

**EL COMPLEJO MDM2-P53 ES
ESENCIAL EN LA TOLERANCIA
ISQUÉMICA NEURONAL INDUCIDA
POR EL PRECONDICIONAMIENTO**

Tesis Doctoral
Rebeca Vecino Pérez

Salamanca 2019





EL COMPLEJO MDM2-P53 ES ESENCIAL EN LA TOLERANCIA ISQUÉMICA NEURONAL INDUCIDA POR EL PRECONDICIONAMIENTO

REBECA VECINO PÉREZ

DIRECTORES:

PROF. DR. JUAN PEDRO BOLAÑOS HERNÁNDEZ

PROF^a. DR^a. ÁNGELES ALMEIDA PARRA

PROF^a. DR^a. MARÍA DELGADO ESTEBAN

SALAMANCA, 2019

Dr. Juan Pedro Bolaños Hernández, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca; Dra. Ángeles Almeida Parra, Jefe del Grupo Neurobiología Molecular del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL. Hospital Universitario de Salamanca, Universidad de Salamanca, CSIC) y del Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG. Universidad de Salamanca, CSIC) y Profesora Asociada del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca y Dra. María Delgado Esteban, Investigadora Miguel Servet I del IBSAL y Profesora Asociada del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca

CERTIFICAN:

Que el trabajo doctoral realizado bajo su dirección por D^ª Rebeca Vecino Pérez, titulado **“El complejo MDM2-p53 es esencial en la tolerancia isquémica neuronal asociada al preconditionamiento”**, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de doctor por la Universidad de Salamanca y autorizan su presentación.

Y para que así conste, firman la presente certificación en Salamanca, a 27 de Junio de 2019.



Fdo. Juan Pedro Bolaños Hernández

Fdo. Ángeles Almeida Parra

Fdo. María Delgado Esteban

Parte de los resultados expuestos en la presente Memoria han sido:

Presentados en Congresos Nacionales e Internacionales, desde el año 2015 hasta la actualidad.

Publicados en:

Vecino R., Burguete M. C., Jover-Mengual T., Agulla J., Bobo-Jiménez V., Salom J. B., Almeida A. and Delgado-Esteban M. (2018). “The MDM2-p53 pathway is involved in preconditioning-induced neuronal tolerance to ischemia”. *Scientific Reports*, 8(1), 1610.

Ramos-Araque M. E., Rodríguez C., **Vecino R.**, Cortijo García E., de Lera Alfonso M., Sánchez Barba M., Colàs-Campàs L., Purroy F., Arenillas J. F., Almeida A., Delgado-Esteban, M. (2019). “The Neuronal Ischemic Tolerance Is Conditioned by the Tp53 Arg72Pro Polymorphism”. *Translational Stroke Research*, 10(2), 204–215.



Este trabajo ha sido financiado con subvenciones concedidas por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, a través de una ayuda para la formación de profesorado universitario (FPU; BOE A-2015-12849); así como una ayuda para financiar la contratación predoctoral de personal investigador de la Junta de Castilla y León (ORDEN EDU/128/2015). Asimismo, este trabajo se ha financiado mediante los proyectos del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (SAF 2013-41177-R, SAF 2016-78114-R); el Instituto de Salud Carlos III (CP0014/00010, PI12/00685, PI15/00473, RD16/0019/0018); la Junta de Castilla y León (BIO/SA35/15) y los fondos FEDER (*European regional development funding*).

INDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	
1. PRECONDICIONAMIENTO Y TOLERANCIA ISQUÉMICA CEREBRAL	7
1.1. PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO	8
1.2. DURACIÓN DE LA TOLERANCIA ISQUÉMICA ASOCIADA AL CONDICIONAMIENTO.....	9
1.3. FACTORES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA DE TOLERANCIA ASOCIADA AL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO	10
1.3.1. NATURALEZA DEL ESTIMULO	10
1.3.2. PERIODO DE APLICACIÓN DEL CONDICIONAMIENTO	11
1.3.3. EL ENTORNO: LA RED NEUROVASCULAR EN LA TOLERANCIA ISQUÉMICA	13
1.4. MECANISMOS MOLECULARES EN LA TI ASOCIADA AL PRECONDICIONAMIENTO	15
2. EL ICTUS	18
2.1. FISIOPATOLOGÍA DEL ICTUS ISQUÉMICO	19
2.1.1. CONCEPTOS DE NÚCLEO ISQUÉMICO Y PENUMBRA.....	20
2.1.2. MECANISMOS MOLECULARES DEL ICTUS ISQUÉMICO	21
2.2. INFLUENCIA DE LA GENÉTICA EN EL ICTUS	29
2.2.1. VARIABILIDAD GENÉTICA EN EL PRONÓSTICO FUNCIONAL TRAS EL ICTUS	31
3. LA PROTEÍNA p53 EN LA ISQUEMIA CEREBRAL	32
3.1. ESTRUCTURA DE p53.....	33
3.2. FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE p53	35
3.2.1. APOPTOSIS MEDIADA POR p53	37
3.3. ACTIVACIÓN Y REGULACIÓN DE p53.....	40
3.3.1. ESTABILIZACIÓN DE p53 POR MECANISMOS POSTRADUCCIONALES	40
3.3.2. DEGRADACIÓN DE p53 POR MECANISMOS POSTRADUCCIONALES.....	41
3.3.3. LA E3-UBIQUITINA LIGASA MDM2 COMO PRINCIPAL REGULADOR NEGATIVO DE p53.	42
3.3.4. LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA PI3K/AKT EN LA REGULACIÓN DE p53.....	45
4. TOLERANCIA ISQUÉMICA NEURONAL EN EL PACIENTE CON ICTUS	48

4.1. TERAPIAS CLÍNICAS EN EL ICTUS ISQUÉMICO.....	48
4.2. TOLERANCIA ISQUÉMICA Y NEUROPROTECCIÓN EN LA CLÍNICA	49
4.3. EL ATAQUE ISQUÉMICO TRANSITORIO (AIT) COMO EJEMPLO DE PRECONDICIONAMIENTO EN PACIENTES.....	50

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS.....	54
2. OBJETIVOS.....	55

MATERIAL Y MÉTODOS

1. CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS.....	57
1.1. ESPECIES ENSAYADAS Y CONDICIONES DEL ANIMALARIO	57
1.2. CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS CORTICALES	58
1.3. IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA.....	60
1.3.1. Genotipado de p53.....	60
1.3.2. Genotipado del polimorfismo humano <i>Arg72Pro</i> de <i>Tp53</i>	61
1.3.3. Extracción del ADN en los ratones	61
1.3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	62
1.3.5. Electroforesis en gel de agarosa.....	63
2. LÍNEAS CELULARES	64
2.1. HEK-293T.....	64
3. MODELO DE ISQUEMIA EXPERIMENTAL <i>IN VITRO</i>	65
4. MODELOS DE PRECONDICIONAMIENTO <i>IN VITRO</i>	66
4.1. MODELO EXPERIMENTAL DE PRECONDICIONAMIENTO FARMACOLÓGICO....	66
4.1.1. Precondicionamiento neuronal e isquemia experimental (NMDA-PC + OGD)	67
4.1.2. Precondicionamiento neuronal (NMDA-PC).....	67
4.2. MODELO EXPERIMENTAL DE PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO	68
4.2.1. Precondicionamiento isquémico neuronal e isquemia experimental (IPC + OGD)	69
4.2.2. Precondicionamiento neuronal (IPC).....	69
5. TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS	70
6. TRANSFECCIONES CELULARES	70
6.1. SILENCIAMIENTO GÉNICO	70
6.2. TRANSFECCIONES CON PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN.....	71

7. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ANÁLISIS DE TRANSFERENCIA TIPO <i>WESTERN BLOT</i>	72
7.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	72
7.1.1. Extracción de proteínas totales	72
7.1.2. Fraccionamiento subcelular de proteínas	73
7.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS	75
7.3. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN SDS-PAGE	76
7.4. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR <i>WESTERN BLOT</i>	77
7.5. “ <i>STRIPPING</i> ” DE MEMBRANAS DE NITROCELULOSA	80
7.6. INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS	81
7.6.1. Unión del anticuerpo a las <i>Dynabeads</i> [®]	81
7.6.2. <i>Crosslinking</i>	81
7.6.3. Inmunoprecipitación con las <i>Dynabeads</i> [®]	82
8. DETERMINACIÓN DE LA APOPTOSIS NEURONAL POR CITOMETRÍA DE FLUJO	83
9. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA ($\Delta\Psi_m$) COMO ÍNDICE DE INTEGRIDAD MITOCONDRIAL	84
10. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA CASPASA 3	86
11. OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DEL RNA	87
11.1. EXTRACCIÓN DEL RNA TOTAL	87
11.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL O CUANTITATIVA (RT-qPCR)	88
12. INMUNOCITOQUÍMICA Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	90
13. MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL <i>IN VIVO</i>	92
14. MODELO DE PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i>	96
15. ESTUDIO CLÍNICO	97
15.1. POBLACIÓN DE PACIENTES	97
15.2. VARIABLES CLÍNICAS	98
15.3. GENOTIPADO DEL POLIMORFISMO <i>ARG72PRO</i> DE <i>TP53</i>	100
15.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	100
15.3.2. Electroforesis en gel de agarosa	101
16. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	102
RESULTADOS	
1. EL NMDA-PC PROMUEVE LA TOLERANCIA ISQUÉMICA A TRAVÉS DE LA DESESTABILIZACIÓN DE P53	105

1.1. EL NMDA-PC, PREVIENE LA APOPTOSIS INDUCIDA TRAS LA ISQUEMIA EXPERIMENTAL, PROMOVRIENDO LA NEUROPROTECCIÓN	106
1.2. EL NMDA-PC INDUCE LA DESESTABILIZACIÓN DE P53 A LAS 4 HORAS DE REOXIGENACIÓN TRAS LA ISQUEMIA EXPERIMENTAL	110
1.3. LA DELECCIÓN GENÉTICA DE P53 PREVIENE LA APOPTOSIS NEURONAL, LO QUE PROMUEVE LA TOLERANCIA NEURONAL FRENTE A LA ISQUEMIA	114
2. LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA MDM2-P53 ES LA RESPONSABLE DE LA TOLERANCIA ISQUÉMICA NEURONAL ASOCIADA AL PC FRENTE A LA ISQUEMIA	119
2.1. EL PRECONDICIONAMIENTO AUMENTA LOS NIVELES DE MDM2, LO QUE PROMUEVE LA DESESTABILIZACIÓN NUCLEAR Y CITOSÓLICA DE P53 TRAS LA ISQUEMIA	119
2.2. EL PRECONDICIONAMIENTO FAVORECE LA INTERACCIÓN MDM2-P53, LO QUE PREVIENE LA ESTABILIZACIÓN DE P53 INDUCIDA TRAS LA ISQUEMIA	124
2.3. LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LA INTERACCIÓN ENTRE MDM2 Y P53 EVITA LA NEUROPROTECCIÓN ASOCIADA AL PRECONDICIONAMIENTO FRENTE A LA ISQUEMIA	127
3. EL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO ACTIVA LA VÍA DE SUPERVIVENCIA PI3K/AKT PROMOVRIENDO LA TOLERANCIA ISQUÉMICA NEURONAL.....	135
3.1. EL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO FAVORECE EL AUMENTO DEL COMPLEJO MDM2-P53, LO QUE PREVIENE LA ACTIVACIÓN DE LA CASPASA-3 Y LA APOPTOSIS NEURONAL INDUCIDAS TRAS LA ISQUEMIA	136
3.2. EL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO INDUCE LA FOSFORILACIÓN TEMPRANA Y TRANSITORIA DE AKT, LO QUE PROMUEVE LA ESTABILIZACIÓN, FOSFORILACIÓN Y SUBSIGUIENTE TRANSLOCACIÓN NUCLEAR DE MDM2.....	140
3.3. TANTO LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LA VÍA PI3K/AKT, COMO EL SILENCIAMIENTO GÉNICO DE LA PROTEÍNA AKT, PREVIENEN LA NEUROPROTECCIÓN ASOCIADA AL PRECONDICIONAMIENTO FRENTE A LA ISQUEMIA	146
3.4. LA INHIBICIÓN DE LA VÍA PI3K/AKT EVITA LA TRANSLOCACIÓN NUCLEAR DE MDM2 INDUCIDA POR EL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO EN NEURONAS CORTICALES DE RATÓN QUE EXPRESAN ECTÓPICAMENTE LA PROTEÍNA MDM2 HUMANA.....	153
4. EL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO <i>IN VIVO</i> INDUCE EL AUMENTO DE LOS NIVELES DE LA PROTEÍNA MDM2 Y LA DESESTABILIZACIÓN DE P53, ATENUANDO EL CRECIMIENTO DEL VOLÚMEN DE INFARTO CEREBRAL TRAS LA ISQUEMIA.....	158
4.1. EL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO, <i>IN VIVO</i> , ATENÚA EL CRECIMIENTO DEL TAMAÑO DEL INFARTO CEREBRAL TRAS LA ISQUEMIA.....	158
4.2. EL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO, <i>IN VIVO</i> , AUMENTA LOS NIVELES DE MDM2 E INDUCE LA DESESTABILIZACIÓN DE P53 TRAS LA ISQUEMIA.....	160

5. EL POLIMORFISMO HUMANO TP53 ARG72PRO MODULA LA NEUROPROTECCIÓN ASOCIADA AL PRECONDICIONAMIENTO EN RESPUESTA A LA ISQUEMIA. RELEVANCIA EN EL AIT	162
5.1. EL PRECONDICIONAMIENTO PROMUEVE LA DESESTABILIZACIÓN DE P53 EN NEURONAS QUE EXPRESAN LA VARIANTE POLIMÓRFICA PRO72-P53, PERO NO EN AQUELLAS QUE EXPRESAN ARG72-P53, TRAS LA ISQUEMIA	162
5.2. EL PC PROMUEVE LA DESESTABILIZACIÓN MITOCONDRIAL DE LA PROTEÍNA P53 Y LA DISMINUCIÓN DEL POTENCIAL DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL EN NEURONAS PRO72-P53, PERO NO EN NEURONAS ARG72-P43 INDUCIDAS TRAS LA ISQUEMIA	165
5.3. EL PRECONDICIONAMIENTO PROMUEVE LA TOLERANCIA ISQUÉMICA, EVITANDO LA ACTIVACIÓN DE LA CASPASA-3 Y LA APOPTOSIS EN NEURONAS PRO72-P53, PERO NO EN NEURONAS ARG72-P53, TRAS LA ISQUEMIA.....	168
5.4. EL AIT SE ASOCIA CON UN MEJOR PRONÓSTICO FUNCIONAL EN PACIENTES CON ICTUS ISQUÉMICO QUE EXPRESAN LA VARIANTE ALÉLICA PRO72, RESPECTO A AQUELLOS PACIENTES CON GENOTIPO ARG/ARG DE P53	171
5.4.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO GENERAL DE LA COHORTE DE PACIENTES QUE PRESENTAN O NO UN AIT PREVIO AL ICTUS ISQUÉMICO	172
5.4.2. EL POLIMORFISMO HUMANO ARG72PRO DE TP53 CONDICIONA EL PRONÓSTICO FUNCIONAL DE PACIENTES QUE HAN SUFRIDO UN AIT UN MES PREVIO AL ICTUS ISQUÉMICO	174

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

3-NP: Ácido 3-Nitropropiónico

7-AAD: 7-amino-actinomicina D

Ac-DEVD-AMC: Acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-metilcumarina

ACM: Arteria cerebral media

ACV: Accidente cerebrovascular

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AIT: Ataque isquémico transitorio

AMC: 7-amino-4-metilcumarina

AMPA: *Ácido* α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

AMPK: *AMP-activated protein kinase*

AP-1: *Activator protein 1*

Apaf-1: *Apoptosis protease-activating factor-1*

APOE: *Apolipoprotein E*

ARF: *ADP ribosylation factor*

ATM: *Ataxia-telangiectasia mutated protein kinase*

ATP: Adenosín trifosfato

ATR: *Ataxia telangiectasia and Rad3 related*

Bad: *Bcl-2 associated death promoter protein*

Bak: *Bcl-2 homologous antagonist killer*

Bax: *Bcl-2 associated X protein*

BCA: Ácido bicinconínico

Bcl-2: *B-cell lymphoma 2*

Bcl-xL: *B-cell lymphoma-extra large*

BDNF: *Brain-Derived Neurotrophic Factor*

BHE: Barrera hematoencefálica

Bid: *BH3 interacting-domain death agonist*

BSA: Albúmina sérica bovina

CCCP: Cianuro de carbonilo 3-clorofenilhidrazona

Cdk: *Cyclin-dependent-like kinase*

COX: *Cyclooxygenase*

CP: Perfusión cerebral

Ct: Ciclo umbral

CTD: Dominio C-terminal

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

DBD: Dominio de unión al DNA

DEPC: Di-etil piro-carbonato

DilC₁(5): 1,1',3,3,3',3'-hexametilindolcarbocianina

DIV: Días *in vitro*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

EDTA: Ácido etilen-di-amino-tetra- acético

eNOS: *Endothelial NOS*

FGF: *Fibroblast growth factor*

Fold: Unidades arbitrarias de expresión

GAPDH: *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

GDNF: *Glial cell-derived neurotrophic factor*

GFP: *Green fluorescent protein*

GWAS: *Genome-Wide Association Study*

HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution*

HIF-1: *Hypoxia Inducible Factor 1*

HSP: *Heat shock protein*

iNOS: *inducible nitric oxide synthase*

IPC: Precondicionamiento isquémico

kDa: Kilodalton

Ko: *Knock-out*

LPS: Lipopolisacárido

MAM: Medio de aislamiento mitochondrial

MAP-2: *Microtubule Associated Protein 2*

MDM2: *Murine doble minute 2*

mPTP: Poro de transición de permeabilidad mitochondrial

MRI: Resonancia magnética cerebral

mRNA: RNA mensajero

NES: Señal de exportación nuclear

NF- κ B: *Nuclear factor κ B*

NGF: *Nerve growth factor*

NIHSS: *National Institute of Health Stroke Scale*

NLS: Señal de localización nuclear

NMDA: N-Metil-D-Aspartato

NMDA-PC: Precondicionamiento con NMDA

NMDA-R: Receptor N-metil-D-aspartato

nNOS: *Neuronal NOS*

NOS: *nitric oxide synthase*

Nx: Normoxia

OGD: *Oxygen-Glucose Deprivation*

OMS: Organización mundial de la salud

OptiMEM: Medio mínimo esencial optimizado

pb: Pares de bases

PBS: Tampón fosfato salino

PC: Precondicionamiento

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDL: Poli-D-lisina

Per-C: Per-condicionamiento

PI3K: Fosfatidilinositol 3 kinasa

PIP2: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PIP3: Fosfatidilinositol (3,4,5) trisfosfato

PKB: *Protein kinase B*

Post-C: Post-condicionamiento

PRD: Dominio rico en prolina

PS: Fosfatidilserina

PSA: Persulfato sódico amónico

PTEN: *Phosphatase and tensin homolog*

PUMA: *p53 upregulated modulator of apoptosis*

RE's: Elementos de respuesta

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RIPA: Tampón para ensayo de radioinmunoprecipitación

RIPC: Precondicionamiento isquémico remoto

RNA: Ácido ribonucleico

RNS: Especies reactivas de nitrógeno

ROS: Especies reactivas de oxígeno

rt-PA: Activador tisular del plasminógeno humano recombinante

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

SDS: Dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: Electroforesis de poliacrilamida en presencia de SDS

SEA: Servicio de experimentación animal

S.E.M: Error estándar de la media

SEN: Sociedad Española de neurociencia

SF: Suero fetal

siRNA: RNA de interferencia

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*

TAD: Dominio de activación transcripcional

TAE/EDTA: Tris-Acetato-EDTA

TBS: Tampón tris salino

TC: Tomografía computarizada

TD: Dominio de tetramerización

TEMED: *N,N,N,N'*-tetrametilendiamina

TI: Tolerancia isquémica

TIGAR: *TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator*

TOAST: *Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment Subtype Classification*

TTBS: Tampón tris salino con tween 20

TTC: Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*

Wt: *Wild type*

YFP: Proteína amarilla fluorescente

$\Delta\Psi_m$: Potencial de membrana mitocondrial

Introducción

1. PRECONDICIONAMIENTO Y TOLERANCIA ISQUÉMICA CEREBRAL

La adaptación es uno de los mecanismos clave que permite, en condiciones ambientales extremas, la supervivencia de los seres vivos. Desde los pequeños microorganismos como las bacterias o las levaduras hasta los grandes mamíferos, incluido el ser humano, presentan diferentes estrategias fisiológicas innatas que les han permitido adaptarse a situaciones desfavorables. Una de las principales situaciones adversas a las que los organismos se enfrentan es el estrés metabólico. Dicha situación se produce por la ausencia de sustratos energéticos o la disminución de oxígeno celular, de forma parcial (hipoxia) o total (anoxia) (Lehotský et al., 2009). Para contrarrestar estos efectos potencialmente dañinos, los organismos desarrollan distintos mecanismos que engloban la disminución de la tasa metabólica, la expresión de chaperonas y proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins*; HSP) o la activación de sistemas de defensa antioxidante. En el cerebro y el corazón, estas adaptaciones resultan ser particularmente importantes, ya que son órganos especialmente sensibles al déficit energético.

