



Universitat Autònoma de Barcelona

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Unidad de Bioquímica de Medicina

Estudio de los mecanismos moleculares implicados en la muerte apoptótica en un modelo de isquemia cerebral *in vitro*

Nahuai Badiola Benito

TESIS DOCTORAL

Bellaterra 2008



Universitat Autònoma de Barcelona

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Unidad de Bioquímica de Medicina

Estudio de los mecanismos moleculares implicados en la muerte apoptótica en un modelo de isquemia cerebral *in vitro*.

Memoria de tesis doctoral presentada por Nahuai Badiola Benito para optar al grado de Doctor en Bioquímica y Biología Molecular, por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Trabajo realizado en la Unidad de Bioquímica de Medicina, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, de la Universidad Autónoma de Barcelona, bajo la dirección del Doctor José Rodríguez Álvarez y la Doctora Josefa Sabriá Pau.

Bellaterra, 20 de Octubre de 2008

Doctorando

Directores de tesis

Nahuai Badiola Benito

Dr. José Rodríguez Álvarez

Dra. Josefa Sabriá Pau

"Cuando una puerta se cierra, otra se abre, pero a menudo vemos tanto tiempo y con tanta tristeza la puerta que se cierra que no notamos otra que se ha abierto para nosotros"

(Alexander Graham Bell)

"Lo que llamamos casualidad no es ni puede ser sino la causa ignorada de un efecto desconocido"

(Voltaire)

A los míos

AGRADECIMIENTOS

Y aquí se encuentra uno, sentado delante del ordenador, con la idea de que tiene casi todo hecho, pero con la extraña sensación de que aun falta algo por escribir, después de doscientas y pico páginas, que necesidad habrá?, se preguntaran algunos. Pero es que lo que falta por escribir es sin duda el apartado más leído en la categoría de tesis doctorales, sólo la portada y el título pueden competir con él.

Lo habitual es empezar con los jefes, y por algo será, para bien o para mal juegan un importante papel en este camino sinuoso e intrincado (raro es si no entras en algún callejón sin salida) y largo, unas veces más, otras veces menos, pero largo, no hay duda. Si Pepe no hubiera decidido incorporarme al grupo, yo no estaría escribiendo esto, no hubiera aprendido lo que he aprendido, no hubiera conocido la gente que he conocido estos años en mi entorno laboral y un numeroso sin fin de obviedades como estas. En tanto en cuanto dentro de estas obviedades considero que hay cosas realmente buenas (incluyendo alguna joyita), te tengo que estar agradecido. En mi opinión sabes fomentar el aprendizaje de tus doctorandos, con journal clubs, con congresos, con libertad en el laboratorio y demás. Estos años he aprendido muchas cosas como científico, y muchas de ellas son fruto de esta actitud pro-formación que tienes. También de ti, Pepi, he aprendido cosas, y vale la pena decir, que han sido cosas muy prácticas y que han aportado, en muchas ocasiones, esa otra visión que viene tan bien para tener una visión más global. Tan bien vale la pena decir que tratar contigo ha sido muy sencillo y agradable, lo cual siempre se agradece.

Que decir de mis dos pilares en el grupo, pues por ejemplo, que si no fuera por ellos igual estaría trabajando de horticultor (tengo que pensarme si daros las gracias o no, ahora que lo escribo, jeje). Bruna, es difícil resumir todo lo que hemos vivido, y el peso que tienes en que yo ande por estos lares (véase tesina) pero si puedo decir que trabajar contigo es más fácil y más divertido y, en definitiva, me siento muy afortunado de haberte tenido al lado como una hermana, gracias por estar siempre ahí. El otro pilar del grupo es Alfredhiño (también conocido como animalejo mayor), del cual no solo he podido aprender su rigor científico (del cual me he quedado una parte, todo era demasiado,

Agradecimientos

verdad Bruna?) sino que he aprendido como se piscineaba si el partido lo requiere (lo importante es ganar, no, Alfredo?), he compartido grandes viajes y aventuras, pero del que aun no he podido imitar su técnica depurada como oyente de congresos, eres un crack!! Lo que me he reído y he aprendido con vosotros!! Dentro del grupo de los Pepe's, no puedo olvidarme tampoco de Xavito Cabrón con el que tuve la suerte de coincidir un tiempo y del que sin duda he aprendido muchas cosas, y no me refiero solo a como ser un cabronzuelo. Sin abandonar el grupo, obligado a agradecer a mi antecesora Cristina Malagelada, la cual me enseñó en primera persona que la mejor forma de hacer una OGD es pillándose un colocón de nitrógeno

La expansión de este departamento, desde mi entrada, ha sido realmente espectacular, lo cual ha empezado a dificultar sobremanera algunas tareas como las de ir a comer todos juntos, traer pastas para todos en tu cumpleaños, por no hablar del catering de la tesis... habrá comida, no sufráis. En este caso, es difícil redactar los agradecimientos de un departamento con tanta gente y con tanta actividad socio-cultural, esos cafecillos, esas pachangas, esas birras en la vila, esas cenitas aquí-y-allá, esa sección de aprende geografía catalana visitando casas rurales, esos disfraces, esos videos (adobe premiere o moviemaker), esos montajes fotográficos (photoshop o publisher)... ha eso se le llama una formación holística, jeje.

En definitiva, aunque no diga nombres de sobra sabe cada uno lo que hemos compartido estos años, de hecho, no por no dar nombres es menos sentido. Quiero decir que gracias a vosotros ir al trabajo ha sido más agradable, que no es poco decir ya que aquí nos hemos pasado muuuuuchas horas. La hora de comer y los cafés me han aportado además de unas cuantas carcajadas, mucho conocimiento gracias al Sr. Google, al Sr. Horóscopo, y a nuestras expertas de prensa rosa. Para mi ha sido un lujo teneros alrededor y poder acompañar la ciencia (de la cual también hemos hablado, no vaya parecer ahora que somos una panda de marujos supersticiosos) de buenos ratos.

Thanks Klas for bring me the opportunity to know new place, new lab and new people and thanks for your kindness. Gracias a Maryam, Pete y Henrik por

hacer de Goteborg una ciudad más acogedora y al mismo tiempo hacer que el curso de inglés fuera mucho más ameno con las salidas al lago, islas, pubs...

Gracias a Raffaella, Nuria y Miguel por haberme echado una mano en mi corta estancia en Lleida, y a Joan Comella por haberme facilitado esta experiencia además de regalarme alguno de sus consejos.

Gracias a Unai, Didac y Laura por esas cenitas, que montábamos apenas cruzando una veintena de mails, en las que todos hacíamos terapia, y aquí servidor os ponía al día de lo agradecido que es y lo bien pagado que está el trabajo científico, también en la UAB.

Gracias a mis compañeros de piso porque llegar de trabajar a las tantas y tener un ratito de sofá comentando las mejores jugadas del día, o viendo House, o criticando lo que echan por la tele, consigue que uno se vaya un poco desintoxicado de trabajo para la cama. Injusto sería que en este punto no hiciera mención a las semejantes comilonas que tenemos costumbre montar de vez en cuando, las cuales demuestran que la combinación vasco-gallega es sin duda explosiva.

Rubén, desde el flechazo mutuo, hemos compartido un montón de experiencias, campings, partidos, cenitas, playas nocturnas, birras a lo manolo... incluso estuviste en mi debut oficial como orador, mi tesina! Espero poder sumar otras tantas experiencias más contigo. Hablando de birras a lo manolo, aunque en este caso igual debería decir a lo hooligan, inestimables las conversaciones contigo Oriol, lo mismo le dábamos a la actualidad del Barça que a nuestra actualidad científica, en muchos casos compartían situaciones caóticas y en algunas menos, situaciones satisfactorias.

Luis eres un gran tipo, lo sabes, no? Da igual que estés a 500km, los buenos amigos siempre están cerca, siempre puedes quedar con ellos y tener la sensación de que les has visto el día anterior. Luisane eres grande y tu concepto de la amistad lo es aun más. Por cierto, no cejes en tu empeño, la transpirenaica no es sólo un sueño...

Agradecimientos

Celina, eres es mejor ejemplo de lo importante que es estar en el sitio adecuado en el momento adecuado, de cómo unas palabras al viento, si son contestadas, se pueden convertir en un cuento. Un cuento con muchos viajes, con muchas idas y venidas, con muchas aventuras y en definitiva un cuento que no deja de nutrirme y de enseñarme cosas nuevas, y del cual deseo no dejar de ser protagonista. Gracias sobretodo (y el todo es muy grande en este caso) por ser tan generosa conmigo, no deja de asombrarme tu capacidad para cuidarme y hacerme sentir bien, el estrés de final de tesis y la incertidumbre sobre mi futuro se encogen a tu lado.

Mención a parte merece la familia, sin duda. Ese apoyo incondicional, simplemente están ahí y te animan, te hacen sentir que estás haciendo algo importante, incluso hacen el esfuerzo por dejar de decir que estudias amebas y empiezan a manejar en su vocabulario palabras como apoptosis, caspasas, TNF... es impresionante, eso es amor, eso es entrega, esos son los míos!! Pero si vienen hasta de Brasil, a verme! Jeje! Simplemente, sois lo mejor, sois el principal motivo de que yo esté aquí, gracias por apoyarme, por creer en mí y por ser tan majos, es verdad, es que sois muy majos. Fíjate que palabra más chorra para terminar los agradecimientos, pero es lo que me sale oye, os quiero familia!

RESUMEN

La isquemia cerebral es la tercera causa de muerte en los países industrializados y constituye la principal causa de discapacidad en el adulto. A pesar de la enorme importancia socio-económica de esta enfermedad, hasta ahora el único tratamiento aprobado para paliarla es la administración del activador tisular del plasminógeno (tPA), el cual sólo se puede aplicar a un 5% de los pacientes. Por eso, es de vital importancia seguir realizando estudios destinados a profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en esta patología. En los últimos años han aparecido evidencias que apoyan la idea de que en la isquemia cerebral, además de ocurrir una muerte celular necrótica, también se está produciendo una muerte más lenta de tipo apoptótico. Al tratarse la apoptosis de un proceso regulado y que requiere más tiempo para su ejecución, la ventana terapéutica que ofrece es mucho mayor. Tomando como base estas observaciones, el presente trabajo se ha centrado en el estudio de los mecanismos moleculares que subyacen a la isquemia cerebral. Para ello, se utilizó principalmente el modelo de privación de oxígeno y glucosa (OGD) en cultivos celulares mixtos de corteza cerebral de rata.

La primera parte de este trabajo se ha centrado en estudiar el papel del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) en la OGD. Se observó que la OGD provoca una liberación de TNF α que, a través del receptor TNFR1, activa la caspasa-8, la cual es responsable de activar posteriormente la caspasa-3, una proteasa clave en la ejecución de la apoptosis. Además, se observó que inhibiendo el efecto del TNF α liberado o de la caspasa-8, se reduce la muerte inducida por la OGD. Estos datos sugieren que la caspasa-8 tiene un papel clave como caspasa iniciadora de la cascada apoptótica en respuesta a la liberación de TNF α mediada por la OGD.

Por otro lado, se ha estudiado el papel del estrés del retículo endoplasmático (RE) en la OGD y en la hipoxia-isquemia neonatal. En ambos modelos se observó una activación de las vías de IRE1 y PERK, además de la proteólisis de la caspasa-12. Los resultados obtenidos indican también que la activación de esta caspasa en la OGD viene mediada por la calpaína y se debe a la

entrada masiva de calcio mediada por los receptores de NMDA, sugiriendo que esta activación puede ser independiente del estrés del RE.

Finalmente, se ha realizado un análisis masivo de los cambios de la expresión génica inducidos por la OGD, mediante la técnica de microarray. Entre los genes cuyo incremento se detectaba en el microarray, se confirmó el incremento de expresión de varios factores de transcripción que pueden tener un papel clave en la isquemia cerebral, como *atf3*, *egr1*, *cebpδ*, *nr4a1* y *nr4a3*. Además, este estudio ha permitido caracterizar los principales clusters de genes inducidos en la OGD, observándose que muchos de los genes cuyo incremento se había observado en modelos murinos de isquemia cerebral, también se encontraban incrementados en la OGD. Estos resultados ponen de relieve que el modelo de OGD en cultivos mixtos de células corticales es una buena aproximación para el estudio de la isquemia cerebral. Por lo tanto, los resultados obtenidos en los apartados anteriores, los cuales aportan nuevos datos sobre mecanismos moleculares en la OGD, pueden servir de base para su extrapolación a los mecanismos moleculares implicados en la isquemia y por tanto, para diseñar nuevas y mejores herramientas terapéuticas, con el fin de paliar esta enfermedad.

ABSTRACT

Brain ischemia is the third cause of death in industrialized countries and the main reason of adulthood incapacity. Although the great social-economic importance of this disease, the only approved treatment, until now, is the tissue plasminogen activator (tPA). That's why is really important to continue with studies focused in extending the knowledge of the molecular mechanisms involved in this pathology. In the last years mounting evidences supporting the idea that in brain ischemia both necrotic and apoptotic cell death are taking place, had appeared. Since apoptosis is a well regulated process and it takes more time, it offers longer therapeutic window. Taken in account these observations, the present work has been focused in the study of molecular mechanisms underlying brain ischemia. For this purpose, the oxygen and glucose deprivation (OGD) model in mixed cortical cells culture was used.

The first part of this work was focused in studying the role of tumor necrosis factor alpha (TNF α) in OGD. It was shown that OGD evokes TNF α release, and this cytokine activates caspase-8 through TNFR1 receptor. This initiator caspase is responsible of subsequent activation of caspase-3, a key protease in apoptosis execution. Moreover, it was shown that inhibition of TNF α or caspase-8 effect reduces the OGD-induced cell death. These data suggest that caspase-8 has a key role as initiator of apoptotic cascade in response to released TNF α in OGD.

On the other hand, the role of endoplasmatic reticulum (ER) stress was studied in OGD and neonatal hypoxia-ischemia. In both models was shown the activation of IRE1 and PERK pathways, as well as the caspase-12 proteolysis. The obtained results also indicate that the activation of this caspase is mediated by calpain and it is due to the massive entrance of calcium regulated by NMDA receptors, suggesting that this activation is independent of ER stress.

Finally, a massive analysis of genetic expression changes induced by OGD was performed using microarray technology. Among the increased genes detected by microarray, it was confirmed the increase of expression of several transcription factor whose could have a key role in brain ischemia, as *atf3*, *egr1*, *cebp δ* , *nr4a1* y *nr4a3*. Moreover, this study has allowed the characterization of

Abstract

main gene clusters induced by OGD, showing that many of increased genes in murine models of brain ischemia were also increased in OGD. These results demonstrate that the OGD model in mixed cortical cells cultures is an adequate approximation for the study of brain ischemia. So, the obtained results in this work could serve as the basis for extrapolation to the molecular mechanisms involved in brain ischemia, and hence, for designing new and better therapeutic tools.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ABREVIATURAS	VII
I – INTRODUCCIÓN	1
1.- El ictus: Concepto, impacto social y factores de riesgo	3
2.- La isquemia cerebral	5
3.- Modelos experimentales de isquemia cerebral.....	6
3.1- Modelos <i>in vivo</i> de isquemia	7
3.1.1- Modelos de isquemia global	7
3.1.2- Modelos de isquemia focal	8
3.2- Modelos <i>in vitro</i> de isquemia.....	9
4.- La cascada isquémica	11
4.1.- Caída de la energía.....	11
4.2.- Excitotoxicidad	11
4.3.- Aumento del calcio intracelular	12
4.4.- Estrés oxidativo.....	14
4.5.- Inflamación.....	14
5.- Muerte celular isquémica.....	16
5.1- Necrosis	16
5.2- Apoptosis	16
5.3.- Las caspasas: concepto e implicación en la muerte apoptótica por isquemia.....	20
5.4.- Papel de los receptores de muerte en la isquemia	26
5.4.1.- Los receptores de muerte y la vía extrínseca	26
5.4.2- El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), sus receptores y las vías de señalización	27
5.4.3- El TNF α en la isquemia cerebral	32
5.5.- Estrés del retículo endoplasmático: ¿una nueva vía apoptótica?	34
5.5.1.- Mecanismos de acción	34
5.5.2.- Evidencias de estrés del RE en la isquemia cerebral.....	38
6.- Cambios en la expresión génica.....	40
6.1.- Factores de transcripción.....	41
6.2.- Cambios de expresión génica en la isquemia cerebral.....	44

II - OBJETIVOS.....	49
III – MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
1.- Preparación de los cultivos primarios de corteza cerebral.....	55
1.1.- Material biológico	55
1.2.- Reactivos	55
1.3.- Soluciones necesarias para la elaboración del cultivo	55
1.3.1.- Composición de los medios de cultivo y del tampón fosfato	56
1.4.- Disección, obtención y disgregación tisular	56
2.- Deprivación de Oxígeno y Glucosa (OGD).....	57
3.- Modelo de Hipoxia-Isquemia	58
4.- Determinación de la viabilidad neuronal	59
4.1.- Ensayo de reducción de MTT	59
4.2.- Tinción de Hoechst 33258, observación del estado de la cromatina	60
5.- Western Blot.....	61
5.1.- Reactivos y fórmulas de los tampones utilizados.....	61
5.2.- Procesamiento por western blot.....	62
6.- Inmunocitoquímica.....	64
7.- Ensayos de determinación de caspasa-8 activa.....	64
7.1.- Determinación de la presencia de caspasa 8 activa mediante un inhibidor fluoresceinado	64
7.2.- Ensayo de actividad de caspasa 8.....	65
8.- Extracción de RNA y Transcripción Inversa	65
9.- Amplificación de DNA por PCR semicuantitativa.....	66
10.- Amplificación de DNA por PCR cuantitativa (Real Time).....	67
11.- Microarray.....	69
11.1.- Fundamentos moleculares del microarray	69
11.2.- Muestras y plataforma utilizada para el análisis.....	71
11.3.- Análisis de los datos obtenidos del microarray	71
12.- Vectores Lentivirales	72
12.1.- Estructura y aplicaciones experimentales	72
12.2.- Generación de los lentivirus.....	76
12.2.1- Obtención del vector pLVTHM-shRNA	76
12.2.2.- Producción de los lentivirus	80
13.- Análisis estadístico	81

IV - RESULTADOS	85
1-Trabajo 1: Activation of caspase-8 by tumor necrosis factor receptor 1 is necessary for OGD-mediated caspasa-3 activation and apoptosis in cultured cortical cells	87
2-Trabajo 2: Induction of ER stress in response to neonatal cerebral hypoxia-ischemia and oxygen-glucose deprivation of cortical cultures involves the activation of PERK and IRE1 pathways and of caspasa-12.....	123
3-Trabajo 3: Gene expression analysis in mixed cortical cultures subjected to an oxygen and glucose deprivation (OGD).....	161
V - DISCUSIÓN.....	203
1.- Papel del TNF alfa en la OGD	205
2.- Papel del estrés del RE en la OGD	210
3.- Cambios en la expresión génica inducidos en la OGD.....	215
VI - CONCLUSIONES.....	219
VII - BIBLIOGRAFÍA.....	223
VIII - ANEXO	251

ABREVIATURAS

ADAM: *Disintegrin-metalloproteinase*
AMPA: *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*
ALLN: *N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO*
Ara C: *Cytosine arabinofuranosid*
ATF: *Activating transcription factor*
ATP: *Adenosine triphosphate*
Bcl: *B-Cell Lymphoma*
BDNF: *Brain-derived neurotrophic factor*
Bid: *BH3-interacting domain death agonist*
BME: *Basal medium eagle*
BSA: *Bovine serum albumin*
BSS: *Balanced saline solution*
bZIP: *Basic leucine zipper domain*
Ca²⁺: *Calcio*
CARD: *Caspase recruitment domain*
cDNA: *DNA complementario*
CEBP: *CCAAT/enhancer binding protein*
CHOP: *C/EBP homologous protein*
CO₂: *Dioxido de carbono*
CREB: *cAMP-response-element binding protein*
DED: *Death effector domain*
DISC: *Death-inducing signaling complex*
DIV: *Días in vitro*
DMSO: *Dimethylsulfoxide*
DNA: *Deoxyribonucleid acid*
dNTP: *Deoxynucleotides triphosphate*
DTT: *Ditiotreitol*
Edem: *ER degradation-enhancer, mannosidase alpha-like protein*
EDTA: *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*
EGTA: *Ethyl glycol-bis (beta -amino-ethyl-ether) Tetraacetic Acid*
Egr: *Early growth response*
eIF2α: *Eukaryotic initiation factor 2 alpha*
FADD: *Fas-associated death domain*
FCS: *Fetal Calf Serum*
FHS: *Fetal Horse Serum*
GAPDH: *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
GFAP: *Glial Fibrillary Acidic Protein*
GRP: *Glucose-regulated protein*
HI: *Hipoxia-isquemia*
IAP: *Inhibitor of Apoptosis Protein*
ICAD: *Inhibitor of Caspase Activated Deoxyribonuclease*

IEG: *Immediate early gene*
IETD: Z-IETD-FMK
IKK: *IκB kinase*
IL: *Interleukine*
IRE1: *Inositol-requiring kinase*
JNK: *Jun N-terminal kinase*
K⁺: Potasio
KDa: *KiloDaltons*
KO: *Knock out*
MAP2: *Microtubule Associated Protein*
MCAO: *Middle carotid artery occlusion*
mg: Miligramo
MK-801: *Dizocilpine maleate*
mL: Mililitro
mM: Milimol/litro
MnSOD: *Manganese superoxid dismutase*
mRNA: RNA mensajero
MTT: *[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]*
N₂: Nitrogeno
Na⁺: Sodio
NF- κB: *Nuclear factor κB*
NMDA: *N-methyl-D-aspartic acid*
NO: Oxido nítrico
NP-40: *Nonidet P-40*
NR4A: *Nuclear receptor subfamily 4, group A*
O₂: Oxígeno
O₂⁻: Anión superóxido
ONOO⁻: Anión peroxinitrito
OGD: *Oxygen and glucose deprivation*
PARP: *Poly (ADP-ribose) polymerase*
PBS: *Phosphate Buffered Saline*
PCR: *Polimerase Chain Reaction*
PERK: *RNA-activated protein kinase-like ER resident kinase*
PMSF: *Phenylmethylsulfonyl fluor*
PVDF: *Polyvinylidene Difluoride*
RE: Reticulo endoplasmático
RIP: *Receptor-interacting protein*
RNA: *Ribonucleid acid*
RT-PCR: *Reverse transcriptase PCR*
SBTI: *Soybean trypsin inhibitor*
SDS-PAGE: *Sodium dodecyl sulphate – polyacrilamide gel electrophoresis*

TACE: *TNF-alpha converting enzyme*

tBid: *Truncated Bid*

TBS: *Tris Buffered Saline*

TBS-T: *TBS + 0,1% tween*

TNF α : *Tumor necrosis factor alpha*

TNFR: *Tumor necrosis factor receptor*

TRADD: *TNFR1-associated death domain*

TRAF2: *TNF-receptor associated factor 2*

XBP1: *x-box binding protein 1*

μ g: *Microgramo*

μ L: *Microlitro*

μ M: *Micromol/litro*

I – INTRODUCCIÓN

1.- EL ICTUS: CONCEPTO, IMPACTO SOCIAL Y FACTORES DE RIESGO

Un accidente cerebrovascular o ictus, ocurre cuando el suministro de sangre a una parte del cerebro se interrumpe repentinamente por la presencia de un coágulo (tipo isquémico) o cuando un vaso sanguíneo en el cerebro se rompe, derramando sangre en los espacios que rodean a las células cerebrales (tipo hemorrágico). La palabra "ictus" proviene del latín y significa golpe (*stroke* en inglés) palabra que describe el carácter brusco y repentino del proceso. Por tanto, los ictus se pueden dividir en dos grandes grupos, los isquémicos y los hemorrágicos. En el presente trabajo se quiso realizar una aproximación a los procesos isquémicos, que representan un 85% de la totalidad de los accidentes cerebrovasculares. Según la duración del proceso isquémico se diferencia entre un ataque isquémico transitorio (AIT) o un infarto cerebral, en función de si el déficit funcional revierte o no antes de las 24h (Marti-Vilalta *et al.* 1993).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el ictus es, tras las enfermedades cardíacas y el cáncer, la tercera causa de muerte en los países industrializados y constituye la principal causa de discapacidad en el adulto. En España, según datos del Instituto Nacional de Estadística (INE) correspondientes al año 2003, las enfermedades cerebrovasculares son la primera causa de muerte entre las mujeres y la tercera entre los hombres. En los países industrializados las tasas anuales de mortalidad por ictus son estables, pero en los países en vías de desarrollo aumentan cada año; se calcula que de los diez millones de fallecimientos anuales por ictus cuatro millones y medio pertenecen a los países no industrializados.

El ictus tiene una incidencia de 250-400 casos por cada 100.000 habitantes y su mortalidad es del 30%. Solo en España se calcula que alrededor de 84.000 personas cada año sufren algún tipo de accidente cerebrovascular agudo. Quienes sobreviven a un primer ictus presentan un riesgo muy alto de sufrir otro durante los 6 meses posteriores, y el riesgo de recidiva durante los 5 años siguientes es muy elevado. De los supervivientes, dos tercios viven en condiciones razonablemente buenas o con déficits moderados, y un tercio

queda totalmente incapacitado tras el accidente cerebrovascular. Por lo tanto, esta patología disminuye la calidad y la esperanza de vida de los afectados y además supone un notable incremento el gasto sanitario (Farreras & Rozman, 1992; Carod *et al.*, 1999; Montaner *et al.*, 2007). Es este impacto socio-económico el que sitúa la isquemia cerebral en un lugar prioritario dentro de la investigación científica actual.

Los principales factores de riesgo para desarrollar esta patología son: la hipertensión, la hipercolesterolemia, la diabetes y el tabaquismo (Farreras P. & Rozman C., 1992). También cabe destacar que las enfermedades cardíacas pueden también predisponer a sufrir ictus, bien por la incapacidad del corazón de bombear suficiente sangre (fallo cardíaco, hipotensión, hipovolemia) o bien por la formación de trombos que pueden viajar hasta las arterias del cerebro causando su obstrucción (valvulopatías, arritmias).

El ictus se manifiesta con la aparición repentina de uno o más déficits neurológicos; como alteraciones de la sensibilidad y pérdida de fuerza en la mitad del cuerpo, así como de trastornos de la visión y dificultad para entender o hablar. Éstos son síntomas de alarma que pueden ser el primer aviso del cuadro. Es muy importante saber reconocerlos y buscar asistencia sanitaria urgentemente, ya que el pronóstico dependerá en gran medida de la rapidez en la instauración del tratamiento. El único tratamiento de la fase aguda del ictus se basa en el restablecimiento precoz del riego sanguíneo con el uso de agentes fibrinolíticos como el activador tisular del plasminógeno (tPA) (NINDS, 1995). A pesar de eso sólo un 0.5% de los pacientes reciben ese tratamiento, ya que los criterios clínicos de aplicación son muy restrictivos debido al alto riesgo de hemorragia que comporta. Aproximadamente, de los 700 fármacos estudiados que eran eficaces en modelos animales, ninguno hasta el momento se ha probado que sea efectivo en base a los ensayos clínicos de fase III (Kaste 2005). Tan sólo un nuevo capturador de radicales libres, NXY-059, ofreció resultados prometedores en un primer ensayo clínico, pero cuando se realizó un estudio con mayor número de pacientes no se pudo demostrar que presentara efectos beneficiosos (Shuaib *et al.* 2007; Lees *et al.* 2006; Diener *et al.* 2008). Por lo tanto, el estudio de los mecanismos celulares y moleculares

implicados en el proceso de ictus es primordial para tener éxito en el diseño de terapias neuroprotectoras.

2.- LA ISQUEMIA CEREBRAL

La palabra isquemia proviene del griego, iskh- (ἴσχω) 'detener' + -haimíā (αἱμία) 'sangre', así la isquemia cerebral podríamos definirla como la disminución transitoria o permanente del riego sanguíneo del encéfalo, producida por una alteración patológica de la arteria o arterias aferentes al mismo. Dependiendo del origen de la interrupción del flujo sanguíneo podemos distinguir las de tipo trombótico, cuando se forma un coágulo en una de las arterias o vasos que irrigan el cerebro provocando la obstrucción del mismo, y las de tipo embólico, cuando el coágulo se forma en alguna parte del cuerpo y viaja hacia el cerebro a través del torrente sanguíneo.

Si se obturan los vasos que irrigan todo el cerebro, la lesión recibe el nombre de isquemia global. En cambio, si sólo se produce la oclusión de vasos que irrigan una zona determinada, la lesión se denomina isquemia focal (García 1975). La isquemia focal y la isquemia global son situaciones muy diferentes. La isquemia global se caracteriza por ser un proceso más homogéneo en el que la muerte celular es uniforme y ocurre de forma muy selectiva. Por otro lado, la isquemia focal es un proceso mucho más complejo ya que existe una gradación del daño en la zona infartada, y consecuentemente, la activación de diversos mecanismos de muerte (Lipton 1999).

En la isquemia focal, la obstrucción de un vaso sanguíneo produce un gradiente de la lesión que se caracteriza por una isquemia intensa en el centro del territorio vascular afectado y una isquemia menos severa en su periferia. Las células del núcleo isquémico mueren en pocos minutos y la zona presenta un área necrótica evidente. En cambio, en la zona más periférica o penumbra isquémica, las neuronas muestran alteraciones de carácter funcional aunque conservan una mínima actividad metabólica que hace que preserven su integridad estructural durante más tiempo, siguiendo un patrón de apoptosis

(Hossmann 1993) (ver figura 1.1). La progresión de la lesión en la penumbra isquémica depende de muchos factores, principalmente de la circulación colateral que se mantiene. La importancia de la penumbra isquémica radica en la hipótesis de que las neuronas de la periferia del infarto que sobreviven pueden recuperarse al restablecerse el flujo sanguíneo.

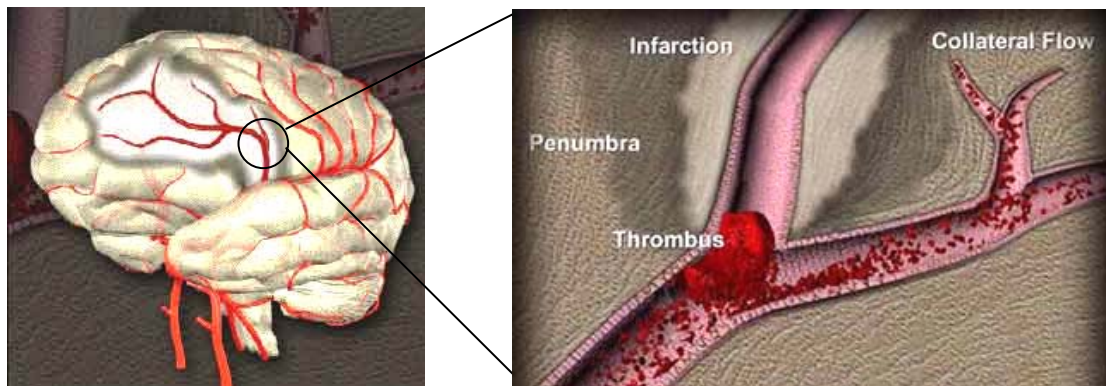


Figura 1. Núcleo y penumbra en una isquemia cerebral. Tras la interrupción del flujo sanguíneo provocado por un trombo se pueden diferenciar dos áreas: el core o núcleo de la lesión (más claro), y la penumbra o región periférica (más oscuro) donde puede llegar circulación colateral. Recurso: www.strokecenter.org.

3.- MODELOS EXPERIMENTALES DE ISQUEMIA CEREBRAL

Gran parte del conocimiento actual sobre la patología cerebrovascular se debe a estudios experimentales que han contribuido al mejor entendimiento de los mecanismos fisiopatológicos que subyacen al desarrollo de esta enfermedad. Además, en el estudio de la isquemia cerebral humana, la necesidad de recurrir a los modelos experimentales ha sido, y es, especialmente relevante debido al carácter agudo de la enfermedad, a la rapidez a la que se produce el daño cerebral y, obviamente, a la limitada accesibilidad al cerebro humano.

Los modelos experimentales pueden dividirse en dos categorías: modelos *in vivo* que se llevan a cabo con animales y permiten, bajo condiciones muy controladas, reproducir la patología humana; y los modelos *in vitro* a nivel celular o tisular. Los modelos *in vivo* permiten un estudio más general, aunque más próximo de la isquemia cerebral humana. Por su parte, los modelos *in vitro*

permiten efectuar un estudio más a nivel celular y molecular de esta patología. A continuación se describirán brevemente los modelos más utilizados para investigar los mecanismos relacionados con la isquemia cerebral.

3.1- Modelos *in vivo* de isquemia

El uso de animales pequeños para el estudio de la isquemia presenta claras ventajas frente al uso de animales grandes, como un menor coste económico, una mayor manejabilidad y una mayor aceptabilidad desde el punto de vista ético. Los roedores son los más utilizados, entre ellos, la rata presenta la ventaja de tener un mayor parecido en la anatomía cerebrovascular al humano que el ratón (Mhairi, I 1992), pero este último permite utilizar animales modificados genéticamente siendo ésta una herramienta muy válida para estudiar los mecanismos implicados en la isquemia (Chen *et al.* 2005;Fujimura *et al.* 1999).

3.1.1- Modelos de isquemia global

Los modelos de isquemia cerebral global están basados en la oclusión de las grandes arterias que irrigan el encéfalo. Estos modelos reproducen el daño cerebral causado por un paro cardíaco o un colapso vascular sistémico en humanos y no por un accidente cerebrovascular agudo.

Oclusión de 4 vasos: Se produce la interrupción completa del flujo sanguíneo en el encéfalo por oclusión de las arterias vertebrales y ambas carótidas comunes (Pulsinelli and Buchan 1988;Pulsinelli and Brierley 1979).

Oclusión de 2 vasos: En este caso sólo se ocluyen ambas carótidas comunes en combinación con una hipotensión sistémica y el flujo cerebral se reduce parcialmente, pero de forma suficiente como para producir una lesión selectiva en el hipocampo (más severamente en las neuronas piramidales de la región CA1), en el caudoputamen y en el neocortex (McBean and Kelly 1998;Smith *et al.* 1984a;Smith *et al.* 1984b).

3.1.2- Modelos de isquemia focal

Los modelos de isquemia focal reproducen con más precisión los accidentes tromboembólicos intracraneales que causan la mayor parte de ictus isquémicos en humanos. Se inducen por la oclusión permanente o transitoria de una arteria cerebral específica, que suele ser la arteria cerebral media (ACM) para tener una mayor relevancia clínica (del Zoppo *et al.* 1992).

Oclusión intraluminal de la ACM: Hasta el momento es el modelo más utilizado en ratas y ratones, ya que es menos invasivo que otros y el área infartada es bastante reproducible. Este modelo permite efectuar una oclusión proximal de la ACM de forma reversible y sin craneotomía: se introduce una sutura de nylon a través de la arteria carótida interna, la cual llega hasta el origen de la ACM (Longa *et al.* 1989). Al mismo tiempo se practica la ligadura o coagulación de las ramas de la arteria carótida externa y las ramas extracraneales de la arteria carótida interna. De esta manera, el modelo permite efectuar la isquemia de forma cómoda, tanto en modelos permanentes de oclusión de la ACM, dejando la sutura en el interior de la arteria, como en modelos transitorios, retirándola y permitiendo la reperusión en el territorio de la ACM.

Oclusión embólica: Aproximadamente el 80% de los ictus isquémicos en humanos se deben a una oclusión tromboembólica, por este motivo resulta interesante reproducir este tipo de oclusión en el laboratorio. Otras ventajas que presenta este modelo son la potencialidad que tiene para probar agentes trombolíticos (Overgaard 1994), poder evaluar la lesión isquémica después de la trombólisis (Brinker *et al.* 1999) y poder estudiar combinación de terapias, como por ejemplo agentes trombolíticos y fármacos neuroprotectores (Zhang *et al.* 2004). Técnicamente, la oclusión puede practicarse por generación de un coágulo rico en plaquetas (modelo trombótico) o rico en fibrina (modelo embólico).

Además de los modelos mencionados, que son los más utilizados, también existen otros como la trombosis fotoquímica y la isquemia inducida por endotelina-1 (Watson *et al.* 1985; Welsh *et al.* 1987; Robinson *et al.* 1990).

Isquemia-hipoxia neonatal: Este modelo pretende mimetizar lo que ocurre en la hipoxia perinatal. Para ello se utilizan animales neonatos, generalmente ratas (alrededor de 9 días), y se les somete a una isquemia (focal o global) y posteriormente se emplaza al animal a un cámara de hipoxia donde se le deja un tiempo (7-10% O₂ 45-70 minutos, aproximadamente) antes de devolverlo a las condiciones ambientales. Este modelo comparte muchos mecanismos comunes con los aplicados en adultos aunque tiene sus peculiaridades, ya que el cerebro está aun en desarrollo.

3.2- Modelos *in vitro* de isquemia

Los modelos *in vitro* son los que permiten estudiar la patología fuera de un organismo vivo habiendo sido reproducidas parcialmente las condiciones *in vivo*. Se pueden elaborar estudios a nivel celular o tisular. En ambos casos se ejerce un control total sobre el entorno fisicoquímico (pH, temperatura, presión osmótica, presión de O₂ y de CO₂).

El estudio de la isquemia cerebral a nivel celular o tisular a través de cultivos *in vitro* permite investigar sobre funciones fundamentales (diferenciación, proliferación y muerte celular), y además permite realizar ensayos de toxicidad farmacológica o estudios de expresión génica y proteica en un ambiente isquémico. Por lo tanto, los modelos de estudio *in vitro* son una herramienta muy poderosa para realizar estudios a nivel celular y molecular, permitiendo tener una idea más clara de las cascadas de señalización que ocurren tras una isquemia. Hay que tener en cuenta siempre que estos datos se han de validar en modelos *in vivo* para que tengan una mayor relevancia clínica.

Modelo de excitotoxicidad: Algunos de los modelos se centran únicamente en reproducir el fenómeno de excitotoxicidad provocado por la isquemia, y para

ello se tratan los cultivos con agonistas de los receptores del NMDA, como el glutamato y el NMDA.

Isquemia química: Este modelo trata de simular la hipoxia mediante la adición de moléculas como la cianida (KCN), que inhibe la citocromo C oxidasa, o la oligomicina, que inhibe la ATP sintasa, para generar un ambiente hipóxico. Estos tratamientos se pueden combinar además con la inducción de hipoglucemia, utilizando un medio bajo en glucosa.

Modelo de privación de oxígeno y glucosa (OGD): Es el modelo *in vitro* más utilizado. Los efectos de la patología a nivel tisular o celular se inducen o se simulan por privación de oxígeno y glucosa (OGD, del inglés *oxygen and glucose deprivation*) (Goldberg and Choi 1993). Para inducir la hipoxia, los cultivos se incuban en una cámara anaeróbica a 37°C con una atmosfera del 95% N₂ y 5% CO₂ o el 90% N₂, 5% CO₂ y 5% H₂ y, además, se cambia el medio por un tampón sin glucosa ni suplementos (por ej. HBSS o Krebs). Debe elaborarse también un grupo control en situación de normoxia y con medio tampón normal.

Este modelo se puede realizar en cultivos tisulares u organotípicos o en cultivos celulares. Los cultivos organotípicos presentan la ventaja de mantener una organización tridimensional más fisiológica mientras que los cultivos celulares presentan otras ventajas, como permitir un control más riguroso de las condiciones, una mayor accesibilidad de los fármacos y, además, el seguimiento de cada tipo celular es más sencillo. Los cultivos primarios, que se obtienen directamente de un organismo vivo por disgregación del tejido cerebral, son los cultivos celulares que más se aproximan a las condiciones reales. En especial los cultivos mixtos de células corticales, donde crecen conjuntamente neuronas, astrocitos y microglía, permiten recrear de forma más parecida el entorno celular fisiológico. Es por ello que elegimos utilizar el modelo de OGD en estos cultivos.

4.- LA CASCADA ISQUÉMICA

La interrupción del flujo sanguíneo en el cerebro provoca una secuencia de procesos patofisiológicos en el espacio y en el tiempo que en conjunto recibe el nombre de cascada isquémica. Estos procesos siguen un orden, aunque se ha demostrado que muchos de ellos se solapan. A continuación se analizarán los principales fenómenos que, a nivel celular, son desencadenados por la isquemia.

4.1.- Caída de la energía

La bajada brusca de la concentración de glucosa y de la presión parcial del oxígeno, en la zona afectada por la isquemia, provoca la inhibición de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y, en consecuencia, el bloqueo de la fosforilación oxidativa. La pérdida del gradiente electroquímico mitocondrial provoca una depleción de energía (ATP) que afecta al correcto funcionamiento de los procesos celulares activos dependientes de ATP (Katsura *et al.* 1993). Entre ellos, se observa un descenso en la actividad de las bombas Na^+/K^+ , lo que provoca una entrada de Na^+ al interior de la célula y una salida masiva de K^+ al espacio extracelular que desencadena una importante despolarización de la membrana. Este proceso se denomina despolarización anóxica (Katsura *et al.* 1994). Además, esta depleción de energía provoca la utilización de la glucosa por la vía anaeróbica lo cual hace que se acumule lactato y se acidifique el medio (Rehncrona 1985).

4.2.- Excitotoxicidad

La despolarización anóxica desencadena una liberación de vesículas de neurotransmisores, entre ellos el glutamato, desde las neuronas presinápticas al espacio extracelular, en una fase muy temprana de la isquemia. En condiciones normales los transportadores de glutamato transportan el aminoácido excitatorio al interior de la célula, pero la despolarización de la membrana provoca una reversión de su función y, por lo tanto, contribuye a que la concentración de glutamato en el espacio extracelular aumente hasta

niveles tóxicos (Benveniste *et al.* 1984; Nicholls and Attwell 1990; Rossi *et al.* 2000). Esta liberación de glutamato al espacio extracelular provoca una sobreactivación tóxica de sus receptores ionotrópicos (NMDA y AMPA-kainato). El efecto tóxico del glutamato y otros neurotransmisores sobre las neuronas se denomina excitotoxicidad. Los mecanismos de excitotoxicidad pueden provocar necrosis pero también pueden iniciar algunos procesos moleculares que conducen a la apoptosis (Dirnagl *et al.* 1999). Como consecuencia de la activación reiterada de los receptores glutamatérgicos se desencadena una entrada masiva de Na^+ y Ca^{2+} . Para contrarrestar esta entrada catiónica hay una entrada de Cl^- y agua, produciéndose un edema cerebral (Dirnagl *et al.* 1999). La presión que puede ejercer el edema dentro de la cavidad rígida intracraneal puede restringir el flujo sanguíneo de otras zonas circundantes y generara así una isquemia secundaria (Siegel GJ *et al.*, 1999). A diferencia de lo que ocurre en el núcleo de la lesión, en la zona de penumbra las neuronas son capaces de repolarizarse tras la liberación inicial de glutamato y K^+ , pero esto supone un gasto energético. Como los niveles de glutamato y K^+ en el medio extracelular siguen altos, las neuronas vuelven a despolarizarse. Estas repetitivas despolarizaciones también se denominan despolarizaciones peri-infarto (Hossmann 1996) (ver figura 3), y se ha demostrado que cuantas más despolarizaciones hay mayor es el área del infarto (Mies *et al.* 1993).

4.3.- Aumento del calcio intracelular

El aumento de Ca^{2+} intracelular a nivel citosólico se produce a través de los receptores NMDA y AMPA, de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y del funcionamiento reverso del intercambiador de Na^+ - Ca^{2+} . Adicionalmente, la liberación desde orgánulos como el retículo endoplasmático y la mitocondria podría contribuir también al aumento intracelular de Ca^{2+} . También se ha propuesto que la acidificación del medio que ocurre en la isquemia puede contribuir al aumento del calcio intracelular, ya que descenso del pH (hasta 6,5) desplaza el calcio de su unión a proteínas (Folbergrova *et al.* 1990). El calcio provoca una activación enzimática masiva, ya que bastantes enzimas son dependientes de Ca^{2+} , como la proteína quinasa C (PKC), fosfolipasa A_2 (PLA_2), fosfolipasa C (PLC), ciclooxigenasa, xantina-oxidasa, oxido nítrico sintasa

(NOS) dependiente de calcio, endonucleasas y diversas proteasas. Dentro de las proteasas activadas cabe destacar la familia de las calpaínas, que son unas cisteína-endopeptidasas citosólicas activadas por calcio, y que se ha descrito que contribuyen a la muerte que tiene lugar en la isquemia (Croall and DeMartino 1991; Saido *et al.* 1994). Por otro lado, la sobreactivación de las fosfolipasas provoca la hidrólisis de los lípidos de membrana perdiéndose así la integridad de la membrana celular y liberándose además enzimas como la PLA₂ y la NOS, que producen radicales libres.

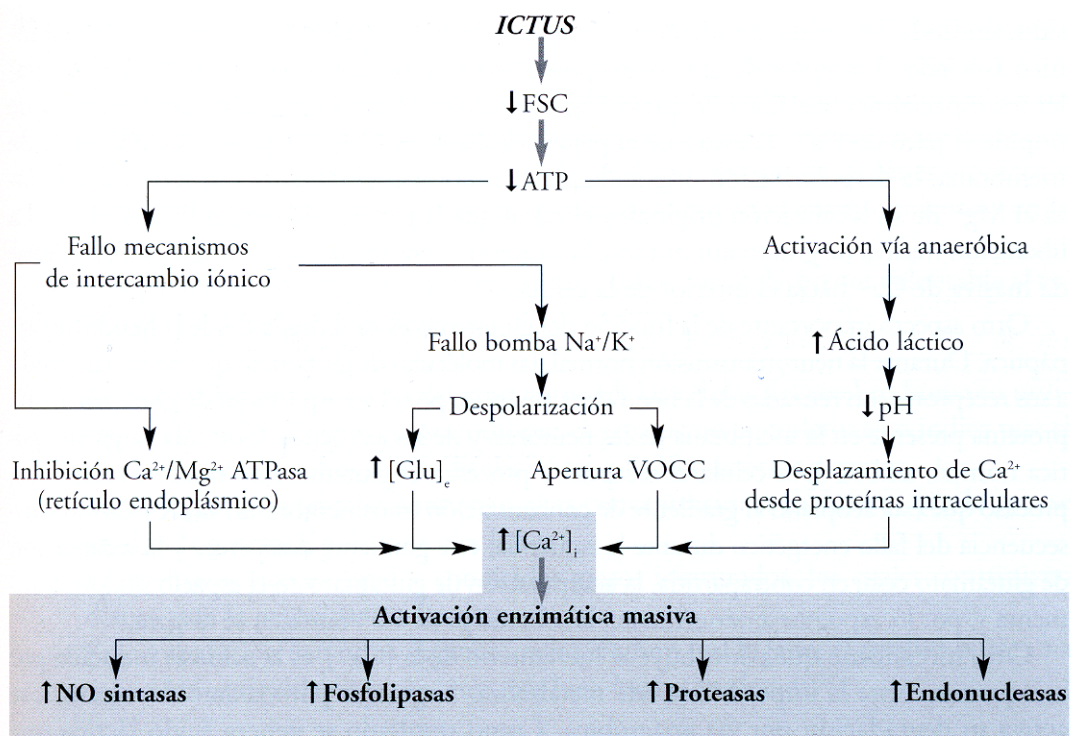


Figura 2 Principales procesos que ocurren después de la caída de la energía. La caída de energía provoca una pérdida de los mecanismos que controlan la homeostasis iónica que junto a la acidificación del medio provocan un gran aumento del Ca²⁺ intracelular. Este aumento provoca una activación enzimática masiva (Extraído de Montaner *et al.*, 2007. Capítulo 1 Torregrosa *et al.*).

4.4.- Estrés oxidativo

Los radicales libres y las especies reactivas del oxígeno (ROS) están implicados en el funcionamiento normal de las células, entre ellos destacamos el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito ($ONOO^-$). En condiciones fisiológicas, los radicales libres y las ROS son eliminados tanto por mecanismos enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) como por mecanismos no enzimáticos (vitaminas E y C y glutatión) (Halliwell and Gutteridge 1985). Sin embargo, la exposición de las células a concentraciones anormalmente elevadas de radicales libres y ROS resulta nociva; es lo que se conoce como estrés oxidativo. Los radicales libres y ROS se producen debido al metabolismo oxidativo de los organismos aeróbicos, principalmente a nivel de las mitocondrias (Schuchmann and Heinemann 2000). Entre las principales vías de formación de radicales libres y ROS, que actúan a través de mecanismos dependientes de Ca^{2+} , están las mediadas por la PLA_2 , la xantin-oxidasa y la NOS. Tras la isquemia, y especialmente tras la reperfusión, se produce estrés oxidativo, provocando la peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y daño estructural a nivel de DNA. Los ROS generados además sirven como importantes moléculas de señalización que provocan inflamación y apoptosis (Dirnagl *et al.* 1999) (ver figura 3).

4.5.- Inflamación

Inmediatamente después del inicio de la isquemia se desencadena una cascada inflamatoria que afecta tanto al parénquima del cerebro como a la pared de los vasos. Las células endoteliales dañadas por radicales libres y ROS promueven la expresión de múltiples elementos como los receptores de adhesión leucocitaria (selectinas P, E y L) y las moléculas de adhesión intracelular (ICAMs). Producto de esta expresión de moléculas de adhesión se produce una infiltración leucocitaria en el parénquima cerebral, y conjuntamente se produce la activación de la microglía (macrófagos residentes en el cerebro) y de los astrocitos, que se vuelven reactivos en un fenómeno denominado gliosis reactiva (ver figura 3). Estas células junto con las neuronas

son responsables de la síntesis de mediadores inflamatorios, como quimioquinas (MCP1) y citoquinas (IL1 β , IL6 y TNF α) y otras sustancias tóxicas.

Actualmente existe debate en torno a los beneficios y perjuicios de la respuesta inflamatoria en la isquemia. Hay evidencias experimentales que indican que ésta contribuye al daño, como por ejemplo, que los ratones KO para ICAM1 presentan un menor área de infarto tras la isquemia (Connolly, Jr. *et al.* 1996). Pero también existen otras pruebas que hacen pensar que la respuesta inflamatoria puede tener un papel beneficioso. Por ejemplo, en ratones KO para los receptores de TNF se observó que el infarto era mayor tras la isquemia (Bruce *et al.* 1996). Como veremos más adelante, el papel que juega el TNF α es especialmente controvertido.

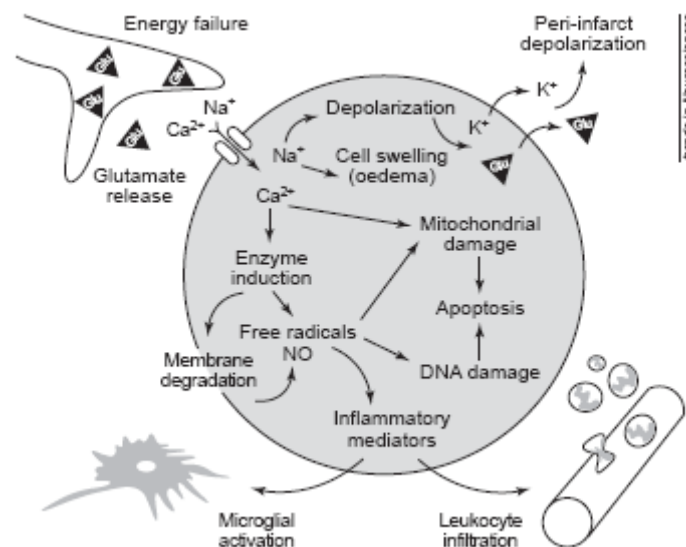


Figura 3. Esquema simplificado de los mecanismos patofisiológicos en la isquemia cerebral. La caída de energía provoca la despolarización de las neuronas. Debido a la activación de los receptores de glutamato se da un incremento de concentración intracelular de Ca²⁺, Na⁺, Cl⁻ y la salida de K⁺. Esta salida junto a la difusión del glutamato acaba provocando las despolarizaciones peri-infarto. El agua entra en la célula por un proceso de osmosis provocando un edema. El aumento intracelular de Ca²⁺ provoca una sobreactivación enzimática, fruto de este proceso se generan radicales libres, que dañan las membranas y el DNA pudiendo desencadenar la apoptosis. La formación de radicales libres también provoca la liberación de mediadores inflamatorios, que activan la microglía y permiten la infiltración leucocitaria mediante la up-regulación de moléculas de adhesión del endotelio. (Extraído de Dirnagl *et al.*, 1999).

5.- MUERTE CELULAR ISQUÉMICA

Los procesos que ocurren en la cascada isquémica, como la excitotoxicidad, la alteración de la homeostasis del calcio, el estrés oxidativo o la inflamación, pueden desembocar en una muerte celular. Hasta hace poco más de 10 años se creía que la muerte que tenía lugar en la isquemia era de tipo necrótico, pero numerosas evidencias pusieron de relieve que también estaba ocurriendo un proceso apoptótico (revisado en (Choi 1996) y (Lipton 1999)). De hecho, la muerte celular en la isquemia focal tiene un componente necrótico muy importante, aunque en la periferia del núcleo isquémico aparecen células con morfología apoptótica (MacManus *et al.* 1994). Los factores que pueden determinar la prevalencia de la necrosis o la apoptosis son la intensidad y duración de la isquemia, el grado de madurez neuronal, la concentración de calcio intracelular y los niveles de ATP intracelulares (Lipton 1999).

5.1- Necrosis

La necrosis se produce en el cerebro de manera indiscriminada y desordenada como consecuencia de la pérdida de homeostasis celular secundaria a la anoxia, la interrupción brusca de nutrientes o la exposición a condiciones físicas o químicas extremas. Morfológicamente, la célula necrótica se identifica principalmente porque ha perdido la integridad de la membrana plasmática y mantiene la membrana nuclear (Brown and Brierley 1972). Habitualmente afecta a gran número de células, especialmente en el núcleo del infarto. Debido a la pérdida de homeostasis iónica hay una entrada de agua que provoca que las células se hinchen. Finalmente estas se rompen liberando el contenido citoplasmático al tejido circundante, este vertido celular contribuye a que se produzca una reacción inflamatoria.

5.2- Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada en el que tiene lugar un proceso activo de síntesis *de novo* de proteínas (Kerr *et al.* 1972). Los componentes necesarios para la señalización apoptótica están codificados

genéticamente, y permanecen inactivos hasta que determinados estímulos deletéreos los activan. Durante la isquemia, la apoptosis se desencadena como respuesta a diferentes estímulos como el glutamato, el calcio, radicales libres, citoquinas, etc. La célula sufre entonces una serie de cambios morfológicos y bioquímicos a través de diferentes etapas que finalizan con la degradación del DNA (fragmentación internucleosomal) y de la infraestructura celular. La neurona apoptótica presenta unas características morfológicas que la diferencian de la neurona necrótica: el citoplasma se encoge, la cromatina se condensa y aparecen los llamados cuerpos apoptóticos (ver figura 4).

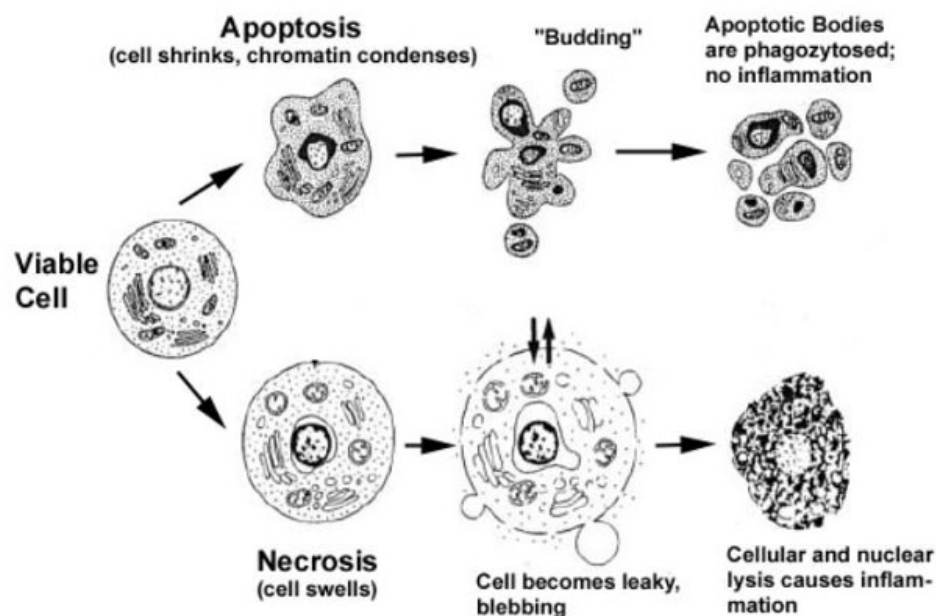


Figura 4. Características de la muerte necrótica y apoptótica. La apoptosis incluye reducción del volumen celular, condensación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos que serán fagocitados sin provocar un proceso inflamatorio. La célula necrótica se hincha, presenta agujeros en la membrana y finalmente se rompe liberando su contenido, causando así inflamación (Extraído de Van Cruchten, 2002).

La aparición de muchas de estas características es debida a la acción de una familia de cisteína-proteasas, las caspasas (ver siguiente apartado). A diferencia de la célula necrótica, la célula apoptótica mantiene intacta la membrana plasmática hasta las últimas etapas de la muerte. Se podría interpretar que el organismo toma la determinación de que algunas células se autodestruyan para evitar que viertan su contenido intracelular y de esta

manera minimizar el daño. Este fenómeno se da principalmente en la penumbra isquémica, donde aun se mantiene la integridad celular y existe energía disponible. El hecho de que este tipo de muerte neuronal sea más lenta permite que la ventana terapéutica sea más amplia y por ello se están estudiando fármacos que bloqueen la vía apoptótica activada en la isquemia cerebral.

A pesar de que clásicamente se han presentado a la necrosis y apoptosis como dos procesos con claras diferencias morfológicas y bioquímicas, en los últimos años han aparecido evidencias de que algunas células tras la isquemia presentan morfologías intermedias, e incluso se han encontrado mecanismos moleculares que sólo se atribuían a la apoptosis, jugando un papel en la muerte necrótica (Moroni *et al.* 2001; Cole and Perez-Polo 2002; Fujikawa *et al.* 2002; Hou and MacManus 2002). En el 2003, Jaeschke y Lemasters acuñaron un nuevo término denominado necrapoptosis para definir el fenotipo intermedio que encontraron en células hepáticas tras la isquemia (Jaeschke and Lemasters 2003). Además, existen trabajos que vinculan los dos tipos de muerte (Schwab *et al.* 2002). Por lo tanto, a la hora de estudiar alguno de estos procesos no se debe olvidar que no se trata de compartimentos estancos y que pueden existir situaciones intermedias y/o que puede haber una interrelación entre ambos procesos.

Cabe destacar también que, aunque el término de muerte celular programada (MCP, muerte celular que viene mediada por programas moleculares intrínsecos a las células) se ha utilizado frecuentemente como equivalente de apoptosis, existen otras formas de MCP no apoptóticas. En este sentido, existen al menos tres formas de MCP: el tipo I, también conocido como MCP nuclear o apoptosis; el tipo II, también denominado autofagia; o el tipo III, que se conoce también como MCP citoplasmática (Bredesen *et al.* 2006). Más recientemente, Dgterev y Yuan han propuesto tres vías de muerte programada independientes de la apoptosis, la autofagia (o tipo II, común), la necroptosis y la muerte mediada por PARP1 (ver figura 5).

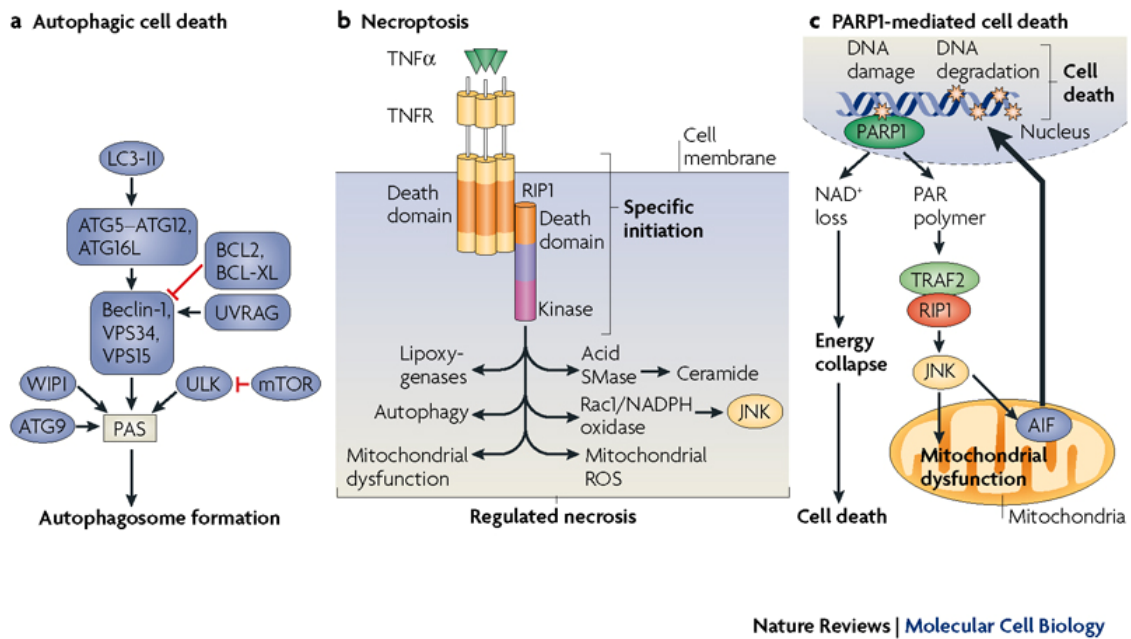


Figura 5. Tres vías de muerte programada celular no apoptótica. a. Autofagia, la activación de esta vía conlleva la intervención de numerosas proteínas que acaban formando el autofagosoma. b. Necroptosis, activación de una necrosis programada por un ligando de muerte. c. Muerte dependiente de PARP, la sobreactivación de PARP provoca muerte, ésta podría estar mediada por la depleción de NAD⁺ o la translocación de AIF (Extraído de Dgterev & Yuan, 2008).

En la autofagia se observa un reordenamiento de las membranas subcelulares que dan lugar a una masiva vacuolización del citoplasma sin que se aprecie condensación de la cromatina. Estas vacuolas, denominadas autofagosomas, tienen una doble membrana que contiene orgánulos citoplasmáticos en degeneración o agregados de proteínas mal plegadas, y se fusionan con los lisosomas resultando en la degradación del contenido del autofagosoma.

