, P. T. (2012). Increased promoter methylation of the immune regulatory gene SHP-1 in leukocytes of multiple sclerosis subjects. *Journal of Neuroimmunology*, 246(1–2), 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2012.03.003>
- Kumar, G. S., Zettl, H., Page, R., & Peti, W. (2013). Structural basis for the regulation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase p38 α by the dual specificity phosphatase 16 MAP kinase binding domain in solution. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(39), 28347–28356. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.499178>
- Laatikainen, L. E., Incoronato, M., Castellone, M. D., Laurila, J. P., Santoro, M., & Laukkanen, M. O. (2011). SOD3 Decreases Ischemic Injury Derived Apoptosis through Phosphorylation of Erk1/2, Akt, and FoxO3a. *PLoS ONE*, 6(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024456>
- Law, J. A., & Jacobsen, S. E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics*, 11(3), 204–220. <https://doi.org/10.1038/nrg2719>
- Lee, J., Inoue, K., Ono, R., Ogonuki, N., Kohda, T., Kaneko-Ishino, T., ... Ishino, F. (2002). Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development*, 129(8), 1807–1817.
- Lee, J.-C., Park, J. H., Yan, B. C., Kim, I. H., Cho, G.-S., Jeoung, D., ... Won, M.-H. (2013). Effects of Transient Cerebral Ischemia on the Expression of DNA Methyltransferase 1 in the Gerbil Hippocampal CA1 Region. *Neurochemical Research*, 38(1), 74–81. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0890-2>

- LeMaistre, J. L., & Anderson, C. M. (2009). Custom astrocyte-mediated vasomotor responses to neuronal energy demand. *Genome Biology*, *10*(2), 209. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-2-209>
- Li, J., Ma, X., Yu, W., Lou, Z., Mu, D., Wang, Y., ... Qi, S. (2012). Reperfusion Promotes Mitochondrial Dysfunction following Focal Cerebral Ischemia in Rats. *PLOS ONE*, *7*(9), e46498. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046498>
- Li, J.-Y., Lees-Murdock, D. J., Xu, G.-L., & Walsh, C. P. (2004). Timing of establishment of paternal methylation imprints in the mouse. *Genomics*, *84*(6), 952–960. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2004.08.012>
- Li, Z., Yu, F., Zhou, X., Zeng, S., Zhan, Q., Yuan, M., ... Xia, J. (2017). Promoter hypomethylation of microRNA223 gene is associated with atherosclerotic cerebral infarction. *Atherosclerosis*, *263*, 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.06.924>
- Liggett, T., Melnikov, A., Tilwalli, S., Yi, Q., Chen, H., Repogle, C., ... Levenson, V. (2010). Methylation patterns of cell-free plasma DNA in relapsing–remitting multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, *290*(1), 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2009.12.018>
- Lin, H.-F., Hsi, E., Huang, L.-C., Liao, Y.-C., Juo, S.-H. H., & Lin, R.-T. (2017). Methylation in the matrix metalloproteinase-2 gene is associated with cerebral ischemic stroke. *Journal of Investigative Medicine: The Official Publication of the American Federation for Clinical Research*, *65*(4), 794–799. <https://doi.org/10.1136/jim-2016-000277>
- Liu, N., Sun, Y., Zhao, N., & Chen, L. (2014). Role of hypoxia-inducible factor-1 α and survivin in oxygen-induced retinopathy in mice. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, *7*(10), 6814.