En los mamíferos, el cerebro constituye el 3% de la masa corporal y consume hasta el 20% del oxígeno total, lo cual lo convierte en el órgano más vulnerable al daño hipóxico/isquémico (Clarke & Sokoloff, 1994). Por ello, a lo largo del tiempo, los organismos han desarrollado una amplia batería de respuestas adaptativas endógenas, con el fin de adquirir un “estado de resistencia” frente a la isquemia conocido como **tolerancia isquémica** (TI). Este estado de tolerancia intrínseca del organismo se induce en respuesta a diferentes estímulos de condicionamiento.

El **condicionamiento**, término que describe perfectamente el aforismo “*What doesn't kill you, makes you stronger*” citado por Friedrich Nietzsche, hace referencia al hecho de que un estímulo subtóxico, inferior al umbral de daño, es capaz de inducir una respuesta adaptativa en el organismo. Esta respuesta desencadena un estado de

resistencia o tolerancia endógena que lo protege frente a un posible daño letal. Así, el condicionamiento promueve la protección frente a un daño prolongado mediante la adopción de un fenotipo “tolerante” que se mantendrá durante un periodo de tiempo (Ulrich Dirnagl, Simon, & Hallenbeck, 2003; Gidday, 2006; Takaaki Kirino, 2002; YUNOKI et al., 2017).

1.1. PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO

El fenómeno de “**precondicionamiento**” (PC) surge en la década de los 60, siendo Aaron Janoff el primero en describirlo (Janoff, 1964). En los años posteriores, varios investigadores publicaron diversos trabajos donde observaban, en modelo *in vivo* de PC en rata, como los animales precondicionados adquirían la TI que les garantizaba una mayor supervivencia en respuesta a un daño anóxico. Fue en 1986 cuando se describe, por primera vez, el fenómeno de tolerancia frente a la isquemia en un modelo experimental de ratón. En este estudio, se sugirió la posible implicación de factores “anti-isquémicos” o mecanismos protectores inducidos tras el PC (Takahata & Shimoji, 1986). En ese mismo año, Murry y colaboradores describieron, en tejido cardiaco, el fenómeno de precondicionamiento isquémico (IPC). En este trabajo detallaban, por primera vez, como breves episodios simultáneos de oclusión/reperfusión coronaria previos a una isquemia prolongada y letal permitían la adaptación del tejido cardiaco al daño (Murry, Jennings, & Reimer, 1986). Este hecho destacó el potencial efecto cardioprotector de la TI, lo que abriría las puertas a la investigación en el desarrollo de técnicas novedosas en el tratamiento del infarto cardiaco, basadas en el PC (Cohen, Yang, & Downey, 1994).

Poco tiempo después, Kitagawa y colaboradores descubrieron la existencia de la TI en el cerebro y describieron cómo pequeños estímulos isquémicos previos confieren neuroprotección total frente al daño letal (K Kitagawa et al., 1990). Estos resultados se corroboraron posteriormente y se afianzó el papel neuroprotector del PC (Takaaki Kirino, Tsujita, & Tamura, 1991). Todos estos estudios descubrieron nuevas

trayectorias a seguir en la investigación de los mecanismos que subyacen a la tolerancia isquémica cerebral.

1.2. DURACIÓN DE LA TOLERANCIA ISQUÉMICA ASOCIADA AL CONDICIONAMIENTO

El condicionamiento desencadena una serie de respuestas adaptativas diferenciales, caracterizadas por los distintos intervalos temporales de inducción de tolerancia frente al daño. Así, se han descrito dos ventanas temporales de acción:

- **Rápida o a corto plazo:** conforma una ventana de neuroprotección rápida, cuya aparición se produce minutos después del condicionamiento y su duración se extiende entre 1-2 horas (Ulrich Dirnagl et al., 2003; Durukan & Tatlisumak, 2010; Gidday, 2006; Takaaki Kirino, 2002; Murry et al., 1986; M A Pérez-Pinzón et al., 1997; Miguel A Pérez-Pinzón, 2004; Stetler, Zhang, Liu, & Chen, 2008). Durante este proceso, se llevan a cabo cambios rápidos de permeabilidad de canales iónicos (receptores), reducción en la demanda energética neuronal, activación de sistemas de defensa antioxidante, así como modificaciones postraduccionales a nivel proteico y de su actividad.
- **Retardada o a largo plazo:** constituye una ventana de neuroprotección a largo plazo, apareciendo hasta 24 horas después del estímulo de condicionamiento y con una duración que puede mantenerse hasta una semana posterior (Ulrich Dirnagl et al., 2003; Durukan & Tatlisumak, 2010; Takaaki Kirino, 2002; Stetler et al., 2014, 2008). Este periodo de tolerancia se encuentra mediado por modificaciones epigenéticas y transcriptómicas, con la inducción de la expresión de diversos genes, así como la síntesis *de novo* de proteínas.

Entre ambas fases de TI se encuentra una ventana temporal donde la protección es reducida o nula, siendo un periodo de tiempo vulnerable a cualquier daño isquémico

que se produzca en él. Durante los últimos años, los esfuerzos se han centrado en prolongar la extensión de la ventana terapéutica en la medida de lo posible, a través de la optimización de las características que acompañan al condicionamiento.

1.3. FACTORES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA DE TOLERANCIA ASOCIADA AL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO

Durante la TI, se activan distintos mecanismos moleculares desencadenantes de la neuroprotección. Estos mecanismos vendrán determinados por la naturaleza y duración del estímulo condicionante, su periodo de aplicación, así como el entorno donde se desarrolla la tolerancia (Khoury, Koronowski, & Perez-Pinzon, 2016).

1.3.1. NATURALEZA DEL ESTIMULO

Los distintos modelos que utilizan estímulos condicionantes se caracterizan por su efectividad al recrear ambientes isquémicos sin un permanente daño neuronal. Diferencias en la intensidad, duración y frecuencia del estímulo conformarán las características básicas que permitirán la inducción de la protección. Ésta última dependerá de la adecuación del factor estimulante, pudiendo ser demasiado leve para inducir una respuesta, demasiado robusto y dañino, o lo suficientemente intenso para desencadenar un condicionamiento (Gidday, 2006).

El IPC es conocido por ser el prototipo de condicionamiento por excelencia. Desde su primera descripción en corazón y, posteriormente, en cerebro (K Kitagawa et al., 1990; Murry et al., 1986), su uso se ha extendido a gran variedad de modelos y tejidos. Esto ha permitido una mayor comprensión de las condiciones requeridas para inducir la tolerancia cerebral (N, Sangwan, Sharma, Majid, & GK, 2015). Aunque el empleo de la isquemia o hipoxia cerebral como estímulo condicionante prevalece como el modelo

más utilizado hasta la actualidad, la posibilidad de inducir TI se ha ampliado. La aplicación de estímulos endógenos o exógenos de diversa naturaleza, entre los que se encuentran la inducción de hipotermia, hipertermia, tratamientos anestésicos, químicos o farmacológicos (Tabla 1), es capaz de generar protección, lo que se conoce como **tolerancia cruzada**. La gran variedad de factores capaces de inducir un fenotipo resistente al daño es un indicativo de la convergencia final de las diversas vías de señalización en una serie de mecanismos que, en última instancia, conducirán a la protección celular (Gidday, 2006).

Isquemia global o focal

Agentes químicos y biológicos

Endotoxinas
Radicales libres
Agentes anestésicos
Lipopolisacáridos
Adenosina
Trombina
N-metil-D-aspartato (NMDA)
Ácido 3-Nitropropiónico (3NP)
Inhibidores de la ATPasa Na⁺/K⁺

Factores fisiológicos

Hipoxia
Isquemia
Inhibidores
metabólicos

Pequeños episodios de convulsión

Traumatismo leve

Oxígeno hiperbárico

Tabla 1. Estímulos utilizados en el PC cerebral

1.3.2. PERIODO DE APLICACIÓN DEL CONDICIONAMIENTO

A pesar de ser el “precondicionamiento” el término empleado más a menudo para referirse a la aplicación de un estímulo no nocivo inductor de tolerancia, cabe destacar otras formas de condicionamiento capaces de promover dicha protección (Esquema 1).

- **Precondicionamiento (PC)**

El PC se basa en la aplicación de un estímulo leve sobre una célula, tejido u organismo capaz de promover una respuesta protectora endógena frente a un daño letal posterior (Meller & Simon, 2013). El PC puede inducirse en la región donde se produce el daño (PC local) o puede desarrollarse sobre un órgano adyacente de mayor accesibilidad, como un brazo o una pierna, ejerciendo una protección remota sobre el órgano dañado. Este último, denominado precondicionamiento isquémico remoto (*remote ischemic preconditioning*; RIPC), presenta un gran potencial en la clínica gracias a la posibilidad de aplicar el estímulo condicionante en un órgano no vital y de menor riesgo que el propio órgano dañado (Che et al., 2019; Sangeetha et al., 2019; W. Zhao et al., 2018; A.-M. Zhou et al., 2004).

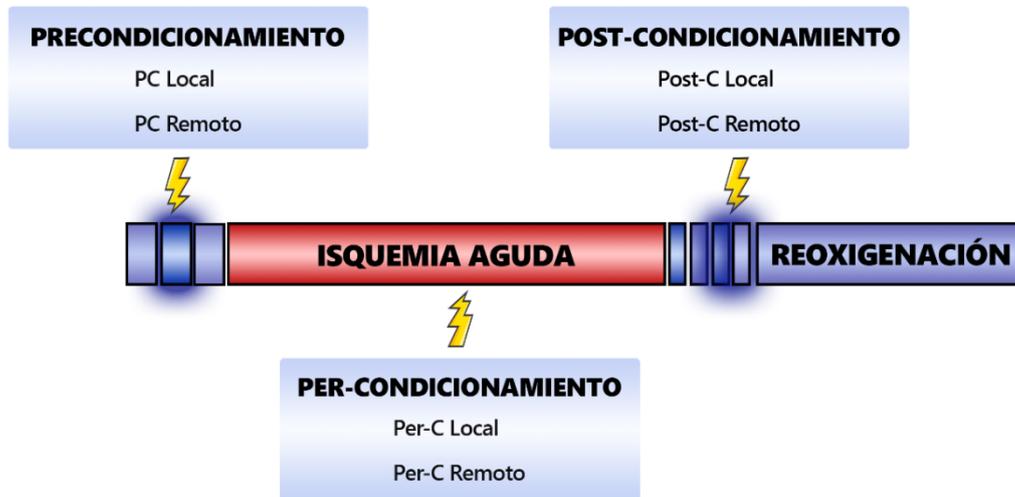
- **Per-condicionamiento (Per-C)**

Resulta de la aplicación de un estímulo no nocivo, durante el periodo de isquemia letal, con el fin de inducir una resistencia frente al daño. El tipo principal de per-condicionamiento es el llevado a cabo de forma remota (per-condicionamiento remoto), aplicando repeticiones de un estímulo isquémico leve, sobre un órgano distinto al dañado, durante el tiempo que transcurre el daño letal. El efecto del per-condicionamiento se ha observado en estudios de corazón, riñón o cerebro, donde la estimulación de una extremidad en el organismo promueve una reducción en el tamaño del área afectada (Hahn, Manlihot, Schmidt, Nielsen, & Redington, 2011; Landman, Schoon, Warlé, de Leeuw, & Thijssen, 2019).

- **Post-condicionamiento (Post-C)**

Se induce mediante la aplicación del estímulo condicionante durante el tiempo de reperusión tras el daño. Esta estrategia se basa principalmente en interrupciones breves del flujo sanguíneo en la etapa temprana de la reperusión, evitando el daño causado por ésta (Pignataro et al., 2008; Heng Zhao, Sapolsky, & Steinberg, 2006a). Sin embargo, no sólo breves periodos de isquemia tras el daño inducen tolerancia, sino que puede alcanzarse, además, a través de la aplicación de estímulos de distinta

naturaleza en un órgano diferente al órgano dañado (tolerancia cruzada), tal y como ocurre en el PC.



Esquema 1. Tipos de condicionamiento. La imagen muestra los principales tipos de condicionamiento: Precondicionamiento (PC); Per-condicionamiento (Per-C) y Post-condicionamiento (Post-C).

1.3.3. EL ENTORNO: LA RED NEUROVASCULAR EN LA TOLERANCIA ISQUÉMICA

Los estudios de TI realizados en modelos *in vitro* de las células que componen la Red Neurovascular, tales como las neuronas, las células gliales o las células endoteliales, han demostrado que la adquisición del fenotipo tolerante está relacionada con el PC. Además, esta protección celular ocurre sin la necesidad de que exista comunicación entre los distintos tipos celulares, ni la participación de las redes vasculares o los mediadores de acción sistémica (Kato, Araki, Murase, & Kogure, 1992; Lu, Yu, Li, Cui, & Gao, 2005). Sin embargo, la obtención de unos niveles óptimos de tolerancia en modelos *in vivo* requiere de una respuesta coordinada de cada célula implicada en la red neurovascular, así como de las células externas a ella (células musculares, inmunes...), consiguiéndose así la supervivencia del territorio dañado (Gidday, 2006).

- **Tolerancia mediada por el endotelio.**

Aunque la idea preconcebida de PC cerebral se asocia principalmente a las neuronas, el fenómeno de TI en los organismos abarca el territorio endotelial y las células musculares lisas, las cuáles contribuyen, en su conjunto, a los mecanismos moleculares inducidos durante la tolerancia *in vivo*.

Las células endoteliales son una parte principal de la barrera hematoencefálica (BHE), la cual resulta dañada en primera instancia tras la isquemia y reperfusión cerebral (del Zoppo & Hallenbeck, 2000). El incremento en la formación de microvasos, inducido por el PC, permite disminuir la reducción de flujo sanguíneo tras la isquemia y revertir la hipoperfusión del territorio cerebral (Nakamura et al., 2006). Esta protección vascular vendrá acompañada, además, de un característico fenotipo antiinflamatorio y la activación de vías anti-apoptóticas que dotarán al endotelio cerebral de la habilidad suficiente para protegerse de un daño posterior (Xiang et al., 2018).

- **Tolerancia mediada por la glía.**

Los astrocitos y la microglía residentes, al igual que las células vasculares, responden al PC y participan en la inducción del fenotipo tolerante (Y. Hirayama et al., 2015; Yuri Hirayama & Koizumi, 2018; Narayanan, Dave, & Perez-Pinzon, 2017; Trendelenburg & Dirnagl, 2005). La transferencia de sustratos energéticos y metabolitos neurotransmisores a las neuronas, el soporte funcional y estructural de la BHE, la eliminación de radicales libres o el almacenamiento de glucógeno son algunas de las vías que permiten a los astrocitos incrementar la resistencia isquémica de las neuronas vecinas (Jimenez-Blasco et al., 2015). Así mismo, la evidencia parece indicar que la liberación de citoquinas antiinflamatorias (IL-10), proteínas de choque térmico o factores tróficos (BDNF, GDNF o VEGF) por astrocitos precondicionados contribuyen en gran medida a la neuroprotección frente al daño (Gidday, 2006; Yuri Hirayama & Koizumi, 2018).

1.4. MECANISMOS MOLECULARES EN LA TI ASOCIADA AL PRECONDICIONAMIENTO

Uno de los objetivos principales del estudio de la TI se centra en la identificación de los mecanismos moleculares inducidos durante el PC. En los últimos años, se han descrito un gran número de elementos moleculares y celulares presentes en las cascadas protectoras inducidas tras el PC. Dichos mecanismos presentan un alto grado de similitud, incluso identidad, entre distintas especies y órganos. Esto parece indicar una evolución conservada en las estrategias generales que han permitido a los organismos sobrevivir a las restricciones ambientales (Ulrich Dirnagl et al., 2003; Gidday, 2006; Takaaki Kirino, 2002; Rybnikova & Samoilov, 2015). A continuación, se describen algunos de los mecanismos moleculares principales involucrados en la TI neuronal.

