

# Proteínas de choque térmico durante la isquemia cerebral transitoria: ¿Un posible blanco terapéutico?

López Amador Noé,<sup>1\*</sup> Ruiz Ramos Rubén,<sup>1</sup> Calderón Garcidueñas Ana Laura,<sup>2</sup> Carvajal Zarrabal Octavio<sup>1</sup> y Alexander Aguilera Alfonso<sup>1</sup>

## Heat shock proteins during transient brain ischemia: A possible therapeutic target?

Recibido: 22 de marzo de 2022  
Aceptado: 30 de marzo de 2022

### Resumen

La enfermedad vascular cerebral (EVC) es una de las causas de morbilidad más frecuentes en nuestro medio. Las proteínas de choque térmico son chaperonas moleculares que responden al estrés inducido por diversas lesiones. Ciertos estudios experimentales han descrito su papel en la respuesta adaptativa a la isquemia cerebral, caracterizando algunos de sus efectos moduladores de la respuesta inflamatoria y del ciclo celular. Presentamos un trabajo de revisión sistemática de la literatura acerca de los hallazgos experimentales de los modelos de lesión por isquemia-reperusión y privación de oxígeno-glucosa, asociados con la función de las proteínas de choque térmico en células nerviosas. Se realizó una búsqueda avanzada de artículos relevantes o recientes sobre este tema, en bases de datos especializadas (*PubMed*, *Google Scholar*, *Scielo*, *MEDLINE* y *Cochrane Library*). Los estudios revisados demuestran que estas chaperonas moleculares modulan la respuesta a la isquemia cerebral transitoria, controlando mecanismos adaptativos que favorecen la tolerancia del cerebro a la isquemia y la inhibición de la apoptosis en las células nerviosas. Estos resultados experimentales permiten entrever una posible utilidad terapéutica de estos mecanismos moleculares, considerando a las proteínas de choque térmico como prometedores blancos terapéuticos para el tratamiento de la enfermedad vascular cerebral y otras patologías.

### PALABRAS CLAVE

Enfermedad vascular cerebral, infarto cerebral, lesión por isquemia-reperusión, privación de oxígeno-glucosa.

### Abstract

Cerebrovascular disease (CVD) is one of the most frequent causes of morbidity and mortality in our setting. Heat shock proteins are stress-induced molecular chaperones responsive to different types of injury. Certain experimental studies have described their role in the adaptive response to cerebral ischemia, characterizing some of their inflammatory response and cell cycle modulatory effects. We present a descriptive and systematic literature review about the experimental findings of ischemia-reperfusion injury and oxygen-glucose deprivation models associated to the function of heat shock proteins in nerve cells. An exhaustive and focused search of relevant or recent articles on this topic was carried out in specialized databases (*PubMed*, *Google Scholar*, *Scielo*, *MEDLINE* and *Cochrane Library*). The studies reviewed demonstrate that these molecular chaperones modulate the transitory cerebral ischemia response, controlling adaptive mechanisms that promote brain tolerance to ischemia and the apoptosis inhibition in nerve cells. These experimental results allow us to glimpse a possible therapeutic utility of these molecular mechanisms, considering heat shock proteins as promising therapeutic targets for the treatment of cerebrovascular disease and other conditions.

### KEY WORDS

Cerebrovascular disease, ischemic stroke, ischemia-reperfusion injury, oxygen-glucose deprivation.

<sup>1</sup>Universidad Veracruzana, México. <sup>2</sup>Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, México  
\*Autor para correspondencia: nolopez@uv.mx

## Introducción

Las proteínas de choque térmico (HSPs, del inglés *heat shock proteins*) son una familia heterogénea de biomoléculas de bajo peso, cuya expresión responde al estrés celular, además de activar su interacción con otras proteínas y ácidos nucleicos regulando importantes cambios en la respuesta inflamatoria y la apoptosis. Estas proteínas se han propuesto como blanco terapéutico en diversos padecimientos autoinmunes y neurodegenerativos, por lo que es importante documentar información actualizada y relevante sobre el conocimiento de sus funciones biológicas.<sup>1</sup> El propósito de este trabajo es presentar una actualización en el tema, con enfoque en los hallazgos experimentales obtenidos por maniobras como la oclusión arterial transitoria *in vivo*, que permita inferir los mecanismos moleculares subyacentes que ocurrirían en condiciones clínicas análogas, tal como en el infarto cerebral; reunir elementos que permitan integrar de mejor manera la respuesta cerebral a la isquemia para prever su utilidad en el desarrollo de terapias moleculares viables, para el tratamiento de pacientes con alto riesgo de enfermedad cerebrovascular. Para este fin, se realizó una revisión sistemática de la literatura con carácter descriptivo, mediante una búsqueda en las bases de datos *PubMed*, *Google Scholar*, *Scielo*, *MEDLINE* y *Cochrane Library*, utilizando los siguientes términos MeSH (*Medical Subject Headings*): *Heat Shock Protein y/o Ischemic Stroke y/o MCAO y/o HSP27 y/o HSP60 y/o HSP70 y/o HSP90*. La información y datos recopilados fueron evaluados de acuerdo con su significancia y congruencia para esclarecer el efecto de la isquemia cerebral transitoria, inducida experimentalmente sobre la expresión y función de proteínas de choque térmico en modelos murinos, así como su relevancia y actualidad.

