

APOPTOSIS DE CÉLULAS NERVIOSAS COMO MARCADOR DE HIPOXIA QUÍMICA

M.C. García-Barceló^{a*}, Z. Batista-Castro^a, Y. Pérez-Betancourt^b, I. Manjarrés-Raza^b, N. Aveiga-Flores^a

^a Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Técnica de Ambato, Tungurahua, Ecuador.

^b Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Ambato, Tungurahua, Ecuador.

*Autor de correspondencia: Dra. María de la Caridad García Barceló, Tlf: + 59 3 33730268 ext. 5219. Fax: + 59 3 2521134 ext.103. E-mail: mdlc.garcia@uta.edu.ec

Recibido: Noviembre 2017. Aprobado: Julio 2018.

Publicado: Diciembre 2018.

RESUMEN

El infarto cerebral constituye actualmente un problema serio de salud pública a nivel mundial. Numerosas evidencias científicas indican que el estrés oxidativo y la apoptosis son dos fenómenos estrechamente implicados en la fisiopatología del infarto cerebral isquémico, por lo que los modelos de hipoxia son utilizados de forma rutinaria para el estudio de esta enfermedad. Se conoce que el ictus cerebral puede ser inducido experimentalmente en roedores por oclusión de la arteria cerebral media, sin embargo, la inducción de hipoxia química sigue siendo un método ampliamente utilizado, siendo el cloruro de cobalto (CoCl_2) el compuesto químico más empleado. Con el objetivo de evaluar la apoptosis de células nerviosas como marcador de hipoxia inducida por CoCl_2 , se utilizó una línea de células gliales B92 las que fueron incubadas con CoCl_2 a 500 μM por 24 horas y posteriormente se realizaron ensayos de inmunocitoquímica y Western blot. Los resultados mostraron que el tratamiento químico induce una disminución del número total de células por campo y cambios morfológicos. Las imágenes obtenidas a través del microscopio de fluorescencia revelaron un incremento en la expresión de NFkB y la técnica de Western blot demostró un aumento de la expresión de Bax, una reconocida señal proapoptótica. Concluimos que la exposición de células gliales B92 a CoCl_2 promueve una marcada señal de neuroinflamación que desencadena la activación de mecanismos moleculares que inducen la apoptosis de las células nerviosas, por lo que podría ser utilizado como marcador en modelos celulares de hipoxia química en estudios de infarto cerebral.

Palabras claves: apoptosis, hipoxia, cobalto, células B92.

APOPTOSIS OF NERVOUS CELLS AS A MARKER OF CHEMICAL HYPOXIA

ABSTRACT

Cerebral stroke is currently a serious public health problem worldwide. Numerous scientific evidence indicate that oxidative stress and apoptosis are two phenomena closely involved in the pathophysiology of ischemic cerebral stroke so that hypoxia models are routinely used for the study of this disease. It is known that cerebral stroke can be induced experimentally in rodents by occlusion of the middle cerebral artery, however, the induction of chemical hypoxia is still a widespread use, with cobalt chloride (CoCl_2) being the most used chemical compound. In order to evaluate the apoptosis of nerve cells as a marker of hypoxia induced by CoCl_2 , we used a B92 glial cell line incubated with CoCl_2 at 500 μM for 24 hours and subsequently performed immunocytochemistry and Western blot assays. The results indicate that the chemical treatment induces a decrease in the total number of cells per field and morphological changes. The images through the fluorescence microscope revealed an increase in the expression of NFkB and the Western Blot technique showed an increase in the expression of Bax, a recognized and proapoptotic signal. We conclude that the exposure of glial cells B92 to CoCl_2 , promotes a marked signal of neuroinflammation that triggers the activation of molecular mechanisms that induce the apoptosis of nerve cells, reason why it could be used as a marker in cellular models of chemical hypoxia in studies of cerebral stroke.

Keywords: apoptosis, hypoxia, cobalt, B92 cells.