En los últimos años, han aparecido trabajos que demuestran la existencia de un incremento de la autofagia tanto en condiciones de hipoxia (Adhami *et al.* 2006;Zhu *et al.* 2005) como de isquemia cerebral (Wen *et al.* 2008;Rami *et al.* 2008). Sin embargo, el papel que juega la autofagia en estos procesos sigue sin estar claro ya que, dependiendo de las circunstancias, parece que puede tener un papel protector (Carlioni *et al.* 2008) o puede acabar desembocando en la muerte celular (Codogno and Meijer 0 AD).

La necroptosis representa un tipo de necrosis programada. Su descubrimiento vino dado por estudios que observaron que estímulos clásicos de apoptosis como el de los ligandos de los receptores de muerte podían provocar una muerte no apoptótica (por criterios morfológicos) cuando la apoptosis se inhibía con inhibidores de caspasas (Khwaja and Tatton 1999;Matsumura *et al.* 2000;Vercammen *et al.* 1998a;Vercammen *et al.* 1998b) o por mutaciones en la caspasa-8 o en la proteína FADD (Chan *et al.* 2003;Degterev *et al.* 2005;Kawahara *et al.* 1998;Holler *et al.* 2000). Por último, se ha observado que una sobreactivación de PARP puede mediar la muerte celular, en algunos casos a través de TRAF2-RIP activando a JNK y permitiendo la salida de AIF de la mitocondria.

Nuestro estudio se ha centrado en ampliar el conocimiento sobre el proceso apoptótico derivado de la isquemia cerebral y, por lo tanto, presentaremos una ampliación de las vías relacionadas con este proceso a continuación.

5.3.- Las caspasas: concepto e implicación en la muerte apoptótica por isquemia

El nombre de caspasa proviene del inglés, *caspase* o *cystein-dependent aspartate-specific protease* (Alnemri *et al.* 1996). Son unas proteasas altamente conservadas a lo largo de la evolución (desde el nemátodo, pasando por insectos hasta humanos). Estas proteínas contienen tres dominios funcionales: un prodominio N-terminal, una subunidad mayor que contiene el centro activo formado por una cisteína dentro de un motivo altamente conservado, QACXG, y una subunidad pequeña en el extremo C-terminal (Stennicke and Salvesen 1998). Hasta el momento se han identificado 14 caspasas diferentes en mamíferos (Van de *et al.* 1998), formadas por dos subfamilias biológicas distintas: una de ellas participa en el procesamiento de citoquinas proinflamatorias, y la otra es necesaria para iniciar y ejecutar la respuesta apoptótica durante la muerte celular programada (ver figura 6).

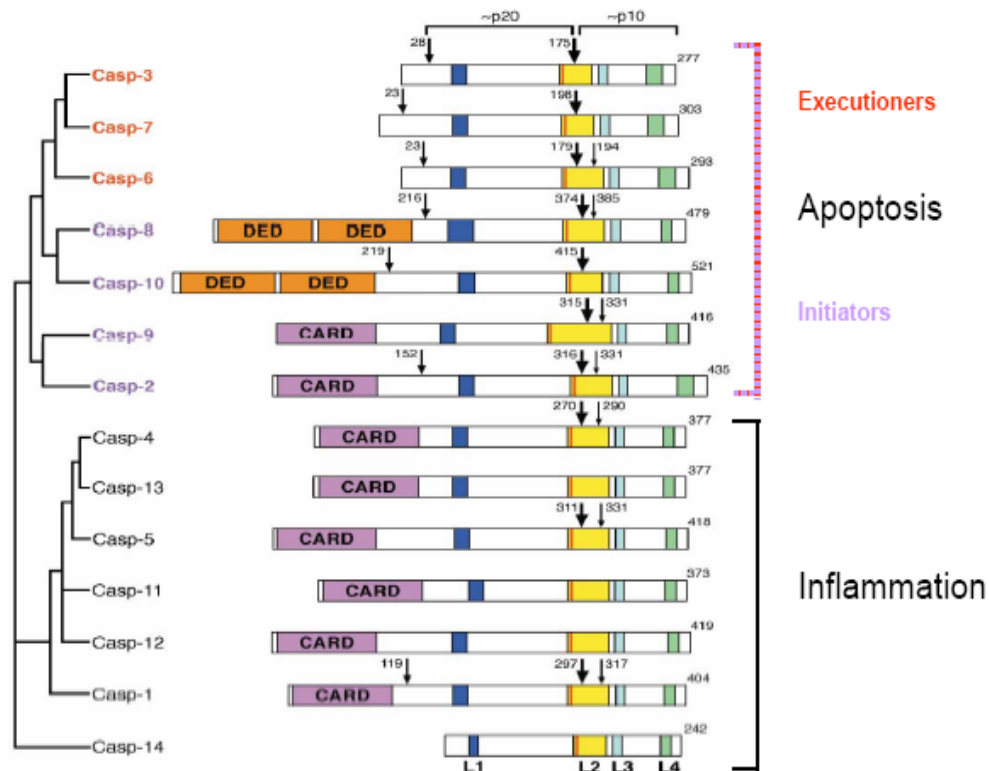


Figura 6. La familia de las caspasas. Representación del árbol filogenético de las caspasas de mamífero con la división de las dos subfamilias biológicas. Dentro de la subfamilia de la respuesta apoptótica se clasifican en caspasas iniciadoras y ejecutoras (Extraído de Shi et al 2002).

Para activar el latente programa apoptótico en respuesta a diferentes señales de muerte, las caspasas se sintetizan en forma de zimógenos (procaspasa), estado en el cual se mantienen inactivas. Estos zimógenos están compuestos por tres dominios: un prodominio N-terminal, y los dominios p20 y p10 (ver figura 7) que formarán el enzima maduro. En la mayoría de los casos examinados, el enzima maduro está formado por un heterotetrámero que contiene dos p20/p10 y dos centros activos (Hengartner 2000; Earnshaw *et al.* 1999). Existen tres mecanismos de activación de las caspasas: la activación por otra caspasa, la activación inducida por proximidad y la activación dependiente de la asociación con una subunidad reguladora. La activación por otras caspasas se realiza mediante la proteólisis de zimógenos entre los dominios p20 y p10 y también habitualmente entre el prodominio y el dominio p20 (ver figura 7a). Esta estrategia de activación se utiliza ampliamente por las células para la activación de las tres procaspasas de prodominio corto,

caspasa-3, -6 y -7. La activación de caspasas inducida por proximidad propone que, bajo condiciones de elevado número de moléculas de procaspasa reclutadas debido a un estímulo concreto y en gran concentración local de zimógeno, la actividad proteasa intrínseca de la proteína es suficiente para permitir que varias moléculas de proenzima se proteoliten mutuamente activándose unas a otras (ver figura 7b). Este mecanismo es el que se propone para la activación de la caspasa-8 (Muzio *et al.* 1998), -2 y la caspasa de nemátodo CED-3 (Yang *et al.* 1998).

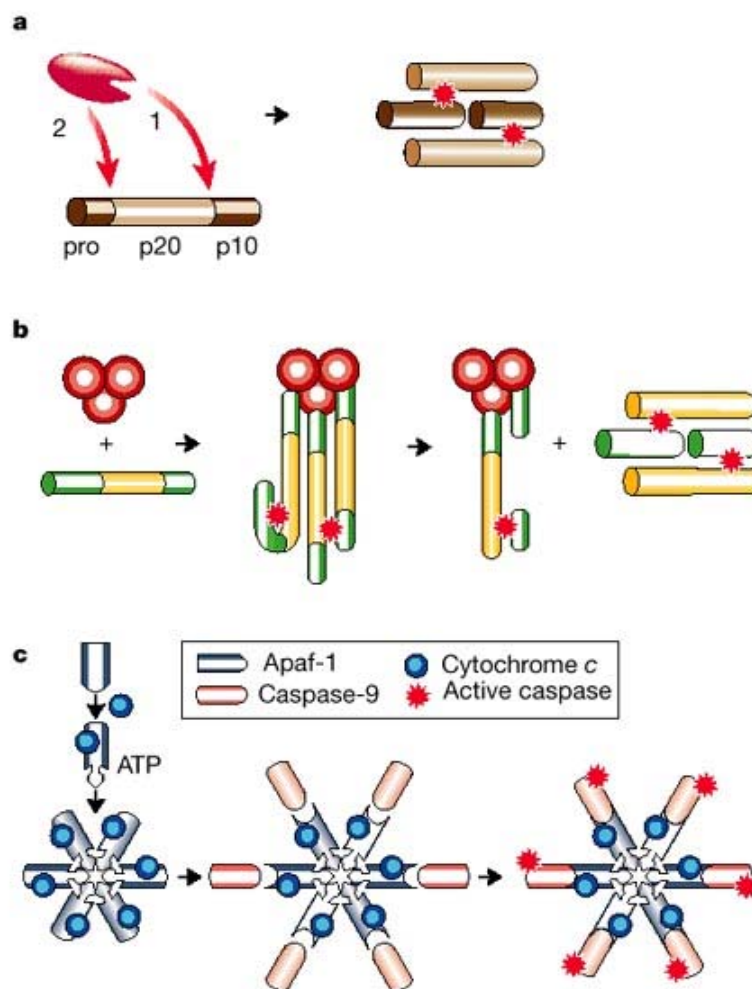


Figura 7. Diferentes mecanismos de activación de las caspasas a. Activación por corte proteolítico de una caspasa que se encuentra *upstream* en la cascada de activación. b. Activación inducida por proximidad. c. Activación por asociación a una subunidad reguladora, formación del apoptosoma (Extraído de Hengartner, 2000).

La activación dependiente de asociación con una subunidad reguladora es el sistema de activación más complejo y es el utilizado por la caspasa-9. A diferencia de las anteriores caspasas, el procesamiento de la procaspasa-9 tiene una menor incidencia en la actividad catalítica del enzima. La clave está en el requerimiento de la asociación con un cofactor proteico, Apaf1. Apaf1, junto con el citocromo c (Li *et al.* 1997), y con la procaspasa-9 forman un holoenzima llamado apoptosoma que, en presencia de ATP, permite la activación de la caspasa (ver figura 7c). Este holoenzima es un gran complejo proteico que puede contener proteínas adicionales formando lo que se denomina el complejo microapoptosoma (Cain *et al.* 1999).

Atendiendo a la función desarrollada en la apoptosis, las caspasas se pueden clasificar en dos grupos: las iniciadoras, aquellas que inician la cascada de activación de las caspasas y que tienen como función activar a otras caspasas, como es el caso de la caspasa-8, -9, -10 y -2 y las caspasas ejecutoras, aquellas que son activadas por las iniciadoras y que actúan directa y selectivamente sobre una serie de sustratos, como por ejemplo la caspasa-3, -7 y -6. En resumen, las caspasas efectoras normalmente son activadas proteolíticamente por caspasas situadas *upstream* en la cascada de activación, mientras que las iniciadoras son activadas a través de interacciones proteína-proteína reguladora.

Cabe destacar el caso de la caspasa-12, que inicialmente fue descrita por su implicación en procesos inflamatorios y actualmente se le atribuye un papel importante en los procesos apoptóticos iniciados por estrés del retículo endoplasmático (Nakagawa *et al.* 2000; Nakagawa and Yuan 2000; Rao *et al.* 2004), el cual puede ser causado por una acumulación de proteínas mal plegadas o una desregulación de la homeostasis del calcio (Kaufman 1999; Ferri and Kroemer 2001).

La importancia de estas proteasas en el proceso de apoptosis radica en que, como se mencionó antes, proteolizan de forma selectiva sustratos, muchos de ellos vitales para la supervivencia de la célula. Entre los sustratos se encuentran proteínas implicadas en la estructura del citoesqueleto como la

fodrina y la gelsolina (Kothakota *et al.* 1997), y en la estructura de la envuelta nuclear (Rao *et al.* 1996; Buendia *et al.* 1999). El corte de las mismas provoca el fenotipo de encogimiento citoplasmático y de condensación nuclear, respectivamente. Otro de los sustratos es el inhibidor de la desoxiribonucleasa activada por caspasas (ICAD) (Liu *et al.* 1997; Sakahira *et al.* 1998; Enari *et al.* 1998). La proteólisis de este inhibidor permite la activación de la subunidad catalítica (CAD) que provoca la típica fragmentación internucleosomal que se observa en los procesos apoptóticos. Las caspasas también cortan proteínas implicadas en el correcto metabolismo y reparación del DNA, como por ejemplo la Poli ADP-ribosa polimerasa (PARP) (D'Amours *et al.* 2001; Benchoua *et al.* 2001).

Además de estos sustratos, existen muchos otros. De hecho, en un reciente estudio se realizó un *screening* de sustratos en el que se identificaron alrededor de 400 dianas de caspasas, muchos de los cuales aun no se conoce su papel en la apoptosis (Luthi and Martin 2007). Más recientemente, en un trabajo en el que se describe una novedosa técnica proteómica, el PROTOMAP (del ingles, *Protein Topography and Migration Analysis Platform*), se identificaron más de 150 sustratos de caspasas que no habían sido anteriormente descritos (Dix *et al.* 2008). Además, en este trabajo se observó que muchos de los fragmentos generados correspondían a dominios funcionales y presentaban una vida media similar a la proteína de la que provenían. Basándose en estas observaciones, los autores proponen que la principal función de las cascadas proteolíticas de la apoptosis puede ser la generación de estas proteínas efectoras activas, y no sólo la inactivación por proteólisis de algunas de ellas.

La caspasa que más se ha implicado en la ejecución de la apoptosis isquémica es la caspasa-3 (Chen *et al.* 1998; Le *et al.* 2002; Namura *et al.* 1998; Ni *et al.* 1998), aunque hay otras caspasas, como la caspasa 1 y la caspasa 8, que también están implicadas (Hara *et al.* 1997; Kang *et al.* 2000; Velier *et al.* 1999). La caspasa-1 cataliza la producción de la IL-1 β , una citoquina muy importante en los procesos inflamatorios. Se ha descrito que su inhibición puede reducir la aparición de la inflamación y el edema cerebral, aunque también se observó una disminución de la apoptosis neuronal (Hara *et al.* 1997; Rabuffetti *et al.*

2000). En un trabajo más reciente, se demuestra que la caspasa-1 se activa en un modelo de isquemia *in vitro* y que media el procesamiento de Bid, proteína de la familia de Bcl-2; esto permitiría la salida de factores proapoptóticos de la mitocondria (Zhang *et al.* 2003).

La caspasa-8 también se ha visto implicada en la muerte neuronal isquémica (Carboni *et al.* 2005; Velier *et al.* 1999), aunque no está muy descrito como su activación estaría interviniendo en la muerte apoptótica. Hay trabajos que indican que podría ser mediante la proteólisis de Bid, que permitiría la salida de factores proapoptóticos de la mitocondria, desencadenando así la muerte apoptótica de las neuronas (Plesnila *et al.* 2001; Yin *et al.* 2002).

En los últimos años, se han descrito otras caspasas que están implicadas en la apoptosis isquémica. Así, la caspasa-11 se ha propuesto como caspasa activadora de la caspasa-3, ya que ratones *knock out* (KO) deficientes de caspasa-11 sometidos a una isquemia focal tienen una menor activación de la caspasa-3 (Kang *et al.* 2000). La caspasa-12 ha sido la última proteasa de la familia que se ha implicado en procesos de apoptosis isquémica. La caspasa-12 reside en el retículo endoplasmático y, como se mencionó anteriormente, se activa en respuesta al estrés de retículo endoplasmático. Existen únicamente dos trabajos que describen la activación de la caspasa-12 en la isquemia, aunque ninguno de ellos aporta datos sobre el mecanismo de activación de esta caspasa en el proceso isquémico (Shibata *et al.* 2003) (Mouw *et al.* 2003).

Cabe destacar también que en un trabajo previo del grupo se describió la activación de las caspasas -3, -7 y -9 en un modelo basado en la privación de oxígeno y glucosa (OGD) en cultivos mixtos de neuronas corticales (Malagelada *et al.* 2005).

5.4.- Papel de los receptores de muerte en la isquemia

5.4.1.- Los receptores de muerte y la vía extrínseca

Los receptores de muerte pertenecen a una superfamilia de receptores relacionados con fenómenos de proliferación, diferenciación y apoptosis denominada Superfamilia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF, del inglés, *Tumor Necrosis Factor*) (Bhardwaj and Aggarwal 2003). Estos receptores son proteínas integrales de membrana, la mayoría de tipo I, es decir, con un solo dominio transmembrana, con el extremo N-terminal extracelular y el C-terminal intracelular.

Los miembros de la familia del TNFR son diversos en su estructura primaria pero todos poseen un dominio extracelular conservado rico en cisteínas (que es el que permite el reconocimiento selectivo del ligando (Naismith and Sprang 1998)), una región transmembrana y una región intracelular conservada de unos 80 aminoácidos llamado dominio de muerte (DD, del inglés, *Death Domain*). A través del DD se podrán reclutar las proteínas adaptadoras para el inicio de la señalización apoptótica (Curtin and Cotter 2003).

A día de hoy se han caracterizado hasta 8 receptores de muerte pertenecientes a la gran familia del TNF con DD en su porción intracelular: TNF receptor 1 (TNFR1; también conocido como DR1, CD120a, p55/60 y TNFRSF1a), CD95 (también llamado DE2, APO1 y Fas), DR3 (conocido como APO3, LARD, TRAMP y WSLT), receptor de inducción a apoptosis por ligando relacionado con TNF (TRAILR1; llamado también DR4 o APO2), TRAILR2 (conocido también como DR5, KILLER y TRICK2), DR, receptor de la ectodisplasia A (EDAR) y el receptor del factor de crecimiento nervioso p75 (p75^{NTR}) (Lavrik *et al.* 2005).

Se conocen al menos 18 ligandos que activan estos receptores, todos a excepción del factor de crecimiento nervioso (NGF), son moléculas relacionadas estructuralmente que pertenecen a la superfamilia génica del TNF (Smith *et al.* 1994;Gaur and Aggarwal 2003) (ver figura 8).

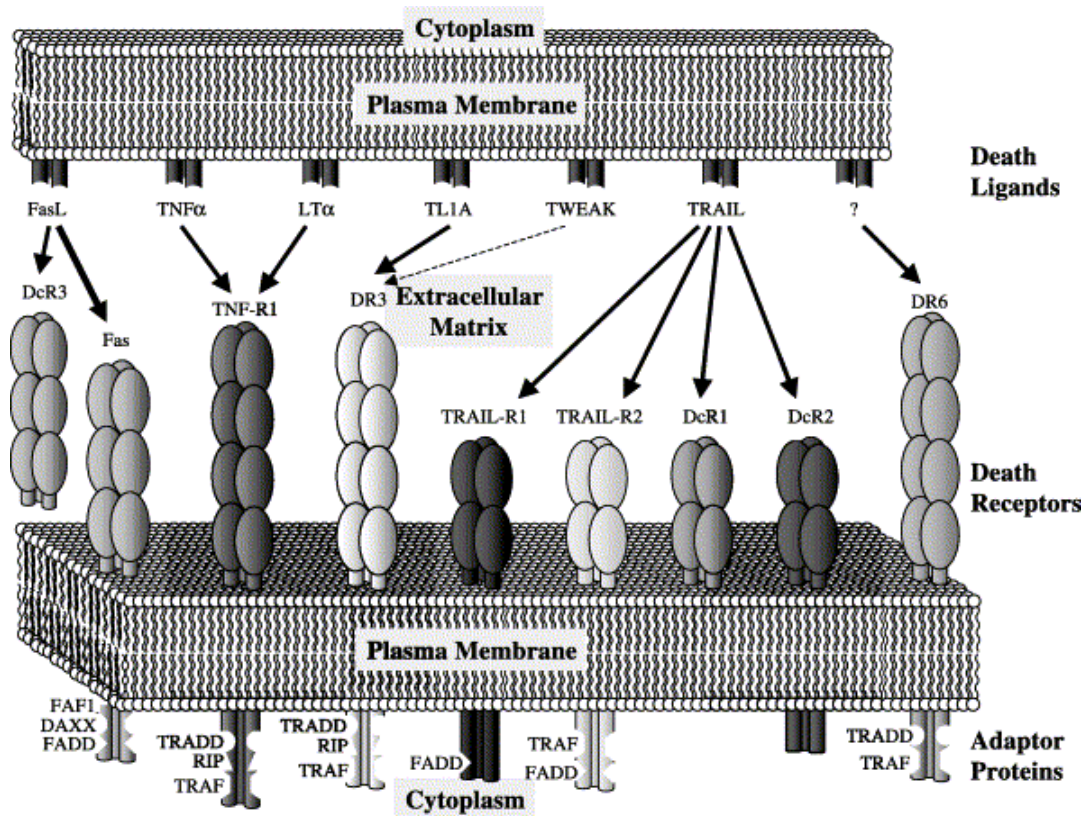


Figura 8. Receptores de muerte y sus correspondientes ligandos. (Extraído de Curtin JF *et al.*, 2003).

Estos ligandos a través de la interacción con sus receptores activan la denominada vía extrínseca mediante la transmisión de señales apoptóticas.

5.4.2- El factor de necrosis tumoral alfa (TNFα), sus receptores y las vías de señalización

El factor de necrosis tumoral alfa, TNFα, es una proteína homotrímica de unos 157 aminoácidos (156 en rata), producida en el sistema nervioso principalmente por la microglía (Lambertsen *et al.* 2005; Schubert *et al.* 2000). El TNFα se sintetiza como una proteína transmembrana y se libera en su forma soluble por medio de una proteasa dependiente de zinc, que también se encuentra anclada a la membrana, denominada TNF-alfa convertasa (TACE, también denominada ADAM 17) (Black *et al.* 1997). La forma soluble, una

proteína de 17kDa, es la responsable de todos los procesos en los que está involucrada la citoquina (Wajant *et al.* 0 AD).

El TNF α es una citoquina pleiotrópica que principalmente se había descrito en procesos inflamatorios, jugando un importante papel en la modulación de la respuesta inflamatoria e inmune. No obstante, durante los últimos años se han acumulado evidencias de que también podría estar jugando un papel importante en procesos de proliferación celular y apoptosis (Barone *et al.* 1997; Tracey and Cerami 1994; MacEwan 2002).

El TNF α ejerce su actividad biológica a través de dos tipos de receptores, el receptor de tipo 1 (TNFR1) y el receptor de tipo 2 (TNFR2; también conocido como p75/80, CD120b y TNFRSF1b), los cuales sólo comparten un 28% de la homología, principalmente en la porción extracelular. De hecho, la principal diferencia entre estos dos receptores es que el TNFR2 no presenta el DD (Vandenabeele *et al.* 1995; Yang *et al.* 2002), lo cual explica las diferencias en las vías de señalización dependiendo del receptor que sea estimulado por el TNF α (MacEwan 2002). Además hay que tener en cuenta la distribución de estos receptores dependiendo del tipo celular, ya que mientras el TNFR1 se expresa constitutivamente en la mayoría de tipos celulares, la expresión del TNFR2 está más restringida a algunos tipos celulares (principalmente células del sistema inmune).

La interacción entre el TNF α y el TNFR1 provoca la trimerización del receptor y la liberación de la proteína inhibidora SODD (del inglés, *Silencer of Death Domains*) del dominio intracelular de TNFR1 (Smith *et al.* 1994). Esto permite el reclutamiento de la proteína adaptadora TRADD (del inglés, *TNFR-Associated Death Domain*), que sirve de plataforma a otras proteínas adaptadoras. La relevancia de esta proteína se demostró en ratones deficientes para TRADD, donde se observó que las vías de señalización de NF- κ B y de la caspasa-8 inducidas por TNF α estaban prácticamente inhibidas (Zheng *et al.* 2006).

El adaptador FADD recluta la procaspasa-8 formando el complejo de señalización inductor de muerte (DISC) (ver figura 9). La procaspasa-8 está

compuesta por un prodominio regulador en N-terminal que consiste en 2 dominios efectores de muerte (DED), que se unen a los dominios de muerte de FADD, y un dominio de homología de caspasas en C-terminal. En el DISC hay numerosas moléculas de procaspasa 8 próximas entre si, lo que permite su activación por dimerización (Boatright and Salvesen 2003; Donepudi *et al.* 2003). El paso de procaspasa-8 a la forma activa consta de 2 procesos autoproteolíticos. En un primer paso la procaspasa-8 (p55/53) se corta entre los dominios p20 y p10 del dominio de homología a caspasa, generando un intermediario p43/41 unido a FADD. La proteólisis de este intermediario p43/41 entre el prodominio y la subunidad p20 tiene como resultado la caspasa-8 activa (compuesta por un heterómero de p20/p10). Así se inicia la vía proapoptótica, que dependiendo del tipo celular activará directamente la caspasa 3 (Scaffidi *et al.* 1999) o bien procesará Bid, proteína de la familia de Bcl-2, provocando la salida de factores pro-apoptóticos de la mitocondria (Budihardjo *et al.* 1999; Luo *et al.* 1998; van Loo *et al.* 2002; Yin *et al.* 2002).

Por otro lado, la unión de TRADD permite reclutar a los adaptadores secundarios RIP y TRAF2 (ver figura 9) que permiten la activación de IKK (Hsu *et al.* 1996; Zhang *et al.* 2000; Chen and Goeddel 2002), las cuales activan a NF- κ B y c-Jun respectivamente. La activación de estos factores de transcripción induce la expresión de una serie de proteínas que pueden favorecer o bloquear la vía apoptótica activada por TNF α (Tang *et al.* 2001). TRAF2 y RIP también reclutan las proteínas inhibitoras de la apoptosis celular, c-IAPs (Fotin-Mleczek *et al.* 2002), que inhiben la activación de las caspasas efectoras (Deveraux *et al.* 1999; Roy *et al.* 1997).

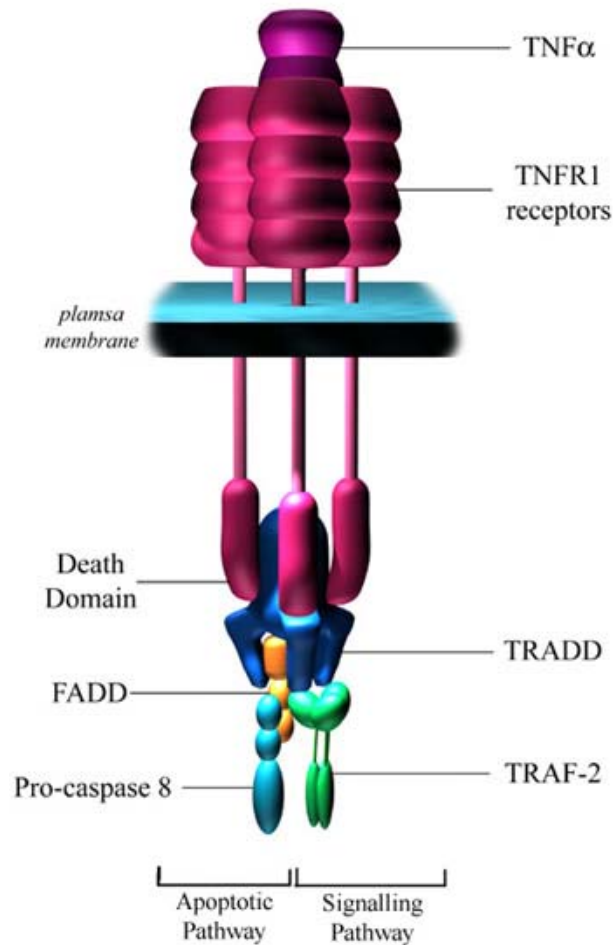


Figura 9. Formación del complejo TNFR1 y vías de transducción asociadas. La unión del TNF α a su receptor de tipo 1 desencadena la formación de complejos de proteínas adaptadoras como TRADD o FADD. Éstas a su vez reclutan proteínas involucradas en vías de transducción de señales tanto apoptóticas como de supervivencia.

(Recurso: <http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/receptors.htm>)

En el 2003, Micheau y Tschopp propusieron un modelo que integraba las distintas vías de señalización de TNFR1 proponiendo la formación de dos complejos distintos (Micheau and Tschopp 2003). El complejo I se formaría inmediatamente después de la estimulación del TNFR1, y comprendería el propio receptor, TRADD, RIP1, TRAF2 (TNFR-Associated Factor 2) y c-IAP1. El ensamblaje de este complejo se daría en los *lipid raft* (Legler *et al.* 2003) y activaría la señalización por NF- κ B mediante el reclutamiento del complejo IKK (Hsu *et al.* 1996; Zhang *et al.* 2000) y la activación de JNK por la vía de TRAF2 (Liu *et al.* 1996; Chen and Goeddel 2002) (ver figura. 10). Cuando el complejo I

no es capaz de promover genes anti-apoptóticos (por ejemplo, FLIP) el TNF α también a través de TNFR1 promueve la formación del complejo II. Este complejo II no contiene TNFR1 pero contiene FADD procaspasa-8 y procaspasa-10, se forma en el citoplasma y es el encargado de promover apoptosis (ver figura 10).

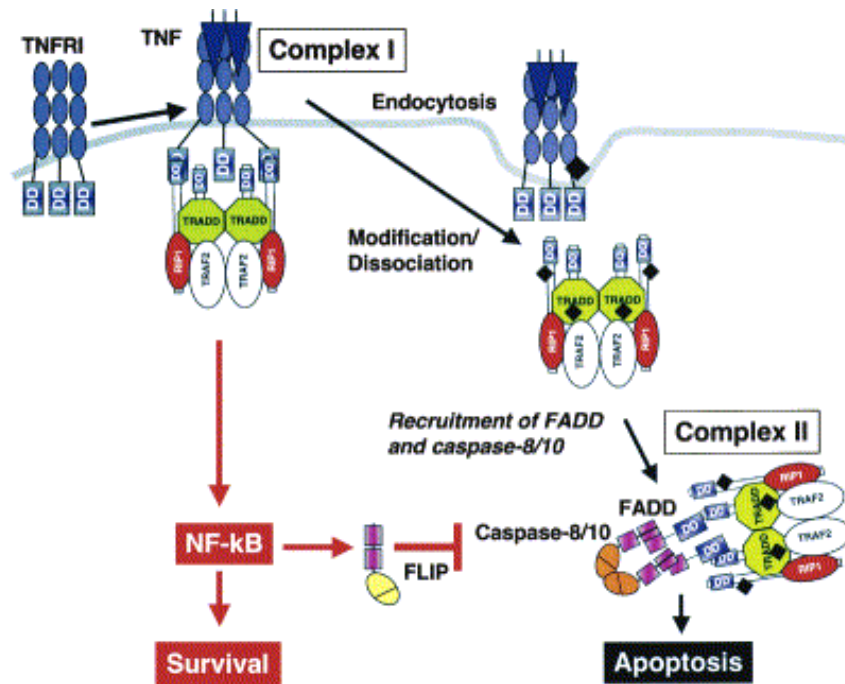


Figura 10. Modelo de formación de los dos complejos de señalización de TNFR1. Tras la unión del TNF a TNFR1, se da un rápido reclutamiento de TRADD, RIP y TRAF2 formando el complejo I. Subsecuentemente TRAF2, TRADD y RIP1 se modifican y se disocian de TNFR1. El dominio de muerte (DD) liberado de TRADD (y/o RIP1) se une a FADD resultando en el reclutamiento de las caspasas-8/10, formando el complejo II y resultando en apoptosis. La activación de NF-kB puede resultar en niveles suficientemente elevados de FLIP como para bloquear la apoptosis y conseguir que las células sobrevivan. (Extraído de Micheau & Tschoop, 2003)

El complejo de señalización de TNFR2 se encuentra menos caracterizado, como se mencionó antes este receptor no contiene dominios de muerte pero TRAF2 se puede unir directamente a su dominio citosólico (Rothe *et al.* 1994). Al igual que en el complejo de TNFR1, TRAF2 tiene la capacidad de activar JNK (Liu *et al.* 1996) y NF-kB (Rothe *et al.* 1995b). También se ha observado que TRAF1 es capaz de unirse a TRAF2, y que este heterodímero TRAF1-TRAF2 puede reclutar a las c-IAPs (Rothe *et al.* 1995a).

5.4.3- El TNF α en la isquemia cerebral

En condiciones normales, la concentración de TNF α en el cerebro se encuentra a niveles muy bajos pero en respuesta a lesiones cerebrales como la isquemia, puede aumentar entre 100 y 1000 veces (Barone *et al.* 1997). Este incremento de expresión del TNF α es detectable 1 hora después de la agresión y suele presentar un máximo entre 6 y 12 horas (Feuerstein *et al.* 1994;Liu *et al.* 1994).

Desde hace años se ha debatido sobre el papel dual del TNF α en la isquemia cerebral (Shohami *et al.* 1999), pero aun no se ha esclarecido que papel juega ya que su función varia dependiendo del escenario celular en el que se encuentre. Las primeras evidencias parecían indicar que la citoquina tenía un efecto tóxico durante la isquemia, ya que se observó que la adición de TNF α durante oclusión de la arteria carótida medial (MCAO) en ratas aumentaba notablemente el volumen de infarto de una manera dosis-dependiente (Barone *et al.* 1997). Por otro lado, se observó que adición directa de un anticuerpo monoclonal o receptores solubles del TNF α , revertían el efecto del TNF α endógeno liberado durante la isquemia, disminuyéndose el daño isquémico y las respuestas funcionales (Barone *et al.* 1997;Lavine *et al.* 1998;Meistrell, III *et al.* 1997). En esta misma dirección, en ratones híbridos deficientes para TNF α y CD95L se observó que eran más resistentes al daño inducido por oclusión arterial, esta protección parecía deberse a una combinación de situaciones, un menor daño isquémico primario y además una menor respuesta inflamatoria. La contribución del TNF α al daño isquémico también puede deberse a su acción proinflamatoria sobre el endotelio vascular (Akassoglou *et al.* 2003). En las células endoteliales parece provocar un aumento en la expresión de factores proinflamatorios, activación de metaloproteasas y enzimas productoras de ROS, como la xantina oxidasa o la COX (Papa *et al.* 2005;Rosenberg *et al.* 2001). En otros estudios se ha descrito que la administración de un inhibidor (DPH-067517) de TACE es capaz de reducir la liberación de TNF α causado por la isquemia cerebral, así como el tamaño del infarto y también los déficits neurológicos (Wang *et al.* 2004).

Por otro lado, se había observado que ratones KO para los receptores del TNF α presentaban una mayor muerte, debido presumiblemente a un menor nivel de agentes antioxidantes (Bruce *et al.* 1996). En este mismo sentido, se había propuesto el papel neuroprotector del TNF α , ya que el pretratamiento con TNF α protegía a los cultivos de neuronas hipocampales y corticales del daño inducido por privación de glucosa, de la toxicidad por glutamato o del daño oxidativo (Mattson 1997). En este trabajo se demostró que frente a la toxicidad por glutamato, el pretratamiento con TNF α suprimía el aumento de calcio intracelular mediante el aumento de expresión de la calbindina, proteína que se une a este catión regulando su homeostasis. Además también quedaba suprimida la formación de especies reactivas de oxígeno, por la inducción de la expresión de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD). Por otro lado, el factor de transcripción NF- κ B se activa con el pretratamiento con TNF α , aumentando su capacidad de unión al DNA y podría promover la transcripción de estos genes, entre otros. También se han encontrado evidencias de que el pretratamiento con TNF α frente a hipoxia o a exposiciones de óxido nítrico (NO), protege las neuronas hipocampales mediante el incremento de proteínas de la familia de Bcl-2, como Bcl-2 y Bcl-x_L, a través de la activación de NF- κ B (Tamatani *et al.* 1999).

Existen diversas evidencias que sugieren que el TNF α tiene un papel importante el preconditionamiento isquémico (PCI). El PCI confiere protección frente a posteriores insultos isquémicos, aunque esta neuroprotección se pierde cuando se inhibe la acción del TNF α , mediante anticuerpos neutralizantes, o si se inhibe la acción de TACE, mediante inhibidores selectivos (Hurtado *et al.* 2002; Pradillo *et al.* 2005; Cardenas *et al.* 2002). Uno de los mecanismos que mejor podrían explicar esta acción protectora del TNF α en el PCI es la reducción en la concentración extracelular de glutamato. Este descenso en la concentración de glutamato estaría relacionado, al menos parcialmente, con el aumento de transportadores de glutamato EAAT2 y EAAT3 (Romera *et al.* 2004).

Así pues, podemos pensar que en los periodos iniciales de la lesión isquémica, la activación de la vía de señalización del TNF α podría ser neuroprotectora,

pero la activación a largo plazo podría ser nociva ya que el TNF α además de poder iniciar procesos apoptóticos en las neuronas, podría también activar a la microglía y los macrófagos. Estas especies celulares cuando se activan producen sustancias tóxicas, como el óxido nítrico o especies reactivas de oxígeno, para las neuronas (Banati *et al.* 1991;Chao *et al.* 1992) y eso contribuiría a la extensión de la lesión.

Para poder entender los distintos papeles que puede jugar el TNF α hay que tener en cuenta además que tiene dos receptores, los cuales pueden estar señalizando cascadas moleculares distintas. Se sabe que el TNFR1 experimenta un aumento de su expresión en neuronas unas 6 horas después de una isquemia focal, mientras que el aumento del TNFR2 no es significativo hasta las 24 horas (Botchkina *et al.* 1997). Estudios en ratones KO para los receptores del TNF α , demuestran diferencias entre el TNFR1 y el TNFR2. Las neuronas hipocampales de cultivo de ratón TNFR1 (-/-) no ven afectada su viabilidad con la adición de TNF α y tampoco presentan translocación al núcleo de NF- κ B. En cambio, en cultivos de ratones TNFR2 (-/-), las neuronas hipocampales son mucho más sensibles a la toxicidad del TNF α y se aprecia una evidente activación de NF- κ B. Se sugirió que en neuronas hipocampales de ratón, el efecto tóxico vendría mediado por el TNFR1 y el efecto trófico por el TNFR2. Esta dualidad de función del TNF α ha llevado a hipotetizar que la supervivencia neuronal depende del subtipo de receptor que expresen las neuronas de manera mayoritaria, tanto durante el desarrollo como en enfermedades neurológicas como la isquemia cerebral (Yang *et al.* 2002).

5.5.- Estrés del retículo endoplasmático: ¿una nueva vía apoptótica?

5.5.1.- Mecanismos de acción

El retículo endoplasmático (RE) es el orgánulo que coordina la síntesis, el plegamiento, la exportación y la degradación de las proteínas. Además cumple un papel clave en el almacenaje y señalización del calcio. En definitiva, la función fisiológica del RE es la síntesis y el plegamiento de las proteínas, así como el mantenimiento de la homeostasis celular del calcio.

El RE es muy sensible a las alteraciones en la homeostasis del calcio y a las perturbaciones del entorno. Así, los compuestos que deplecionan de calcio el lumen del retículo (thapsigargina), los inhibidores de la glicosilación (brefeldina A), el estrés oxidativo y la acumulación de proteínas mal plegadas pueden interrumpir su función, provocando estrés en el RE. La respuesta a este estrés tiene como objetivo disminuir la cantidad de proteínas mal plegadas y recuperar el buen funcionamiento del RE y para ello se disminuye la síntesis proteica, se eliminan las proteínas mal plegadas y se incrementa la transcripción de genes de respuesta como las chaperonas. Estas respuestas vienen mediadas por vías de señalización específicas, UPR (*Unfolded Protein Response*), EOR (*ER-Overload Response*) y ERAD (*ER-associated degradation*).

La respuesta a proteínas no plegadas o UPR, fue la primera que se describió como respuesta al estrés del RE y que, posteriormente, se ha sugerido que podría estar mediando en la apoptosis (Kaufman 1999; Paschen and Mengesdorf 2005).

La UPR se lleva a cabo por 3 proteínas efectoras que se encuentran en la membrana del RE, PERK (*PRK-like ER Kinase*), IRE1 (*Inositol Required ER transmembrane RNAsa*) y ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*). En condiciones basales las tres tienen sus dominios luminales unidos a la chaperona GRP78 (*Glucose Response Protein 78*, también denominada Bip), que reprime su actividad. En respuesta al estrés del RE la chaperona se disocia de estas proteínas para facilitar el buen plegamiento de las proteínas, permitiendo así la activación de PERK, IRE1 y ATF6 (Bertolotti *et al.* 2000; Shen *et al.* 2002), la subsiguiente cascada de señalización molecular (ver figura 11).

PERK es una proteína transmembrana de tipo I que se encuentra en la membrana del RE, y en la porción citoplasmática contiene un dominio kinasa. En condiciones de estrés del ER la chaperona GRP78 se disocia de PERK permitiendo su oligomerización y trans-fosforilación. Una vez activa, PERK fosforila la subunidad alfa del eIF2 (*eucariotic Initiation Factor 2*), reduciendo así su capacidad de unir tRNA al ribosoma. Esto se traduce en una disminución global de la síntesis proteica, que tiene como objetivo evitar una mayor

acumulación de proteínas mal plegadas en el RE (Harding *et al.* 1999). Por otro lado, la forma fosforilada de eIF2 α puede aumentar la traducción de mRNAs que tienen ORF (*Open Reading Frames*) en el extremo 5' mediante un proceso denominado *bypass scanning* (Dever *et al.* 1995; Morris and Geballe 2000). De esta manera se induce la expresión de ATF4 (*Activating Transcription Factor 4*) (Harding *et al.* 2000), que a su vez puede viajar al núcleo para inducir la expresión de GADD34 (*DNA Damage Gene 34*), una subunidad reguladora de la fosfatasa 1 que interviene en la desfosforilación de eIF2 α (P), permitiendo la restauración de la síntesis proteica (Ma and Hendershot 2003; Novoa *et al.* 2001). ATF4 también es capaz de incrementar la expresión de CHOP (*C/EBP Homologous Protein*, también denominada GADD153) (Ma *et al.* 2002), un factor de transcripción que se ha relacionado con procesos apoptóticos (Oyadomari and Mori 2004; Zinszner *et al.* 1998).

ATF6 es una proteína transmembrana de tipo II, la porción citoplasmática tiene un dominio de unión a DNA que contiene un motivo de cremallera de leucinas (bZIP) y un dominio de activación transcripcional. En ausencia de estrés en el RE la chaperona GRP78 está unida a su dominio luminal y esconde la señal de localización a Golgi, previniendo su translocación. En respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas, GRP78 se disocia de ATF6 y este viaja al aparato de Golgi por vía vesicular. Una vez en el aparato de Golgi ATF6 sufre un corte secuencial por parte de las proteasas S1P y S2P (*Site 1 or 2 Protease*) y el dominio citosólico resultante transloca a núcleo (Haze *et al.* 1999). En el núcleo este fragmento de 50kDa se une a la secuencia promotora ERSE (*ER Stress Response Element*) presente en los genes que codifican para proteínas residentes en el RE aumentando su transcripción (Roy and Lee 1999). El corte de ATF6 es un tipo de corte poco común ya que el segundo corte por parte de SP2 ocurre en la región transmembrana (Ye *et al.* 2000). Este proceso se llama RIP (del inglés, *Regulated Intramembrane Proteolysis*), y está conservado de bacterias a mamíferos.

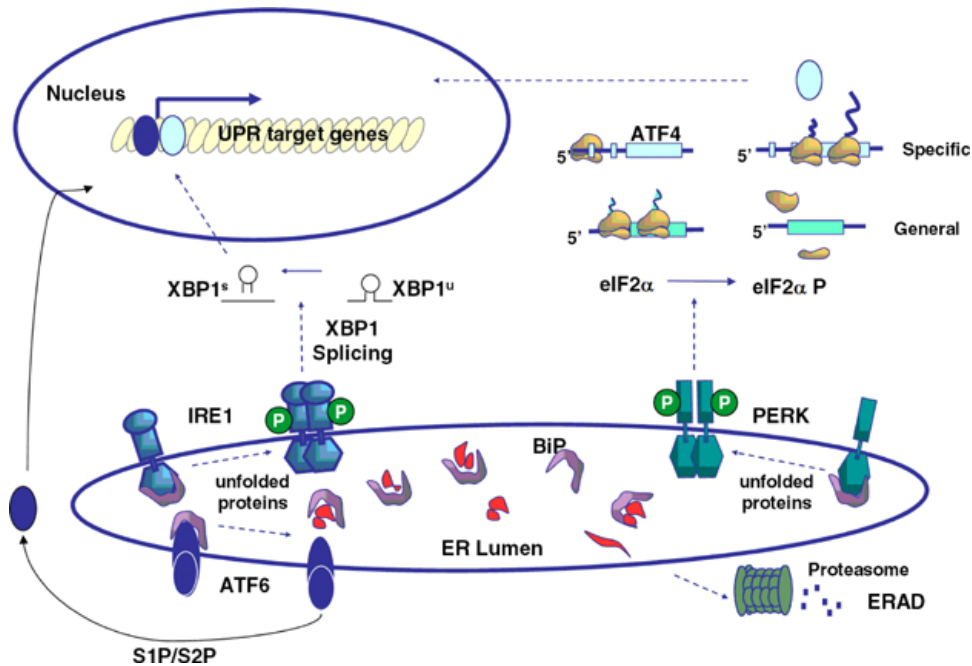


Figura 11. Principales vías de la *unfolded protein response* (UPR). Las tres vías de la UPR se activan cuando sus sensores transmembranales, denominados PERK, IRE1 y ATF6, detectan la acumulación de proteínas mal plegadas dentro del RE. Este mecanismo de detección viene mediado por la chaperona Bip/Grp78, la cual, en respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE, se disocia de estos sensores transmembranales, dando lugar a la activación de las tres principales vías de la UPR. La activación de PERK resulta en la fosforilación del factor de la iniciación eucariótico 2 α (eIF2 α), la cual se traduce en una atenuación de la síntesis general de proteínas y la traducción selectiva de determinados transcritos, como el factor de transcripción ATF4. Por otro lado, la activación de IRE1 tiene como resultado el *splicing* no convencional de los transcritos de *xbp1*, cuyo resultado codifica para un potente factor de transcripción que es más estable que la forma no procesada. Finalmente, la activación de ATF6 resulta en su procesamiento por las proteasas S1P y S2P, dando lugar a un fragmento de 50kDa que transloca a núcleo para inducir la expresión de diferentes genes de respuesta a la UPR (Extraído de Wu & Kaufman, 2006).

El tercer sensor en la membrana del RE es IRE1. Además del dominio luminal unido a GRP78 presenta un dominio RNasa en la porción citoplasmática. Existen dos genes para IRE, IRE α y IRE β , aunque la primera es la más estudiada. En condiciones de estrés de RE la chaperona se disocia y permite la dimerización y trans-fosforilación de IRE1. La forma activa de IRE1 α lleva a cabo un *splicing* (o procesamiento) no convencional sobre el mRNA de *xbp1* (del inglés, *X-Box Binding Protein*) (Calfon *et al.* 2002; Lee *et al.* 2002; Yoshida

et al. 2001). El mRNA procesado, una vez cortado y ligado, da lugar a la proteína XBP1 de 54kDa que es un factor de transcripción más estable que se une a los ERSE y tiene la misma especificidad de unión que el ATF6 (Lee *et al.* 2003). Por otro lado, se ha observado que el dominio citoplasmático de IRE1 puede estar unido a TRAF2 que en situaciones de estrés de RE podría estar mediando la activación de JNK (Urano *et al.* 2000) o regulando la autoproteólisis de la caspasa-12 (Yoneda *et al.* 2001).

A modo de resumen, se podría proponer que los primeros procesos en respuesta al estrés en el RE, como la inhibición global de la síntesis de proteínas y el incremento de la expresión de enzimas residentes del RE y chaperonas, tratan de proteger a la célula; mientras que si el estrés persiste la activación sostenida de los efectores de la UPR puede derivar en procesos apoptóticos, principalmente mediante la transcripción de CHOP y la activación de la caspasa-12. Por este motivo se ha propuesto que la vía del estrés del RE podría ser una tercera vía apoptótica, junto a las vías extrínseca e intrínseca.

5.5.2.- Evidencias de estrés del RE en la isquemia cerebral

En la isquemia cerebral se dan algunos de los procesos mencionados anteriormente, como la disminución de ATP, el estrés oxidativo o la disrupción de la homeostasis del calcio, que finalmente conllevan una acumulación de proteínas no plegadas, y que en última estancia puede provocar la activación de la UPR.

No ha sido hasta estos últimos años cuando se ha comenzado a estudiar el papel que podría jugar el estrés del RE en la apoptosis observada en distintos procesos patológicos. En este sentido, no hay demasiados trabajos que se hayan centrado en estudiar el estrés del RE en la isquemia cerebral, y a pesar de que hay cierto consenso respecto a que la isquemia provoca la disfunción del RE, existe mucha controversia acerca de que vías están activadas y que proteínas están implicadas, ya que existen resultados contradictorios al respecto (Roberts *et al.* 2007).

La activación de PERK y el subsiguiente incremento en la fosforilación de eIF2 α tras la isquemia cerebral es un proceso aceptado, ya que se ha observado en distintos estudios. Además, se conoce que este proceso es transitorio ya que la fosforilación revierte horas más tarde, lo cual sugiere que la inhibición de la síntesis proteica debida a este proceso es temporal (Althausen *et al.* 2001;Kumar *et al.* 2003). El estrés oxidativo generado durante el proceso isquémico podría jugar un papel importante en la activación de estas proteínas (Hayashi *et al.* 2003). En cambio, existe una mayor controversia acerca de si existe, o no, un aumento de las proteínas que se encuentran *downstream* como ATF4 y CHOP. Respecto a la expresión de ATF4 y CHOP existen trabajos que describen el aumento de ambas proteínas tras la isquemia (Hayashi *et al.* 2005;Morimoto *et al.* 2007;Tajiri *et al.* 2004), mientras que en otros no lo observan (Kumar *et al.* 2003). En un principio se propuso que estas discrepancias podían deberse a la utilización de distintos modelos animales o a la diferencia de los tiempos estudiados. Pero recientemente en un trabajo que utilizaba el mismo modelo animal que Hayashi y colaboradores, no detectaron el aumento de ninguna de las dos proteínas (Roberts *et al.* 2007). A este respecto, cabe destacar que en el trabajo de Hayashi y cols. observaban un aumento de proteínas de 26 y 50kDa que identificaron como ATF4 y CHOP, respectivamente, aunque las secuencias de cDNA de rata de ambas proteínas predicen unas bandas de aproximadamente 43kDa para ATF4 y 29kDa para CHOP. Además, el incremento de CHOP observado en los otros dos trabajos fue mediante inmunohistoquímica, pero no se confirmó por *western blot*, lo cual no acaba de despejar las dudas al respecto.

Estas discrepancias vuelven a repetirse en el estudio de la activación de IRE1. Existen trabajos en los que detectan la forma procesada de *xbp1* (Paschen *et al.* 2003;Tajiri *et al.* 2004), indicativo de la activación de IRE1, mientras en otros trabajos no son capaces de detectar ni la forma procesada ni la proteína de 54kDa para la que codifica el mRNA procesado (Kumar *et al.* 2003;Roberts *et al.* 2007). Aunque en este punto si se podrían atribuir las diferencias al modelo experimental, ya que el procesamiento de *xbp1* se observa en los modelos de isquemia focal, pero no así en los modelos de isquemia global.

Se ha descrito que existe una activación de la caspasa-12 tanto en un modelo de isquemia transitoria focal (Shibata *et al.* 2003) como en un modelo de isquemia permanente focal (Mouw *et al.* 2003), aunque no existe ningún estudio en isquemia global. Además, ninguno de los dos estudios aporta suficientes datos para saber si la activación estaba mediada por IRE1 (Yoneda *et al.* 2001) o por otros mecanismos.

Por otro lado, cuando se ha estudiado ATF6 no se ha detectado la forma de 50kDa, responsable de translocar a núcleo e incrementar la expresión de los genes de respuesta, después de la isquemia cerebral (Kumar *et al.* 2003).

A modo de resumen, se podría decir que la isquemia cerebral induce estrés de RE pero su respuesta difiere de la clásica UPR que se observa tratando las células con fármacos inductores de estrés en el RE (brefeldina A, thapsigargina o tunicamicina, por ejemplo). Además, las actuales controversias acerca de las vías activadas junto con algunas limitaciones técnicas, dejan muchas incógnitas sobre el papel del estrés del RE en la isquemia cerebral, invitando a profundizar más en los mecanismos moleculares implicados y en la evaluación de dichos mecanismos en la contribución de la muerte o supervivencia neuronal.

6.- CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA

En las últimas décadas, la investigación en medicina y biología ha ido incorporando nuevas técnicas como el *Northern blot*, la hibridación *in situ* y la PCR que permitían detectar y amplificar el mRNA individual de una especie. Si bien estas técnicas permiten un estudio más o menos detallado de los cambios génicos, otorgan una visión parcial de lo que puede estar ocurriendo en una patología, por ejemplo. Gracias a la secuenciación del genoma humano (así como el de rata y ratón) se han sentado las bases para el desarrollo de cambios revolucionarios en la medicina molecular. Uno de los más relevantes ha sido desarrollo de los *biochips* o *microarrays* que nos permiten hacer un estudio comparado de la expresión génica de un gran número de genes al

mismo tiempo, facilitándonos una visión más global de los cambios que pueden conducir a una determinada enfermedad, además de permitirnos diseñar una terapia más personalizada atendiendo al perfil genético de cada paciente (Ginsburg *et al.* 2005). Así en los últimos años, el microarrays de DNA se ha convertido en la herramienta que más universalmente se utiliza para el análisis comparado de la expresión génica.

El correcto análisis de los datos de expresión implica utilizar métodos estadísticos y bioinformáticos robustos que permitan una adecuada normalización y comparación entre distintas muestras; y después, métodos que encuentren los genes que presentan una expresión diferencial para el estado concreto que se estudia, por ejemplo, el hemisferio isquémico (ipsilateral) frente al hemisferio control (contralateral) para el caso de muestras derivadas animales sometidos a una isquemia cerebral. Otro punto importante es la transición desde los datos de expresión génica hacia el mapeo y descubrimiento de redes funcionales transcriptómicas que integran relaciones complejas entre conjuntos de genes que se coexpresan o que se alteran de modo concordante. La obtención de estos datos más integrados supone la aplicación de métodos biocomputacionales capaces de identificar patrones de expresión y de agrupar genes según dichos patrones. Este salto para poder explorar la complejidad implica también la capacidad de integrar distintos niveles de información biológica, como la información funcional que viene derivada del mapeo sobre ontología de genes (*gene ontology*, GO) o la información que viene derivada del mapeo sobre redes conocidas de interacción de proteínas, llamadas interactomas. Todo ello, permite explorar mejor la complejidad relacional de los sistemas vivos a nivel biomolecular.

6.1.- Factores de transcripción

Los factores de transcripción son las proteínas que coordinan y regulan la expresión de un gen o de un grupo de genes, y por lo tanto, las principales responsables de los cambios génicos observados tras la isquemia, por ejemplo. En muchos casos regulan su propia expresión y también es frecuente que regulen a otros factores de transcripción. Los factores de transcripción

interaccionan con regiones específicas del DNA, con elementos de la maquinaria de transcripción como la DNA polimerasa, con otros factores de transcripción o con moléculas que activan o inhiben su actividad. La activación de estos puede ser debido a estímulos externos (citoquinas, radiación UV) y/o internos (activación de vías de señalización, ERK, AKT). El conjunto de los factores de transcripción de una célula forman una red transcripcional cuyas conexiones determinan el conjunto de genes que se expresan en un determinado momento y tiene como nombre transcriptoma.

Todos los procesos celulares, desde el ciclo celular hasta la diferenciación, celular dependen de la expresión de un patrón específico de genes, lo que está en gran medida determinado por el perfil de factores de transcripción expresados en cada tipo celular. Dentro de este perfil hay factores de transcripción constantemente activos, responsables de la expresión de los genes constitutivos, y hay otros que se activan o inhiben en respuesta a estímulos externos. Las redes de señalización intracelular están íntimamente relacionadas con las redes transcripcionales. La activación de algunas cascadas de señalización intracelular desemboca en muchos casos en la activación o supresión de uno o varios factores de transcripción que van a controlar una respuesta, determinando el patrón de genes expresados por la célula.

En general los factores de transcripción tienen una estructura modular que consta de: un dominio de unión al DNA, un dominio que detecta las señales, y el dominio de transactivación. El orden y el número de dominios pueden diferir dependiendo el tipo de factor de transcripción. Además, el dominio de transactivación y el que detecta las señales pueden estar contenidos en el mismo dominio.

El dominio de transactivación contiene las regiones de unión de otras proteínas como los coreguladores transcripcionales. Opcionalmente, existe un dominio de detección de señales que puede ser el lugar de unión de ligando y que, al detectar la señal, la trasmite al resto del complejo de transcripción resultando en una regulación positiva o negativa de los genes. El dominio de unión a DNA

se une a secuencias específicas de DNA adyacentes al gen como pueden ser los promotores o los *enhancers*. Estas secuencias suelen comprender entre 5 y 12 nucleótidos y se denominan elementos de respuesta (por ejemplo, ERSE) (Pabo and Sauer 1992).

Dependiendo de la estructura y forma de unión al DNA existen distintos motivos proteicos de unión DNA, entre los más habituales se encuentran: la hélice-giro-hélice, la hélice-lazo-hélice, la hélice alada, los dedos de zinc y las cremalleras de leucina (Struhl 1989). Aquí comentaremos brevemente las características de los dominios básicos de cremallera de leucinas (bZIP, *basic and leucine zipper*) y los dominios de unión a DNA coordinado por zinc.

El dominio básico de cremallera de leucinas contiene una hélice alfa de aproximadamente 35 residuos con una leucina cada 7 aminoácidos. Si dos hélices se encuentran, las leucinas pueden interaccionar como dientes de una cremallera, permitiendo la dimerización de dos proteínas (ver figura 13). La cremallera está estabilizada por interacciones hidrofóbicas y de van der Waals entre leucinas. Además, hay una región básica de unos 30 residuos hacia el extremo amino terminal que actúa como un módulo de unión al DNA. Dentro de los factores de transcripción que pertenecen a este grupo están las familias de CREB (ATF3 y ATF4 entre otros) y C/EBP, así como c-Fos, c-Jun y c-Myc. Estos factores de transcripción pueden formar homodímeros o heterodímeros (Vinson *et al.* 1989).

El dominio de dedos de zinc contiene 30 aminoácidos y consiste en una hélice de reconocimiento y dos hojas beta (ver figura 13). Cada dominio contiene dos cisteínas y dos histidinas en localizaciones idénticas. Estos residuos invariantes están coordinados tetraédricamente con un ión zinc, el cual es el que estabiliza la estructura 3D del dominio. Cada dedo contiene un ion zinc que reconoce un triplete específico de bases de DNA. Dentro de este grupo se encuentran los receptores de hormonas esteroideas y otros factores de transcripción como Sp1 o Egr1.

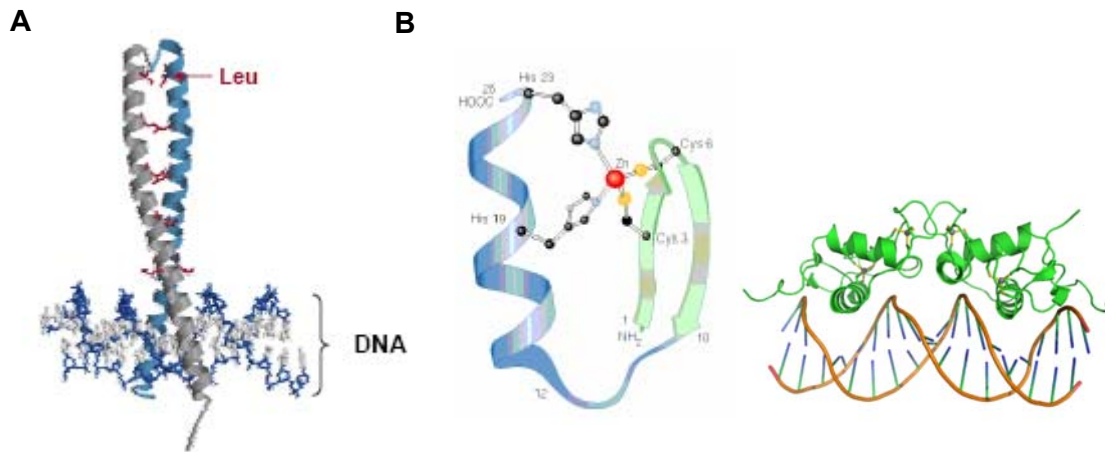


Figura 12. Estructura e interacción con el DNA de los motivos proteicos: dedos de zinc y la cremallera de leucina. **A**, Estructura de las cremalleras de leucina (Leu), dos hélices alfa interaccionan a través de las leucinas, formando un dímero, y los dominios básicos de las hélices interaccionan con el DNA. **B**, Estructura de un dominio de dedo de zinc, este ion (Zn) estabiliza la estructura mediante una unión tetraédrica a dos cisteínas (Cys) y a dos histidinas (his). A la derecha un esquema de interacción de los dedos de zinc con el DNA. (Recurso: www.uniovi.es)

Cabe destacar que hay otras proteínas que también son claves para la regulación de la transcripción pero que no son clasificados como factores de transcripción porque no tienen dominios de unión al DNA, como por ejemplo los coactivadores, las acetilasas de histonas, las desacetilasas, las metilasas, las quinasas y los remodeladores de la cromatina.

6.2.- Cambios de expresión génica en la isquemia cerebral

La isquemia cerebral desencadena un conjunto de alteraciones en las células afectadas. Entre ellos, los cambios transcripcionales tienen una gran importancia para entender mejor los procesos celulares, ya que las alteraciones en la expresión de algunos genes estarán jugando un papel importante en la recuperación y, por otro lado, la inducción de genes envueltos en la apoptosis será clave para el desencadenamiento de la muerte isquémica. Por eso futuras

terapias pueden estar dirigidas a proteínas diana involucradas en los cambios de expresión génica, bien sea en un sentido u otro.

La mayoría de estos estudios de expresión génica están realizados utilizando modelos animales ya que la obtención de tejido humano post-mortem es muy limitada. Los primeros trabajos en el campo utilizaban técnicas de hibridación *in situ* o inmuno histoquímicas, pero como ya hemos mencionado anteriormente la tecnología del microarray nos permite comparar la expresión génica de un gran número de genes (>20.000) de forma simultánea y, por lo tanto, los estudios más globales se han realizando utilizando esta tecnología. En la isquemia se considera que existe una diferencia consistente en la expresión de un gen cuando la expresión de este es, como mínimo, el doble de la expresión observada en el hemisferio contralateral utilizado como control.

Uno de los primeros grupos de genes que se observó que sufrían cambios en su expresión tras la isquemia cerebral fueron los genes de respuesta inmediata (IEG, *Immediate early genes*). Estos genes son activados transitoriamente y de forma rápida en respuesta a una gran variedad de estímulos celulares. Representan un mecanismo de respuesta que es activado a nivel de transcripción en respuesta al estímulo y que ocurre antes de que se sinteticen nuevas proteínas (Morgan and Curran 1991). Además, la mayor parte de los IEG codifican para factores de transcripción teniendo una función reguladora (Lanahan and Worley 1998). Tras la isquemia cerebral existe un claro incremento de estos genes, *c-fos*, *fos-B*, *fra-1*, *c-jun*, *jun-B*, and *jun-D*, *egr1* (NGFI-A), *nur77* (NGFI-B, NR4A1), NGFI-C, *egr-2*, *egr-3*, y *nurr1* (Honkaniemi *et al.* 1997;Akins *et al.* 1996). Estos trabajos junto a otros sugieren que la activación sostenida de estos factores de transcripción provoca una muerte celular.