- Liu, X., Cheng, R., Verbitsky, M., Kisselev, S., Browne, A., Mejia-Sanatana, H., ... Lee, J. H. (2011). Genome-wide association study identifies candidate genes for Parkinson's disease in an Ashkenazi Jewish population. *BMC Medical Genetics*, *12*, 104. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-12-104>
- Long, J. Z., Svensson, K. J., Bateman, L. A., Lin, H., Kamenecka, T., Lokurkar, I. A., ... Spiegelman, B. M. (2016). The Secreted Enzyme PM20D1 Regulates Lipidated Amino Acid Uncouplers of Mitochondria. *Cell*, *166*(2), 424–435. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.071>
- Magnusson, J. P., Göritz, C., Tatarishvili, J., Dias, D. O., Smith, E. M. K., Lindvall, O., ... Frisén, J. (2014). A latent neurogenic program in astrocytes regulated by Notch signaling in the mouse. *Science (New York, N.Y.)*, *346*(6206), 237–241. <https://doi.org/10.1126/science.346.6206.237>
- Maguire, M., Nield, P. C., Devling, T., Jenkins, R. E., Park, B. K., Polański, R., ... Boyd, M. T. (2008). MDM2 Regulates Dihydrofolate Reductase Activity through Monoubiquitination. *Cancer research*, *68*(9), 3232–3242. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5271>
- Mahmoudian, E., Khalilnezhad, A., Gharagozli, K., & Amani, D. (2017). Thioredoxin-1, redox factor-1 and thioredoxin-interacting protein, mRNAs are differentially expressed in Multiple Sclerosis patients exposed and non-exposed to interferon and immunosuppressive treatments. *Gene*, *634*(Supplement C), 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.08.021>
- Mandric, I., Temate-Tiagueu, Y., Shcheglova, T., Al Seesi, S., Zelikovsky, A., & Mandoiu, I. I. (2017). Fast Bootstrapping-Based Estimation of Confidence Intervals of Expression Levels and Differential Expression from RNA-Seq Data. *Bioinformatics (Oxford, England)*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx365>
- Manzanero, S., Santro, T., & Arumugam, T. V. (2013). Neuronal oxidative stress in acute ischemic stroke: Sources and contribution to cell injury. *Neurochemistry International*, *62*(5), 712–718. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.11.009>
- Mărgăritescu, O., Pirici, D., & Mărgăritescu, C. (2011). VEGF expression in human brain tissue after acute ischemic stroke. *Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine De Morphologie Et Embryologie*, *52*(4), 1283–1292.
- Mariani, C. J., Vasanthakumar, A., Madzo, J., Yesilkanal, A., Bhagat, T., Yu, Y., ... Godley, L. A. (2014). TET1-Mediated Hydroxymethylation Facilitates Hypoxic Gene Induction in Neuroblastoma. *Cell Reports*, *7*(5), 1343–1352. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.040>

- Markišić, M., Pavlović, A. M., & Pavlović, D. M. (2017). The Impact of Homocysteine, Vitamin B12, and Vitamin D Levels on Functional Outcome after First-Ever Ischaemic Stroke. *BioMed Research International*, 2017, 5489057. <https://doi.org/10.1155/2017/5489057>
- Mastroeni, D., Grover, A., Delvaux, E., Whiteside, C., Coleman, P. D., & Rogers, J. (2010). Epigenetic changes in Alzheimer's disease: Decrements in DNA methylation. *Neurobiology of Aging*, 31(12), 2025–2037. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.12.005>
- Mattes, K., Berger, G., Geugien, M., Vellenga, E., & Schepers, H. (2017). CITED2 affects leukemic cell survival by interfering with p53 activation. *Cell Death & Disease*, 8(10), cddis2017548. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.548>
- Maunakea, A. K., Nagarajan, R. P., Bilenky, M., Ballinger, T. J., D'Souza, C., Fouse, S. D., ... Costello, J. F. (2010). Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature*, 466(7303), 253. <https://doi.org/10.1038/nature09165>
- Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G.-W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., ... Ratcliffe, P. J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 399(6733), 271–275. <https://doi.org/10.1038/20459>
- Meng, Q., Zhi, T., Chao, Y., Nie, E., Xu, X., Shi, Q., ... Yu, R. (2014). Bex2 controls proliferation of human glioblastoma cells through NF-κB signaling pathway. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, 53(2), 262–270. <https://doi.org/10.1007/s12031-013-0215-1>