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud estima que cada año más de 15 millones de personas sufren de enfermedad cerebrovascular, de las cuales, alrededor de 5

millones mueren y el resto sufren secuelas irreversibles [1], al punto de ser considerada la primera causa de invalidez permanente en la población adulta y una de las

principales causas de déficit neurológico en el anciano [2], por lo que esta patología se ha convertido en un serio problema de salud pública a nivel mundial y en algunos países como Ecuador, representa la tercera causa de muerte [3].

El ictus o enfermedad cerebrovascular consiste en un déficit neurológico debido a trastornos isquémicos o hemorrágicos de la circulación cerebral, siendo el ictus isquémico su forma predominante [1]. Un cúmulo de evidencias indica que el estrés oxidativo y la apoptosis son fenómenos estrechamente asociados a la fisiopatología del infarto cerebral isquémico [4, 5].

Para estudiar los eventos moleculares que se desencadenan tras una enfermedad cerebrovascular y poder establecer nuevas estrategias terapéuticas se utilizan diferentes modelos experimentales. Hasta el momento, se han descrito diferentes métodos físicos para inducir hipoxia en modelos de animales, siendo la oclusión transitoria o permanente de la arteria cerebral media un método ampliamente utilizado [6, 7]. Sin embargo, para reducir, reemplazar y refinar los ensayos que utilizan animales de experimentación [8], una alternativa es inducir hipoxia química en cultivos primarios o estables de células nerviosas, siendo el cloruro de cobalto (CoCl_2) el compuesto más empleado [9-11].

Evidencias experimentales han demostrado que el CoCl_2 activa mecanismos celulares que conllevan a la muerte celular [12, 13] por la activación de las vías extrínsecas e intrínsecas de la apoptosis [14], el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la expresión de caspasas apoptóticas [12] y por cambios en la transcripción de genes que codifican diversas proteínas importantes para la adaptación celular al estado hipóxico [13]. Por ello, la activación de las vías de neuroinflamación, estrés oxidativo y apoptosis pueden

ser considerados marcadores celulares de la inducción de hipoxia química por CoCl_2 .

Aunque algunos mecanismos de daño celular provocados por el cobalto han sido identificados [12, 14], los resultados no son concluyentes y varían entre los diversos estudios, y estas diferencias podrían deberse al uso de diferentes líneas celulares y concentraciones de CoCl_2 [15, 16]. Hasta la fecha, no se ha descrito el uso de las células B92 como modelo de hipoxia química. En el presente trabajo nos propusimos elucidar el uso de esta línea de células estables como modelo celular para estudios de enfermedad cerebrovascular. Para ello, evaluamos la citotoxicidad del CoCl_2 en estas células y determinamos algunos marcadores moleculares de hipoxia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

Las células gliales B92 fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ estreptomycin y 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS) a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% de CO_2 y 95% aire. Todos los reactivos utilizados para los cultivos y subcultivos de las células B92 fueron adquiridos de Thermo Fisher Scientific (USA).

Ensayo de MTT

Las células fueron sembradas en placas de cultivo celular de 96 pocillos a una concentración de 5×10^4 células/pocillo y cultivadas por 24 horas antes del tratamiento con diferentes concentraciones de CoCl_2 (Sigma-Aldrich, USA) en el rango de 10 nM hasta 1 M. Para determinar la viabilidad celular se utilizó el ensayo MTT (Invitrogen, USA) de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial y se determinó la absorbancia a 570 nm utilizando un lector de microplacas VictorX3 Multilabel Microplate Reader (PerkinElmer, USA). Los

resultados se muestran con porcentaje de viabilidad celular respecto al control (células sin tratamiento).

Inmunocitoquímica

Los ensayos de inmunocitoquímica se realizaron como se ha descrito anteriormente [17]. Básicamente, las células cultivadas sobre cubreobjetos en placas de 6 pocillos fueron tratadas o no con 500 μM de CoCl_2 por 24 horas. Posteriormente las células fueron lavadas con tampón fosfato 1X, fijadas con paraformaldehído al 3,7% a temperatura ambiente por 15 minutos, tratadas con glicina 10 mM a temperatura ambiente por 30 minutos, permeabilizadas con Triton X-100 al 0,1% a temperatura ambiente por 30 minutos, bloqueadas con albúmina de suero bovino a temperatura ambiente por 1 hora en agitación e incubadas a 4°C y en agitación toda la noche con un anticuerpo primario anti-NF- κB producido en ratón (sc-8008, Santa Cruz Biotecnología, USA, dilución 1:250). Después de extensos lavados las células fueron incubadas con un anticuerpo secundario conjugado Alexa Fluor®594 (Invitrogen, USA, dilución 1:1000). Posteriormente, las muestras fueron secadas, montadas con medio de montaje con DAPI (Thermo Fisher Scientific, USA) y observadas al microscopio de fluorescencia (Leica DMi8, Leica Microsystems, Alemania).