Dentro de los genes relacionados con la apoptosis se han encontrado incrementos en las caspasas-3 y -8, las catepsinas-B y -D, y también un incremento en de expresión en genes de la familia de Bcl-2 como *Bax*, *Bad* y *Bid* (Kim *et al.* 2004;Yakubov *et al.* 2004).

Del mismo modo, existe un evidente incremento en genes relacionados con el estrés oxidativo, como pueden ser la superóxido dismutasa, la glutatión-transferasa o las metalotioneinas. De la misma manera, numerosos genes relacionados con la inflamación, como interleuquinas, quimioquinas o antígenos CD, están claramente incrementados en la isquemia cerebral.

Una de las primeras respuestas endógenas tras la isquemia es el incremento de la expresión de chaperonas en respuesta al estrés. Esta respuesta se denomina la HSR (*Heat Shock response*) (DeGracia and Hu 2007). Posteriormente, existe una respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas mediada por el estrés de ER que provoca un aumento de *grp78* y *grp94*. Estos aumentos de la expresión en chaperonas se ven claramente reflejados en los estudios de microarrays (Ford *et al.* 2006; Jin *et al.* 2001; Kim *et al.* 2004; Rickhag *et al.* 2006; Tang *et al.* 2006; Yakubov *et al.* 2004).

A modo de resumen, para ilustrar de una forma visual los cambios transcripcionales que suceden en la isquemia cerebral, se presenta una tabla resumen (simplificada), que recoge algunos de los principales genes que se sobreexpresan tras la isquemia. Para su elaboración se tomaron datos de estudios que utilizaron microarrays para comparar la expresión génica, y se agruparon seis categorías: factores de transcripción, apoptosis, inflamación, estrés oxidativo, chaperonas y señalización celular. A pesar de que los datos provienen de distintos estudios y algunos realizados en modelos distintos, permite tener una visión global de los cambios transcripcionales que suceden en la isquemia cerebral (ver tabla 1).

Categoría	Nombre del gen	Símbolo oficial
Apoptosis	Caspase-8	<i>Casp8</i>
	Caspase-3	<i>Casp3</i>
	Cathepsin B	<i>Ctsb</i>
	Cathepsin D	<i>Ctsd</i>
	Bcl2-associated X protein	<i>Bax</i>
	Bcl2-associated death agonist	<i>Bad</i>
	BH3 interacting domain death agonist	<i>Bid</i>
	Fas ligand	<i>Fasl</i>
	Tumor necrosis factor receptor superfamily, CD40/TNFRSF5	<i>Tnfrsf1a</i>
	DNA-damage-inducible transcript 3 (CHOP, Transformation related protein 53 (p53))	<i>Cd40</i>
		<i>Ddit3</i>
		<i>Trp53</i>
	Factores de transcripción	Fos family members
Jun family members		<i>c-jun, jun-b, jun-D</i>
CEBP family members		<i>Cebp a/b/d</i>
Early growth response family		<i>Egr 1/2/3</i>
Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1		<i>Nr4a1</i>
Activating transcription factor 3		<i>Atf3</i>
Activating transcription factor 4		<i>Atf4</i>
Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit		<i>Hif1a</i>
Estrés oxidativo	Superoxide dismutase 1	<i>Sod1</i>
	Superoxide dismutase 3	<i>Sod3</i>
	Heme oxygenase	<i>Hmox1</i>
	Nitric oxide synthase 2, inducible	<i>Nos2</i>
	Glutathione S-transferase, mu 2	<i>Gstm2</i>
	Metallothionein 1	<i>Mt1</i>
	Metallothionein 2	<i>Mt2</i>
Inflamación	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (Cox2)	<i>Ptgs2</i>
	Glial fibrillary acidic protein	<i>Gfap</i>
	Intercellular adhesion molecule 1	<i>Icam1</i>
	CD44 antigen	<i>Cd44</i>
	CD63 antigen	<i>Cd63</i>
	CD74 antigen	<i>Cd74</i>
	CD151 antigen	<i>Cd151</i>
	Matrix metalloproteinase 9	<i>Mmp9</i>
	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	<i>Timp1</i>
	Interleukin 1 beta	<i>Il1b</i>
	Interleukin 6	<i>Il6</i>
	Interleukin 18	<i>Il18</i>
	Interleukin 4 receptor alpha	<i>Il4ra</i>
	Chemokine (C-C motif) ligand 4-like 1	<i>Ccl4</i>

Categoría	Nombre del gen	Símbolo oficial
Chaperonas	Heat shock 105kDa/110kDa protein 1	<i>Hsp1</i>
	Heat shock protein 4 (Hsp70)	<i>Hspa4</i>
	Heat shock protein 1 (Hsp60)	<i>Hspd1</i>
	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B,	<i>Dnajb5</i>
	Heat shock protein 1A (Hsp68)	<i>Hspa1a</i>
	Heat shock protein 5 (Bip,Grp78)	<i>Hspa5</i>
	Heat shock protein 90, beta (Grp94),	<i>Hsp90b1</i>
Señalización	Mitogen-activated protein kinase 4 (erk3)	<i>Mapk4</i>
	Mitogen-activated protein kinase kinase 3	<i>Map4k3</i>
	Mitogen activated protein kinase kinase 7	<i>Map2k7</i>
	Dual specificity phosphatase 5	<i>Dusp5</i>
	Brain derived neurotrophic factor	<i>Bdnf</i>
	Insulin-like growth factor 1	<i>Igf1</i>
	Transforming growth factor, beta 1	<i>Tgfb1</i>
	Fibroblast growth factor 2	<i>Fgf2</i>
	Vascular endothelial growth factor A	<i>Vegfa</i>
	Neuregulin1	<i>Ngr1</i>
	Signal transducer and activator of	<i>Stat3</i>
	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45	<i>Gadd45 b/g</i>
	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor)	<i>Gadd34</i>
	Cyclin-dependent kinase	<i>Cdk5</i>

Tabla 1. Resumen de genes cuya expresión incrementa tras una isquemia cerebral.

Relación de genes, ordenados en categorías, que sufren un incremento de su expresión tras una isquemia cerebral. La tabla no trata de recoger todos los genes incrementados sino representar de forma ilustrativa los principales grupos de genes implicados. Los datos se extrajeron de trabajos en los que se realizó un estudio de la expresión génica mediante microarrays en modelos animales de isquemia cerebral ((Ford *et al.* 2006;Jin *et al.* 2001;Kim *et al.* 2004;Rickhag *et al.* 2006;Tang *et al.* 2006;Yakubov *et al.* 2004)).

La respuesta del cerebro a la isquemia está regulada, entre otras, por una serie de programas genéticos que pueden promover la supervivencia o la muerte celular. La herramienta del microarray puede ser muy útil ya que permite comparar un gran número de genes, lo cual permite hacer un análisis exhaustivo de las vías que están incrementadas, o disminuidas en la isquemia, además de poder ofrecer pistas sobre genes que aun no se conoce su función en la patología. Por eso, el análisis de la expresión génica mediante microarray puede facilitar la elucidación de nuevos mediadores moleculares de la muerte y supervivencia en la isquemia cerebral.

II - OBJETIVOS

El principal objetivo de esta tesis doctoral fue el de conocer que estaban mecanismos implicados en la muerte apoptótica provocada por la isquemia cerebral. Para ello, utilizamos el modelo de privación de oxígeno y glucosa (OGD) en cultivos mixtos de células corticales y dentro del objetivo general nos fijamos unos objetivos concretos:

1.- Determinar si el TNF α es un factor determinante en la muerte apoptótica observada en la OGD:

- Establecer que tipos celulares expresan la citoquina y el receptor de tipo 1.
- Describir los mecanismos moleculares implicados en la muerte apoptótica.

2.- Estudiar el papel del estrés del retículo endoplasmático en la OGD y la HI neonatal:

- Estudiar cuales son las vías de señalización de respuesta al estrés del RE que se activan en la OGD.
- Estudiar los factores que determinan la activación de la caspasa-12.

3.- Realizar un análisis masivo de cambios de expresión génica inducidos por la OGD:

- Identificar las principales categorías de genes que están alterados tras la OGD.
- Identificar genes cuya expresión está alterada por la OGD y que no hayan sido asociados anteriormente con la isquemia cerebral.

III – MATERIALES Y MÉTODOS

1.- PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS DE CORTEZA CEREBRAL

1.1.- Material biológico

Los cultivos primarios de corteza cerebral de rata se hicieron a partir de embriones de 17 días de gestación de la cepa OFA, que fueron proporcionados por el Servicio de Estabulario de la propia Universitat Autònoma de Barcelona. Mientras que para la preparación del cultivo neuronal mixto de ratón las cortezas se extrajeron de embriones, de la cepa C57BL, salvajes y de *knock out* del receptor de tipo 1 del TNF α , de entre 16-19 días de gestación. Estos animales fueron suministrados por el Dr. Hidalgo (Harlan). El procedimiento experimental fue aprobado por el Comité ético de la Universidad Autónoma de Barcelona, en conformidad con las líneas directrices de las instituciones nacionales (Generalitat de Catalunya, Decreto 214/1997, DOG 2450).

1.2.- Reactivos

Los reactivos químicos si no se indica lo contrario fueron de Merck, Panreac o Flucka.

1.3.- Soluciones necesarias para la elaboración del cultivo

Para la realización del cultivo primario mediante un método de disgregación enzimático-mecánico se necesitarán las siguientes soluciones que se filtrarán previamente a su uso:

- Solución 1: 50ml de tampón Krebs (de composición NaCl 120mM, KCl 4.8mM, KH₂PO₄ 1.2mM, NaHCO₃ 25mM, Glucosa 14.3mM), 0.15g de albúmina bovina (BSA; Sigma) y 0.4ml de una solución 3.8% de MgSO₄.
- Solución 2: 10ml de la solución 1, 2.5mg de tripsina (Sigma).
- Solución 3: 10ml de la solución 1, 5.2mg de inhibidor de tripsina (Sigma), 0.8mg de Dnasa (Sigma), 0.1ml de la solución 3.8% de MgSO₄.
- Solución 4: 8.4ml de la solución 1, 1.6ml de la solución 3.
- Solución 5: 5ml de la solución 1, 40 μ l de la solución de 3.8% de MgSO₄, 6 μ l de una solución 1.2% de CaCl₂.

1.3.1.- Composición de los medios de cultivo y del tampón fosfato

- Medio *Basal Eagle's Medium* (BME; Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FCS), 30mM de glucosa, 2mM de glutamina, 25.000u de penicilina y 25mg de estreptomina (GIBCO-Invitrogen).
- BME suplementado con 5% de FCS y 5% de suero equino (HS; GIBCO), 30mM de glucosa, 2mM de glutamina, 25.000u de penicilina y 25mg de estreptomina.
- BME suplementado con 10% de HS, 30mM de glucosa, 2mM de glutamina, 25.000u de penicilina y 25mg de estreptomina.
- Tampón Fosfato (Phosphate Buffered Saline, PBS 1x; Sigma) suplementado con 30mM de glucosa, 100.000u de penicilina, 100mg de estreptomina.

1.4.- Disección, obtención y disgregación tisular.

En el caso de la preparación del cultivo neuronal mixto de rata las cortezas cerebrales se extrajeron de embriones, de la cepa OFA, de 17 días de gestación. Mientras que en la preparación del cultivo neuronal mixto de ratón las cortezas se extrajeron de embriones, de la cepa C57BL, salvajes y de *knock out* del receptor de tipo 1 del TNF α , de entre 16-19 días de gestación. En ambos casos se limpiaron de meninges para limitar la contaminación por fibroblastos y se escindió el estriado. El hipocampo se incluyó en la mayoría de los casos.

Una vez obtenido el tejido se procedió a la disgregación mecánico-enzimática. El tejido en el tampón Krebs se centrifuga a 1500 rpm durante unos 10-20 segundos (un pulso de centrifuga) y se elimina el sobrenadante. Se añade al precipitado una solución que contiene tripsina para disgregar enzimáticamente el tejido durante unos 10 minutos a 37°C (solución 2). Después de este tiempo se añade una solución diluida que contiene inhibidor de tripsina y DNasa (solución 4), inhibiendo la acción de la tripsina y degradando el DNA de las células que se hayan podido lisar por acción de la tripsina. Se vuelve a centrifugar a 1500 rpm para volver a eliminar el sobrenadante. Se añade una solución concentrada de inhibidor de tripsina y DNasa (solución 3) al pellet y se

procede a la disgregación mecánica mediante, una pipeta Pasteur de vidrio con la punta roma aspirando-soltando la suspensión celular unas 10 veces y posteriormente se hace pasar esta suspensión por una malla de nylon (con un diámetro de poro de 40 μ m) con la misma pipeta Pasteur otras 10 veces para conseguir una suspensión celular (Patel and Hunt 1985). Se repite este proceso dos veces.

La suspensión celular se transfiere a una solución con magnesio y calcio para restablecer la homeóstasis celular (solución 5) y se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos. Se elimina el sobrenadante y se diluyen las células en el medio deseado para realizar el recuento celular mediante la exclusión del colorante vital azul tripano (se diluye la suspensión celular con el azul tripano 1:1 para detectar las células muertas) en una cámara de Neubauer.

Las neuronas corticales se sembraron a una densidad de 300.000 células/cm² en placas de cultivo que habían sido previamente tratadas, durante 24hr, a 37°C, con poli-L-lisina 50 μ g/ml (MW>300,000 Sigma). El medio utilizado para sembrar las células fue el BME suplementado con un 5% de FHS (*Fetal Horse Serum*) y con un 5% de FCS (*Fetal Calf Serum*), 30mM de glucosa, 2mM de glutamina, 25.000u de penicilina y 25mg de estreptomycin. A 7 DIV (días *in vitro*) el medio de siembra se reemplazó por medio BME suplementado con 10%FHS y citosina- β -D-Arabinofuranoside (Ara-C; Sigma) 10 μ M, un antimetabólico que frena la proliferación de células gliales del cultivo. Las placas se mantuvieron dentro de un incubador en una atmósfera húmeda, con un 5% de CO₂ y a 37°C hasta el día del experimento (12-14 DIV). Los cultivos estaban enriquecidos en neuronas pero la presencia de glía era destacable.

2.- DEPRIVACIÓN DE OXIGENO Y GLUCOSA (OGD)

Cultivos mixtos de corteza cerebral de entre 12-14 DIV, se sometieron a una privación de O₂ y glucosa (OGD), según los protocolos descritos anteriormente por Goldberg y Choi (Goldberg and Choi 1993), con mínimas modificaciones.

Las células se lavaron dos veces con el tampón BSS (del inglés, *Balanced Salt Solution*) con la siguiente composición: NaCl 116 mM, KCl 5.4 mM, MgSO₄ · 7H₂O 0.8 mM, NaH₂PO₄·2H₂O 1 mM, NaHCO₃ 26.2 mM, Glicina 0.01 mM, CaCl₂·2H₂O 1.8 mM con pH 7.4, previamente equilibrado en una atmosfera de 0.5% O₂ /94.5% N₂ /5% CO₂ a 37°C. Con estos lavados se conseguía diluir la glucosa residual del medio unas 2000 veces. Posteriormente, las placas se introdujeron en una cámara de hipoxia (Invivo2 400, Ruskinn Technologies) con una atmosfera de 0.5% O₂ /94.5% N₂ /5% CO₂ y a 37°C, donde se añadió BSS previamente equilibrado en esta atmosfera, y se dejaron durante 75 minutos. La OGD se finalizó aspirando el BSS y devolviendo a los pocillos el medio de cultivo guardado inicialmente (medio condicionado).

Este proceso se realizó también en paralelo con una placa control, expuesta a condiciones de normoxia, donde las células fueron lavadas con el tampón BSS con 5mM de glucosa y después se colocó en un incubador con una atmósfera húmeda, con un 5% de CO₂ y a 37°C, el mismo tiempo que la placa de OGD. La manipulación mecánica que suponían los lavados no reducía la viabilidad celular de manera significativa.

3.- MODELO DE HIPOXIA-ISQUEMIA

La HI unilateral se indujo en ratas de 7 días de la cepa Wistar de ambos sexos (46, 47). Las crías de rata se anestesiaron con halotano (3.0% para inducir y 1.0–1.5% para mantenerlas) en una mezcla de oxido nitroso y oxígeno (1:1), y la duración de la anestesia fue de 10 minutos. La arteria carótida común izquierda se ocluyó con una doble ligadura con suturas de prolono. Tras el procedimiento quirúrgico, se dejó que los animales se recuperaran durante 1-2 horas. Después las crías se introdujeron en una cámara humidificada con una mezcla de gases (7.70 ± 0.01% oxígeno en nitrógeno) durante 70 minutos. La temperatura de la cámara se mantuvo a 36°C. Tras la exposición a la hipoxia, las crías se devolvieron a sus cajas hasta que se sacrificaron.

Los animales se sacrificaron por decapitación y los cerebros se diseccionaron rápidamente en un lecho de hielo, se pesaron, se congelaron rápidamente en isopentano con hielo seco y se guardaron a -80°C . El tejido se homogenizó por sonicación en 10 volúmenes de 50 mM Tris-HCl (pH 7.3), que contenía 5 mM de EDTA, se alicuotó y se guardó a -80°C . Las muestras homogenizadas se mezclaron con un volumen igual de tampón de electroforesis (3X) y se calentaron a 96°C durante 5 minutos. Toda la experimentación con animales fue aprobada por el comité de ética de Goteborg (número de aprobación 225-97).

4.- DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD NEURONAL

4.1.- Ensayo de reducción de MTT

El MTT o Bromuro de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5, difeniltetrazolio, es una sal de tetrazolio hidrosoluble. El MTT es reducido a formazan, un compuesto lila insoluble en medio acuoso, por las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables. Se puede solubilizar con DMSO y medir la absorbancia espectrofotométricamente a una longitud de onda dual de 560nm y 620nm, correlacionando la absorbancia obtenida con la viabilidad celular (Mosmann 1983). Esta técnica se utiliza comúnmente para determinar el porcentaje de células viables que hay en el cultivo aunque no permite discriminar si la muerte es necrótica o apoptótica.

A partir de una solución stock de MTT de 2 mg/mL en agua destilada, se añadió a las placas de cultivo el volumen necesario para conseguir una concentración de MTT final en los pocillos de 0,2 mg/mL. Las células se incubaron en una atmósfera húmeda, con un 5% de CO_2 y a 37°C , durante 45 minutos, posteriormente se aspiró el medio de cultivo y se añadió DMSO para disolver el formazan formado. La medida espectrofotométrica en el lector de placas Sinergy® (BioTek).

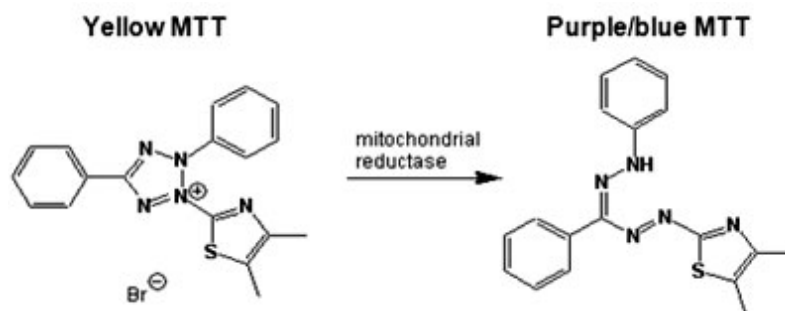


Figura 13. Esquema de reacción de la reducción del MTT. Recurso: www.brightminds.uq.edu.au.

4.2.- Tinción de Hoechst 33258, observación del estado de la cromatina.

El Hoechst 33258 o Bisbenzimidazoles (2-[4-hidroxifenil]-5-[4-metil-1-piperazinil]2,5.-bi-1Hbenzimidazol; Molecular Probes) es un compuesto fluorescente que se une al DNA (Weisblum and Haenssler 1974). Si la cromatina se encuentra condensada o fragmentada, tal como sucede en procesos de muerte celular por apoptosis, este compuesto se concentra en mayor proporción a causa de la condensación de las estructuras y la señal que se obtiene con el microscopio de fluorescencia es mucho más intensa. Por tanto, la observación de la condensación de la cromatina, una de las características morfológicas de la apoptosis, es un buen indicador del grado de muerte apoptótica presente en nuestros cultivos.

Después de la OGD los cultivos fueron lavados con TBS (Trizma Base 0.05M; NaCl 0.15M; H₂O pH 7.3-7.4) y se fijaron con paraformaldehído al 4% (diluido en tampón fosfato 0.1M pH 7.2) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se lavó con TBS a 4°C dos veces y se añadió una solución de Hoechst 33258 1µg/mL. Se incubó 5 minutos y se realizaron dos lavados más con TBS a 4°C. Con unas gotas de medio de montaje *FluorSaveTM Reagent* (Calbiochem), se procedió al montaje para su observación en el microscopio de fluorescencia (LEICA) a una longitud de onda de excitación/emisión de 350nm/460nm. Los núcleos laxos se consideraron neuronas viables, en cambio, los núcleos condensados y/o fragmentados se computaron como neuronas apoptóticas. Se

contaron todas las células de un mínimo de 4 campos por cada pocillo (unas 1000 células por cada condición de cada experimento). Los resultados se expresaron en forma de porcentaje de células apoptóticas versus el total de células contadas.

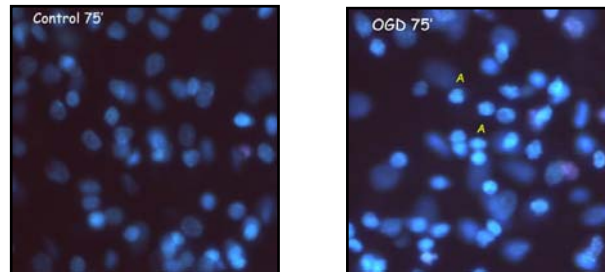


Figura 14. Tinción con Hoechst 33258 de núcleos de en cultivos mixtos de neuronas corticales. En la microfotografía de la derecha se muestra la tinción de un cultivo control y en la izquierda uno sometido a una OGD. Se observa que la OGD provoca la condensación de la cromatina de algunas células, señalaron algunos núcleos apoptóticos (A).

5.- WESTERN BLOT

El término *blotting* se refiere a la transferencia de muestras biológicas de un gel a una membrana y su subsiguiente detección en la superficie de la membrana. El *western blot* (también llamado immunoblot porque un anticuerpo es usado específicamente para detectar su antígeno) fue introducido por Towbin en 1979 (Towbin *et al.* 1979) y actualmente es una técnica de rutina para el análisis de proteínas. La especificidad de interacción entre el complejo anticuerpo-antígeno permite a una simple proteína ser identificada entre una compleja mezcla de gran cantidad de proteínas.

5.1.- Reactivos y fórmulas de los tampones utilizados

Tampón de lisis protéica: 20mM Tris pH 7.5, 1% NP-40, 150mM NaCl y 5mM EDTA suplementado con inhibidores de proteasas (1mM PMSF, 10µg/ml Aprotinine, 20µg/ml Leupeptine, 1mM Na₂VO₄).

Tampón de carga 4X (tampón Laemmli-SDS): 250mM Tris-HCl pH 6.8, 5%(p/v) SDS, 2.5% glicerol, 1.4M β -mercaptoetanol y 0,01% (p/v) de azul de bromofenol.

Tampón de electroforesis: 25mM Tris 192mM glicina, 20%SDS.

Tampón de Transferencia: 25mM Tris 192mM glicina, 20% metanol.

Tampón Tris Salino (TBS): 20mM Tris 137mM NaCl pH 7.6.

TBS-Tween (TBS-T): TBS con 0.1% de Tween 20.

Tampón de bloqueo: TBS-T con 5% de leche en polvo.

Anticuerpos primarios: anti-GRP94 (1/2000; Stressgen Biotechnologies), anti-GRP78 (1/1000; BD PharMingen), anti-ATF6 α (1/200, Santa Cruz Biotechnologies), anti-ATF4 (1/500, Santa Cruz Biotechnologies), anti-eIF2 α fosforilado (1/1000; Cell Signalling Technology), anti-eIF2 α total (1/1000; Cell Signalling Technology), anti-caspase-12 (1/500, Sigma), anti-NR4A1 (1/500; Cell Signalling Technology), anti-NR4A2 y anti-NR4A3 (1/1000; Abcam), anti- β -tubulina (1/10.000; Sigma), anti-GAPDH (1/20.000; BD PharMingen) y anti- β -actina (1/10.000; Sigma).

Anticuerpos secundarios: Anticuerpo policlonal anti-rabbit peroxidasa conjugado y anticuerpo policlonal anti-mouse peroxidasa conjugado de BD Biosciences, y el anticuerpo policlonal anti-rat peroxidasa conjugado de Calbiochem.

5.2.- Procesamiento por western blot

Una vez sometidas a la OGD, las células se lavaron con tampón PBS a 4°C, se lisaron y posteriormente se centrifugaron las muestras a 20.000 X g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante contiene las proteínas solubles y el precipitado los restos de células no lisadas y membranas del resto. Seguidamente se procedió a la determinación de la concentración de proteína mediante el método de Bradford (Bradford 1976) y se realizaron los cálculos oportunos para

preparar las muestras a una concentración $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en tampón Laemmli-SDS. Seguidamente se sonicaron brevemente cada una de las muestras y se dejaron a 95°C durante 5 minutos.

Las proteínas se separaron mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (Poly Acrilamide Gel Electrophoresis-Sodium Dodecyl Sulfate; PAGE-SDS). La densidad de los geles fue variable, del 10%, 12% o 15% según la proteína a estudiar. En cada carril se cargó la misma cantidad de proteína de entre 20 y 40 μg , según la proteína a detectar y se cargó un estándar de proteína pre-teñido con colorante azul (*Precision Plus ProteinTM Standard All Blue*, Bio-Rad). La electroforesis se realizó a una intensidad de corriente constante de aproximadamente 80mA.

Una vez finalizada la electroforesis se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa (Amersham pharmacia biotech) o PVDF (*Polyvinylidene difluoride, Hybond-P PVDF Membrana*; Amersham pharmacia biotech) activada con metanol. La transferencia se realizó a 90V durante una hora y media o a 50V durante toda la noche a 4°C . Se lavaron las membranas con agua y TBS-T y se les aplicó el tampón de bloqueo durante una hora. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario pertinente (diluido en tampón de bloqueo) toda la noche a 4°C en agitación. Pasado ese tiempo, se lavaron las membranas abundantemente con TBS-T, dos lavados de 5 minutos y dos lavados de 10 minutos para después incubar la membrana durante una hora con el anticuerpo secundario correspondiente en tampón de bloqueo, a temperatura ambiente; y se repitieron los lavados con TBS-T.

Las proteínas se detectaron por quimioluminiscencia (*ECLTM Western Blotting Detection Reagent*; Amersham Pharmacia). La cuantificación de las bandas se hizo densitometrando las bandas a través del programa *ImageJ* (Scion Corporation). Una carga igual de proteínas en cada carril se verificó a través de la visualización de las formas totales de las proteínas estudiadas o por una tinción de Ponceau S (sigma) de la membrana al finalizar la transferencia.

6.- IMMUNOCITOQUÍMICA

Para los estudios de inmunocitoquímica las células fueron sembradas en portaobjetos de 8 pocillos cubiertos con Poli-D-lisina (BIOCOAT[®] cellware poly-D-lysine 8-well CultureSlides, BECTON-DICKINSON). A los 12 DIV las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0.1 M pH 7.2, durante 1 hora a 4° C. Se lavaron las placas dos veces con TBS-Tween 0.1% (TBS-T; Tris 20mM, NaCl 137mM, HCl 1M, pH 7.6, 0.1% Tween) a temperatura ambiente y se bloqueó con tampón de bloqueo (TBS-T, 5% FCS, 3% BSA) durante 45-60 min. a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron las células con el anticuerpo primario anti-caspasa-3 activa (Cell Signalling Technology), anti-TNF α (PeproTech), anti-TNFR1 (Santa Cruz Biotechnology), anti-CD11b (Pharmingen), anti-GFAP y anti-MAP-2 (Chemicon internacional) diluido 1:100 (o 1:200 en el caso de los marcadores celulares) en TBS-T 5% BSA, durante 24h a 4°C. Se hicieron dos lavados con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 o 594 (Molecular Probes) diluido 1:500 en TBS-T 5% BSA, durante 1h. Después de dos lavados con TBS-T, se hizo un último lavado con TBS y se montaron las preparaciones con medio de montaje Fluorosave[™] (Calbiochem). Las preparaciones se observaron bajo un microscopio de fluorescencia (LEICA) a una longitud de onda de 492nm o 584nm.

7.- ENSAYOS DE DETERMINACIÓN DE CASPASA-8 ACTIVA

7.1.- Determinación de la presencia de caspasa 8 activa mediante un inhibidor fluoresceinado

Para los estudios de determinación de caspasa 8 activa, se utilizó el kit comercial *Carboxyfluorescein FLICA Apoptosis Detection* (Immunochemistry Technologies). Las células fueron sembradas en portaobjetos de 8 pocillos cubiertos con Poli-D-lisina (Biocoat de FALCON[®]). A los cultivos de 12 DIV sometidos a una OGD se les añadió al medio de cultivo el fluorocromo inhibidor de la caspasa 8 (FLICA) y se dejó en el medio durante una hora. En este

tiempo el inhibidor se unía directa y exclusivamente al centro activo de las moléculas de caspasa 8 activas. Inmediatamente después se realizó un lavado con el tampón de lavado y se añadió 1 µg/mL de Hoechst 33258 y se dejó 5 minutos. A continuación se realizaron 3 lavados y se fijaron las células durante 20 minutos a 4° C con el tampón de fijación. Una vez fijada la muestra, se realizó el montaje colocando un cubreobjetos sobre el portaobjetos con medio de montaje Fluorosave™ (Calbiochem), para su observación al microscopio de fluorescencia (LEICA). De este modo podía detectarse que células tenían la caspasa 8 activa mediante microscopia de fluorescencia. El número total de células se contabilizó mediante el marcaje nuclear con Hoechst 33258.

7.2.- Ensayo de actividad de caspasa 8

La actividad de la caspasa 8 se determinó utilizando un sustrato fluorogénico de la caspasa-8, el Ac-IEPD-AMC. Si la caspasa-8 está activa hidroliza el sustrato liberándose la molécula fluorogénica (AMC), la fluorescencia resultante se correlaciona con la actividad de la caspasa-8 y puede ser cuantificada en un lector de fluorescencia. Los lisados celulares se recogieron a distintos tiempos después de la OGD (0, 3 y 6 horas) con un tampón de lisis específico (100 mM HEPES pH 7.5, 10% sacarosa, 1 mM EDTA, 20 µM EGTA, 0,1% CHAPS, 10 mM DTT, leupeptina 10 µg/mL, ortovanadato 1 mM, aprotinina 2 µg/mL y PMSF 1mM). La reacción se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos opaca (para evitar la pérdida de fluorescencia) a la que se añadió la cantidad de proteína necesaria para que la concentración final estuviera entre 30-60 µg/mL más 20 µM del sustrato fluorogénico, Ac-IEPD-AMC, y se llevó hasta un volumen final de 250 µL con el tampón de lisis utilizado previamente. Inmediatamente se procedió a la lectura en el lector de fluorescencia (Victor III, Perkin Elmer).

8.- EXTRACCIÓN DE RNA Y TRANSCRIPCIÓN INVERSA

Después de la OGD se lavaron las células con PBS y se procedió a la extracción del mRNA mediante la utilización de la solución TRIzol™ (Invitrogen)

de isotiocianato de guanidina siguiendo el protocolo indicado. Posteriormente se determinó la concentración de RNA para normalizar las muestras e igualar concentraciones. Se realizó midiendo su absorbencia en un biofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf). a 260nm y relacionándola con la absorbencia a 280nm para obtener un valor que nos indicase su estado de pureza. Así pues, para un grado de pureza óptimo e indicativo de no degradación de RNA deberíamos encontrar un valor 260nm/280nm superior a 1.8 e inferior a 2.1. La contaminación de proteínas o de fenol disminuye la relación. Se aplicó la relación existente para la cuantificación espectrofotométrica de ácidos nucleicos, en este caso RNA, de 1 unidad de densidad óptica (1 UDO) equivale a 40µg/mL de RNA.

Alternativamente, se utilizó el kit de extracción de RNA, RNeasy (Quiagen), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Posteriormente se determinó la concentración de RNA utilizando el kit de detección de Quant-iT™ RNA Assay (Invitrogen).

La síntesis de cDNA mediante transcripción reversa (RT) se realizó con el kit *SuperScript™ First-Strand Syntesis System for RT-PCR* (Invitrogen) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. La cantidad de partida de RNA fue entre 1 y 5 µg de RNA. El cDNA obtenido se conservó a -20° C.

Como control para las diferencias en la cantidad de RNA presente en cada reacción de RT y diferencias en la eficiencia de la RT, los resultados fueron normalizados con el nivel de expresión del rRNA 18s.

9.- AMPLIFICACIÓN DE DNA POR PCR SEMICUANTITATIVA

Para cada muestra se tomaron 2 µL del DNA resultante de la retrotranscripción del RNA extraído del cultivo. Además se añadieron 5µL de tampón de PCR 10X, 1.5 µL de MgCl₂ (50 mM), 1µL de mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs, 10mM), 1µL de cada cebador (10 µL), 0.5 µL de la Taq DNA Polimerasa (5 U/µL) y se llevó hasta los 50 µL de volumen final con agua

destilada. Los reactivos utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) semi-cuantitativa fueron adquiridos de Invitrogen.

El protocolo utilizado consistió en una fase inicial de desnaturalización de 2 minutos a 94° C. Después 30 ciclos que constaban de tres etapas, una primera desnaturalización de 15 segundos a 94° C, seguida de una de rehibridación de 30 segundos a 63° C y 1 minuto a 72° C de elongación. Por último una fase de elongación de 5 minutos a 72° C. El termociclador utilizado fue el PTC-100 de MJ Research. Para visualizar el producto obtenido de la PCR semicuantitativa se realizó una electroforesis con 5 µL de este producto en un gel de agarosa del 2%.

Gen		Secuencia del primer (5'-3')
Atf3	Fw	CAGGCAGGAGCATCCTTTGT
	Rv	GAGAATGGCCGGGATGGT
Egr1	Fw	GCAACACTTTGTGGCCTGAA
	Rv	GAGTTGGGACTGGTAGGTGT
Cebpδ	Fw	GAATTGCTACAGTTTCTTGG
	Rv	ATGCGCAGTCTCTTCCTC
Nr4a1	Fw	GAAGGAGAAGAAGGTTGGAG
	Rv	CACCTTCCTATAACCAGCTGC
Nr4a2	Fw	GGCGGAGACTGCTTGAAGTA
	Rv	AACACCGTAATGCTGACAGG
Nr4a3	Fw	CCTGATTCTGGAGAGCAGTG
	Rv	CCTTCACAACCTCCACCAGA
18S	Fw	TCAAGAACGAAAGTCGGAGG
	Rv	GGACATCTAA GGCATCACA

Tabla 2. Secuencias de los primers. Se muestran los pares de primers utilizados para la detección de los distintos genes.

10.- AMPLIFICACIÓN DE DNA POR PCR CUANTITATIVA (REAL TIME)

La PCR a tiempo real permite monitorizar el progreso de la PCR en cada momento, por lo tanto, permite detectar cuando empieza la amplificación de cada muestra. El ciclo en el que se empieza a detectar el aumento de fluorescencia se denomina ciclo umbral (Ct, de *threshold cycle*) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de DNA diana presente en

la muestra. Este seguimiento se hace gracias a una sonda de DNA complementaria a una región del cDNA.

La sonda es un oligonucleótido que tiene un fluorocromo donador en el extremo 5' y tiene un fluorocromo aceptor en el extremo 3'. Cuando la sonda está intacta, la proximidad del fluorocromo aceptor reduce considerablemente la fluorescencia emitida por el fluorocromo donador por un proceso de transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET). La sonda hibrida con una región *downstream* del cebador y es cortada por la actividad nucleasa 5' de la Taq DNA polimerasa en el proceso de extensión del cebador. Este corte provoca la fragmentación del oligonucleótido y como consecuencia la separación del fluorocromo aceptor y el donador, permitiendo así la emisión de fluorescencia. La intensidad de fluorescencia emitida se puede correlacionar con la cantidad del producto que se amplifica. El gen que comience con mayor número de copias emitirá más fluorescencia.

Para la determinación cuantitativa del mRNA de TNF α y de sus dos receptores se preparó una mezcla para la reacción de amplificación que constaba de: los cebadores (10 μ M); sonda fluorogénica (20 μ M, fluorocromo FAM) para el TNF α y sus receptores que formaban parte de un kit (Applied Biosystems) y de Taqman Universal Master Mix (2X; que contenía la DNA polimerasa AmpliTaq Gold, la AmpErase UNG para prevenir la contaminación con dUTP, los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), Rox como fluorocromo de referencia pasiva y además los componentes del tampón). Se dispensaron 20 μ L de la mezcla en una placa óptica de 96 pocillos y se añadieron 5 μ L del producto de la retrotranscripción, cDNA, equivalente a 100 ng. La placa se selló con un plástico adherente para evitar la evaporación durante la reacción de PCR y se centrifugó un pulso para reunir los 25 μ L de volumen final. La reacción de amplificación se llevó a cabo en el equipo de PCR a tiempo real ABI 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) y constó de 2 etapas. La primera con un ciclo inicial de 2 minutos a 50° C, para activar la AmpErase UNG, seguido de otro ciclo de 10 minutos a 55° C, para activar la DNA polimerasa. La segunda etapa consistió en 40 ciclos en los que primero se desnaturalizaba el DNA con 15 segundos a 95° C y después un minuto a 60° C

para la rehibridación y extensión de la cadena. Como control endógeno de expresión se utilizó el gen del enzima Gliceraldehido-3-fosfato Deshidrogenasa (GAPDH) que se expresa constitutivamente. Para ello se utilizó el reactivo de Applied Biosystems, *Rodent GAPDH control reagents*, que constaba de los cebadores (300nM) y la sonda (200 nM, fluorocromo VIC).

La cuantificación del mRNA se hizo de forma relativa respecto al mRNA de GAPDH mediante el software ABI Prism SDS v1.1 Relative Quantification Study.

11.- MICROARRAY

11.1.- Fundamentos moleculares del microarray

La estrategia general del microarray consiste en poner una micromatriz (cristal, plástico o silicio) oligonucleótidos de DNA que contengan secuencias específicas de los distintos genes que se quieren estudiar. Estas secuencias sirven como sondas que hibridan con el cDNA o cRNA de la muestra (extraídas de las células sometidas a estudio, también denominadas diana) bajo condiciones altamente restrictivas. La hibridación sonda-diana suele detectarse y cuantificarse mediante fluorescencia ya que el cDNA o cRNA diana va marcando con un fluoróforo, de esta manera se puede determinar la relativa abundancia de las secuencias de ácidos nucleicos diana. Después se analiza la imagen obtenida para obtener un patrón de intensidades en cada casilla.

Actualmente coexisten diferentes plataformas para llevar a cabo el análisis comparado de la expresión génica utilizando microarrays (los mRNAs bajo estudio pueden marcarse de diferentes maneras, el DNA inmovilizado en el chip puede ser cDNA u oligonucleótidos de distinta longitud, la hibridación de las muestras en el chip puede ser simultánea o en chip independientes, etc.). Entre estas plataformas las que utilizan oligonucleótidos son los más utilizados dentro de la investigación científica y concretamente el *GeneChip* de Affymetrix es el más común.

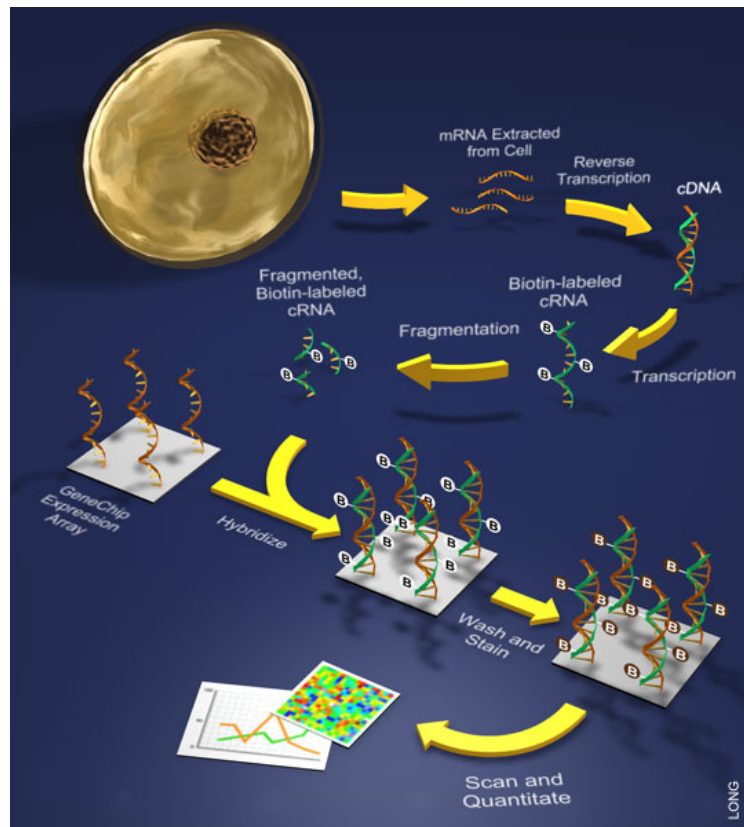


Figura 15. Esquema general del array GeneChip de Affymetrix.
(Recurso: <http://plasticdog.cheme.columbia.edu>)

Estos chips de Affymetrix contienen todo el genoma de un organismo en forma de oligonucleótidos específicos, cada uno de ellos tiene aproximadamente 25 pares de bases. El procedimiento básico utilizado es muy similar al array de cDNA anteriormente explicado. Brevemente, el mRNA se extrae de las células y se realiza la transcripción inversa para obtener el cDNA. Posteriormente se realiza una transcripción *in vitro* para obtener cRNA marcado con biotina. Estas moléculas de cRNA son expuestas al microarray toda una noche para que hibriden con las sondas. Después el chip se marca estreptavidina conjugada con una molécula fluorescente (ficoeritrina) que se une a la biotina. El protocolo incluye además otro paso para amplificación de la señal mediante un anticuerpo anti-estreptavidina y un anticuerpo IgG biotinilado. Un escáner se encarga de analizar las señales del chip y posteriormente se utilizan avanzados

algoritmos para obtener los datos de los niveles de expresión de los genes de interés (ver figura 15).

11.2.- Muestras y plataforma utilizada para el análisis

Para el estudio de expresión génica se utilizó el GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix Inc.) que nos permitía cubrir el genoma de rata en un solo array, ya que se utilizan más de 31.000 sondas, analizando unos 30.000 transcritos y variantes de unos 28.000 genes bien conocidos de rata.

Se eligieron dos tiempos 0h y 6h en los que se extrajo el RNA de los cultivos sometidos a OGD y también a los cultivos control (normoxia). Para el estudio se utilizaron dos experimentos independientes. En todos los casos, los datos de la OGD se compararon con el control recogido al mismo tiempo. Las muestras de RNA se enviaron al servicio de microarray del hospital Vall d'Hebron, donde se realizó una comprobación de la integridad del RNA mediante 2100 Bioanalyzer (Aligent) y posteriormente realizaron el estudio de expresión génica utilizando el chip de Affymetrix. Una vez realizado el estudio, el servicio nos envió los datos brutos de expresión obtenidos en el chip.

11.3.- Análisis de los datos obtenidos del microarray

Los datos de expresión del chip de Affymetrix en primer lugar se utilizó el programa estadístico RMA (Robust multiarray average) que permite normalizar los datos teniendo en cuenta el background (Irizarry *et al.* 2003). Después se utilizó el paquete informático LIMMA para realizar el estudio estadístico y así identificar los genes up-regulados o down-regulados integrando los duplicados utilizando un valor de $p < 0.05$. Para los genes con varias sondas se eligió la más informativa, teniendo en cuenta el valor de p más pequeño.

Para el análisis posterior de los datos se utilizó el programa estadístico DAVID 2.0 (DAVID Bioinformatics Resources 2008, NIAID/NIH) que está disponible *on-line* (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/summary.jsp>). Este programa ofrece potentes herramientas bioinformáticas, permitiéndonos realizar un análisis ontológico y

además presentar los grupos funcionales de genes en *clusters*. Para realizar estos análisis sólo se introdujeron los genes que tenían un incremento de al menos dos veces su expresión inicial (FC > 2-folds). Los resultados obtenidos del análisis se priorizaron según el *score* EASE (*Expression Analysis Systematic Explorer*). EASE es un software que permite hacer una rápida interpretación biológica de una lista de genes resultantes de un microarray, entre otros. Básicamente, el EASE score es una modificación del valor-P de Fisher para el análisis del incremento de genes. Normalmente a partir de un valor de $p \leq 0.05$ se considera que existe un fuerte incremento de la expresión génica (Hosack *et al.* 2003).

12.- VECTORES LENTIVIRALES

12.1.- Estructura y aplicaciones experimentales

Los vectores retrovirales derivados de lentivirus como HIV1 son herramientas prometedoras tanto para la terapia génica como para la investigación básica, ya que permiten una eficiente internalización, integración y transfección estable de transgenes en células quiescentes (arrestadas en G0) y diferenciadas como las neuronas.

Los lentivirus tienen un complejo genoma ya que aparte de los genes estructurales esenciales (*env*, *gag*, *pol*), contiene genes reguladores que promueven la expresión viral a través de los mecanismos de transcripción y postranscripción (*tat* y *rev*), y genes accesorios que no son necesarios para la replicación viral pero que presentan factores esenciales para la virulencia del virus (*vpr*, *vif*, *vpu* y *nef*) (ver figura 16).

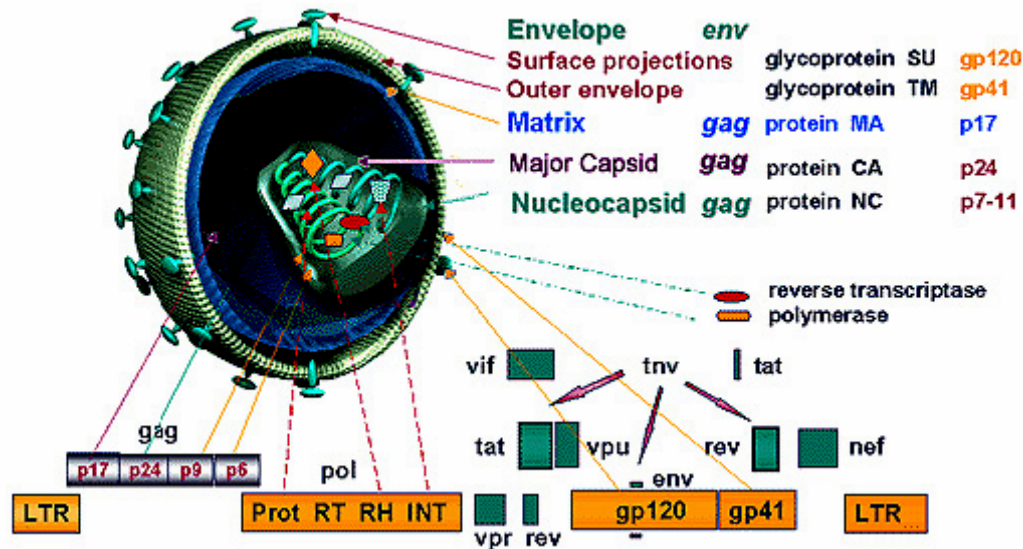


Figura 16. Estructura y genoma de los lentivirus. Recurso: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV> (*The universal virus database of the International Committee on Taxonomy of Viruses*).

Algunas de las ventajas de los lentivirus ya las hemos comentado:

1. Capacidad de integrar su carga en los cromosomas de las células diana, permitiendo así expresiones estables.
2. No codifican para proteínas virales, eliminando las respuestas inmunes contra las células transducidas (problema de los vectores basados en adenovirus).
3. Permiten una alta capacidad de introducción de transgenes, hasta 10kbases de secuencia.
4. Son capaces de infectar tanto células proliferantes como diferenciadas. Una vez el virus ha infectado la célula diana, el vector que contiene el RNA del gen experimental se retrotranscribe a DNA y, este DNA forma un complejo de preintegración formado por la proteína accesoria Vpr, la integrasa y la proteína de matriz. Las secuencias de localización nuclear de estas proteínas permiten que el complejo de preintegración atraviese la membrana nuclear sin tener que esperar a que esta se rompa durante la división celular. Dentro del núcleo, el DNA se integra en el genoma del huésped (ver Figura 17).

Las partículas lentivirales se generan por coexpresión de los elementos de empaquetamiento del virión y del DNA del vector experimental en células productoras HEK 293T. Nosotros utilizamos el sistema de vectores lentivirales de segunda generación diseñados y distribuidos gratuitamente por el Dr. Trono de Laboratory of Virology and Genetics (LVG) and School of Life Sciences Swiss Institute of Technology Lausanne (Switzerland).

Se usan tres plásmidos separados, sin secuencias superpuestas entre ellas para minimizar la posibilidad de recombinación durante la producción de los vectores.

1. Vector lentiviral: en nuestro caso utilizamos el pLVTHM, que contiene solamente el material genético a transferir a la célula diana, flanqueado por los elementos cis-activadores que en el lentivirus real serían necesarios para su encapsidación, transcripción reversa e integración. Contiene una serie de modificaciones para que pierda la capacidad transcripcional de la región viral LTR una vez sea transferido a la célula diana. Esto minimiza el riesgo de aparición de recombinantes de replicación competentes y evita problemas ligados a la interferencia de promotores.

2. Plásmido de empaquetamiento: vector psPAX2 que contiene un promotor CAG (activador de citomegalovirus, CMV, y el promotor y el intrón de la β -actina de pollo) para promover una eficiente expresión de las proteínas Gag, Pol, Tat y Rev del virus. Se le han eliminado además los genes accesorios *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef* para evitar su efecto virulento, ya que no son necesarios para la generación de partículas lentivirales funcionales.

3. Plásmido de la envuelta viral: plásmido pMD2G que codifica para la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV). Se trata de una proteína heteróloga que es usada para pseudotipar las partículas generadas por las otras dos construcciones. La envuelta final ofrece así la ventaja adicional de tener una alta estabilidad que permite la concentración de las partículas por ultracentrifugación (Naldini *et al.* 1996).

Las características de este sistema de transducción hacen que sean muy atractivos no solo para integrar un transgen en la célula huésped, logrando así la sobreexpresión de la proteína, sino también nos permite introducir de forma estable un silenciador de la expresión génica como un RNA de interferencia.

La técnica del RNA de interferencia (RNAi) es el proceso por el cual RNAs de doble cadena silencian la expresión de genes específicos. Brevemente, en primer lugar el enzima DICER reconoce el shRNA (*short hairpin* RNA) y lo corta en fragmentos de RNA de doble cadena (siRNA, *small interfering* RNA) que a la vez son reconocidos por el complejo proteico RISC. Este complejo separa las dos cadenas de RNA y se une preferencialmente a la cadena antisentido. El complejo formado por RISC y la cadena antisentido se dirige a la secuencia de RNA homóloga y la destruye, provocando de esta manera el silenciamiento específico del gen.

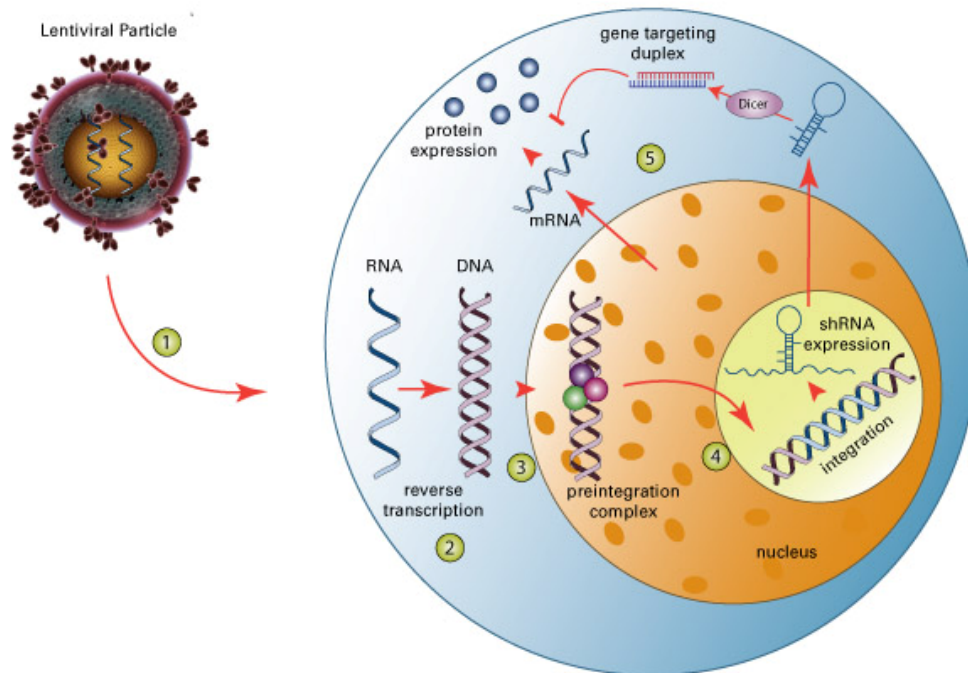


Figura 17. Esquema de transferencia genética de un vector lentiviral con un shRNA mediante la infección una partícula lentiviral. 1- El lentivirus se une directamente a la célula y libera el RNA genómico al citoplasma. 2- El genoma viral se retrotranscribe en el citoplasma. 3- El complejo intermediario de DNA viaja al núcleo de la célula huésped. 4- El complejo intermediario de DNA viral se integra en el genoma del huésped. 5- El constructo para silenciar se expresa constitutivamente y se procesa en pequeños hairpins (shRNA) capaces de silenciar los genes diana. Recurso: <http://www.dharmacon.com/>

12.2.- Generación de los lentivirus

La generación de lentivirus que contengan las secuencias específicas de shRNA se puede dividir en dos partes, la primera en la que se obtiene el vector lentiviral con la secuencia de shRNA insertada y la segunda en la que se generan las partículas víricas.

12.2.1- Obtención del vector pLVTHM-shRNA

El diseño de las secuencias de RNAi se realizó con ayuda la herramienta de siDESIGN[®] Center (*Dharmacon RNAi Technologies*, Thermo Scientific). Los oligonucleótidos diseñados además de las secuencia de RNAi constaba de un *loop* entre la secuencia sentido y antisentido, además de incorporar en los extremos las secuencias de corte para los enzimas de restricción BglII y HindIII (ver tabla I y figura 16).

Una vez diseñados los oligonucleótidos y recibidos de Invitrogen, se procedió al *annealing* de las cadenas complementarias para obtener una cadena de doble DNA que codificaba para una cadena sentido de 19 nucleótidos, un loop de 9 nucleótidos y una cadena de 19 nucleótidos antisentido contra los distintos genes seleccionados. También se diseñó un shRNA con una secuencia al azar (*random*) para utilizarlo como vector lentiviral control, la cual se comprobó que no pertenecía a ningún gen (BLAST). Primero se realizó un subclonaje en el vector pSUPER a través de las dianas de restricción de BglII y HindIII (ver figura 18) y posteriormente se clonó el fragmento H1-shRNA (que comprende el promotor de H1 más la secuencia del shRNA) en el plásmido lentiviral pLVTHM mediante las dianas de restricción de EcoRI y ClaI. A continuación se describe con mayor detalle los métodos y materiales utilizados.

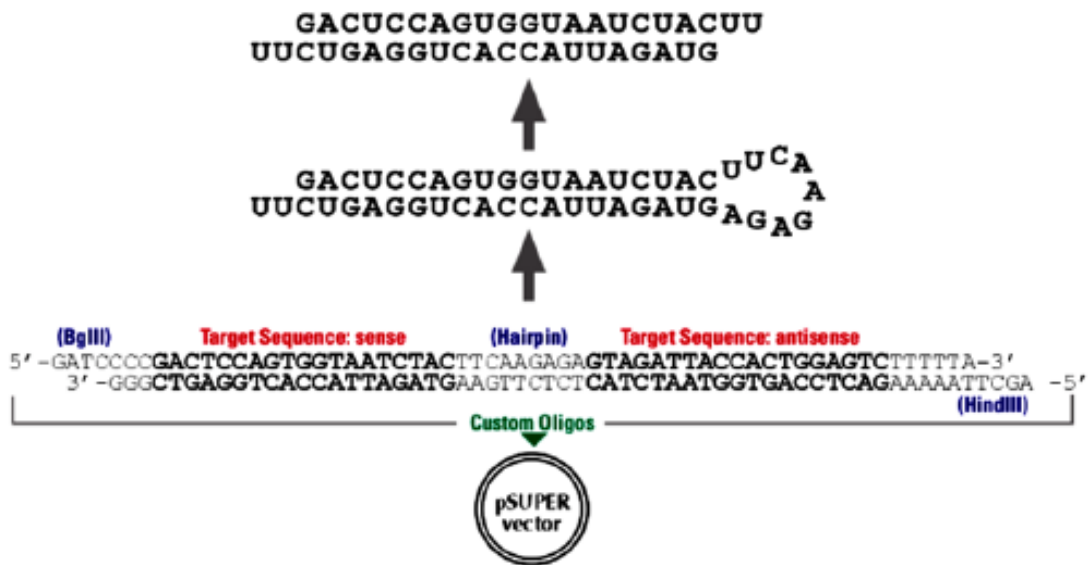


Figura 18. Esquema de la secuencia dentro del plásmido y posterior procesamiento dentro de la célula. Una vez realizado el annealing de los oligonucleótidos, el fragmento de doble cadena de DNA se clona en el vector pSUPER a través de las dianas Bgl II y Hind III.

Gen		Secuencia del oligonucleótido (5'-3')
Atf3	Fw	gatccccGCTGCCAAGTGTCGAAACAttcaagagaTGTTTCGACACTTGGCAGCttttt
	Rv	agctaaaaaGCTGCCAAGTGTCGAAACAtctcttgaaTGTTTCGACACTTGGCAGCggg
Egr1	Fw	gatccccGCGAACAACCCTACGAGCAttcaagagaTGCTCGTAGGGTTGTTTCGCttttt
	Rv	agctaaaaaGCGAACAACCCTACGAGCAtctcttgaaTGCTCGTAGGGTTGTTTCGCggg
Cebpδ	Fw	gatccccCCTTAGAGACTCCGAACGAttcaagagaTCGTTCCGAGTCTCTAAGGttttt
	Rv	agctaaaaaCCTTAGAGACTCCGAACGAtctcttgaaTCGTTCCGAGTCTCTAAGGggg
Nr4a1	Fw	gatccccCTGCAGAACCGCATTGCTAttcaagagaTAGCAATGCGGTTCTGCAGttttt
	Rv	agctaaaaaCTGCAGAACCGCATTGCTAtctcttgaaTAGCAATGCGGTTCTGCAGggg
Nr4a2	Fw	gatccccCCATTAAGGTAGAAGACATtcaagagaATGTCTTCTACCTTAATGGttttt
	Rv	agctaaaaaCCATTAAGGTAGAAGACAtctcttgaaATGTCTTCTACCTTAATGGggg
Nr4a3	Fw	gatccccAGACAAGAGACGTGAAATtcaagagaATTCGACGTCTCTTGCTttttt
	Rv	agctaaaaaAGACAAGAGACGTGAAATtctcttgaaATTCGACGTCTCTTGCTggg
Random	Fw	gatccccAGCGAAAACTTTATCGGAAttcaagagaTCCGATAAAGTTTTTCGCTttttt
	Rv	agctaaaaaAGCGAAAACTTTATCGGAAtctcttgaaTCCGATAAAGTTTTTCGCTggg

Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos que se insertaron en el plásmido pSUPER. En mayúscula se indica la secuencia de 19nt específica del gen diana contra la cual se diseña el RNAi.

Digestión del vector pSUPER

Se realizó una digestión secuencial del plásmido pSUPER. En un tubo añadimos 5µg del plásmido, el tampón de los enzimas de restricción y 10 unidades HindIII (Genecraft) hasta un volumen total de 20µL. Se incubó a 37°C durante 1h, posteriormente se añadieron 10 unidades de BglII (Genecraft) y se incubó durante 2h a 37°C. El producto de la digestión se corrió en un gel de agarosa del 0.8%, y la banda del plásmido se extrajo con utilizando el kit Perfectprep® Gel Cleanup (Eppendorf) siguiendo el protocolo indicado.

Ligación y transformación en DH5α

Una vez purificado el plásmido digerido se realizó una ligación con los oligonucleótidos hibridados, para ello se utilizó el Quick Ligation™ kit (BioLabs). Para realizar la ligación se añadieron 120ng de los oligonucleotidos, 100ng de pSUPER, 1µL de T4 DNA ligasa en un volumen total de 20µL. Después de 10 minutos a temperatura ambiente, se paró la reacción con 5 minutos en hielo. Se tomaron 10µL de la reacción para transformar por choque térmico en células competentes DH5α. Brevemente, las DH5α se descongelaron (30µL) y se les añadieron 10µL del producto de la ligación y se dejaron 30 minutos en hielo. A continuación se realizó un choque térmico de 90 segundos a 42°C en un baño húmedo, tras 2 minutos en hielo se le añadió 1mL de LB (Luria-Bertrani medium, que por cada litro lleva: 10g de triptona, 5g de extracto de levadura, 10g de NaCl, pH 7) y se incubó 1h a 37°C en agitación (200rpm). Pasado este tiempo las células se sembraron en placas de agar con 50µg/ml de ampicilina y se dejaron crecer toda la noche en un incubador a 37°C.

Amplificación de las colonias positivas, miniprep y obtención del fragmento H1-shRNA por digestión con EcoRI y ClaI

Para seleccionar los plásmidos con el inserto y realizar la posterior purificación del fragmento H1-shRNA, se realizó en primer lugar un cultivo líquido de varias colonias de la placa sembrada. Las colonias de la placa de agar se picaron y se crecieron en 3ml de medio LB con ampicilina 50µg/ml durante toda la noche a 37°C y 200rpm.

La purificación del plásmido se realizó utilizando el kit Perfectprep[®] Plasmid Mini (Eppendorf) siguiendo el protocolo indicado.