### Modelo de isquemia cerebral inducida experimentalmente

La oclusión mecánica de la arteria cerebral media (MCAO, del inglés *middle cerebral artery occlusion*) es un modelo experimental de isquemia cerebral transitoria. Dicha maniobra impide el flujo sanguíneo normal hacia el hemisferio cerebral ipsilateral, y se logra introduciendo un filamento o catéter removible en la luz arterial, lo cual produce isquemia durante su curso, para posteriormente permitir la reperfusión y finalmente evaluar los cambios en el órgano (Figura 1).<sup>2</sup>

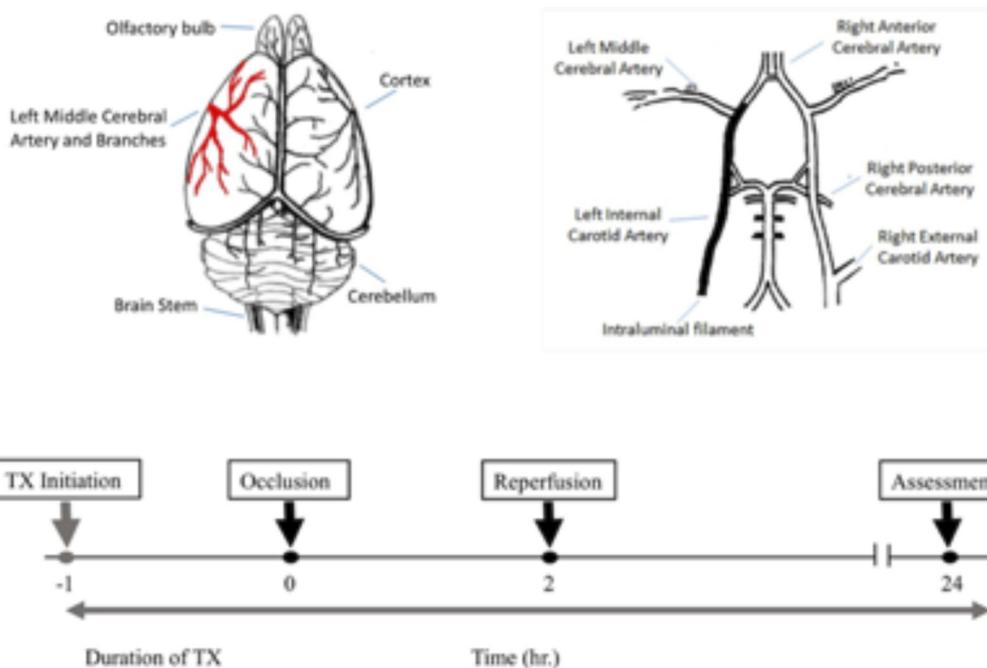
Este modelo pretende emular las condiciones fisiopatológicas que ocurren durante un ictus.<sup>3</sup> La arteria cerebral media es una rama derivada de la arteria carótida interna, un vaso que frecuentemente forma placas de ateroma reduciendo progresivamente el flujo sanguíneo cerebral. En algunas ocasiones dicha obstrucción puede favorecer un evento embólico al desprenderse un fragmento del ateroma.<sup>4</sup>

### Proteínas de choque térmico y regulación de la respuesta adaptativa

La respuesta fisiológica a la isquemia involucra a las HSPs, las cuales interactúan con mu-

Figura 1

Modelo de isquemia - reperfusión cerebral inducida por oclusión de la arteria media cerebral. Tomado de Khansari and Halliwell, 2019.



Fuente: Khansari PS, Halliwell RF, 2019.