Electroforesis de proteínas SDS-PAGE y Western blot

Para determinar la señal apoptótica a través de electroforesis de proteínas y Western blot se procedió como se ha descrito anteriormente [18-21]. Específicamente, las células cultivadas en frascos de 75 cm^2 fueron tratadas o no con 500 μM de CoCl_2 por 24 horas. Al cabo de este tiempo, las células fueron lavadas con tampón fosfato 1X, colectadas y sonicadas. Las fracciones de proteínas citoplasmáticas fueron colectadas por centrifugación a 4°C y se determinó las concentraciones de proteínas totales mediante un ensayo de Bradford (Sigma-Aldrich, USA), utilizando una curva

estandarizada de albúmina de suero bovino. 20 μg de proteínas totales fueron separadas por electroforesis de proteínas SDS-PAGE al 12% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Millipore, USA) utilizando un semi-dry (Bio-Rad, USA). Las membranas fueron incubadas a 4°C y en agitación toda la noche con un anticuerpo primario anti-Bax producido en conejo (sc-493, Santa Cruz Biotechnology, USA, dilución 1:250). Después de extensos lavados las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario conjugado Alexa Fluor®488 (Invitrogen, USA, dilución 1:1000) y luego de varios lavados fueron reveladas utilizando un fotodocumentador ChemiDoc™ (Bio-Rad, USA). La tubulina se usó como un control de carga interno para normalizar las cantidades de proteínas totales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad celular indican que la concentración de CoCl_2 que provocó el 50% de muerte de las células B92 fue de $\text{Log IC}_{50} = -3.07 \pm 0.04$ ($845 \pm 43 \mu\text{M}$) (Figura 1). En la literatura se describe el uso de diferentes concentraciones de CoCl_2 tales como 25-300 μM en células de glioma U87-MG humano [16], 600-900 μM en células de túbulo renales [22], 200 μM en células PC2 y células madres embrionarias de ratón y concentración más alta de 150 mM en células HeLa-Fucci [23, 15], lo que sugiere que la concentración de CoCl_2 a utilizar depende de la línea celular. Dado que nuestros resultados están en el rango de lo encontrado por otros autores en células neuronales/gliales [13, 24], establecimos una concentración de CoCl_2 de partida de 800 μM para inducir hipoxia en las células B92, sin embargo, para evitar que el compuesto químico provocara una disminución considerable del número total de células que afectara la señal de los marcadores a determinar, decidimos definir una concentración mínima (500 μM) que al inducir muerte celular garantizara la presencia de señal de neuroinflamación y de apoptosis.

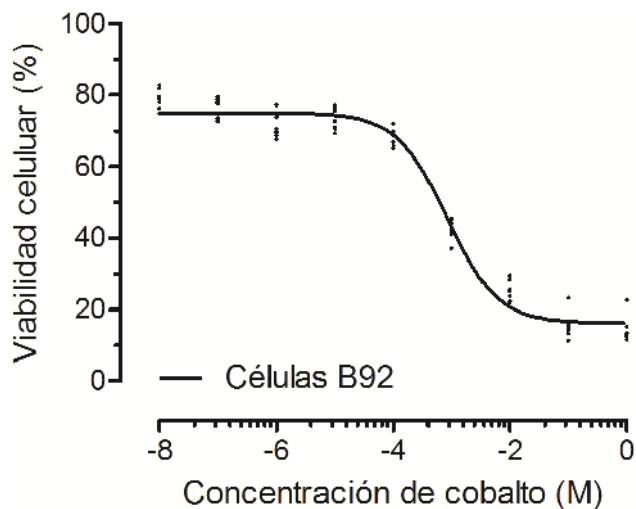


Fig. 1. Curva dosis-respuesta de células B92 tratadas con CoCl_2 .