Durante el proceso de subclonaje en el plásmido pSUPER se adquiere el promotor H1 que posteriormente será reconocido por la polimerasa III. Para obtener este nuevo fragmento, H1-shRNA, el plásmido pSUPER se digiere con los enzimas de restricción EcoRI y ClaI que flaquean el fragmento, de la misma manera se digiere el plásmido pLVTHM vacío. En este caso también se realiza una digestión secuencial, para ello se añaden 5µg de pSUPER, o 1.5µg de pLVTHM con 10 unidades ClaI (Sigma) en un volumen total de 20µL, dejándose incubar durante 2h a 37°C. Posteriormente se añaden 10 unidades de EcoRI (Sigma) y se incuba durante 2h más a 37°C. Todo el volumen de la reacción se cargó en un gel de agarosa del 2.5% y las bandas correspondientes al plásmido pLVTHM abierto y H1-shRNA se extrajeron con el kit Perfectprep[®] Gel Cleanup (Eppendorf) siguiendo el protocolo indicado.

Ligación de los H1-shRNA con el vector PLVTHM

Una vez purificados el fragmento H1-shRNA y el vector pLVTHM abierto, se realizó una ligación para obtener el vector lentiviral con el shRNA bajo el promotor de H1. En la ligación se añadieron 5ng del fragmento H1-shRNA y 50ng del pLVTHM digerido en un volumen final de 20uL. El proceso de selección y amplificación de las colonias además de la extracción del plásmido y la posterior comprobación se hizo como se mencionó anteriormente.

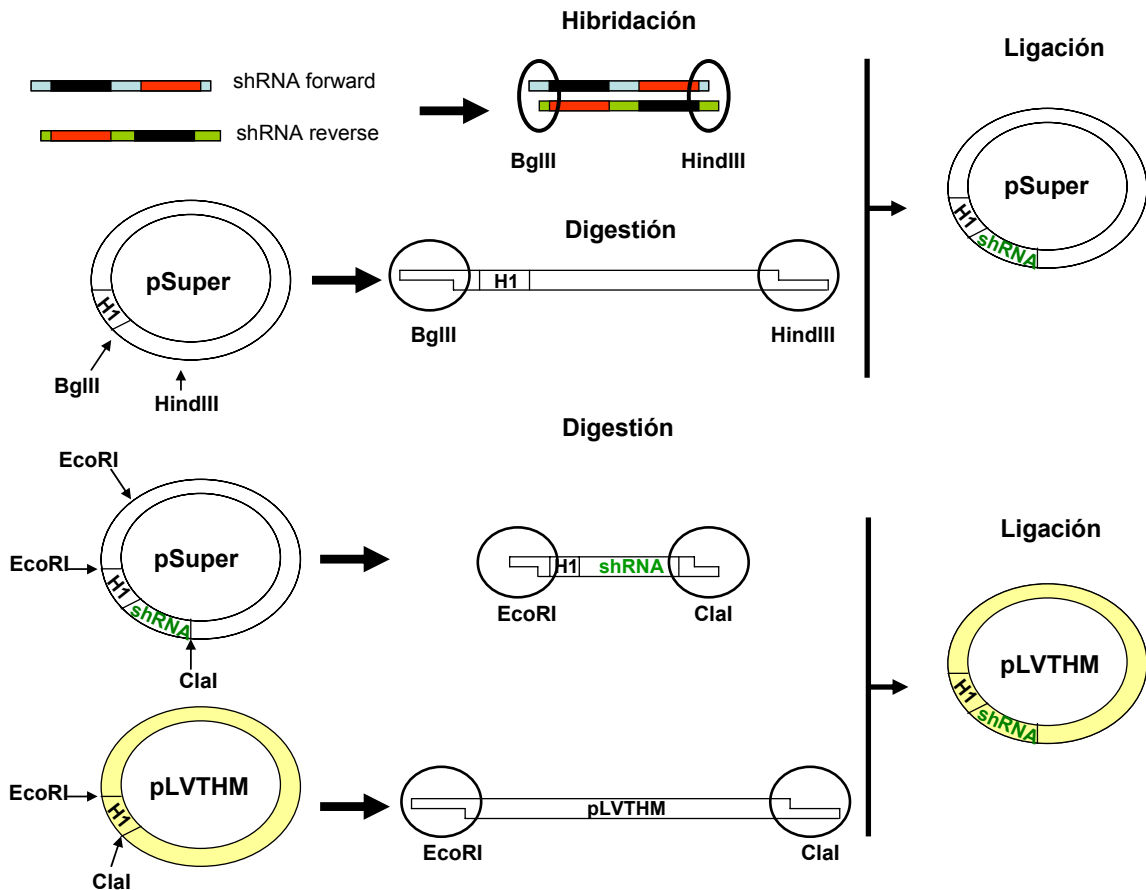


Figura 19. Esquema de la obtención del plásmido lentiviral (pLVTHM) con el H1-shRNA insertado. El primer paso es la hibridación de las secuencias que contienen el shRNA, posteriormente se introducen en un plásmido pSUPER digerido con los enzimas BglIII y HindIII. En el siguiente paso, se digiere el pSUPER con EcoRI para obtener el fragmento H1-shRNA y con los mismos enzimas se corta el pLVTHM. Por último, se liga el fragmento H1-shRNA con el pLVTHM, obteniendo el plásmido lentiviral con la secuencia de sh-RNA bajo el promotor H1.

12.2.2.- Producción de los lentivirus

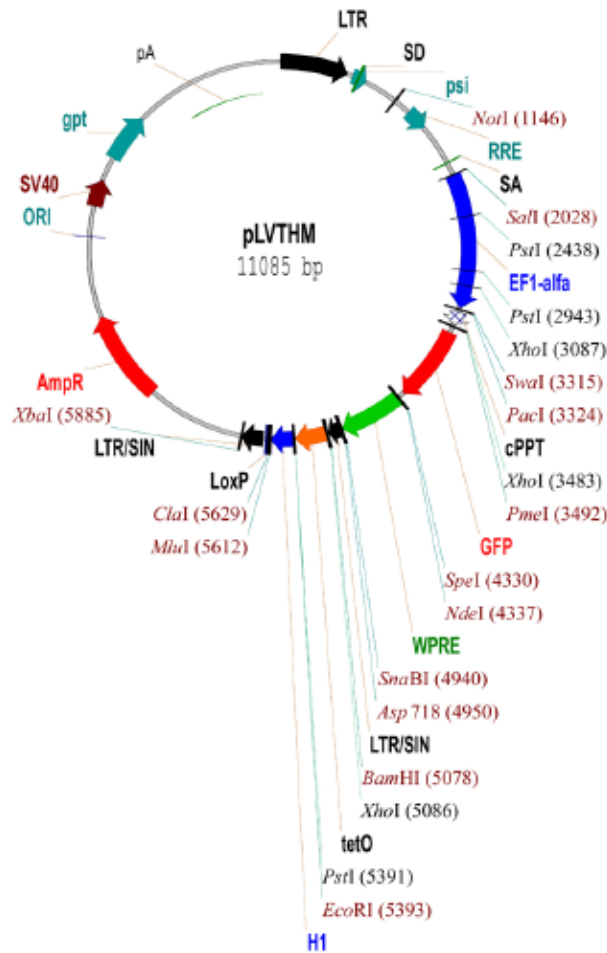
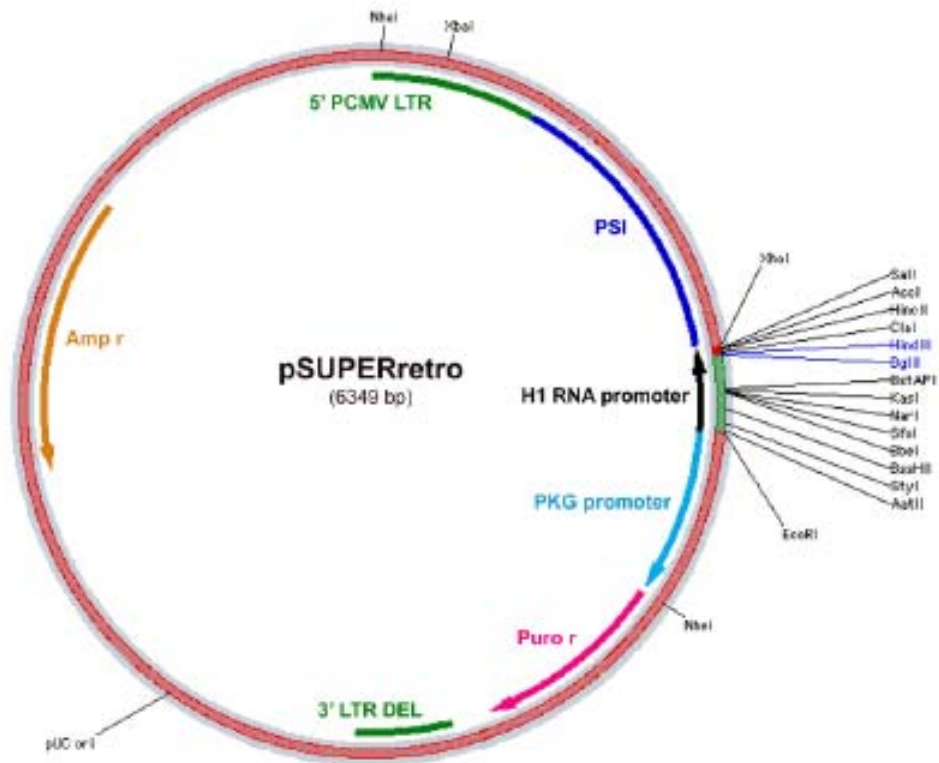
Las partículas víricas pseudotipadas con la proteína G del virus de la estomatitis vesicular se produjeron por transfección transitoria en células HEK 293T plaqueadas en placas de 100mm de diámetro con DMEM con 10% de FBS. Las células se plaquearon el día anterior a la transfección a una densidad de 300.000 células/mL, de manera que a la hora de transfectar estuvieran con una confluencia del 70% aproximadamente. Para transfectar las células se utilizó el método de fosfato cálcico. En un tubo se añadieron 20µg del vector lentiviral (que contiene la construcción shRNA en el plásmido

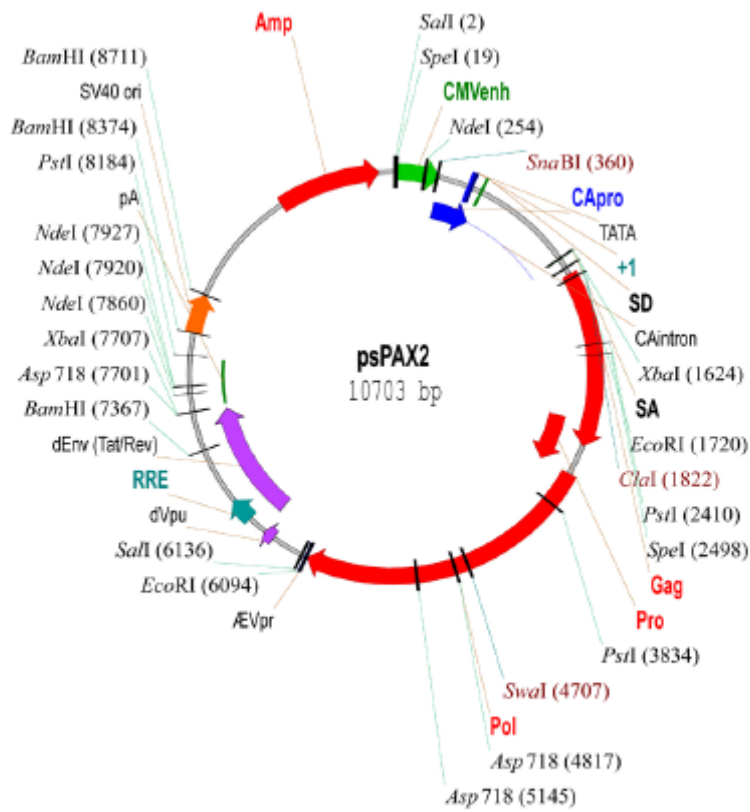
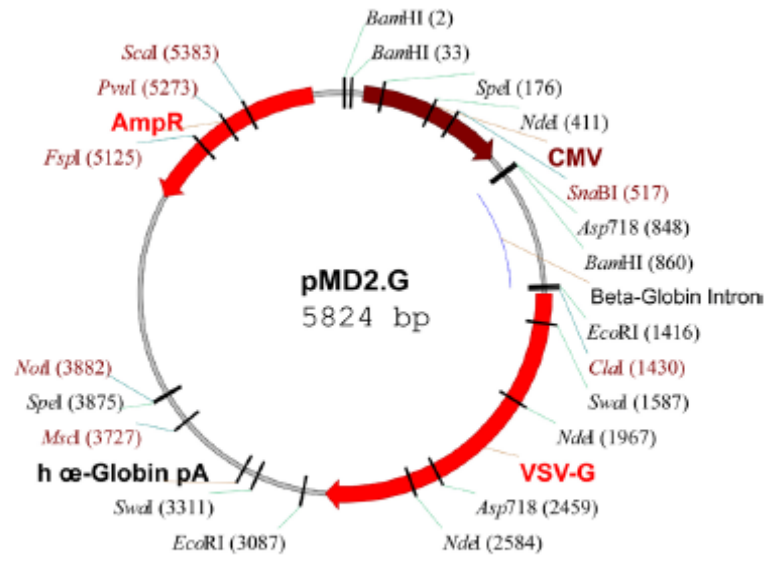
pLVTHM), 13µg del vector vector psPAX2 (codifica para proteínas de la cápside del virus), y 7µg del vector pMD2G (codifica para proteínas de la envuelta viral). Después se añadió agua y HBS (273mM NaCl, 10.2mM KCl, 1.4mM Na₂HPO₄, 42mM Hepes y 10mM de glucosa, pH 7.05). A continuación se añadió CaCl₂ 2.5mM gota a gota para precipitar el DNA. La mezcla se incubó durante 25 minutos a temperatura ambiente y se añadió 1mL a cada placa donde previamente se habían cambiado los 10mL de medio por 5mL de medio fresco. Unas 8 horas después de la transfección se cambió de nuevo el medio por 10mL de medio fresco. 48 horas después de la transfección se recogió el sobrenadante viral y se realizó una ultracentrifugación a 140.000g durante 2 horas a 4°C para obtener las partículas víricas concentradas. Una vez realizada la ultracentrifugación se descartó el sobrenadante, se añadieron 150µL de TNE (50mM Tris HCl pH 7.5, 130mM NaCl y 1mM EDTA) y se dejó toda la noche en agitación (175rpm) a 4°C para resuspender los virus precipitados. Al día siguiente se alicuotaron las partículas víricas y se guardaron a -80°C hasta el momento de utilizarlas.

13.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de las gráficas están expresados como media ± SEM, de un mínimo de 3 experimentos. Los grupos experimentales fueron comparados mediante análisis de varianza con un test ANOVA de una vía, seguido de un test de multicomparación de Bonferroni, cuando era necesario. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

Anexo - Materiales y Métodos





IV - RESULTADOS

1-Trabajo 1: Activation of caspase-8 by tumor necrosis factor receptor 1 is necessary for OGD-mediated caspase-3 activation and apoptosis in cultured cortical cells

Enviado a Neurobiology of Disease

Activation of caspase-8 by tumour necrosis factor receptor 1 is necessary for OGD-mediated caspase-3 activation and apoptosis in cultured cortical cells

Nahuai Badiola^{1,2#}, Cristina Malagelada^{1,2#}, Nuria Llecha⁵, Juan Hidalgo^{1,3}, Joan X. Comella⁴, Josefa Sabriá^{1,2} & José Rodríguez-Alvarez^{1,2}

¹Institut de Neurociències and ²Departament de Bioquímica i Biologia Molecular or ³Departament de Biologia Celular i Fisiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain, ⁴Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Universitat de Lleida, Spain ⁵Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida, Spain.

#both authors contributed equally to this work

Abbreviated title: TNF- α mediated apoptosis in OGD cortical cultures

Number of text pages: 19

Number of figures: 7

Number of tables: 0

Corresponding author: Dr. José Rodríguez Alvarez

Instituto de Neurociencias, Edificio M, Campus de Bellaterra, Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Valles, Barcelona, Spain

Phone: (34) 935 811 525; Fax: (34) 935 811 573; Email: jose.rodriguez@uab.es

ABSTRACT

TNF- α is a pro-inflammatory cytokine which has been reported to play a role in stroke. However the precise function of TNF- α in brain ischemia has been the subject of some controversies with data supporting either detrimental or protective role. Here we show the release and up regulation of TNF- α after oxygen-glucose deprivation (OGD) of cortical cultures. Moreover, OGD-mediated activation of caspase-3 and apoptosis is dependent on TNF- α activation of caspase-8. However, TNF- α action is not involved in OGD-mediated activation of caspase-7 and -9. By using knock-out mice for TNF- α receptor 1, we are able to show that the activation of both caspase-3 and -8 by TNF- α in OGD-treated cultures is mediated by TNF- α receptor 1. The pro-apoptotic role of TNF- α in OGD seems to be restricted to neurons and microglia, since no expression of both TNF- α or TNF- α receptor 1 was found in astrocytes.

Keywords: TNF- α , apoptosis, caspase, ischemia, cell culture, brain.

Acknowledgments: This work was supported by grants from Ministerio de Ciencia y Tecnologia (SAF2001-1941; SAF2005-05106) and Ministerio de Sanidad y Consumo (Red G03/167) to J.R.A. N.B is recipient of a predoctoral fellowship from the Gobierno Vasco. C.M was a recipient of a pre-doctoral fellowship from the Universitat Autònoma de Barcelona

INTRODUCTION

Stroke is a brain injury caused by decreased blood supply to the brain. The deprivation of oxygen and glucose (OGD) in the ischemic brain eventually leads to cell death which was believed to have necrotic features (Rothman and Olney, 1986; Choi, 1988). Over the last decade this view has been challenged. Mounting evidences indicate the appearance of active caspases in the ischemic brain tissue (Hara et al., 1997; Chen et al., 1998) or in cultured cortical neurons transiently deprived of oxygen and glucose (Gottron et al., 1997; Malagelada et al., 2005), suggesting that the loss of neurons by apoptosis might be important, especially in the penumbra area. It has been shown that in OGD-treated cortical cultures, at least 50% of dying cells showed morphological characteristics of apoptosis and the activation of caspase-3, -7 and -9 in neurons and microglial cells (Malagelada et al., 2005).

Several factors are believed to contribute to ischemic brain injury. An increase in glutamate release seems to be a major cause in triggering cellular death (Benveniste et al., 1984), although several other factors such as cytokines could also play an important role. The cytokine tumour necrosis factor α (TNF α) is present in the brain at low levels but it is upregulated more than 100 folds following brain ischemia (Liu et al., 1994; Wang et al., 1994; Barone et al., 1997; Tarkowski et al., 1997), suggesting a role in modulating cellular damage after cerebral ischemia. However whether TNF- α plays a detrimental or protective role in cerebral ischemia is still controversial. The infarct size following middle cerebral artery occlusion is greater in TNF- α knock out mice than in the wild-type mice (Bruce et al., 1996) and some reports suggest that TNF- α is involved in the resistance to injury due to ischemic preconditioning (Nawashiro et al., 1997a; Castillo et al., 2003). Similar results are observed “in vitro” when the cytokine is present before the OGD (Wilde et al., 2000; Romera et al., 2004). On the other hand, several reports have shown that TNF- α is implicated in the cellular damage in response to cerebral ischemia. In this context, it has been reported that intracerebroventricular injection of TNF- α prior to the ischemic period produced an increase in the area of infarction (Barone et al., 1997) and that the administration of TNF- α antibody significantly reduced

the injury after focal ischemia (Dawson et al., 1996; Barone et al., 1997; Nawashiro et al, 1997b). By contrast, almost no data exist indicating whether TNF- α contributes towards the necrotic or apoptotic damage observed after brain ischemia and which mechanisms are involved. For this reason, we decided to explore in OGD-treated cortical cultures whether TNF- α was responsible for the observed apoptotic or necrotic death (Malagelada et al., 2005) and which mechanisms were eventually involved. Our study shows an OGD-mediated increase in the release of TNF- α which promotes an early activation of caspase-8 through TNF- α receptor 1. Moreover, caspase-8 activation is necessary for the subsequent activation of caspase-3, but not caspase-7 or -9, and the OGD-mediated apoptotic death.

MATERIAL AND METHODS

Reagents. Propidium iodide (PI) and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) were provided by Sigma-Aldrich. Hoechst 33258 was obtained from Molecular Probes. The rat TNF- α was obtained from R&D Systems. The caspase 8 inhibitor, Z-IETD-FMK, and the caspase 8 fluorogenic substrate, Ac-IEPD-AMC, were from Bachem. The Caspase 8 Carboxyfluorescein FLICA Apoptosis Detection Kit was obtained from Immunochemistry Technologies. The rat TNF ELISA Kit was purchased from Diaclone. All other reagents were from Sigma and Calbiochem.

Antibodies. The antibodies against cleaved caspase 3, cleaved caspase 7 and cleaved caspase 9 were from Cell Signalling. Anti-microtubule-associated protein-2 (MAP2), anti-neuronal nuclei (NeuN) and anti-gliial fibrillary acidic protein (GFAP) were from Chemicon. The antibody against OX-42 was obtained from Serotec. The antibody against TNFR1 was purchased from Santa Cruz Biotechnology. The antibody against TNF- α was obtained from Peprotech. The secondary antibodies conjugated with fluorescein were from Molecular Probes. Horseradish peroxidase anti rabbit-secondary antibody, anti CD11b and anti α -tubuline were from BD PharMingen.

Cell cultures. Primary cultures of mouse or rat cortical cells, containing both neurons and glia, were prepared as described by (Goldberg et al., 1993; Malagelada et al 2005) with modifications, from foetal Wistar rats or C57BL mice at 17 days of gestation. The dissociated cells were plated onto poly-L-lysine pre-coated wells at a density of 3×10^5 cells/cm² in Basal Medium Eagle (BME) supplemented with 5% foetal calf serum, 5% horse serum, 50 U/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin, 2 mM glutamine and 10 mM glucose. Cultures were kept at 37°C, 100% humidity and in a 95% air/ 5%CO₂ atmosphere until 7 days in vitro (DIV; cultures from rats) or 4 DIV (cultures from mouse), when the plating medium was replaced by BME supplemented as above without foetal calf serum and with 10% horse serum containing 10 µM cytosine arabinoside to arrest non-neuronal cell proliferation. The experiments were performed with mature cultures, at 9-13 DIV. The procedures followed were in accordance with guidelines of the Comissió d'Ètica en l'Experimentació Animal i Humana of the Universitat Autònoma de Barcelona.

Oxygen-glucose deprivation. Cultures were oxygen and glucose deprived (OGD) as described before (Malagelada et al., 2004). The culture medium was replaced by a glucose-free Earle's balanced salt solution (BSS) with the following composition: NaCl 116 mM, KCl 5.4 mM, MgSO₄·7H₂O 0.8 mM, NaH₂PO₄·2H₂O 1 mM, NaHCO₃ 26.2 mM, Glycine 0.01 mM, CaCl₂·2H₂O 1.8 mM, pH 7.4, which was previously saturated with 95%N₂/5%CO₂ at 37°C. The cultures were then placed in an airtight incubation chamber (CBS Scientific) equipped with inlet and outlet valves, and were equilibrated for 15 minutes with a continuous flux of gas (5%CO₂/95%N₂). The chamber was then sealed and placed into a humidified incubator at 37°C for 75 min. OGD was terminated by removing the cultures from the airtight chamber, replacing the deoxygenated and glucose-free BSS with the pre-OGD culture medium and returning the cells to the normoxic conditions. Control sister culture plates were exposed to oxygenated BSS containing 5.5 mM glucose in normoxic conditions during the same period of time as the OGD cultures. When used, the caspase 8 inhibitor was present in culture media 60 minutes before OGD.

TNF- α release determination. The cells were plated on 24 well plates and exposed to OGD or normoxic conditions as described above. 24 h later the media were collected and the concentration of TNF- α was measured using a rat TNF ELISA kit according to the instructions of the manufacturer. Total protein concentration was measured by the Bradford method (Bradford, 1976). TNF- α values were normalized to the total protein per well.

Fluorescent analysis of necrosis and apoptosis. Cells were stained with Propidium Iodide (PI) and Hoechst 33258. PI (10 μ M) was added to the cultures 12-16 h after OGD. To perform the staining with Hoechst 33258, the cells were fixed in ice-cold 4% paraformaldehyde and then incubated for 10 min at room temperature with 1 μ g/ml Hoechst 33258. Cells were analyzed under a non-confocal fluorescent Leica microscope. Because in our experimental conditions Hoechst 33258 stains all nuclei and PI stains the nuclei of cells with disrupted plasma membrane, the nuclei of viable, necrotic, and apoptotic cells were observed as blue intact nuclei, red round nuclei, and fragmented (or condensed) nuclei, respectively (Malagelada *et al.*, 2005). Cells were counted, by a blinded investigator, from at least 3 independent experiments. In each experiment, more than 750 cells were examined in random fields from 3 or more culture wells for each condition. Our cultures showed around 8% of apoptotic and 3% of necrotic cells under basal conditions (data not shown; Malagelada *et al.*, 2005).

Cell viability. Cell viability was monitored by the colorimetric 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay as described (Mossmann *et al.*, 1983). MTT (0.3 mg/ml) was added to cultures and incubated for 40 min at 37°C. The reaction media were then aspirated and DMSO was used to solubilise the blue formazan product prior its quantification at 570 nm (Labsystems Multiskan RC). Results were expressed as the percentage of viable cells in OGD-exposed plates compared with control normoxic plates.

RNA Isolation. Total RNA was obtained with Trizol[®] Reagent (Invitrogen) following the manufacturer's indications; 1.8 million cells were used per ml of

Trizol. The integrity of RNA was always checked by electrophoresis in an agarose gel.

Reverse transcription - Quantitative PCR. cDNA was synthesized from 1 µg total RNA using SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kit (Invitrogen) following the manufacturer's indications. The reaction was performed in a Thermal Cycler as follows: 65°C for 5 min, 42°C for 50 min and 70°C for 15 min. Samples were then kept at -20°C until their utilization. PCR amplifications were performed on the ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems), using 96-well microtiter plates. They were performed in a total volume of 25 µl, containing 5 µl cDNA sample (equivalent to 100 ng), 20 µM of probe, 10 µM of forward and reverse primers, and 1X Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystems). PCR amplifications were always performed in duplicate wells, using the following temperature cycles: 2 min at 50°C, 10 min at 55°C followed by 40 cycles consisting of 15 s at 94°C and 1 min at 60 °C. A sample without cDNA was used as negative control. The quantification was performed by the comparative Ct (Cycle threshold) method (Livak and Schmittgen, 2001), using glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as internal control. The primers were designed and provided by Applied Biosystems, Rn 00709830-m1 for TNF-α, Rn 00565310-m1 for TNFR1 and the Rodent GAPDH Control Reagent for GAPDH.

Caspase 8 activity assay. Cortical cells were washed with PBS and then homogenized in lysis buffer (100 mM HEPES pH 7.5, 10% sucrose, 1 mM EDTA, 20 µM EGTA, 0,1% CHAPS, 10 mM DTT, leupeptin 10 µg/ml, ortovanadate 1 mM, aprotinin 2 µg/ml and PMSF 1mM). Caspase 8 activity was assayed by monitoring the cleavage of the tetrapeptide Ac-IETD-AMC in a fluorescence plate reader (Wallac 1420 VICTOR3, Perkin Elmer, Inc). The reaction was followed for 15 min after addition of 25 µM of the substrate to cell lysate (10 µg protein) in 250 µl of lysis buffer.

Western blot analysis. Extracts of cell cultures were prepared by lysis in Mammalian Protein Extraction Reagent (M-PER™; Pierce). Protein content was determined by the Bradford method {Bradford, 1976 586 /id}. 25 µg of protein

were resolved on a 15% SDS-PAGE gel and transferred onto Hybond-P (Amersham Biosciences) polyvinylidene difluoride membranes. The blots were blocked with 5% BSA in TBS containing 0.1% Tween 20 and incubated overnight at 4°C in a blocking buffer containing primary antibodies against cleaved caspase-3 (1:1000), MAP-2 (1:1000), or α -tubulin (1:10.000). The blots were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:10.000) in blocking buffer and developed using the Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate method (Pierce).

Immunohistochemistry. The cells were plated on BICOAT™ 8-wells culture slides (Becton Dickinson) and fixed in 4% paraformaldehyde in TBS (100 mM Tris, 0.9% NaCl, pH 7.6) for 1 hour at 4°C. After washing, the cells were blocked for 1 hr in TBS-Tween 0.1% containing 5% bovine serum albumin (BSA) and then incubated overnight at 4°C with the primary antibodies against the active form of caspase-3,-7 or 9 (diluted 1:100 in blocking buffer). The same was performed with antibodies against TNF- α (1:100) and against TNFR1 (1:100). The cell-specific markers, MAP-2 (neurons; 1:200), NeuN (neurons; 1:500), GFAP (astrocytes; 1:200) and OX42 (microglia; 1:200) were used to identify the phenotype of the cells showing caspase activation or cells expressing TNF- α and TNFR1. The cells were washed with TBS-Tween 0.1% and then incubated with the appropriate secondary antibodies Alexa fluor 488 or 594 (1:500) in blocking buffer. Culture slides were then mounted and the cells were analyzed by epifluorescence with Leica microscope.

Statistical analysis. Statistical significance was determined by one-way analysis of variance followed by Tukey's multiple comparison test. A value of $p < 0.05$ was accepted as denoting statistical significance.

RESULTS

TNF- α is involved in OGD-mediated apoptotic death

TNF- α has been involved in stroke-mediated damage in the brain (Barone *et al.*, 1997). However, other reports have suggested that the cytokine could exert a neuroprotective role in certain conditions (Mattson *et al.*, 1998). In the first set of experiments we wanted to test the role of TNF- α in OGD-mediated cell death in cortical cultures by blocking TNF- α biological actions with the presence in the culture medium of anti-TNF- α . As previously reported (Malagelada *et al.*, 2004; 2005), exposure of mixed cortical cultures to OGD produced a marked reduction in cell viability monitored by the MTT assay. A 90-min exposure to OGD produced a 55% decrease in cell viability measured 24 hr after the OGD period (data not shown). Blockade of TNF- α by the presence of 1 $\mu\text{g/ml}$ of anti-TNF- α in the culture medium produced a 45% reduction in OGD-mediated cell death (Fig. 1A). This observation suggests that TNF- α is released after OGD. Accordingly, we have observed a 2-fold increase in TNF- α in the culture medium after OGD (Fig. 1B). We have previously described (Malagelada *et al.*, 2005) that when cultures are deprived of oxygen and glucose for more than 45 min, a 50% of the dying cells showed morphological features of apoptosis and the other 50% were necrotic. In order to know the eventual contribution of TNF- α in OGD-mediated apoptosis or necrosis, we examined the nuclear morphology and the integrity of plasma membrane in OGD-treated cultures in the presence of the anti-TNF- α . As indicated in Fig 1C and D, the blockade of TNF- α produced a strong reduction in the number of cells with condensed or fragmented chromatin 24 hrs after OGD. By contrast, no reduction in the number of PI positive cells (compromised plasma membrane) was observed (Fig. 1D). These data indicate that TNF- α contributes to OGD-mediated apoptotic death.

TNF- α induces apoptosis in cultured cortical cells

The above mentioned results suggested that TNF- α was involved in OGD-mediated cell death in our cortical cultures. Accordingly, addition of TNF- α to culture media should produce cell death. Indeed, that was our observation. As it is shown in Fig 2A, the cytokine produced a significant and dose-dependent decrease in cell viability. A maximal effect was already observed at 1 ng/ml of TNF- α . Treatment for 24 hr with TNF- α produced a 20% decrease in cell viability vs. control cultures whereas a 30% decrease was observed in cultures treated for 48 hr with the cytokine. When the extension of necrotic and apoptotic death was monitored, we found that TNF- α increased the number of cell with condensed or fragmented nuclei (Fig 2B) but did not modify the percentage of cell with compromised plasma membrane (data not shown). Thus, these data further support the pro-apoptotic effect of TNF- α in cortical cell cultures.

The expression of TNF- α and TNFR1 in neurons and microglia is increased after OGD.

Since neurons, astrocytes and microglia are present in our cortical cell cultures (Malagelada et al., 2005) we decided to perform double labelling immunocytochemistry to assess the phenotype of cells expressing TNF- α and TNFR1. For this purpose we used MAP2 as a neuronal marker, GFAP for astroglia and OX-42 for microglia. Our results indicated that both TNF- α and TNFR1 are expressed in neurons and microglial cells, but not in astrocytes (Fig. 3A). The cellular distribution of the TNF- α and TNFR1 immunoreactivity did not change after OGD (data not shown). However, when the expression of *tnfa* and *tnfr1* was monitored by quantitative RT-PCR, a significant time-dependent increase in both genes was evident after OGD. A 3-fold increase in *tnfa* and a 5-fold increase in *tnfr1* were observed 3 hr after OGD (Fig. 3B).

OGD-mediated activation of caspase-3, but not of caspase-7 and -9, is TNF- α -dependent

Apoptotic cell death after cerebral ischemia is associated to activation of caspases. Accordingly, we have previously shown that OGD causes the activation of caspase-3, -7 and -9 in cortical cell cultures (Malagelada et al., 2005). Caspases activation was observed in neurons and microglia but not in astrocytes, precisely, the same types of cells in which TNF- α and TNFR1 is expressed (Fig. 3A). Since we have seen that TNF- α promotes apoptotic cell death in cultures exposed to OGD we wanted to explore whether OGD-mediated caspases activation was triggered by TNF- α . As it is shown in Fig 4A, the presence in the culture media of anti-TNF- α antibody produced a marked reduction in the number of immunoreactive cells for the active form of caspase-3. By contrast, inhibition of TNF- α did not change the number of cells showing active caspase -7 and -9. The decrease in caspase-3 cleavage was further confirmed by immunoblotting. OGD caused an increase in the expected caspase-3 cleaved product p17/p20 that was prevented by the presence of TNF- α antibody (Fig 4B). Since TNF- α seems to be responsible for OGD-mediated caspase-3 activation but not for the activation of caspase-7 and -9, we expected to find similar results in cortical cultures treated with exogenous TNF- α . Indeed, TNF- α treatment caused an increase in the number of cells positive for active caspase-3. However the presence of positive cells for active caspase-7 or -9 was not detected (data not shown). As it is observed after OGD, treatment with TNF- α elicited the activation of caspase-3 in neurons and microglia (Fig 4C). Altogether, these data indicate that OGD-mediated cleavage of caspase-3 in neurons and microglial cells is elicited by TNF- α . Interestingly, OGD-mediated activation of caspase-7 and -9 is independent of TNF- α .

Activation of caspase-8 in OGD is mediated by tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1)

Because it has been described that TNF- α can activate caspase-8 (Boldin et al., 1996), we wanted to know whether this initiator caspase was responsible for the OGD and TNF- α -mediated activation of caspase-3. When OGD was triggered in

the presence of IETD-FMK, a specific inhibitor of caspase-8, cell death after 24 hr was greatly reduced (more than 50% inhibition; Fig 5). Our results indicate that caspase-8 inhibition confers neuroprotection against OGD. To further evaluate the role of caspase-8 in OGD-mediated cell death we decided to compare caspase-8 activity in OGD-treated vs. control cultures by a fluorimetric assay. As indicated in Fig 6A, OGD caused an increase in caspase-8 activity that was evident from the OGD period through the whole time monitored afterwards (until 6 hr post-OGD). At the latest time-point monitored, OGD produced a 4-fold increase in caspase-8 activity when compared with normoxia cultures. This increase in caspase-8 was mediated by TNF- α since it was significantly reduced by incubation of OGD-treated cultures with TNF- α antibody (Fig 6B). TNF- α dependent activation of caspase-8 has been reported in other tissues to be mediated by TNFR1 stimulation (Hsu et al., 1996). To explore whether TNFR1 was involved in OGD-mediated caspase-8 activation we took advantage of the use of cortical cell cultures obtained from TNFR1 knock-out mouse. Similarly to rat cortical cell cultures, a significant increase in caspase-8 activity was observed after OGD in cultures obtained from wild-type mice. By contrast, no activation of caspase-8 was observed in cultures derived from the TNFR1 knock-out mice (Fig. 6C). These data strongly support that OGD-mediated activation of caspase-8 is elicited by TNF- α activation of TNFR1.

Caspase-8 is involved in OGD-mediated activation of caspase-3

Activation of caspase-8 by OGD is observed early after the OGD period (see Fig 6A), whereas the presence of cleaved caspase-3 was clearly evident 6 hr after OGD (Fig 4A and Malagelada et al., 2005), suggesting that TNF- α activation of caspase-8 could be responsible for OGD-mediated caspase-3 activation. Results presented in fig 7 clearly support this possibility. When cortical cell cultures were oxygen and glucose deprived in the presence of IETD-FMK, a significant reduction in the number of cells showing active-caspase-3 was observed (Fig. 7A). Moreover, we have also observed that in OGD-treated cortical cell cultures from TNFR1 KO mice, there was an important reduction in the number of cleaved caspase-3 positive cells in comparison with cultures obtained from wild type animals (Fig. 7B). These results clearly indicate

that the activation of caspase-8 by TNFR1 is necessary for the OGD-mediated activation of caspase-3.

DISCUSSION

Although the major cause of cellular injury in cerebral ischemia is believed to be an excess in glutamate release (Benveniste et al., 1984), it seems clear that other factors, such as cytokines, may have an important role in shaping the dimension of the ischemic lesion. TNF- α is a key inflammatory cytokine which has been reported to have an important role after focal ischemia. However, the precise role of TNF- α in stroke is still a subject of controversy with data supporting both protective (Bruce et al., 1996; Nawashiro et al., 1997; Castillo et al., 2003) and detrimental (Dawson et al., 1996; Barone et al., 1997) roles.

In this study, we have used the oxygen and glucose deprivation (OGD) paradigm in mixed cortical cultures as an *in vitro* approach to evaluate the eventual role of TNF- α in cerebral ischemia. By using this paradigm, we have previously shown (Malagelada et al., 2004; 2005) the simultaneous presence of necrotic and apoptotic cells and that the apoptotic death represents at least 50% of total cell death. Here we show that 90 minutes of OGD triggers the release of TNF- α to the extracellular medium and that the blockade of TNF- α with anti-TNF- α produced a marked reduction in OGD-mediated apoptotic cell death but not in OGD-mediated necrotic death. As expected, the treatment of mixed cortical cultures with exogenous TNF- α produced a dose-dependent increase in apoptosis but did not produced significant necrotic death. Enhancement of damage by TNF- α has been previously described in *in vivo* models of ischemia. For example, intracerebroventricular administration of TNF- α did increase the lesion area after focal ischemia (Barone et al 1997) and the inhibition of TNF- α action by soluble TNF receptors or by anti-TNF- α antibodies reduced the ischemic damage (Dawson et al., 1996; Nawashiro et al., 1997). However, these studies did not shown whether TNF- α promoted necrotic and/or apoptotic death. Moreover, the pro-death effect of the cytokine was attributed to its pro-inflammatory action on vascular endothelial cells (Akassoglou et al., 2003). In this respect, our study shows for the first time that TNF- α mediates

apoptotic death (but not necrosis) in cerebral ischemia and that the pro-apoptotic effect is due to a direct action on neurons and glia and is independent of a pro-inflammatory action on endothelial cells. Interestingly, it has been reported in cortical cultures that exposure to a sublethal OGD (less than 20 min) elicit an ischemic preconditioning event mediated by TNF- α that results in a subsequent resistance of the cultures to lethal OGD exposures (Romera et al., 2004). Thus, it seems that the beneficial or detrimental role of TNF- α in cerebral ischemia seems to depend on both the time of TNF- α release and the intensity of the ischemic insult.

The observed release of TNF α triggered by OGD was accompanied by an increase in both the expression of *tnf- α* and *tnfr-1*. An increase in both mRNA was already observed at 90 min. Expression was further increased at 3 hr after OGD (no longer time was studied). A similar increase in *tnf- α* has been described during the first day after middle cerebral artery occlusion (Yang et al., 1999; Gregersen et al., 2000). By contrast, no previous data existed about an up-regulation of a TNF- α receptor after ischemia.

Few data is available about the molecular mechanisms triggered by TNF- α which are involved in cellular damage in stroke. As indicated above, our results suggest that this cytokine is involved in OGD-mediated apoptosis and we have previously shown (Malagelada et al., 2005) that activation of caspase-3, -7 and -9 in neurons and microglia is observed in cortical cultures following OGD. In this context, the blockade of TNF- α produced a significant reduction in OGD-mediated caspase-3 activation. Accordingly, an activation of caspase-3 was observed when cortical cultures were treated with TNF- α . Although TNF- α -mediated activation of caspase-3 has been already reported in endothelial (Grethe et al., 2004; Ohtani et al., 2006) and hippocampal cells (Zhao et al., 2001), this is, to our knowledge, the first report in cortical cells and in an experimental paradigm of stroke. Interestingly, we did not observe a reduction of OGD-mediated caspase-7 and -9 when TNF- α was blocked. Also, no activation of these caspases was observed in TNF- α -treated cortical cultures. Thus, we could conclude that whereas caspase-3 is activated after OGD mainly

by a TNF- α -dependent pathway, the activation of caspase-7 and -9 is independent of TNF- α .

Caspase-3 activation seems to be a major event in the apoptotic death triggered by cerebral ischemia (Hara et al., 1997; Chen et al., 1998; Namura et al., 1998). This effector caspase is activated mainly by a limited proteolysis catalyzed by initiator caspases like caspase-8 and -9 (Earnshaw et al., 1999). It is well documented that TNF- α activates caspase-8 in some cell types like MCF7 breast carcinoma cells, U937 human monocyte or L929 mouse fibroblasts (Boldin et al., 1996; Monney et al 1998; Srinivasan et al., 1998). Activation of caspase-8 has also been reported after middle cerebral artery occlusion (Plesnila et al., 2001), although it was not related to TNF- α . In the present study we have observed a TNF- α -dependent activation of caspase-8 in OGD-treated cortical cultures. The activation of caspase-8 was observed during the first 6 hr after OGD, earlier than when the OGD-mediated activation of caspase-3 has peaked (Malagelada et al., 2005). Caspase-8 mediated activation of caspase-3 was further supported when inhibition of the former was able to block OGD-mediated caspase-3 activation. Moreover, the inhibition of caspase-8 did almost completely block OGD-mediated apoptotic cell death. This data shows that caspase-8 activation by TNF- α is a key factor in OGD-mediated apoptotic cell death. Two mechanisms could explain how caspase-3 could be activated by caspase-8: a) direct cleavage mechanism (Stennicke et al., 1998a) or b) caspase-8 truncation of Bid to tBid, allowing the release of cytochrome C, the activation of caspase-9 (Stennicke et al., 1998b; Gross et al., 1999b; Plesnila et al., 2001; Yin et al., 2002) and the subsequent activation of caspase-3. We favoured a direct cleavage mechanism since, as indicated above, we observed that OGD-mediated caspase-9 activation was a TNF- α independent event.

TNF- α exerts its biological actions through two plasma membrane receptors, the TNFR1 and the TNFR2. Both receptors are coexpressed in most tissues including the CNS, where TNFR1 is present in both glia and neurons and TNFR2 seems to be restricted to microglia and neurons (Perry et al., 2002; refs). In our cultures we have detected the presence of TNF- α and TNFR1 in

both neurons and microglia. However we did observe neither the cytokine nor the receptor in astrocytes. TNF- α receptors are associated to distinct cellular responses. Whereas stimulation of TNFR1 can signal almost all TNF- α action including cell death and proliferation, the TNFR2 signalling seems to be limited to certain cell systems and used to be related to proliferative responses (Aggarwal, 2003). Little is know about the role of these receptors in TNF- α -mediated effects in stroke. TNFR2 activation seems to have a proinflammatory role in the CNS vascular endothelium suggesting that it could be involved in inflammation in cerebral ischemia (Akassoglou et al., 2003). On the other hand, it has been reported that TNFR1 activation mediates the role of TNF- α in ischemic tolerance (Romera et al, 2004; Pradillo et al., 2005) through a mechanism that involves the up-regulation of neuronal glutamate transporters (Pradillo et al., 2006). However, it is not know which TNF- α receptor could mediate the cytokine-mediated cell death observed in cerebral ischemia. Studies with cortical cultures obtained from TNFR1 knock-out mice allow us to demonstrate that TNF- α -mediated caspase-8 was mediated by TNFR1 since OGD was unable to activate caspase-8. Moreover, no OGD-mediated caspase-3 was also observed. These results support the data obtained with caspase-8 inhibitor, showing that caspase-3 was dependent on the activation of caspase-8 by TNF- α .

In summary, the results presented here demonstrate that TNF- α has an important role in the OGD-mediated apoptosis. We have observed an OGD-mediated release of TNF- α which promotes the activation of caspase-8 through TNFR1. TNF- α -mediated caspase-8 activation is needed for the OGD-mediated activation of caspase-3 (but not of caspase-7 and -9) and apoptosis.

REFERENCES

Aggarwal BB (2003) Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3: 745-756.

Akassoglou K, Douni E, Bauer J, Lassmann H, Kollias G, Probert L (2003) Exclusive tumor necrosis factor (TNF) signaling by the p75TNF receptor triggers

inflammatory ischemia in the CNS of transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 709-714.

Barone FC, Arvin B, White RF, Miller A, Webb CL, Willette RN, Lysko PG, Feuerstein GZ (1997) Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury. Stroke 28: 1233-1244.

Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer N (1984) Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. J Neurochem 43: 1369-1374.

Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D (1996) Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. Cell 85: 803-815.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254.

Bruce AJ, Boling W, Kindy MS, Peschon J, Kraemer PJ, Carpenter MK, Holtzman FW, Mattson MP (1996) Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. Nat Med 2: 788-794.

Castillo J, Moro MA, Blanco M, Leira R, Serena J, Lizasoain I, Davalos A (2003) The release of tumor necrosis factor-alpha is associated with ischemic tolerance in human stroke. Ann Neurol 54: 811-819.

Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu RL, Graham SH, Simon RP (1998) Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. J Neurosci 18: 4914-4928.

Choi DW (1988) Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and the role in ischemic damage. Trends Neurosci 11: 465-469.

Dawson DA, Martin D, Hallenbeck JM (1996) Inhibition of tumor necrosis factor- α reduces focal cerebral ischemic injury in the spontaneously hypertensive rat. *Neurosci Lett* 218: 41-44.

Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68: 383-424.

Goldberg MP, Choi DW (1993) Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell cultured neurons: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci* 13: 3510-3524.

Gottron FJ, Ying HS, Choi DW (1997) Caspase inhibition selectively reduces the apoptotic component of oxygen-glucose deprivation-induced cortical neuronal cell death. *Mol Cell Neurosci* 9: 159-169.

Gregersen R, Lambertsen K, Finsen B (2000) Microglia and macrophages are the major source of tumor necrosis factor in permanent middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 53-65.

Grethe S, Ares MP, Andersson T, Porn-Ares MI (2004) p38 MAPK mediates TNF-induced apoptosis in endothelial cells via phosphorylation and downregulation of Bcl-x(L). *Exp Cell Res* 298: 632-642.

Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ (1999) Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* 274: 1156-1163.

Hara H, Fink K, Endres M, Friedlander RM, Gagliardini V, Moskowitz MA (1997) Attenuation of transient focal cerebral ischemic injury in transgenic mice expressing a mutant ICE inhibitory protein. *J Cereb Blood Flow Metab* 17: 370-375.

Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV (1996) TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84: 299-308.

Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, Feuerstein GZ (1994) Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke* 25: 1481-1488.

Malagelada C, Xifro X, Badiola N, Sabria J, Rodriguez-Alvarez J (2004) Histamine H2-receptor antagonist ranitidine protects against neural death induced by oxygen-glucose deprivation. *Stroke* 35: 2396-2401.

Malagelada C, Xifro X, Miñano A, Sabriá J, Rodriguez-Alvarez J (2005) Contribution of caspase-mediated apoptosis to the cell death caused by oxygen-glucose deprivation in cortical cell cultures. *Neurobiol Dis* 20: 27-37.

Monney L, Olivier R, Otter I, Jansen B, Poirier GG, Borner C (1998) Role of an acidic compartment in tumor-necrosis-factor-alpha-induced production of ceramide, activation of caspase-3 and apoptosis. *Eur J Biochem* 251: 295-303.

Mossmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.

Namura S, Zhu J, Fink K, Endres M, Srinivasan A, Tomaselli KJ, Yuan J, Moskowitz MA (1998) Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *J Neurosci* 18: 3659-3668.

Nawashiro H, Martin D, Hallenbeck JM (1997) Neuroprotective effects of TNF binding protein in focal cerebral ischemia. *Brain Res* 778: 265-271.

Ohtani T, Nakamura T, Toda K, Furukawa F (2006) Cyclophosphamide enhances TNF-alpha-induced apoptotic cell death in murine vascular endothelial cell. *FEBS Lett* 580: 1597-1600.

Perry SW, Dewhurst S, Bellizzi MJ, Gelbard HA (2002) Tumor necrosis factor-alpha in normal and diseased brain: Conflicting effects via intraneuronal receptor crosstalk? *J Neurovirol* 8: 611-624.

Plesnila N, Zinkel S, Le DA, Amin-Hanjani S, Wu Y, Qiu J, Chiarugi A, Thomas SS, Kohane DS, Korsmeyer SJ, Moskowitz MA (2001) BID mediates neuronal

cell death after oxygen/ glucose deprivation and focal cerebral ischemia. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 15318-15323.

Pradillo JM, Hurtado O, Romera C, Cardenas A, Fernandez-Tome P, Alonso-Escolano D, Lorenzo P, Moro MA, Lizasoain I (2006) TNFR1 mediates increased neuronal membrane EAAT3 expression after in vivo cerebral ischemic preconditioning. Neuroscience 138: 1171-1178.

Pradillo JM, Romera C, Hurtado O, Cardenas A, Moro MA, Leza JC, Davalos A, Castillo J, Lorenzo P, Lizasoain I (2005) TNFR1 upregulation mediates tolerance after brain ischemic preconditioning. J Cereb Blood Flow Metab 25: 193-203.

Romera C, Hurtado O, Botella SH, Lizasoain I, Cardenas A, Fernandez-Tome P, Leza JC, Lorenzo P, Moro MA (2004) In vitro ischemic tolerance involves upregulation of glutamate transport partly mediated by the TACE/ADAM17-tumor necrosis factor-alpha pathway. J Neurosci 24: 1350-1357.

Rothman SM, Olney JW (1986) Glutamate and the patho-physiology of hypoxic-ischemic brain damage. Ann Neurol 19: 105-111.

Srinivasan A, Li F, Wong A, Kodandapani L, Smidt R, Jr., Krebs JF, Fritz LC, Wu JC, Tomaselli KJ (1998) Bcl-xL functions downstream of caspase-8 to inhibit Fas- and tumor necrosis factor receptor 1-induced apoptosis of MCF7 breast carcinoma cells. J Biol Chem 273: 4523-4529.

Stennicke HR, Jurgensmeier JM, Shin H, Deveraux Q, Wolf BB, Yang X, Zhou Q, Ellerby HM, Ellerby LM, Bredesen D, Green DR, Reed JC, Froelich CJ, Salvesen GS (1998) Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. J Biol Chem 273: 27084-27090.

Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, Wikkelso C, Jensen C, Ekholm S, Tarkowski A (1997) Intrathecal release of pro- and anti-inflammatory cytokines during stroke. Clin Exp Immunol 110: 492-499.

Wang X, Feuerstein GZ, Xu L, Wang H, Schumacher WA, Ogletree ML, Taub R, Duan JJ, Decicco CP, Liu RQ (2004) Inhibition of tumor necrosis factor-

alpha-converting enzyme by a selective antagonist protects brain from focal ischemic injury in rats. *Mol Pharmacol* 65: 890-896.

Wilde GJ, Pringle AK, Sundstrom LE, Mann DA, Iannotti F (2000) Attenuation and augmentation of ischaemia-related neuronal death by tumour necrosis factor-alpha in vitro. *Eur J Neurosci* 12: 3863-3870.

Yang GY, Schielke GP, Gong C, Mao Y, Ge HL, Liu XH, Betz AL (1999) Expression of tumor necrosis factor-alpha and intercellular adhesion molecule-1 after focal cerebral ischemia in interleukin-1beta converting enzyme deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 1109-1117.

Yin XM, Luo Y, Cao G, Bai L, Pei W, Kuharsky DK, Chen J (2002) Bid-mediated mitochondrial pathway is critical to ischemic neuronal apoptosis and focal cerebral ischemia. *J Biol Chem* 277: 42074-42081.

Zhao X, Bausano B, Pike BR, Newcomb-Fernandez JK, Wang KK, Shohami E, Ringger NC, DeFord SM, Anderson DK, Hayes RL (2001) TNF-alpha stimulates caspase-3 activation and apoptotic cell death in primary septo-hippocampal cultures. *J Neurosci Res* 64: 121-131.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. TNF α is involved in OGD-mediated apoptotic death. *A*, Cortical cultures were exposed to OGD, in the presence or absence of anti-TNF- α antibody (1 μ g/ml), and after 24 hr the viability was determined by MTT assay. Data are expressed as percentage of OGD-mediated cell death and are the mean \pm SEM of 3 independent experiments performed in quadruplicate. *B*, Cortical cultures were exposed to OGD and TNF- α release was measured by ELISA after 24 hr. The discontinuous line represents the basal levels of TNF- α (before OGD) in the culture medium (60 pgr TNF/mg prot). Results are mean \pm SEM of 3 independent experiments performed in triplicate. * P <0.05 vs. normoxic cultures. *C*, Chromatin morphology was assessed 24 hr after OGD, in the presence or absence of anti-TNF- α antibody. Arrows indicate the presence of condensed or fragmented chromatin. *D*, Quantification of apoptotic and necrotic cells after OGD, in presence or absence of anti-TNF- α antibody. Necrotic and apoptotic cells were determined 24 hr after OGD as indicated in material and methods. Data are mean \pm SEM of 3 independent experiments performed in triplicate. * P <0.05 vs. OGD-treated cultures.

Figure 2. Treatment with TNF- α induces apoptosis in cultured cortical neurons. *A*, Cortical cultures were treated with soluble TNF- α at the indicated concentrations and viability was determined after 24 or 48 hr by MTT assay. Data are mean \pm SEM of 3 independent experiments performed in quadruplicate. * P <0.01 vs. control at 24 hr; ⁺ P <0.01 vs. control at 48 hr. *B*, Quantification of apoptotic cells after TNF- α treatment. Cortical cultures were treated with soluble TNF- α , and nuclear morphology was determined 24 hr later by Hoechst 33258 staining. Data are mean \pm SEM of 3 independent experiments performed in triplicate.* P <0.05 vs. non treated (NT).

Figure 3. Cellular localization of TNF- α and TNFR1 in primary cultures of cortical cells. *A*, Cortical cultures were double-immunostained for a neuronal marker (MAP2), astroglial marker (GFAP) or microglial marker (OX42), and TNF- α or TNFR1. Neurons and microglial cells present positive staining for TNF- α and TNFR1 (see arrows). *B*, *tnta* and *tntf1* gene expression was

determined by quantitative RT-PCR at different times after OGD. mRNA levels of GAPDH were used to normalize the results (see material and methods). Data are mean \pm SEM of 3 independent experiments performed in duplicate.* $P < 0.05$ vs. control (mRNA levels in sister cultures subjected to normoxia).

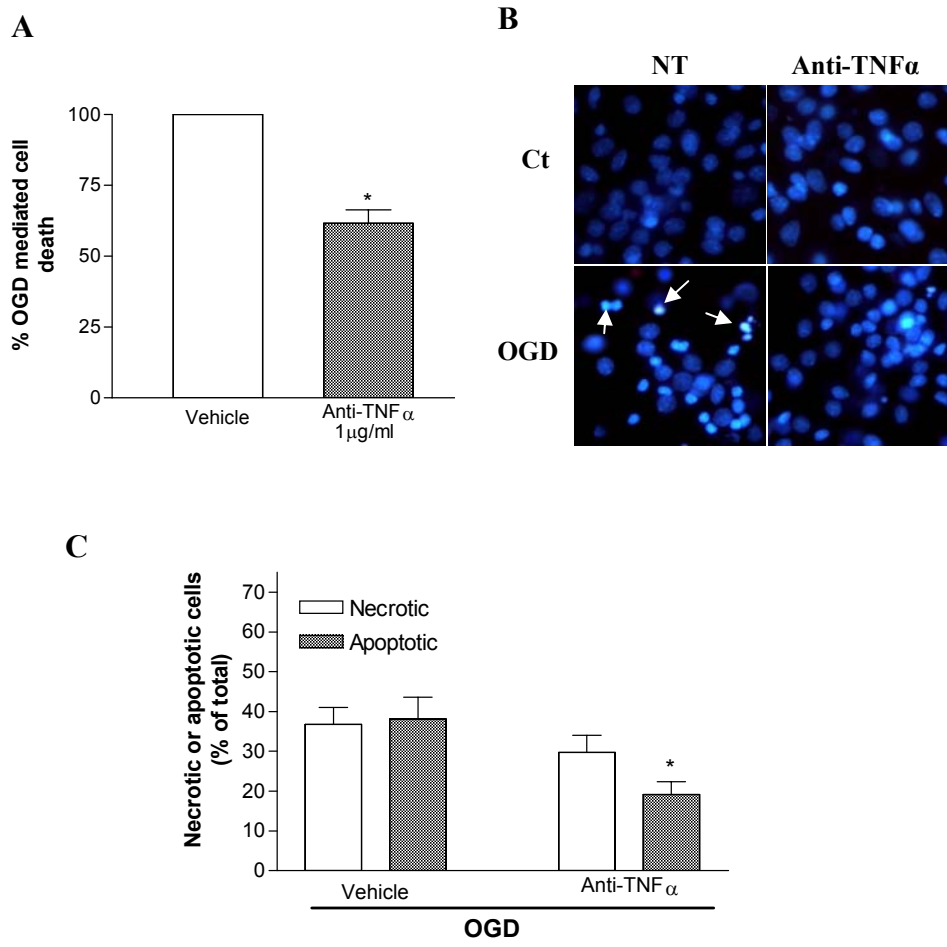
Figure 4. Activation of caspase-3, but not caspase-9, is blocked by anti-TNF- α in OGD-exposed cortical cultures. *A*, Cortical cultures were exposed to OGD, in the presence or absence of anti-TNF- α antibody (1 μ g/ml) and were double-immunostained 6 hr later for a neuronal marker (NeuN) and active caspase-3 or active caspase-9. Blockade of TNF- α produced a decrease in the number of positive cells for active caspase-3. *B*, Quantification of positive immunostained cells for active caspase-3 and -9, the data presented are a representative experiment. *C*, Western blot analysis of cleaved caspase-3 in cortical cultures exposed to OGD, in the presence or absence of anti-TNF- α antibody (1 μ g/ml). A clear decrease in the p17/p20 fragment was evident 6 hr after OGD in anti-TNF- α treated cultures. β -tubulin was used as protein loading control. Similar results were obtained in at least three independent experiments. *D*, Activation of caspase-3 in neurons and microglía by TNF- α . Cortical cultures were treated with soluble TNF- α (100 ng/ml), and were double-immunostained for MAP2 (a neuronal marker), GFAP (an astroglial marker) or OX42 (a microglial marker) and active caspase-3. The presence of immunoreactive neurons and microglia for active caspase-3 was evident 6 hr after TNF- α treatment (see arrows).

Figure 5. Inhibition of caspase-8 reduces cell death in OGD-treated cultures. Cortical cultures were pretreated with the caspase-8 inhibitor, IETD-FMK, and cell viability was measured with the MTT assay 24 hr after the OGD. Data are mean \pm SEM of 4 independent experiments performed in triplicate.* $P < 0.05$ vs. control.

Figure 6. Activation of caspase-8 in OGD is mediated by tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1). *A*, Cortical cultures were exposed to OGD, and the caspase-8 activity was measured at indicated times. Data are mean \pm SEM of 5 independent experiments performed in triplicate.* $P < 0.05$ vs. control. *B*, Cortical cultures were exposed to OGD in the presence or absence of anti-TNF- α

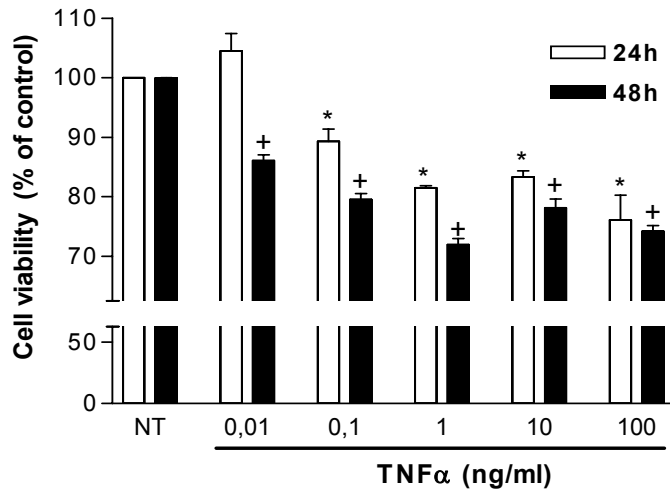
antibody (1µg/ml) and the caspase-8 activity was measured at 6 hr. Data are mean ± SEM of 4 independent experiments performed in triplicate. * $P < 0.05$ vs. OGD without anti-TNF-α antibody. C, Cortical cultures of wild type and TNFR1 knock out C57BL mice were exposed to OGD, and the caspase-8 activity was measured at indicated times. Data are mean ± SEM of 3 independent experiments performed in triplicate. * $P < 0.05$ vs. control.