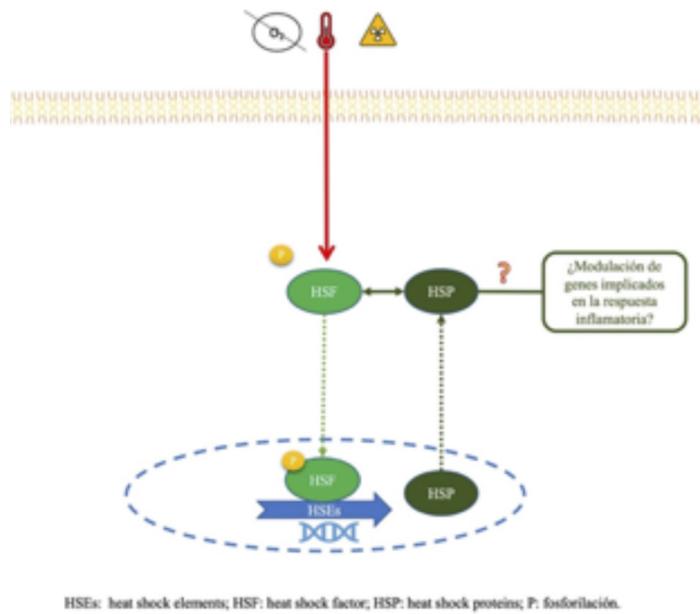
chas otras proteínas que participan en diversas vías de señalización intracelular, actuando como factores transcripcionales que regulan la expresión de genes que participan en la adaptación celular al estrés. Además, las HSPs intervienen en el plegamiento de proteínas y modulan cambios postraduccionales, así como los fenómenos de autofagia y el ciclo celular, lo que les confiere un papel decisivo en el mantenimiento de la homeostasis celular.<sup>1</sup>

En general, la expresión génica de las HSPs está regulada por el factor de choque térmico (HSF, del inglés *heat shock factor*), que es fosforilado en respuesta a un estímulo nocivo (p. ej. hipoxia, cambios bruscos de temperatura, exposición a radiación, etc.) (Figura 2).

Este factor fosforilado se transloca al núcleo celular, donde reconoce y se une a secuencias consenso dentro de los elementos de respuesta a estrés térmico (HSEs, del inglés *heat shock elements*); estas secuencias están ampliamente distribuidas en las regiones promotoras de los genes que codifican a las HSPs, que al reconocer al HSF inducen la expresión de dichos genes en respuesta a los estímulos nocivos. Una vez que las HSPs se distribuyen en el citosol, éstas interactúan con el HSF impidiendo su fosforilación y regulando negativamente su propia expresión. Dicho brevemente, las HSPs son moléculas moduladoras de la respuesta adaptativa y tienen, por ende, una participación importante en la respuesta inmunitaria y en la regulación de la apoptosis.<sup>5</sup>

A continuación, se enumeran las HSPs de cada grupo en función de su peso molecular, las cuales han mostrado ser inducibles por isquemia cerebral transitoria, de acuerdo con lo encontrado en la presente revisión:

**Figura 2**  
Regulación canónica de la expresión génica de las proteínas de choque térmico.



Fuente: Elaboración propia.

## Efectos de la isquemia cerebral en las proteínas de choque térmico

A continuación, se describen los efectos moleculares encontrados en la literatura, de las distintas chaperonas reportadas en esta revisión, de acuerdo con el grupo de peso molecular al que pertenecen:

### Hsp27

El papel de esta chaperona en la respuesta a la isquemia cerebral transitoria destaca en el estudio del paradigma de preconditionamiento focal. Dicho fenómeno consiste en producir tolerancia a la isquemia prolongada después de someter al organismo a un curso de sesiones subsecuentes de MCAO. El estudio de este fenómeno arrojó que después de 1-7 días de intervención, considerando intervalos de recuperación adecuados para la síntesis de proteínas, se indujo la expresión de los genes que codifican para Hsp70, Hsp27 y la proteína ácida gliofibrilar (GFAP, del inglés *glial fibrillary acidic protein*). El aumento inducido en los niveles de esta última proteína es característico de la astrogliosis, que ocurre en presencia de un aumento significativo de la actividad metabólica de los astrocitos ante diferentes tipos de insulto. Los cambios descritos en este trabajo ocurren sin mostrar evidencia de daño cerebral posterior a las pruebas. Este hallazgo llevó a los autores a proponer que la inducción de Hsp27 y Hsp70 responde a una reacción adaptativa que provee protección temporal contra la isquemia.<sup>6</sup> En otro estudio realizado en células de retina y del nervio óptico de ratas sometidas a diferentes tipos de isque-

**Tabla 1**  
HSPs inducibles por isquemia cerebral

Grupo	Integrantes
Hsp27	ab-cristalinas Hsp20
Hsp60	Hsp10 Hsp60
Hsp70	Hsp72 HspA12B
Hsp90	Hsp90a

Fuente: Elaboración propia.