Vía glutamatérgica. Uno de los mecanismos clave del daño tras la isquemia es la excitotoxicidad. La caída en los niveles de ATP que acompaña a la isquemia provoca una alteración de los receptores de glutamato, lo que resulta en un cambio de la plasticidad sináptica y acumulación de glutamato. Principalmente, esto provocará una activación desmesurada de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA-R) del glutamato, con la consiguiente entrada masiva de calcio en el interior celular, que provocará la activación de la cascada de señalización responsable del daño neuronal. Sin embargo, una activación moderada de los NMDA-R promueve la TI a través de diversas vías de señalización, en las que se encuentran involucrados factores como el factor nuclear κ B (NF- κ B), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), o kinasas como JNK, ERK o Akt1 entre otras (Grabb & Choi, 1999; Soriano et al., 2006).

Mecanismos anti-apoptóticos. La expresión de ciertos genes que participan en las vías de apoptosis neuronal puede estar involucrada, a su vez, en los mecanismos inductores de tolerancia. Entre los mecanismos anti-apoptóticos desencadenados por el PC se encuentra la reducción en la síntesis o activación de ciertas proteínas, mediadores destacados de la cascada de apoptosis neuronal (Takaaki Kirino, 2002), como la caspasa3 o p53 (profundizaremos más adelante en el Apartado 3 de la

Introducción), A su vez, la inducción de la TI incluye un aumento de la expresión de proteínas anti-apoptóticas, como la familia Bcl-2, y la activación de vías de supervivencia como la vía fosfatidilinositol 3 kinasa / Akt (PI3K/Akt) (NAKAJIMA et al., 2004).

Óxido nítrico (NO[·]). El NO[·] es una de las moléculas más estudiadas en la TI, aunque su modo de acción aún se desconoce. En modelos de rata recién nacida, el PC induce una resistencia a la isquemia a través de la producción de NO[·] por la sintasa de NO[·] endotelial (eNOS) (Gidday et al., 1999). En otros modelos, dicha tolerancia se alcanza a través de la activación de la sintasa de NO[·] neuronal (nNOS) (Centeno, Orti, Salom, Sick, & Pérez-Pinzón, 1999). De hecho, la inhibición de ambas enzimas evita la tolerancia inducida tras el PC, acentuando el papel clave de dicha activación enzimática en la neuroprotección.

Mecanismos antiinflamatorios. Los lipopolisacáridos (LPS) son el prototipo de estímulo desencadenante de la expresión de citocinas proinflamatorias. Su administración es utilizada como modelo de PC en diversos órganos como el hígado, el corazón o el cerebro. La neuroprotección asociada al PC con LPS involucra la actividad de enzimas como la superóxido dismutasa o la eNOS, así como la liberación de TNF o interleucina 1 (IL-1) (Bordet et al., 2000; Ohtsuki, Ruetzler, Tasaki, & Hallenbeck, 1996).

Factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1). Entre los factores de transcripción susceptibles a la regulación por hipoxia/isquemia, destaca HIF-1. Los niveles de dicha proteína aumentan durante la TI, induciendo la expresión de genes de supervivencia tales como la eritropoyetina, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o transportadores de glucosa entre otros (Sharp et al., 2004).

Adenosina y canales de potasio. La adenosina es un nucleótido endógeno neuroprotector capaz de inhibir la liberación de aminoácidos excitadores y el flujo de calcio presináptico mediante los receptores de adenosina A1. La activación de dichos receptores contribuye a la supresión de la actividad sináptica promovida tras la isquemia, disminuyendo así el gasto energético neuronal (A.-M. Zhou et al., 2004). Por su parte, la activación de los canales de potasio sensibles a ATP (K⁺_{ATP}) también posee

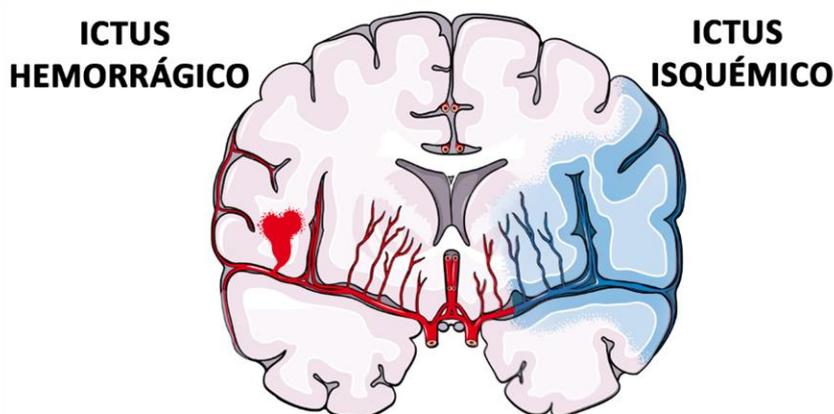
un papel importante en el PC. Uno de los principales canales K^+_{ATP} es el canal mitocondrial (mK^+_{ATP}), cuya activación es clave en la neuroprotección, pudiendo promover cambios en la cadena transportadora de electrones e incrementar la producción energética celular (Schultz, Qian, Gross, & Kukreja, 1997).

Proteínas de choque térmico. Aunque la mayoría de la síntesis proteica se encuentra inhibida tras la isquemia cerebral, la síntesis remanente presenta un papel importante en el mantenimiento de la viabilidad celular (X. Liu, Sheng, & Qin, 2009). En este sentido, las HSPs son chaperonas que se sintetizan de forma constitutiva, o en condiciones de estrés, ayudando al mantenimiento de la integridad celular y previniendo la desnaturalización o agregación indebida de proteínas tras el daño. HSP70, la más abundante de ellas, se encuentra expresada de forma constitutiva en las células y el incremento de su expresión tras el PC permite la inducción de las vías de neuroprotección endógena (Blanco, Lizasoain, Sobrino, Vivancos, & Castillo, 2006; Steiger & Hänggi, 2007; Yenari, Giffard, Sapolsky, & Steinberg, 1999).

Reprogramación genómica. En el cerebro, la alteración en la respuesta transcripcional o reprogramación genómica no sólo hace referencia a la activación de genes encaminados a la protección neuronal, sino también a la supresión de aquellos relacionados directamente con las vías degenerativas activas durante la isquemia (Stenzel-Poore et al., 2003). Las técnicas de análisis por *microarray* del ADN han permitido una mayor comprensión de la TI a nivel genético. Así, se ha observado como la mayoría de los genes reprimidos forman parte de vías reguladoras del metabolismo, transporte molecular o control del ciclo celular, mientras que los genes cuya expresión aumenta se relacionan con proteínas como HSP70 o factores de transcripción como HIF-1 (Benardete & Bergold, 2009; Obrenovitch, 2008; H. Xu, Lu, & Sharp, 2011).

2. EL ICTUS

El ictus es un episodio agudo de disfunción neurológica caracterizado por la interrupción súbita del flujo sanguíneo en una región determinada del cerebro, lo que conlleva la disminución o anulación de la función nerviosa en la zona afectada (Hankey & Wee, 2016). El ictus se clasifica principalmente en isquémico o hemorrágico (Esquema 2), en función de la causa que lo provoca. El **ictus isquémico** engloba aproximadamente el 85% de los accidentes cerebrovasculares (ACV) y es el resultado de la oclusión embólica o trombótica de una arteria cerebral, o la disminución del flujo sanguíneo debido a enfermedades de los vasos cerebrales o del corazón. El **ictus hemorrágico**, en cambio, constituye el 15% de los ACV y surge como consecuencia de la ruptura de un vaso sanguíneo debilitado (aneurismas o malformaciones arteriovenosas) con la consiguiente extravasación de sangre al parénquima cerebral (Deb, Sharma, & Hassan, 2010; Saenger & Christenson, 2010).



Esquema 2. Tipos de ictus según su etiología. Ictus hemorrágico (causado por la rotura de un vaso sanguíneo cerebral) e ictus isquémico (causado por una oclusión vascular).

El ictus es la segunda causa de muerte en España, siendo la primera en mujeres. Además, es la primera causa de discapacidad adquirida en adultos y la segunda de demencia (Benjamin et al., 2019). Cada año, cerca de 110.000-120.000 personas sufren ictus en España, de los cuales más del 50% mantendrán secuelas discapacitantes o fallecerán (OMS; 17 de mayo de 2017). Esto supone el 70% de los ingresos neurológicos que se producen, lo que genera un 3-6% del gasto total sanitario (Mar et al., 2013).

La edad es uno de los principales factores de riesgo en el desarrollo de un ictus, ya que su incidencia aumenta considerablemente a partir de los 60-65 años. Sin embargo, no debe considerarse una enfermedad ligada a la edad avanzada, ya que una tercera parte de las víctimas de un ictus poseen una edad inferior a 65 años. La raza y el sexo son otros de los factores determinantes del riesgo a padecerlo, junto a factores modificables tales como la hipertensión, tabaquismo, diabetes, fibrilación auricular, obesidad o sedentarismo entre otros (Gardener, Wright, Rundek, & Sacco, 2015; Hankey & Wee, 2016).

Los avances en diagnóstico y tratamiento de la enfermedad en los últimos años han permitido un descenso de la mortalidad, aunque no de su prevalencia. Esto provoca un incremento el número de supervivientes, lo que conlleva un incremento mayor del gasto sociosanitario (Donnan & Davis, 2008). Estos factores, junto con el aumento global de la esperanza de vida de la población, hacen del ictus una de las enfermedades más importantes en la sociedad, lo que precisa el desarrollo de nuevas estrategias para la detección precoz, el diagnóstico avanzado y el tratamiento eficaz.

2.1. FISIOPATOLOGÍA DEL ICTUS ISQUÉMICO

El ictus isquémico es el resultado de una reducción transitoria o permanente del flujo sanguíneo cerebral como consecuencia de la oclusión de una arteria cerebral (U Dirnagl, Iadecola, & Moskowitz, 1999). La magnitud del daño isquémico cerebral

dependerá de la duración y severidad del bloqueo sanguíneo, pudiéndose extender varias horas o incluso días (Brouns & Deyn, 2009).

2.1.1. CONCEPTOS DE NÚCLEO ISQUÉMICO Y PENUMBRA

Tras la obstrucción de un vaso sanguíneo, se origina un gradiente de presiones en la región del daño, diferenciándose clínicamente dos zonas principales: la zona del *core* o núcleo isquémico y la penumbra.

La región del cerebro donde el flujo sanguíneo se encuentra reducido por debajo del 10-25% se denomina **núcleo isquémico**. En ella, el aporte de oxígeno no es suficiente para mantener la función tisular. Esto deriva en un daño rápido e irreversible, caracterizado principalmente por procesos lipolíticos y proteolíticos, que conducirán a la pérdida total de la homeostasis y el consiguiente fallo bioenergético y necrosis celular (Almeida & Bolaños, 2001; Bolaños, Moro, Lizasoain, & Almeida, 2009; Brouns & Deyn, 2009; Deb et al., 2010).

Rodeando la región del núcleo isquémico se encuentra una zona cuya perfusión se encuentra comprometida, denominada **penumbra**. En dicha región, el aporte sanguíneo no es suficiente para mantener la función neuronal, pero sí para preservar su integridad celular, así como un reducido metabolismo energético que evitará la necrosis neuronal (Astrup, Siesjö, & Symon, 1981; Fernández-Gómez et al., 2008). Por tanto, la progresión ralentizada del daño en esta región, gracias a la circulación colateral, permite la posibilidad de una recuperación funcional si se restablece la perfusión a tiempo, o se consigue frenar la cascada isquémica inducida tras el daño (Deb et al., 2010). Por ello, la penumbra representa una ventana temporal limitada de oportunidades terapéuticas que permite potenciar la supervivencia celular, evitando la progresión del daño y mejorando el pronóstico funcional tras el ictus (Donnan & Davis, 2008; Fernández-Gómez et al., 2008; Paciaroni, Caso, & Agnelli, 2009; Ramos-Cabrer, Campos, Sobrino, & Castillo, 2011; Touzani, Roussel, & MacKenzie, 2001).

2.1.2. MECANISMOS MOLECULARES DEL ICTUS ISQUÉMICO

El daño isquémico cerebral surge como resultado de una compleja secuencia de eventos fisiopatológicos que evolucionan en el tiempo y el espacio, conocidos como **cascada isquémica** (Esquema 3). La extensión del daño depende de la localización, severidad y duración del proceso isquémico, pudiendo durar desde horas a días (U Dirnagl et al., 1999; Durukan & Tatlisumak, 2007). La cascada isquémica comenzará con una serie de eventos moleculares que contribuirán al fallo bioenergético, la excitotoxicidad y el estrés oxidativo, junto a fenómenos secundarios de disfunción vascular, inflamación y muerte celular que acompañarán la progresión del ictus (J Castillo, Rama, & Dávalos, 2000; Durukan & Tatlisumak, 2007; Gomez-Sanchez et al., 2011; Hossmann, 2006; Rodríguez et al., 2017).

- FALLO BIOENERGÉTICO CELULAR

El cerebro consume aproximadamente el 20% del oxígeno que respiramos, siendo un tejido con una alta demanda energética, empleada principalmente en la producción de los impulsos eléctricos neuronales (Bolaños, 2016). Además, dicho tejido carece de reservas energéticas propias, siendo necesario el aporte continuo de oxígeno y glucosa para llevar a cabo la fosforilación oxidativa y la producción de compuestos fosfato altamente energéticos, como el ATP (Deb et al., 2010; Durukan & Tatlisumak, 2007). La reducción del flujo sanguíneo producida tras la isquemia tiene como consecuencia una disminución del aporte de los sustratos principales, oxígeno y glucosa, provocando la acumulación de lactato vía glucólisis anaerobia (metabolismo anaerobio) (Durukan & Tatlisumak, 2007; Katsura, Kristián, & Siesjö, 1994). Esta acidosis celular promueve la formación de radicales libres, lo que interfiere con la síntesis proteica intracelular e incrementa el daño isquémico (Mergenthaler, Dirnagl, & Meisel, 2004). Además, el fallo energético conlleva la alteración de las bombas iónicas Na^+/K^+ y $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ dependientes de ATP, provocando un desequilibrio homeostático general (incremento intracelular de Na^+ , Ca^{2+} y Cl^- e incremento extracelular de K^+). Este proceso conduce a

la despolarización neuronal y glial y al desarrollo de los procesos que se suceden a continuación.

- **EXCITOTOXICIDAD**

Durante la isquemia, la despolarización de las neuronas y la glía inducida por el déficit energético local conduce a la activación anómala de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, lo que provoca la liberación de grandes cantidades de neurotransmisores excitadores al espacio extracelular, tal y como indicamos en el Apartado 1.4. de la Introducción. Al mismo tiempo, los procesos de recaptación presináptica se encuentran bloqueados, incrementándose en mayor medida la acumulación de estos aminoácidos en la hendidura sináptica (U Dirnagl et al., 1999). Esta hiperactividad neuronal provoca, a su vez, oleadas de despolarización que promueven el fallo energético e intensifican el daño cerebral (Takano et al., 1996).

Uno de los principales neurotransmisores excitadores es el **glutamato**, vital en la plasticidad neuronal. Una liberación incontrolada de éste provoca la excitotoxicidad, mediada por la activación anómala de los NMDA-R, α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) o kainato, y la consiguiente entrada de Ca^{2+} , Cl^- y Na^+ al interior celular (Brouns & Deyn, 2009; Guo et al., 2013; Mergenthaler et al., 2004; Sattler & Tymianski, 2001). En este sentido, trabajos *in vitro* de nuestro laboratorio han descrito que, en cultivos primarios de neuronas corticales, la administración de la D-Glucosa previene el fallo energético y la muerte celular, induciendo la neuroprotección frente a la excitotoxicidad (María Delgado-Esteban, Almeida, & Bolaños, 2002). Por lo tanto, el estudio de los mecanismos asociados a la excitotoxicidad podría ser de gran ayuda en el desarrollo de la neuroprotección frente al ictus.

La activación elevada de los receptores ionotrópicos del glutamato, junto con la pérdida de la homeostasis iónica y el incremento del Ca^{2+} intracelular, son los factores principales responsables de iniciar los procesos de muerte celular tras la isquemia (U Dirnagl et al., 1999). Uno de los receptores más estudiados es el NMDA-R, presente en las sinapsis neuronales y con una importante función en la protección neuronal. En

este sentido, se ha descrito un papel dual de estos receptores, pudiendo promover la muerte o supervivencia de las neuronas en función de su nivel de actividad, su composición y localización celular (Hardingham, Fukunaga, & Bading, 2002; Lai, Zhang, & Wang, 2014; Soriano et al., 2006). El estudio de la función de los NMDA-R puede ayudar a la comprensión de las distintas respuestas celulares.

- **AUMENTO DEL Ca^{2+} INTRACELULAR**

Tras la isquemia, se produce la entrada masiva de Ca^{2+} al interior celular. Este aumento del Ca^{2+} intracelular se encuentra mediado no sólo por receptores NMDA y AMPA, sino también por los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y el tráfico reverso del intercambiador $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$. Además, la liberación de Ca^{2+} desde los orgánulos internos tales como el retículo endoplasmático, vesículas sinápticas o mitocondria contribuye al incremento del *pull* intracelular (Durukan & Tatlisumak, 2007). La acumulación desmesurada de Ca^{2+} , mensajero secundario universal, inicia una serie de procesos nucleares y citoplasmáticos con gran impacto en el desarrollo del daño cerebral. Entre las enzimas que se activan por acción del Ca^{2+} se encuentran: enzimas generadoras de radicales libres como la fosfolipasa A2, óxido nítrico sintasa o ciclooxigenasa; enzimas hidrolasas como fosfolipasa C, numerosas proteasas y endonucleasas y las calpaínas (U Dirnagl et al., 1999; Durukan & Tatlisumak, 2007). Estas últimas, cuya actividad es dependiente del Ca^{2+} , activan enzimas como Cdk5, cuya hiperactividad conducirá a la muerte neuronal por apoptosis mediada por la activación aberrante de proteínas de ciclo celular (Maestre, Delgado-Esteban, Gomez-Sanchez, Bolaños, & Almeida, 2008; Veas-Pérez de Tudela, Maestre, Delgado-Esteban, Bolaños, & Almeida, 2015). Entre las proteínas de ciclo celular se encuentra Cdk1, responsable de reclutar a la ciclina B1 en la mitocondria durante el proceso excitotóxico, y cuya activación modifica la estructura de la ATP-sintasa e induce la muerte neuronal (Veas-Pérez de Tudela, Delgado-Esteban, et al., 2015). Así, la producción de radicales libres y la actividad de las enzimas degradativas promoverán los eventos moleculares responsables de la activación de genes de inflamación, el daño mitocondrial y la muerte neuronal por apoptosis o

necrosis (Kalogeris, Baines, Krenz, & Korthuis, 2012; White et al., 2000; J. Yuan, Lipinski, & Degterev, 2003).