Los resultados de viabilidad celular se confirmaron a través de microscopía de luz transmitida (Figura 2), donde se observó que las células en el cultivo sin tratamiento mantienen su morfología, con núcleos y membranas definidas. Sin embargo, el tratamiento con $800 \mu\text{M}$ de CoCl_2 por 24 horas provoca una considerable disminución del número total de células por campo e induce cambios morfológicos tales como pérdida de las prolongaciones, alteraciones nucleares y disminución del volumen celular (Figura 2). Para garantizar que esta disminución/cambio no destruya por completo la señal a determinar, en los experimentos posteriores se redujo la concentración a $500 \mu\text{M}$ y se tuvo en cuenta el número total de células, garantizando que en las muestras con tratamiento el total de células en el experimento fuese como mínimo el 50% respecto al control (células sin tratamiento).

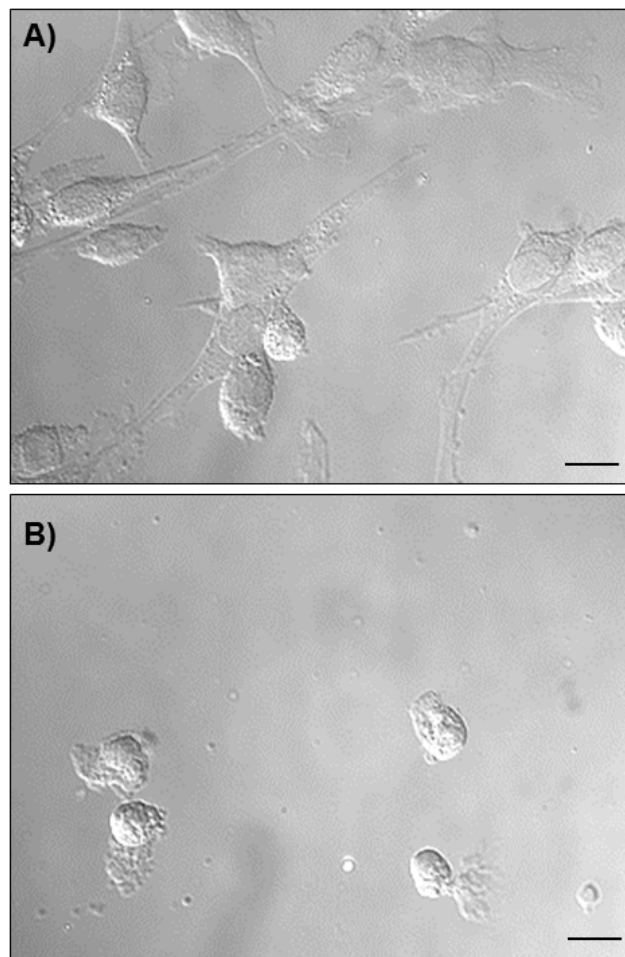


Fig. 2. Imágenes de microscopía de luz transmitida de células B92 cultivadas por 24 horas antes del tratamiento según lo descrito en materiales y métodos. A) Células no tratadas. B) Células tratadas con $800 \mu\text{M}$ de CoCl_2 por 24 horas. Las imágenes fueron obtenidas a través de un objetivo 63X y son representativas de tres experimentos realizados de forma independiente. La escala representa $10 \mu\text{m}$.

Un estudio previo demuestra que las células U87-MG de glioma maligno humano al ser tratadas con CoCl_2 incrementan la autofagia celular lo que causa una disminución del número total de células [16] y exponen que estos cambios son dependientes de la concentración de CoCl_2 utilizada. También, otros estudios donde utilizan células HeLa-Fucci han informado que la viabilidad celular está relacionada con modificaciones en la dinámica del ciclo celular [15]. Por otra parte, además de los cambios morfológicos inducidos por el tratamiento con CoCl_2 , en células PC12 se observó fragmentación del ADN [12] y en hepatocitos de ratones el compuesto

provocó procesos degenerativos, alteración en el metabolismo de los ácidos grasos y núcleos picnóticos [25]. De la misma forma, se ha señalado la disminución de la viabilidad de las células Möller (una neuroglia presente en la retina) y la muerte celular a través de la vía apoptótica intrínseca [26].