Figure 7. Activation of caspase-8 is necessary for the OGD-mediated activation of caspase 3. A, Cortical cultures were pretreated with the caspase-8 inhibitor, IETD-FMK (10µM), before the OGD and after 6 hr, cells were immunostained for active caspase-3. Inhibition of caspase-8 decreases the number of immunoreactive cells for active caspase-3. B, Cortical cultures of wild type and TNFR1 knock out C57BL mice were exposed to OGD and immunostained for active caspase-3 after 6 hr. Quantification of positive immunostained cells was done as indicated in material and methods. Results are mean ± SEM of 3 independent experiments performed in triplicate

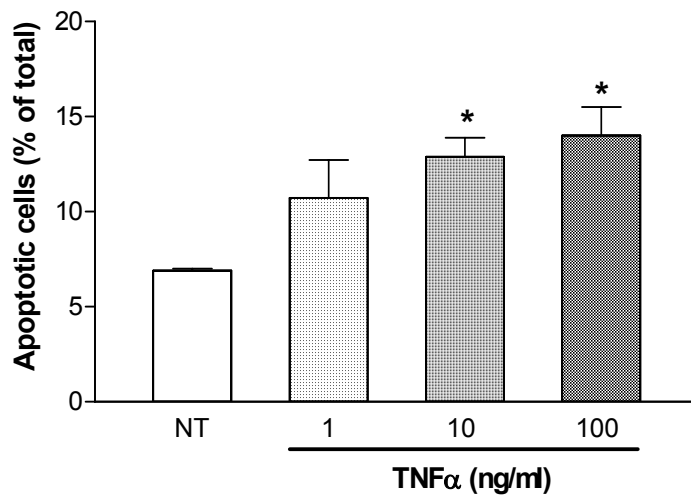


Badiola *et al.*- Figure 1

A

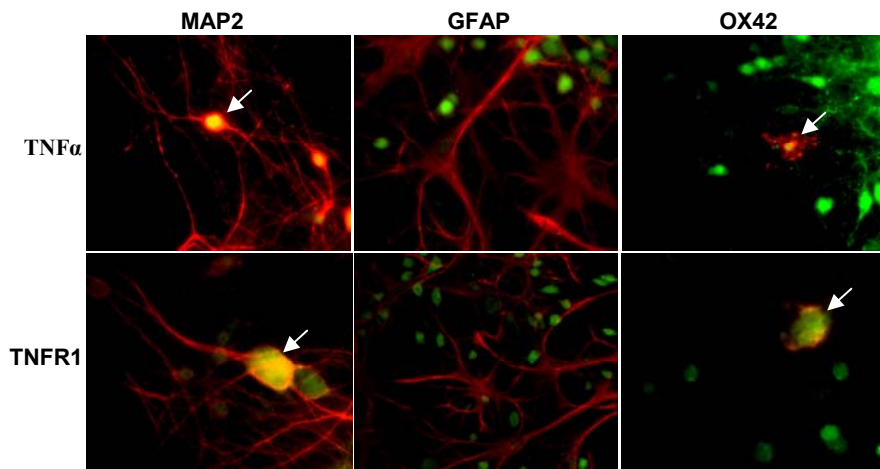


B

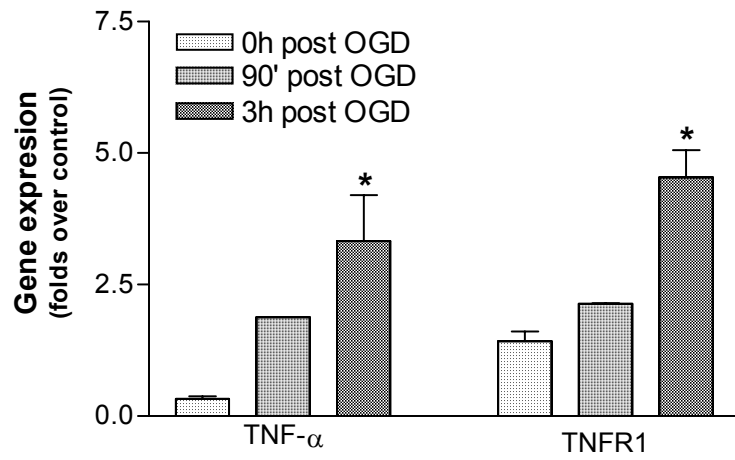


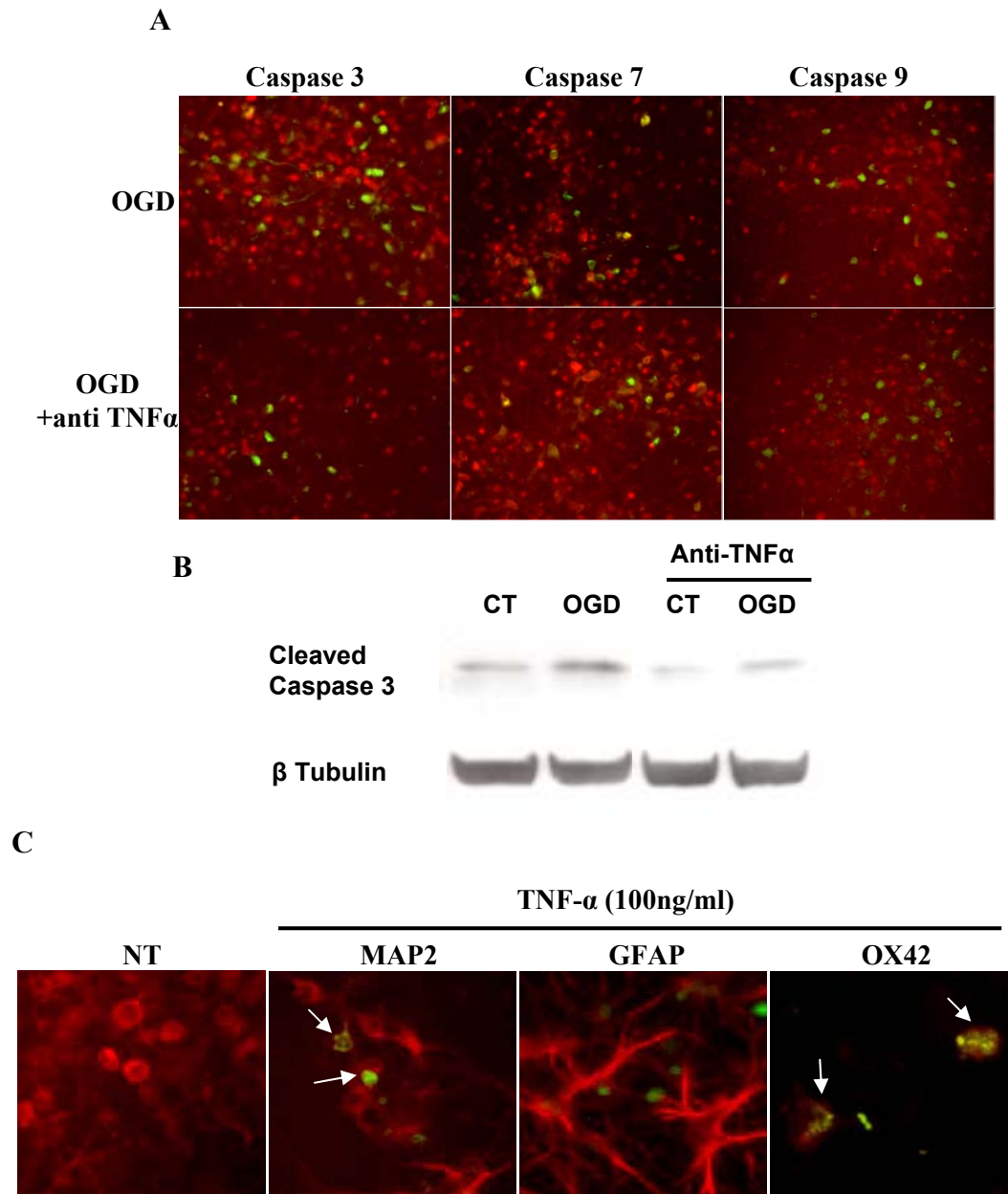
Badiola *et al.*- Figure 2

A

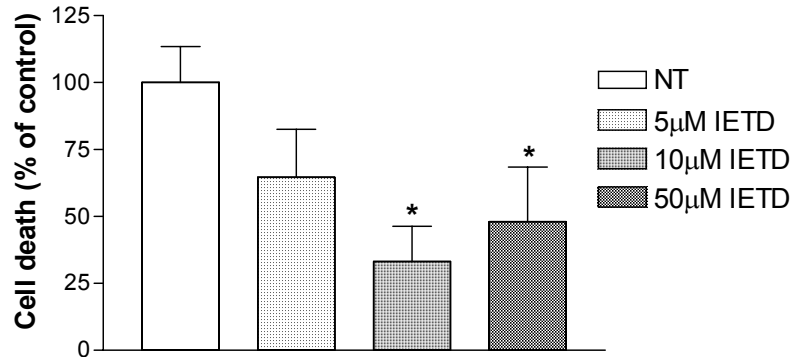


B

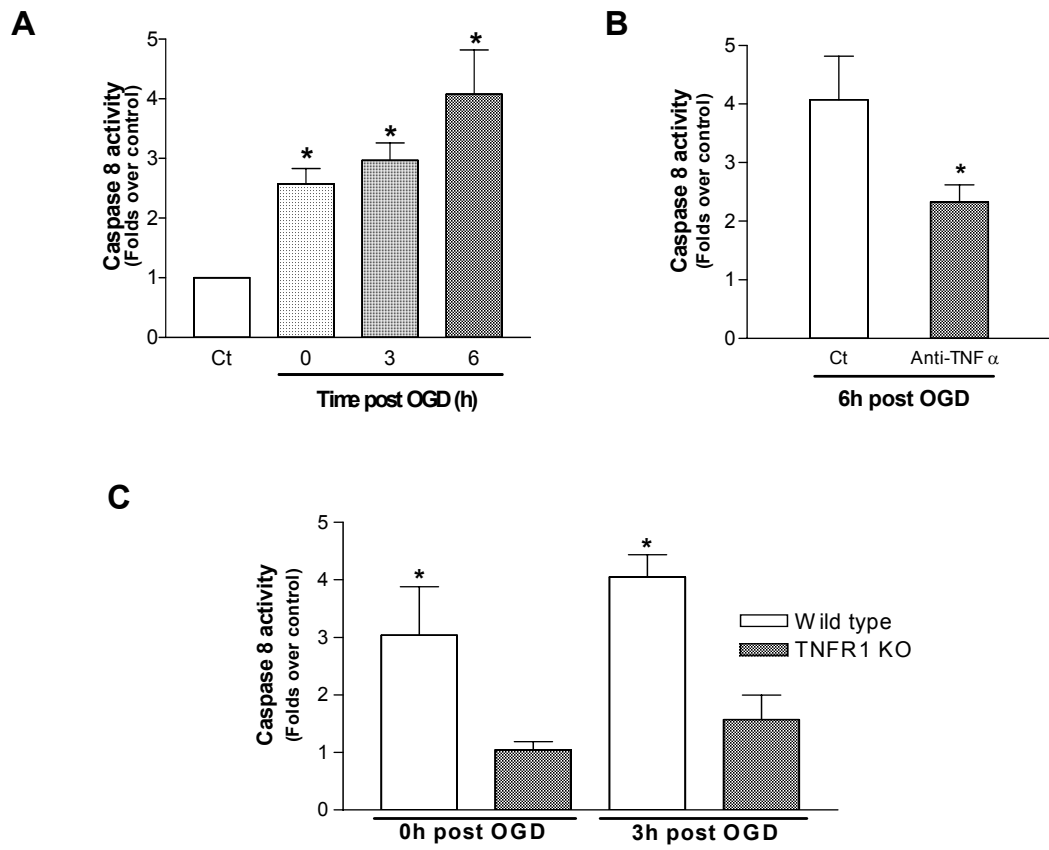
Badiola *et al.*- Figure 3



Badiola *et al.*- Figure 4

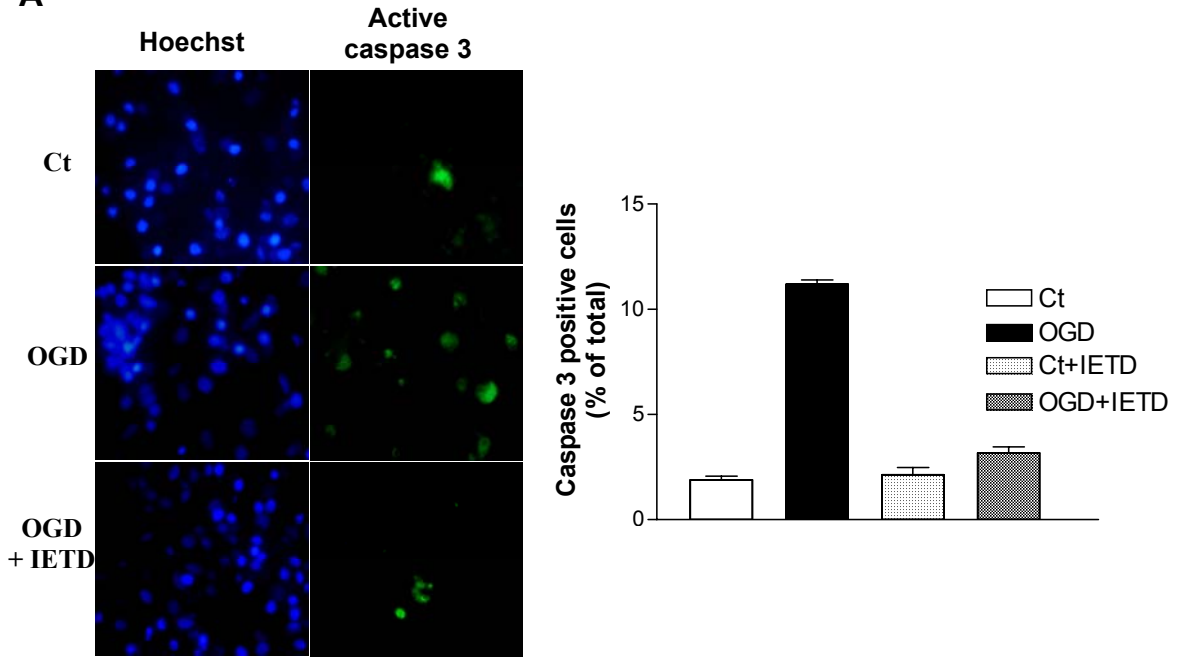


Badiola *et al.*- Figure 5

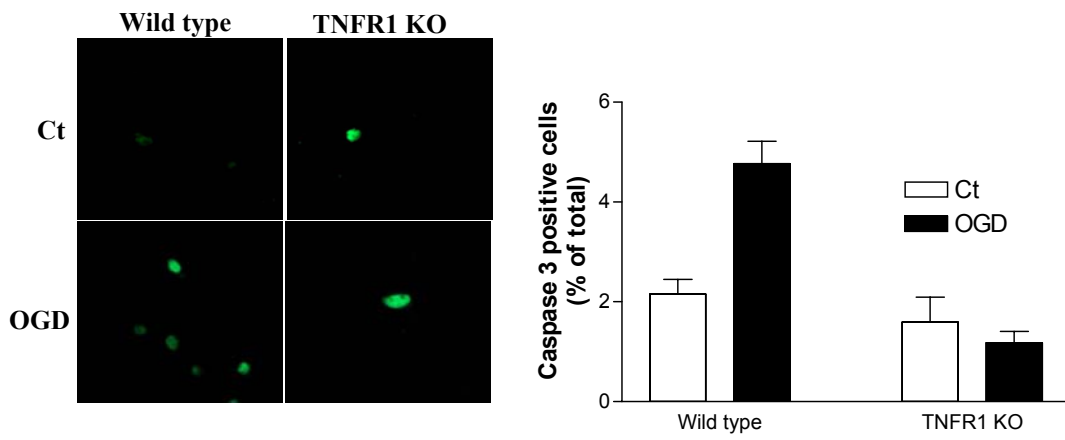


Badiola *et al.*- Figure 6

A



B



Badiola *et al.*- Figure 7

2-Trabajo 2: Induction of ER stress in response to neonatal cerebral hypoxia-ischemia and oxygen-glucose deprivation of cortical cultures involves the activation of PERK and IRE1 pathways and of caspasa-12

Enviado a Cell Death and Differentiation

Induction of ER stress in response to neonatal cerebral hypoxia-ischemia and oxygen-glucose deprivation of cortical cultures involves the activation of the PERK and IRE-1 pathways and of caspase-12

Nahuai Badiola^{1,2,6}, Clara Penas^{1,3}, Alfredo Miñano^{1,6}, Bruna Barneda^{1,2,6}, Rut Fadó^{1,2,6}, Joan X. Comella^{1,2,6}, Josefa Sabriá^{1,2}, Changlian Zhu⁴, Klas Blomgren^{4,5}, Caty Casas^{1,3,6} & José Rodríguez-Alvarez^{1,2,6}

¹Institut de Neurociències and ²Departament de Bioquímica i Biologia Molecular or ³Departament de Biologia Celular, Fisiologia e Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain; ⁴Center for Brain Repair and Rehabilitation, Institute of Neuroscience and Physiology, University of Gothenburg, Sweden; ⁵Department of Pediatric Oncology, The Queen Silvia Children's Hospital, Gothenburg, Sweden; ⁶Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Spain

Running title: ER stress pathways activated after neonatal HI and OGD in cortical cultures

Number of text pages: 26

Number of figures: 6

Number of tables: 0

Corresponding author: Dr. José Rodríguez Alvarez

Institut de Neurociències, Edificio M, Campus de Bellaterra, Universidad Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Valles, Barcelona, Spain

Phone: (34) 935 811 525; Fax: (34) 935 811 573; Email: jose.rodriguez@uab.es

ABSTRACT

Disturbance of calcium homeostasis and accumulation of misfolded proteins in the endoplasmic reticulum (ER) are considered contributory components of cell death after ischemia. However, the signal-transducing events that are activated by ER stress after cerebral ischemia are incompletely understood. Here we show that caspase-12 and the PERK and IRE pathways are activated following neonatal hypoxia –ischemia (HI) or oxygen-glucose deprivation (OGD) of mixed cortical cultures. Activation of PERK led to a transient phosphorylation of eIF2 α , an increase in ATF4 levels and the induction of *gadd34* (a subunit of an eIF2 α -directed phosphatase). Interestingly, the up-regulation of ATF4 did not lead to an increase in the levels of CHOP. Additionally, IRE1 activation was mediated by the increase in the processed form of *xbp1*, which would be responsible for the observed expression of *edem2* and the increased levels of the chaperones GRP78 and GRP94. We were also able to detect caspase-12 proteolysis after HI or OGD. Processing of procaspase-12 was mediated by NMDA receptor and calpain activation. Moreover, our data suggest that caspase-12 activation is independent of the unfolded protein response activated by ER stress.

Keywords: *Endoplasmic Reticulum stress, apoptosis, caspase-12, ischemia, cell culture, brain.*

Abbreviations: *ATF, activating transcription factor; edem2, ER degradation-enhancer, mannosidase alpha-like protein 2; eIF2, eukaryotic initiation factor 2; ER, endoplasmic reticulum; GRP, glucose-regulated protein; HI, hypoxia-ischemia; IRE1, inosito-requiring kinase; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; OGD, oxygen and glucose deprivation; PERK, RNA-activated protein kinase-like ER resident kinase; xbp1, x-box binding protein 1.*

INTRODUCTION

Brain ischemia is caused by decreased blood supply to the brain, for example in stroke in adults or perinatal asphyxia in newborns. The deprivation of oxygen and glucose (OGD) in the ischemic brain eventually leads to cell death which was believed to have necrotic features (Rothman and Olney, 1986;Choi, 1988). Over the last decade this view has been challenged. Mounting evidence indicates that activation of caspases occurs in the ischemic brain tissue (Hara et al., 1997;Chen et al., 1998) or in cultured cortical neurons transiently deprived of oxygen and glucose (Gottron et al., 1997;Malagelada et al., 2005), suggesting that the loss of neurons by apoptosis might be important, especially in the penumbra area. It has been shown that in OGD-treated cortical cultures, at least 50% of dying cells showed morphological characteristics of apoptosis and the activation of caspase-3, -7 and -9 in neurons and microglial cells (Malagelada et al., 2005).

The unfolded protein response or UPR was first identified as a cellular response signalling to preserve the organelle function once misfolded or unfolded proteins were accumulated in the ER (Kaufman, 1999). Later on, it was found that the ER stress and UPR activation can be also induced by various stimuli such as disruption of calcium homeostasis or inhibition of glycosilation and it may end up with apoptosis (Rao et al., 2004). The UPR is essentially carried out by three ER-transmembrane effectors proteins: the RNA-activated protein kinase-like ER resident kinase (PERK), the inositol-requiring kinase (IRE1) and the activating transcription factor 6 (ATF6). In the physiological state, PERK, IRE1 and ATF6 activity is suppressed by binding of the ER chaperone glucose regulated protein 78 (GRP78, also called BiP) to the ER-transmembrane effectors. In response to ER stress GRP78 dissociates and binds to the unfolded proteins to facilitate refolding, this allows the activation of PERK, IRE1 and ATF6 (Bertolotti et al., 2000;Shen et al., 2002). Overall, UPR activation can help the cell to cope with the ER stress but if it is persistent it can also contribute to cell death (Rao et al., 2004). Caspase-12 activation was also associated with the cell damage induced by ER stress (Nakagawa et al., 2000;Morishima et al., 2002;Shibata et al.,

2003), although some reports suggest that it is not always necessary for ER stress-induced apoptosis (Obeng and Boise, 2005).

Some evidence suggesting that ER stress plays an important role in cerebral ischemia has appeared during the last years (Paschen and Doutheil, 1999). Activation of some ER stress-related molecules had been described in transient focal or global cerebral ischemia (Tajiri et al., 2004) (Hayashi et al., 2005; Oida et al., 2008) and in primary neuronal cultures following *in vitro* ischemia (Chen et al., 2008). However, it is still not well understood how ER-transmembrane effectors proteins and other molecular mechanisms that are involved.

Here, we show for the first time that the PERK and IRE pathways are activated following neonatal hypoxia-ischemia. Furthermore, we have used an OGD paradigm in mixed cortical cell cultures to study in more detail the ER stress-related pathways involved in ischemic damage. Our results show that OGD induced ER stress by activating PERK and IRE1 pathways and that OGD-mediated activation of caspase-12 is dependent of NMDA receptor-mediated calpain activation.

MATERIAL AND METHODS

Reagents. Foetal calf serum, foetal horse serum and penicillin/streptomycin were obtained from Gibco (Grand Island, NY, USA). Poly-L-lysine (MW < 300,000), trypsin, soybean trypsin inhibitor, DNase, thapsigargin (Tg), MK-801 and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) were provided by Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). The broad-spectrum caspase inhibitor, zVAD-FMK, was purchased from Bachem (Heidelberg, Germany). Hoechst 33258 was obtained from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). The calpain inhibitor I, ALLN, and brefeldin A (BfA) were from Calbiochem (San Diego, CA, USA). All other chemicals were of the purest grade available from regular commercial sources.

Induction of Hypoxia-Ischemia. Unilateral HI was induced in 7-day-old Wistar rats of both sexes (Zhu et al., Journal of Neurochemistry, 2003, 86, 306–317).

The pups were anesthetized with halothane (3.0% for induction and 1.0–1.5% for maintenance) in a mixture of nitrous oxide and oxygen (1:1), and the duration of anesthesia was <10 min. The left common carotid artery was cut between double ligatures of prolene sutures (6–0). After the surgical procedure, the wounds were infiltrated with a local anesthetic, and the pups were allowed to recover for approximately 1 h. The litters were then placed in a chamber perfused with a humidified gas mixture ($7.70 \pm 0.01\%$ oxygen in nitrogen) for 55 min. The temperature in the gas chamber was kept at 36 °C. Following hypoxic exposure, the pups were returned to their biological dams until sacrificed. Control animals were operated and ligated but not subjected to hypoxia.

The animals were sacrificed by decapitation, and the brains were rapidly dissected out on a bed of ice, weighed, quickly frozen in isopentane and dry ice, and stored at -80 °C. Cortical tissue rostral to the hippocampus, ~50 mg, was dissected out from each hemisphere at -10 °C. The tissue was homogenized by sonication in 10 volumes of ice-cold 50 mM Tris-HCl (pH 7.3), containing 5 mM EDTA, aliquoted, and stored at -80 °C. Homogenate samples were mixed with an equal volume of concentrated (3X) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis buffer and heated (96 °C) for 5 min. All animal experimentation was approved by the Ethical Committee of Göteborg (approval number 183-99).

Cell cultures. Primary cultures of mixed rat brain cortical cells containing both neurons and glia were prepared as described by (Goldberg and Choi, 1993; Malagelada et al., 2004) with modifications, from fetal Wistar rats at 17 days of gestation. The dissociated cells were plated at a density of 3×10^5 cells per square centimeter in Basal Medium Eagle (BME) supplemented with 5% fetal calf serum, 5% horse serum, 50 U/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin, 2 mM glutamine and 10 mM glucose, and plated onto poly-L-lysine pre-coated wells. Cultures were kept at 37°C, 100% humidity and in a 95% air/ 5%CO₂ atmosphere for 7 days in vitro (DIV), when the plating medium was replaced by BME supplemented as above without fetal calf serum and with 10% horse serum containing 10 µM cytosine arabinoside. The experiments were performed at 11-13 DIV. The procedures followed were in accordance with guidelines of the Comissió d'Ètica en l'Experimentació Animal i Humana of the Universitat Autònoma de Barcelona.

Oxygen-glucose deprivation. Cultures were oxygen and glucose deprived (OGD) as described before (Malagelada et al., 2004), with minor modifications. The culture medium was replaced by a glucose-free Earle's balanced salt solution (BSS) with the following composition: NaCl 116 mM, KCl 5.4 mM, MgSO₄·7H₂O 0.8 mM, NaH₂PO₄·2H₂O 1 mM, NaHCO₃ 26.2 mM, Glycine 0.01 mM, CaCl₂·2H₂O 1.8 mM, pH 7.4, which was previously equilibrated in 0.8%O₂/94.2%N₂/5%CO₂ atmosphere at 37°C. The cultures were then placed in humidified hypoxic workstation for 90 min. (Invivo2 400, Ruskinn Technologies, Bridgend, United Kingdom) at 37°C and 0.8%O₂/94.2%N₂/5%CO₂ atmosphere. OGD was terminated by removing the cultures from the hypoxic workstation, replacing the deoxygenated and glucose-free BSS with the pre-OGD culture medium and returning the cells to the normoxic conditions. Control sister culture plates were exposed to oxygenated BSS containing 5.5 mM glucose in normoxic conditions during the same period of time as the OGD cultures. When used, the calpain or caspase inhibitors (ALLN or ZVAD respectively) were added to culture media 60 minutes before OGD.

Hoechst - staining. Nuclear morphology was assessed after Hoechst staining. Briefly, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 10 min and then incubated with Hoechst 33258 (1µg/ml) for 5 min at room temperature. Nuclear staining was analyzed under a non-confocal fluorescent microscope (Nikon, Eclipse TE2000). Cells were counted, by a blinded investigator, from at least 3 independent experiments. In each experiment, more than 750 cells were examined in random fields from 3 or more culture wells for each condition.

Cell viability. Cell viability was monitored by the colorimetric 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay as described (Mosmann, 1983). MTT (0.2 mg/ml) was added to cultures and incubated for 45 min at 37°C. The reaction media were then aspirated and DMSO was used to solubilize the blue formazan product prior its quantification at 570 nm (Sinergy HT, BioTek). Results were expressed as the percentage of viable cells in OGD-exposed plates compared with control normoxic plates.

Reverse transcription - PCR. Total RNA was obtained using the RNA extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer instructions. cDNA was synthesized from 1 µg total RNA using SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kit (Invitrogen, Foster City, CA, USA), following the manufacturer's indications. The reaction was performed in a Thermal Cycler as follows: 65°C for 5 min, 42°C for 50 min and 70°C for 15 min. Samples were then kept at -20°C until their utilization. The primers used for RT-PCR were: xbp1u (F, 5'-AAGGACACGCTTGGGGA-3'; R, 5'-AGAGGCGCACGT-AGTCTG-3'), Xbp1 spliced (F, 5'TGAGTCCGCAGCAGGT-3'; 5'-AGAGGCGCACGT-AGTCTG-3'); Grp78 (F, 5'-CCACCAGGATGCAGACATTG-3';R, 5'-AGGGCCTCCACTTCCATAGA-3'); Grp94 (F, 5'AAGGTCATTGTACGTCGAAA-3'; 5'-GTGTTTCCTCTTGGGTCAGC-3'); the growth arrest and DNA damage inducible gene 34 (Gadd34) (F, 5'-GTCCATTTCTTGCTGTCTG-3'; R, 5'-AAGGCGTGT-CCATGCTCTGG-3'); edem2 (F, 5'GGGAGAGCCGGTCAGATA-3'; 5'-CCCAAAGTCTTCCATACAG-3') and actin (F, 5'TACAACCTTCTTGCAGCTCC-3'; 5'-GGATCTTCATGAGGTAGTCTG-3'). PCR conditions for semi-quantitative analysis were set up for each pair of primers to obtain non-saturated products. Quantification was estimated by band densitometry on 2% agarose gels (Gene Tools software; Syngene, Cambridge, UK).

Xbp1 processing analysis cDNA obtained from cortical cultures was used as templates for PCR amplification. We used Xbp1 primers that flank the processed site (F 5'-AAA-CAGAGTAGCAGCACAGACTG-3' and R 5'-GGATCTCTAA-GACTAGAGGCTTGGTG-3'). PstI (BioLabs) digestion of the samples was carried out from 30 µL of each purified PCR product overnight (Paschen et al., 2003; Penas et al 2007). Semi-quantification of the processed Xbp1 (Xbp1p) was estimated by band densitometry on 3% agarose gels of non-saturated PCR products.

Western blot analysis. Cells were homogenized in lysis buffer (62.5mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glycerol, 50mM DTT and 0.01% bromophenol blue). Protein concentration was measured by bicinchoninic acid assay (BCA Protein Assay

kit; Pierce, Rockford, IL, USA). 30 μ g of protein were resolved on a 10% SDS-PAGE gel and transferred onto Hybond-P (GH Healthcare, Buckinghamshire, UK), polyvinylidene difluoride membranes. The blots were blocked with 5% dry milk in TBS containing 0.1% Tween 20 and incubated overnight at 4°C in a blocking buffer containing primary antibodies. The following primary antibodies and dilutions were used: rat anti-GRP94 (1/2000; Stressgen Biotechnologies, Victoria, C, Canada), mouse anti-GRP78 (1/1000; BD PharMingen, San Diego, CA, USA), rabbit anti-ATF6 α (1/200, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA), rabbit anti-ATF4 (1/500; Santa Cruz Biotechnologies), rabbit anti-phosphorylated alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 (eIF2 α) (1/1000; Cell Signalling Technology, Inc., Beverly, MA, USA), rabbit anti-total eIF2 α (1/1000; Cell Signalling Technology), mouse anti-caspase-12 (1/500, Sigma), mouse anti-tubulin (1/10 000; Sigma), mouse anti-GAPDH (1/20 000; BD PharMingen) and mouse anti- β -actin (1/ 10 000; Sigma). The blots were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (BD PharMingen) in blocking buffer and developed using the ECLTM Western Blotting Detection Reagent (GH Healthcare Europe).

Immunocytochemistry. The cells were plated on 24-well culture plates and fixed in 4% paraformaldehyde in TBS (100 mM Tris, 0.9% NaCl, pH 7.6) for 1 hour at 4°C. After washing, the cells were blocked for 1 hr in TBS-Tween 20 0.1% containing 5% bovine serum albumin (BSA) and then incubated overnight at 4°C with the primary antibody against the active form of caspase-3 (diluted 1:100 in blocking buffer). The cells were washed with TBS-Tween 0.1% and then incubated with the secondary antibody Alexa fluor 488 (1:500; Molecular Probes) in blocking buffer. Cells were analyzed under a non-confocal fluorescent microscope (Nikon, Eclipse TE2000).

Statistical analysis. Statistical significance was determined by one-way analysis of variance followed by Bonferroni multiple comparison test. A value of $p < 0.05$ was accepted as denoting statistical significance.

RESULTS

ER stress is induced in neonatal cerebral hypoxia-ischemia

Brain injury after neonatal cerebral hypoxia-ischemia (HI) includes focal ischemic infarction and cell loss with apoptotic features such as caspase activation and DNA fragmentation (Blomgren et al., 2001). However it is not known whether ER stress is induced after neonatal cerebral hypoxia-ischemia. In order to assess whether ER stress is induced after HI we determined the activation of the UPR by analyzing the phosphorylation of eIF2 α (eIF2 α -P), the protein levels of the chaperones GRP78 and GRP94 and the eventual activation of caspase-12.

Direct phosphorylation of eIF2 α by PERK leads to general protein synthesis shut off to prevent ER overload (Harding et al., 2000a; Harding et al., 2000b). As shown in figure 1A we observed an increase in eIF2 α -P in the ipsilateral compared with the contralateral hemisphere immediately after HI, although 3 hrs later, phosphorylation in the ipsilateral hemisphere returned to basal levels, indicating that the phosphorylation of this factor is acute and transient. An increase in the protein levels of chaperones GRP78 and GRP94 was also observed after HI in the ipsilateral hemisphere (Fig. 1B). Finally, we also observed that HI induced proteolysis of procaspase-12 in the ipsilateral hemisphere (Fig. 1C). Altogether, these results confirm that ER stress is induced in neonatal cerebral HI.

PERK-eIF2 α pathway is activated in OGD

In order to further dissect the molecular pathways involved in ER stress, we decided to use the oxygen and glucose deprivation (OGD) of cortical cultures where we have previously described that apoptosis was contributing to neuronal death (Malagelada et al., 2005) and where we confirmed that ER stress is elicited with thapsigargin or Blefeldin A (see Supplemental Figure 1).

First, we studied the activation of the PERK-mediated pathway. As described in figure 2A, eIF2 α (a substrate of PERK) was heavily phosphorylated during the first 30 min after OGD. Phosphorylation was already evident after the OGD period, although it was maximal 15 min later and returned to basal levels 1 h after the end of OGD. The phosphorylation of eIF2 α causes a global inhibition of protein synthesis but increases the translation of rare mRNAs containing upstream open reading frames, such as ATF4; (Dever et al., 1995; Harding et al., 2000a). We found that ATF4 protein levels were increased until 3 h after the OGD period and they returned to normal levels at 6 h (Fig. 2B). The fast dephosphorylation of eIF2 α brought us to analyze the levels of *gadd34*. *Gadd34* encodes a regulatory subunit of an eIF2 α -directed phosphatase complex that serves as a regulatory loop to mitigate the activation of PERK (Novoa et al., 2001; Brush et al., 2003). As expected *gadd34* expression was up-regulated after OGD (Fig. 2C). Altogether, these data suggest that PERK-eIF2 α pathway is activated by OGD.

OGD activates IRE1-XBP1 pathway and the up-regulation of GRP78 and GRP94

We observed a robust increase in the expression levels of *grp78* and *grp94* at 6 h and 12 h after OGD (Fig. 3A). The increase in the expression of both chaperones was accompanied by a significant increase in their protein levels OGD. Protein levels peaked at 12 and 24 h and declined to basal values at 48 h (Fig. 3B). In order to identify transcription factors responsible for the increase in GRP78 and GRP94 we decided to monitor the involvement of ATF6 and/or XBP1 that are able to bind to the endoplasmic reticulum stress response element (ERSE) present in the chaperones promoters.

Under ER stress, full-length ATF6 (90kDa) is cleaved in the Golgi apparatus by SP1 and SP2 proteases to yield a cytosolic fragment (50kDa) that migrates to nucleus to activate transcription of genes containing ERSE sequence on their promoters (Ye et al., 2000). Recently, the presence of an underglycosylated form of ATF6 was described as a novel sensing mechanism for the activation of the UPR (Hong et al., 2004). We found a decrease in full-length ATF6 (90kDa)

and the appearance of a faster migrating band (f) 24 h after OGD (Fig. 3C). This band appeared also when cells were treated with thapsigargin, in accordance with previous observations (Hong et al., 2004). However, the observed activation of ATF6 24 h after OGD could not be responsible for the early increase in the expression of *grp78* and *grp94*. Then, we decided to study whether the IRE-pathway could be responsible for the increased levels of the chaperones. When IRE1 (an mRNA endonuclease) is activated by ER stress, is able to process the mRNA of *xbp1* leading to the efficient translation of XBP1 into an ERSE-binding transcription factor (Lee et al., 2003). We found an increase of spliced *xbp1* after OGD but also after normoxia (control conditions; Fig. 3D). While the increase during OGD and normoxia was similar at 6 h, the level of spliced *xbp1* was significantly higher in OGD vs. normoxia at 12 h. To check whether the increase of processed *xbp1* observed under normoxia was related to an increase in the transcription activity of XBP1, we studied the expression of *edem2* (ER degradation-enhancer, mannosidase alpha-like protein 2), a target gene of XBP1 (Yoshida et al., 2003). We observed a significant increase in *edem2* expression after OGD but not under normoxic conditions (Fig. 3D), confirming the increase in XBP1 activity after OGD.

OGD-mediated caspase-12 activation is calpain and NMDA receptor dependent

Caspase-12 is an ER-resident procaspase that is proteolyzed in response to ER stress conditions (Nakagawa et al., 2000) releasing two catalytic subunits, p20 and p10. Treatment of our cultures with thapsigargin, a well-known ER stress inducer, produced a decrease in the pro-caspase-12 levels and the appearance of the p20 subunit (Fig. 4A and Supplemental Figure 1B). When the cultures were deprived of oxygen and glucose, a clear reduction in procaspase-12 was observed after 6 h until 48 h whereas p20 was only detected after 12 h and 24 h (Fig. 4A). We were able to observe the presence of other fragments produced by procaspase-12 proteolysis 48 hr after OGD or in thapsigargin-treated cultures (Fig. 4A).

It is described that caspase-12 activation can be mediated by caspase-7 (Rao et al., 2001) or by homodimerization of procaspase-12 (Yoneda et al., 2001). Thus, we decided to treat the cultures with the caspase pan-inhibitor zVAD in order to know whether caspase activity was mediating the processing of procaspase-12 in OGD cultures. As shown in figure 4B, the presence of zVAD in the culture media was not able to block OGD-mediated procaspase-12 proteolysis. In contrast, the presence of calpain inhibitors, such as ALLN or MDL 28170, completely blocked the proteolysis of procaspase-12 (Fig. 4C and data not shown), suggesting that calpains are responsible for the OGD-mediated activation of caspase-12. Calpains are calcium-dependent proteases and it is well known that the NMDA receptor, a major entry route for this divalent cation, is activated by OGD. Accordingly, the use of MK-801, an irreversible N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist, in OGD cultures was able to completely block procaspase-12 proteolysis (Fig. 4D). Thus, our data support that NMDA receptor-mediated influx of calcium in OGD cultures is responsible for calpain-mediated procaspase-12 proteolysis. Accordingly, treatment of the cultures with NMDA produced proteolysis of procaspase-12 (Fig. 4E).

DISCUSSION

The ER plays an important role in the maintenance of intracellular calcium homeostasis and the post-translational modifications and proper folding of proteins synthesized in the ribosomes (Sambrook, 1990; Rapoport, 1992). Some evidence suggests that the energy depletion and disruption of calcium homeostasis that occurs during an ischemic process could trigger the accumulation of misfolded proteins in the ER lumen and activation of the UPR (Hu et al., 2000; Althausen et al., 2001; DeGracia et al., 2002). It has been widely reported that the UPR is launched by the activation of the ER-transmembrane effectors proteins, PERK, IRE1 or ATF6 (for review see Xu et al., 2005). However, it is not well established which effectors are activated in the cerebral ischemia-mediated UPR. Some reports have described the activation of PERK after transient forebrain ischemia, but whereas the increase in phosphorylation of eIF2 α and in ATF4 expression is not challenged (Oida et al., 2008; Hayashi et al., 2004), the activation of CHOP is controversial (Kumar et al., 2003; Tajiri et

al., 2004). Few studies have addressed the role of IRE 1 and ATF6 effectors. Paschen and co-workers described a marked increase in processed *xbp1* mRNA, indicating that IRE 1 should be activated in transient focal cerebral ischemia (Paschen et al., 2003). However, the processing of *xbp1* mRNA was not observed in another study after transient global cerebral ischemia (Kumar et al., 2003).

Neonatal HI is a major cause of neurological deficits and shares similar molecular injury mechanisms with stroke in adult brains. However, it is not known if ER stress was induced after neonatal HI. Here, we have shown a fast increase in p-eIF2 α which is followed by up-regulation of the chaperones GRP78 and GRP94 and procaspase-12 proteolysis. In order to explore in more detail the molecular mechanisms involved, we took advantage of an *in vitro* model where mixed neuronal-glial cortical cultures were obtained from embryonic rats and deprived of oxygen and glucose. Our results suggest the activation of PERK and IRE1 early after OGD.

In accordance with the data observed after neonatal HI, a rapid phosphorylation of eIF2 α was observed during 30 min after OGD in mixed cortical cultures, suggesting that protein synthesis inhibition, induced by PERK activation, occurs just after injury and is transient. A similar, fast and transient phosphorylation of eIF2 α was described in other models of ischemia, such as the middle cerebral artery occlusion (MCAO) and the four-vessel occlusion (4VO) (Althausen et al., 2001; Kumar et al., 2003; Martin, V et al., 2001). It is well known that protein synthesis inhibition induced by phosphorylation of eIF2 α could be bypassed for some rare mRNAs including ATF4 mRNA (Dever et al., 1995). We found increased levels of ATF4 until 3 hr after OGD. Similar results were observed previously after global cerebral ischemia (Hayashi et al., 2005) or permanent middle cerebral artery occlusion (Hayashi et al., 2005; Morimoto et al., 2007). However, failure to detect an increase in ATF4 has been also reported (Kumar et al., 2003; Morishima et al., 2002). The observed increase in ATF4 levels after OGD was further confirmed since we have detected OGD-mediated expression of *gadd34*, a protein phosphatase-1 subunit that dephosphorylates p-eIF2 α (Brush et al., 2003) and is up-regulated by ATF4 (Ma and Hendershot, 2003).

Interestingly, the increase in *gadd34* expression was observed when ATF4 has returned to basal levels. However, the negative feed-back control of translation arrest due to *gadd34*-mediated dephosphorylation of p-eIF2 α could be avoided by the action of other factors besides eIF2 α such as eIF24 family-like proteins that act at different level in ribosomal recruitment (Martin, V et al., 2001; Mengesdorf et al., 2002; Neumar et al., 1998). On the other hand, ATF4 can up-regulate CHOP (C/EBP homologous protein, also called GADD153) by its binding to AARE sequence present in the CHOP promoter (Fawcett et al., 1999; Bruhat et al., 2000). However, the increase in ATF4 did not lead to an increase in CHOP levels after OGD (data not shown) in contrast with other studies reporting CHOP induction after brain ischemia (Tajiri et al., 2004; Hayashi et al., 2005). It has been described that transcription of the CHOP gene requires both ATF4 expression and the phosphorylation of ATF2 (Averous et al., 2004). Accordingly, lack of ATF2 phosphorylation could explain why CHOP levels do not increase after OGD.

IRE1 is an mRNA endoribonuclease, which under ER stress is activated and cleaves a 26 nt “non-classical intron” from *xbp1* mRNA in a reaction homologous to tRNA transcript processing (Calton et al., 2002; Gonzalez et al., 1999; Yoshida et al., 2001). The processing of *xbp1* mRNA promotes efficient translation of XBP1 into an ERSE-binding transcription factor with overlapping specificity to ATF6 (Lee et al., 2003). Our results show that OGD activates IRE1 since we were able to detect an increase in the processed *xbp1*. Thus, our results are in agreement with a previous study that reported the processing of *xbp1* after transient global or focal cerebral ischemia (Paschen et al., 2003). XBP1 acts as a transcription factor for ER stress genes such as *edem2*. EDEM2 is required for efficient degradation of glycoproteins misfolded in the ER in the process called ER-associated degradation (ERAD) (Kopito, 1997; Olivari et al., 2005; Plemper and Wolf, 1999). The fact that OGD up-regulated *edem2*, confirms that IRE1 was activated and also suggests that ERAD is involved in the degradation of misfolded proteins.

One of the hallmarks of ER stress is the induction of the chaperones GRP78 and GRP94. This induction, which is a part of the UPR, is required to decrease

ER stress and facilitate protein folding. Some studies have shown the induction of these chaperones after cerebral brain ischemia (Higashi et al., 1994; Shibata et al., 2003; Kudo et al., 2008). Recently, similar results have been described after OGD in cortical cultures (Chen et al., 2008). Accordingly, we have also observed an increase in both chaperones after OGD in our primary cultures of cortical neurons and glia. Regulation of the transcription of these chaperones is mediated by the binding of transcription factors to the ERSE sequences present in the promoter. XBP1 and ATF6 are transcription factors related to the UPR that could bind to the ERSE sequences and mediate the up-regulation of GPR78 and GPR94 (Calfon et al., 2002). As indicated above, we have observed an increase in the processed form of *xbp1*. In contrast, we were unable to detect cleaved ATF6 (50kDa) even in the presence of proteasome inhibitor to avoid the fast degradation of this labile form (Ye et al., 2000), but OGD promoted the accumulation of the underglycosylated form of ATF6. This partially glycosylated ATF6 shows a faster rate of constitutive transport to the Golgi resulting in a higher level of ATF6 (50kDa) in the nucleus (Hong et al., 2004). However, the underglycosylated ATF6 form was only evident 24 hours after OGD and would not explain the induction of the chaperones observed a few hours after OGD. We think that processed *xbp1* expression is mediating the induction of GRP74 and GRP94, although we cannot exclude the possibility that ATF4 could also be promoting this up-regulation in an ERSE independent way (Luo et al., 2003).

Caspase-12 is an ER-resident caspase that is activated under ER stress conditions and can mediate apoptosis (Nakagawa et al., 2000). This caspase requires cleavage of the prodomain to render the active fragment p20. It has been described that caspase-12 is cleaved after permanent (Mouw et al., 2003) or transient (Shibata et al., 2003) focal ischemia and after OGD in neuronal cortical cultures (Chen et al., 2008). Here, we also report that caspase-12 is cleaved after HI in neonatal brain and in neuronal-glia cortical cultures. Cleavage was already observed at 6 hrs post-OGD, although the p20 fragment was only detected after 12 and 24 h post-OGD. In contrast with the data obtained in previous “in vivo” studies (Mouw et al., 2003; Shibata et al., 2003), we did not observe an increase in procaspase-12 levels due to HI or OGD. It is

uncertain which mechanism is mediating caspase-12 cleavage after cerebral ischemia and whether activation of caspase-12 is always related to UPR or could be activated independently. Several mechanisms for caspase-12 activation have been described. It has been reported that caspase-12 activation is mediated by the IRE1 transmembrane effector protein through a proximity mechanism that promotes the formation of caspase-12 clusters. The formation of IRE1-TRAF2 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 2) complex or the translocation of Bim to the ER could be the triggering signal for the formation of the clusters and caspase-12 activation (Yoneda et al., 2001; Morishima et al., 2004). Also, a non-proximity driven mechanism for activation of caspase-12 has been also reported since several pieces of evidence suggest that calpains, a calcium-dependent protease, could be responsible for the proteolysis and activation of caspase-12 (Nakagawa et al., 2000; Nakagawa and Yuan, 2000; Tan et al., 2006). Accordingly, disruption of calcium homeostasis in the ER, would activate pro-caspase-12 cleavage and the UPR (Xu et al., 2005). Our data support a calpain-mediated mechanism for OGD-mediated procaspase-12 cleavage. However, we think that OGD-mediated proteolysis of caspase-12 by calpains is independent of major disruption of intracellular calcium stores and the subsequent activation of the UPR since it is NMDA receptor- dependent and ER stress is not triggered in NMDA-mediated neuronal death (Concannon et al., 2008). Moreover, our data also indicate that NMDA receptor stimulation is sufficient for calpain-mediated procaspase-12 cleavage in the absence of up-regulation of the chaperones GRP78 and GRP94.

In summary, we have provided data for the involvement of IRE1 and PERK in the HI and OGD-mediated UPR. Moreover, we conclude that procaspase-12 cleavage is a NMDA receptor and calpain mediated effect, probably independent of ER stress.

Acknowledgments: This work was supported by grants from Ministerio de Ciencia y Tecnologia (SAF2005-05106 and SAF2008-01904) and by the Red de Investigación Cooperativa Neurovascular to J.R.A. N.B was a recipient of a predoctoral fellowship from the Gobierno Vasco. B.B is a recipient of a pre-

doctoral fellowship from the Universitat Autònoma de Barcelona. R.F is a recipient of a predoctoral fellowship from the Generalitat de Catalunya.

REFERENCES

Althausen S, Mengesdorf T, Mies G, Olah L, Nairn AC, Proud CG, Paschen W (2001) Changes in the phosphorylation of initiation factor eIF-2 α , elongation factor eEF-2 and p70 S6 kinase after transient focal cerebral ischaemia in mice. *J Neurochem* 78:779-787.

Averous J, Bruhat A, Jousse C, Carraro V, Thiel G, Fafournoux P (2004) Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation. *J Biol Chem* 279:5288-5297.

Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D (2000) Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2:326-332.

Blomgren K, Zhu C, Wang X, Karlsson JO, Leverin AL, Bahr BA, Mallard C, Hagberg H (2001) Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of "pathological apoptosis"? *J Biol Chem* 276:10191-10198.

Bruhat A, Jousse C, Carraro V, Reimold AM, Ferrara M, Fafournoux P (2000) Amino Acids Control Mammalian Gene Transcription: Activating Transcription Factor 2 Is Essential for the Amino Acid Responsiveness of the CHOP Promoter. *Mol Cell Biol* 20:7192-7204.

Brush MH, Weiser DC, Shenolikar S (2003) Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 α to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol* 23:1292-1303.

Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D (2002) IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415:92-96.

Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu RL, Graham SH, Simon RP (1998) Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci* 18:4914-4928.

Chen X, Kintner DB, Luo J, Baba A, Matsuda T, Sun D (2008) Endoplasmic reticulum Ca²⁺ dysregulation and endoplasmic reticulum stress following in vitro neuronal ischemia: role of Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter. *J Neurochem* 106:1563-1576.

Choi DW (1988) Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and the role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 11:465-469.

Concannon CG, Ward MW, Bonner HP, Kuroki K, Tuffy LP, Bonner CT, Woods I, Engel T, Henshall DC, Prehn JH (2008) NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal apoptosis in vitro and in vivo occurs in an ER stress and PUMA independent manner. *J Neurochem* 105:891-903.

DeGracia DJ, Kumar R, Owen CR, Krause GS, White BC (2002) Molecular pathways of protein synthesis inhibition during brain reperfusion: implications for neuronal survival or death. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:127-141.

Dever TE, Yang W, Astrom S, Bystrom AS, Hinnebusch AG (1995) Modulation of tRNA(iMet), eIF-2, and eIF-2B expression shows that GCN4 translation is inversely coupled to the level of eIF-2.GTP.Met-tRNA(iMet) ternary complexes. *Mol Cell Biol* 15:6351-6363.

Drummond IA, Lee AS, Resendez EJ, Steinhardt RA (1987) Depletion of intracellular calcium stores by calcium ionophore A23187 induces the genes for glucose-regulated proteins in hamster fibroblasts. *J Biol Chem* 262:12801-12805.

Fawcett TW, Martindale JL, Guyton KZ, Hai T, Holbrook NJ (1999) Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive-element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response. *Biochem J* 339:135-141.

Goldberg MP, Choi DW (1993) Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell cultured neurons: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci* 13:3510-3524.

Gonzalez TN, Sidrauski C, Dorfler S, Walter P (1999) Mechanism of non-spliceosomal mRNA splicing in the unfolded protein response pathway. *EMBO J* 18:3119-3132.

Gottron FJ, Ying HS, Choi DW (1997) Caspase inhibition selectively reduces the apoptotic component of oxygen-glucose deprivation-induced cortical neuronal cell death. *Mol Cell Neurosci* 9:159-169.

Hara H, Fink K, Endres M, Friedlander RM, Gagliardini V, Moskowitz MA (1997) Attenuation of transient focal cerebral ischemic injury in transgenic mice expressing a mutant ICE inhibitory protein. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:370-375.

Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D (2000a) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 6:1099-1108.

Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D (2000b) Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* 5:897-904.

Hayashi T, Saito A, Okuno S, Ferrand-Drake M, Dodd RL, Chan PH (2004) Oxidative injury to the endoplasmic reticulum in mouse brains after transient focal ischemia. *Neurobiol Dis* 15:229-239.

Hayashi T, Saito A, Okuno S, Ferrand-Drake M, Dodd RL, Chan PH (2005) Damage to the endoplasmic reticulum and activation of apoptotic machinery by oxidative stress in ischemic neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:41-53.

Higashi T, Takechi H, Uemura Y, Kikuchi H, Nagata K (1994) Differential induction of mRNA species encoding several classes of stress proteins following focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 650:239-248.

Hong M, Luo S, Baumeister P, Huang JM, Gogia RK, Li M, Lee AS (2004) Underglycosylation of ATF6 as a novel sensing mechanism for activation of the unfolded protein response. *J Biol Chem* 279:11354-11363.

Hu BR, Martone ME, Jones YZ, Liu CL (2000) Protein aggregation after transient cerebral ischemia. *J Neurosci* 20:3191-3199.

Kaufman RJ (1999) Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 13:1211-1233.

Kopito RR (1997) ER Quality Control: The Cytoplasmic Connection. *Cell* 88:427-430.

Kudo T, Kanemoto S, Hara H, Morimoto N, Morihara T, Kimura R, Tabira T, Imaizumi K, Takeda M (2008) A molecular chaperone inducer protects neurons from ER stress. *Cell Death Differ* 15:364-375.

Kumar R, Krause GS, Yoshida H, Mori K, DeGracia DJ (2003) Dysfunction of the unfolded protein response during global brain ischemia and reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:462-471.

Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH (2003) XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response. *Mol Cell Biol* 23:7448-7459.

Luo S, Baumeister P, Yang S, Abcouwer SF, Lee AS (2003) Induction of Grp78/BiP by Translational Block: ACTIVATION OF THE Grp78 PROMOTER BY ATF4 THROUGH AN UPSTREAM ATF/CRE SITE INDEPENDENT OF THE ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS ELEMENTS. *J Biol Chem* 278:37375-37385.

Ma Y, Hendershot LM (2003) Delineation of a Negative Feedback Regulatory Loop That Controls Protein Translation during Endoplasmic Reticulum Stress. *J Biol Chem* 278:34864-34873.

Malagelada C, Xifro X, Badiola N, Sabria J, Rodriguez-Alvarez J (2004) Histamine H2-receptor antagonist ranitidine protects against neural death induced by oxygen-glucose deprivation. *Stroke* 35:2396-2401.

Malagelada C, Xifro X, Miñano A, Sabriá J, Rodriguez-Alvarez J (2005) Contribution of caspase-mediated apoptosis to the cell death caused by oxygen-glucose deprivation in cortical cell cultures. *Neurobiol Dis* 20:27-37.

Martin dl, V, Burda J, Nemethova M, Quevedo C, Alcazar A, Martin ME, Danielisova V, Fando JL, Salinas M (2001) Possible mechanisms involved in the down-regulation of translation during transient global ischaemia in the rat brain. *Biochem J* 357:819-826.

Mengesdorf T, Proud CG, Mies G, Paschen W (2002) Mechanisms underlying suppression of protein synthesis induced by transient focal cerebral ischemia in mouse brain. *Exp Neurol* 177:538-546.

Morimoto N, Oida Y, Shimazawa M, Miura M, Kudo T, Imaizumi K, Hara H (2007) Involvement of endoplasmic reticulum stress after middle cerebral artery occlusion in mice. *Neuroscience* 147:957-967.

Morishima N, Nakanishi K, Tsuchiya K, Shibata T, Seiwa E (2004) Translocation of Bim to the endoplasmic reticulum (ER) mediates ER stress signaling for activation of caspase-12 during ER stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 279:50375-50381.

Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y (2002) An Endoplasmic Reticulum Stress-specific Caspase Cascade in Apoptosis. CYTOCHROME c-INDEPENDENT ACTIVATION OF CASPASE-9 BY CASPASE-12. *J Biol Chem* 277:34287-34294.

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.

Mouw G, Zechel JL, Gamboa J, Lust WD, Selman WR, Ratcheson RA (2003) Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum resident caspase, after permanent focal ischemia in rat. *Neuroreport* 14:183-186.

Nakagawa T, Yuan J (2000) Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 150:887-894.

Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403:98-103.

Neumar RW, DeGracia DJ, Konkoly LL, Khoury JI, White BC, Krause GS (1998) Calpain Mediates Eukaryotic Initiation Factor 4G Degradation During Global Brain Ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:876-881.

Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D (2001) Feedback Inhibition of the Unfolded Protein Response by GADD34-mediated Dephosphorylation of eIF2 α . *J Cell Biol* 153:1011-1022.

Obeng EA, Boise LH (2005) Caspase-12 and caspase-4 are not required for caspase-dependent endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 280:29578-29587.

Oida Y, Shimazawa M, Imaizumi K, Hara H (2008) Involvement of endoplasmic reticulum stress in the neuronal death induced by transient forebrain ischemia in gerbil. *Neuroscience* 151:111-119.

Olivari S, Galli C, Alanen H, Ruddock L, Molinari M (2005) A novel stress-induced EDEM variant regulating endoplasmic reticulum-associated glycoprotein degradation. *J Biol Chem* 280:2424-2428.

Paschen W, Aufenberg C, Hotop S, Mengesdorf T (2003) Transient cerebral ischemia activates processing of xbp1 messenger RNA indicative of endoplasmic reticulum stress. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:449-461.

Paschen W, Doutheil J (1999) Disturbances of the functioning of endoplasmic reticulum: a key mechanism underlying neuronal cell injury? *J Cereb Blood Flow Metab* 19:1-18.

Plempner RK, Wolf DH (1999) Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends in Biochemical Sciences* 24:266-270.

Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE (2004) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* 11:372-380.

Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del RG, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE (2001) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem* 276:33869-33874.

Rapoport TA (1992) Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science* 258:931-936.

Rothman SM, Olney JW (1986) Glutamate and the patho-physiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol* 19:105-111.

Sambrook JF (1990) The involvement of calcium in transport of secretory proteins from the endoplasmic reticulum. *Cell* 61:197-199.

Shang J (2005) Quantitative measurement of events in the mammalian unfolded protein response. *Methods* 35:390-394.

Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R (2002) ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell* 3:99-111.

Shibata M, Hattori H, Sasaki T, Gotoh J, Hamada J, Fukuuchi Y (2003) Activation of caspase-12 by endoplasmic reticulum stress induced by transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Neuroscience* 118:491-499.

Tajiri S, Oyadomari S, Yano S, Morioka M, Gotoh T, Hamada JI, Ushio Y, Mori M (2004) Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP. *Cell Death Differ* 11:403-415.

Tan Y, Dourdin N, Wu C, De VT, Elce JS, Greer PA (2006) Ubiquitous calpains promote caspase-12 and JNK activation during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 281:16016-16024.

Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC (2005) Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 115:2656-2664.

Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Dave UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL (2000) ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* 6:1355-1364.

Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M (2001) Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem* 276:13935-13940.

Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107:881-891.

Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K (1998) Identification of the cis-Acting Endoplasmic Reticulum Stress Response Element Responsible for Transcriptional Induction of Mammalian Glucose-regulated Proteins. INVOLVEMENT OF BASIC LEUCINE ZIPPER TRANSCRIPTION FACTORS. *J Biol Chem* 273:33741-33749.

Yoshida H, Matsui T, Hosokawa N, Kaufman RJ, Nagata K, Mori K (2003) A Time-Dependent Phase Shift in the Mammalian Unfolded Protein Response. *Developmental Cell* 4:265-271.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Hypoxia- ischemia (HI) induces ER stress. **A**, Western blot analysis of total eIF2 α and phosphorylated eIF2 α (p-eIF2 α) at different times after HI. Pooled samples of homogenates from contralateral (CL) or ipsilateral (IL) cortex were loaded. **B**, Western blot analysis of GRP78 and GRP94 protein expression after HI (left). Histogram quantification of pooled samples normalized respect to GAPDH levels and showed as fold change versus contralateral (right). **C**, Procaspase-12 proteolysis analysis by western blot, in cortex homogenates of animals exposed to HI. Lysates of cortical neurons culture exposed to OGD (O) and control (C) were use to confirm the proteolysis of procaspase-12. GAPDH was used as loading control.

Figure 2. OGD activates PERK-eIF2 α pathway. **A**, Western blot analysis of total eIF2 α and phosphorylated eIF2 α (p-eIF2 α) after OGD. **B**, Western blot analysis of ATF4 levels at indicated times after OGD. α -tubulin was used as loading control. **C**, RT-PCR products for *gadd34* obtained from cortical cultures at indicated times after OGD (top). Histogram quantification of the fold change in *gadd34* expression respect to *actin* levels (bottom).*, P < 0.001, vs. control.

Figure 3. OGD activates IRE1-XBP1 pathway. **A**, RT-PCR products for *grp78* and *grp94* obtained from cortical cultures at indicated times after OGD (top). Quantification of *grp78* and *grp94* mRNAs, normalized to *actin* levels (bottom).*, P < 0.01, and +, P<0.001,vs. control. **B**, Time course of GRP78 and GRP94 protein expression in cortical cultures exposed to OGD. Membranes were also immunoblotted with an anti-actin antibody as loading control (top). Quantification of protein levels of GRP78 and GRP94 normalized to actin levels (bottom).*, P < 0.05, and +, P<0.001 vs. control. **C**, ATF6 protein expression was study by western blot at different times after OGD. ATF6 (f) is ATF6 form that migrates faster. A lysate of thapsigargin (Tg) treated cells (5 μ M) was loaded as a positive control. **D**, RT-PCR products for *xbp1* and *edem2* obtained from cortical cultures at indicated times after OGD (top). The processed *xbp1* was obtained as explained in material and methods. Quantification of spliced

xbp1 and *edem2* mRNAs, normalized to *actin* levels (bottom).*, P < 0.001, vs. control.

Figure 4. OGD-mediated activation of caspase-12 is calpain dependent. **A**, Western blot analysis of caspase-12 at indicated times in cultures exposed to OGD. A lysate of thapsigargin (Tg) treated cells (5 μ M) was loaded as a positive control of caspase-12 activation. Arrows indicate procaspase-12 cleavage products. * indicates a non specific band. **B,C** and **D**, Procaspase-12 proteolysis analysis by western blot in cultures exposed to OGD in presence of caspase pan-inhibitor, z-VAD-fmk(100 μ M) (**B**), calpain inhibitor, ALLN (1 μ M) (**C**), or NMDA receptor agonist, MK-801 (10 μ M) (**D**). **E**, Procaspase-12 proteolysis in cortical cultures treated for 6 or 12 hrs with NMDA (100 μ M) in the presence or absence of MK-801. All the membranes were also immunoblotted with an anti-actin antibody as a loading control.

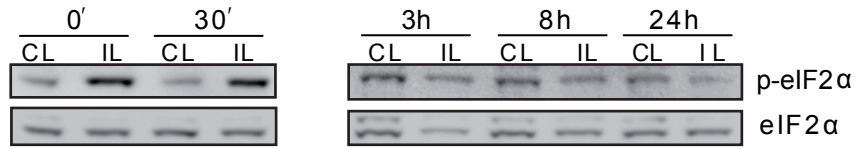
Figure 5. ER stress-activated signal transduction pathways and caspase-12 activation in OGD. OGD activate PERK which phosphorylates eIF2 α leading to inhibition of protein synthesis, but also increases the translation of ATF4 transcription factor. ATF4 mediate the increase of *gadd34* expression, which is involved in the desphosphorylation of eIF2 α . OGD-mediated IRE1 activation allows the processing of *xbp1* mRNA, resulting in enhance of XBP1 (54kDa) translation. XBP1 protein binds to ERSE enhancing the expression of *grp78* and *grp94*, and binds to UPRE increasing the *edem2* expression.