- GENERACIÓN DE RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo tiene lugar cuando la producción de especies reactivas del oxígeno (*Reactive Oxygen Species*; ROS) y de especies reactivas del nitrógeno (*Reactive Nitrogen Species*; RNS) supera la capacidad de los sistemas antioxidantes endógenos para eliminarlas (Guo et al., 2013). Como consecuencia del proceso isquémico, concretamente del periodo de reperfusión tras el daño, se generan gran cantidad de ROS y RNS como el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^\cdot), el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), el óxido nítrico (NO^\cdot) y el peroxinitrito ($ONOO^-$). El O_2^- se genera a través de diversas vías, incluyendo la cadena de transporte mitocondrial, la vía de las ciclooxigenasas (COX) o el sistema xantina oxidasa, una de las fuentes principales de generación de radicales libres durante la isquemia y reperfusión (Allen & Bayraktutan, 2009; Guo et al., 2013). Este anión es uno de los radicales principales, que dará lugar a la formación del H_2O_2 , fuente principal del radical hidroxilo (OH^\cdot). El NO^\cdot se produce a partir de la L-arginina por las sintasas del óxido nítrico (NOS) activadas por el Ca^{2+} , pudiendo reaccionar con O_2^- y generar $ONOO^-$, especie altamente reactiva que colaborará en el daño tisular tras la isquemia.

Los radicales libres pueden exhibir un amplio espectro de efectos celulares incluyendo la inactivación de enzimas, la liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares, la desnaturalización proteica, la peroxidación lipídica y el daño en membranas celulares, citoesqueleto y ADN (U Dirnagl et al., 1999; Lo, Dalkara, & Moskowitz, 2003). Sin embargo, en células vecinas como los astrocitos, los ROS modulan el estado redox de la célula y, por consiguiente, la supervivencia neuronal (Vicente-Gutierrez et al., 2019). De hecho, se ha descrito en el grupo de laboratorio como concentraciones subtóxicas de ciertos radicales, como el $ONOO^-$, favorecen la inducción de la vía de supervivencia PI3K/Akt en respuesta a la excitotoxicidad en cultivos de neuronas *in vitro* (Maria Delgado-Esteban, Martin-Zanca, Andres-Martin, Almeida, & Bolaños, 2007). Por lo tanto, un conocimiento más profundo de las distintas funciones de los radicales libres

durante la tolerancia asociada al PC podría favorecer el desarrollo de terapias neuroprotectoras frente a la isquemia (Kunz et al., 2007).

El estado de hipoxia tras el ictus isquémico, junto a la alta concentración de Ca^{2+} intracelular, pueden promover la formación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP, *mitochondrial permeability transition pore*), alterando la producción de ATP y liberándose una mayor cantidad de radicales libres y moléculas pro-apoptóticas, que contribuirán al incremento del daño neuronal y glial (Brouns & Deyn, 2009; S Love, 1999; Mergenthaler et al., 2004; Sims & Anderson, 2002).

- PROCESO INFLAMATORIO

Tras la isquemia cerebral, se produce una respuesta inflamatoria aguda que contribuye a la progresión del daño isquémico. Entre los elementos clave que participan en ella se encuentran las células inflamatorias, moléculas de adhesión y señalización y numerosos reguladores transcripcionales (NF- κ B, MAPK, AP-1) (Jin, Liu, Zhang, Nanda, & Li, 2013; Pei, You, & Fu, 2015; WANG, TANG, & YENARI, 2007).

Entre los distintos tipos celulares que contribuyen al daño inflamatorio se encuentran los astrocitos y la microglía, ambos activados por los ROS producidos durante la isquemia. Los astrocitos, tras la isquemia, adquieren un fenotipo reactivo y son capaces de secretar diversos factores pro-inflamatorios como citoquinas, quimiocinas o la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS) (Dong & Benveniste, 2001). Por otro lado, ellos mismos expresan el complejo mayor de histocompatibilidad y moléculas asociadas con respuestas anti-inflamatorias, pudiendo favorecer la recuperación durante la isquemia (Sofroniew, 2015). Los macrófagos residentes del cerebro que componen la microglía juegan un papel crucial, transformándose en fagocitos y liberando diversos compuestos tanto citotóxicos como citoprotectores. Por su parte, los leucocitos circulantes se adhieren a los vasos sanguíneos, extravasándose y migrando al cerebro, incrementando los niveles de mediadores proinflamatorios y colaborando en el daño tras la isquemia (WANG et al., 2007). Finalmente, las moléculas de adhesión juegan un papel fundamental en dicha infiltración de leucocitos

en el parénquima cerebral, destacando las selectinas, las inmunoglobulinas y las integrinas (Brouns & Deyn, 2009; Hossmann, 2006; WANG et al., 2007).

Las citoquinas, mediadores inflamatorios producidos por el sistema inmune y las células nerviosas residentes tras la isquemia, actúan como agentes proinflamatorios (interleucinas 1, 6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) o antiinflamatorios (interleucina 10 y el factor de crecimiento tumoral beta (TGF β)), jugando un papel dual en la recuperación del tejido dañado y condicionando el pronóstico tras el ictus (Mergenthaler et al., 2004; Pei et al., 2015). Así, se ha demostrado que el aumento de factores como tales como TNF α , y la expresión de los receptores TNFR1 o TLR4, son algunos de los mecanismos involucrados en la neuroprotección asociada al IPC *in vivo* (J.M. Pradillo et al., 2006; Jesús M. Pradillo et al., 2009; Jesús M Pradillo et al., 2005). Por lo tanto, la respuesta inmune tendrá efectos beneficiosos o deletéreos en función de los componentes celulares activados que, junto con los factores inflamatorios, mediarán el balance entre el daño isquémico y los procesos de reparación celular (George & Steinberg, 2015).

- **DISFUNCIÓN DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA Y DAÑO MICROVASCULAR**

La BHE es una estructura clave en la regulación del tráfico de moléculas, fluidos y células entre el sistema circulatorio y el cerebro, garantizando el mantenimiento del microambiente del sistema nervioso central. Tras la isquemia, la integridad de la BHE se ve comprometida como consecuencia de la alteración estructural del endotelio y el consiguiente aumento de la permeabilidad vascular. Esto provoca la extravasación de numerosas células sanguíneas y la infiltración de fluido en el cerebro, lo que conduce a la formación del edema cerebral y posterior daño secundario por hipertensión intracraneal (Brouns & Deyn, 2009; Jiang et al., 2018).

La pérdida de la BHE provocará, además, la acumulación de determinados factores como la bradiquinina, la trombina o el VEGF, y de ciertas proteasas (metaloproteasas, MMP). Algunas de ellas, como la MMP-9, son liberadas como consecuencia del estrés oxidativo y participan en el daño vascular digiriendo la lámina basal endotelial, lo que

potencia la posibilidad de la transformación hemorrágica del área infartada (Jiang et al., 2018; Khatri, McKinney, Swenson, & Janardhan, 2012).

La pérdida de función de la BHE continúa durante la reperfusión tras la isquemia debido a la producción de radicales libres, la activación del endotelio y la respuesta inflamatoria. Este proceso puede resumirse en una primera hiperemia reactiva que provoca el incremento de la permeabilidad de la BHE, seguida de una hipoperfusión (efecto de no reflujo) debida a la obstrucción microvascular. Estos procesos provocan un aumento final de la permeabilidad celular promovida por procesos inflamatorios, estrés oxidativo y degradación enzimática (del Zoppo & Hallenbeck, 2000; Khatri et al., 2012). La pérdida de la integridad de la BHE, junto con los procesos inflamatorios desencadenados con ella, se prolongan en el tiempo y son los causantes del daño isquémico secundario.

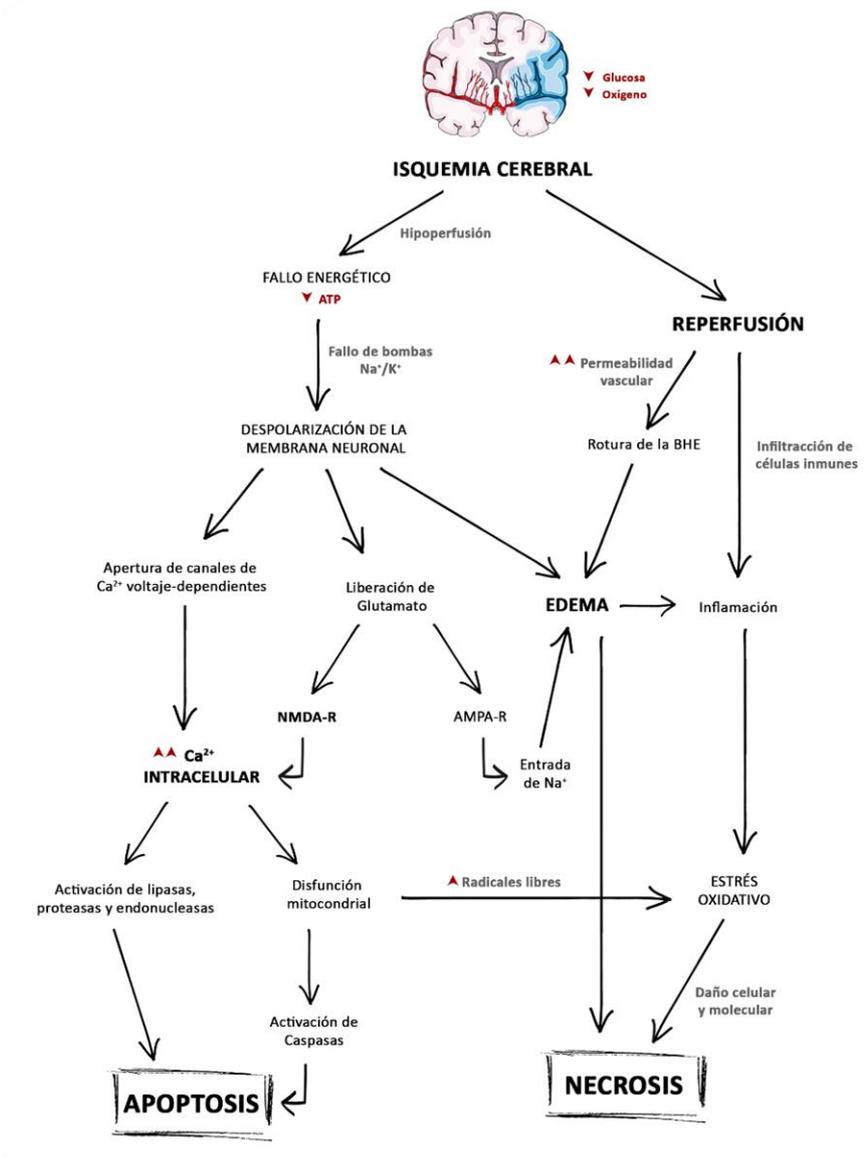
- MECANISMOS DE MUERTE CELULAR

Los fenómenos de excitotoxicidad y sobrecarga de calcio intracelular, la liberación de radicales libres y el daño en la mitocondria y el ADN tras la isquemia comprometen el estado de las células nerviosas, volviéndolas susceptibles de morir por procesos de apoptosis o necrosis.

En los primeros minutos de la isquemia, las células que componen el núcleo isquémico se encuentran expuestas a una reducción drástica del flujo sanguíneo, lo que resultará en un daño irreversible y una muerte celular por procesos de **necrosis**. La necrosis es un tipo de muerte celular, independiente de caspasas, caracterizada por cambios rápidos en la estructura y funcionalidad de la membrana plasmática. Estos cambios provocan una expansión celular y dilatación del retículo endoplásmico y la mitocondria, con la posterior ruptura y liberación del contenido citoplasmático al exterior. De esta manera, se genera un edema citotóxico, tanto en los orgánulos subcelulares como en la propia célula, favoreciendo los procesos inflamatorios y promoviendo un mayor daño cerebral (Martin, Brambrink, Koehler, & Traystman, 1997; Stoica & Faden, 2010).

Por otra parte, las células localizadas en la periferia del núcleo isquémico (lo que denominamos penumbra isquémica) se ven afectadas por la caída del flujo sanguíneo y los procesos inflamatorios desencadenados tras la isquemia, mostrando una diferente susceptibilidad a morir por apoptosis, que se prolonga durante horas o incluso días (Broughton, Reutens, & Sobey, 2009; Gomez-Sanchez et al., 2011; Rodríguez et al., 2017). Por este motivo, en los últimos años la apoptosis constituye una de las principales dianas de acción terapéutica frente al ictus isquémico. Dicha **apoptosis** es un proceso dependiente de energía, por lo que predomina durante el periodo de reperfusión, momento en que se restablece el flujo sanguíneo y la energía celular. Se caracteriza por contracciones en la membrana celular, condensación de la cromatina y fragmentación celular en pequeños cuerpos membranosos que contienen los orgánulos intactos en su interior (cuerpos apoptóticos). Los cuerpos apoptóticos serán eliminados por fagocitosis, evitándose una reacción inflamatoria (Durukan & Tatlisumak, 2007; Seth Love, 2003; Mergenthaler et al., 2004).

La apoptosis tras la isquemia puede ser activada por dos vías: intrínseca o extrínseca. La **vía intrínseca** (o vía mitocondrial) se basa en la traslocación e integración de factores pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 (BAX, BAD) en la membrana externa mitocondrial, provocando la apertura del mPTP y la liberación al citosol de proteínas apoptóticas, como el citocromo c. Éste último, tras unirse a la proteína apaf1, forma el “apoptosoma” y activa las caspasas efectoras 3 y 9 (Angeles Almeida, 2013; Broughton et al., 2009; Kalogeris et al., 2012). Esta cascada de acontecimientos conducirá al daño en el ADN y la apoptosis celular. La **vía extrínseca** se inicia tras la activación de los receptores de muerte celular (Fas, TNF α o TRAIL) y la proteólisis de la procaspasa 8. Esta caspasa puede promover la apertura del mPTP, así como la activación de las caspasas efectoras 3 y 7, llevando a término el proceso apoptótico (Angeles Almeida, 2013; Broughton et al., 2009; Lo et al., 2003; Taylor, Cullen, & Martin, 2008).



Esquema 3. Cascada isquémica neuronal. La imagen representa, de forma resumida, los principales mecanismos moleculares desarrollados durante la cascada isquémica tras el ictus.

2.2. INFLUENCIA DE LA GENÉTICA EN EL ICTUS

A diferencia de las enfermedades monogénicas, las enfermedades complejas o multifactoriales como el ictus se caracterizan por presentar una etiopatogenia diversa. Entre los factores de riesgo que influyen en el desarrollo de la enfermedad cerebrovascular se encuentran tanto factores ambientales como variantes genéticas heredadas (Tournier-Lasserre, 2002). En el caso del ictus isquémico, se ha descrito una

heredabilidad de entre un 30 y 50%, aunque la asociación entre los genes y el fenotipo cardiovascular parecen ser específicos de cada subtipo de ictus (Bevan et al., 2012). La investigación en las causas genéticas del ictus se basa principalmente en estudios de asociación caso- control, analizándose las frecuencias de las variantes genéticas en enfermos respecto a individuos control (Giralt-Steinhauer et al., 2014). Una de las variaciones genéticas más comunes es el polimorfismo de nucleótido simple (*single nucleotide polymorphism*; SNP), consistente en la sustitución de un único nucleótido por otro en la secuencia del ADN cromosomal. Las secuencias codificantes del genoma contienen aproximadamente 100.000-300.000 SNPs, junto con aquellos que se encuentran en las regiones reguladoras, con una relevancia potencial en la susceptibilidad de los humanos a determinadas enfermedades (Angeles Almeida, 2013; Cargill et al., 1999). En este contexto, el desarrollo reciente de los estudios de asociación de genoma completo (*genomewide association studies*; GWAS) permite la determinación de la frecuencia alélica de miles de SNPs de forma aleatoria en enfermedades *versus* controles, lo que facilita el establecimiento de nuevas asociaciones con fenotipos cardiovasculares (Bevan et al., 2012; J. M. Maguire et al., 2017; Matarin et al., 2008; Traylor et al., 2012).

Las variaciones genéticas interindividuales no solo influyen en el riesgo de un paciente a sufrir un ictus, sino que además pueden afectar a la respuesta frente al tratamiento con fármacos o incluso explicar la distinta evolución funcional de pacientes con características clínicas similares (Angeles Almeida, 2013). Por lo tanto, los estudios genéticos ayudan a identificar marcadores que permiten dilucidar los mecanismos moleculares asociados a la enfermedad. Además, la identificación de las variantes genéticas contribuye al descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas, modificando el enfoque farmacológico de los desórdenes cardiovasculares (Boehme et al., 2018; Gallego-Fabrega et al., 2015; Portilla, Muñoz, & Sierra, 2014).

2.2.1. VARIABILIDAD GENÉTICA EN EL PRONÓSTICO FUNCIONAL TRAS EL ICTUS

Uno de los mecanismos principales responsables del daño cerebral en el paciente tras el ictus es la muerte neuronal por apoptosis. En humanos, el desarrollo de los procesos apoptóticos se encuentra ligado a variaciones interindividuales atribuidas a factores genéticos (Angeles Almeida, 2013). En este contexto, se han descrito numerosos SNPs en genes que codifican proteínas que modulan la vulnerabilidad a la apoptosis neuronal, asociándose con enfermedades neurodegenerativas e ictus (Bonafé et al., 2004; Gomez-Sanchez et al., 2011; Rodríguez et al., 2018). Entre las SNPs con relevancia funcional y clínica en los desórdenes neurológicos se encuentra el polimorfismo específico de humanos *Arg72Pro* del gen *Tp53* (*rs1042522*), situado en el codón 72 del exón 4 y que da lugar a las dos variantes genéticas Prolina (CCC) y Arginina (CGC) (Matlashewski, Pim, Banks, & Crawford, 1987; Pietsch, Humbey, & Murphy, 2006; Thomas et al., 1999). De hecho, se ha demostrado que existen diferencias funcionales en la proteína relacionadas directamente con esa variación génica (Bonafé et al., 2004; Dumont, Leu, Della Pietra, George, & Murphy, 2003). En este sentido, nuestro grupo ha demostrado que el polimorfismo *Arg72Pro* de *Tp53* regula la susceptibilidad de las neuronas a la apoptosis tras la isquemia y condiciona el pronóstico funcional de pacientes con ictus isquémico o hemorrágico (Gomez-Sanchez et al., 2011). Además, dicho polimorfismo se ha vinculado recientemente con la resistencia de las células endoteliales en el cerebro, determinando la neovascularización y plasticidad cerebral, y condicionando la recuperación funcional tras el ictus hemorrágico (Rodríguez et al., 2017).