- Mense, S. M., Sengupta, A., Zhou, M., Lan, C., Bentsman, G., Volsky, D. J., & Zhang, L. (2006). Gene expression profiling reveals the profound upregulation of hypoxia-responsive genes in primary human astrocytes. *Physiological Genomics*, 25(3), 435–449. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00315.2005>
- Miao, X.-R., Fan, L.-C., Wu, S., Mao, Q.-X., Li, Z., Lutz, B. M., ... Tao, Y.-X. (2017). DNMT3a contributes to the development and maintenance of bone cancer pain by silencing Kv1.2 expression in spinal cord dorsal horn. *Molecular Pain*, 13, 1744806917740681. <https://doi.org/10.1177/1744806917740681>
- Miranda-Gonçalves, V., Bezerra, F., Costa-Almeida, R., Freitas-Cunha, M., Soares, R., Martinho, O., ... Baltazar, F. (2017). Monocarboxylate transporter 1 is a key player in glioma-endothelial cell crosstalk. *Molecular Carcinogenesis*, 56(12), 2630–2642. <https://doi.org/10.1002/mc.22707>
- Mishima, T., Miner, J. H., Morizane, M., Stahl, A., & Sadovsky, Y. (2011). The Expression and Function of Fatty Acid Transport Protein-2 and -4 in the Murine Placenta. *PLOS ONE*, 6(10), e25865. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025865>
- Mitchell, R. W., On, N. H., Del Bigio, M. R., Miller, D. W., & Hatch, G. M. (2011). Fatty acid transport protein expression in human brain and potential role in fatty acid transport across human brain microvessel endothelial cells. *Journal of Neurochemistry*, 117(4), 735–746. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07245.x>
- Morken, T. S., Brekke, E., Håberg, A., Widerøe, M., Brubakk, A.-M., & Sonnewald, U. (2014). Altered Astrocyte–Neuronal Interactions After Hypoxia-Ischemia in the Neonatal Brain in Female and Male Rats. *Stroke*, 45(9), 2777–2785. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.005341>
- Moruzzi, S., Guarini, P., Udali, S., Ruzzenente, A., Guglielmi, A., Conci, S., ... Friso, S. (2017). One-carbon genetic variants and the role of MTHFD1 1958G>A in liver and colon cancer risk according to global DNA methylation. *PLoS One*, 12(10), e0185792. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185792>
- Moskowitz, M. A., Lo, E. H., & Iadecola, C. (2010). The Science of Stroke: Mechanisms in Search of Treatments. *Neuron*, 67(2), 181–198. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.07.002>
- Murtagg, F., & Legendre, P. (2014). Ward's Hierarchical Agglomerative Clustering Method: Which Algorithms Implement Ward's Criterion? *Journal of Classification*, 31(3), 274–295. <https://doi.org/10.1007/s00357-014-9161-z>
- Nagy, C., Suderman, M., Yang, J., Szyf, M., Mechawar, N., Ernst, C., & Turecki, G. (2015). Astrocytic abnormalities and global DNA methylation patterns in depression and suicide. *Molecular Psychiatry*, 20(3), 320–328. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.21>

- Nalls, M. A., Pankratz, N., Lill, C. M., Do, C. B., Hernandez, D. G., Saad, M., ... Singleton, A. B. (2014). Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nature Genetics*, *46*(9), 989–993. <https://doi.org/10.1038/ng.3043>
- Napoli, E., Tassone, F., Wong, S., Angkustsiri, K., Simon, T. J., Song, G., & Giulivi, C. (2015). Mitochondrial Citrate Transporter-dependent Metabolic Signature in the 22q11.2 Deletion Syndrome. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(38), 23240–23253. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.6723607>
- Neuhaus, W., Gaiser, F., Mahringer, A., Franz, J., Riethmüller, C., & Förster, C. (2014). The pivotal role of astrocytes in an in vitro stroke model of the blood-brain barrier. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00352>
- Ng, D., Pitcher, G. M., Szilard, R. K., Sertié, A., Kanisek, M., Clapcote, S. J., ... McInnes, R. R. (2009). Neto1 Is a Novel CUB-Domain NMDA Receptor-Interacting Protein Required for Synaptic Plasticity and Learning. *PLOS Biology*, *7*(2), e1000041. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000041>
- Nie, E., Zhang, X., Xie, S., Shi, Q., Hu, J., Meng, Q., ... Yu, R. (2015). B-catenin is involved in Bex2 down-regulation induced glioma cell invasion/migration inhibition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *456*(1), 494–499. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.11.113>