mia experimental, se demostró que existen cambios diferenciales en la expresión de proteínas como c-Fos, ab-cristalina (Cryab), Hsp27, Hsp60 y Hsp70, sin mostrar daño neurológico aparente, sugiriendo nuevamente que la inducción de Hsp27 y Hsp70 podría tener un efecto protector o adaptativo.<sup>7</sup> Este efecto inductor de la isquemia cerebral transitoria sobre los niveles de Hsp27 en la zona perilesional, no solo es específico, sino de utilidad como indicador para discriminar la población neuronal y glial afectada por la isquemia.<sup>8</sup> Más aún, los ratones Hsp27tg con sobreexpresión constitutiva de esta chaperona, fueron más resistentes al daño inducido por isquemia cerebral transitoria, en comparación con ratones silvestres.<sup>9</sup> Por otro lado, en animales transfundidos con células troncales neurales (HSC, del inglés *neural stem cells*) se reportaron niveles de expresión superiores de Hsp27, al compararlos con los controles tratados solo con un vehículo; además, dichos niveles se asociaron a una baja actividad de la caspasa-3 (Cas-3), que se traduce en un efecto inhibitorio de la apoptosis. Lo anterior también podría postularse como un mecanismo putativo de neuroprotección.<sup>10</sup> Algunos fármacos pueden potenciar el efecto neuroprotector de Hsp27, tal es el caso de sulindaco, un potente agente antiinflamatorio no esteroideo (AINE). Este fármaco induce la expresión de Hsp27 en la zona de penumbra isquémica y el núcleo de la lesión por MCAO, así como la activación de las proteínas Akt y cambios en los niveles de Bcl-2, las cuales promueven la diferenciación y el crecimiento celular,<sup>11</sup> confiriendo un efecto anti-apoptótico y neuroprotector; es pertinente señalar que para que Hsp27 tenga este efecto, debe estar fosforilada.<sup>12</sup> Más aún, se ha demostrado que la fosforilación de Hsp27 inducida por la isquemia cerebral con cursos de hasta 120 minutos, inhibe la síntesis de la fructosa-6-fosfato y ribulosa-5-fosfato, potenciando la vía de la pentosa-fosfato (PPP, del inglés *pentose phosphate pathway*). Por otra parte, se ha reportado que la vía de MAPK (del inglés, *mitogen-activated protein kinase*) está regulada positivamente durante el curso de la isquemia cerebral, favoreciendo la activación de Hsp27 y la vía de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) con un aumento en el cociente NADPH / NAD<sup>+</sup>. Se observó además que la inyección local de un inhibidor de la proteína ATM cinasa (ATM, del inglés *ataxia telangiectasia mutated*, KU-55933) redujo significativamente la fosforilación de Hsp27 y G6PD; mientras que el uso de un inhibidor selectivo de la proteína cinasa D (CID755673) no tuvo efecto alguno. Por este motivo, se concluyó que la activación de la PPP mediante Hsp27 dependía de la actividad de ATM cinasa, considerando esto un mecanismo endógeno de defensa antioxidante durante la lesión por isquemia-reperfusión.<sup>13,14</sup>

## Hsp60

Existe poca información relacionada con el efecto de la isquemia cerebral sobre Hsp60, cuya expresión es de origen mitocondrial y es regulada en conjunto con Hsp10. Se ha demostrado que la isquemia producida por MCAO induce la expresión de Hsp60 y Hsp10, mientras que la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, del inglés inducible *nitric oxide synthase*) regula negativamente dichos niveles de expresión, puesto que la aminoguanidina (AG), un inhibidor de la iNOS, reduce el daño isquémico inducido por MCAO en modelos murinos. Por su parte, ensayos in vitro, demostraron que el tratamiento de células astrogliales con lipopolisacárido (LPS) y con interferón- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), indujo la expresión de estas chaperonas, justo como ocurre durante la isquemia cerebral. También se vio que la inhibición de la iNOS potenció la inducción de Hsp60 y Hsp10. Estos estudios sugieren que el óxido nítrico (NO) suprime la inducción de Hsp60 y Hsp10 en el cerebro post-isquémico y que el mecanismo de dicha supresión es un bloqueo del sitio de unión al factor transcripcional STAT3 (del inglés *signal transducer and activator of transcription 3*).<sup>15</sup>

## Hsp70

Algunos de los efectos de Hsp70 ya fueron descritos en conjunto con Hsp27. Todo parece indicar que las chaperonas de este grupo juegan un papel protagónico en la respuesta adaptativa del cerebro ante la isquemia. En los trabajos realizados por Suzuki et al. (1997), se describe un patrón de expresión diferencial de Hsp72 en la corteza cerebral y el núcleo caudado de ratas sometidas a MCAO