Otro de los polimorfismos descritos, con relevancia funcional, es el localizado en el gen de *MDM2*, que codifica para una proteína clave en la regulación de la actividad de p53. Este polimorfismo, situado en la posición 309 del primer intrón (309T>G, *rs2279744*), regula la expresión de *MDM2*, lo que modula la susceptibilidad neuronal a la apoptosis tras la isquemia y determina el pronóstico funcional de los pacientes tras el daño cerebral (Rodríguez et al., 2018).

Sin embargo, no solo encontramos variaciones genéticas en aquellos genes implicados en la apoptosis neuronal, sino que también se han descrito SNPs en genes relacionados con la reparación y la plasticidad neuronal, como el factor BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*; rs6265) (Kim, Kim, & Kim, 2012); genes relacionados con procesos inflamatorios como COX-2 (rs20417, rs5275) (J. Maguire et al., 2011) y el receptor TLR4 (rs4986791, rs4986790) (Weinstein et al., 2014); o genes relacionados con el metabolismo de lípidos como APOE (rs7412, rs429358) (Cramer & Procaccio, 2012). Los genes descubiertos hasta ahora revelan nuevas vías de la enfermedad y constituyen dianas moleculares terapéuticas para la mejora en el tratamiento de los pacientes tras el ictus. Sin embargo, son necesarios más estudios genéticos para identificar todas las variantes génicas y elucidar los mecanismos involucrados en la susceptibilidad al ictus.

3. LA PROTEÍNA p53 EN LA ISQUEMIA CEREBRAL

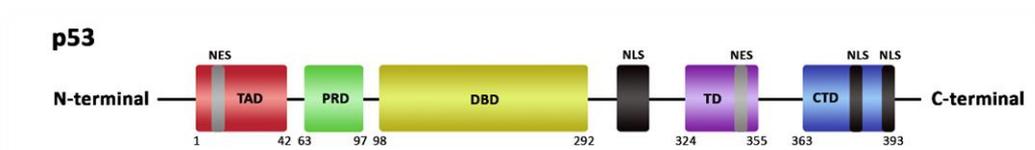
La proteína p53 es una proteína supresora de tumores codificada por el gen *Tp53* (humano), situado en el cromosoma 17p13.1. Su descubrimiento se remonta a 1979, donde se identificó como una proteína de 53 kDa unida a la proteína transformante (el antígeno T mayor) del virus SV40 en células transformadas inmortalizadas y potencialmente tumorigénicas (LANE & CRAWFORD, 1979; Linzer & Levine, 1979). Este hecho hizo que se clasificara inicialmente a *Tp53* como oncogén, aunque años más tarde se describiera su papel como supresor tumoral o “guardián del genoma”, clave en la regulación de la síntesis, transcripción y reparación del ADN (Finlay, Hinds, & Levine, 1989; Hofseth, Hussain, & Harris, 2004; Arnold J Levine, Momand, & Finlay, 1991). Además de controlar la estabilidad genómica, la proteína p53 participa en la regulación de procesos celulares críticos tales como la senescencia, la apoptosis o el control del ciclo celular, cuya alteración se encuentra presente en numerosas enfermedades neurodegenerativas o en el cáncer.

3.1. ESTRUCTURA DE p53

La proteína p53 es un factor de transcripción nuclear compuesto por 393 residuos aminoácidos. Su estructura molecular presenta 5 dominios estructurales y funcionales que incluyen un dominio de activación transcripcional (*TAD*), un dominio rico en prolina (*PRD*), un dominio de unión al ADN (*DBD*), un dominio de tetramerización (*TD*) y un dominio regulador C-terminal (*CTD*) (A. C. Joerger & Fersht, 2010; Andreas C Joerger & Fersht, 2008) (Esquema 4).

- **Dominio de activación transcripcional o *TAD*** (residuos del 1 al 42). Se sitúa en la región N-terminal de la proteína y es necesario para la actividad transcripcional de p53. Este dominio permite la interacción de p53 con multitud de proteínas, como componentes de la maquinaria transcripcional, co-activadores como p300/CBP (proteína de unión a secuencia CREB) o los reguladores negativos MDM2 y MDMX.
- **Dominio rico en prolina o *PRD*** (residuos del 63 al 97). Se encuentra a continuación del dominio *TAD* en la región N-terminal y se compone de 5 motivos PXXP. Posee un papel principalmente estructural, permitiendo la separación entre diferentes dominios funcionales (Toledo & Wahl, 2006). Además, este dominio es importante para la estabilidad de la proteína y sus interacciones con otras moléculas y genes diana, favoreciendo su actividad tanto transcripcional como pro-apoptótica (Sakamuro et al., 1997).
- **Dominio de unión al ADN o *DBD*** (residuos del 98 al 292). Se encuentra en la región central de la proteína y permite su interacción con secuencias específicas de ADN de doble cadena (elementos de respuesta; RE's) en los promotores de los genes diana (Kern et al., 1991).

- **Señales de localización nuclear (NLS;** residuos del 300 al 322; del 370 al 376 y del 380 al 386) y **señales de exportación nuclear (NES;** residuos del 11 al 27 y del 340 al 351). Ambas señales permiten el transporte núcleo- citoplasmático de la proteína, regulando su localización y función celular (T. Tanaka, Yamashita, & Watanabe, 2018; Teveroni et al., 2016).
- **Dominio de tetramerización o TD** (residuos del 324 al 355). Se encuentra situado en la región C-terminal y permite la tetramerización reversible de la proteína, regulando su estado oligomérico.
- **Dominio regulador C-terminal o CTD** (residuos del 363 al 393). Conforman la mayor parte del extremo C-terminal de la proteína e interactúan con secuencias no específicas del ADN, regulando la unión específica de secuencia del dominio central *DBD*. De esta forma, modula positiva y negativamente la actividad transcripcional de p53. Además, este dominio permite el deslizamiento de la proteína por el ADN, favoreciendo la búsqueda de secuencias diana en el genoma (Y. Liu & Bodmer, 2006).



Esquema 4. Estructura y dominios de la proteína p53. La imagen muestra los dominios estructurales de p53.

La oligomerización de la proteína p53 es esencial para el desarrollo de sus funciones, favoreciendo su unión al ADN y las interacciones con diversas proteínas. P53 forma un homo-tetrámero (dímero de dímeros) mediado por el dominio *TD*, lo que favorece su unión al ADN en las secuencias específicas de respuesta a la proteína. De hecho, el tetrámero de p53 posee una afinidad de unión al ADN cien veces mayor que su estado monomérico (W. M. Chan, Siu, Lau, & Poon, 2004; Kamada, Toguchi, Nomura,

Imagawa, & Sakaguchi, 2016). Por lo tanto, el estado estructural de p53 será clave en el desarrollo de sus funciones.

3.2. FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE p53

La proteína p53 es un factor de transcripción que se activa en situaciones de estrés y participa en la activación o la represión de una amplia variedad de genes inmersos en múltiples procesos celulares. Su papel transcripcional se debe a la capacidad de p53, en su forma tetramérica, de unirse a secuencias específicas del ADN localizadas frecuentemente en los promotores o primeros intrones de los genes diana. Esta unión al ADN estimula o reprime la transcripción de determinados genes, codificantes o no (microRNAs), con un papel fundamental en el desarrollo de las funciones asociadas a la proteína. Junto a su papel como factor de transcripción, se han descrito diversas funciones no transcripcionales de p53 en distintos compartimentos celulares, mediadas por interacciones proteína-proteína.

El papel de la proteína p53 no sólo dependerá de su estado de activación, sino que vendrá determinado por el contexto celular, es decir, el tipo celular; el ambiente que le rodea, la localización subcelular o la naturaleza del estímulo estresante (Kasthuber & Lowe, 2017). Como factor transcripcional, participará en diversas funciones, algunas de las cuáles se resumen a continuación:

- **Regulación del ciclo celular.** Una de las principales funciones de p53, como proteína supresora de tumores, es el control del ciclo celular. Para ello, regula la expresión de genes clave tales como *14-3-3 σ* , *Reprimo*, *Btg2* o *p21^{Waf1/Cip}* (Bai & Zhu, 2006).
- **Reparación del ADN.** Frente a un daño en el ADN, la proteína p53 induce una parada del ciclo celular, lo que proporciona un tiempo adicional a la célula para que se produzca, siempre que sea posible, la reparación del daño genómico

previo a la entrada en mitosis. Entre los genes diana, se encuentran *Gadd45*, *p53R2* o *DDB2*.

- **Senescencia celular.** La senescencia celular es una forma permanente de parada de ciclo celular, con un papel clave en el envejecimiento o la respuesta antitumoral (Rufini, Tucci, Celardo, & Melino, 2013). En este sentido, p53 puede inducir o inhibir los procesos de senescencia celular mediante el control, entre otros, de los genes *p21^{Waf1/Cip}*, *SERPINE1* y *PML* (Riley, Sontag, Chen, & Levine, 2008).
- **Apoptosis.** La proteína p53 tiene un papel central en el balance entre la muerte y la supervivencia celular, actuando como un sensor de estrés celular y promoviendo o reprimiendo un amplio panel de genes pro- y anti-apoptóticos (Bai & Zhu, 2006; D. B. Wang, Kinoshita, Kinoshita, & Morrison, 2014b; Zilfou & Lowe, 2009). Dada la importancia del proceso apoptótico que tiene lugar tras la isquemia, nos centraremos en él con más detalle en el apartado siguiente.
- **Funciones no canónicas.** En los últimos años, se ha descrito la participación de p53 en la regulación de factores clave de procesos como el metabolismo celular (TIGAR, SCO2, GLUT1, GLUT4), la respuesta antioxidante (Sestrina 1 y 2, GPX1), la autofagia (AMPK, DRAM1, *PTEN*) o la angiogénesis (*Bai1*, TSP1) entre otras (Brady & Attardi, 2010; Andreas C Joerger & Fersht, 2016; Kruiswijk, Labuschagne, & Vousden, 2015; D. B. Wang et al., 2014b).

Además de su función como factor transcripcional, p53 participa en estos y otros procesos mediante su interacción directa con diversas proteínas, en distintos compartimentos celulares. En el núcleo, p53 no sólo actúa como factor de transcripción, sino que interacciona con determinados factores reguladores para evitar su unión al ADN (represión transcripcional), colaborar en la reparación del daño en el ADN, en la recombinación homóloga o en el procesamiento de microRNAs. En el citosol, p53 interacciona con numerosas proteínas a nivel mitocondrial, regulando el metabolismo y la homeostasis celular, la biogénesis y dinámica mitocondrial, los

procesos autofágicos (mitofagia), los procesos necróticos y la apoptosis celular (Green & Kroemer, 2009; D. B. Wang et al., 2014b).

La enorme red de procesos moleculares en los que se encuentra involucrada la proteína p53 implica que su respuesta frente al estrés celular no radica en un interruptor *on/off*, sino que será en resultado de la activación o represión de numerosas vías celulares conectadas y coordinadas (Kasthuber & Lowe, 2017). Así, el contexto celular será clave tanto en la activación de la proteína como en su respuesta biológica.

3.2.1. APOPTOSIS MEDIADA POR p53

Como sensor de estrés, algunas de las funciones principales de la proteína p53 son el control del balance entre la supervivencia y la inducción de la apoptosis. En aquellos tejidos en los que una situación de estrés celular, como puede ser la isquemia, ha generado un daño irreversible, p53 puede activarse y desencadenar las vías de apoptosis (intrínseca y extrínseca) con objeto de eliminar las células dañadas. Estos procesos apoptóticos son el resultado de la coordinación entre las funciones transcripcionales y no transcripcionales de la proteína p53 (Speidel, Helmbold, & Deppert, 2006) (Esquema 5).

En la vía extrínseca de la apoptosis, p53 puede promover la transcripción de los genes que codifican para Fas/CD95 o DR5/KILLER, ambos receptores de muerte celular (Kruiswijk et al., 2015). En cuanto a la vía apoptótica intrínseca o mitocondrial, p53 ejerce un papel dual, induciendo la expresión de genes pro-apoptóticos (*PUMA*, *Noxa*, *Bid*, *Bad*, *p53AIP1*, *Bax*, *Apaf1* o *PERP*) y reprimiendo la expresión de aquellos anti-apoptóticos (*Bcl-2*, *Bcl-xL*, *Mcl-1*).

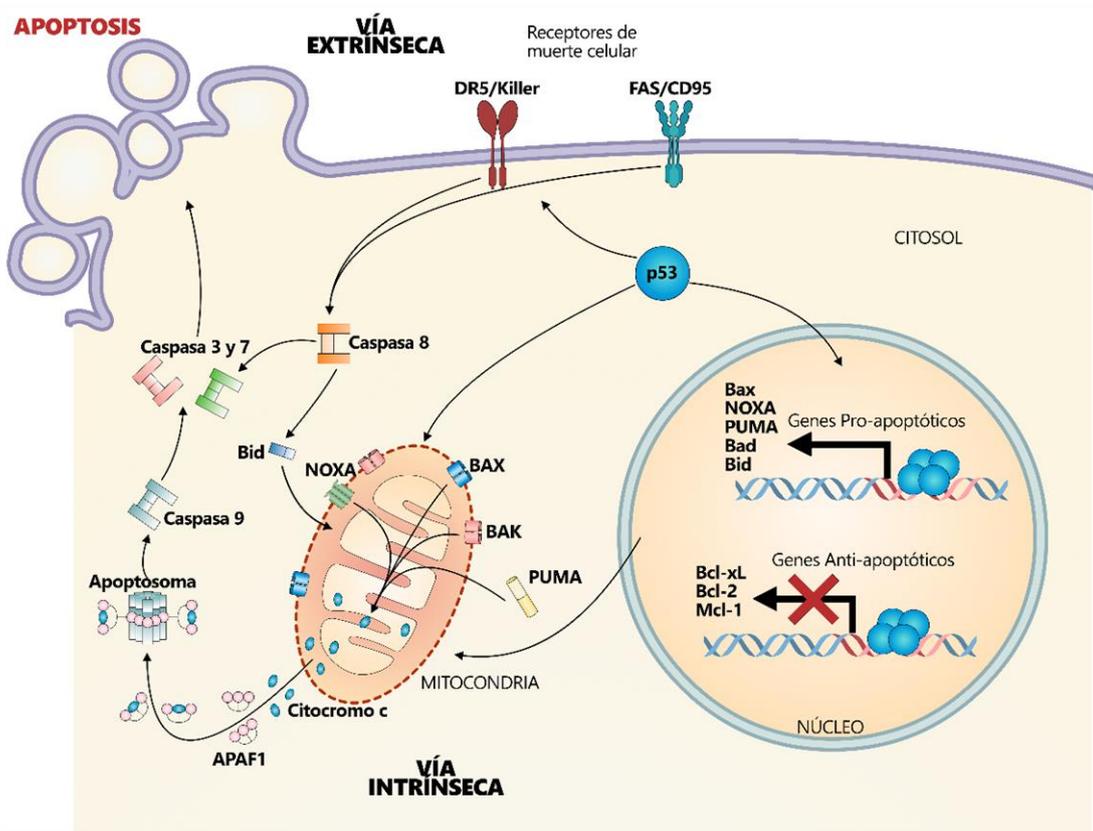
Entre sus funciones no transcripcionales, p53 puede interactuar directamente con la mitocondria. En este sentido, se han encontrado evidencias de la proteína p53 en fracciones mitocondriales (Marchenko, Zaika, & Moll, 2000; Sansome, Zaika, Marchenko, & Moll, 2001). Además, se ha descrito la traslocación mitocondrial de p53, en neuronas del hipocampo, tras ser expuestas a un estímulo isquémico prolongado

(Endo, Kamada, Nito, Nishi, & Chan, 2006). Es más, el simple hecho de la localización de p53 en la mitocondria es suficiente para promover la apoptosis, incluso en ausencia de estímulos externos estresantes (Gomez-Sanchez et al., 2011; Marchenko et al., 2000). Así, el transporte de p53 a la membrana mitocondrial externa facilita su interacción física con proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas previamente citadas. Este hecho desencadena la formación del mPTP mediado por BAX/BAK y la liberación del citocromo c al espacio citoplasmático, lo que culmina con la activación de la cascada de caspasas y la muerte celular por apoptosis (Green & Kroemer, 2009; D. B. Wang, Kinoshita, Kinoshita, & Morrison, 2014a; Zilfou & Lowe, 2009). Ambas funciones de p53, transcripcional y citoplasmática, están estrechamente conectadas a través de la proteína PUMA. Esta proteína no solo es una diana transcripcional de p53, sino que puede trasladarse a la mitocondria e interactuar con Bcl-xL. Esta interacción provoca la liberación de su unión a p53, lo que favorece la activación de Bax. Este hecho posiciona a PUMA como una proteína con un papel clave en el proceso apoptótico (Chipuk, Bouchier-Hayes, Kuwana, Newmeyer, & Green, 2005; Zilfou & Lowe, 2009).

La función de p53 en la inducción de la apoptosis tiene importantes implicaciones en el sistema nervioso central. Así, dicha proteína se encuentra inmersa en procesos tan relevantes como son la inducción de la muerte celular fisiológica durante el desarrollo del cerebro (Tedeschi & Di Giovanni, 2009) o la respuesta al daño y el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson (Lapresa et al., 2019; Raff et al., 1993; Szybińska & Leśniakx, 2017) o el ictus isquémico (Gomez-Sanchez et al., 2011) y hemorrágico (Rodríguez et al., 2018). Los síntomas que manifiestan estas enfermedades resultan, principalmente, de la degeneración y muerte de determinadas poblaciones de neuronas, como por ejemplo los progenitores neurales durante el desarrollo de la corteza cerebral y el desarrollo de microcefalia (Maria Delgado-Esteban, García-Higuera, Maestre, Moreno, & Almeida, 2013).

Dentro del campo de estudio de la isquemia cerebral, son numerosos los trabajos desarrollados en modelos *in vivo* (Crumrine, Thomas, & Morgan, 1994; Culmsee et al., 2003; Y Li, Jenkins, Nichols, & Xiong, 1994; Yonekura, Takai, Asai, Kawahara, & Kirino, 2006) e *in vitro* (Gomez-Sanchez et al., 2011; Schuler, Bossy-Wetzels, Goldstein,

Fitzgerald, & Green, 2000) que han demostrado la implicación de p53 en la muerte neuronal por apoptosis. En estas condiciones, se ha observado un incremento en los niveles de p53, localizado en neuronas y astroglia. En relación a estas observaciones, se ha demostrado que la ausencia de p53 resulta ser neuroprotectora frente a estímulos dañinos como la hipoxia y la isquemia en individuos adultos (Crumrine et al., 1994; Filichia et al., 2015), así como en situaciones de estrés replicativo, en ausencia de Cdh1 (cofactor esencial del complejo APC/C) en los progenitores neurales y durante el desarrollo de la corteza cerebral (Maria Delgado-Esteban et al., 2013), o incluso en la respuesta neuronal a la toxicidad del β -amiloide (Lapresa et al., 2019). Por lo tanto, la regulación de la función de p53 será clave en los procesos de muerte neuronal por apoptosis.