- Nishioka, M., Bundo, M., Koike, S., Takizawa, R., Kakiuchi, C., Araki, T., ... Iwamoto, K. (2013). Comprehensive DNA methylation analysis of peripheral blood cells derived from patients with first-episode schizophrenia. *Journal of Human Genetics*, *58*(2), 91–97. <https://doi.org/10.1038/jhg.2012.140>
- Nojima, M., Iwasaki, M., Kasuga, Y., Yokoyama, S., Onuma, H., Nishimura, H., ... Tsugane, S. (2018). Correlation between global methylation level of peripheral blood leukocytes and serum C reactive protein level modified by MTHFR polymorphism: a cross-sectional study. *BMC Cancer*, *18*(1), 184. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4089-z>
- Ohgami, R. S., Campagna, D. R., McDonald, A., & Fleming, M. D. (2006). The Steap proteins are metalloreductases. *Blood*, *108*(4), 1388–1394. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-003681>
- Okada, Y., Yano, K., Jin, E., Funahashi, N., Kitayama, M., Doi, T., Spokes, K., Beeler, D.L., Shih, S.C., Okada, H., Danilov, T.A., Maynard, E., Minami, T., Oettgen, P., Aird, W.C. (2007). A three-kilobase fragment of the human Robo4 promoter directs cell type-specific expression in endothelium. *Circulation Research*, *100*(12):1712-22. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000269779.10644.dc>
- Overman, J. J., Clarkson, A. N., Wanner, I. B., Overman, W. T., Eckstein, I., Maguire, J. L., ... Carmichael, S. T. (2012). A role for ephrin-A5 in axonal sprouting, recovery, and activity-dependent plasticity after stroke. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(33), E2230–E2239. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204386109>
- Palma, P. F. R., Baggio, G. L., Spada, C., Silva, R. da, Ferreira, S. I. A. C. P., & Treitinger, A. (2008). Evaluation of annexin V and Calcein-AM as markers of mononuclear cell apoptosis during human immunodeficiency virus infection. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, *12*(2), 108–114. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702008000200003>
- Pan, Z., Zhu, L.-J., Li, Y.-Q., Hao, L.-Y., Yin, C., Yang, J.-X., ... Cao, J.-L. (2014). Epigenetic Modification of Spinal miR-219 Expression Regulates Chronic Inflammation Pain by Targeting CaMKII γ . *Journal of Neuroscience*, *34*(29), 9476–9483. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5346-13.2014>
- Peters, A., Schweiger, U., Pellerin, L., Hubold, C., Oltmanns, K. M., Conrad, M., ... Fehm, H. L. (2004). The selfish brain: competition for energy resources. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *28*(2), 143–180. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.03.002>
- Pihlstrøm, L., Berge, V., Rengmark, A., & Toft, M. (2015). Parkinson's disease correlates with promoter methylation in the α -synuclein gene. *Movement Disorders*, *30*(4), 577–580. <https://doi.org/10.1002/mds.26073>
- Portela, A., & Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nature Biotechnology*, *28*(10), 1057–1068. <https://doi.org/10.1038/nbt.1685>

- Prokopuk, L., Western, P. S., & Stringer, J. M. (2015). Transgenerational epigenetic inheritance: adaptation through the germline epigenome? *Epigenomics*, 7(5), 829–846. <https://doi.org/10.2217/epi.15.36>
- Rakyan, V. K., Chong, S., Champ, M. E., Cuthbert, P. C., Morgan, H. D., Luu, K. V. K., & Whitelaw, E. (2003). Transgenerational inheritance of epigenetic states at the murine AxinFu allele occurs after maternal and paternal transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(5), 2538–2543. <https://doi.org/10.1073/pnas.0436776100>
- Rashid, M., Wangler, N. J., Yang, L., Shah, K., Arumugam, T. V., Abbruscato, T. J., & Karamyan, V. T. (2014). Functional up-regulation of endopeptidase neurolysin during post-acute and early recovery phases of experimental stroke in mouse brain. *Journal of Neurochemistry*, 129(1), 179–189. <https://doi.org/10.1111/jnc.12513>
- Rasmussen, K. D., & Helin, K. (2016). Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. *Genes & Development*, 30(7), 733–750. <https://doi.org/10.1101/gad.276568.115>
- Ravi, R., Mookerjee, B., Bhujwalla, Z. M., Sutter, C. H., Artemov, D., Zeng, Q., ... Bedi, A. (2000). Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes & Development*, 14(1), 34–44.