por 60 min, en diferentes cursos temporales durante el periodo de reperfusión. Estos trabajos consideraban su presencia como un “marcador de daño celular bien conocido”, atribuyendo un efecto protector al bloqueo de p-selectina, una molécula de adhesión expresada en la membrana de los leucocitos, que está implicada en la migración de éstos a través de la barrera hemato-encefálica (BHE). Adicionalmente, el bloqueo de p-selectina también inhibe la expresión de Hsp72.<sup>16,17</sup> Fue hasta la publicación del trabajo de Currie et al., (2000), que realmente se describió el efecto protector de Hsp70 en respuesta a la isquemia cerebral. Se ha reportado la interacción de Hsp70 con miR-122, un microRNA que se une directamente a la secuencia 3'-UTR del gen Foxo3; la expresión de miR-122 tiene un efecto protector contra la hipoxia in vitro e in vivo, y su expresión está regulada por la vía de Hsp70-NFκB.<sup>18</sup> Interesantemente, la modulación que ejerce Hsp70 podría ser detectada incluso en extremidades distales, durante la hipoxia de origen periférico, pues se ha demostrado que tanto los animales que fueron sometidos a MCAO, como los que se sometieron a un preconditionamiento isquémico de extremidades periféricas (RIPC, del inglés remote limb ischemic preconditioning) aumentaron los niveles de expresión de HIF-1α (del inglés hypoxia inducible factor 1α), Hsp70 y AMPK (del inglés AMP-activated protein kinase), y que esta inducción fue potenciada aún más en los animales que fueron sometidos a RIPC, previo a la isquemia inducida por MCAO.<sup>19</sup>

La HspA12B pertenece a una nueva subfamilia de Hsp70. Esta proteína tiene un papel fundamental en la regulación de la apoptosis neuronal. Su inducción en modelos in vitro de deprivación de oxígeno-glucosa e in vivo por MCAO, indican que tiene una acción reguladora de la viabilidad celular. Por otro lado, la expresión de HspA12B puede inhibirse por miR-134, puesto que el silenciamiento de miR-134, induce a HspA12B regulando negativamente la apoptosis a través de la inhibición de la caspasa-3.<sup>20-22</sup>

## Hsp90

Los estudios publicados por Qi et al. (2015), reportan que la inhibición de Hsp90α con 17-dimetilaminoetilamino-17-demetoxigeldanamicina (17-DMAG) protege la integridad de la BHE durante la isquemia cerebral. Este fármaco experimental tiene un efecto anti-inflamatorio e inhibe la expresión de la metaloproteasa-9 (MMP9), la cual se ha visto que mantiene una correlación positiva con HSP90α en el suero de pacientes post-ictus, y a la que se le atribuye una acción como promotora de la permeabilidad de la BHE.<sup>23,24</sup> Lo anterior podría significar que inhibir a Hsp90 tiene un efecto neuroprotector, al implicar a esta chaperona en la apertura de la BHE; sin embargo, esto no puede ser interpretado totalmente en este sentido. Un estudio publicado por Zhang et al. (2014), sobre el efecto neuroprotector de N-acetilcisteína (NAC) durante la isquemia inducida por MCAO, demostró que la NAC reguló positivamente los niveles de Hsp90, aumentando su interacción con HIF-1α e incrementando la estabilidad de esta última, que es considerada un factor de neuroprotección. Posteriormente, se demostró que la inhibición de Hsp90 disminuyó los efectos neuroprotectores de NAC durante la isquemia inducida por MCAO.<sup>25</sup> Por este motivo, no se puede considerar que la inhibición de Hsp90 tenga un efecto neuroprotector y deben realizarse más estudios para corroborar este hecho.

Finalmente, el sistema neuroendocrino parece estar implicado en la regulación de los diversos fenómenos de tolerancia a la lesión inducida por isquemia-reperfusión. La inhibición de la secreción de testosterona inducida por estrés tiene un efecto neuroprotector que implica la inducción de Hsp70 y Hsp90, y un efecto inhibitorio de la apoptosis.<sup>26</sup>

Los efectos de la isquemia cerebral y la deprivación de oxígeno-glucosa sobre las diferentes proteínas de choque térmico descritos en esta revisión se resumen en la siguiente tabla:

## Conclusión

La información obtenida acerca de los posibles efectos de la isquemia cerebral sobre las proteínas de choque térmico es escasa. Si bien esta revisión presenta los trabajos más relevantes en relación con Hsp27, Hsp60, Hsp70 y Hsp90, con los datos recopilados se han identificado los principales mecanismos y rutas moleculares propuestos para explicar las funciones de estas proteínas (Figura 3).