OGD induce an increase of underglycosilated ATF6 form, these increase can be related with the translocation of ATF6 to Golgi to be cleaved. The cleaved ATF6 could translocate to nucleus but it is not related to the up-regulation of *grp78* and *grp94* expression. OGD activation of NMDAR also causes calcium influx and the subsequent activation of calpain. Calpain proteolyse procaspase-12 generating the active form of caspase-12.

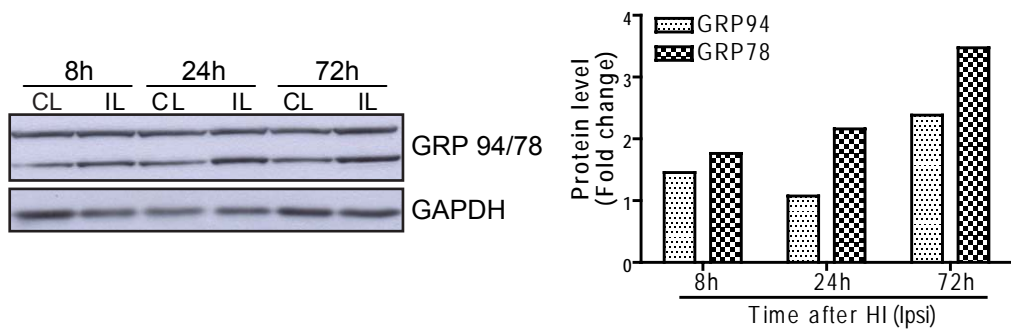
Supplemental figure 1. Brefeldin A and thapsigargin induce ER stress in mixed cultures of cortical neurons. Cortical cultures were treated with brefeldin A (BfA, 1 μ M) or thapsigargin (Tg, 5 μ M). **A**, RT-PCR products for *grp78* and *grp94* obtained from treated cortical cultures (top). Quantification of *grp78* and *grp94*

mRNAs, normalized to *actin* levels (bottom).*, $P < 0.01$, vs. vehicle. **B**, Western blot analysis of GRP78, GRP94 and pro-caspase-12, 24h after treatment. Actin was used as a loading control. **C**, Western blot analysis of total eIF2 α and phosphorylated eIF2 α (p-eIF2 α) in cultures at different times after treatment with thapsigargin (5 μ M). **D**, 24h after treatment cells were immunostained for active caspase-3 and the chromatin was stained with Hoechst 33258. **E**, Quantification of apoptotic cells in cortical cultures after treatment. Data are mean \pm SEM of 3 independent experiments performed in quadruplicates.*, $P < 0.05$, vs. vehicle. **F**, Cortical cultures were treated and the viability was determined at 24h by MTT assay. Data are mean \pm SEM of 3 independent experiments performed in quadruplicates. +, $P < 0.001$, vs. vehicle.

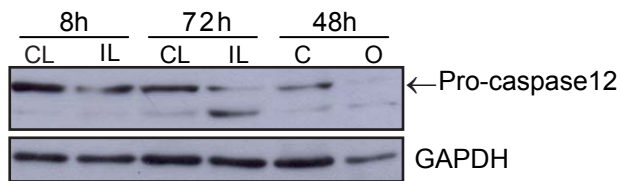
A

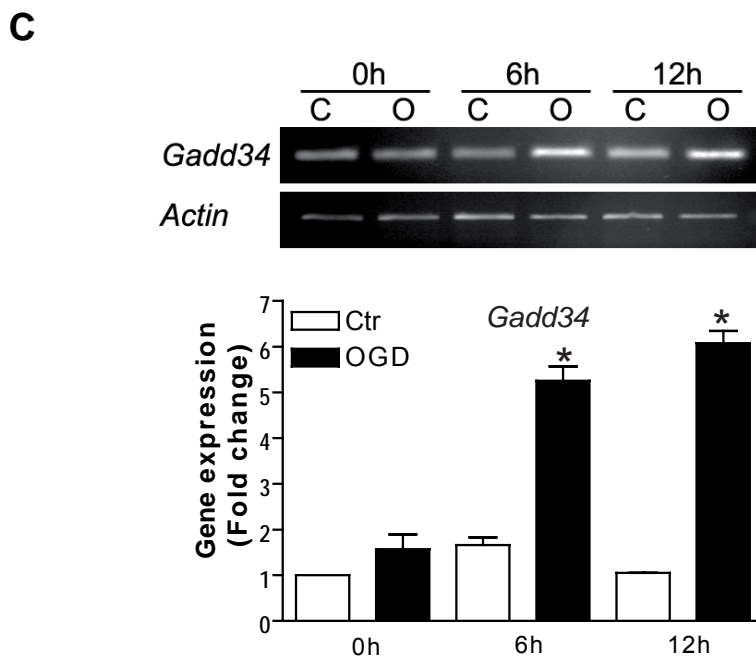
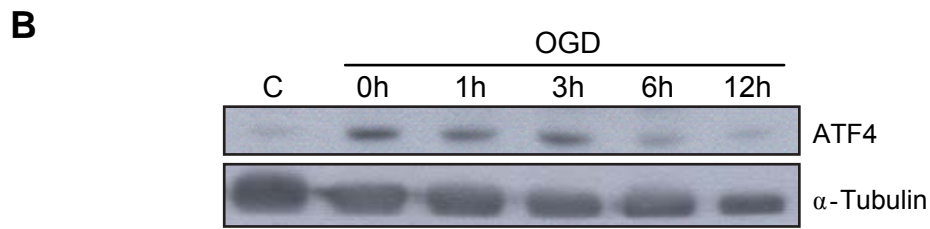
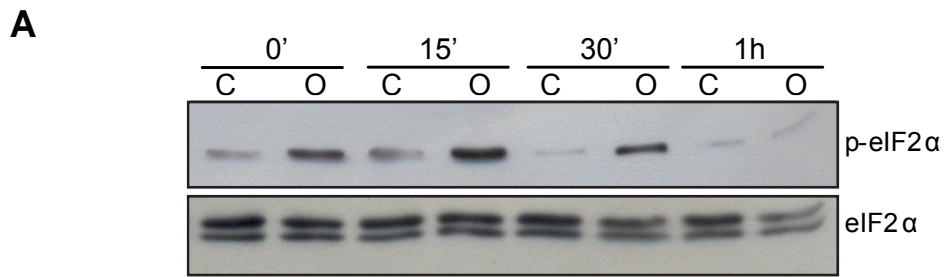


B

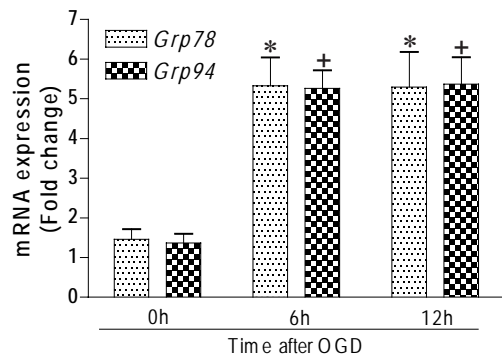
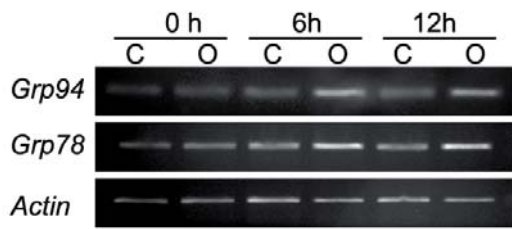


C

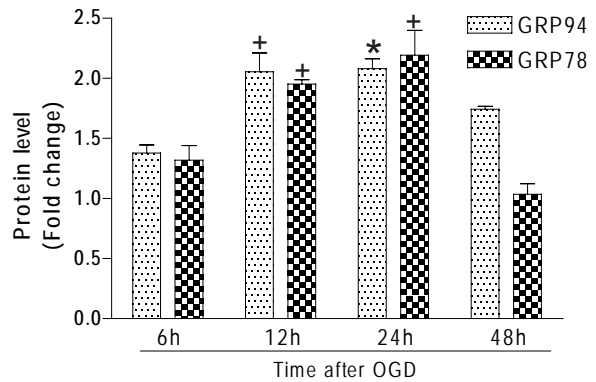
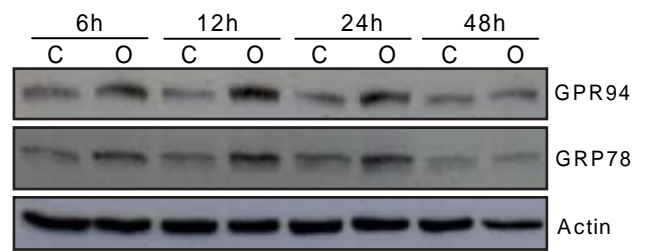




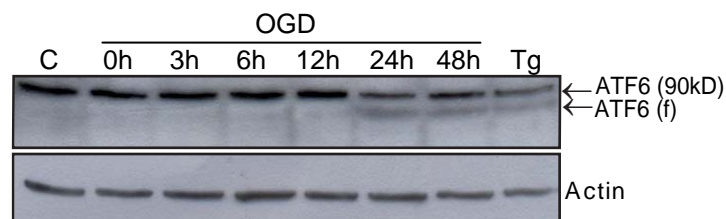
A



B



C



D

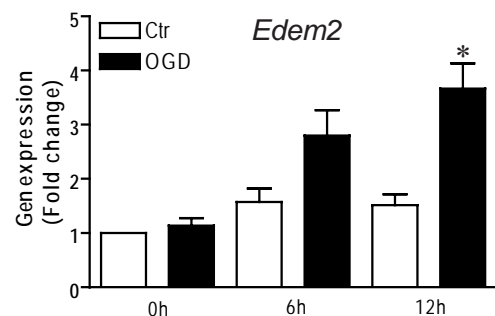
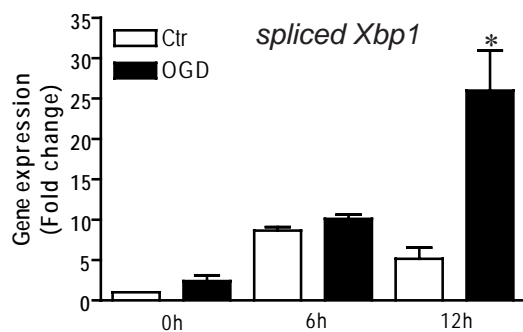
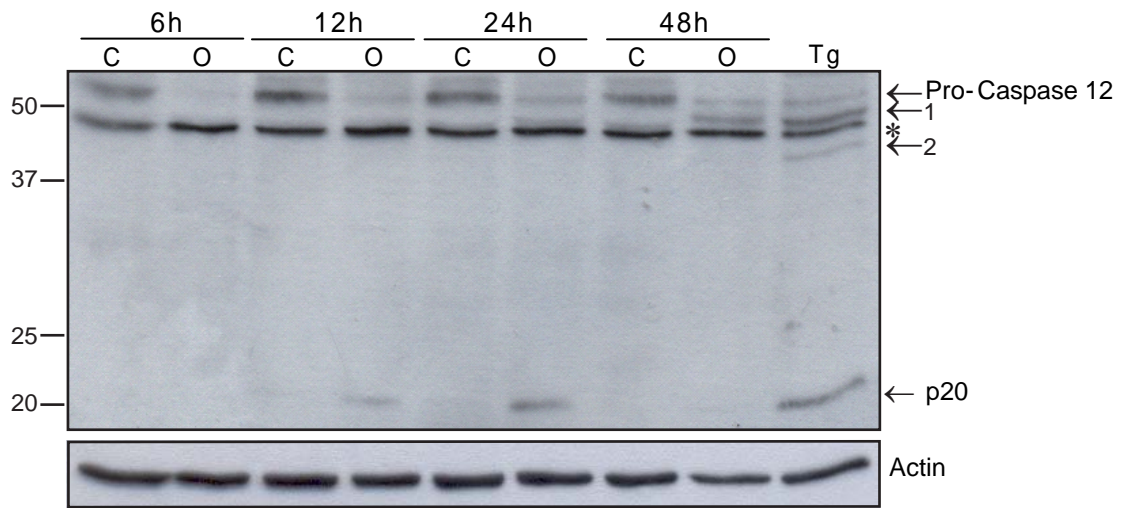
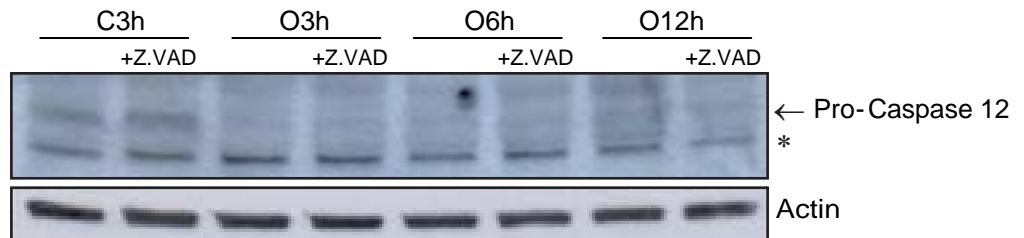


Figure 3 - Badiola et al.

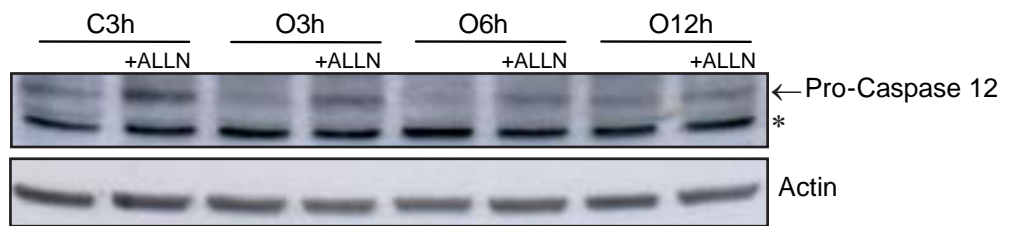
A



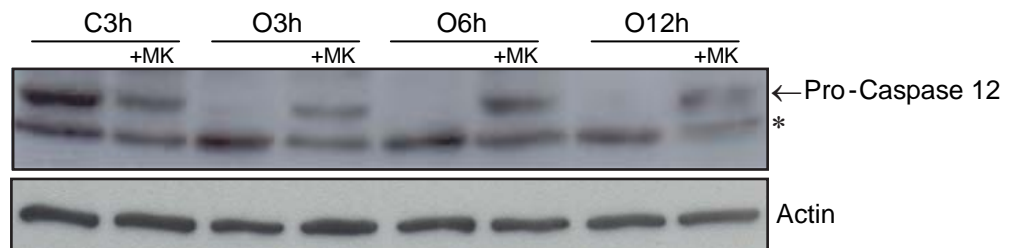
B



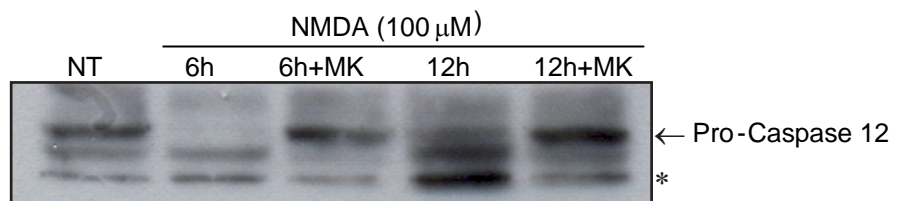
C



D



E



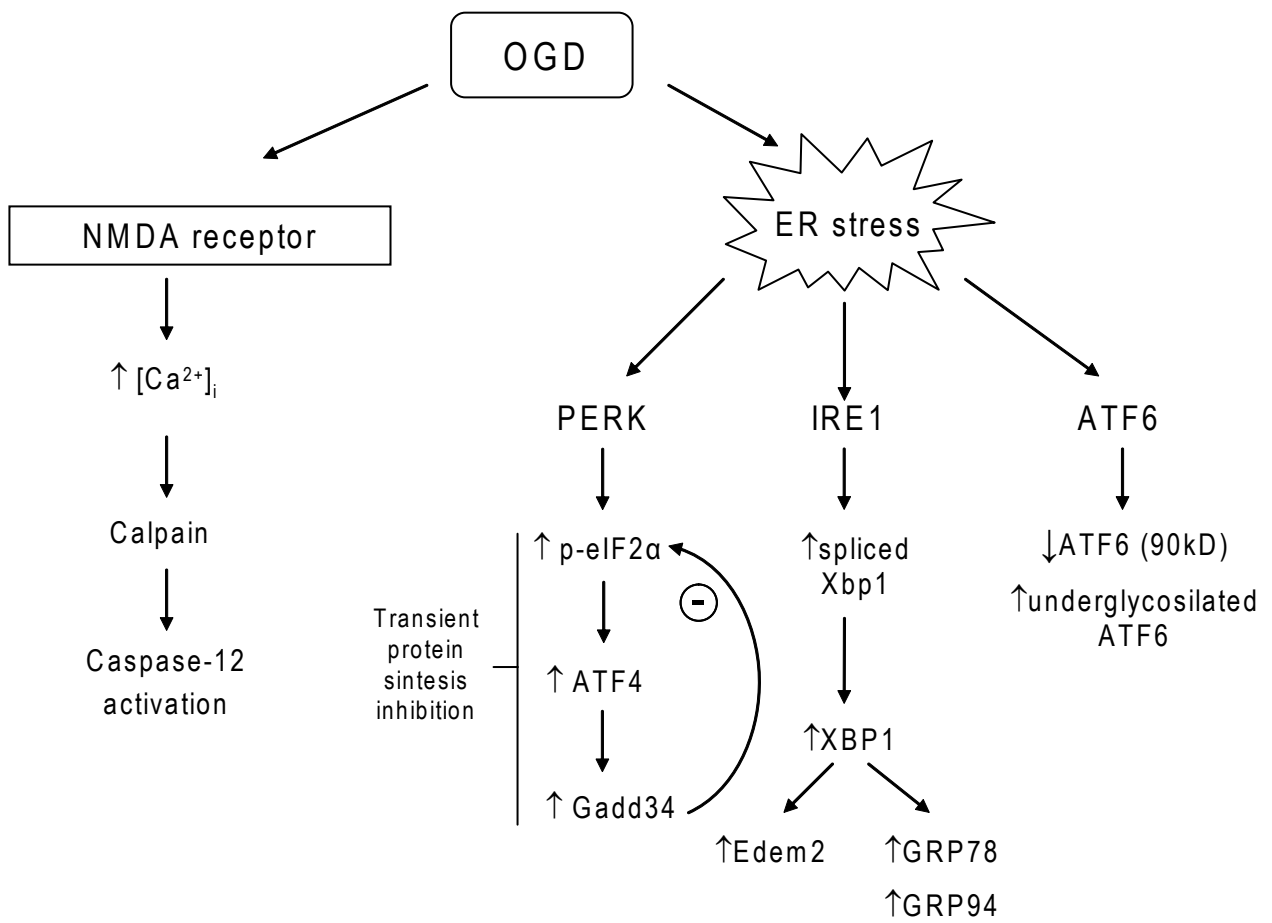
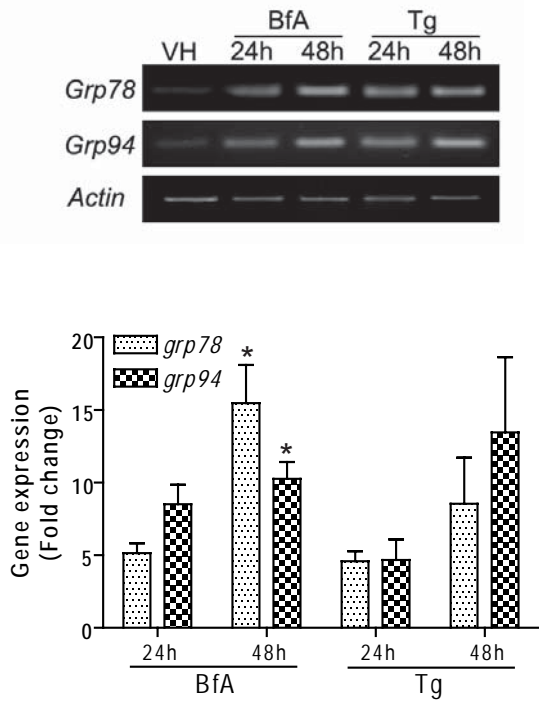
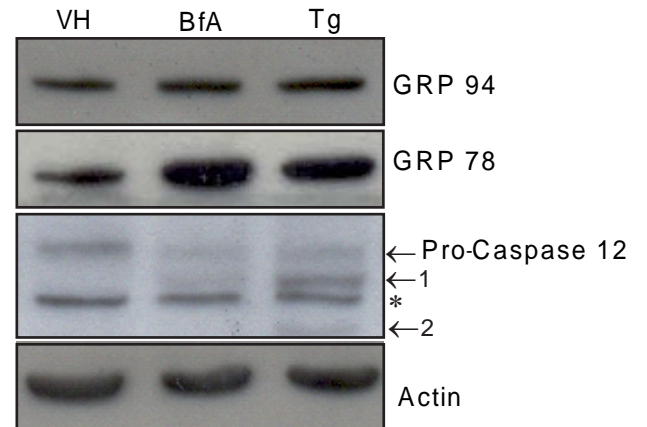


Figure 5 - Badiola et al.

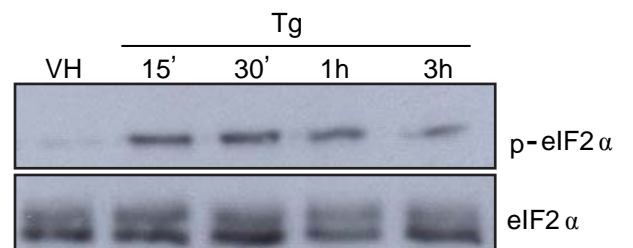
A



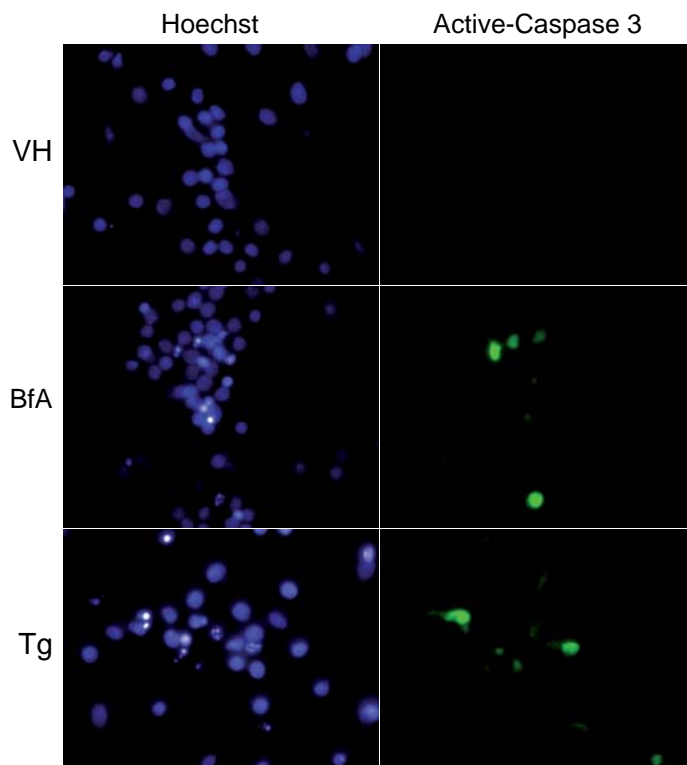
B



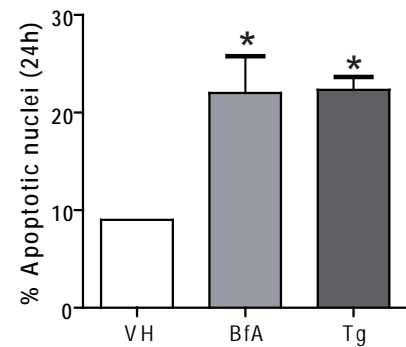
C



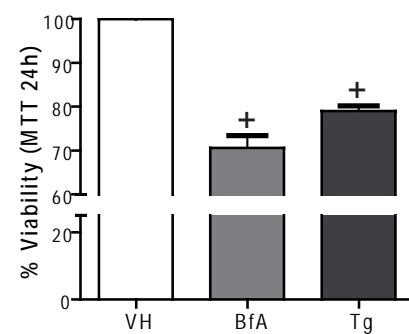
D



E



F



***3-Trabajo 3: Gene expression analysis in mixed cortical cultures
subjected to an oxygen and glucose deprivation (OGD)***

Pendiente de enviar a Molecular Brain Research

Gene expression analysis in mixed cortical cultures subjected to an oxygen and glucose deprivation (OGD)

Nahuai Badiola^{1,2,3}, Bruna Barneda^{1,2,3}, Rut Fadó^{1,2,3}, Alfredo Miñano^{1,2,3},
Josefa Sabriá^{1,2} & José Rodríguez-Alvarez^{1,2,3}

¹Institut de Neurociències and ²Departament de Bioquímica i Biologia Molecular or ³Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Spain

Abbreviated title: Gene expression in OGD cortical cultures

Number of text pages: 23

Number of figures: 2

Number of tables: 4

Corresponding author: Dr. José Rodríguez Alvarez

Instituto de Neurociencias, Edificio M, Campus de Bellaterra, Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Valles, Barcelona, Spain

Phone: (34) 935 811 525; Fax: (34) 935 811 573; Email: jose.rodriguez@uab.es

Keywords: TNF- α , apoptosis, caspase, ischemia, cell culture, brain.

Acknowledgments: This work was supported by grants from Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2001-1941; SAF2005-05106) and Ministerio de Sanidad y Consumo (Red G03/167) to J.R.A. N.B was recipient of a predoctoral fellowship from the Gobierno Vasco. N.B is a recipient of a pre-doctoral fellowship from the Universitat Autònoma de Barcelona.

INTRODUCTION

Insults to the brain that interrupt its blood flow, as an ischemia, results in the stop of oxygen supply combined with a massive reduction in glucose supply (hypoglycemia) and leads to neuronal death. The precise mechanisms involved in neuronal cell death are still incompletely known. During the recent years, the understanding of the cellular mechanisms involved in ischemic brain injury and the development of strategies to attenuate or to prevent ischemic injury have been a major focus of research. However, most of the studies have been designed to address these issues by investigating a single signalling pathway and/or expression of a single gene. By contrast, it is known that in complex pathologies, such as brain stroke, several pathways and/or group of functionally-related proteins are involved. So, it has become a priority to analyse which functionally-related protein clusters are affected in stroke. The power of broad-based gene expression analysis, such as microarray technology, allows performing these complex and extensive studies by a massive analysis of gene expression profiles. Thus, the analysis of differentially expressed genes and their products in response to ischemia can yield important information, leading to a better understanding of the causes of ischemic damage and could provide new information about proteins and/or proteins clusters that can be used as targets for therapeutic intervention.

Several previous studies have examined gene expression profiles in brain tissues following ischemia in rodent stroke models using microarray technology to elucidate the mechanisms involved in the neuronal death associated to this insult (Bates et al., 2001; Bowler et al., 2002; Lu et al., 2003, 2004; Raghavendra Rao et al., 2002; Schmidt-Kastner et al., 2002; Schroeter et al., 2003; Soriano et al., 2000; Stenzel- Poore et al., 2003). These studies revealed that cerebral ischemia induced the expression of genes associated with a number of general functions including apoptosis, inflammation and metabolism. The identification of these specific cellular and molecular pathways has led to further studies that have demonstrated their implication in the progression of neuronal injury following stroke (Dirnagl et al., 1999; Iadecola and Alexander, 2001; Lo et al., 2003).

In a previous work, we have characterized the cell death mediated by oxygen and glucose deprivation (OGD) in cortical cultures. Our results suggested that both necrosis and apoptosis contributed to OGD-mediated cell death (Malagelada *et al.* 2005). Since apoptotic death has a slower development, it has become a target for therapeutic intervention in brain ischemia. For that reason, the aim of this study was to analyze the gene expression changes induced by OGD in mixed cortical cell cultures in order to identify genes involved in the apoptotic death. The present study represents the first complete analysis of the expression profile (almost whole genome, over 28.000 genes) in OGD-induced mixed cortical culture.

MATERIAL AND METHODS

Reagents. Foetal calf serum, foetal horse serum and penicillin/streptomycin were obtained from Gibco (Grand Island, NY, USA). Poly-L-lysine (MW < 300,000), trypsin, soybean trypsin inhibitor and DNAase were provided by Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). All others chemicals were of the purest grade available from regular commercial sources.

Cell cultures. Primary cultures of mixed rat brain cortical cells containing both neurons and glia were prepared as described by (Goldberg and Choi 1993; Malagelada *et al.* 2004a) with modifications, from fetal Wistar rats at 17 days of gestation. The dissociated cells were plated at a density of 3×10^5 cells per square centimeter in Basal Medium Eagle (BME) supplemented with 5% fetal calf serum, 5% horse serum, 50 U/mL penicillin, 50 μ g/mL streptomycin, 2 mM glutamine and 10 mM glucose, and plated onto poly-L-lysine pre-coated wells. Cultures were kept at 37°C, 100% humidity and in a 95% air/ 5%CO₂ atmosphere for 7 days in vitro (DIV), when the plating medium was replaced by BME supplemented as above without fetal calf serum and with 10% horse serum containing 10 μ M cytosine arabinoside. The experiments were performed at 11-13 DIV. The procedures followed were in accordance with guidelines of the Comissió d'Ètica en l'Experimentació Animal i Humana of the Universitat Autònoma de Barcelona.

Oxygen-glucose deprivation. Cultures were oxygen and glucose deprived (OGD) as described before (Malagelada *et al.* 2004b), with minor modifications. The culture medium was replaced by a glucose-free Earle's balanced salt solution (BSS) with the following composition: NaCl 116 mM, KCl 5.4 mM, MgSO₄·7H₂O 0.8 mM, NaH₂PO₄·2H₂O 1 mM, NaHCO₃ 26.2 mM, Glycine 0.01 mM, CaCl₂·2H₂O 1.8 mM, pH 7.4, which was previously equilibrated in 0.8%O₂/94.2%N₂/5%CO₂ atmosphere at 37°C. The cultures were then placed in humidified hypoxic workstation for 90 min. (Invivo2 400, Ruskinn Technologies, Bridgend, United Kingdom) at 37°C and 0.8%O₂/94.2%N₂/5%CO₂ atmosphere. OGD was terminated by removing the cultures from the hypoxic workstation, replacing the deoxygenated and glucose-free BSS with the pre-OGD culture medium and returning the cells to the normoxic conditions. Control sister culture plates were exposed to oxygenated BSS containing 5.5 mM glucose in normoxic conditions during the same period of time as the OGD cultures.

RNA Isolation. Total RNA was obtained using the RNA extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer instructions.

Microarray. Affymetrix Rat Genome 230 2.0 arrays (Affymetrix Inc., Santa, CA) which contain approximately 28000 genes or ESTs, were used for the comparison of RNA from OGD-treated cultures and controls (Microarray was performed by Servicio Vall d'Hebron). Affymetrix expression data was normalized with RMA (Robust multiarray average), and the LIMMA package was used for statistical analysis to identify up-regulated and down-regulated genes in duplicate hybridizations using p value < 0.05. For genes with multiple probes we selected a single most informative probe showing the lowest p value.

For ontologic analysis and to group functional categories into clusters DAVID 2.0 statistic program was used. For these analyses only genes whose change 2-folds or more the expression were used (FC > 2-folds). The obtained results were indexed by score EASE (Expression Analysis Systematic Explorer). EASE is a bioinformatics program that provides statistical methods that facilitates the biological interpretation of gene list derived from results of a microarray analysis

(Hosack et al. 2003). Results with p-value < 0.05 were considered as strong enrichment in gene expression.

Reverse transcription - PCR. cDNA was synthesized from 1 µg total RNA using SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kit (Invitrogen, Foster City, CA, USA), following the manufacturer's indications. The reaction was performed in a Thermal Cycler as follows: 65°C for 5 min, 42°C for 50 min and 70°C for 15 min. Samples were then kept at -20°C until their utilization. The primers used for RT-PCR were: *Atf3* forward 5'- CAGGCAGGAGCATCCTTTGT-3', *Atf3* reverse 5'- GAGAATGGCCGGGATGGT-3', *Egr1* forward 5'- GCAACACTTTGTGGCCTGAA-3', *Egr1* reverse 5'-GAGTTGGGACTGGTAGGTGT-3', *Cebpδ* forward 5'-GAATTGCTACAGTTTCTTGG-3', *Cebpδ* reverse 5'-ATGCGCAGTCTCTTCCTC -3', *Nr4a1* forward 5'-GAAGGAGAAGAAGGTTGGAG-3', *Nr4a1* reverse 5'-CACCTTCCTATAACCAGCTGC -3', *Nr4a2* forward 5'-GGCGGAGACTGCTTGAAGTA-3', *Nr4a2* reverse 5'- AACACCGTAATGCTGACAGG -3', *Nr4a3* forward 5'- CCTGATTCTGGAGAGCAGTG-3', *Nr4a3* reverse 5'-CCTTCACAACCTCCACCAGA-3', 18S forward 5'-TCAAGAACGAAAGTCGGAGG-3', 18S reverse 5'-GGACATCTAA GGGCATCACA -3'. PCR products were run in 2% agarose gels.

Western blot analysis. Cells were homogenized in lysis buffer (62.5mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glycerol, 50mM DTT and 0.01% bromophenol blue). Protein concentration was measured by bicinchoninic acid assay (BCA Protein Assay kit; Pierce, Rockford, IL, USA). 30 µg of protein were resolved on a 10% SDS-PAGE gel and transferred onto Hybond-P (GH Healthcare, Buckinghamshire, UK), polyvinylidene difluoride membranes. The blots were blocked with 5% dry milk in TBS containing 0.1% Tween 20 and incubated overnight at 4°C in a blocking buffer containing primary antibodies. The following primary antibodies and dilutions were used rabbit anti-NR4A1 (1/500; Cell Signalling Technology, Inc., Beverly, MA, USA), mouse anti-NR4A2 and mouse anti-NR4A3 (1/1000; Abcam, Cambridge, UK), mouse anti-GAPDH (1/20 000; BD PharMingen). The blots were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary

antibodies (BD PharMingen) in blocking buffer and developed using the ECL™ Western Blotting Detection Reagent (GH Healthcare Europe).

RESULTS

Gene expression changes on microarray after OGD

We previously observed apoptosis hallmarks, such as caspase-3 activation or condensed chromatin, 6h after OGD although maximal cell death was observed 24h. For this reason, we decided to perform the gene expression profile study just after OGD (time 0h) and 6h after OGD. For these experiments, we have used the Affymetrix Rat Genome 430 2.0 arrays, that has 30.000 probe sets (over 28.000 genes). We did not see significant changes at 0h post-OGD versus control. However, at 6h post-OGD there was a great number of genes that increased their expression by 2 fold, minimal change that we have chosen to consider that a gene was either up regulated. The complete list of these genes is represented in a table in supplementary figure 1.

Ontological analysis

A stringent set of genes specifically upregulated 6h after OGD were imported to DAVID 2.0 program, to test for over-representation of annotation classes. Genes identified to be differentially expressed by 2-fold or greater according to microarray analysis and determined by LIMMA program were imported to DAVID 2.0 program to search for protein clusters modulated by OGD.

Analysis according with Gene Ontology was performed and the categories with the lower EASE score (always less than 0.05) are listed in tables (Supplementary fig 2). After, functional annotation, clustering tool was use to obtain groups putting together the similar or redundant biological functions, giving us more information about the main cellular processes affected in OGD-treated cultures. After this analysis, we observed that 5 clusters were specifically affected and were selected for further analysis (Figure 1).

Cluster 1 include 194 genes related with *cellular development, structure and morphogenesis*, inside this cluster we could found neuregulin1, bdnf, myosin Va, integrin alpha 5, integrin alpha 6, fibronectin, annexin a5, glycoprotein 38, connective tissue growth factor, tissue factor pathway inhibitor 2, actinin alpha 1, laminin gamma 1, gap junction membrane channel protein alpha 1, solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter) member 3, synapsin III, activity regulated cytoskeletal-associated protein, chondroitin sulfate proteoglycan 2 or collagen type XVIII alpha 1.

Cluster 2 is related with the *regulation of cell proliferation*, including 58 genes such as ras homolog gene family member, ras association (ralgds/af-6) domain family 4, retinoblastoma 1, b-cell translocation gene 2 anti-proliferative, nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in b-cells inhibitor alpha, cyclin-dependent kinase inhibitor 1a, fibroblast growth factor receptor 3, inhibitor of dna binding 1, helix-loop-helix protein (splice variation), hras like suppressor, insulin-like growth factor binding protein 3.

Cluster 3 includes *cell death and apoptosis* pathways (52 genes). We found either pro-apoptotic or anti-apoptotic genes. Some of the pro-apoptotic genes are tumor necrosis factor ligand superfamily member 12, tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a, tumor necrosis factor receptor superfamily member 6, nuclear receptor subfamily 4 group a member 1, heme oxygenase (decycling) 1, growth arrest and dna-damage-inducible 45 gamma and tissue inhibitor of metalloproteinase 3. In the group of anti-apoptotic genes is included bcl2-associated athanogene 3, b-cell translocation gene 2, anti-proliferative, nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in b-cells inhibitor alpha, brain derived neurotrophic factor and heat shock 27kda protein 1.

Cluster 4 includes genes related with *vasculature and angiogenesis processes* (41 genes). We observed an increase in: thrombospondin 2, angiopoietin-like protein 4, endothelial pas domain protein 1, fibroblast growth factor receptor 1, plasminogen activator tissue, angiotensinogen and coagulation factor III.

Cluster 5 is mainly referred to *stress and inflammatory response*. This cluster includes 97 genes. In response to stress we found some immediate-early genes (IEG): fos-like antigen 1, fbj murine osteosarcoma viral oncogene homolog, early growth response 1 and 2, immediate early response 2, nr4a family members or neuron-derived orphan receptor and we also find another stress response genes like CREB binding protein, chloride intracellular channel 1, heat shock 22kda protein 8 and heat shock 27kda protein 1. Involved with inflammatory process we found chemokine (c-c motif) ligands 1, 2, 7 and 20, complement component 1 q subcomponent, beta and gamma polypeptide, tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a, allograft inflammatory factor 1 and interleukin 1 receptor accessory protein.

We choose some genes (table II) to confirm their increase in OGD by RT-PCR. Genes were selected by taking in account if their expression was also described in animal models or if they could be physiologically relevant genes in the control of cell survival in OGD. However, the functionality of these genes in ischemia/OGD has not further studied.

Activating transcription factor 3 (ATF3)

ATF3 is a 181 amino acid protein that belongs to ATF/CREB transcription factor family, which has more than ten proteins with the bZIP DNA binding domain. This transcription factor is activated by different stimulus like cytokines, genotoxic agents, cicloheximide and another death inductors (Hai *et al.* 1999; Hai and Hartman 2001). It's activation was also related with ER stress (Wek *et al.* 2006; Jiang *et al.* 2004). A homodimer of ATF-3 represses transcription, whereas heterodimers with c-Jun, JunB or with members of C/EBP (CCAAT/*enhancer binding protein*) family activate the transcription (Chen *et al.* 1996). This ability allows ATF3 to activate or repress the expression of target genes depending of the promoter and cellular context. Few targets of ATF3 are already known, some of them are CHOP (Fawcett *et al.* 1999), E-selectin (Nawa *et al.* 2000) and is also shown that can regulate the own expression. Evidences supports both pro-survival or pro-apoptotic role of ATF3, probably it will depend in cellular context (Kawauchi *et al.* 2002)

(Mashima *et al.* 2001;Zhang *et al.* 2001;Persengiev and Green 2003). We found relevant increase of *atf3* 6h after OGD (Fig. 1A) supporting the result obtained by microarray analysis (Table 1)

C/EBP delta (CEBP δ)

CEBP δ belongs to C/EBP transcription factor family which is formed by six members. All C/EBPs share substantial sequence identity in the C-terminal, which contains the bZIP domain. This domain consists of basic aminoacid-rich DNA-binding region followed by a dimerization motif termed the leucine zipper (Ramji and Foka 2002). The N-terminal presents much more variability and is the region which binds to different coactivators (for example, CBP/p300) (Mink *et al.* 1997).

Cebp δ was first characterized as an acute phase inflammatory response gene. Expression of *cebpd* is typically low in most cell types and tissues, but is rapidly induced by a variety of extracellular stimuli as hormones, interleukines, cytokines or glutamate (Ramji and Foka 2002;Takiguchi 1998). Is well documented the role of this transcription factor in osteoblast proliferation (Umayahara *et al.* 1997;Billiard *et al.* 2001) and in epithelial cells differentiation (Sugahara *et al.* 1999;Cassel *et al.* 2000;O'Rourke *et al.* 1999), but there is few data about its role in brain.

Here we observe clear increase in *cebpd* expression already at time 0h after OGD, and this increase is sustained until 12h (Fig. 1B). This observations corroborate the microarrays results were significant increase was also detect since 0h post-OGD (Table 1), and tell us that *Cebpd* upregulation is really fast after OGD and is long-lasting.

Early growth response 1 (Egr1)

Egr1 is an IEG that encodes a nuclear phosphoprotein containing three zinc finger elements, these bind target GC-rich elements in the promoter of many different genes, thereby regulating transcription (Cao *et al.* 1993; Yan *et al.* 2000). The coactivators CBP (*CREB Binding Protein*) and p300 can bind to promoter and increase transactivation of Egr1. The expression of *egr1* can be induced by diverse signals like growth factors, hormones, UV or hypoxia (Yan *et al.* 2000). There are also evidences that its regulation can be induced by TNF α (MECHTCHERIAKOVA *et al.* 2001; Cao *et al.* 1992). The regulation of *egr1* expression seems to be mediated by MAPK, including, ERK, JNK and p38 (Lim *et al.* 1998; Guha *et al.* 2001). Egr1 regulates the expression of wide range of genes including cytokines, interleukines, TF, PAI-1, ICAM-1, VEGF and its own expression (Yan *et al.* 2000) (Maltzman *et al.* 1996) (Kim *et al.* 1989).

We observed an increase in *egr1* expression at time 0h not only in OGD-treated cells but also in control (Fig. 1C). This increase in control cells is probably due to the serum deprivation (Gos *et al.* 2005) because they stay in serum-free buffer (BSS) for short time before return complete media. Consistently, 6 and 12h after treatment there is minimal expression of *egr1* in control cells whereas OGD-treated cells show an important increase of expression (Fig. 1C).

NR4A subfamily

The nuclear receptor subfamily 4, group A (NR4A) belongs to the hormone nuclear receptor superfamily and include three members, NR4A1 (Nur77), NR4A2 (Nurr1) and NR4A3 (NOR-1). Sequence and functional analysis reveal that all three receptor share a modular structure, characterized by different functional domains, with variable N-terminal, central DNA binding domain (DBD) and high conserved C-terminal which contains the ligand binding domain (LBD). N-terminal domain varies in both length and amino acid composition and is responsible for interaction with other transcription factors, while DBD present two highly conserved zinc fingers whose mediate the interaction with DNA (Martinez-Gonzalez and Badimon 2005; Giguere 1999; Mangelsdorf *et al.* 1995).

The binding site for these transcription factors is A/TAAAGGTCA octanucleotide named NBRE (NGFI-B *response element*). Although NR4A group contain LBD, the activation of transcription is ligand-independent (Wang *et al.* 2003).

Nr4a are IEGs that can response to a different stimulus as growth factors, mitogenic factors and cytokines (Martinez-Gonzalez and Badimon 2005; Martinez-Gonzalez *et al.* 2003; Gruber *et al.* 2003). The induction of these genes in vascular cells is mediated by CREB (Martinez-Gonzalez and Badimon 2005; Rajpal *et al.* 2003), but different transcription factors, including AP-1, NF- κ B or MEF-2, can participate in the up-regulation of the NR4A genes in other cell types (Liu *et al.* 1999; McEvoy *et al.* 2002; Youn *et al.* 2000). The more significant targets are HIF, PAI, FasL and TRAIL (Gruber *et al.* 2003; Rajpal *et al.* 2003). These orphan nuclear receptors are involved in a wide range of cellular process like inflammation, apoptosis, carcinogenesis or aterogenesis.

By semi-quantitative PCR we could confirm *nr4a1* and *nr4a3* expression increase whereas no increase in *nr4a2* levels was detect after OGD (Fig. 2A). Same results were obtained when protein levels were studied. The NR4A2 expression remains in the same levels than control in all studied times after OGD, whereas protein levels of NR4A1 and NR4A3 are increased in OGD comparing with the control (Fig. 2B). Different pattern of increase was observed between NR4A1 and NR4A3, first one was detectable since time 0h post-OGD until 6h, and NR4A3 was not increased until 3h post-OGD but its levels remains increased until 9h.

DISCUSSION

The integrated cellular response to ischemic injury is dynamic and complex and the associated transcriptional activation requires large-scale array technology for a compressive analysis. Here we used Affymetrix Rat Genome 430 2.0 array to study expression profile changes induced by OGD. At first glance we detect several IEG as members of *fos*, *jun*, *nr4a* or *egr* families as well other genes which increase is described in brain ischemia like *bdnf*, *ngr1*, *gadd45* β and γ ,

hmox1, *dusp5*, *cebpδ* o *tnfrs1a* (Supplementary fig 1). This results indicates that OGD affects in some way similar genes involved in animal models of ischemia, suggesting that OGD model in mixed cortical cultures can mimics, at least in part, processes involved in brain ischemia.

Cluster 1 involved 194 genes related with changes in structure and morphology indicating that different cells of culture are suffering changes in this way. Astrocytes probably are getting reactive as we detect 1'7 fold increase in *gfap* expression (data not shown). In the same way microglia get reactive changing amoeboid morphology for round morphology, change that we could observed by immunocytochemistry (data not shown). In other hand, neurons are changing morphology with neurites and axon retraction, and losing in part cellular structure as we can observe visually in cultures and with MAP2 degradation (data not shown). Anyway, OGD also induces a heavy increase in *arc* expression, an important gene involved in dendrite formation and synaptic plasticity processes (Lyford *et al.* 1995;Tzingounis and Nicoll 2006). There are two papers describing *arc* induction in animal models of brain ischemia, and they relate this increase with synaptic reorganization and plasticity (Rickhag *et al.* 2007;Kunizuka *et al.* 1999). So, we can consider that OGD is producing a deep reorganization of synapses in surviving cells meanwhile a loss of structure is also present due to cell death.

Cluster 2 includes 58 genes involved in the control of cell proliferation, both positive and negative regulation. We can think that positive processes are happening in glial cells proliferating in response to inflammatory mediators whereas the negative control of proliferation is mainly due to neurons, reflecting in someway the OGD-mediated apoptotic process, because a lot of components of cell cycle machinery are also implicated in apoptosis.

Cluster 3 is related with cell death and apoptosis containing 52 genes. We know that in OGD-treated cultures there is a 50% of cell death after 24h, where a half is necrotic death and the other half is apoptotic (Malagelada *et al.* 2005). This is well reflected in microarray results where there is an increase in general cell death category but also in specific apoptosis related genes, both pro-apoptotic

and anti-apoptotic genes. There is a clear increase in *tnfr1* (*tnfrsf1a*) as we previously observed by real-time PCR (Badiola et al. submitted). Expression of *tnfr2* (*tnfrsf1b*) was also increased in microarray (without arriving to 2-fold increase) confirming our previous observations (data not shown). Moreover, the expression of other receptors of TNFR superfamily were also increased (*tnfrsf6* and *tnfrsf12a*), supporting the idea that TNF α pathway plays an important role in OGD. Inside the genes that could play an anti-apoptotic role we found *bdnf*, with well described neuroprotective properties, and neuregulin 1 (*ngr1*), which expression is increased in brain ischemia and could play a neuroprotective role through erbB receptors (Parker *et al.* 2002; Xu and Ford 2005). Another gene involved in this process is *bag3*, bcl-2 family member, that is described that acts synergically with bcl-2 to block apoptosis (Lee *et al.* 1999).

Surprisingly, cluster 4 is related with vascular blood vessel development and angiogenesis (41 genes). This is surprising since in our mixed cortical cultures there are no vascular cells, although it is possible that the observed changes could be due to the presence of angiogenic molecules both in cultured neurons and glial cells (del Zoppo and Mabuchi 2003; Lennmyr *et al.* 1998; Hayashi *et al.* 1997). In this way, there is an *in vitro* study where the contact between endothelial cells culture (BBMEC) and hypoxia-induced astrocytes produced an increase in tubule formation, suggesting that stimulated astrocytes release some angiogenic molecule to the media (Ment *et al.* 1997). In our culture, we also observe increase in genes involved with blood flow regulation and with modulation of thrombus formation (*thbs1*, *plat*, *plau*, *plaur*) and others (*fgl2*, *angptl4*, *fn1*, *agf*).

Cluster 5 involves stress and inflammatory response, containing 97 genes. In response to stress we can identify several IEG and some chaperones. Accordingly with many other *in vivo* results, after OGD we can observe also an inflammatory response, with the increase of several chemokines (*cxcl1*, *ccl2*, *ccl7*, *ccl12*, *ccl20*) and genes related with interleukins (*il1rap*, *il6st*, *il6* has an 1.7 fold increase), antigens (*cd9*, *cd44*) and adhesion molecules (*icam1* y *ncam1*). Thus, putting together with TNF α receptors expression increase let us to think

that there is an inflammatory-like response in culture probably due to cytokines release.

Comparing our results with microarray analysis performed in animal models of brain ischemia we can observe several similarities. The main cellular processes observed in OGD, as cellular structure related changes, cell death-apoptosis, angiogenesis and inflammatory response are also detected in animal models (Jin *et al.* 2001;Kim *et al.* 2004;Rickhag *et al.* 2006;Schmidt-Kastner *et al.* 2002;Soriano *et al.* 2000;Tang *et al.* 2006;Yakubov *et al.* 2004). Taken together we can affirm that OGD is a good model to study brain ischemia, from the gene expression point of view, since our results are similar to the ones reported in *in vivo* models. Although mixed cortical cultures did not preserve the architecture of cerebral parenquima and there is a lack of blood vessels, they maintain interaction between glia and neurons that allows to simulate in some way the response of this cells as a whole, but having more facilities to study them individually.

We have confirmed the changes in gene expression for some genes of our interest. It has been described that *Atf3* expression is increased after exposure of cytokines or several death inductors. Here we found a strong increase of *atf3* in OGD-treated cells. These results are in agreement with the increase described after focal cerebral ischemia (Ohba *et al.* 2004;Ohba *et al.* 2003). Although it is known the increase of *atf3* in brain ischemia, the physiological role is still unknown.

Although role of CEBP δ in osteoblast or epithelial cells is well established (Billiard *et al.* 2001;O'Rourke *et al.* 1999;Sugahara *et al.* 1999;Umayahara *et al.* 1997), there is few literature about CEBP δ role in the brain. There are some data relating CEBP δ with the memory consolidation and with Alzheimer disease (Li *et al.* 2004;Sterneck *et al.* 1998), but nothing is known about its role in brain ischemia except a report that shown an increase in its expression (Soga *et al.* 2003). We also observed the increase in *cebp δ* expression in OGD-treated cultures. This increase is happening really fast after deprivation and is maintained for long time, suggesting that is taking part somehow in OGD-activated mechanisms.

Few years ago an increase in *egr1* expression and other IEG was described in brain ischemia (Honkaniemi *et al.* 1997; McGahan *et al.* 1998; Wang *et al.* 1995). In a recent study it was observed that KO mice for *egr1* presents minor ischemic damage whereas the overexpression of this protein exacerbate the damage (Tureyen *et al.* 2008). Although in this study the authors attribute the minor damage to a reduction of inflammation in *egr1* absence, more detailed studies about the molecular mechanisms about the Egr1 contribution to ischemic damage are necessary. Here we observed clear increase of *egr1* in OGD-treated cultures suggesting that it is playing a role in this process.

The expression of *nr4a* in brain was described more than ten years ago (Zetterstrom *et al.* 1996) and different studies have observed increase of this IEG in brain ischemia (Honkaniemi *et al.* 1997; Hung *et al.* 2000; Yakubov *et al.* 2004), but nothing about their role in this context is known. Although the three nuclear receptors are highly homologous they have different abilities for dimerize, forming homodimers or heterodimers with other transcription factors. In fact, NR4A2 KO mice die prematurely lacking dopaminergic neurogenesis (Zetterstrom *et al.* 1997) suggesting a specific role of this protein, not related with the two other members. In fact, it is described the redundant function of NR4A1 and NR4A3 in T-cell apoptosis without the intervention of NR4A2 (Cheng *et al.* 1997; Calnan *et al.* 1995). Here we observed the OGD-mediated increase of NR4A1 and NR4A3 but not NR4A2 suggesting also the existence of a different regulation of these genes after OGD.

We are now performing further experiments to elucidate the role of these proteins in OGD, basically by silencing their gene expression by using specific sh-RNA.

REFERENCES

- Billiard J., Grewal S. S., Lukaesko L., Stork P. J. and Rotwein P. (2001) Hormonal control of insulin-like growth factor I gene transcription in human osteoblasts: dual actions of cAMP-dependent protein kinase on CCAAT/enhancer-binding protein delta. *J Biol Chem* **276**, 31238-31246.
- Calnan B. J., Szychowski S., Chan F. K., Cado D. and Winoto A. (1995) A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection. *Immunity* **3**, 273-282.
- Cao X., Mahendran R., Guy G. R. and Tan Y. H. (1993) Detection and characterization of cellular EGR-1 binding to its recognition site. *J. Biol. Chem.* **268**, 16949-16957.
- Cao X. M., Guy G. R., Sukhatme V. P. and Tan Y. H. (1992) Regulation of the Egr-1 gene by tumor necrosis factor and interferons in primary human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **267**, 1345-1349.
- Cassel T. N., Nordlund-Moller L., Andersson O., Gustafsson J. A. and Nord M. (2000) C/EBPalpha and C/EBPdelta activate the clara cell secretory protein gene through interaction with two adjacent C/EBP-binding sites. *Am. J Respir. Cell Mol Biol* **22**, 469-480.
- Chen B. P., Wolfgang C. D. and Hai T. (1996) Analysis of ATF3, a transcription factor induced by physiological stresses and modulated by gadd153/Chop10. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1157-1168.
- Cheng L. E., Chan F. K., Cado D. and Winoto A. (1997) Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *EMBO J* **16**, 1865-1875.
- del Zoppo G. J. and Mabuchi T. (2003) Cerebral Microvessel Responses to Focal Ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **23**, 879-894.

Fawcett T. W., Martindale J. L., Guyton K. Z., Hai T. and Holbrook N. J. (1999) Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive-element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response. *Biochem J* **339** (Pt 1), 135-141.

Giguere V. (1999) Orphan Nuclear Receptors: From Gene to Function. *Endocr Rev* **20**, 689-725.

Goldberg M. P. and Choi D. W. (1993) Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell cultured neurons: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J. Neurosci.* **13**, 3510-3524.

Gos M., Miloszezewska J., Swoboda P., Trembacz H., Skierski J. and Janik P. (2005) Cellular quiescence induced by contact inhibition or serum withdrawal in C3H10T1/2 cells. *Cell Prolif.* **38**, 107-116.

Gruber F., Hufnagl P., Hofer-Warbinek R., Schmid J. A., Breuss J. M., Huber-Beckmann R., Lucerna M., Papac N., Harant H., Lindley I., de Martin R. and Binder B. R. (2003) Direct binding of Nur77/NAK-1 to the plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) promoter regulates TNFalpha -induced PAI-1 expression. *Blood* **101**, 3042-3048.

Guha M., O'Connell M. A., Pawlinski R., Hollis A., McGovern P., Yan S. F., Stern D. and Mackman N. (2001) Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood* **98**, 1429-1439.

Hai T. and Hartman M. G. (2001) The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* **273**, 1-11.

Hai T., Wolfgang C. D., Marsee D. K., Allen A. E. and Sivaprasad U. (1999) ATF3 and stress responses. *Gene Expr.* **7**, 321-335.

Hayashi T., Abe K., Suzuki H. and Itoyama Y. (1997) Rapid induction of vascular endothelial growth factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* **28**, 2039-2044.

Honkaniemi J., States B. A., Weinstein P. R., Espinoza J. and Sharp F. R. (1997) Expression of Zinc Finger Immediate Early Genes in Rat Brain After Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* **17**, 636-646.

Hosack D. A., Dennis G., Jr., Sherman B. T., Lane H. C. and Lempicki R. A. (2003) Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol* **4**, R70.

Hung A. C., Huang H. M., Tsay H. J., Lin T. N., Kuo J. S. and Sun S. H. (2000) ATP-stimulated c-fos and zif268 mRNA expression is inhibited by chemical hypoxia in a rat brain-derived type 2 astrocyte cell line, RBA-2. *J Cell Biochem* **77**, 323-332.

Jiang H. Y., Wek S. A., McGrath B. C., Lu D., Hai T., Harding H. P., Wang X., Ron D., Cavener D. R. and Wek R. C. (2004) Activating Transcription Factor 3 Is Integral to the Eukaryotic Initiation Factor 2 Kinase Stress Response. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 1365-1377.

Jin K., Mao X. O., Eshoo M. W., Nagayama T., Minami M., Simon R. P. and Greenberg D. A. (2001) Microarray analysis of hippocampal gene expression in global cerebral ischemia. *Ann. Neurol.* **50**, 93-103.

Kawauchi J., Zhang C., Nobori K., Hashimoto Y., Adachi M. T., Noda A., Sunamori M. and Kitajima S. (2002) Transcriptional repressor activating transcription factor 3 protects human umbilical vein endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis through down-regulation of p53 transcription. *J Biol Chem* **277**, 39025-39034.

Kim J. B., Piao C. S., Lee K. W., Han P. L., Ahn J. I., Lee Y. S. and Lee J. K. (2004) Delayed genomic responses to transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurochem.* **89**, 1271-1282.

Kim S. J., Jeang K. T., Glick A. B., Sporn M. B. and Roberts A. B. (1989) Promoter sequences of the human transforming growth factor-beta 1 gene responsive to transforming growth factor-beta 1 autoinduction. *J Biol Chem* **264**, 7041-7045.

Kunizuka H., Kinouchi H., Arai S., Izaki K., Mikawa S., Kamii H., Sugawara T., Suzuki A., Mizoi K. and Yoshimoto T. (1999) Activation of Arc gene, a dendritic immediate early gene, by middle cerebral artery occlusion in rat brain. *Neuroreport* **10**, 1717-1722.

Lee J. H., Takahashi T., Yasuhara N., Inazawa J., Kamada S. and Tsujimoto Y. (1999) Bis, a Bcl-2-binding protein that synergizes with Bcl-2 in preventing cell death. *Oncogene* **18**, 6183-6190.

Lenmyr F., Ata K. A., Funa K., Olsson Y. and Terent A. (1998) Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (Flt-1 and Flk-1) following permanent and transient occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* **57**, 874-882.

Li R., Strohmeyer R., Liang Z., Lue L. F. and Rogers J. (2004) CCAAT/enhancer binding protein delta (C/EBPdelta) expression and elevation in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **25**, 991-999.

Lim C. P., Jain N. and Cao X. (1998) Stress-induced immediate-early gene, egr-1, involves activation of p38/JNK1. *Oncogene* **16**, 2915-2926.

Liu X., Chen X., Zachar V., Chang C. and Ebbesen P. (1999) Transcriptional activation of human TR3/nur77 gene expression by human T-lymphotropic virus type I Tax protein through two AP-1-like elements. *J Gen Virol* **80**, 3073-3081.

Lyford G. L., Yamagata K., Kaufmann W. E., Barnes C. A., Sanders L. K., Copeland N. G., Gilbert D. J., Jenkins N. A., Lanahan A. A. and Worley P. F. (1995) Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* **14**, 433-445.

Malagelada C., Xifro X., Badiola N., Sabria J. and Rodriguez-Alvarez J. (2004b) Histamine H₂-receptor antagonist ranitidine protects against neural death induced by oxygen-glucose deprivation. *Stroke* **35**, 2396-2401.

Malagelada C., Xifro X., Badiola N., Sabria J. and Rodriguez-Alvarez J. (2004a) Histamine H₂-receptor antagonist ranitidine protects against neural death induced by oxygen-glucose deprivation. *Stroke* **35**, 2396-2401.

Malagelada C., Xifro X., Milano A., Sabria J. and Rodriguez-Alvarez J. (2005) Contribution of caspase-mediated apoptosis to the cell death caused by oxygen-glucose deprivation in cortical cell cultures. *Neurobiology of Disease* **20**, 27-37.

Maltzman J. S., Carmen J. A. and Monroe J. G. (1996) Transcriptional regulation of the Icam-1 gene in antigen receptor- and phorbol ester-stimulated B lymphocytes: role for transcription factor EGR1. *J Exp. Med.* **183**, 1747-1759.

Mangelsdorf D. J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schutz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P. and Evans R. M. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835-839.

Martinez-Gonzalez J. and Badimon L. (2005) The NR4A subfamily of nuclear receptors: new early genes regulated by growth factors in vascular cells. *Cardiovasc Res* **65**, 609-618.

Martinez-Gonzalez J., Rius J., Castello A., Cases-Langhoff C. and Badimon L. (2003) Neuron-Derived Orphan Receptor-1 (NOR-1) Modulates Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. *Circ Res* **92**, 96-103.

Mashima T., Udagawa S. and Tsuruo T. (2001) Involvement of transcriptional repressor ATF3 in acceleration of caspase protease activation during DNA damaging agent-induced apoptosis. *J Cell Physiol* **188**, 352-358.

McEvoy A. N., Murphy E. A., Ponnio T., Conneely O. M., Bresnihan B., FitzGerald O. and Murphy E. P. (2002) Activation of Nuclear Orphan Receptor NURR1 Transcription by NF- κ B and Cyclic Adenosine 5'-Monophosphate

Response Element-Binding Protein in Rheumatoid Arthritis Synovial Tissue. *J Immunol* **168**, 2979-2987.

McGahan L., Hakim A. M., Nakabeppu Y. and Robertson G. S. (1998) Ischemia-induced CA1 neuronal death is preceded by elevated FosB and Jun expression and reduced NGFI-A and JunB levels. *Brain Res Mol Brain Res* **56**, 146-161.

MECHTCHERIAKOVA D. I. A. N., SCHABBAUER G. E. R. N., LUCERNA M. A. R. K., CLAUSS M. A. T. T., DE MARTIN R. A. I. N., Binder B. R. and HOFER E. R. H. A. (2001) Specificity, diversity, and convergence in VEGF and TNF- α signaling events leading to tissue factor up-regulation via EGR-1 in endothelial cells. *FASEB J.* **15**, 230-242.