- Reynolds, N., Salmon-Divon, M., Dvinge, H., Hynes-Allen, A., Balasooriya, G., Leaford, D., ... Hendrich, B. (2012). NuRD-mediated deacetylation of H3K27 facilitates recruitment of Polycomb Repressive Complex 2 to direct gene repression. *The EMBO Journal*, 31(3), 593–605. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.431>
- Rhee, J.-K., Kim, K., Chae, H., Evans, J., Yan, P., Zhang, B.-T., ... Kim, S. (2013). Integrated analysis of genome-wide DNA methylation and gene expression profiles in molecular subtypes of breast cancer. *Nucleic Acids Research*, 41(18), 8464–8474. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt643>
- Rizvi, F., Heimann, T., Herrnreiter, A., & O'Brien, W. J. (2011). Mitochondrial Dysfunction Links Ceramide Activated HRK Expression and Cell Death. *PLOS ONE*, 6(3), e18137. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018137>
- Rothhammer, V., & Quintana, F. J. (2015). Control of autoimmune CNS inflammation by astrocytes. *Seminars in immunopathology*, 37(6), 625–638. <https://doi.org/10.1007/s00281-015-0515-3>
- Ryou, M.-G., Liu, R., Ren, M., Sun, J., Mallet, R. T., & Yang, S.-H. (2012). Pyruvate Protects the Brain Against Ischemia–Reperfusion Injury by Activating the Erythropoietin Signaling Pathway. *Stroke*, 43(4), 1101–1107. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.620088>
- Safa, A. R. (2012). c-FLIP, A MASTER ANTI-APOPTOTIC REGULATOR. *Experimental oncology*, 34(3), 176–184.
- Sanderson, T. H., Reynolds, C. A., Kumar, R., Przyklenk, K., & Hüttemann, M. (2013). Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation. *Molecular Neurobiology*, 47(1), 9–23. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8344-z>
- Sasai, N., Nakao, M., & Defossez, P.-A. (2010). Sequence-specific recognition of methylated DNA by human zinc-finger proteins. *Nucleic Acids Research*, 38(15), 5015–5022. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq280>
- Scarpa Sigfrido, Fuso Andrea, D'Anselmi Fabrizio, & Cavallaro Rosaria A. (2003). Presenilin 1 gene silencing by S-adenosylmethionine: a treatment for Alzheimer disease? *FEBS Letters*, 541(1–3), 145–148. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00277-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00277-1)
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schmid, T., Zhou, J., Köhl, R., & Brüne, B. (2004). p300 relieves p53-evoked transcriptional repression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Biochemical Journal*, 380(Pt 1), 289–295. <https://doi.org/10.1042/BJ20031299>
- Schmitt, I., Kaut, O., Khazneh, H., deBoni, L., Ahmad, A., Berg, D., ... Wüllner, U. (2015). L-dopa increases α -synuclein DNA methylation in Parkinson's disease patients in vivo and in vitro. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 30(13), 1794–1801. <https://doi.org/10.1002/mds.26319>

- Shenker, N. S., Flower, K. J., Wilhelm-Benartzi, C. S., Dai, W., Bell, E., Gore, E., ... Flanagan, J. M. (2015). Transcriptional implications of intragenic DNA methylation in the oestrogen receptor alpha gene in breast cancer cells and tissues. *BMC Cancer*, *15*, 337. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1335-5>
- Shi, Y., Zhang, L., Pu, H., Mao, L., Hu, X., Jiang, X., ... Chen, J. (2016). Rapid endothelial cytoskeletal reorganization enables early blood–brain barrier disruption and long-term ischaemic reperfusion brain injury. *Nature Communications*, *7*, 10523. <https://doi.org/10.1038/ncomms10523>
- Shigetomi, E., Tong, X., Kwan, K. Y., Corey, D. P., & Khakh, B. S. (2012). TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nature Neuroscience*, *15*(1), 70–80. <https://doi.org/10.1038/nn.3000>
- Soriano-Tárraga, C., Mola-Caminal, M., Giralt-Steinhauer, E., Ois, A., Rodríguez-Campello, A., Cuadrado-Godia, E., ... Jiménez-Conde, J. (2017). Biological age is better than chronological as predictor of 3-month outcome in ischemic stroke. *Neurology*, *89*(8), 830–836. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004261>
- Stephens, D. C., & Poon, G. M. K. (2016). Differential sensitivity to methylated DNA by ETS-family transcription factors is intrinsically encoded in their DNA-binding domains. *Nucleic Acids Research*, *44*(18), 8671–8681. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw528>
- Suh, S. W., Gum, E. T., Hamby, A. M., Chan, P. H., & Swanson, R. A. (2007). Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase. *The Journal of Clinical Investigation*, *117*(4), 910–918. <https://doi.org/10.1172/JCI30077>
- Sun, Y., Jin, K., Xie, L., Childs, J., Mao, X. O., Logvinova, A., & Greenberg, D. A. (2003). VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *The Journal of Clinical Investigation*, *111*(12), 1843–1851. <https://doi.org/10.1172/JCI117977>
- Syc-Mazurek, S. B., Fernandes, K. A., Wilson, M. P., Shrager, P., & Libby, R. T. (2017). Together JUN and DDIT3 (CHOP) control retinal ganglion cell death after axonal injury. *Molecular Neurodegeneration*, *12*, 71. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0214-8>