Se conoce que al mismo tiempo que se produce la cascada isquémica caracterizada por una depleción energética y generación de moléculas que causan excitotoxicidad y estrés oxidativo en el tejido isquémico [27], también se activa la cascada neuroinflamatoria que involucra una respuesta inflamatoria local que puede aumentar el daño cerebral isquémico [28]. Por ello, incluimos la determinación de un marcador de neuroinflamación.

El factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) está implicado en la respuesta celular frente a diferentes estímulos dañinos que comprometen la viabilidad de las células [29]. De hecho, la producción de NF- κ B también se ha reportado en estudios de isquemia/reperfusión cerebral y en modelos de excitotoxicidad neuronal *in vitro* e *in vivo* [30], lo que indica que NF- κ B juega un papel importante en los procesos de hipoxia [29, 31].

Los ensayos de microscopía de fluorescencia revelaron que el tratamiento de células B92 con 500 μ M de CoCl₂ durante 24 horas incrementa de manera considerable la expresión de NF- κ B en comparación con el control, todo ello sin comprometer significativamente la viabilidad celular (Figura 3).

Aunque se ha señalado que la apoptosis que ocurre en la zona de penumbra isquémica puede tener un papel de neuroprotección fisiológica [32], ha quedado bien establecido que en esta área ocurre muerte neuronal y que es el resultado de procesos apoptóticos. También, dado al

incremento de neuroinflamación obtenido, decidimos evaluar la señalización apoptótica.

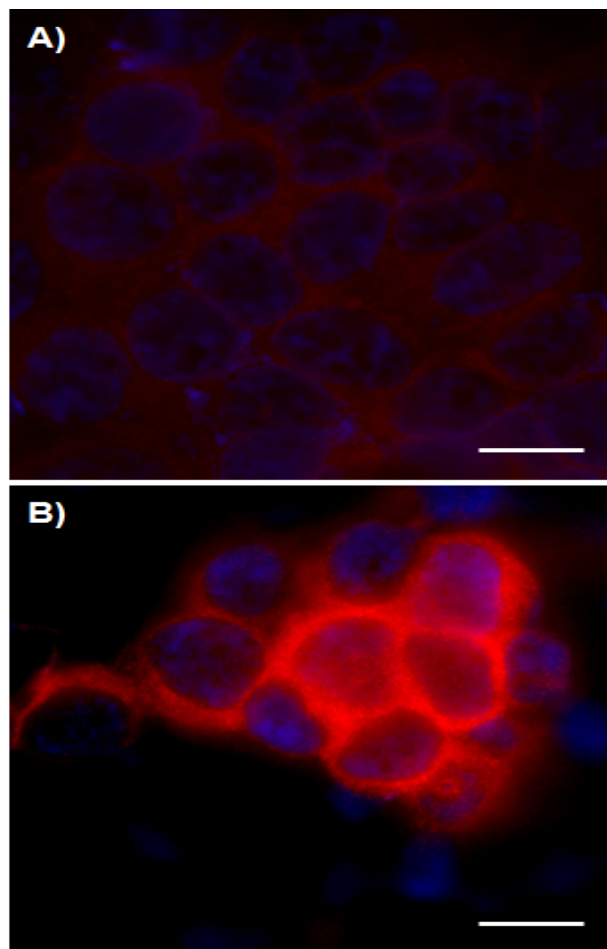


Fig. 3. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células gliales B92 tratadas con 500 μ M de CoCl₂ durante 24h. A) Control. B). Células tratadas, donde la señal en rojo indica los niveles de expresión de NF- κ B y los núcleos se muestran en azul. Las imágenes fueron obtenidas a través de un objetivo 63X y son representativas de tres experimentos realizados de forma independiente. La escala representa 10 μ m.