Ment L. R., Stewart W. B., Fronc R., Seashore C., Mahooti S., Scaramuzzino D. and Madri J. A. (1997) Vascular endothelial growth factor mediates reactive angiogenesis in the postnatal developing brain. *Developmental Brain Research* **100**, 52-61.

Mink S., Haenig B. and Klempnauer K. H. (1997) Interaction and functional collaboration of p300 and C/EBP β . *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6609-6617.

Nawa T., Nawa M. T., Cai Y., Zhang C., Uchimura I., Narumi S., Numano F. and Kitajima S. (2000) Repression of TNF- α -Induced E-Selectin Expression by PPAR Activators: Involvement of Transcriptional Repressor LRF-1/ATF3. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **275**, 406-411.

O'Rourke J. P., Newbound G. C., Hutt J. A. and DeWille J. (1999) CCAAT/enhancer-binding protein delta regulates mammary epithelial cell G0 growth arrest and apoptosis. *J Biol Chem* **274**, 16582-16589.

Ohba N., Kiryu-Seo S., Maeda M., Muraoka M., Ishii M. and Kiyama H. (2004) Expression of damage-induced neuronal endopeptidase (DINE) mRNA in peri-infarct cortical and thalamic neurons following middle cerebral artery occlusion. *J Neurochem.* **91**, 956-964.

Ohba N., Maeda M., Nakagomi S., Muraoka M. and Kiyama H. (2003) Biphasic expression of activating transcription factor-3 in neurons after cerebral infarction. *Brain Res Mol Brain Res* **115**, 147-156.

Parker M. W., Chen Y., Hallenbeck J. M. and Ford B. D. (2002) Neuregulin expression after focal stroke in the rat. *Neuroscience Letters* **334**, 169-172.

Persengiev S. P. and Green M. R. (2003) The role of ATF/CREB family members in cell growth, survival and apoptosis. *Apoptosis*. **8**, 225-228.

Rajpal A., Cho Y. A., Yelent B., Koza-Taylor P. H., Li D., Chen E., Whang M., Kang C., Turi T. G. and Winoto A. (2003) Transcriptional activation of known and novel apoptotic pathways by Nur77 orphan steroid receptor. *EMBO J* **22**, 6526-6536.

Ramji D. P. and Foka P. (2002) CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* **365**, 561-575.

Rickhag M., Wieloch T., Gido G., Elmer E., Krogh M., Murray J., Lohr S., Bitter H., Chin D. J., von S. D., Shamloo M. and Nikolich K. (2006) Comprehensive regional and temporal gene expression profiling of the rat brain during the first 24 h after experimental stroke identifies dynamic ischemia-induced gene expression patterns, and reveals a biphasic activation of genes in surviving tissue. *J Neurochem*. **96**, 14-29.

Rickhag M., Teillum M. and Wieloch T. (2007) Rapid and long-term induction of effector immediate early genes (BDNF, Neurtin and Arc) in peri-infarct cortex and dentate gyrus after ischemic injury in rat brain. *Brain Research* **1151**, 203-210.

Schmidt-Kastner R., Zhang B., Belayev L., Khoutorova L., Amin R., Busto R. and Ginsberg M. D. (2002) DNA microarray analysis of cortical gene expression during early recirculation after focal brain ischemia in rat. *Brain Res Mol Brain Res* **108**, 81-93.

Soga Y., Yamanaka R., Nishino K. and Tanaka R. (2003) CCAAT/enhancer binding proteins are expressed in the gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia. *Neurosci. Lett.* **337**, 106-110.

Soriano M. A., Tessier M., Certa U. and Gill R. (2000) Parallel gene expression monitoring using oligonucleotide probe arrays of multiple transcripts with an animal model of focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **20**, 1045-1055.

Sterneck E., Paylor R., Jackson-Lewis V., Libbey M., Przedborski S., Tessarollo L., Crawley J. N. and Johnson P. F. (1998) Selectively enhanced contextual fear conditioning in mice lacking the transcriptional regulator CCAAT/enhancer binding protein delta. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **95**, 10908-10913.

Sugahara K., Sadohara T., Sugita M., Iyama K. and Takiguchi M. (1999) Differential expression of CCAAT enhancer binding protein family in rat alveolar epithelial cell proliferation and in acute lung injury. *Cell Tissue Res* **297**, 261-270.

Takiguchi M. (1998) The C/EBP family of transcription factors in the liver and other organs. *Int. J Exp. Pathol.* **79**, 369-391.

Tang Y., Pacary E., Freret T., Divoux D., Petit E., Schumann-Bard P. and Bernaudin M. (2006) Effect of hypoxic preconditioning on brain genomic response before and following ischemia in the adult mouse: identification of potential neuroprotective candidates for stroke. *Neurobiol. Dis.* **21**, 18-28.

Tureyen K., Brooks N., Bowen K., Svaren J. and Vemuganti R. (2008) Transcription factor early growth response-1 induction mediates inflammatory gene expression and brain damage following transient focal ischemia. *J Neurochem.* **105**, 1313-1324.

Tzingounis A. V. and Nicoll R. A. (2006) Arc/Arg3.1: Linking Gene Expression to Synaptic Plasticity and Memory. *Neuron* **52**, 403-407.

Umayahara Y., Ji C., Centrella M., Rotwein P. and McCarthy T. L. (1997) CCAAT/enhancer-binding protein delta activates insulin-like growth factor-I

gene transcription in osteoblasts. Identification of a novel cyclic AMP signaling pathway in bone. *J Biol Chem* **272**, 31793-31800.

Wang X., Yue T. L., Young P. R., Barone F. C. and Feuerstein G. Z. (1995) Expression of interleukin-6, c-fos, and zif268 mRNAs in rat ischemic cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* **15**, 166-171.

Wang Z., Benoit G., Liu J., Prasad S., Aarnisalo P., Liu X., Xu H., Walker N. P. C. and Perlmann T. (2003) Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* **423**, 555-560.

Wek R. C., Jiang H. Y. and Anthony T. G. (2006) Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc. Trans.* **34**, 7-11.

Xu Z. and Ford B. D. (2005) Upregulation of erbB receptors in rat brain after middle cerebral arterial occlusion. *Neurosci. Lett.* **375**, 181-186.

Yakubov E., Gottlieb M., Gil S., Dinerman P., Fuchs P. and Yavin E. (2004) Overexpression of genes in the CA1 hippocampus region of adult rat following episodes of global ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* **127**, 10-26.

Yan S. F., Fujita T., Lu J., Okada K., Shan Z. Y., Mackman N., Pinsky D. J. and Stern D. M. (2000) Egr-1, a master switch coordinating upregulation of divergent gene families underlying ischemic stress. *Nat Med.* **6**, 1355-1361.

Youn H. D., Chatila T. A. and Liu J. O. (2000) Integration of calcineurin and MEF2 signals by the coactivator p300 during T-cell apoptosis. *EMBO J* **19**, 4323-4331.

Zetterstrom R. H., Solomin L., Jansson L., Hoffer B. J., Olson L. and Perlmann T. (1997) Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science* **276**, 248-250.

Zetterstrom R. H., Solomin L., Mitsiadis T., Olson L. and Perlmann T. (1996) Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1. *Mol Endocrinol.* **10**, 1656-1666.

Zhang C., Kawauchi J., Adachi M. T., Hashimoto Y., Oshiro S., Aso T. and Kitajima S. (2001) Activation of JNK and transcriptional repressor ATF3/LRF1 through the IRE1/TRAF2 pathway is implicated in human vascular endothelial cell death by homocysteine. *Biochem Biophys. Res Commun.* **289**, 718-724.

FIGURE LEGENDS

Table 1. Main clusters of genes induced 6h post-OGD. The principal clusters are presented according to fold enrichment, the increased functional categories inside the cluster are also shown with the number of genes ordered by EASE score, only genes with p-value < 0.05 were taken in account. All functional categories belong to biological process (BP) of Gene ontology (GO) term.

Table 2. Expression change after OGD in selected genes. Expression changes were presented as fold changes (FC) to control, indicating also p-value of each change. Gene expression is shown for 0h and 6h post-OGD, each one referred to its control.

Figure 1. Expression study of *atf3*, *cebpδ* and *egr1* by semiquantitative-PCR at different time points after OGD. Expression of *atf3* (A), *cebpδ* (B) and *egr1* (C) 0h, 6h and 12h after OGD (O) was studied by RT-PCR, the expression in control was also studied for all the times (C). Ribosomal 18S was used as loading control.

Figure 2. NR4A subfamily members expression changes after OGD. A, Expression of *nr4a1*, *nr4a2* and *nr4a3* 0h, 6h and 12h after OGD (O) was studied by RT-PCR, the expression in control was also studied for all the times (C). Ribosomal 18S was used as loading control. B, Protein levels were studied by western blot 0h, 3h, 6h y 9h after OGD (O), the protein levels in control were also studied for all the times (C). GAPDH was used as loading control.

Supplementary table 1. Increased genes 6h post-OGD. The table represents the induced genes 6h after OGD (FC ≥ 2), they were ordered accordingly with fold increase only genes with p-value < 0.05 were taken in account.

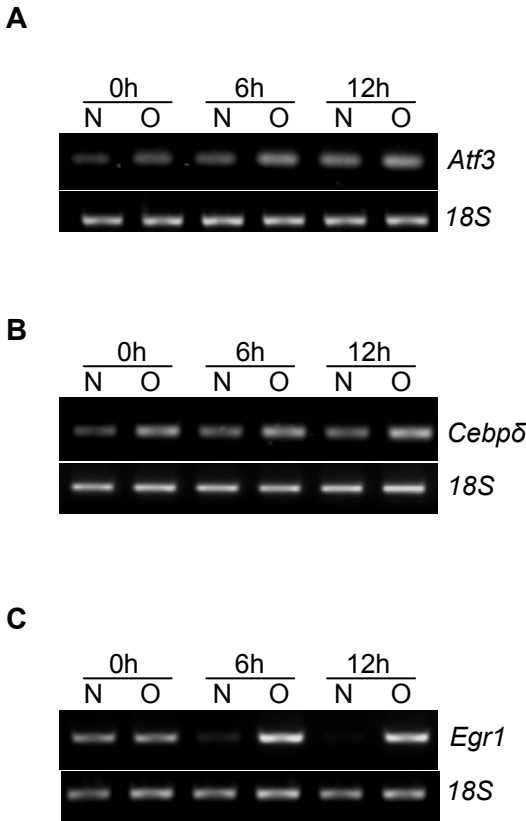
Supplementary table 2. Category of genes increased 6h post-OGD. For the ontological analysis upregulated genes 6h post-OGD (FC>2) were taken. The Gene ontology (GO) term was presented as, BP (biological process) MF

Resultados

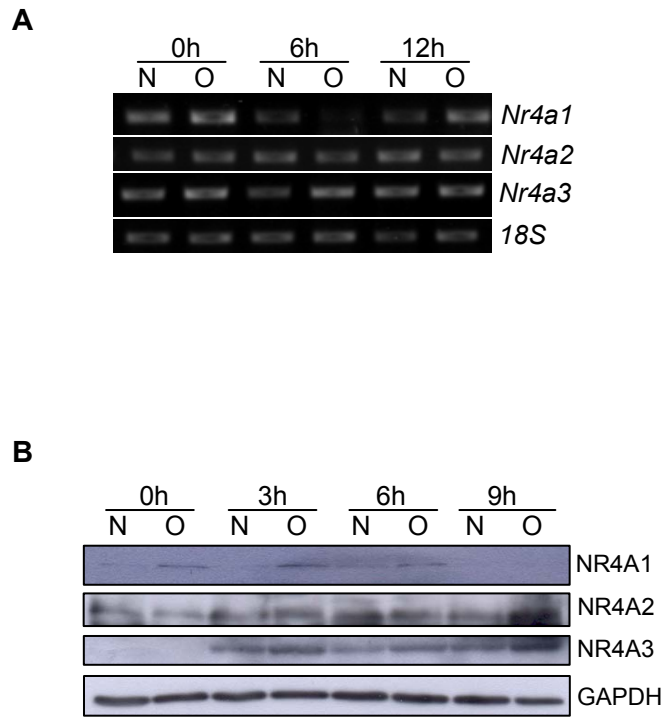
(molecular function) CC (cellular component). Functional categories were ordered accordingly with EASE score. The number of genes of each category and the fold enrichment (FE) were also presented.

		Nº Genes	EASE score
Annotation Cluster 1	developmental process	147	6.2E-26
Enrichment Score:	biological regulation	174	4.6E-23
18.12	anatomical structure development	115	3.9E-22
	multicellular organismal development	116	1.2E-21
	organ development	88	1.5E-21
	regulation of biological process	157	4.3E-21
	system development	103	7.8E-21
	positive regulation of biological process	76	3.1E-19
	anatomical structure morphogenesis	73	1.4E-17
	positive regulation of cellular process	69	2.4E-17
	cell differentiation	92	3.2E-17
	cellular developmental process	92	3.2E-17
	cell development	65	9.0E-11
Annotation Cluster 2	negative regulation of biological process	73	2.0E-18
Enrichment Score:	negative regulation of cellular process	70	2.8E-18
14.21	regulation of cellular process	137	5.7E-17
	regulation of cell proliferation	48	3.4E-16
	cell proliferation	58	4.6E-16
	negative regulation of cell proliferation	26	1.2E-10
	positive regulation of cell proliferation	23	5.7E-8
Annotation Cluster 3	death	52	5.5E-13
Enrichment Score:	cell death	52	5.5E-13
10.06	apoptosis	48	1.7E-11
	programmed cell death	48	2.7E-11
	regulation of apoptosis	39	4.8E-10
	regulation of programmed cell death	39	7.4E-10
	negative regulation of apoptosis	22	5.9E-8
	negative regulation of programmed cell death	22	6.8E-8
	positive regulation of apoptosis	19	3.2E-5
	positive regulation of programmed cell death	19	3.8E-5
	induction of apoptosis	14	8.1E-4
	induction of programmed cell death	14	8.5E-4
	anti-apoptosis	12	9.8E-4
Annotation Cluster 4	vasculature development	26	9.1E-13
Enrichment Score:	blood vessel development	25	4.0E-12
9.66	organ morphogenesis	37	7.8E-12
	blood vessel morphogenesis	22	9.7E-11
	anatomical structure formation	18	1.8E-7
	angiogenesis	16	2.4E-7
Annotation Cluster 5	response to wounding	47	1.3E-16
Enrichment Score:	response to stress	70	5.1E-16
9.39	response to external stimulus	52	2.7E-13
	inflammatory response	25	2.0E-7
	defense response	26	1.1E-4
	response to stimulus	97	1.2E-2

Public ID	Gene Title	Gene Symbol	FC 0h	FC 6h
NM_024388	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	Nr4a1	1,5	8,2
NM_012551	early growth response 1	Egr1	1,7	6,9
NM_012912	activating transcription factor 3	Atf3	1,5	3,6
BF419200	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	Cebpδ	2,1	2,9
NM_017352	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	Nr4a3	1,5	2,1
L08595	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	Nr4a2	1,2	2



Badiola et al.- Figure 1



Public ID	Gene Title	Gene Symbol	FC	p-value
AI179507	tissue factor pathway inhibitor 2	Tfpi2	14,0	9,5E-04
NM_030845	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Cxcl1	13,9	8,4E-04
AI175779	Polymerase (DNA directed), alpha 2	Pola2	10,7	6,9E-04
BF415939	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	Fos	9,3	2,2E-05
NM_024388	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	Nr4a1	8,2	3,2E-06
BI275741	epithelial membrane protein 1	Emp1	7,8	1,4E-03
NM_012551	early growth response 1	Egr1	6,9	7,6E-06
AI012949	retinol binding protein 2, cellular	Rbp2	6,4	8,4E-04
NM_012953	fos-like antigen 1	Fosl1	6,2	9,7E-03
NM_024400	a disintegrin-like and metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 1	Adamts1	5,3	1,6E-02
BG663284	fibrinogen-like 2	Fgl2	4,9	4,6E-03
AA818262	angiopoietin-like 4	Angptl4	4,9	2,9E-02
BF391914	interleukin 1 receptor accessory protein	Il1rap	4,4	5,5E-03
NM_017334	cAMP responsive element modulator	Crem	4,4	2,7E-03
BI303379	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a	Tnfrsf12a	4,3	1,1E-02
NM_053633	early growth response 2	Egr2	4,3	4,0E-05
AA924754	Paired related homeobox 1	Prrx1	4,2	4,5E-03
NM_019905	annexin A2	Anxa2	4,2	3,5E-02
NM_017172	zinc finger protein 36, C3H type-like 1	Zfp36l1	4,1	6,1E-03
U02315	neuregulin 1	Nrg1	4,1	5,1E-03
U14007	aquaporin 4	Aqp4	4,0	2,9E-02
AI176519	immediate early response 3	Ier3	3,9	1,0E-02
NM_013057	coagulation factor III	F3	3,9	1,2E-02
AF210250	solute carrier family 4, member 4	Slc4a4	3,8	4,5E-03
AI548856	poliovirus receptor	PVR	3,6	1,3E-02
NM_012912	activating transcription factor 3	Atf3	3,6	2,9E-02
NM_031530	chemokine (C-C motif) ligand 2	Ccl2	3,6	1,3E-02
NM_021836	Jun-B oncogene	Junb	3,5	7,4E-05
AI009159	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3	Timp3	3,5	6,4E-03
NM_012513	brain derived neurotrophic factor	Bdnf	3,5	4,9E-05
BF419899	chemokine (C-C motif) ligand 7	Ccl7	3,5	5,6E-03
BI276110	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A	Gprc5a	3,4	1,1E-02
NM_017074	cystathionase (cystathionine gamma-lyase)	Cth	3,3	2,3E-02
NM_031549	transgelin	Tagln	3,2	2,6E-02
BE116021	solute carrier family 5 (inositol transporters), member 3	Slc5a3	3,2	3,6E-03
NM_031970	heat shock 27kDa protein 1	Hspb1	3,2	2,9E-03
NM_019137	early growth response 4	Egr4	3,2	8,1E-05
AF370889	Tropomyosin 1, alpha	Tpm1	3,2	1,7E-02
M86708	inhibitor of DNA binding 1	Id1	3,2	4,4E-02
AI406660	Thrombospondin 1	Thbs1	3,2	2,6E-02
U05989	PRKC, apoptosis, WT1, regulator	Pawr	3,1	6,7E-03
NM_012924	CD44 antigen	Cd44	3,1	1,2E-02
NM_012945	heparin-binding EGF-like growth factor	Hbegf	3,1	1,9E-02
BF391820	Regulator of G-protein signaling 16	Rgs16	3,1	3,3E-03
X57764	endothelin receptor type B	Ednrb	3,0	1,5E-02

Resultados

Public ID	Gene Title	Gene Symbol	FC	p-value
BF284523	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	Abca1	3,0	4,7E-02
X75207	cyclin D1	Ccnd1	3,0	2,4E-02
AA893484	fibronectin 1	Fn1	3,0	1,6E-02
AI575844	cardiotrophin-like cytokine factor 1	Clcf1	3,0	3,8E-02
NM_012649	syndecan 4	Sdc4	3,0	8,8E-03
AI599423	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma	Gadd45g	2,9	5,9E-03
BI288701	B-cell translocation gene 2, anti-proliferative	Btg2	2,9	1,5E-03
AI178069	zinc finger protein 36, C3H type-like 2	Zfp36l2	2,9	1,1E-02
BF283398	chemokine (C-X-C motif) ligand 12	Cxcl12	2,9	4,2E-02
AI406520	Axl receptor tyrosine kinase	Axl	2,9	7,6E-03
BE128738	pleckstrin homology domain containing, family C member 1	Plekhc1	2,9	3,0E-03
BE102996	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	Ntrk2	2,9	6,3E-03
NM_012580	heme oxygenase (decycling) 1	Hmox1	2,9	4,8E-02
NM_053326	PDZ and LIM domain 5	Pdlim5	2,9	1,7E-02
BE349669	caveolin 2	Cav2	2,9	3,8E-02
AI598323	Rho family GTPase 3	Rnd3	2,9	5,3E-03
BF419200	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	Cebpd	2,9	4,9E-02
BG380282	heat shock 22kDa protein 8	Hspb8	2,8	1,0E-02
BM392106	caldesmon 1	Cald1	2,8	1,8E-03
AI406939	G0/G1 switch gene 2	G0s2	2,8	3,6E-02
BF398558	Fatty acid binding protein 7, brain	Fabp7	2,8	1,4E-02
NM_022266	connective tissue growth factor	Ctgf	2,8	1,2E-02
NM_012715	adrenomedullin	Adm	2,8	3,4E-02
BG378746	tight junction protein 2	Tjp2	2,8	1,2E-02
AI012221	chloride intracellular channel 1	Clic1	2,7	2,7E-02
X05566	myosin light chain, regulatory B	Mrlcb	2,7	3,6E-02
BI286015	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 4	Rassf4	2,7	1,7E-02
AA943163	peripheral myelin protein 22	Pmp22	2,7	1,3E-02
BI295861	cyclin D1	Ccnd1	2,7	4,0E-02
BF566908	CREB binding protein	Crebbp	2,7	1,8E-03
BM385031	proteolipid protein 2 (mapped)	Plp2	2,7	1,5E-02
AI575254	Synaptosomal-associated protein, 91kDa homolog (mouse)	Snap91	2,7	5,8E-03
AF104399	Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 1	Cited1	2,6	8,3E-03
AW918387	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	Abca1	2,6	1,7E-02
NM_017180	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	Phlda1	2,6	7,3E-03
NM_013151	plasminogen activator, tissue	Plat	2,6	2,8E-02
BE110691	EH-domain containing 2	Ehd2	2,6	3,8E-03
AW917275	claudin 1	Cldn1	2,6	3,5E-03
NM_133578	dual specificity phosphatase 5	Dusp5	2,6	3,9E-04
BI300426	junction adhesion molecule 2	Jam2	2,6	1,2E-02
AI231792	Bcl2-associated athanogene 3	Bag3	2,6	2,1E-02
NM_017062	reversion induced LIM gene	Ril	2,6	1,7E-02

Public ID	Gene Title	Gene Symbol	FC	p-value
AA799627	selenoprotein P, plasma, 1	Sepp1	2,6	2,4E-02
BI274903	tubulin, beta 6	Tubb6	2,6	4,1E-02
AF084544	chondroitin sulfate proteoglycan 2	Cspg2	2,6	4,4E-03
AB025017	zinc finger protein 36	Zfp36	2,6	4,2E-02
NM_013198	monoamine oxidase B	Maob	2,5	2,2E-02
AI137640	claudin 1	Cldn1	2,5	1,1E-02
NM_053819	tissue inhibitor of metallopeptidase 1	Timp1	2,5	3,3E-02
AF053312	chemokine (C-C motif) ligand 20	Ccl20	2,5	2,2E-02
NM_019361	activity regulated cytoskeletal-associated protein	Arc	2,5	5,5E-05
AF265360	solute carrier family 1, member 3	Slc1a3	2,5	3,9E-02
AI177099	protease, serine, 23	Prss23	2,5	8,7E-03
NM_134389	acyl-CoA synthetase bubblegum family member 1	Acsbg1	2,5	1,9E-02
NM_133621	homeobox only domain	Hod	2,5	3,6E-02
BI287978	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta	Gadd45b	2,5	9,1E-04
NM_019358	podoplanin	Pdpn	2,5	1,1E-02
AI237518	succinate-Coenzyme A ligase, GDP-forming, beta subunit	Suclg2	2,5	2,3E-02
NM_080399	DNA-damage-inducible transcript 4-like	Ddit4l	2,4	1,1E-02
AI548897	Sterol O-acyltransferase 1	Soat1	2,4	3,4E-02
AI408151	Mesoderm specific transcript	Mest	2,4	6,9E-03
M37394	epidermal growth factor receptor	Egfr	2,4	1,5E-02
NM_031789	nuclear factor, erythroid derived 2, like 2	Nfe2l2	2,4	4,9E-02
NM_057197	2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial	Decr1	2,4	2,0E-02
BI288619	Jun oncogene	Jun	2,4	3,9E-02
NM_031005	actinin, alpha 1	Actn1	2,4	5,6E-03
NM_031659	transglutaminase 1	Tgm1	2,4	4,0E-03
NM_012935	crystallin, alpha B	Cryab	2,4	2,0E-03
BI275245	TERF1 (TRF1)-interacting nuclear factor 2	Tinf2	2,4	1,4E-02
AW672589	nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	Nfkbia	2,4	9,8E-03
AF322217	immunoglobulin superfamily, member 1	Igsf1	2,4	2,4E-02
NM_031315	cytosolic acyl-CoA thioesterase 1	Cte1	2,4	1,2E-02
BF281131	eukaryotic translation initiation factor 2C, 2	Eif2c2	2,4	3,7E-05
H31896	Sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae)	Srxn1	2,4	8,0E-03
NM_053713	Kruppel-like factor 4 (gut)	Klf4	2,4	1,9E-02
S54008	Fibroblast growth factor receptor 1	Fgfr1	2,3	3,5E-03
NM_022695	neurotensin receptor 2	Ntsr2	2,3	3,8E-02
BI285616	adipose differentiation related protein	Adfp	2,3	4,3E-03
NM_017351	inter-alpha trypsin inhibitor, heavy chain 3	Itih3	2,3	4,0E-02
BF559566	Spectrin beta 2	Spnb2	2,3	1,1E-02
AW524359	Casein kinase 1, alpha 1	Csnk1a1	2,3	3,9E-02
BF389640	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 10 (theta)	Eif3s10	2,3	4,0E-03
BF420059	immediate early response 2	Ier2	2,3	3,2E-04
AI235948	Nidogen 1	Nid1	2,3	7,7E-03
NM_017196	allograft inflammatory factor 1	Aif1	2,3	4,2E-02
D28875	secreted acidic cysteine rich glycoprotein	Sparc	2,3	2,7E-02
AI227627	CD9 antigen	Cd9	2,3	4,4E-02

Resultados

Public ID	Gene Title	Gene Symbol	FC	p-value
NM_012505	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 2 polypeptide	Atp1a2	2,3	3,7E-02
U37142	brevican	Bcan	2,3	4,7E-02
BI296947	Fos-like antigen 2	Fosl2	2,3	1,5E-03
BI288690	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2	Entpd2	2,3	1,3E-02
BF283688	tumor necrosis factor ligand superfamily member 12	Tnfsf12	2,3	1,2E-02
AA944398	fibulin 2	Fbln2	2,3	2,0E-02
AI231531	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	Tnfrsf6	2,3	3,7E-02
U72345	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	Nr4a2	2,3	1,2E-04
AI138017	Abelson helper integration site 1	Ahi1	2,3	5,7E-03
BE107413	similar to coiled-coil domain containing 8	MGC72567	2,3	3,2E-03
NM_012819	acetyl-Coenzyme A dehydrogenase, long-chain	Acadl	2,2	1,9E-02
AI713966	insulin-like growth factor binding protein 3	Igfbp3	2,2	1,1E-02
NM_017035	phospholipase C, delta 1	Plcd1	2,2	2,3E-03
NM_134449	protein kinase C, delta binding protein	Prkcdpb	2,2	2,1E-02
AF070475	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 7	Slc4a7	2,2	3,0E-03
BM390457	sprouty homolog 2 (Drosophila)	Spry2	2,2	6,2E-03
NM_031655	latexin	Lxn	2,2	2,9E-02
AI101782	procollagen, type XVIII, alpha 1	Col18a1	2,2	1,2E-02
NM_013091	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a	Tnfrsf1a	2,2	4,8E-02
AB000489	solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 1	Slc20a1	2,2	6,1E-03
NM_053946	implantation-associated protein	Iag2	2,2	3,4E-02
NM_053936	endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor, 2	Edg2	2,2	3,4E-02
BG668051	paraoxonase 2	Pon2	2,2	4,2E-02
AW535564	hook homolog 3 (Drosophila)	Hook3	2,2	1,6E-03
AA944212	glycophorin C (Gerbich blood group)	Gypc	2,2	1,0E-02
AB030829	carbonic anhydrase 3	Ca3	2,2	1,8E-02
BF386882	Mitogen-activated protein kinase 6	Mapk6	2,2	8,3E-03
NM_134390	LR8 protein	Lr8	2,2	1,7E-02
BE118639	translocated promoter region	Tpr	2,2	3,9E-03
AI137113	transmembrane emp24 protein transport domain containing 5	Tmed5	2,2	2,0E-03
BI292351	transmembrane BAX inhibitor motif containing 1	Tmbim1	2,2	3,8E-02
BF413266	ankyrin 2, neuronal	Ank2	2,2	3,4E-03
NM_017123	amphiregulin	Areg	2,2	7,3E-03
BE109334	Kinesin family member 1B	Kif1b	2,2	8,7E-03
AW253995	phosphatidic acid phosphatase type 2B	Ppap2b	2,2	2,2E-03
AB036421	glycoprotein m6b	Gpm6b	2,2	3,3E-02
BF393825	dendritic cell inhibitory receptor 3	Dcir3	2,2	4,1E-02
BE105500	Vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1A (yeast)	Vti1a	2,1	1,4E-02
NM_013191	S100 protein, beta polypeptide	S100b	2,1	2,2E-02

Public ID	Gene Title	Gene Symbol	FC	p-value
NM_017352	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	Nr4a3	2,1	6,4E-05
NM_031059	homeo box, msh-like 1	Msx1	2,1	3,4E-02
U04998	protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1	Ptprz1	2,1	4,1E-02
NM_017215	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2	Slc1a2	2,1	3,5E-02
BM383427	interleukin 6 signal transducer	Il6st	2,1	7,4E-03
U24174	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	Cdkn1a	2,1	4,7E-02
AI411618	complement component 1, q subcomponent, gamma polypeptide	C1qg	2,1	4,0E-02
BI285495	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade H, member 1	Serpinh1	2,1	4,4E-02
BE105446	Polymerase (DNA directed), beta	Polb	2,1	1,1E-02
NM_024159	disabled homolog 2 (Drosophila)	Dab2	2,1	3,1E-02
BM390774	peroxisomal delta3, delta2-enoyl-Coenzyme A isomerase	Peci	2,1	3,3E-02
NM_031357	tripeptidyl peptidase I	Tpp1	2,1	2,3E-02
AW435211	Transcription factor 4	Tcf4	2,1	3,0E-02
AW525342	ubiquitin specific peptdiase 1	Usp1	2,1	3,5E-02
AA851304	villin 2	Vil2	2,1	3,1E-02
AI176041	pirin	Pir	2,1	3,5E-02
AI070976	low density lipoprotein receptor-related protein 4	Lrp4	2,1	3,4E-02
BF284634	epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	Efemp1	2,1	1,6E-02
AW434057	complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide	C1qb	2,1	4,6E-02
AF087947	G protein-coupled receptor 37-like 1	Gpr3711	2,0	1,6E-02
BG378637	HRAS like suppressor 3	Hrasls3	2,0	1,6E-02
BM387324	tribbles homolog 1 (Drosophila)	Trib1	2,0	8,2E-03
AI011448	Notch gene homolog 2 (Drosophila)	Notch2	2,0	2,2E-02
BI289559	SRY-box containing gene 6	Sox6	2,0	4,2E-02
NM_053698	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	Cited2	2,0	4,3E-03
BF282365	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 6	Nek6	2,0	2,9E-02
NM_019216	growth differentiation factor 15	Gdf15	2,0	3,7E-02
BI278268	peroxisomal delta3, delta2-enoyl-Coenzyme A isomerase	Peci	2,0	3,0E-02
NM_012967	intercellular adhesion molecule 1	Icam1	2,0	3,0E-02
AI705174	Sp1 transcription factor	Sp1	2,0	2,6E-03
AF081582	pleckstrin homology domain containing, family B (evectins) member 1	Plekhb1	2,0	3,0E-02
BI277042	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	Gpd1	2,0	1,6E-03
BI275624	laminin, gamma 1	Lamc1	2,0	1,2E-02
X60790	polypyrimidine tract binding protein 1	Ptbp1	2,0	1,9E-02
NM_022178	myosin Va	Myo5a	2,0	1,2E-03
AF007789	plasminogen activator, urokinase receptor	Plaur	2,0	1,6E-02
NM_012811	milk fat globule-EGF factor 8 protein	Mfge8	2,0	3,8E-02
NM_021696	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 2	Serpinb2	2,0	5,5E-03
AA893220	spermidine	Sat	2,0	1,6E-02

Public ID	Gene Title	Gene Symbol	FC	p-value
BE110753	integrin, alpha 6	Itga6	2,0	3,8E-03
NM_134392	spermatogenesis associated 6	Spata6	2,0	1,7E-02
AF314657	clusterin	Clu	2,0	1,8E-02
AA945069	SERTA domain containing 1	Sertad1	2,0	1,5E-02
AI409738	Neural cell adhesion molecule 1	Ncam1	2,0	4,8E-02

GO term	Functional category	N° gens	EASE score	FE
GO-BP	developmental process	147	6,20E-26	2,3
GO-BP	biological regulation	174	4,60E-23	1,9
GO-BP	anatomical structure development	115	3,90E-22	2,5
GO-MF	protein binding	191	5,10E-22	1,8
GO-BP	multicellular organismal development	116	1,20E-21	2,4
GO-BP	organ development	88	1,50E-21	3
GO-BP	regulation of biological process	157	4,30E-21	1,9
GO-BP	system development	103	7,80E-21	2,6
GO-BP	positive regulation of biological process	76	3,10E-19	3,1
GO-BP	negative regulation of biological process	73	2,00E-18	3,1
GO-BP	negative regulation of cellular process	70	2,80E-18	3,2
GO-BP	anatomical structure morphogenesis	73	1,40E-17	3
GO-BP	positive regulation of cellular process	69	2,40E-17	3,1
GO-BP	cell differentiation	92	3,20E-17	2,5
GO-BP	cellular developmental process	92	3,20E-17	2,5
GO-BP	regulation of cellular process	137	5,70E-17	1,9
GO-BP	response to wounding	47	1,30E-16	4,2
GO-BP	regulation of cell proliferation	48	3,40E-16	4
GO-BP	cell proliferation	58	4,60E-16	3,4
GO-BP	response to stress	70	5,10E-16	2,9
GO-BP	regulation of biological quality	63	5,10E-16	3,1
GO-BP	response to external stimulus	52	2,70E-13	3,2
GO-BP	death	52	5,50E-13	3,1
GO-BP	cell death	52	5,50E-13	3,1
GO-BP	vasculature development	26	9,10E-13	6,1
GO-CC	plasma membrane	90	3,10E-12	2,1
GO-BP	blood vessel development	25	4,00E-12	6
GO-BP	organ morphogenesis	37	7,80E-12	3,8
GO-BP	apoptosis	48	1,70E-11	3
GO-BP	programmed cell death	48	2,70E-11	3
GO-BP	cell motility	35	3,10E-11	3,8
GO-BP	localization of cell	35	3,10E-11	3,8
GO-BP	growth	30	4,00E-11	4,4
GO-BP	cell development	65	9,00E-11	2,4
GO-BP	blood vessel morphogenesis	22	9,70E-11	6
GO-MF	binding	255	9,80E-11	1,2
GO-BP	negative regulation of cell proliferation	26	1,20E-10	4,9
GO-BP	wound healing	22	2,50E-10	5,7
GO-CC	extracellular region part	84	2,60E-10	2
GO-BP	cell morphogenesis	37	2,70E-10	3,4
GO-BP	cellular structure morphogenesis	37	2,70E-10	3,4
GO-BP	multicellular organismal process	150	4,40E-10	1,5
GO-BP	regulation of apoptosis	39	4,80E-10	3,2
GO-CC	extracellular region	90	6,00E-10	1,9
GO-BP	regulation of programmed cell death	39	7,40E-10	3,1
GO-CC	proteinaceous extracellular matrix	25	1,50E-09	4,5
GO-BP	cell-cell signaling	44	2,60E-09	2,7
GO-CC	extracellular matrix	25	3,30E-09	4,3
GO-CC	extracellular space	75	4,40E-08	1,9
GO-BP	positive regulation of cell proliferation	23	5,70E-08	4
GO-BP	negative regulation of apoptosis	22	5,90E-08	4,2
GO-MF	receptor binding	42	6,10E-08	2,5

V - DISCUSIÓN

1.- PAPEL DEL TNF ALFA EN LA OGD

Tal y como se ha mencionado anteriormente, el único tratamiento aprobado para la isquemia cerebral es el tPA, que además sólo se puede aplicar a un pequeño porcentaje de pacientes. Teniendo en cuenta el enorme impacto socio-económico que tiene esta enfermedad es importante profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares que desencadenan la muerte celular tras la interrupción de flujo sanguíneo. Tras varios años en los que se pensaba que la muerte isquémica era únicamente de tipo necrótico (Brown and Brierley 1972), actualmente se tiene la certeza de que en este proceso también participa la apoptosis (Choi 1996;Lipton 1999) (Love 2003). De hecho, se conoce que en el núcleo de la lesión ocurre una muerte rápida de tipo necrótico, que permite una reducida o nula intervención terapéutica. En cambio, en la zona de penumbra se da un proceso de degeneración neuronal que puede durar días. Es en esta zona donde se ha descrito que ocurre una muerte de tipo apoptótico que al tratarse de un proceso más lento y regulado permite una mayor ventana terapéutica. Por ello, nosotros nos hemos centrado en el estudio de los mecanismos moleculares que subyacen a este proceso de apoptosis mediado por la isquemia cerebral.

Para realizar dicho estudio hemos utilizado principalmente el modelo de privación de oxígeno y glucosa (OGD) en cultivos mixtos de corteza cerebral de rata. En nuestro laboratorio se había estudiado previamente en que grado contribuían la necrosis y la apoptosis a la muerte generada por la OGD. Se observó que aproximadamente la mitad de la muerte era de tipo necrótico y la otra mitad de tipo apoptótico. Además, en estos estudios se caracterizó que en este proceso de apoptosis estaban implicadas las caspasas-3, -7 y -9, concretamente en neuronas y microglía (Malagelada *et al.* 2005).

A la hora de profundizar más en los mecanismos que estaban implicados en la muerte neuronal quisimos evaluar el papel del TNF α , ya que se había observado que su concentración en el cerebro aumentaba notablemente tras la isquemia (Barone *et al.* 1997), pero existían muchas controversias sobre si la citoquina jugaba un papel protector (Bruce *et al.* 1996;Mattson 1997) (Castillo

et al. 2003), o, si al contrario, contribuía al daño isquémico (Barone *et al.* 1997; Lavine *et al.* 1998; Meistrell, III *et al.* 1997). Nosotros observamos una disminución de la muerte generada por la OGD cuando bloqueábamos el efecto del TNF α mediante un anticuerpo contra esta citoquina. Este bloqueo del TNF α disminuía la apoptosis generada por la OGD pero no así la necrosis. En este mismo sentido, cuando tratamos los cultivos con TNF α exógeno observamos un aumento de la muerte apoptótica dosis-dependiente sin que se produjera necrosis. Otros autores habían observado que la administración intracerebrovascular de TNF α exógeno aumentaba el área de lesión tras la isquemia y que la inhibición de la acción del TNF α mediante la adición de receptores solubles de TNF α o anticuerpos anti-TNF α reducían el daño isquémico (Barone *et al.* 1997; Lavine *et al.* 1998; Meistrell, III *et al.* 1997). También se había propuesto que la contribución del TNF α al daño isquémico podía ser debida a su acción proinflamatoria sobre el endotelio (Akassoglou *et al.* 2003), aunque estos trabajos no esclarecían en mecanismo de acción de la citoquina. En nuestro trabajo demostramos que el TNF α es responsable de al menos parte de la muerte apoptótica generada por la OGD y que, además, lo está haciendo a través de la interacción neurona-glía y de forma independiente de la acción de las células endoteliales.

Cuando realizamos un estudio de localización del TNF α y de TNFR1 en nuestro cultivo encontramos que ambas proteínas se expresaban en microglía y neuronas. Por lo tanto, la microglía podría ser la responsable de la liberación de TNF α que habíamos observado tras la OGD, y la citoquina podía estar llevando a cabo su efecto a través del TNFR1 expresado en neuronas. Estas observaciones, se vieron apoyadas por un elegante estudio que demostró que las células de microglía puestas en contacto con cultivos de neuronas y astrocitos sometidos a una OGD se activaban debido al glutamato liberado por las neuronas (a través de los receptores de glutamato de tipo II). Esta activación resultaba en una posterior liberación de TNF α por parte de la microglía que provocaba la muerte de las neuronas por apoptosis (Kaushal and Schlichter 2008).

Como hemos mencionado anteriormente, existen pocos datos acerca de los mecanismos moleculares que están implicados en el daño por TNF α en la isquemia cerebral. En este sentido, nosotros observamos que si bloqueábamos el TNF α mediante el anticuerpo específico reducíamos significativamente la activación de la caspasa-3 mediada por la OGD. De la misma manera observamos la activación de caspasa-3 en los cultivos tratados con TNF α exógeno. Si bien se ha descrito que el TNF α puede provocar la activación de la caspasa-3 en células endoteliales (Grethe *et al.* 2004;Ohtani *et al.* 2006) y en células del hipocampo (Zhao *et al.* 2001), no había hasta el momento ningún trabajo que describiera este proceso en neuronas corticales en un paradigma de isquemia. Cabe destacar que no observamos reducción de la activación de la caspasa-7 y -9 tras la OGD cuando se bloqueaba el efecto del TNF α . Esto estaría indicando que la activación de la caspasa-3 mediada por la OGD vendría dada por una vía independiente a la activación de la caspasa-7 y -9.

Es bien conocido que el TNF α puede activar la caspasa-8 en distintos tipos celulares como monocitos, células de carcinoma o fibroblastos (Boldin *et al.* 1996;Monney *et al.* 1998;Srinivasan *et al.* 1998), en cambio apenas existen datos acerca de esta vía en neuronas. De hecho, solo se ha descrito la activación de la caspasa-8 en neuronas corticales en un trabajo en el que se utiliza el paradigma de tratar las células con TNF α junto con un inhibidor de la transcripción (en este caso actinomicina D) (Gozzelino *et al.* 2008). La caspasa-8 se localizó en las neuronas corticales (Velier *et al.* 1999) y otros autores detectaron actividad caspasa-8 tras la oclusión de la arteria medial del cerebro (MCAO) (Benchoua *et al.* 2001). El descubrimiento de que la administración intracerebroventricular de un inhibidor específico de la caspasa-8 (zIETD-FMK) limitaba el desarrollo de la lesión en un modelo de hipoxia-isquemia en ratas neonatales (Feng *et al.* 2003), ofreció la primera evidencia del papel funcional de la caspasa-8 en la isquemia, aunque la caracterización de cómo podría contribuir a la muerte quedaba aun sin resolver. Nosotros observamos una temprana activación de la caspasa-8, inmediatamente después de la OGD. Esta activación era inhibida si se añadía el anticuerpo anti-TNF α durante la OGD. Para confirmar de forma más precisa que esta activación de la caspasa-8 estaba mediada por el TNF α utilizamos cultivos

mixtos de neuronas corticales de ratones KO para TNFR1. Observamos que tras la OGD no se producía la activación de la caspasa-8 en los cultivos provenientes de los animales KO, mientras que si observamos dicha activación en los cultivos provenientes de animales salvajes, indicándonos que la señalización del TNF α a través de este receptor es crucial para la activación de la caspasa-8. En contraste con nuestros resultados, recientemente se publicó un trabajo en el que se observaba la activación de la caspasa-8 en cultivos neuronales, de ratones TNFR1 KO, sometidos a OGD (Taoufik *et al.* 2007). Es interesante señalar que estas discrepancias, probablemente son debidas a las diferencias metodológicas existentes entre ambos trabajos, en nuestro caso se trata de un cultivo mixto maduro (12-14DIV) donde hay una presencia considerable de astrocitos (alrededor del 40%) mientras que Taoufik y cols. utilizan un cultivo neuronal “puro” (menos de un 5% de astrocitos) y más joven (7DIV). El grado de maduración y el entorno celular de las neuronas parece pues determinar la susceptibilidad de estas a distintos estímulos, probablemente debido a la expresión de distintos receptores, canales, etc. En este sentido, cuando los cultivos “puros” de neuronas corticales se someten a 3h de OGD presentan un 50% de muerte, mientras que en los cultivos mixtos son suficientes 75 minutos de OGD para obtener ese mismo porcentaje de muerte.

La activación de la caspasa-8 tras la OGD se producía antes que la activación de la caspasa-3 (Malagelada *et al.* 2005), sugiriendo que la caspasa-8 estaría activando la caspasa-3. Esto se confirmó cuando observamos que la activación de la caspasa-3 se bloqueaba casi totalmente en presencia del inhibidor específico de la caspasa-8 (IETD-FMK). Además, en los cultivos de animales TNFR1 KO donde no se observaba activación de la caspasa-8 tras la OGD tampoco se observaba activación de la caspasa-3, dando mayor soporte a la idea de que la activación de la caspasa-8 es necesaria para que se de una posterior activación de la caspasa-3 en la OGD.

Dos mecanismos alternativos pueden explicar la activación de la caspasa-3 por parte de la caspasa-8, mediante una proteólisis directa o por el procesamiento de Bid a tBid por parte de la caspasa-8 (Stennicke *et al.* 1998), lo que permite

la salida del citocromo C, la activación de la caspasa-9 (Gross *et al.* 1999;Plesnila *et al.* 2001;Yin *et al.* 2002) y la subsiguiente activación de la caspasa-3. Para conocer cual de los dos mecanismos estaba actuando en la OGD tratamos de detectar tBid, pero los resultados obtenidos hasta el momento no son concluyentes. Sin embargo, atendiendo a los datos que nos indicaban que la activación de la caspasa-9 seguía ocurriendo aun en presencia del anticuerpo anti-TNF α , cabría pensar que la activación de la caspasa-3 ocurriría por proteólisis directa de la caspasa-8.

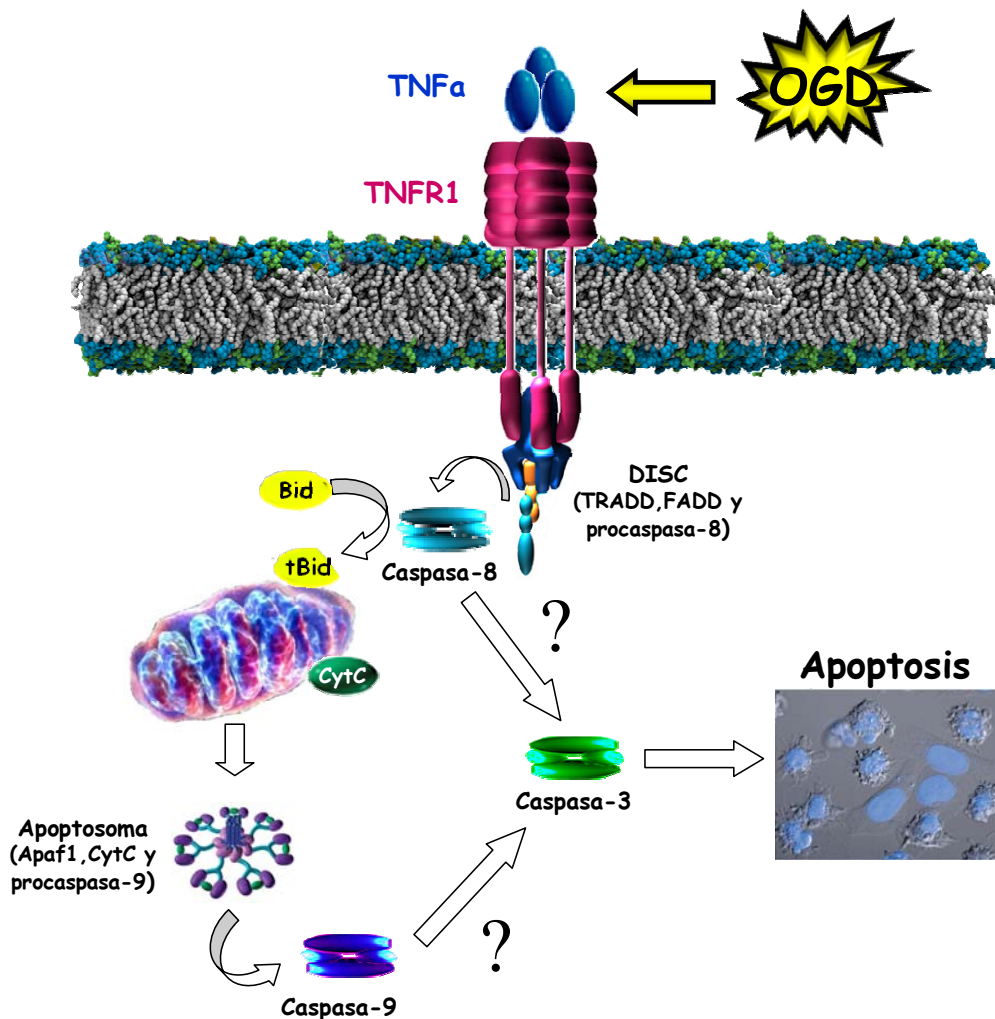


Figura 20. Esquema de los potenciales mecanismos implicados en la muerte apoptótica mediada por TNF α en la OGD. El TNF α liberado en la OGD activa la caspasa-8 a través del TNFR1, provocando la subsiguiente activación de la caspasa-3. Esta activación podría darse por proteólisis directa o por proteólisis de Bid que provocaría la formación del apoptosoma y la activación de la casapasa-9. Nuestros datos apoyarían una proteólisis directa de la caspasa-3 por la caspasa-8

De los resultados comentados hasta el momento, podemos proponer que la OGD provoca una liberación de TNF α al medio, probablemente por parte de la microglía. Esta citoquina a través de su receptor de tipo 1 (TNFR1), que se encuentra principalmente en neuronas, activa la caspasa-8. La activación de esta caspasa iniciadora provoca la activación de la caspasa-3, presumiblemente por proteólisis directa, y la activación de esta caspasa ejecutora desemboca en un proceso apoptótico (Fig. 20). La importancia del papel de la caspasa-8 como iniciadora en este proceso de muerte se confirma además al observar una reducción de la muerte generada por OGD en los cultivos que están tratados con IETD-FMK. Atendiendo a los datos previos en los que se observó que la activación de las caspasas y la condensación de la cromatina eran rasgos que correspondían con neuronas, podemos pensar que esta vía apoptótica estaría ocurriendo mayoritariamente en neuronas.

2.- PAPEL DEL ESTRÉS DEL RE EN LA OGD

En los últimos años, el estudio del estrés del RE en la isquemia cerebral está adquiriendo relevancia, debido a la aparición de numerosas evidencias que indican que dicho proceso tiene lugar en esta patología. Si bien existen claros indicios de que en la isquemia ocurre una alteración en el funcionamiento del RE, observándose una disrupción de la homeostasis de calcio del RE y la agregación de proteínas (DeGracia and Hu 2007;Hu *et al.* 2000;Paschen and Mengesdorf 2005), no se conoce todavía con exactitud la manera en que las células responden a este estrés de RE (Roberts *et al.* 2007).

El daño tras la hipoxia-isquemia cerebral en neonatos incluye un infarto focal isquémico y la pérdida celular con rasgos apoptóticos como la activación de caspasas (Blomgren *et al.* 2001). Sin embargo, poco se sabe sobre como el estrés de RE es inducido en la HI. Nosotros describimos por primera vez una rápida fosforilación de eIF2 α (P) seguida de un incremento de las chaperonas GRP78 y GRP94 tras la HI neonatal. Además, también observamos la proteólisis de la caspasa-12, lo que concuerda con el incremento de actividad

de la caspasa-12 observado en un trabajo reciente, que utiliza el mismo paradigma experimental (Cai *et al.* 2008).

Posteriormente, para realizar un estudio más exhaustivo de las vías implicadas en la respuesta a estrés de RE, utilizamos nuestro modelo de OGD. Atendiendo a los resultados obtenidos podemos decir que la OGD provoca un estrés de RE y que activa alguna de las vías de la UPR, si bien no es una activación canónica y además la activación de la caspasa-12 ocurre de forma independiente al estrés de RE.

Cuando exploramos la activación de PERK observamos que la OGD provocaba una rápida fosforilación de eIF2 α que además era transitoria, ya que los niveles de eIF2 α (P) volvían a los niveles basales 1h después. Este resultado estaba en concordancia con lo observado en otros modelos de isquemia *in vivo*, donde también observaban que el incremento de eIF2 α (P) se daba pronto tras la isquemia y volvía a los niveles basales poco tiempo después (Althausen *et al.* 2001;Kumar *et al.* 2003;Martin, V *et al.* 2001). También observamos que la OGD además de provocar la inhibición de la síntesis proteica mediante la fosforilación de eIF2 α , favorecía la transcripción de ATF4 mediante el *bypass scanning* (ver introducción) (Dever *et al.* 1995;Morris and Geballe 2000). Este aumento en los niveles de proteína de ATF4 se traducía además en un aumento de la expresión de *gadd34*, que codifica para una subunidad de la fosfatasa responsable de desfosforilar eIF2 α (Brush *et al.* 2003). Así pues, la vía de PERK se activa en la OGD provocando una inhibición transitoria de la síntesis de proteínas, lo cual se puede interpretar como un intento de minimizar el daño celular reduciendo la cantidad de proteínas acumuladas en el lumen del RE. Además, a pesar que esta vía se ha descrito que puede activar CHOP a través de ATF4 (Bruhat *et al.* 2000;Fawcett *et al.* 1999), la OGD no provoca un aumento de la expresión de CHOP, por lo que podemos deducir que, no contribuye a la apoptosis por esta vía. Cabe destacar que en un trabajo posterior se demostró que ATF4 aumenta fuertemente la expresión de CHOP en condiciones de privación de aminoácidos pero lo hace de una forma mucho más leve por estrés del RE (Averous *et al.* 2004). El papel de CHOP en la isquemia es un tema controvertido ya que, como se mencionó en la

introducción, existen algunos trabajos que describen un incremento (Hayashi *et al.* 2005; Morimoto *et al.* 2007; Tajiri *et al.* 2004) mientras que en otros trabajos no lo detectaron (Kumar *et al.* 2003; Roberts *et al.* 2007). Dado que CHOP es una proteína clave para explicar la inducción de apoptosis por estrés de RE, se debe clarificar si realmente está jugando un papel en la isquemia cerebral.

Otro punto en el que existen controversias, es la activación de IRE1 (Paschen *et al.* 2003; Roberts *et al.* 2007). Nosotros observamos un incremento de la forma procesada de *xbp1* tras la OGD, lo que estaría indicando que la OGD activa IRE1. Además pudimos corroborar que tras la OGD existía una mayor actividad por parte de XBP1 ya que observamos un aumento de expresión de *edem2*, uno de los genes diana de este factor de transcripción. EDEM2 está, además, interviniendo en un proceso de degradación asociado a RE (ERAD) (Kopito 1997; Plemper and Wolf 1999), ya que esta proteína se requiere para la degradación de glicoproteínas mal plegadas (Olivari *et al.* 2005). Por otro lado, el aumento de la forma estable de XBP1, explicaría el incremento de expresión de las chaperonas GRP78 y GRP94 observado tras la OGD, ya que puede unir a las secuencias ERSE presentes en el promotor de las chaperonas (Lee *et al.* 2003). A pesar de que este es el principal proceso que explica el aumento de expresión de las chaperonas, no podemos descartar que ATF4 esté también contribuyendo de alguna manera a este incremento de una forma independiente de las secuencias ERSE (Luo *et al.* 2003).

Cuando estudiamos la activación de ATF6 en la OGD no detectamos la forma activa de 50kDa producto del corte de las proteasas S1P y S2P. Cabe destacar que esta forma es muy lábil y por lo tanto difícil de detectar, y que a pesar de utilizar inhibidores del proteosoma para ralentizar su degradación (Ye *et al.* 2000) tampoco pudimos detectarla. Curiosamente si observamos la acumulación tardía de una forma sub-glicosilada de ATF6, que también se observó en cultivos tratados con thapsigargina. Esta forma parcialmente glicosilada de ATF6 se ha descrito que se transporta con mayor facilidad al aparato de Golgi pudiendo resultar en mayor cantidad de ATF6 en núcleo (Hong *et al.* 2004). Atendiendo a los tiempos en los que se observa esta forma de ATF6 (a partir de 24h post-OGD) no esperamos que esté contribuyendo de

una forma importante en la respuesta al estrés, pero la acumulación de esta forma tras la OGD podría considerarse como otro marcador de estrés de RE (Hong *et al.* 2004).

A pesar de que la activación de la caspasa-12 se ha descrito en dos trabajos realizados en modelos *in vivo* de isquemia (Mouw *et al.* 2003a; Shibata *et al.* 2003a), y muy recientemente utilizando el paradigma de OGD (Chen 2008), en ningún caso se ha estudiado el mecanismo implicado en esta activación. Existen distintos mecanismos que se han descrito como responsables de la activación de la caspasa-12. Entre ellos se encuentra la activación por proteólisis de la calpaína (Nakagawa and Yuan 2000), o de la caspasa-7 (Rao *et al.* 2001) o la activación por proximidad mediada por IRE1-TRAF2 (Yoneda *et al.* 2001). Nosotros observamos que la activación de la caspasa-12 viene mediada por la calpaína, y que además, esta activación es dependiente de la activación de los receptores de NMDA, ya que si los bloqueábamos con un antagonista (MK-801) se revertía la proteólisis de la caspasa-12. Además, observamos que en cultivos tratados con NMDA también había una activación de la caspasa-12, aunque no se inducía el aumento de las chaperonas ni el incremento de la fosforilación de eIF2 α . De hecho, en un reciente trabajo se describió que el tratamiento con NMDA en neuronas no inducía estrés en el RE (Concannon *et al.* 2008). Estos datos sugieren que la activación de la caspasa-12 en la OGD podría ser independiente de estrés del RE y estar vinculada con la activación de la calpaína debida a la entrada de calcio a través de los receptores de NMDA.

Se ha descrito que la caspasa-12 una vez activada puede activar la caspasa-9 (Morishima *et al.* 2002; Rao *et al.* 2001). En un trabajo previo de nuestro grupo habíamos observado que la OGD activaba la caspasa-9 (Malagelada *et al.* 2005). Esta activación no parece estar mediada por el TNF α , ya que el tratamiento con un anticuerpo anti-TNF no bloquea su activación, en cambio, en presencia de un inhibidor de la calpaína se observaba una disminución de esta caspasa-9 activa. De la misma manera, la inhibición de la calpaína producía una pequeña reducción en la activación de la caspasa-3, sugiriendo que, a pesar de que la activación de la caspasa-3 en la OGD viene mediada

principalmente por la caspasa-8, la calpaína, bien de forma directa o indirecta, también está contribuyendo a la activación de esta caspasa.

A continuación, se muestra un esquema que recoge los principales procesos relacionados con el estrés de RE inducidos por la OGD (Fig. 21).

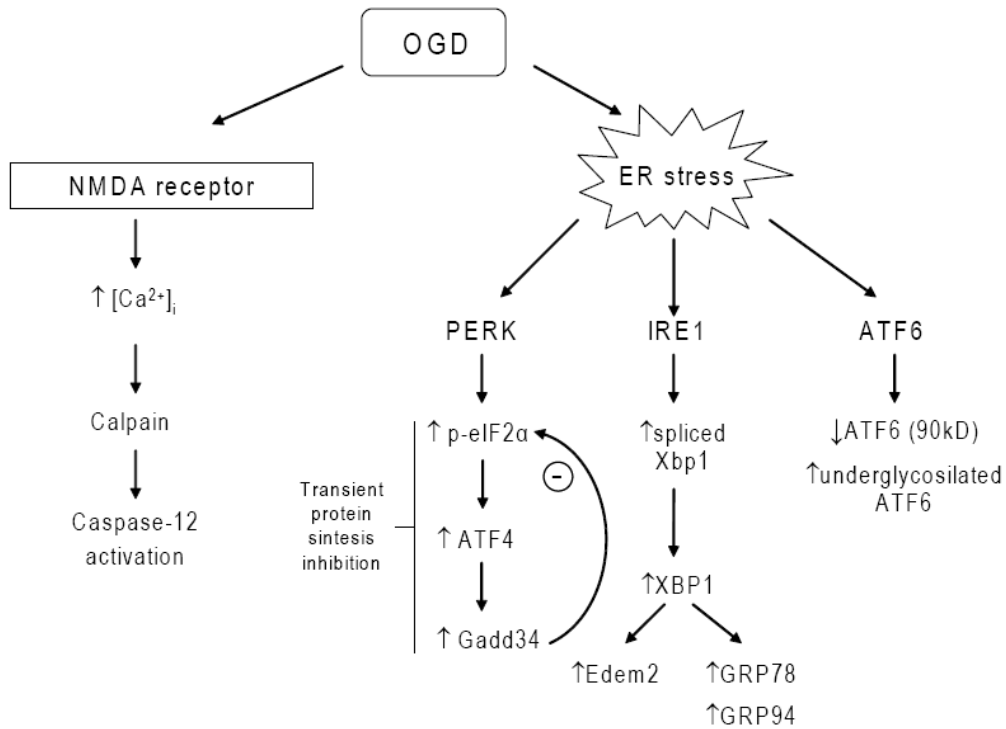


Figura 21. Vías de señalización asociadas al estrés de RE activadas por la OGD. La OGD provoca la activación de PERK que fosforila eIF2α provocando la inhibición de la síntesis proteica, por un lado, y el incremento ATF4 mediante el *bypass scanning*. ATF4 media el incremento de Gadd34 que es la responsable de la posterior desfosforilación de eIF2α. La OGD también provoca la activación de IRE1 traduciendo en un incremento de *xbp1* procesado, resultando en un incremento de XBP1 (54kDa). Este incremento se traduce en una mayor expresión de *grp78* y *grp94*. Además, la OGD provoca un incremento de una forma subglicosilada de ATF6. Por otro lado, la OGD provoca la activación de los receptores de NMDA, provocando una entrada masiva de calcio al interior de la célula. Este incremento de calcio intracelular provoca la activación de la calpaína que proteoliza la caspasa-12, generando la forma activa de la caspasa-12.

3.- CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA INDUCIDOS EN LA OGD

En los últimos años, el desarrollo de la tecnología de los microarrays está permitiendo realizar estudios exhaustivos de los cambios de expresión génica que tienen lugar en algunas enfermedades, proporcionando una información más global de los procesos que están teniendo lugar en estas patologías. Nosotros utilizamos esta tecnología para realizar un estudio de expresión génica en nuestro modelo de OGD, e identificar nuevos genes alterados tras la privación de oxígeno y glucosa, que también lo estaban en modelos de isquemia *in vivo*, pero de los que no se conocía bien su papel en esta patología. Por otro lado, también realizamos un estudio ontológico de los genes alterados de forma que se identificaron los principales *clusters* de genes implicados en respuesta a la privación de oxígeno y glucosa.