- Takai, D., & Jones, P. A. (2002). Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(6), 3740–3745. <https://doi.org/10.1073/pnas.052410099>
- Teo, J. D., Morris, M. J., & Jones, N. M. (2015). Hypoxic postconditioning reduces microglial activation, astrocyte and caspase activity, and inflammatory markers after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *Pediatric Research*, *77*(6), 757–764. <https://doi.org/10.1038/pr.2015.47>
- Thienpont, B., Steinbacher, J., Zhao, H., D'Anna, F., Kuchnio, A., Ploumaki, A., ... Lambrechts, D. (2016). Tumour hypoxia causes DNA hypermethylation by reducing TET activity. *Nature*, *537*(7618), 63. <https://doi.org/10.1038/nature19081>
- Tian, T., Yang, K.-Q., Cui, J.-G., Zhou, L.-L., & Zhou, X.-L. (2017). Folic Acid Supplementation for Stroke Prevention in Patients With Cardiovascular Disease. *The American Journal of the Medical Sciences*, *354*(4), 379–387. <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2017.05.020>
- Tretyakova, N. Y., Burney, S., Pamir, B., Wishnok, J. S., Dedon, P. C., Wogan, G. N., & Tannenbaum, S. R. (2000). Peroxynitrite-induced DNA damage in the supF gene: correlation with the mutational spectrum. *Mutation Research*, *447*(2), 287–303.
- Urrutia, P., Aguirre, P., Esparza, A., Tapia, V., Mena, N. P., Arredondo, M., ... Núñez, M. T. (2013). Inflammation alters the expression of DMT1, FPN1 and hepcidin, and it causes iron accumulation in central nervous system cells. *Journal of Neurochemistry*, *126*(4), 541–549. <https://doi.org/10.1111/jnc.12244>
- van Os, J., Kenis, G., & Rutten, B. P. F. (2010). The environment and schizophrenia. *Nature*, *468*(7321), 203–212. <https://doi.org/10.1038/nature09563>
- Véga, C., R. Sachleben, L., Gozal, D., & Gozal, E. (2006). Differential metabolic adaptation to acute and long-term hypoxia in rat primary cortical astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, *97*(3), 872–883. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03790.x>

- Venkatachalam, K., Prabhu, S. D., Reddy, V. S., Boylston, W. H., Valente, A. J., & Chandrasekar, B. (2009). Neutralization of Interleukin-18 Ameliorates Ischemia/Reperfusion-induced Myocardial Injury. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(12), 7853–7865. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808824200>
- Vickers, K. C., Landstreet, S. R., Levin, M. G., Shoucri, B. M., Toth, C. L., Taylor, R. C., ... Remaley, A. T. (2014). MicroRNA-223 coordinates cholesterol homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(40), 14518–14523. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215767111>
- Wang, L., Wang, F., Guan, J., Le, J., Wu, L., Zou, J., ... Zhang, T. (2010). Relation between hypomethylation of long interspersed nucleotide elements and risk of neural tube defects. *American Journal of Clinical Nutrition*, *91*(5), 1359–1367. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.28858>
- Wang, L., Zhang, J., Duan, J., Gao, X., Zhu, W., Lu, X., ... Liu, J. (2014). Programming and Inheritance of Parental DNA Methylomes in Mammals. *Cell*, *157*(4), 979–991. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.017>
- Wang, P., Cao, X., Nagel, D. J., & Yin, G. (2007). Activation of ASK1 during reperfusion of ischemic spinal cord. *Neuroscience Letters*, *415*(3), 248–252. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.01.050>
- Wang, S., & Kelly, S. (2013). Global cerebral ischemia induces increased expression of multiple retrotransposons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *434*(3), 572–576. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.03.116>
- Wang, S.-C., Oelze, B., & Schumacher, A. (2008). Age-Specific Epigenetic Drift in Late-Onset Alzheimer's Disease. *P2014LOS ONE*, *3*(7), e2698. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002698>
- Wang, X., Mao, W., Fang, C., Tian, S., Zhu, X., Yang, L., ... Li, H. (2017). Dusp14 protects against hepatic ischaemia–reperfusion injury via Tak1 suppression. *Journal of Hepatology*. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.08.032>
- Wang, X., Wang, Y., Zhang, J., Kim, H. P., Ryter, S. W., & Choi, A. M. K. (2005). FLIP Protects against Hypoxia/Reoxygenation-Induced Endothelial Cell Apoptosis by Inhibiting Bax Activation. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(11), 4742–4751. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.11.4742-4751.2005>
- Weilinger, N. L., Maslieieva, V., Bialecki, J., Sridharan, S. S., Tang, P. L., & Thompson, R. J. (2013). Ionotropic receptors and ion channels in ischemic neuronal death and dysfunction. *Acta Pharmacologica Sinica*, *34*(1), 39–48. <https://doi.org/10.1038/aps.2012.95>
- Wenger, R. H., Kvietikova, I., Rolfs, A., Camenisch, G., & Gassmann, M. (1998). Oxygen-regulated erythropoietin gene expression is dependent on a CpG methylation-free hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding site. *European Journal of Biochemistry*, *253*(3), 771–777.