Los miembros de la familia de Bcl-2 son importantes reguladores antiapoptóticos o proapoptóticos y son ampliamente utilizados como marcadores de apoptosis [33]. En nuestras condiciones experimentales encontramos que el tratamiento de las células con 500 μ M de CoCl₂ durante 24 horas incrementa la expresión de Bax respecto al control (Figura 4).

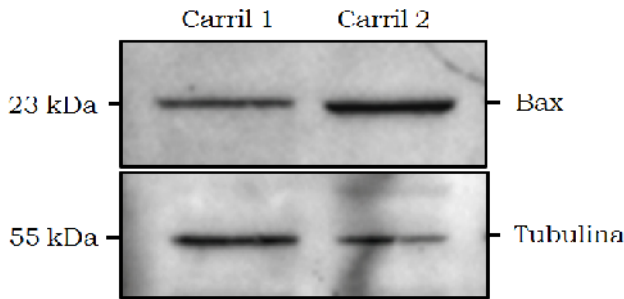


Fig.4. Imagen de SDS-PAGE. Carril 1: Control. Carril 2: Células tratadas. Como control de carga se utilizó la expresión de tubulina. La imagen es representativa de tres experimentos realizados de forma independiente.

Hasta la fecha, no existen estudios que demuestren el aumento de la expresión de Bax e inducción de apoptosis de células gliales B92 por CoCl_2 . Sin embargo, en otras líneas celulares como las PC12 [12, 14], rMC-1 y HK-2 [22] tratadas con el mismo compuesto se ha confirmado la inducción de apoptosis por la disminución de la expresión de proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL y el aumento de la expresión de proteínas proapoptóticas como Bax. Otros marcadores de apoptosis utilizados en estudios que involucran el CoCl_2 incluyen los niveles de caspasa-3 [14, 16, 24], así como la producción de ROS que actúa sobre las mitocondrias e induce la liberación de citocromo c provocando la activación de la caspasa-9 y la apoptosis [14].

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demuestran que la exposición de células nerviosas gliales B92 a CoCl_2 , promueve cambios morfológicos y disminución del número de células, así como el desarrollo de una marcada señal de neuroinflamación (NFkB) que desencadena la activación de mecanismos moleculares (Bax) que inducen la apoptosis de las células nerviosas, por lo que podrían ser utilizados como marcador en modelos celulares de hipoxia química en estudios de enfermedad cerebrovascular.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte de las actividades realizadas por el Dr. Wilber Romero-Fernández dentro del Programa "Becas Prometeo" de la Secretaria de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación del Gobierno de Ecuador a quien los autores agradecen su colaboración y revisión crítica. El presente estudio ha sido financiado por la Universidad Técnica de Ambato (Resoluciones 0932-CU-P-2016 y 0906-CU-P-2016).

REFERENCIAS

- [1] Fernández J.C. (2014) "Enfermedad cerebrovascular: incidencia y tratamiento actual" *Rev CENIC Cienc Biol.* 45(3):152-177.
- [2] Ruiz J.L., Cantú C., Chiquete E., P Gustavo., Arauz A., Villaseñor T.J., Parada J.D., Pérez H.R., Barinagarrementeria F., Ramos A. (2017) "Enfermedad vascular cerebral isquémica aguda en mayores de 75 años en la primera década del siglo XXI en México" *Rev Mex Neuroci.* 18(2):42-53.
- [3] Moreno D., Santamaría D., Ludeña C., Barco A., Vásquez D., Santibáñez R. (2016) "Enfermedad Cerebrovascular en el Ecuador: Análisis de los Últimos 25 Años de Mortalidad, Realidad Actual y Recomendaciones" *Rev. Ecuat. Neurol.* 25(1-3):17-20.
- [4] Tian J., Guo S., Chen H., Peng J.J., Jia1 M.M., Li1 N.S., Zhang X.J., Yang J., Luo X.J., Peng J. (2017) "Combination of Emricasan with Ponatinib Synergistically Reduces Ischemia/Reperfusion Injury in Rat Brain Through Simultaneous Prevention of Apoptosis and Necroptosis" *Transl Stroke Res.*
- [5] Qing L., Stephen M., Black L.Q., Black S.M. (2016) "Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury: Apoptotic and Non-Apoptotic Cell Death" *J. Neurol. Neuromed.* 1(4):5-10.
- [6] Sun H., Juul H.M., Jensen F.E. (2016) "Models of hypoxia and ischemia-induced seizures". *J Neurosci Methods.* 260:252-60.