La expresión génica de las HSPs es inducida por la isquemia cerebral consistentemente y los cambios de expresión son detectables en las primeras 24 horas de haberse sometido a MCAO. La fosforilación de estas proteínas es fundamental para iniciar su cascada de señalización. Se debe considerar que, si bien las HSPs participan en la respuesta a la isquemia cerebral, cada una podría tener una actuación *per se* en la activación de los distintos mecanismos homeostáticos implicados en la respuesta cerebral. De acuerdo con los resultados de esta búsqueda, la actividad de Hsp27 y HspA12B inhibe a caspasa-3 e induce a Akt y Bcl-2, lo que se traduce en un efecto anti-apoptosis. Sin embargo, a pesar de que el efecto antiapoptótico de estas proteínas ha sido reportado, se requiere realizar más investigación experimental para esclarecer estas rutas. En cuanto a las vías de señalización que interactúan con las HSPs, se encontró que la activación de MAPK favorece la fosforilación de Hsp27, potenciando la vía de la G6PDH. Se infiere que este efecto podría ser extensivo a otras HSPs, lo que sería importante demostrar experimentalmente. Por otro lado, inos puede inactivar a Hsp60 y Hsp10 durante el curso de un evento isquémico, bloqueando el sitio de unión a STAT3. Es importante considerar la interacción con miRNAs, ya que estos pueden modular la expresión de chaperonas, tanto inhibiéndolas como induciéndolas, siendo importante mencionar que la expresión de dichos miRNAs, podría interactuar con la vía de Hsp70-NFkB. El tratamiento con células troncales del SNC, el efecto de los AINES durante la isquemia cerebral, la terapia adyuvante con moléculas antioxidantes (p.ej. NAC) y el estudio la interacción de las chaperonas con el eje neuro-endocrino, se vislumbran como potenciales líneas de investigación que pueden establecer nuevos tratamientos de la enfermedad cerebrovascular, con un enfoque molecular.

Tabla 2

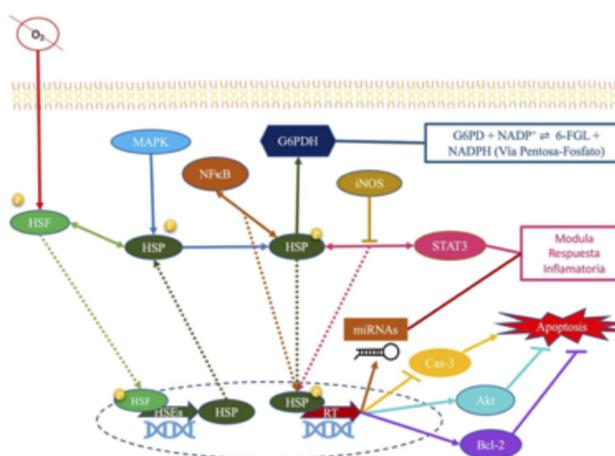
Posibles efectos moleculares secundarios a la inducción de las HSPs por isquemia cerebral transitoria y privación de oxígeno-glucosa

Grupo	Efectos	Referencias
Hsp27	Protección temporal contra la isquemia	Currie et al. <sup>6</sup> Kalesnykas et al. <sup>7</sup>
	Marcador de isquemia cerebral	Popp et al. <sup>8</sup>
	Ratones HSP27tg más resistentes a isquemia	Van der Weerd et al. <sup>9</sup>
	Posible inhibición de caspasa-3	Shen et al. <sup>10</sup>
	Inducción por AINEs con efecto en Akt y Bcl-2	Modi et al. <sup>11</sup>
	MAPK y ATM inducen pHsp27 potenciando PPP	Shimada et al. <sup>12</sup> Imahori et al. <sup>13</sup> Yamamoto et al. <sup>14</sup>
Hsp60	NO suprime Hsp10 y Hsp60 mediante bloqueo del sitio de unión a STAT3	Kim et al. <sup>15</sup>
Hsp70	Protección temporal contra la isquemia	Currie et al. <sup>6</sup> Kalesnykas et al. <sup>7</sup>
	Induce la expresión de miR-122 mediante la vía HSP70-NFkB.	Guo et al. <sup>18</sup>
	HSPA12B es inhibida por miR-134	Chi et al. <sup>20,21</sup>
	Testosterona regula negativamente a HSP70	Kang et al. <sup>22</sup> Yang et al. <sup>26</sup>
Hsp90	Induce HIF-1a, con efecto neuroprotector	Zhang et al. <sup>25</sup>
	Testosterona regula negativamente a HSP90	Yang et al. <sup>26</sup>

Fuente: Elaboración propia.

Figura 3

Posibles interacciones moleculares de las proteínas de choque térmico en respuesta a la isquemia cerebral



heat shock factor; HSEs: heat shock elements; HSP: heat shock protein; P: fosforilación; Cas-3: caspasa-3; MAPK: mitogen activated kinase; NFkB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; STAT3: signal transducer and activator of transcription-3; citocina inducible nitric oxide synthase; miRNAs: ácidos ribonucleicos monocatenarios cortos; Akt: protein kinase B; Bcl-2: B cell lms 2; G6PD: glucosa-6-fosforilasa deshidrogenasa; NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosforato; 6-FGL: 6-oxohepto-D-tilucosa.