Esquema 5. Función de p53 en la apoptosis neuronal. Se muestra la participación de p53 en las vías intrínseca y extrínseca de activación de la muerte neuronal por apoptosis.

3.3. ACTIVACIÓN Y REGULACIÓN DE p53

La proteína p53 es el componente principal en el control de la supervivencia celular y la muerte neuronal en respuesta a diferentes señales de estrés, intrínsecas o extrínsecas, como el daño genotóxico (ROS, radiación gamma, UV), la hipoxia, óxido nítrico, privación de nutrientes, estrés ribosomal o activación oncogénica entre otros (Culmsee & Mattson, 2005; A J Levine, Hu, & Feng, 2006; Vousden & Prives, 2009). En circunstancias fisiológicas, p53 se encuentra en las células en forma latente, inactiva y en bajas concentraciones. Sin embargo, los niveles estacionarios de p53 aumentan en respuesta al estrés celular, lo que conduce a la estabilización y activación de la proteína. Por lo tanto, la función de p53 radica principalmente en su estabilidad molecular.

3.3.1. ESTABILIZACIÓN DE p53 POR MECANISMOS POSTRADUCCIONALES

Una actividad inapropiada de la proteína puede ser determinante para la viabilidad celular y del organismo, por lo que existen numerosos mecanismos que regulan su activación y su función (Esquema 6). Estos mecanismos son muy diversos y se encuentran interconectados, formando una red compleja de procesos reguladores que abarca desde el control de la transcripción y traducción de la proteína (Saldaña-Meyer & Recillas-Targa, 2011) hasta su estabilización y localización subcelular (Kruiswijk et al., 2015).

El principal mecanismo de regulación de la proteína p53 se basa en modificaciones postraduccionales, que afectan a la estructura y estabilidad de la proteína, su tetramerización, su interacción con otras proteínas y la localización subcelular (Hafner, Bulyk, Jambhekar, & Lahav, 2019). Las principales modificaciones de p53 en respuesta al estrés se localizan en el extremo N-terminal de la molécula (responsable de su función como factor de transcripción), así como en el dominio regulador C-terminal (Kruse & Gu, 2008; Lavin & Gueven, 2006). Algunas modificaciones postraduccionales

estabilizan y activan a la proteína (fosforilación, acetilación, o-glicosilación y metilación en lisina 372), mientras que otras promueven su degradación e inactivación (ubiquitinación, nedilación, sumoilación y metilación de determinadas lisinas), aunque muchas de estos mecanismos aún se desconocen (T. Tanaka et al., 2018).

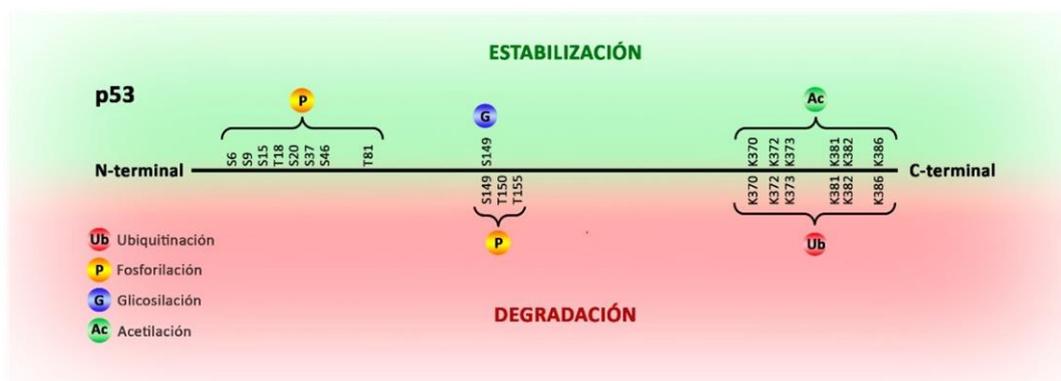
Las **fosforilaciones** y **acetilaciones** son las principales modificaciones postraduccionales que incrementan la función transcripcional de p53, ya que resultan en la estabilización de la proteína y su acumulación en el núcleo, donde interacciona con los genes diana. Además, dichas modificaciones previenen la degradación de p53 al interferir en la unión con su principal regulador negativo, la E3 ubiquitina ligasa MDM2. Algunas de las quinasas descritas de p53 son ATM, ATR o Cdk5 (Gu & Zhu, 2012; Lee, Kim, Lee, & Kim, 2007), que fosforilan diversos residuos de serina y treonina. Uno de los más estudiados es la serina 15 (serina 18 en ratones), situada en la región N-terminal, cuya fosforilación impide la unión de p53 a MDM2 y evita su posterior degradación por el proteosoma. Entre las histona acetiltransferasas descritas en la acetilación de p53 se encuentran CBP/p300 y P/CAF, responsables de acetilar numerosos residuos de lisina localizados en el extremo C-terminal de la proteína (Brooks & Gu, 2003; Tang, Zhao, Chen, Zhao, & Gu, 2008).

3.3.2. DEGRADACIÓN DE p53 POR MECANISMOS POSTRADUCCIONALES

En condiciones fisiológicas, la célula mantiene unos niveles bajos de p53, por lo que muchas de sus funciones se consideran “latentes” ante la ausencia de estrés. Este hecho, junto con la escasa vida media de la proteína (5-20 minutos), refleja su alta tasa de degradación y la necesidad de un control negativo robusto. En este sentido, determinadas modificaciones postraduccionales evitan su estabilización y promueven, en ciertos casos, su degradación. Entre ellas, destacan la nedilación, sumoilación o ubiquitinación, siendo esta última la más conocida (Gu & Zhu, 2012; Lavin & Gueven, 2006).

La **nedilación** y **sumoilación** tienen lugar en residuos de lisina situados en el extremo C-terminal de la proteína. Estas modificaciones modulan la actividad transcripcional de p53, su estabilidad y tráfico subcelular, aunque algunos de sus efectos aún se desconocen (Chao, 2015).

La **ubiquitinación** es, junto a la fosforilación, una de las modificaciones postraduccionales de p53 mejor descritas hasta el momento. Este proceso, llevado a cabo por las E3 ubiquitina ligasas, consiste en la anexión de cuatro o más unidades de ubiquitina (76 aminoácidos) a residuos de lisina de p53, para su degradación por el proteosoma 26S (Chao, 2015). Se han descrito numerosas ubiquitina ligasas que participan en la degradación de p53, como Pirh2, ARF-BP1 o COP1, destacando principalmente la proteína MDM2.



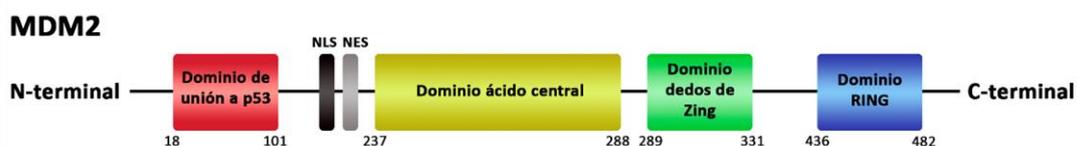
Esquema 6. Modificaciones postraduccionales de p53. En la imagen se recogen las principales modificaciones postraduccionales que participan en la estabilización o degradación de la proteína p53.

3.3.3. LA E3-UBIQUITINA LIGASA MDM2 COMO PRINCIPAL REGULADOR NEGATIVO DE P53.

El gen *MDM2* es un oncogen, identificado por primera vez en cromosomas dobles de una línea celular tumoral de ratón (*mouse double minute*). Dicho gen se localiza en el cromosoma 12q13-14 y presenta dos promotores, P1 y P2, siendo este último dependiente de p53 (Oliner et al., 1993). La proteína codificada, MDM2, se constituye

de 491 aminoácidos (Esquema 7) y se localiza principalmente en el núcleo, aunque puede traslocarse al citoplasma para mediar la degradación, por el proteosoma, de algunas de sus moléculas diana (Olson et al., 1993).

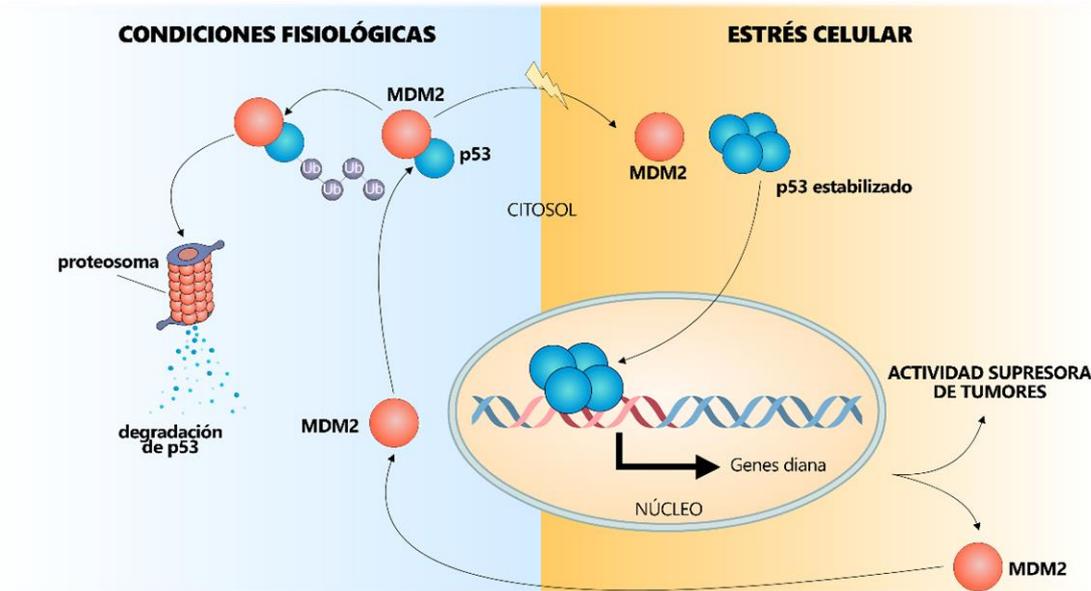
La proteína MDM2 es el principal regulador negativo de p53, ya que la delección del gen *MDM2* resulta letal en el estado embrionario (de Oca Luna, Wagner, & Lozano, 1995). Esta proteína controla los niveles celulares y la actividad de p53 mediante, al menos, dos mecanismos distintos que han sido identificados en células tumorales (Shi & Gu, 2012; Toledo & Wahl, 2006). Por un lado, MDM2 puede unirse al dominio N-terminal *TAD* de p53 de forma directa, lo que bloquea su actividad transcripcional (regulación independiente de ubiquitinación). Por otro lado, como ubiquitina ligasa, MDM2 promueve la mono-ubiquitinación o poli-ubiquitinación de p53 y favorece su traslocación citosólica y degradación por el proteosoma 26S (Soussi & Kroemer, 2018).



Esquema 7. Estructura de la proteína MDM2. En la imagen se muestran los dominios estructurales de MDM2.

Sin embargo, la regulación de p53 por la proteína MDM2 no es unidireccional, sino que ambas se encuentran formando un **bucle de autorregulación negativo**, tal y como se ha demostrado en células tumorales (Moll & Petrenko, 2003; Nag, Qin, Srivenugopal, Wang, & Zhang, 2013; Wu, Bayle, Olson, & Levine, 1993) (Esquema 8). De este modo, la proteína MDM2 ubiquitina y promueve la degradación de p53, favorece su exportación nuclear, previene su interacción con co-activadores transcripcionales y recluta co-represores de ésta. Por otro lado, la proteína p53 regula la transcripción de MDM2, promoviendo su expresión. El incremento de los niveles de MDM2 favorece, de nuevo, la degradación de p53 por el proteosoma 26S y disminuye sus niveles en la célula. De este modo, este bucle de regulación negativo entre ambas proteínas

consigue mantener unos niveles bajos de la proteína p53 en condiciones fisiológicas celulares, limitando su papel pro-apoptótico y anti-proliferativo (Vousden & Prives, 2009). Sin embargo, ante situaciones de estrés celular como el daño en el ADN o la hipoxia, esta regulación se ve alterada, lo que conduce al incremento de los niveles de p53 y su acumulación nuclear.



Esquema 8. Bucle de autorregulación negativa MDM2-p53 descrito en células tumorales. En la imagen se muestra la regulación de la proteína p53 por la E3 ubiquitina ligasa MDM2, tanto en condiciones fisiológicas como en situación de estrés celular.

Debido a la importancia de este bucle regulador MDM2-p53, se han descrito, en células tumorales, numerosos mecanismos que pueden alterar la conformación de ambas proteínas, así como su localización, su expresión e incluso la actividad de MDM2 (Moll & Petrenko, 2003; Nag et al., 2013). Algunos de los factores que afectan al complejo MDM2-p53 son la unión de determinadas moléculas, como MDMX (Huang et al., 2011; Marine & Jochemsen, 2004; Shvarts et al., 1996) o ARF (Honda & Yasuda, 1999; Kamijo et al., 1998); la existencia de polimorfismos en *Tp53* (Gomez-Sanchez et al., 2011) o en *MDM2* (Rodríguez et al., 2018) (Ver Apartado 2.2. de la Introducción) o las modificaciones postranscripcionales de ambas proteínas. Al igual que p53, la proteína MDM2 se encuentra altamente regulada, tanto a nivel transcripcional como a

través de modificaciones postraduccionales. En este último caso, cobran especial importancia las fosforilaciones, mediadas por kinasas como la ATM (disminuyendo la estabilidad de MDM2 (Meulmeester, Pereg, Shiloh, & Jochemsen, 2005) o Akt (favoreciendo la traslocación de MDM2 al núcleo, con la subsiguiente degradación de p53 (L. D. Mayo & Donner, 2001).

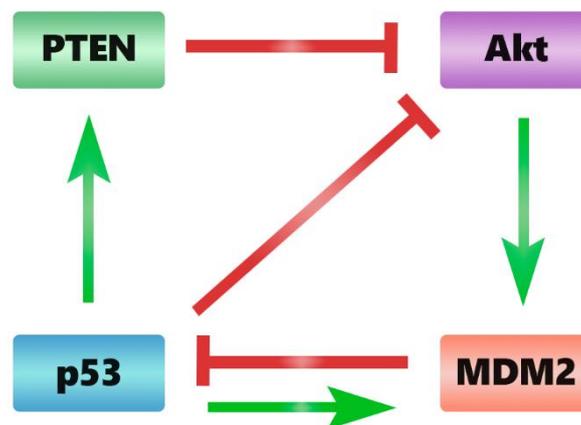
3.3.4. LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA PI3K/AKT EN LA REGULACIÓN DE P53

La vía de señalización PI3K/Akt es una de las vías clave implicadas en la supervivencia celular y cuyo papel regulador de p53 se ha descrito ampliamente en estudios de cáncer (Manning & Toker, 2017; Lindsey D Mayo & Donner, 2002; B. P. Zhou et al., 2001). Entre los componentes que forman esta vía, cobra especial relevancia la proteína Akt, también denominada PKB (*protein kinase B*). Akt es una serina/treonina kinasa con un papel central en las vías de señalización que se activan en respuesta a diversos factores de crecimiento, hormonas, citoquinas y nutrientes. Esta proteína presenta 3 isoformas diferentes, con alta homología entre ellas (80%) y distinta localización. Así, Akt1 predomina en núcleo y citosol, Akt2 en mitocondria y Akt3 en núcleo (Santi & Lee, 2010). La activación de todas ellas está mediada por la fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K), que se caracteriza por fosforilar el fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP2) a PIP3. Este proceso puede revertirse por acción de la fosfatasa PTEN, encargada de convertir de nuevo PIP3 a PIP2, regulando negativamente la vía (Maria Delgado-Esteban et al., 2007; Vara et al., 2004; Heng Zhao, Sapolsky, & Steinberg, 2006b). El PIP3 es imprescindible para la activación de Akt, ya que actúa como segundo mensajero y permite el reclutamiento de la kinasa a la membrana celular. Una vez allí, la activación de Akt se llevará a cabo mediante su fosforilación en dos residuos principales (Thr 308 y Ser 473) por acción de las kinasas PDK1 y mTORC2. (Paraskevopoulou & Tsihchlis, 2017; Sarbassov, Guertin, Ali, & Sabatini, 2005; Vara et al., 2004). Una vez activa, Akt participa en el control de numerosas funciones celulares, que incluyen la proliferación, la autofagia, el metabolismo, la angiogénesis, la exocitosis o la supervivencia celular (Martelli et al., 2012).

En el sistema nervioso, la proteína Akt participa en el crecimiento, la polaridad, la plasticidad sináptica o la formación de circuitos neuronales durante el desarrollo, así como la supervivencia neuronal en condiciones fisiológicas o frente al daño (Manning & Toker, 2017; Song, Tian, Wang, & Wang, 2015; Heng Zhao et al., 2006b; T. Zhao et al., 2014). De hecho, la inhibición de la vía Akt, ya sea bloqueando la actividad de su kinasa PI3K o interfiriendo en la expresión de su gen, aumenta la vulnerabilidad de las neuronas corticales frente al daño excitotóxico (Maria Delgado-Esteban et al., 2007). Estos trabajos han hecho que, en los últimos años, se haya incrementado el estudio de su posible implicación en los mecanismos neuroprotectores asociados al condicionamiento, tanto en modelos *in vitro* (Bhuiyan, Jung, Kim, Lee, & Jin, 2011; Hillion et al., 2006; Y. Zhang, Park, & Gidday, 2007) como *in vivo* (Gao, Zhang, Steinberg, & Zhao, 2010; Pignataro et al., 2012; Xie, Wang, Ji, & Zhao, 2013; Y. Zhang et al., 2007).