- [7] SH F., Zhang H.F., Yang Z.B., Li T.B., Liu B., Lou Z. (2014) "Alda-1 reduces cerebral ischemia/reperfusion injury in rat through clearance of reactive aldehydes" *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 387(1):87-94.
- [8] Romero-Fernandez W., Batista-Castro Z., De Lucca M., Ruano A., Garcia-Barcelo M., Rivera-Cervantes M., Garcia-Rodriguez J., Sanchez-Mateos S. (2016) "The 1, 2, 3 of laboratory animal experimentation" *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 33(2):288-99.
- [9] Wang P., Ling L., Zhang Z., Kan Q., Gao F., Chen S. (2016) "Time-dependent activity of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 and homeostasis of intracellular pH in astrocytes exposed to CoCl₂ treatment". *Molecular Medicine Reports.* 13(5):4443-4450.
- [10] Li G., Zhao Y., Li Y., Lu J. (2015) "Up-Regulation of Neuronal Nitric Oxide Synthase Expression by Cobalt Chloride Through a HIF-1α Mechanism in Neuroblastoma Cells" *Neuromol Med.* 17(4):443-53.
- [11] Niwa M., Aoki H., Hirata A., Tomita H., Green P.G., Hara A. (2016) "Review Retinal Cell Degeneration in Animal Models" *Int J Mol Sci.* 17(1):1-16.
- [12] Zou W., Yan M., Xu W., Huo H., Sun L., Zheng Z., Liu X. (2001) "Cobalt Chloride Induces PC12 Cells Apoptosis Through Reactive Oxygen Species and Accompanied by AP-1 Activation" *J Neurosci Res.* 64(6):646-53.
- [13] Karovic O., Tonazzini I., Rebola N., Edström E., Lövdahl C., Fredholm B.B., Daré E. (2007) "Toxic effects of cobalt in primary cultures of mouse Astrocytes. Similarities with hypoxia and role of HIF-1α" *Biochem Pharmacol.* 73(5):694-708.
- [14] Pulido M.D., Parrish A.R., (2003) "Metal-induced apoptosis: mechanisms" *Mutat Res.* 533:227-241.
- [15] Bedessem B., Marie-Paule M., Hamel M., Giroud F., Stéphanou A. (2015) "Effects of the Hypoxia-Mimetic Agents DFO and CoCl₂ on HeLa-Fucci Cells" *J Cell Biol Cell Metab.* 2:4-12.
- [16] Cheng B.C., Chen J.T., Yang S.T., Chio C.C., Liu S.H., Chen R.M. (2017) "Cobalt chloride treatment induces autophagic apoptosis in human glioma cells via a p53-dependent pathway" *Int. J. Oncol.* 50(3):964-974.
- [17] Romero-Fernandez W., Borroto-Escuela D.O., Vargas-Barroso V., Narvaez M., Di Palma M., Agnati L.F., Larriva Sahd J., Fuxe K. (2014) "Dopamine D1 and D2 receptor immunoreactivities in the arcuate-median eminence complex and their link to the tubero-infundibular dopamine neurons". *Eur J Histochem.* 58(3):185-199.
- [18] Romero-Fernandez W., Garriga P., Borroto-Escuela D.O. (2011) "Overproduction of human M(3) muscarinic acetylcholine receptor: an approach toward structural studies" *Biotechnology progress.* 27(3):838-45.
- [19] Fuxe K., Tarakanov A., Romero Fernandez W., Ferraro L., Tanganelli S., Filip M., Agnati L.F., Garriga P., Diaz-Cabiale Z., Borroto-Escuela D.O. (2014) "Diversity and Bias through Receptor-Receptor Interactions in GPCR Heteroreceptor Complexes. Focus on Examples from Dopamine D2 Receptor Heteromerization" *Front Endocrinol.* 5:1-11.
- [20] Alea M.P., Borroto-Escuela D.O., Romero-Fernandez W., Fuxe K., Garriga P. (2011) "Differential expression of muscarinic acetylcholine receptor subtypes in Jurkat cells and their signaling" *J Neuroimmunol.* 237(1-2):13-22.
- [21] Borroto-Escuela D.O., Romero-Fernandez W., Garcia-Negredo G., Correia P.A., Garriga P., Fuxe K., Ciruela F. (2011) "Dissecting the conserved NPxxY motif of the M3 muscarinic acetylcholine receptor: critical role of Asp-7.49 for receptor signaling and multiprotein complex formation" *Cell Physiol Biochem.* 28(5):1009-1022.