Fuente: Elaboración propia.

## Referencias

1. Kim JY, Kim JW, Yenari MA. Heat shock protein signaling in brain ischemia and injury. *Neurosci Lett*. 2020 Jan 10;715:134642. DOI: 10.1016/j.neulet.2019.134642. Epub 2019 Nov 20. PMID: 31759081; PMCID: PMC6925329.
2. Khansari PS, Halliwell RF. Mechanisms Underlying Neuroprotection by the NSAID Mefenamic Acid in an Experimental Model of Stroke. *Front Neurosci*. 2019 Feb 7;13:64. DOI: 10.3389/fnins.2019.00064. PMID: 30792624; PMCID: PMC6374636.
3. World Health Organization. The top 10 causes of death. Geneva, Switzerland. WHO, 2022.
4. National Library of Medicine. Stroke: MedlinePlus Medical Encyclopedia. Bethesda, US. NIH, 2022.
5. Shan Q, Ma F, Wei J, Li H, Ma H, Sun P. Physiological Functions of Heat Shock Proteins. *Curr Protein Pept Sci*. 2020;21(8):751-760. DOI: 10.2174/138920372066619111113726. PMID: 31713482.
6. Currie RW, Ellison JA, White RF, Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC. Benign focal ischemic preconditioning induces neuronal Hsp70 and prolonged astrogliosis with expression of Hsp27. *Brain Res*. 2000 Apr 28; 863 (1-2): 169-81. DOI: 10.1016/S0006-8993(00)02133-8. PMID: 10773205.
7. Kalesnykas G, Tuulos T, Uusitalo H, Jolkkonen J. Neurodegeneration and cellular stress in the retina and optic nerve in rat cerebral ischemia and hypoperfusion models. *Neuroscience*. 2008 Aug 26;155(3):937-47. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.06.038. Epub 2008 Jun 21. PMID: 18640247.
8. Popp A, Jaenisch N, Witte OW, Frahm C. Identification of ischemic regions in a rat model of stroke. *PLoS One*. 2009; 4 (3): e4764. DOI: 10.1371/journal.pone.0004764. Epub 2009 Mar 10. PMID: 19274095; PMCID: PMC2652027.
9. Van der Weerd L, Tariq Akbar M, Aron Badin R, Valentim LM, Thomas DL, Wells DJ, Latchman DS, Gadian DG, Lythgoe MF, de Belleruche JS. Overexpression of heat shock protein 27 reduces cortical damage after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010 Apr; 30 (4): 849-56. DOI: 10.1038/jcbfm.2009.249. Epub 2009 Dec 9. PMID: 19997117; PMCID: PMC2949174.
10. Shen CC, Lin CH, Yang YC, Chiao MT, Cheng WY, Ko JL. Intravenous implanted neural stem cells migrate to injury site, reduce infarct volume, and improve behavior after cerebral ischemia. *Curr Neurovasc Res*. 2010 Aug; 7 (3): 167-79. DOI: 10.2174/156720210792231822. PMID: 20560882.
11. Modi JP, Gharibani PM, Ma Z, Tao R, Menzie J, Prentice H, Wu JY. Protective mechanism of sulindac in an animal model of ischemic stroke. *Brain Res*. 2014 Aug 12; 1576: 91-9. DOI: 10.1016/j.brainres.2014.06.019. Epub 2014 Jun 23. PMID: 24968090.
12. Shimada Y, Tanaka R, Shimura H, Yamashiro K, Urabe T, Hattori N. Phosphorylation enhances recombinant HSP27 neuroprotection against focal cerebral ischemia in mice. *Neuroscience*. 2014 Oct 10;278:113-21. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.07.073. Epub 2014 Aug 15. PMID: 25135354.
13. Imahori T, Hosoda K, Nakai T, Yamamoto Y, Irino Y, Shinohara M, Sato N, Sasayama T, Tanaka K, Nagashima H, Kohta M, Kohmura E. Combined metabolic and transcriptional profiling identifies pentose phosphate pathway activation by HSP27 phosphorylation during cerebral ischemia. *Neuroscience*. 2017 May 4; 349: 1-16. DOI: 10.1016/j.neurosci.2017.02.036. Epub 2017 Mar 6. Erratum in: *Neuroscience*. 2017 Aug 15;357:414. PMID: 28257891.
14. Yamamoto Y, Hosoda K, Imahori T, Tanaka J, Matsuo K, Nakai T, Irino Y, Shinohara M, Sato N, Sasayama T, Tanaka K, Nagashima H, Kohta M, Kohmura E. Pentose phosphate pathway activation via HSP27 phosphorylation by ATM kinase: A putative endogenous antioxidant defense mechanism during cerebral ischemia-reperfusion. *Brain Res*. 2018 May 15; 1687: 82-94. DOI: 10.1016/j.brainres.2018.03.001. Epub 2018 Mar 3. PMID: 29510140.
15. Kim SW, Lee JK. NO-induced downregulation of HSP10 and HSP60 expression in the postischemic brain. *J Neurosci Res*. 2007 May 1; 85 (6): 1252-9. DOI: 10.1002/jnr.21236. PMID: 17348040.
16. Suzuki H, Abe K, Tojo S, Morooka S, Kimura K, Mizugaki M, Itoyama Y. Expressions of P-selectin- and HSP72-like immunoreactivities in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Brain Res*. 1997 Jun 13; 759 (2): 321-9. DOI: 10.1016/S0006-8993(97)00392-2. PMID: 9221957.
17. Suzuki H, Abe K, Tojo SJ, Kitagawa H, Kimura K, Mizugaki M, Itoyama Y. Reduction of ischemic brain injury by anti-P-selectin monoclonal antibody after permanent middle cerebral artery occlusion in rat. *Neurol Res*. 1999 Apr; 21 (3): 269-76. DOI: 10.1080/01616412.1999.11740930. PMID: 10319335.
18. Guo D, Ma J, Li T, Yan L. Up-regulation of miR-122 protects against neuronal cell death in ischemic stroke through the heat shock protein 70-dependent NF- $\kappa$ B pathway by targeting FOXO3. *Exp*