En el caso de las enfermedades neurodegenerativas, como el ictus, la susceptibilidad de las neuronas a la apoptosis se rige por la integración entre las señales de estrés celular (p53) y las vías de supervivencia celular (Akt (Gottlieb, Leal, Seger, Taya, & Oren, 2002)). En este sentido, la vía de señalización PI3K/Akt se encuentra mediando la supervivencia celular frente a la apoptosis (P. H. Chan, 2004; Heng Zhao et al., 2006b). Esta función la lleva a cabo mediante la inhibición de proteínas pro-apoptóticas (BAD, Caspasa 9), así como la regulación de factores de transcripción, como FOXO o p53. La interacción entre ambas vías se encuentra mediada por el regulador principal de p53, MDM2, así como la fosfatasa PTEN. Así, se ha demostrado en células de diferentes tipos de cáncer, que la fosforilación de MDM2 en los residuos de serina 166 y serina 186, llevada a cabo por Akt, promueve la traslocación de la proteína al núcleo y su interacción con p53 (L. D. Mayo & Donner, 2001; B. P. Zhou et al., 2001). Además, dicha fosforilación evita la auto-ubiquitinación de MDM2 y su posterior degradación (Feng et al., 2004). De esta forma, la actividad de Akt favorece la degradación de p53 por MDM2, lo que se traduce en la prevención del daño neuronal (Ogawara et al., 2002). A su vez, la estabilización y acumulación de p53 inhibe la actividad de PI3K y promueve la transcripción del supresor de tumores PTEN, conocido antagonista de la vía PI3K/Akt. En esta situación, la proteína PTEN bloquea la activación de Akt mediante

su actividad fosfatasa (convirtiendo PIP3 en PIP2) y promueve la estabilización de p53, favoreciendo su actividad transcripcional (Freeman et al., 2003) e impidiendo la traslocación de MDM2 al núcleo (L. D. Mayo & Donner, 2001). De esta forma, se genera un **bucle de autorregulación positivo** entre las proteínas Akt y p53. Ambos bucles de regulación (p53-MDM2 y p53-Akt), junto con otros muchos descritos (Harris & Levine, 2005), manifiestan la compleja regulación de la proteína p53 y su comportamiento oscilatorio (Wee & Aguda, 2006). Esta oscilación se ha descrito, principalmente, en los niveles de las proteínas p53 y MDM2, en función del daño que recibe la célula en el ADN (Lahav et al., 2004). Sin embargo, la importancia de la dinámica oscilatoria puede trasladarse al resto de mecanismos reguladores de p53, entre los que está la proteína Akt, manteniendo así el balance entre las señales pro-apoptóticas y anti-apoptóticas a lo largo del tiempo (Wee, Surana, & Aguda, 2009; C.-Q. Yuan et al., 2009).



Esquema 9. Red de interacción Akt-MDM2-p53.

4. TOLERANCIA ISQUÉMICA NEURONAL EN EL PACIENTE CON ICTUS

Debido a la alta tasa metabólica intrínseca, y a las grandes concentraciones que posee de glutamato, principal neurotransmisor excitador, el cerebro es especialmente vulnerable al daño isquémico. Aunque la disfunción neurológica ocurre en segundos o minutos tras la oclusión, la evolución del daño y muerte celular puede prolongarse a horas o incluso días. El tiempo que perdura el daño varía en función de la vulnerabilidad de la región celular donde se produce, los constituyentes celulares y la extensión de la perfusión residual. Para evitar la expansión del daño cerebral tras la isquemia y procurar la normalización de la función cerebral lo antes posible, las estrategias desarrolladas frente al ictus isquémico agudo tienen dos objetivos principales: la **recanalización** o restauración de flujo sanguíneo en el área afectada y la **neuroprotección** del tejido dañado (Brouns & Deyn, 2009; Durukan & Tatlisumak, 2007).

4.1. TERAPIAS CLÍNICAS EN EL ICTUS ISQUÉMICO

La restauración inminente del flujo sanguíneo cerebral tras un ictus isquémico es vital para evitar la progresión del daño neuronal. Una de principales terapias aprobadas para lograr la recuperación del flujo sanguíneo consiste en la aplicación intravenosa de la forma recombinante del activador tisular del plasminógeno o rt-PA (NINDS 1995). Este trombolítico, suministrado entre las 3 y 4,5 horas tras la aparición de los síntomas del ictus (ventana terapéutica), permite la disgregación del coágulo y mejora el pronóstico funcional de los pacientes a los 3 meses tras el ictus (Emberson et al., 2014; Marler et al., 2000). Sin embargo, presenta numerosas limitaciones y contraindicaciones, lo que lo hace inaccesible para aquellos pacientes que no cumplen los criterios de inclusión. En este sentido, se han desarrollado nuevas técnicas mecánicas, como la trombectomía endovascular, aprobada en 2004 por la Administración de Medicamentos y Alimentos Americana (FDA). Esta técnica permite

la recanalización vascular tras la disolución *in situ* del coágulo o la retirada mecánica de éste con un catéter o *stent* vascular (Bergui et al., 2006; Campbell et al., 2015; Ciccone et al., 2013). Este proceso conlleva una mayor tasa de recanalización eficaz y una mejora del pronóstico funcional en aquellos pacientes que no responden al tratamiento con rt-PA. Además, la combinación de la trombectomía mecánica con los agentes trombolíticos (Goyal et al., 2016; Smith et al., 2008), junto a las terapias anticoagulantes y antiplaquetarias, el desarrollo de técnicas de neuroimagen avanzadas (Tomografía computerizada; TC y Resonancia magnética cerebral; MRI) y la creación de las Unidades de Ictus permite la mejora en el manejo de los pacientes y su estratificación (Catanese, Tarsia, & Fisher, 2017). Así, se favorece el empleo de terapias dirigidas, incrementándose la supervivencia tras el daño isquémico.

4.2. TOLERANCIA ISQUÉMICA Y NEUROPROTECCIÓN EN LA CLÍNICA

La recanalización o reperfusión cerebral es clave para recuperar la función neuronal y mejorar el pronóstico funcional tras el ictus isquémico. Paradójicamente, la re-entrada de oxígeno y glucosa en el cerebro isquémico durante la reperfusión estimula la producción de especies reactivas, las cuáles sobrepasan los sistemas antioxidantes celulares y conducen al llamado daño por reperfusión. Este síndrome se caracteriza, principalmente, por un aumento de la respuesta inflamatoria, la activación endotelial, la alteración de la BHE y el incremento en el riesgo de transformación hemorrágica. Por ello, es necesario acompañar el proceso de reperfusión con terapias neuroprotectoras que prevengan la propagación del daño excitotóxico y la muerte neuronal, favoreciendo la regeneración cerebral (Fisher & Saver, 2015; Jover-Mengual et al., 2017). Dicha neuroprotección, dirigida principalmente a la zona de penumbra, permite disminuir la progresión del daño y extender la ventana terapéutica en el desarrollo de las terapias frente al ictus.

Una gran parte de los tratamientos neuroprotectores en desarrollo se dirigen principalmente a los eventos bioquímicos que se desencadenan durante la cascada

isquémica, incluyendo anti-excitotóxicos, anti-apoptóticos, anti-inflamatorios y anti-oxidantes entre otros (Chamorro, Dirnagl, Urra, & Planas, 2016; Nagy & Nardai, 2017; Prass & Dirnagl, 1998). Por lo tanto, un mayor conocimiento de los procesos bioquímicos desencadenados durante el transcurso de la enfermedad nos permitirá identificar dianas moleculares para el desarrollo de tratamientos enfocados a la mejora del estado funcional del paciente.

Otro de los puntos clave en el desarrollo de terapias protectoras frente al ictus se basa en la inducción de los mecanismos endógenos de reparación y recuperación cerebral que se suceden durante el proceso isquémico. En este sentido, se encuentran en desarrollo numerosas terapias basadas en tratamientos con factores tróficos (NGF, BDNF, FGF) que favorecen la plasticidad neurovascular endógena y terapias celulares que reemplazan el cerebro dañado (Fletcher et al., 2009; T. G. Koch, Berg, & Betts, 2009; Marei et al., 2018; Z. G. Zhang & Chopp, 2009). Pero no sólo los procesos de neuroreparación han suscitado un creciente interés en los últimos años. La habilidad del cerebro para protegerse frente al daño ha fomentado un nuevo campo de investigación centrado en el estudio de los mecanismos moleculares endógenos responsables de la neuroprotección (TI cerebral) (Gidday, 2006; Obrenovitch, 2008). En este contexto, el IPC se ha convertido en una herramienta experimental efectiva capaz de inducir vías de tolerancia neuronal frente a la isquemia, favoreciendo la identificación de dianas moleculares con carácter terapéutico frente al ictus.

4.3. EL ATAQUE ISQUÉMICO TRANSITORIO (AIT) COMO EJEMPLO DE PRECONDICIONAMIENTO EN PACIENTES

El IPC ha cobrado gran relevancia en la clínica, convirtiéndose hoy en día en unas de las estrategias experimentales con potencial terapéutico en la neuroprotección frente al ictus (S. Koch, Della-Morte, Dave, Sacco, & Perez-Pinzon, 2014). El fenómeno de TI se describió inicialmente en pacientes con infarto de corazón. En este sentido, diversos estudios identificaron la angina de pecho como el correlato clínico del PC (Andreotti &

Pasceri, 1996; Ottani et al., 1995). Años más tarde, se describió el PC en el cerebro, mediante el estudio del ataque isquémico transitorio (AIT).

Un AIT se define clínicamente como un episodio transitorio de disfunción neurológica causado por una isquemia cerebral focal o retiniana, sin evidencia de infarto agudo y cuya sintomatología no suele durar más de 1 hora (Easton et al., 2009). Aunque el incremento del riesgo de padecer un ictus isquémico tras un AIT es un hecho bien establecido, numerosos estudios han demostrado que pacientes que sufren un AIT previo a un ictus isquémico presentan un cuadro neurológico menos severo, y mejor pronóstico funcional, que aquellos que no lo sufren (José Castillo et al., 2003; Moncayo, de Freitas, Bogousslavsky, Altieri, & van Melle, 2000; W.-W. Wang, Chen, Zhao, Yang, & Gong, 2017; Wegener et al., 2004; Weih et al., 1999). Debido a ello, el AIT se considera en la actualidad como una situación de PC. Esto sugiere que la tolerancia endógena inducida por el AIT está presente en el cerebro humano.

En los últimos años, numerosos trabajos se han centrado en la utilización de los distintos modelos de pre-, post- y per-condicionamiento en animales, con el fin de estudiar y trasladar esta estrategia como terapia neuroprotectora en pacientes con ictus isquémico agudo (Ulrich Dirnagl, Becker, & Meisel, 2009; T Kirino, Nakagomi, Kanemitsu, & Tamura, 1996; K Kitagawa et al., 1990). Sin embargo, aún existen numerosas limitaciones clínicas, como el estrecho margen de seguridad del estímulo (Durukan & Tatlisumak, 2010), la falta de predictibilidad del ictus y la influencia de distintos factores como la edad o el sexo (S. Koch et al., 2014; Narayanan, Dave, & Perez-Pinzon, 2013). Por este motivo, los estudios clínicos se han centrado en modelos modificados de condicionamiento traslacionales, como es el caso del per-condicionamiento isquémico remoto. Este modelo, tal y como explicamos previamente en el apartado 1.3.2. de la Introducción, consiste en la aplicación de varios ciclos breves de oclusión/restauración del flujo sanguíneo en una región alejada del cerebro, como el brazo o la pierna, lo que desencadena la liberación de factores protectores solubles en la sangre que confieren protección en el órgano dañado (Hess et al., 2015; Lim, Yellon, & Hausenloy, 2010). En este contexto, existen diversos estudios clínicos en desarrollo en la actualidad (www.clinialtrials.gov), con aplicabilidad tanto profiláctica como terapéutica, principalmente durante intervenciones quirúrgicas, o en conjunto

con otras terapias, frente al ictus isquémico (Che et al., 2019; K. D. Hougaard et al., 2013; Kristina Dupont Hougaard et al., 2014; W. Zhao et al., 2018).

Otro de los modelos de condicionamiento con carácter terapéutico y trasladable a la clínica es el uso de fármacos capaces de mimetizar los efectos del IPC e inducir la activación de las vías neuroprotectoras clave en la tolerancia inducida durante el IPC (Della-Morte et al., 2009; E. Tanaka, Niiyama, Sato, Yamada, & Higashi, 2003). En este sentido, la comprensión de los mecanismos intrínsecos desarrollados en las distintas células que componen la Red Neurovascular, a través de estudios *in vitro* e *in vivo*, permitirá identificar biomarcadores determinantes de la tolerancia isquémica y el proceso isquémico cerebral. Estos biomarcadores no solo mejorarán el diagnóstico de la enfermedad, sino que favorecerán la estratificación de los pacientes para determinados tratamientos y actuarán de indicadores de la eficacia terapéutica del fármaco y su efecto clínico en el pronóstico funcional a largo plazo (Saenger & Christenson, 2010; Whiteley, Chong, Sengupta, & Sandercock, 2009).

Por lo tanto, la identificación de las vías implicadas en la TI y los biomarcadores asociados a la neuroprotección endógena inducida por el PC ayudará a la translación de las terapias neuroprotectoras a la práctica clínica, y en concreto a pacientes con ictus isquémico (S. Koch et al., 2014).

Hipótesis y Objetivos

A decorative watercolor splash in shades of purple, blue, and pink serves as a background for the text.

1. HIPÓTESIS

Un estímulo subtóxico en el cerebro (precondicionamiento; PC) promueve una situación de resistencia transitoria, que lo protege frente a un daño isquémico agudo posterior. Este estado de tolerancia isquémica se debe a la activación de mecanismos endógenos que promueven la supervivencia neuronal (Ulrich Dirnagl et al., 2009, 2003; Gidday, 2006; Takaaki Kirino, 2002; Y. Wang et al., 2015). De hecho, se ha observado que aquellos pacientes que sufren, previo al ictus, uno o varios AITs presentan un mejor pronóstico funcional que aquellos pacientes sin AIT (Schaller, 2005; W.-W. Wang et al., 2017; Wegener et al., 2004). Por ello, en la actualidad, se considera al AIT como el correlato clínico de una situación de PC. Con estos antecedentes, nosotros creemos que el PC constituye una herramienta experimental eficaz en la identificación de las vías de neuroprotección asociadas a la tolerancia neuronal y frente a la isquemia.

Aunque se desconocen los mecanismos moleculares implicados en la TI, se sabe que la regulación de la apoptosis es fundamental (Ulrich Dirnagl et al., 2009; Kazuo Kitagawa et al., 1991; Stetler et al., 2008). En este contexto, se ha descrito que la proteína p53, sensor de estrés celular, se estabiliza y acumula durante la isquemia cerebral e induce la muerte neuronal por apoptosis (Broughton et al., 2009; Hong, Zhao, & Zhang, 2010; Morrison & Kinoshita, 2000; Yonekura et al., 2006). Además, la inhibición funcional o delección de p53 promueve la neuroprotección (Crumrine et al., 1994). Por ello, pensamos que la proteína p53 y sus proteínas relacionadas podrían tener una función esencial en los mecanismos de neuroprotección asociados al PC.

Resultados previos de nuestro grupo han identificado que el polimorfismo humano o SNP *Arg72Pro* de *Tp53* modula la susceptibilidad de las neuronas a la isquemia y condiciona el pronóstico funcional de pacientes de ictus isquémico y hemorrágico (Gomez-Sanchez et al., 2011). Además, este SNP determina la neovascularización y recuperación neurológica tras el ictus hemorrágico (Rodríguez et al., 2017). Por lo tanto, nosotros pensamos que este polimorfismo podría tener alguna función en la tolerancia isquémica asociada al PC, lo que podría condicionar el estado funcional de pacientes con un AIT previo al ictus.

2. OBJETIVOS

A la vista de los antecedentes descritos y la hipótesis de trabajo planteada, nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Establecer un modelo de PC que promueva neuroprotección frente a la isquemia, en cultivo primario de neuronas corticales de ratón.
2. Investigar la función de p53 y sus proteínas relacionadas, en la tolerancia isquémica asociada al PC, en cultivo primario de neuronas corticales de ratón.
3. Comprobar la relevancia de la vía Akt-MDM2-p53 en un modelo *in vivo* de preconditionamiento isquémico.
4. Identificar la función del polimorfismo humano *Arg72Pro* de *Tp53* en la neuroprotección asociada al PC y su posible relevancia en el pronóstico funcional de pacientes con AIT previo al ictus isquémico.

Material y Métodos

1. CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS

1.1. ESPECIES ENSAYADAS Y CONDICIONES DEL ANIMALARIO

Para el desarrollo de los cultivos primarios de neuronas corticales se dispuso de embriones de ratón *Mus musculus*, L.1758 (Muridae, Rodentia, Mammalia) de la cepa C57BL/6J (Jackson Laboratories, Mayne, EE. UU), así como embriones de ratón modificados genéticamente. En este sentido, se emplearon ratones *Wild type (wt)/Knock-out (Ko)* para la proteína p53 y ratones *Knock-in* que expresan la variante polimórfica humana Pro-p53 o Arg-p53 (cedidos por el Prof. G. David Jonhson; The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Smithville, TX) (Zhu et al., 2010). Ambos genotipados se muestran en la Imagen 2. En todos los casos, las hembras gestantes se criaron en el Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca.

Los animales se mantuvieron en jaulas individuales bajo un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas (fase de luz de 8:00 a 20:00 y fase de oscuridad de 20:00 a 8:00 horas del día siguiente). Se mantuvo una humedad relativa que osciló entre un 45 % y un 65 %, así como una temperatura controlada entre los 20°C y los 25°C. La alimentación fue *ad libitum*, con una dieta sólida estándar (17 % proteínas, 3 % lípidos, 58,7 % glúcidos, 4,3 % celulosa, 5 % minerales y 12 % humedad), permitiéndose siempre el acceso libre al agua de bebida.

El periodo de gestación de la ratona, establecido en 19,5 días, se controló limitando el tiempo de cohabitación de las hembras con los machos a una noche. A las 9:00 horas de la mañana siguiente se separaron aquellas hembras que presentaban espermatozoides en el frotis vaginal, acompañados de células epiteliales de la vagina (que son características de un día fértil del estro), asumiéndose este día como el inicio del periodo gestacional.

Todas las manipulaciones y los procedimientos con animales cumplen la normativa vigente de la Comisión Europea de 22 de septiembre de 2010, relativa al alojamiento y cuidado de animales (2010/63/UE), así como de la Legislación Española de 1 de febrero de 2013, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos (RD 53/2013) y siguiendo la Orden ECC/566/2015 y la ley 32/2007.

Todos los protocolos realizados en esta Tesis se han aprobado por el comité de Bioética de la Universidad de Salamanca y por los comités de Bioética locales.