- Wockner, L. F., Noble, E. P., Lawford, B. R., Young, R. M., Morris, C. P., Whitehall, V. L. J., & Voisey, J. (2014). Genome-wide DNA methylation analysis of human brain tissue from schizophrenia patients. *Translational Psychiatry*, *4*(1), e339. <https://doi.org/10.1038/tp.2013.111>
- Wolf, S. F., Jolly, D. J., Lunnen, K. D., Friedmann, T., & Migeon, B. R. (1984). Methylation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase locus on the human X chromosome: implications for X-chromosome inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(9), 2806–2810.
- Wolffe, A. P., & Matzke, M. A. (1999). Epigenetics: Regulation Through Repression. *Science*, *286*(5439), 481–486. <https://doi.org/10.1126/science.286.5439.481>
- Wu, C., Ding, X., Li, H., Zhu, C., & Xiong, C. (2013). Genome-wide promoter methylation profile of human testis and epididymis: identified from cell-free seminal DNA. *BMC Genomics*, *14*, 288. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-288>
- Wu, L.-J., Wu, G., Akhavan Sharif, M. R., Baker, A., Jia, Y., Fahey, F. H., ... Clapham, D. E. (2012). The voltage-gated proton channel Hv1 enhances brain damage from ischemic stroke. *Nature Neuroscience*, *15*(4), 565–573. <https://doi.org/10.1038/nn.3059>

- Wu, X., Sun, J., Zhang, X., Li, X., Liu, Z., Yang, Q., & Li, L. (2014). Epigenetic Signature of Chronic Cerebral Hypoperfusion and Beneficial Effects of S-adenosylmethionine in Rats. *Molecular Neurobiology*, 50(3), 839–851. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8698-5>
- Xi, Z., Zinman, L., Moreno, D., Schymick, J., Liang, Y., Sato, C., ... Rogaeva, E. (2013). Hypermethylation of the CpG Island Near the G4C2 Repeat in ALS with a C9orf72 Expansion. *The American Journal of Human Genetics*, 92(6), 981–989. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.04.017>
- Xin, Y.-J., Yuan, B., Yu, B., Wang, Y.-Q., Wu, J.-J., Zhou, W.-H., & Qiu, Z. (2015). Tet1-mediated DNA demethylation regulates neuronal cell death induced by oxidative stress. *Scientific Reports*, 5, 7645. <https://doi.org/10.1038/srep07645>
- Xu, S., Niu, P., Chen, K., Xia, Y., Yu, Q., Liu, N., ... Guo, C. (2017). The liver protection of propylene glycol alginate sodium sulfate preconditioning against ischemia reperfusion injury: focusing MAPK pathway activity. *Scientific Reports*, 7(1), 15175. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15521-3>
- Yang, Q., Wu, X., Sun, J., Cui, J., & Li, L. (2016). Epigenetic Features Induced by Ischemia-Hypoxia in Cultured Rat Astrocytes. *Molecular Neurobiology*, 53(1), 436–445. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9027-8>
- Yang, S., Wang, Y., Mei, K., Zhang, S., Sun, X., Ren, F., ... Chang, Z. (2015). Tumor Necrosis Factor Receptor 2 (TNFR2)-Interleukin-17 Receptor D (IL-17RD) Heteromerization Reveals a Novel Mechanism for NF- κ B Activation. *Journal of Biological Chemistry*, 290(2), 861–871. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.586560>
- Yao, I., Iida, J., Nishimura, W., & Hata, Y. (2002). Synaptic and nuclear localization of brain-enriched guanylate kinase-associated protein. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(13), 5354–5364. <https://doi.org/20026505>
- Yao, W., Ji, F., Chen, Z., Zhang, N., Ren, S.-Q., Zhang, X.-Y., ... Lu, W. (2012). Glycine Exerts Dual Roles in Ischemic Injury Through Distinct Mechanisms. *Stroke*, 43(8), 2212–2220. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.645994>
- Yin, H., & Blanchard, K. L. (2000). DNA methylation represses the expression of the human erythropoietin gene by two different mechanisms. *Blood*, 95(1), 111–119.