- Cell Res. 2018 Aug 1;369(1):34-42. doi: 10.1016/j.yexcr.2018.04.027. Epub 2018 Apr 30. PMID: 29715465.
19. Xia M, Ding Q, Zhang Z, Feng Q. Remote Limb Ischemic Preconditioning Protects Rats Against Cerebral Ischemia via HIF-1 $\alpha$ /AMPK/HSP70 Pathway. *Cell Mol Neurobiol.* 2017 Aug;37(6):1105-1114. doi: 10.1007/s10571-016-0444-2. Epub 2016 Nov 28. PMID: 27896629.
  20. Chi W, Meng F, Li Y, Li P, Wang G, Cheng H, Han S, Li J. Impact of microRNA-134 on neural cell survival against ischemic injury in primary cultured neuronal cells and mouse brain with ischemic stroke by targeting HSPA12B. *Brain Res.* 2014 Dec 10;1592:22-33. doi: 10.1016/j.brainres.2014.09.072. Epub 2014 Oct 7. PMID: 25304362.
  21. Chi W, Meng F, Li Y, Wang Q, Wang G, Han S, Wang P, Li J. Downregulation of miRNA-134 protects neural cells against ischemic injury in N2A cells and mouse brain with ischemic stroke by targeting HSPA12B. *Neuroscience.* 2014 Sep 26;277:111-22. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.06.062. Epub 2014 Jul 5. PMID: 25003713.
  22. Kang L, Zhang G, Yan Y, Ke K, Wu X, Gao Y, Li J, Zhu L, Wu Q, Zhou Z. The role of HSPA12B in regulating neuronal apoptosis. *Neurochem Res.* 2013 Feb;38(2):311-20. doi: 10.1007/s11064-012-0922-y. Epub 2013 Jan 5. PMID: 23292195.
  23. Qi J, Liu Y, Yang P, Chen T, Liu XZ, Yin Y, Zhang J, Wang F. Heat shock protein 90 inhibition by 17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin protects blood-brain barrier integrity in cerebral ischemic stroke. *Am J Transl Res.* 2015 Oct 15;7(10):1826-37. PMID: 26692927; PMCID: PMC4656760.
  24. Qi J, Han X, Liu HT, Chen T, Zhang JL, Yang P, Bo SH, Lu XT, Zhang J. 17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin attenuates inflammatory responses in experimental stroke. *Biol Pharm Bull.* 2014;37(11):1713-8. doi: 10.1248/bpb.b14-00208. PMID: 25366476.
  25. Zhang Z, Yan J, Taheri S, Liu KJ, Shi H. Hypoxia-inducible factor 1 contributes to N-acetylcysteine's protection in stroke. *Free Radic Biol Med.* 2014 Mar;68:8-21. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.007. Epub 2013 Dec 1. PMID: 24296245; PMCID: PMC3943875.
  26. Yang SH, Liu R, Wen Y, Perez E, Cutright J, Brun-Zinkernagel AM, Singh M, Day AL, Simpkins JW. Neuroendocrine mechanism for tolerance to cerebral ischemia-reperfusion injury in male rats. *J Neurobiol.* 2005 Feb 15;62(3):341-51. doi: 10.1002/neu.20103. PMID: 15514992.