- [22] Song H., Han IY., Kim Y., Kim YH., Choi IW., Seo SK., Jung S.Y., Park S., Kang M.S. (2015) "The NADPH oxidase inhibitor DPI can abolish hypoxia-induced apoptosis of human kidney proximal tubular epithelial cells through Bcl2 up-regulation via ERK activation without ROS reduction" *Life Sci.* 126:69-75.
- [23] Lee J.H., Choi S.H., Baek M.W., Kim M.H., Kim H.J., Kim S.H., Oh S.J., Park H.J., Kim W.J., Jung J.Y. (2013) "CoCl₂ induces apoptosis through the mitochondria- and death receptor-mediated pathway in the mouse embryonic stem cells" *Mol Cell Biochem.* 379:133-140.
- [24] Zou W., Zeng J., Zhuo M., Xu W., Sun L., Wang J., Liu X. (2002) "Involvement of caspase-3 and p38 mitogen-activated protein kinase in cobalt chloride-induced apoptosis in PC12 cells" *J Neurosci Res.* 67(6):837-43.
- [25] Gholami S., Azadbakht M. (2016) "The Effect of Cobalt Chloride and Chromium Chloride on Development of Mouse Liver during Pregnancy" *J Nov. Appl Sci.* 5(4):124-132.
- [26] Fung F.K.C., Law B.Y.K., Lo A.C.Y. (2016) "Lutein Attenuates Both Apoptosis and Autophagy upon Cobalt (II) Chloride-Induced Hypoxia in Rat Müller Cells" *PLoS ONE.* 11(12): e0167828.
- [27] Arauz A., Murillo L.M., Bonnin E. (2002) "Neuroprotección en isquemia cerebral aguda. Estado actual e importancia clínica de la cascada isquémica" *Rev Ecuat Neurol.* 11(3):1-11.
- [28] Vidale S., Consoli A., Arnaboldi M., Consoli D. (2017) "Postischemic Inflammation in Acute Stroke" *J Clin Neurol.* 13(1):1-9.
- [29] Harari OA., Liao JK. (2010) "NF- κ B and innate immunity in ischemic stroke" *Ann N Y Acad Sci.* 1207:32-40.
- [30] Li-Rong Wu., Liang Liu., Xiao-Yi Xiong., Qin Zhang., Fa-Xiang Wang., Chang-Xiong Gong., Qi Zhong., Yuan-Rui Yang., Zhao-You Meng., Qing-Wu Yang. (2017) "Vinpocetine alleviate cerebral ischemia/reperfusion injury by down-regulating TLR4/MyD88/NF- κ B signaling" *Oncotarget.* 8(46):80315-80324.
- [31] Li YH., Fu HL., Tian ML., Wang YQ., Chen W., Cai LL., Zhou XH., Yuan HB. (2016) "Neuron-derived FGF10 ameliorates cerebral ischemia injury via inhibiting NF- κ B-dependent neuroinflammation and activating PI3K/Akt survival signaling pathway in mice" *Sci Rep.* 6:1-12.
- [32] Castillo J. (2001) "Luces y sombras de la neuroprotección en la isquemia cerebral" *Rev. neuro-psiquiatr.* 64(4):354-381.
- [33] Romero-Fernandez W., Borroto-Escuela D.O., Alea M.P., Garcia-Mesa Y., Garriga P. (2011) "Altered trafficking and unfolded protein response induction as a result of M3 muscarinic receptor impaired N-glycosylation". *Glycobiology.* 21(12):1663-72.