- Yoon, J., Feng, X., Kim, Y.-S., Shin, D.-M., Hatzl, K., Wang, H., & Morse, H. C. (2014). Interferon Regulatory Factor 8 (IRF8) Interacts with the B Cell Lymphoma 6 (BCL6) Corepressor BCOR. *Journal of Biological Chemistry*, 289(49), 34250–34257. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.571182>
- Yu, J., Zhang, H., Gu, J., Lin, S., Li, J., Lu, W., ... Zhu, J. (2004). Methylation profiles of thirty four promoter-CpG islands and concordant methylation behaviours of sixteen genes that may contribute to carcinogenesis of astrocytoma. *BMC Cancer*, 4, 65. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-4-65>
- Yue, Z., Dong, H., Wang, Y., Liu, Y., Song, C., Yang, W., ... Chang, F. (2015). Propofol prevents neuronal mtDNA deletion and cerebral damage due to ischemia/reperfusion injury in rats. *Brain Research*, 1594(Supplement C), 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.016>
- Zhang, R., Huang, Q., Zou, L., Cao, X., Huang, H., & Chu, X. (2014). Beneficial effects of deferoxamine against astrocyte death induced by modified oxygen glucose deprivation. *Brain Research*, 1583, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.08.016>
- Zhang, Y., Ng, H. H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bird, A., & Reinberg, D. (1999). Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes & Development*, 13(15), 1924–1935.
- Zhang, Y., Sloan, S. A., Clarke, L. E., Caneda, C., Plaza, C. A., Blumenthal, P. D., ... Barres, B. A. (2016). Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse. *Neuron*, 89(1), 37–53. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.013>
- Zhang, Ying, Feng, X.-H., & Derynck, R. (1998). Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF- β -induced transcription. *Nature*, 394(6696), 909–913. <https://doi.org/10.1038/29814>

- Zhou, J., & Chng, W.-J. (2013). Roles of thioredoxin binding protein (TXNIP) in oxidative stress, apoptosis and cancer. *Mitochondrion*, 13(3), 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2012.06.004>
- Zhou, X., Hao, Q., Liao, P., Luo, S., Zhang, M., Hu, G., ... Lu, H. (2016). Nerve growth factor receptor negates the tumor suppressor p53 as a feedback regulator. *ELife*, 5, e15099. <https://doi.org/10.7554/eLife.15099>
- Zhou, X., Meng, Q., Xu, X., Zhi, T., Shi, Q., Wang, Y., & Yu, R. (2012). Bex2 regulates cell proliferation and apoptosis in malignant glioma cells via the c-Jun NH2-terminal kinase pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 427(3), 574–580. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.09.100>
- Zhu, W., Luo, X., Adnan, A., Yu, P., Zhang, S., Huo, Z., ... Pang, H. (2018). Association analysis of NUCKS1 and INPP5K polymorphism with Parkinson's disease. *Genes & Genetic Systems*. <https://doi.org/10.1266/ggs.17-00038>
- Ziu, M., Fletcher, L., Rana, S., Jimenez, D. F., & Digicaylioglu, M. (2011). Temporal Differences in MicroRNA Expression Patterns in Astrocytes and Neurons after Ischemic Injury. *PLOS ONE*, 6(2), e14724. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014724>
- Zonta, M., Angulo, M. C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K.-A., Pozzan, T., & Carmignoto, G. (2003). Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nature Neuroscience*, 6(1), 43–50. <https://doi.org/10.1038/nn980>