De los más de 200 genes que incrementaban su expresión de forma significativa, se escogieron seis factores de transcripción cuyo incremento se había descrito en modelos murinos de isquemia cerebral, pero cuyo papel en dicha patología no estaba del todo esclarecido: *atf3*, *egr1*, *cebp*, *nr4a1*, *nr4a2* y *nr4a3*. El incremento de expresión observado en el microarray fue confirmado por RT-PCR para todos ellos excepto para *nr4a2*, del cual no se observó aumento ni a nivel de mRNA ni a nivel de proteína, tras la OGD. Estos factores de transcripción, algunos de ellos pertenecientes al grupo de los *immediate early genes*, probablemente están jugando un importante papel en la respuesta a la OGD, aunque hasta el momento no se ha descrito su papel fisiológico en la isquemia cerebral. La confirmación del incremento de expresión de estos genes en la OGD permite plantear en el futuro estudios más detallados de las vías de señalización implicadas con estos factores de transcripción en este modelo así como evaluar su papel en la muerte celular, por ejemplo, silenciando estos genes mediante shRNA específicos.

También se realizó un análisis ontológico para saber cuales eran las principales categorías de genes que estaban incrementadas tras la OGD. Para ello utilizamos un poderoso programa bioinformático (DAVID 2.0) que nos permitía

agrupar en *clusters* las categorías similares o redundantes, de forma que obteníamos mayor información sobre los procesos celulares que estaban ocurriendo tras la OGD.

El *cluster* que presenta mayor incremento comprende genes relacionados con estructura y morfología celular. Probablemente esto nos está indicando que el conjunto de células que hay en el cultivo está sufriendo cambios en su estructura y morfología. En este sentido, es interesante señalar que los astrocitos tras la OGD se vuelven reactivos, y se observa un incremento de expresión de *gfap* (1'7 veces incrementado). Asimismo, la microglía se activa cambiando de su morfología ameboide a la redondeada, cambio que además se pudo observar por inmunocitoquímica. Mientras, las neuronas estarían sufriendo un cambio morfológico, con el recogimiento de las neuritas y axones, y en definitiva, perdiendo gran parte de su estructura celular, tal y como se observa visualmente en cultivos sometidos a OGD, o con la degradación de MAP2. De todas maneras, no hay que ignorar que la OGD induce fuertemente la expresión de *arc*, un gen implicado en la formación de dendritas y de gran importancia en procesos de plasticidad sináptica (Lyford *et al.* 1995; Tzingounis and Nicoll 2006). De hecho, existen dos trabajos que describen esta inducción de *arc* en modelos de isquemia focal y la relacionan con la reorganización y plasticidad sináptica (Rickhag *et al.* 2007; Kunizuka *et al.* 1999). Por lo tanto, se puede considerar que la OGD, provoca una reorganización sináptica debido a la pérdida de estructura de gran parte de las neuronas.

Relacionado con el anterior *cluster*, el segundo cluster muestra procesos relacionados con proliferación celular, tanto de inducción de la proliferación como de regulación negativa. Se podría pensar que los procesos de proliferación celular estarían sucediendo en las células gliales como respuesta a mediadores inflamatorios y que los procesos que regulan negativamente la proliferación estarían teniendo lugar en las neuronas, y por ello ser reflejo de un proceso de apoptosis, ya que muchos de los componentes de la maquinaria del ciclo celular están también implicados en la apoptosis.

El tercer *cluster* está relacionado con la muerte celular y la apoptosis. En nuestro cultivo sabemos que 24h después de la OGD hay una muerte del 50% aproximadamente y que la mitad de esta muerte es necrótica y la otra mitad es apoptótica (Malagelada *et al.* 2005). El análisis de la expresión génica refleja muy bien este hecho ya que observamos un incremento en la categoría general de muerte celular, pero también en genes específicos de procesos apoptóticos, tanto proapoptóticos como antiapoptóticos. Se observa un claro incremento del *tnfr1* (*tnfrsf1a*) en clara concordancia con lo que observamos mediante real-time PCR (ver capítulo 2). En el caso del *tnf* en el microarray se observa un incremento menor al observado por rt-PCR ya que uno de los cultivos utilizados no mostró aumento. De todas maneras, el aumento de la expresión de *tnfr2* (*tnfrsf1b*) se detectó por ambos métodos (datos no mostrados). Además, la expresión de otros receptores de la superfamilia TNFR estaba claramente incrementada (*tnfsr12* y *tnfsr6*), lo que nos indica que esta vía tiene un papel importante en la OGD. Respecto a los genes que pueden estar implicados en la prevención de la apoptosis están el *bdnf*, factor neurotrófico con propiedades anti-apoptóticas ampliamente descritas o, la neuregulina 1 (*ngr1*), cuya expresión se ha descrito que incrementa en la isquemia cerebral, y a la cual se le atribuye una función neuroprotectora, actuando a través de sus receptores erbB (Parker *et al.* 2002; Xu and Ford 2005). Otro gen que podría estar interviniendo en este proceso es *bag3* miembro de la familia de bcl-2, que se ha descrito que actúa de forma sinérgica con bcl-2 para bloquear la apoptosis (Lee *et al.* 1999).

Sorprendentemente el cuarto cluster hace referencia a procesos de formación de vasos sanguíneos o angiogénesis. Sorprende que sea uno de los grupos más significados, ya que en los cultivos mixtos de neuronas corticales no hay células vasculares, aunque puede entenderse si se tiene en cuenta que está descrito que tanto las neuronas como la glía pueden ser fuente de las moléculas responsables de la nueva formación de vasos sanguíneos (del Zoppo and Mabuchi 2003; Lennmyr *et al.* 1998; Hayashi *et al.* 1997). Además, en un estudio *in vitro* se demostró que los cultivos de células endoteliales (BBMEC) que se ponían en contacto con astrocitos sometidos a una hipoxia presentaban un incremento en la formación de túbulos, sugiriendo que estos

astrocitos estimulados estaban liberando algún factor angiogénico al medio. En nuestro cultivo, no solo se observa el aumento de la expresión de genes relacionados con la angiogénesis, sino también con la regulación del flujo sanguíneo, como los moduladores de la formación de coágulos (trombos) (*thbs1, plat, plau, plaur*) y otros (*fgl2, angptl4, fn1, agt*).

El quinto cluster comprende genes implicados en la respuesta a un estímulo u estrés externo. Es una respuesta esperable ya que la OGD se puede considerar como una compleja (combinada) estimulación externa. En esta respuesta podemos identificar numerosos IEG y chaperonas. Cabe destacar también que existe un claro incremento de genes relacionados con respuesta inflamatoria, observándose un aumento en numerosas quimioquinas (*cxcl1, ccl2, ccl7, ccl12, ccl20*) además de genes relacionados con las interleuquinas (*il1rap, il6st, il6* que sufre un incremento de 1.7 FC), antígenos (*cd9, cd44*) y moléculas de adhesión (*icam1 y ncam1*). Esto junto al incremento de expresión de algunos receptores del TNF α hacen pensar que en el cultivo se está dando de alguna manera una respuesta inflamatoria, probablemente debida a la liberación de citoquinas.

Considerando el conjunto de los resultados se puede afirmar que la OGD es un buen modelo para estudiar la isquemia cerebral, ya que consigue mimetizar en gran parte los procesos celulares que ocurren *in vivo*. Los cultivos mixtos de neuronas corticales, a pesar de no conservar la arquitectura del parénquima cerebral y de la falta de vasos, mantienen la interacción entre la glía y las neuronas lo cual, frente a una privación de oxígeno y glucosa, permite recrear de forma razonable la respuesta de estas células como un conjunto, teniendo además facilidades para poder estudiarlas por separado.

VI - CONCLUSIONES

- 1.- En los cultivos mixtos de células corticales el TNF α y TNFR1 se expresa en neuronas y microglía pero no así en los astrocitos.
- 2.- La OGD provoca un incremento en la expresión de *tnfa* y de varios de sus receptores, incluyendo el *tnfr1*.
- 3- La liberación de TNF α en la OGD activa la caspasa-8 a través del TNFR1, siendo esta caspasa es la principal responsable de la posterior activación de la caspasa-3.
- 4.- Si se bloquea el efecto del TNF α o se inhibe de forma específica la caspasa-8, (IETD), se observa una reducción de la muerte provocada por OGD, sugiriendo que esta vía tiene un papel clave en la muerte inducida por OGD.
- 5.- Tanto la OGD como la hipoxia-isquemia neonatal provocan estrés del RE y, como consecuencia, activan las vías de PERK e IRE1, implicadas en la respuesta por estrés del RE.
- 6.- La activación de la caspasa-12 observada en la OGD está mediada por la calpaína, y depende de la estimulación del receptor de NMDA.
- 7.- La OGD induce expresión de los factores de transcripción *atf3*, *egr1*, *cebp δ* , *nr4a1* y *nr4a3*.
- 8.- El estudio de los cambios de expresión génica inducidos por la OGD ponen de relieve que la OGD es una buena aproximación *in vitro* a la isquemia cerebral, ya que existen muchos genes alterados en común con modelos murinos de isquemia.

VII - BIBLIOGRAFÍA

Adhami F., Liao G., Morozov Y. M., Schloemer A., Schmithorst V. J., Lorenz J. N., Dunn R. S., Vorhees C. V., Wills-Karp M., Degen J. L., Davis R. J., Mizushima N., Rakic P., Dardzinski B. J., Holland S. K., Sharp F. R. and Kuan C. Y. (2006) Cerebral ischemia-hypoxia induces intravascular coagulation and autophagy. *Am. J Pathol.* 169, 566-583.

Akassoglou K., Douni E., Bauer J., Lassmann H., Kollias G. and Probert L. (2003) Exclusive tumor necrosis factor (TNF) signaling by the p75TNF receptor triggers inflammatory ischemia in the CNS of transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 709-714.

Akins P. T., Liu P. K. and Hsu C. Y. (1996) Immediate Early Gene Expression in Response to Cerebral Ischemia: Friend or Foe? *Stroke* 27, 1682-1687.

Alnemri E. S., Livingston D. J., Nicholson D. W., Salvesen G., Thornberry N. A., Wong W. W. and Yuan J. (1996) Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *Cell* 87, 171.

Althausen S., Mengesdorf T., Mies G., Olah L., Nairn A. C., Proud C. G. and Paschen W. (2001) Changes in the phosphorylation of initiation factor eIF-2 α , elongation factor eEF-2 and p70 S6 kinase after transient focal cerebral ischaemia in mice. *J. Neurochem.* 78, 779-787.

Averous J., Bruhat A., Jousse C., Carraro V., Thiel G. and Fafournoux P. (2004) Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 279, 5288-5297.

Banati R. B., Rothe G., Valet G. and Kreutzberg G. W. (1991) Respiratory burst activity in brain macrophages: a flow cytometric study on cultured rat microglia. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 17, 223-230.

Barone F. C., Arvin B., White R. F., Miller A., Webb C. L., Willette R. N., Lysko P. G. and Feuerstein G. Z. (1997) Tumor necrosis factor- α . A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke* 28, 1233-1244.

Benchoua A., Guegan C., Couriaud C., Hosseini H., Sampaio N., Morin D. and Onteniente B. (2001) Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction. *J Neurosci.* 21, 7127-7134.

Benveniste H., Drejer J., Schousboe A. and Diemer N. H. (1984) Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during

transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.* 43, 1369-1374.

Bertolotti A., Zhang Y., Hendershot L. M., Harding H. P. and Ron D. (2000) Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* 2, 326-332.

Bhardwaj A. and Aggarwal B. B. (2003) Receptor-Mediated Choreography of Life and Death. *Journal of Clinical Immunology* 23, 317-332.

Black R. A., Rauch C. T., Kozlosky C. J., Peschon J. J., Slack J. L., Wolfson M. F., Castner B. J., Stocking K. L., Reddy P., Srinivasan S., Nelson N., Boiani N., Schooley K. A., Gerhart M., Davis R., Fitzner J. N., Johnson R. S., Paxton R. J., March C. J. and Cerretti D. P. (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-[alpha] from cells. *Nature* 385, 729-733.

Blomgren K., Zhu C., Wang X., Karlsson J. O., Leverin A. L., Bahr B. A., Mallard C. and Hagberg H. (2001) Synergistic Activation of Caspase-3 by m-Calpain after Neonatal Hypoxia-Ischemia. A MECHANISM OF "PATHOLOGICAL APOPTOSIS"? *J. Biol. Chem.* 276, 10191-10198.

Boatright K. M. and Salvesen G. S. (2003) Mechanisms of caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 725-731.

Boldin M. P., Goncharov T. M., Goltseve Y. V. and Wallach D. (1996) Involvement of MACH, a Novel MORT1/FADD-Interacting Protease, in Fas/APO-1- and TNF Receptor-Induced Cell Death. *Cell* 85, 803-815.

Botchkina G. I., Meistrell M. E., III, Botchkina I. L. and Tracey K. J. (1997) Expression of TNF and TNF receptors (p55 and p75) in the rat brain after focal cerebral ischemia. *Mol. Med.* 3, 765-781.

Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Bredesen D. E., Rao R. V. and Mehlen P. (2006) Cell death in the nervous system. *Nature* 443, 796-802.

Brinker G., Franke C., Hoehn M., Uhlenkuken U. and Hossmann K. A. (1999) Thrombolysis of cerebral clot embolism in rat: effect of treatment delay. *Neuroreport* 10, 3269-3272.

Brown A. W. and Brierley J. B. (1972) Anoxic-ischaemic cell change in rat brain light microscopic and fine-structural observations. *J. Neurol. Sci.* 16, 59-84.

Bruce A. J., Boling W., Kindy M. S., Peschon J., Kraemer P. J., Carpenter M. K., Holsberg F. W. and Mattson M. P. (1996) Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat. Med.* 2, 788-794.

Bruhat A., Jousse C., Carraro V., Reimold A. M., Ferrara M. and Fafournoux P. (2000) Amino Acids Control Mammalian Gene Transcription: Activating Transcription Factor 2 Is Essential for the Amino Acid Responsiveness of the CHOP Promoter. *Mol. Cell. Biol.* 20, 7192-7204.

Brush M. H., Weiser D. C. and Shenolikar S. (2003) Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol. Cell Biol.* 23, 1292-1303.

Budihardjo I., Oliver H., Lutter M., Luo X. and Wang X. (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 269-290.

Buendia B., Santa-Maria A. and Courvalin J. C. (1999) Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci* 112, 1743-1753.

Cai J., Kang Z., Liu W. W., Luo X., Qiang S., Zhang J. H., Ohta S., Sun X., Xu W., Tao H. and Li R. (2008) Hydrogen therapy reduces apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *Neuroscience Letters* 441, 167-172.

Cain K., Brown D. G., Langlais C. and Cohen G. M. (1999) Caspase Activation Involves the Formation of the Aposome, a Large (~700 kDa) Caspase-activating Complex. *J. Biol. Chem.* 274, 22686-22692.

Calfon M., Zeng H., Urano F., Till J. H., Hubbard S. R., Harding H. P., Clark S. G. and Ron D. (2002) IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415, 92-96.

Carboni S., Antonsson B., Gaillard P., Gotteland J. P., Gillon J. Y. and Vitte P. A. (2005) Control of death receptor and mitochondrial-dependent apoptosis by c-Jun N-terminal kinase in hippocampal CA1 neurones following global transient ischaemia. *J Neurochem.* 92, 1054-1060.

Cardenas A., Moro M. A., Leza J. C., O'Shea E., Davalos A., Castillo J., Lorenzo P. and Lizasoain I. (2002) Upregulation of TACE/ADAM17 after ischemic preconditioning is involved in brain tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 22, 1297-1302.

Carlioni S., Buonocore G. and Balduini W. (2008) Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury. *Neurobiol. Dis.*

Castillo J., Moro M. A., Blanco M., Leira R., Serena J., Lizasoain I. and Davalos A. (2003) The release of tumor necrosis factor-alpha is associated with ischemic tolerance in human stroke. *Ann. Neurol.* 54, 811-819.

Chan F. K.-M., Shisler J., Bixby J. G., Felices M., Zheng L., Appel M., Orenstein J., Moss B. and Lenardo M. J. (2003) A Role for Tumor Necrosis Factor Receptor-2 and Receptor-interacting Protein in Programmed Necrosis and Antiviral Responses. *J. Biol. Chem.* 278, 51613-51621.

Chao C. C., Hu S., Molitor T. W., Shaskan E. G. and Peterson P. K. (1992) Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J. Immunol.* 149, 2736-2741.

Chen G. and Goeddel D. V. (2002) TNF-R1 Signaling: A Beautiful Pathway. *Science* 296, 1634-1635.

Chen J., Nagayama T., Jin K., Stetler R. A., Zhu R. L., Graham S. H. and Simon R. P. (1998) Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 18, 4914-4928.

Chen J., Zacharek A., Zhang C., Jiang H., Li Y., Roberts C., Lu M., Kapke A. and Chopp M. (2005) Endothelial Nitric Oxide Synthase Regulates Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression and Neurogenesis after Stroke in Mice. *J. Neurosci.* 25, 2366-2375.

Choi D. W. (1996) Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 667-672.

Codogno P. and Meijer A. J. (0 AD) Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ* 12, 1509-1518.

Cole K. K. and Perez-Polo J. R. (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition prevents both apoptotic-like delayed neuronal death and necrosis after H₂O₂ injury. *J Neurochem.* 82, 19-29.

Concannon C. G., Ward M. W., Bonner H. P., Kuroki K., Tuffy L. P., Bonner C. T., Woods I., Engel T., Henshall D. C. and Prehn J. H. (2008) NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal apoptosis in vitro and in vivo occurs in an ER stress and PUMA independent manner. *J Neurochem.* 105, 891-903.

Connolly E. S., Jr., Winfree C. J., Springer T. A., Naka Y., Liao H., Yan S. D., Stern D. M., Solomon R. A., Gutierrez-Ramos J. C. and Pinsky D. J. (1996) Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. *J Clin. Invest* 97, 209-216.

Croall D. E. and DeMartino G. N. (1991) Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.* 71, 813-847.

Curtin J. F. and Cotter T. G. (2003) Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal.* 15, 983-992.

D'Amours D., Sallmann F. R., Dixit V. M. and Poirier G. G. (2001) Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis. *J Cell Sci* 114, 3771-3778.

DeGracia D. J. and Hu B. R. (2007) Irreversible translation arrest in the reperfused brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 27, 875-893.

Degterev A., Huang Z., Boyce M., Li Y., Jagtap P., Mizushima N., Cuny G. D., Mitchison T. J., Moskowitz M. A. and Yuan J. (2005) Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* 1, 112-119.

del Zoppo G. J., Poeck K., Pessin M. S., Wolpert S. M., Furlan A. J., Ferbert A., Alberts M. J., Zivin J. A., Wechsler L., Busse O. and . (1992) Recombinant tissue plasminogen activator in acute thrombotic and embolic stroke. *Ann. Neurol.* 32, 78-86.

del Zoppo G. J. and Mabuchi T. (2003) Cerebral Microvessel Responses to Focal Ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 879-894.

Dever T. E., Yang W., Astrom S., Bystrom A. S. and Hinnebusch A. G. (1995) Modulation of tRNA(iMet), eIF-2, and eIF-2B expression shows that GCN4 translation is inversely coupled to the level of eIF-2.GTP.Met-tRNA(iMet) ternary complexes. *Mol. Cell Biol.* 15, 6351-6363.

Deveraux Q. L., Stennicke H. R., Salvesen G. S. and Reed J. C. (1999) Endogenous inhibitors of caspases. *J. Clin. Immunol.* 19, 388-398.

Diener H. C., Lees K. R., Lyden P., Grotta J., Davalos A., Davis S. M., Shuaib A., Ashwood T., Wasiewski W., Alderfer V., Hardemark H. G. and Rodichok L. (2008) NXY-059 for the treatment of acute stroke: pooled analysis of the SAINT I and II Trials. *Stroke* 39, 1751-1758.

Dirnagl U., Iadecola C. and Moskowitz M. A. (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in Neurosciences* 22, 391-397.

Dix M. M., Simon G. M. and Cravatt B. F. (2008) Global Mapping of the Topography and Magnitude of Proteolytic Events in Apoptosis. *Cell* 134, 679-691.

Donepudi M., Mac S. A., Briand C. and Grutter M. G. (2003) Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol. Cell* 11, 543-549.

Earnshaw W. C., Martins L. M. and Kaufmann S. H. (1999) MAMMALIAN CASPASES: Structure, Activation, Substrates, and Functions During Apoptosis. *Annual Review of Biochemistry* 68, 383-424.

Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A. and Nagata S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.

Farreras P. & Rozman C. (1992) *Medicina Interna. Volumen II, 12ª edición,*

Fawcett T. W., Martindale J. L., Guyton K. Z., Hai T. and Holbrook N. J. (1999) Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive-element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response. *Biochem. J.* 339, 135-141.

- Feng Y., Fratkin J. D. and LeBlanc M. H. (2003) Inhibiting caspase-8 after injury reduces hypoxic-ischemic brain injury in the newborn rat. *Eur. J Pharmacol* 481, 169-173.
- Ferri K. F. and Kroemer G. (2001) Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 3, E255-E263.
- Feuerstein G. Z., Liu T. and Barone F. C. (1994) Cytokines, inflammation, and brain injury: role of tumor necrosis factor- α . *Cerebrovasc. Brain Metab Rev.* 6, 341-360.
- Folbergrova J., Minamisawa H., Ekholm A. and Siesjo B. K. (1990) Phosphorylase alpha and labile metabolites during anoxia: correlation to membrane fluxes of K⁺ and Ca²⁺. *J Neurochem.* 55, 1690-1696.
- Ford G., Xu Z., Gates A., Jiang J. and Ford B. D. (2006) Expression Analysis Systematic Explorer (EASE) analysis reveals differential gene expression in permanent and transient focal stroke rat models. *Brain Res* 1071, 226-236.
- Fotin-Mleczek M., Henkler F., Samel D., Reichwein M., Hausser A., Parmryd I., Scheurich P., Schmid J. A. and Wajant H. (2002) Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. *J. Cell Sci.* 115, 2757-2770.
- Fujikawa D. G., Ke X., Trinidad R. B., Shinmei S. S. and Wu A. (2002) Caspase-3 is not activated in seizure-induced neuronal necrosis with internucleosomal DNA cleavage. *J Neurochem.* 83, 229-240.
- Fujimura M., Morita-Fujimura Y., Kawase M., Copin J. C., Calagui B., Epstein C. J. and Chan P. H. (1999) Manganese Superoxide Dismutase Mediates the Early Release of Mitochondrial Cytochrome C and Subsequent DNA Fragmentation after Permanent Focal Cerebral Ischemia in Mice. *J. Neurosci.* 19, 3414-3422.
- Garcia J. H. (1975) The neuropathology of stroke. *Hum. Pathol.* 6, 583-598.
- Gaur U. and Aggarwal B. B. (2003) Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochemical Pharmacology* 66, 1403-1408.
- Ginsburg G. S., Donahue M. P. and Newby L. K. (2005) Prospects for Personalized Cardiovascular Medicine: The Impact of Genomics. *Journal of the American College of Cardiology* 46, 1615-1627.

Goldberg M. P. and Choi D. W. (1993) Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J. Neurosci.* 13, 3510-3524.

Gozzelino R., Sole C., Llecha N., Segura M. F., Moubarak R. S., Iglesias-Guimaraes V., Perez-Garcia M. J., Reix S., Zhang J., Badiola N., Sanchis D., Rodriguez-Alvarez J., Trullas R., Yuste V. J. and Comella J. X. (2008) BCL-X(L) regulates TNF-alpha-mediated cell death independently of NF-kappaB, FLIP and IAPs. *Cell Res.*

Grethe S., Ares M. P. S., Andersson T. and Parn-Ares M. I. (2004) p38 MAPK mediates TNF-induced apoptosis in endothelial cells via phosphorylation and downregulation of Bcl-xL. *Experimental Cell Research* 298, 632-642.

Gross A., Yin X. M., Wang K., Wei M. C., Jockel J., Milliman C., Erdjument-Bromage H., Tempst P. and Korsmeyer S. J. (1999) Caspase Cleaved BID Targets Mitochondria and Is Required for Cytochrome c Release, while BCL-XL Prevents This Release but Not Tumor Necrosis Factor-R1/Fas Death. *J. Biol. Chem.* 274, 1156-1163.

Halliwell B. and Gutteridge J. M. (1985) The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med.* 8, 89-193.

Hara H., Friedlander R. M., Gagliardini V., Ayata C., Fink K., Huang Z., Shimizu-Sasamata M., Yuan J. and Moskowitz M. A. (1997) Inhibition of interleukin 1beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 2007-2012.

Harding H. P., Novoa I., Zhang Y., Zeng H., Wek R., Schapira M. and Ron D. (2000) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* 6, 1099-1108.

Harding H. P., Zhang Y. and Ron D. (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397, 271-274.

Hayashi T., Abe K., Suzuki H. and Itoyama Y. (1997) Rapid induction of vascular endothelial growth factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 28, 2039-2044.

Hayashi T., Saito A., Okuno S., Ferrand-Drake M., Dodd R. L. and Chan P. H. (2005) Damage to the endoplasmic reticulum and activation of apoptotic machinery by oxidative stress in ischemic neurons. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 25, 41-53.

Hayashi T., Saito A., Okuno S., Ferrand-Drake M., Dodd R. L., Nishi T., Maier C. M., Kinouchi H. and Chan P. H. (2003) Oxidative damage to the endoplasmic reticulum is implicated in ischemic neuronal cell death. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 23, 1117-1128.

Haze K., Yoshida H., Yanagi H., Yura T. and Mori K. (1999) Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell* 10, 3787-3799.

Hengartner M. O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.

Holler N., Zaru R., Micheau O., Thome M., Attinger A., Valitutti S., Bodmer J. L., Schneider P., Seed B. and Tschopp J. (2000) Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol.* 1, 489-495.

Hong M., Luo S., Baumeister P., Huang J. M., Gogia R. K., Li M. and Lee A. S. (2004) Underglycosylation of ATF6 as a novel sensing mechanism for activation of the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* 279, 11354-11363.

Honkaniemi J., States B. A., Weinstein P. R., Espinoza J. and Sharp F. R. (1997) Expression of Zinc Finger Immediate Early Genes in Rat Brain After Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 17, 636-646.

Hosack D. A., Dennis G., Jr., Sherman B. T., Lane H. C. and Lempicki R. A. (2003) Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol* 4, R70.

Hossmann K. A. (1993) Ischemia-mediated neuronal injury. *Resuscitation* 26, 225-235.

Hossmann K. A. (1996) Excitotoxic mechanisms in focal ischemia. *Adv. Neurol.* 71, 69-74.

Hou S. T. and MacManus J. P. (2002) Molecular mechanisms of cerebral ischemia-induced neuronal death. *Int. Rev Cytol.* 221, 93-148.

Hsu H., Shu H. B., Pan M. G. and Goeddel D. V. (1996) TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84, 299-308.

Hu B. R., Martone M. E., Jones Y. Z. and Liu C. L. (2000) Protein aggregation after transient cerebral ischemia. *J Neurosci.* 20, 3191-3199.

Hurtado O., Lizasoain I., Fernandez-Tome P., varez-Barrientos A., Leza J. C., Lorenzo P. and Moro M. A. (2002) TACE/ADAM17-TNF-alpha pathway in rat cortical cultures after exposure to oxygen-glucose deprivation or glutamate. *J Cereb Blood Flow Metab* 22, 576-585.

Irizarry R. A., Hobbs B., Collin F., Beazer-Barclay Y. D., Antonellis K. J., Scherf U. and Speed T. P. (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostat* 4, 249-264.

Jaeschke H. and Lemasters J. J. (2003) Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology* 125, 1246-1257.

Jin K., Mao X. O., Eshoo M. W., Nagayama T., Minami M., Simon R. P. and Greenberg D. A. (2001) Microarray analysis of hippocampal gene expression in global cerebral ischemia. *Ann. Neurol.* 50, 93-103.

Kang S. J., Wang S., Hara H., Peterson E. P., Namura S., Amin-Hanjani S., Huang Z., Srinivasan A., Tomaselli K. J., Thornberry N. A., Moskowitz M. A. and Yuan J. (2000) Dual role of caspase-11 in mediating activation of caspase-1 and caspase-3 under pathological conditions. *J. Cell Biol.* 149, 613-622.

Kaste M. (2005) Use of animal models has not contributed to development of acute stroke therapies: *pro. Stroke* 36, 2323-2324.

Katsura K., Kristian T. and Siesjo B. K. (1994) Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem. Soc. Trans.* 22, 991-996.

Katsura K., Rodriguez de Turco E. B., Folbergrova J., Bazan N. G. and Siesjo B. K. (1993) Coupling among energy failure, loss of ion homeostasis, and phospholipase A2 and C activation during ischemia. *J. Neurochem.* 61, 1677-1684.

Kaufman R. J. (1999) Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* 13, 1211-1233.

Kaushal V. and Schlichter L. C. (2008) Mechanisms of Microglia-Mediated Neurotoxicity in a New Model of the Stroke Penumbra. *J. Neurosci.* 28, 2221-2230.

- Kawahara A., Ohsawa Y., Matsumura H., Uchiyama Y. and Nagata S. (1998) Caspase-independent Cell Killing by Fas-associated Protein with Death Domain. *J. Cell Biol.* 143, 1353-1360.
- Kerr J. F., Wyllie A. H. and Currie A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257.
- Khwaja A. and Tatton L. (1999) Resistance to the Cytotoxic Effects of Tumor Necrosis Factor alpha Can Be Overcome by Inhibition of a FADD/Caspase-dependent Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* 274, 36817-36823.
- Kim J. B., Piao C. S., Lee K. W., Han P. L., Ahn J. I., Lee Y. S. and Lee J. K. (2004) Delayed genomic responses to transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurochem.* 89, 1271-1282.
- Kopito R. R. (1997) ER Quality Control: The Cytoplasmic Connection. *Cell* 88, 427-430.
- Kothakota S., Azuma T., Reinhard C., Klippel A., Tang J., Chu K., McGarry T. J., Kirschner M. W., Kohts K., Kwiatkowski D. J. and Williams L. T. (1997) Caspase-3-Generated Fragment of Gelsolin: Effector of Morphological Change in Apoptosis. *Science* 278, 294-298.
- Kumar R., Krause G. S., Yoshida H., Mori K. and DeGracia D. J. (2003) Dysfunction of the unfolded protein response during global brain ischemia and reperfusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 23, 462-471.
- Kunizuka H., Kinouchi H., Arai S., Izaki K., Mikawa S., Kamii H., Sugawara T., Suzuki A., Mizoi K. and Yoshimoto T. (1999) Activation of Arc gene, a dendritic immediate early gene, by middle cerebral artery occlusion in rat brain. *Neuroreport* 10, 1717-1722.
- Lambertsen K. L., Meldgaard M., Ladeby R. and Finsen B. (2005) A quantitative study of microglial-macrophage synthesis of tumor necrosis factor during acute and late focal cerebral ischemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 25, 119-135.
- Lanahan A. and Worley P. (1998) Immediate-Early Genes and Synaptic Function, . *Neurobiology of Learning and Memory* 70, 37-43.

Lavine S. D., Hofman F. M. and Zlokovic B. V. (1998) Circulating antibody against tumor necrosis factor- α protects rat brain from reperfusion injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 18, 52-58.

Lavrik I., Golks A. and Krammer P. H. (2005) Death receptor signaling. *J Cell Sci* 118, 265-267.

Le D. A., Wu Y., Huang Z., Matsushita K., Plesnila N., Augustinack J. C., Hyman B. T., Yuan J., Kuida K., Flavell R. A. and Moskowitz M. A. (2002) Caspase activation and neuroprotection in caspase-3- deficient mice after in vivo cerebral ischemia and in vitro oxygen glucose deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 15188-15193.

Lee A. H., Iwakoshi N. N. and Glimcher L. H. (2003) XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7448-7459.

Lee J. H., Takahashi T., Yasuhara N., Inazawa J., Kamada S. and Tsujimoto Y. (1999) Bis, a Bcl-2-binding protein that synergizes with Bcl-2 in preventing cell death. *Oncogene* 18, 6183-6190.

Lee K., Tirasophon W., Shen X., Michalak M., Prywes R., Okada T., Yoshida H., Mori K. and Kaufman R. J. (2002) IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev.* 16, 452-466.

Lees K. R., Zivin J. A., Ashwood T., Davalos A., Davis S. M., Diener H. C., Grotta J., Lyden P., Shuaib A., Hardemark H. G. and Wasiewski W. W. (2006) NXY-059 for acute ischemic stroke. *N. Engl. J Med.* 354, 588-600.

Legler D. F., Micheau O., Doucey M. A., Tschopp J. and Bron C. (2003) Recruitment of TNF Receptor 1 to Lipid Rafts Is Essential for TNF[α]-Mediated NF- κ B Activation. *Immunity* 18, 655-664.

Lenmyr F., Ata K. A., Funai K., Olsson Y. and Terent A. (1998) Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (Flt-1 and Flk-1) following permanent and transient occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 874-882.

- Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S. M., Ahmad M., Alnemri E. S. and Wang X. (1997) Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell* 91, 479-489.
- Lipton P. (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev.* 79, 1431-1568.
- Liu T., Clark R. K., McDonnell P. C., Young P. R., White R. F., Barone F. C. and Feuerstein G. Z. (1994) Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke* 25, 1481-1488.
- Liu X., Zou H., Slaughter C. and Wang X. (1997) DFF, a Heterodimeric Protein That Functions Downstream of Caspase-3 to Trigger DNA Fragmentation during Apoptosis. *Cell* 89, 175-184.
- Liu Z. G., Hsu H., Goeddel D. V. and Karin M. (1996) Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* 87, 565-576.
- Longa E. Z., Weinstein P. R., Carlson S. and Cummins R. (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20, 84-91.
- Love S. (2003) Apoptosis and brain ischaemia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 27, 267-282.
- Luo S., Baumeister P., Yang S., Abcouwer S. F. and Lee A. S. (2003) Induction of Grp78/BiP by Translational Block: ACTIVATION OF THE Grp78 PROMOTER BY ATF4 THROUGH AN UPSTREAM ATF/CRE SITE INDEPENDENT OF THE ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS ELEMENTS. *J. Biol. Chem.* 278, 37375-37385.
- Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C. and Wang X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.
- Luthi A. U. and Martin S. J. (2007) The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ* 14, 641-650.
- Lyford G. L., Yamagata K., Kaufmann W. E., Barnes C. A., Sanders L. K., Copeland N. G., Gilbert D. J., Jenkins N. A., Lanahan A. A. and Worley P. F. (1995) Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* 14, 433-445.

Ma Y., Brewer J. W., an Diehl J. and Hendershot L. M. (2002) Two Distinct Stress Signaling Pathways Converge Upon the CHOP Promoter During the Mammalian Unfolded Protein Response. *Journal of Molecular Biology* 318, 1351-1365.

Ma Y. and Hendershot L. M. (2003) Delineation of a Negative Feedback Regulatory Loop That Controls Protein Translation during Endoplasmic Reticulum Stress. *J. Biol. Chem.* 278, 34864-34873.

MacEwan D. J. (2002) TNF receptor subtype signalling: Differences and cellular consequences. *Cellular Signalling* 14, 477-492.

MacManus J. P., Hill I. E., Huang Z. G., Rasquinha I., Xue D. and Buchan A. M. (1994) DNA damage consistent with apoptosis in transient focal ischaemic neocortex. *Neuroreport* 5, 493-496.

Malagelada C., Xifré X., Miñano A., Sabrib J. and Rodr eguez-Alvarez J. (2005) Contribution of caspase-mediated apoptosis to the cell death caused by oxygen-glucose deprivation in cortical cell cultures. *Neurobiology of Disease* 20, 27-37.

Marti-Vilalta J. L., Arboix A. and Vazquez J. (1993) [Additional tests in cerebral vascular diseases]. *Neurologia* 8, 295-307.

Martin d. I., V, Burda J., Nemethova M., Quevedo C., Alcazar A., Martin M. E., Danielisova V., Fando J. L. and Salinas M. (2001) Possible mechanisms involved in the down-regulation of translation during transient global ischaemia in the rat brain. *Biochem. J.* 357, 819-826.

Matsumura H., Shimizu Y., Ohsawa Y., Kawahara A., Uchiyama Y. and Nagata S. (2000) Necrotic Death Pathway in Fas Receptor Signaling. *J. Cell Biol.* 151, 1247-1256.

Mattson M. P. (1997) Neuroprotective signal transduction: relevance to stroke. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21, 193-206.

McBean D. E. and Kelly P. A. (1998) Rodent models of global cerebral ischemia: a comparison of two-vessel occlusion and four-vessel occlusion. *Gen. Pharmacol.* 30, 431-434.

Meistrell M. E., III, Botchkina G. I., Wang H., Di Santo E., Cockroft K. M., Bloom O., Vishnubhakat J. M., Ghezzi P. and Tracey K. J. (1997) Tumor necrosis factor is a brain damaging cytokine in cerebral ischemia. *Shock* 8, 341-348.

Mhairi M., I (1992) New models of focal cerebral ischaemia. *Br. J Clin. Pharmacol.* 34, 302-308.

Micheau O. and Tschopp J. (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114, 181-190.

Mies G., Iijima T. and Hossmann K. A. (1993) Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat. *Neuroreport* 4, 709-711.

Monney L., Olivier R., Otter I., Jansen B., Poirier G. G. and Borner C. (1998) Role of an acidic compartment in tumor-necrosis-factor-alpha-induced production of ceramide, activation of caspase-3 and apoptosis. *Eur. J Biochem* 251, 295-303.

Montaner J. (2007) *Fisiopatología de la isquemia cerebral*. Merge medica books.

Morgan J. I. and Curran T. (1991) Stimulus-Transcription Coupling in the Nervous System: Involvement of the Inducible Proto-Oncogenes fos and jun. *Annual Review of Neuroscience* 14, 421-451.

Morimoto N., Oida Y., Shimazawa M., Miura M., Kudo T., Imaizumi K. and Hara H. (2007) Involvement of endoplasmic reticulum stress after middle cerebral artery occlusion in mice. *Neuroscience* 147, 957-967.

Morishima N., Nakanishi K., Takenouchi H., Shibata T. and Yasuhiko Y. (2002) An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J. Biol. Chem.* 277, 34287-34294.

Moroni F., Meli E., Peruginelli F., Chiarugi A., Cozzi A., Picca R., Romagnoli P., Pellicciari R. and Pellegrini-Giampietro D. E. (2001) Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors attenuate necrotic but not apoptotic neuronal death in experimental models of cerebral ischemia. *Cell Death. Differ.* 8, 921-932.

Morris D. R. and Geballe A. P. (2000) Upstream Open Reading Frames as Regulators of mRNA Translation. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8635-8642.

Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55-63.

Mouw G., Zechel J. L., Gamboa J., Lust W. D., Selman W. R. and Ratcheson R. A. (2003) Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum resident caspase, after permanent focal ischemia in rat. *Neuroreport* 14, 183-186..

Muzio M., Stockwell B. R., Stennicke H. R., Salvesen G. S. and Dixit V. M. (1998) An Induced Proximity Model for Caspase-8 Activation. *J. Biol. Chem.* 273, 2926-2930.

Naismith J. H. and Sprang S. R. (1998) Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci* 23, 74-79.

Nakagawa T. and Yuan J. (2000) Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J. Cell Biol.* 150, 887-894.

Nakagawa T., Zhu H., Morishima N., Li E., Xu J., Yankner B. A. and Yuan J. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403, 98-103.

Naldini L., Blomer U., Gallay P., Ory D., Mulligan R., Gage F. H., Verma I. M. and Trono D. (1996) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263-267.

Namura S., Zhu J., Fink K., Endres M., Srinivasan A., Tomaselli K. J., Yuan J. and Moskowitz M. A. (1998) Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 18, 3659-3668.

Ni B., Wu X., Su Y., Stephenson D., Smalstig E. B., Clemens J. and Paul S. M. (1998) Transient global forebrain ischemia induces a prolonged expression of the caspase-3 mRNA in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 18, 248-256.

Nicholls D. and Attwell D. (1990) The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol. Sci.* 11, 462-468.

NINDS, Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA stroke study group, *N Engl J Med* 333 (1995), pp. 1581–1587

Novoa I., Zeng H., Harding H. P. and Ron D. (2001) Feedback Inhibition of the Unfolded Protein Response by GADD34-mediated Dephosphorylation of eIF2{alpha}. *J. Cell Biol.* 153, 1011-1022.

Ohtani T., Nakamura T., Toda K. i. and Furukawa F. (2006) Cyclophosphamide enhances TNF-[alpha]-induced apoptotic cell death in murine vascular endothelial cell. *FEBS Letters* 580, 1597-1600.

Olivari S., Galli C., Alanen H., Ruddock L. and Molinari M. (2005) A novel stress-induced EDEM variant regulating endoplasmic reticulum-associated glycoprotein degradation. *J Biol Chem.* 280, 2424-2428.

Overgaard K. (1994) Thrombolytic therapy in experimental embolic stroke. *Cerebrovasc. Brain Metab Rev* 6, 257-286.

Oyadomari S. and Mori M. (2004) Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death. Differ.* 11, 381-389.

Pabo C. O. and Sauer R. T. (1992) Transcription Factors: Structural Families and Principles of DNA Recognition. *Annual Review of Biochemistry* 61, 1053-1095.

Papa S., Bubici C., Pham C. G., Zazzeroni F. and Franzoso G. (2005) NF-[kappa]B meets ROS: an 'iron-ic' encounter. *Cell Death Differ* 12, 1259-1262.

Parker M. W., Chen Y., Hallenbeck J. M. and Ford B. D. (2002) Neuregulin expression after focal stroke in the rat. *Neuroscience Letters* 334, 169-172.

Paschen W., Aufenberg C., Hotop S. and Mengesdorf T. (2003) Transient cerebral ischemia activates processing of xbp1 messenger RNA indicative of endoplasmic reticulum stress. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 23, 449-461.

Paschen W. and Mengesdorf T. (2005) Endoplasmic reticulum stress response and neurodegeneration. *Cell Calcium* 38, 409-415.

Patel A. J. and Hunt A. (1985) Observations on cell growth and regulation of glutamine synthetase by dexamethasone in primary cultures of forebrain and cerebellar astrocytes. *Brain Res.* 350, 175-184.

Plempner R. K. and Wolf D. H. (1999) Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends in Biochemical Sciences* 24, 266-270.

Plesnila N., Zinkel S., Le D. A., Amin-Hanjani S., Wu Y., Qiu J., Chiarugi A., Thomas S. S., Kohane D. S., Korsmeyer S. J. and Moskowitz M. A. (2001) BID mediates neuronal cell death after oxygen/ glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 15318-15323.

Pradillo J. M., Romera C., Hurtado O., Cardenas A., Moro M. A., Leza J. C., Davalos A., Castillo J., Lorenzo P. and Lizasoain I. (2005) TNFR1 upregulation mediates tolerance after brain ischemic preconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab* 25, 193-203.

Pulsinelli W. A. and Brierley J. B. (1979) A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 10, 267-272.

Pulsinelli W. A. and Buchan A. M. (1988) The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke* 19, 913-914.

Rabuffetti M., Sciorati C., Tarozzo G., Clementi E., Manfredi A. A. and Beltramo M. (2000) Inhibition of caspase-1-like activity by Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-chloromethyl ketone induces long-lasting neuroprotection in cerebral ischemia through apoptosis reduction and decrease of proinflammatory cytokines. *J. Neurosci.* 20, 4398-4404.

Rami A., Langhagen A. and Steiger S. (2008) Focal cerebral ischemia induces upregulation of Beclin 1 and autophagy-like cell death. *Neurobiology of Disease* 29, 132-141.

Rao L., Perez D. and White E. (1996) Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J. Cell Biol.* 135, 1441-1455.

Rao R. V., Ellerby H. M. and Bredesen D. E. (2004) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death. Differ.* 11, 372-380.

Rao R. V., Hermel E., Castro-Obregon S., del R. G., Ellerby L. M., Ellerby H. M. and Bredesen D. E. (2001) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J. Biol. Chem.* 276, 33869-33874.

Rehncrona S. (1985) Brain acidosis. *Annals of Emergency Medicine* 14, 770-776.

Rickhag M., Wieloch T., Gido G., Elmer E., Krogh M., Murray J., Lohr S., Bitter H., Chin D. J., von S. D., Shamloo M. and Nikolich K. (2006) Comprehensive regional and temporal gene expression profiling of the rat brain during the first 24 h after

experimental stroke identifies dynamic ischemia-induced gene expression patterns, and reveals a biphasic activation of genes in surviving tissue. *J Neurochem.* 96, 14-29.

Rickhag M., Teilmann M. and Wieloch T. (2007) Rapid and long-term induction of effector immediate early genes (BDNF, Neurturin and Arc) in peri-infarct cortex and dentate gyrus after ischemic injury in rat brain. *Brain Research* 1151, 203-210.

Roberts G. G., Di Loreto M. J., Marshall M., Wang J. and DeGracia D. J. (2007) Hippocampal cellular stress responses after global brain ischemia and reperfusion. *Antioxid. Redox. Signal.* 9, 2265-2275.

Robinson M. J., Macrae I. M., Todd M., Reid J. L. and McCulloch J. (1990) Reduction of local cerebral blood flow to pathological levels by endothelin-1 applied to the middle cerebral artery in the rat. *Neuroscience Letters* 118, 269-272.

Romera C., Hurtado O., Botella S. H., Lizasoain I., Cardenas A., Fernandez-Tome P., Leza J. C., Lorenzo P. and Moro M. A. (2004) In vitro ischemic tolerance involves upregulation of glutamate transport partly mediated by the TACE/ADAM17-tumor necrosis factor-alpha pathway. *J Neurosci.* 24, 1350-1357.

Rosenberg G. A., Cunningham L. A., Wallace J., Alexander S., Estrada E. Y., Grossetete M., Razhagi A., Miller K. and Gearing A. (2001) Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases in reperfusion injury to rat brain: activation of MMP-9 linked to stromelysin-1 and microglia in cell cultures. *Brain Research* 893, 104-112.

Rossi D. J., Oshima T. and Attwell D. (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403, 316-321.

Rothe M., Pan M. G., Henzel W. J., Ayres T. M. and Goeddel D. V. (1995a) The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 83, 1243-1252.

Rothe M., Sarma V., Dixit V. M. and Goeddel D. V. (1995b) TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* 269, 1424-1427.

Rothe M., Wong S. C., Henzel W. J. and Goeddel D. V. (1994) A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 78, 681-692.

Roy B. and Lee A. S. (1999) The mammalian endoplasmic reticulum stress response element consists of an evolutionarily conserved tripartite structure and interacts with a novel stress-inducible complex. *Nucl. Acids Res.* 27, 1437-1443.

Roy N., Deveraux Q. L., Takahashi R., Salvesen G. S. and Reed J. C. (1997) The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* 16, 6914-6925.

Saido T. C., Sorimachi H. and Suzuki K. (1994) Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological- pathological involvement. *FASEB J.* 8, 814-822.

Sakahira H., Enari M. and Nagata S. (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391, 96-99.

Scaffidi C., Schmitz I., Zha J., Korsmeyer S. J., Krammer P. H. and Peter M. E. (1999) Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J. Biol. Chem.* 274, 22532-22538.

Schubert P., Morino T., Miyazaki H., Ogata T., Nakamura Y., Marchini C. and Ferroni S. (2000) Cascading glia reactions: a common pathomechanism and its differentiated control by cyclic nucleotide signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 903, 24-33.

Schuchmann S. and Heinemann U. (2000) Increased mitochondrial superoxide generation in neurons from trisomy 16 mice: a model of Down's syndrome. *Free Radic. Biol Med.* 28, 235-250.

Schwab B. L., Guerini D., Didszun C., Bano D., Ferrando-May E., Fava E., Tam J., Xu D., Xanthoudakis S., Nicholson D. W., Carafoli E. and Nicotera P. (2002) Cleavage of plasma membrane calcium pumps by caspases: a link between apoptosis and necrosis. *Cell Death. Differ.* 9, 818-831.

Shen J., Chen X., Hendershot L. and Prywes R. (2002) ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev. Cell* 3, 99-111.

Shibata M., Hattori H., Sasaki T., Gotoh J., Hamada J. and Fukuuchi Y. (2003) Activation of caspase-12 by endoplasmic reticulum stress induced by transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Neuroscience* 118, 491-499.

Shohami E., Ginis I. and Hallenbeck J. M. (1999) Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 10, 119-130.

Shuaib A., Lees K. R., Lyden P., Grotta J., Davalos A., Davis S. M., Diener H. C., Ashwood T., Wasiewski W. W. and Emeribe U. (2007) NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke. *N. Engl. J Med.* 357, 562-571.

Smith C. A., Farrah T. and Goodwin R. G. (1994) The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: Activation, costimulation, and death. *Cell* 76, 959-962.

Smith M. L., Auer R. N. and Siesjo B. K. (1984a) The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2-10 min of forebrain ischemia. *Acta Neuropathol.* 64, 319-332.

Smith M. L., Bendek G., Dahlgren N., Rosen I., Wieloch T. and Siesjo B. K. (1984b) Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. *Acta Neurol. Scand.* 69, 385-401.

Srinivasan A., Li F., Wong A., Kodandapani L., Smidt R., Jr., Krebs J. F., Fritz L. C., Wu J. C. and Tomaselli K. J. (1998) Bcl-xL functions downstream of caspase-8 to inhibit Fas- and tumor necrosis factor receptor 1-induced apoptosis of MCF7 breast carcinoma cells. *J Biol Chem* 273, 4523-4529.

Stennicke H. R., Jurgensmeier J. M., Shin H., Deveraux Q., Wolf B. B., Yang X., Zhou Q., Ellerby H. M., Ellerby L. M., Bredesen D., Green D. R., Reed J. C., Froelich C. J. and Salvesen G. S. (1998) Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J. Biol. Chem.* 273, 27084-27090.

Stennicke H. R. and Salvesen G. S. (1998) Properties of the caspases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1387, 17-31.

Struhl K. (1989) Helix-turn-helix, zinc-finger, and leucine-zipper motifs for eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Trends Biochem Sci* 14, 137-140.

Tajiri S., Oyadomari S., Yano S., Morioka M., Gotoh T., Hamada J. I., Ushio Y. and Mori M. (2004) Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP. *Cell Death. Differ.* 11, 403-415.

Tamatani M., Che Y. H., Matsuzaki H., Ogawa S., Okado H., Miyake S., Mizuno T. and Tohyama M. (1999) Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NFkappaB activation in primary hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 274, 8531-8538.

Tang G., Yang J., Minemoto Y. and Lin A. (2001) Blocking caspase-3-mediated proteolysis of IKKbeta suppresses TNF-alpha-induced apoptosis. *Mol. Cell* 8, 1005-1016.

Tang Y., Pacary E., Freret T., Divoux D., Petit E., Schumann-Bard P. and Bernaudin M. (2006) Effect of hypoxic preconditioning on brain genomic response before and following ischemia in the adult mouse: identification of potential neuroprotective candidates for stroke. *Neurobiol. Dis.* 21, 18-28.

Taoufik E., Valable S., Muller G. J., Roberts M. L., Divoux D., Tinel A., Voulgari-Kokota A., Tseveleki V., Altruda F., Lassmann H., Petit E. and Probert L. (2007) FLIPL Protects Neurons against In Vivo Ischemia and In Vitro Glucose Deprivation-Induced Cell Death. *J. Neurosci.* 27, 6633-6646.

Towbin H., Staehelin T. and Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 76, 4350-4354.

Tracey K. J. and Cerami A. (1994) Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu. Rev. Med.* 45, 491-503.

Tzingounis A. V. and Nicoll R. A. (2006) Arc/Arg3.1: Linking Gene Expression to Synaptic Plasticity and Memory. *Neuron* 52, 403-407.

Urano F., Wang X., Bertolotti A., Zhang Y., Chung P., Harding H. P. and Ron D. (2000) Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1. *Science* 287, 664-666.

Van de C. M., Van L. G., Pype S., Van C. W., Van d. b., I, Molemans F., Fiers W., Declercq W. and Vandenabeele P. (1998) Identification of a new caspase homologue: caspase-14. *Cell Death. Differ.* 5, 838-846.

van Loo G., Saelens X., van Gurp M., MacFarlane M., Martin S. J. and Vandenabeele P. (2002) The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death. Differ.* 9, 1031-1042.

Vandenabeele P., Declercq W., Beyaert R. and Fiers W. (1995) Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends in Cell Biology* 5, 392-399.

Velier J. J., Ellison J. A., Kikly K. K., Spera P. A., Barone F. C. and Feuerstein G. Z. (1999) Caspase-8 and caspase-3 are expressed by different populations of cortical neurons undergoing delayed cell death after focal stroke in the rat. *J. Neurosci.* 19, 5932-5941.

Vercammen D., Beyaert R., Denecker G., Goossens V., Van Loo G., Declercq W., Grooten J., Fiers W. and Vandenabeele P. (1998a) Inhibition of Caspases Increases the Sensitivity of L929 Cells to Necrosis Mediated by Tumor Necrosis Factor. *J. Exp. Med.* 187, 1477-1485.

Vercammen D., Brouckaert G., Denecker G., Van de Craen M., Declercq W., Fiers W. and Vandenabeele P. (1998b) Dual Signaling of the Fas Receptor: Initiation of Both Apoptotic and Necrotic Cell Death Pathways. *J. Exp. Med.* 188, 919-930.

Vinson C. R., Sigler P. B. and McKnight S. L. (1989) Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science* 246, 911-916.

Wajant H., Pfizenmaier K. and Scheurich P. (2001) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10, 45-65.

Wang X., Feuerstein G. Z., Xu L., Wang H., Schumacher W. A., Ogletree M. L., Taub R., Duan J. J. W., Decicco C. P. and Liu R. Q. (2004) Inhibition of Tumor Necrosis Factor- α -Converting Enzyme by a Selective Antagonist Protects Brain from Focal Ischemic Injury in Rats. *Mol Pharmacol* 65, 890-896.

Watson B. D., Dietrich W. D., Busto R., Wachtel M. S. and Ginsberg M. D. (1985) Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann. Neurol.* 17, 497-504.

Weisblum B. and Haenssler E. (1974) Fluorometric properties of the bibenzimidazole derivative Hoechst 33258, a fluorescent probe specific for AT concentration in chromosomal DNA. *Chromosoma* 46, 255-260.

Welsh F. A., Sakamoto T., McKee A. E. and Sims R. E. (1987) Effect of lactacidosis on pyridine nucleotide stability during ischemia in mouse brain. *J Neurochem.* 49, 846-851.

Wen Y. D., Sheng R., Zhang L. S., Han R., Zhang X., Zhang X. D., Han F., Fukunaga K. and Qin Z. H. (2008) Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways. *Autophagy*. 4, 762-769.

Xu Z. and Ford B. D. (2005) Upregulation of erbB receptors in rat brain after middle cerebral arterial occlusion. *Neurosci. Lett.* 375, 181-186.

Yakubov E., Gottlieb M., Gil S., Dinerman P., Fuchs P. and Yavin E. (2004) Overexpression of genes in the CA1 hippocampus region of adult rat following episodes of global ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* 127, 10-26.

Yang L., Lindholm K., Konishi Y., Li R. and Shen Y. (2002) Target depletion of distinct tumor necrosis factor receptor subtypes reveals hippocampal neuron death and survival through different signal transduction pathways. *J. Neurosci.* 22, 3025-3032.

Yang X., Chang H. Y. and Baltimore D. (1998) Essential Role of CED-4 Oligomerization in CED-3 Activation and Apoptosis. *Science* 281, 1355-1357.

Ye J., Rawson R. B., Komuro R., Chen X., Dave U. P., Prywes R., Brown M. S. and Goldstein J. L. (2000) ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell* 6, 1355-1364.

Yin X. M., Luo Y., Cao G., Bai L., Pei W., Kuharsky D. K. and Chen J. (2002) Bid-mediated mitochondrial pathway is critical to ischemic neuronal apoptosis and focal cerebral ischemia. *J. Biol. Chem.* 277, 42074-42081.

Yoneda T., Imaizumi K., Oono K., Yui D., Gomi F., Katayama T. and Tohyama M. (2001) Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J. Biol. Chem.* 276, 13935-13940.

Yoshida H., Matsui T., Yamamoto A., Okada T. and Mori K. (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107, 881-891.

Zhang L., Zhang Z. G., Zhang C., Zhang R. L. and Chopp M. (2004) Intravenous Administration of a GPIIb/IIIa Receptor Antagonist Extends the Therapeutic Window of Intra-Arterial Tenecteplase-Tissue Plasminogen Activator in a Rat Stroke Model. *Stroke* 35, 2890-2895.

Zhang S. Q., Kovalenko A., Cantarella G. and Wallach D. (2000) Recruitment of the IKK Signalingosome to the p55 TNF Receptor: RIP and A20 Bind to NEMO (IKK[gamma]) upon Receptor Stimulation. *Immunity* 12, 301-311.

Zhang W. H., Wang X., Narayanan M., Zhang Y., Huo C., Reed J. C. and Friedlander R. M. (2003) Fundamental role of the Rip2/caspase-1 pathway in hypoxia and ischemia-induced neuronal cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 16012-16017.

Zhao X., Bausano B., Pike B. R., Newcomb-Fernandez J. K., Wang K. K., Shohami E., Ringger N. C., DeFord S. M., Anderson D. K. and Hayes R. L. (2001) TNF-alpha stimulates caspase-3 activation and apoptotic cell death in primary septo-hippocampal cultures. *J Neurosci. Res* 64, 121-131.

Zheng L., Bidere N., Staudt D., Cubre A., Orenstein J., Chan F. K. and Lenardo M. (2006) Competitive Control of Independent Programs of Tumor Necrosis Factor Receptor-Induced Cell Death by TRADD and RIP1. *Mol. Cell. Biol.* 26, 3505-3513.

Zhu C., Wang X., Xu F., Bahr B. A., Shibata M., Uchiyama Y., Hagberg H. and Blomgren K. (2005) The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia. *Cell Death Differ* 12, 162-176.

Zinszner H., Kuroda M., Wang X., Batchvarova N., Lightfoot R. T., Remotti H., Stevens J. L. and Ron D. (1998) CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 12, 982-995.

VIII - ANEXO

Contribuciones más relevantes a congresos

Autores: Nahuai Badiola, Cristina Malagelada, Bruna Barneda, Rut Fado, Josefa Sabriá y José Rodríguez

Título: Papel del TNF alfa en la muerte apoptótica provocada por privación de oxígeno y glucosa (OGD)

Tipo de participación: Poster

Congreso: XI Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia (SENC)

Lugar celebración: Torremolinos (Malaga) **Fecha:** 15-18 septiembre del 2005

Autores: Nahuai Badiola, Cristina Malagelada, Juan Hidalgo, Josefa Sabriá y José Rodríguez

Título: Activation of caspase-8 by Tumor Necrosis Factor Receptor 1 (TNFR1) is necessary for OGD-mediated apoptosis in cultured cortical neurons

Tipo de participación: Poster

Congreso: 5th Forum of European Neuroscience (FENS Forum)

Lugar celebración: Viena **Fecha:** 8-12 de Julio del 2006

Autores: Nahuai Badiola, Cristina Malagelada, Juan Hidalgo, Josefa Sabriá y José Rodríguez

Título: The role of TNF-alpha in apoptotic death in a *in vitro* model of ischemia

Tipo de participación: Poster

Congreso: 13th Euroconference on Apoptosis (ECDO)

Lugar celebración: Chia (Cerdeña) **Fecha:** 29 de septiembre al 4 de octubre del 2006

Autores: Nahuai Badiola, Cristina Malagelada, Juan Hidalgo, Josefa Sabriá y José Rodríguez

Título: Papel del TNF alfa en la muerte apoptótica en un modelo de isquemia cerebral *in vitro*

Tipo de participación: Presentación oral

Congreso: VIII Reunión de la APORED

Lugar celebración: Begur (Girona) **Fecha:** 4-7 de febrero del 2007

Autores: Nahuai Badiola, Clara Penas, Bruna Barneda, Rut Fado, Alfredo Miñano, Josefa Sabriá, Caty Casas y José Rodríguez-Alvarez

Título: Study of endoplasmic reticulum stress in a brain ischemia *in vitro* model

Tipo de participación: Poster

Congreso: 6th Forum of European Neuroscience (FENS Forum)

Lugar celebración: Ginebra **Fecha:** 12-16 de Julio del 2008

Artículos y capítulos publicados

Gozzelino R, Sole C, Llecha N, Segura MF, Moubarak RS, Iglesias-Guimaraes V, Perez-Garcia MJ, Reix S, Zhang J, **Badiola N**, Sanchis D, Rodriguez-Alvarez J, Trullas R, Yuste VJ, Comella JX. BCL-XL regulates TNF-alpha-mediated cell death independently of NF-kappaB, FLIP and IAPs. *Cell Res*. 2008 Oct;18(10):1020-36.

Badiola N, Segura M.F, Comella J.X, Rodríguez-Alvarez J. Receptores de muerte e isquemia cerebral. *Fisiopatología de la isquemia cerebral* (2008).

Segura MF, Sole C, Pascual M, Moubarak RS, Perez-Garcia MJ, Gozzelino R, Iglesias V, **Badiola N**, Bayascas JR, Llecha N, Rodriguez-Alvarez J, Soriano E, Yuste VJ, Comella JX. The long form of Fas apoptotic inhibitory molecule is expressed specifically in neurons and protects them against death receptor-triggered apoptosis. *J Neurosci*. 2007 Oct 17;27(42): 11228-41.

Malagelada C, Xifró X, **Badiola N**, Sabrià J, Rodríguez-Alvarez J. Histamine H2-receptor antagonist ranitidine protects against neural death induced by oxygen-glucose deprivation. *Stroke*. 2004 Oct;35(10):2396-401.

Artículos enviados o en preparación

Badiola N*, Malagelada C*, Llecha N, Hidalgo J, Comella JX, Sabrià J, Rodríguez-Álvarez J. Activation of caspase-8 by tumor necrosis factor receptor 1 is necessary for OGD-mediated caspase-3 activation and apoptosis in cultured cortical cells. *Neurobiology of Disease* (Enviado).
(*co-autors)

Badiola N, Penas C, Barneda B, Fado R, Miñano A, Comella JX, Sabrià J, Blomgren K, Casas K, Rodríguez-Álvarez. Induction of ER stress in response to oxygen-glucose deprivation of cortical cultures involves the activation of PERK and IRE-1 pathways and caspase-12. *Cell Death and Differentiation* (Enviado).

Barneda B, Miñano A, **Badiola N**, Fado R, Xifró X, Saura C, Rodríguez-Álvarez. Bone Morphogenetic Protein-6 Promotes Cerebellar Granule Neurons Survival by Activation of the MEK/ERK/CREB Pathway. *JBC* (Enviado).

Badiola N, Barneda B, Fado R, Miñano A, Sabrià J, Rodríguez-Álvarez. Gene expression analysis in mixed cortical cultures subjected to an oxygen and glucose deprivation (OGD). (En preparación)