1.2. CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS CORTICALES

Para la realización del cultivo primario de neuronas corticales se emplearon embriones C57BL/6J, *wt/ko* para la proteína p53 y *knock-in* que expresaban la variante polimórfica humana Pro-p53 o Arg-p53. Todos ellos se utilizaron a 14,5 días de gestación (Maria Delgado-Esteban et al., 2013; Gomez-Sanchez et al., 2011). Las hembras gestantes se sacrificaron mediante dislocación cervical tras ser previamente anestesiadas en una atmósfera saturada de CO₂. Los embriones se extrajeron por histerectomía y se trasladaron para su procesamiento a una cabina de flujo laminar (TC48, Gelaire Flow Laboratories, Virginia, EE. UU.). Primero, se retiró el cráneo y se llevó a cabo la extracción del cerebro, descartando el cerebelo y los bulbos olfativos, con ayuda de las microtijeras, pinzas de cirugía y un papel estéril impregnado de etanol al 70 %. A continuación, los hemisferios corticales se colocaron en una placa de cultivos en presencia de solución de disgregación (NaCl 116 mM, KCl 5,4 mM, NaH₂PO₄ 1,01 mM, MgSO₄ 1,5 mM, NaHCO₃ 26 mM, D-glucosa 4 mM, rojo fenol 10 mg/l, albúmina fracción V al 0,3 % p/v y DNAsa tipo I 20 µg/ml pH 7,1) y se diseccionó el tejido con la ayuda de un bisturí. La suspensión tisular se trasladó a un tubo de 50 ml (BD Falcon™, Becton Dickinson Biosciences, Massachusetts, EE. UU.), donde se dejó sedimentar durante 4 minutos. Tras retirar el sobrenadante del tubo, se disgregó el tejido extraído durante 10 minutos a 37°C (baño termostatzado) incubándose en una solución de

tripsinización (solución suplementada con tripsina al 0.025 % p/v) en agitación suave e intervalos de 3 minutos para facilitar la actividad enzimática de la tripsina.

La tripsinización se detuvo añadiendo suero fetal de ternera (SF; Roche, Roche Applied Science, Barcelona, España) a una concentración final del 10 % (v/v). El tejido disgregado se centrifugó durante 5 minutos a 500 x *g*. A continuación, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió 9 veces en solución de disgregación con una pipeta Pasteur de vidrio siliconada. Posteriormente, tras un periodo de sedimentación de 4 minutos, se recogió el sobrenadante que contenía la suspensión celular y se depositó en un tubo estéril de 50 ml. Este proceso se repitió con el sedimento sobrante, una vez más, a fin de incrementar el rendimiento del cultivo. Una vez finalizadas las resuspensiones, se mezclaron las soluciones celulares obtenidas y se centrifugaron 5 minutos a 500 x *g*.

La solución celular resultante se resuspendió cuidadosamente en medio Neurobasal (Gibco, Thermo Fisher Scientific, California, EE. UU.), un medio de cultivo específico para neuronas, suplementado con B27 al 2 % (suplemento antioxidante), glutamina 2 mM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, California, EE. UU.) y antibiótico: penicilina G 100 U/ml; estreptomicina 100 µg/ml; anfotericina B 0,25 µg/ml (Sigma-Aldrich, Missouri, EE. UU.). El conteo de las células viables se llevó a cabo mediante la tinción de la suspensión celular con azul de tripano en un volumen final de 80 µl (suspensión celular 10 µl; medio de cultivo 30 µl; azul de tripano 40 µl), empleando una cámara cuenta glóbulos de Neubauer (Zeiss, Oberkochen, Alemania) y un microscopio de contraste de fases Olympus CK30 (Olympus®, Tokyo, Japón).

Finalmente, se sembraron las células a una densidad de $1,8 \times 10^5$ células/cm² en placas de cultivo de poliestireno (Nunclon™, ThermoScientific, Thermo Fischer Scientific, California, EE. UU.) y previamente tratadas con una solución de poli-D-lisina 10 µg/ml (PDL; Sigma Aldrich, Misuri, EE. UU.). Las células se mantuvieron en un incubador termostático a 37°C (Forma 310, Thermo Scientific, Barcelona, España), en una atmósfera húmeda compuesta por un 95 % de aire y un 5 % de CO₂. Cada 3 días de cultivo *in vitro*, la mitad del medio fue sustituido por medio Neurobasal fresco. Las células se utilizaron en el día 9-10 de cultivo (*days in vitro*; DIV), momento en que

sabemos que las neuronas expresan receptores sinápticos funcionales (Gomez-Sanchez et al., 2011) (Imagen 1).

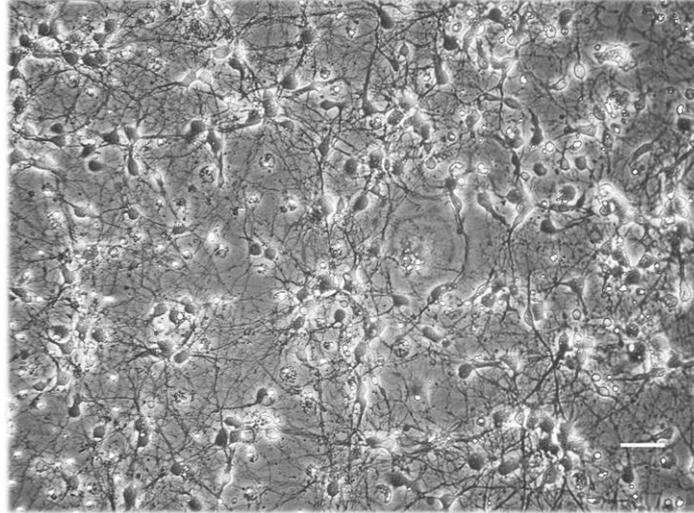


Imagen 1. Microfotografía de campo claro de neuronas corticales de ratón de 9 días de cultivo. Barra de escala: 50 μm .

1.3. IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA

1.3.1. Genotipado de p53

La identificación genotípica de los embriones, utilizados en los cultivos primarios de neuronas corticales, se realizó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Dicha técnica permitió amplificar secuencias específicas de los alelos de p53 e identificar los individuos *ko* (-/-) y *wt* (+/+) de p53, así como los heterocigotos (+/-). Posteriormente, los productos resultantes de la amplificación se resolvieron en un gel de agarosa (ver Imagen 2).

1.3.2. Genotipado del polimorfismo humano *Arg72Pro* de *Tp53*

En el caso del gen *Tp53*, se ha descrito un polimorfismo humano de base única o SNP en el codón 72 del exón 4 (*Arg72Pro*; rs1042522), el cual codifica para un residuo de prolina (Pro o P; CCC) o para un residuo de arginina (Arg o R; CGC). La identificación de la variante polimórfica de la proteína p53 que expresaban los individuos (Pro-p53 o Arg-p53) se realizó mediante la técnica de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), consistente en la amplificación del ADN, para una posterior digestión del producto amplificado con enzimas de restricción y su análisis en gel de agarosa (Ver Imagen 2).

1.3.3. Extracción del ADN en los ratones

La extracción del ADN genómico se realizó mediante la digestión de una pequeña porción de cola (4 mm) del embrión, durante 40-60 minutos a 55°C y en agitación (1300 rpm) con proteinasa K (100 µg/ml, Sigma-Aldrich), en un medio tamponado (pH 8,5) que contiene KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Tris-HCl 10 mM, gelatina al 0,01 % (p/v), Nonidet P-40 al 0,45 % (v/v) y Tween-20 al 0,45 % (v/v). Tras la digestión, se inactivó la proteinasa K al incubarse la muestra a 95°C durante 15 minutos. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 7000 x *g* durante 15 segundos, precipitando los restos de tejido no digerido.

El sobrenadante se utilizó para la determinación de la concentración de ADN en un espectrofotómetro UV-Vis Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). A continuación, se tomó una alícuota procedente de cada muestra con objeto de igualar la concentración final en todos los casos.

1.3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la identificación del genotipo se llevó a cabo la amplificación de fragmentos específicos del gen *Tp53*. La mezcla para la reacción de la PCR, en cada caso, fue la siguiente:

μL/muestra		μL/muestra	
Agua libre de nucleasas	14,5	Agua libre de nucleasas	5,0
Buffer 10X	2,5	Master Mix (Promega)	6,0
Betaina 1 M	5,0	In3-F 10 μM (Sigma)	0,5
dNTPs 10 mM	0,5	In4-R 10 μM (Sigma)	0,5
Fw. p53 100 μM (Sigma)	0,25	Muestra	1,0
Rv. p53 100 μM (Sigma)	0,25	(150 ng ADN)	
Fw. pPNT 100 μM (Sigma)	0,25		
Taq polimerasa 5U/μL	0,3		
Muestra (150 ng ADN)	1,5		

Tabla 2. Lista de componentes de la mezcla de reacción de PCR. La tabla muestra los compuestos de la mezcla de reacción para la realización de la PCR e identificación genotípica de los individuos *wt* o *ko* de p53 (izquierda), así como los individuos que expresan las variantes polimórficas Pro-p53 o Arg-p53 (derecha).

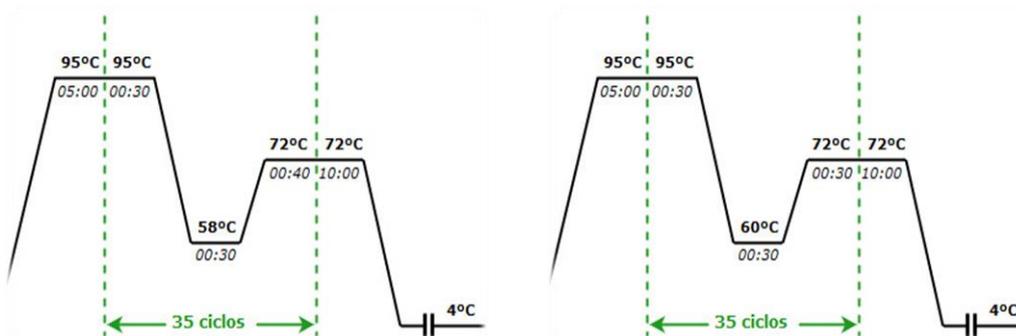
Las secuencias de cada uno de los oligonucleótidos empleados, durante ambos genotipados, son las siguientes:

OLIGONUCLEÓTIDOS		TÉCNICA EMPLEADA	GENOTIPADO
Fw.p53	5'-TGG TTT GTG CGT CTT AGA GAC AGT 3'	PCR	p53 <i>ko</i>
Rv.p53	5'-AAG GAT AGG TCG GCG GTT CAT 3'		
Fw.pPNT	5'-CCA GCT CAT TCC TCC CAC TCA 3'		
Trp53-In3-F	5'- GCTGGTAGGCTGAGAACACA 3'	PCR-RFLP	Pro-p53 Arg-p53
Trp53-In4-R	5'- GGCACAGTCTACAGGCTGAA 3'		

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en la identificación genotípica de los individuos *wt* o *ko* de p53 y de las variantes polimórficas Pro-p53/Arg-p53. En la tabla se recogen las secuencias de los oligonucleótidos correspondientes a cada una de las técnicas de genotipado utilizadas.

El **Fw.pPNT** es un oligonucleótido que reconoce una secuencia del vector utilizado para la generación de los individuos *ko* de p53, siendo necesario su uso para la amplificación durante la PCR.

La PCR se desarrolló en un termociclador automático Eppendorf (Mastercycler® ep, Eppendorf, Eppendorf Inc.; Enfield, EE. UU.), cuyas temperaturas y ciclos de amplificación se muestran a continuación:



Esquema 10. Protocolo de PCR. El esquema muestra las temperaturas y tiempos en las diferentes etapas, así como el número de ciclos de amplificación realizados durante la PCR para la identificación de los individuos *wt* y *ko* de p53 (izquierda) o de los individuos que expresan las variantes polimórficas Pro-p53/Arg-p53 (derecha).

Para el genotipado de las variantes polimórficas Pro-p53 y Arg-p53, el producto obtenido tras la PCR fue posteriormente digerido durante 1 hora a 37°C, con una mezcla de digestión que contenía 7,2 µl de agua libre de nucleasas, 2 µl de *Buffer* CutSmart® y 0,8 µl de la enzima de restricción BtgI (10 U/µl, New England Biolabs, Hertfordshire, Reino Unido). Dicha enzima reconoce el sitio de corte generado en la secuencia debido al cambio de Citosina a Guanina (CG´CG).

1.3.5. Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de la PCR se mezclaron con un tampón de carga 6X (Trizma-base 10 mM, 0,03 % azul de bromofenol, 0,03 % (v/v) xileno cianol, 60 % (v/v) glicerol, Na₂EDTA·2H₂O 60 mM pH 7,6) y se resolvieron en un gel de agarosa (Sigma-Aldrich)

fabricado al 2 % (p/v) en tampón Tris-acetato-EDTA (ácido etilen-di-amino-tetraacético) (TAE/EDTA), al que se añadió Midori Green (1:20.000; Nippon Genetics Europe GmbH) como agente intercalante. Para calcular el tamaño de las bandas obtenidas, se incluyó en los geles el marcador de peso molecular Plus ADN ladder 1Kb (Thermo Fischer Scientific), cuyo patrón de bandas oscila entre 100 y 15.000 pb.

Para visualizar las bandas de ADN amplificado tras la PCR se utilizó un transiluminador Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories, S.A.; Hercules, California, EE. UU) y el software *Quantity One* (Bio-Rad Laboratories).

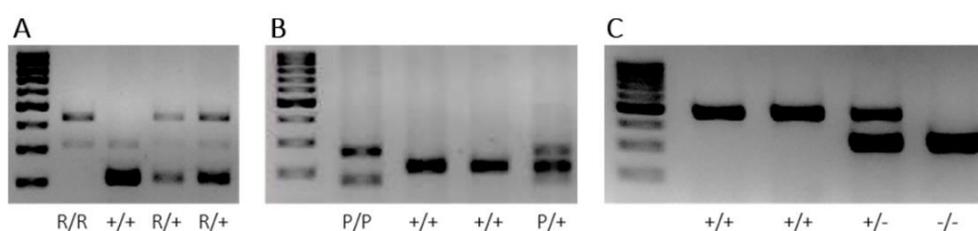


Imagen 2. Geles de los productos de PCR. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados de PCR utilizados para la identificación genotípica de los embriones de ratón. **A:** Embriones knock-in Arg72-p53 (R/R), heterocigotos (R/+) y wt (+/+). **B:** Embriones knock-in Pro72-p53 (P/P), heterocigotos (P/+) y wt (+/+). **C:** Embriones p53 ko (-/-), heterocigotos (+/-) y p53 wt (+/+).

2. LÍNEAS CELULARES

2.1. HEK-293T

Las HEK-293T son una línea celular procedente de células de riñón de embrión humano. Para su cultivo, se sembraron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Sigma) suplementado con suero fetal a una concentración final del 10 % (v/v) y se mantuvieron mediante subcultivos a una proporción 1:3 cada 2 o 3 días. Para los experimentos de expresión de plásmidos, p-YFP y p-Mdm2-YFP, las células se resembraron en placas de poliestireno, recubiertas de PDL, a una densidad de 10^5 células/cm².

3. MODELO DE ISQUEMIA EXPERIMENTAL *IN VITRO*

El protocolo de isquemia experimental realizado fue puesto a punto previamente en el grupo de laboratorio (Angeles Almeida, Delgado-Esteban, Bolaños, & Medina, 2002; María Delgado-Esteban et al., 2002). Este modelo se basa en la incubación de las neuronas corticales en cultivo primario en un medio con oxígeno reducido (0,2-1 %) y ausencia total de glucosa, en un incubador de hipoxia, según el protocolo que se detalla a continuación (Angeles Almeida et al., 2002; María Delgado-Esteban et al., 2002; Gomez-Sanchez et al., 2011).

Para llevar a cabo la isquemia experimental *in vitro*, las neuronas se incubaron durante 90 minutos a 37°C en un incubador de hipoxia con *airlock* (Forma 3141 *Water Jacketed CO₂*; Thermo Scientific, Barcelona, España) (N₂ 95 %, CO₂ 5 %, O₂ < 1 %), sustituyendo el medio de cultivo completo por *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS: NaCl 134,2 mM, KCl 5,26 mM, KH₂PO₄ 0,43 mM, NaHCO₃ 4,09 mM, Na₂HPO₄·2H₂O 0,33 mM, HEPES 20 mM, CaCl₂·2H₂O 4 mM, pH 7,4) previamente gaseado durante 5 minutos con N₂ comercial.

Esta condición se denominó **OGD** (*Oxygen-Glucose Deprivation*). Se considera que en estas condiciones experimentales se reproducen de forma representativa los procesos fisiopatológicos asociados a la isquemia (Angeles Almeida et al., 2002).

Tras la isquemia experimental, el medio de incubación fue reemplazado por medio Neurobasal de cultivo sin B27 y las neuronas se mantuvieron en una atmosfera estándar de cultivo (aire 95 %, CO₂ 5 %, O₂ 21 %) durante distintos tiempos. Estos periodos se denominaron tiempos de reoxigenación.

Paralelamente, las neuronas pertenecientes al mismo cultivo primario se incubaron en medio HBSS suplementado con glucosa 5,5 mM, en una atmosfera estándar de cultivo, durante el tiempo de OGD. Esta condición se denominó **Normoxia** (Nx).



Esquema 11. Protocolo de isquemia experimental *in vitro*. Representación de las condiciones y tiempos utilizados durante el desarrollo del protocolo de isquemia experimental (OGD). Paralelamente, las neuronas se incubaron en condiciones de Normoxia.

4. MODELOS DE PRECONDICIONAMIENTO *IN VITRO*

El preconditionamiento se define como un estímulo subletal (por debajo del umbral de daño) que es capaz de producir en un órgano, tejido o célula, una resistencia transitoria frente a un daño isquémico prolongado. En los últimos años, se ha descrito que episodios breves de un estímulo subtóxico en el cerebro inducen una respuesta endógena que le ayuda a tolerar un daño isquémico subsiguiente (Ulrich Dirnagl et al., 2003; Kazuo Kitagawa et al., 1991; Stetler et al., 2008).

4.1. MODELO EXPERIMENTAL DE PRECONDICIONAMIENTO FARMACOLÓGICO

Entre los diversos tipos de agentes preconditionantes definidos hasta la actualidad, la estimulación, a concentraciones subtóxicas, de los NMDA-R constituye un modelo validado de preconditionamiento farmacológico capaz de inducir una respuesta endógena que provoca la tolerancia neuronal frente a la isquemia u otros estímulos excitotóxicos (Ulrich Dirnagl et al., 2003; Durukan & Tatlisumak, 2010; Grabb & Choi, 1999; Tauskela et al., 2001).

Dicho modelo se basa en la exposición de las neuronas en cultivo primario a una dosis, por debajo del umbral de toxicidad, de NMDA, derivado aminoácido que actúa como agonista específico del NMDA-R y mimetiza la acción del glutamato (Jimenez-Blasco et al., 2015; Soriano et al., 2006).

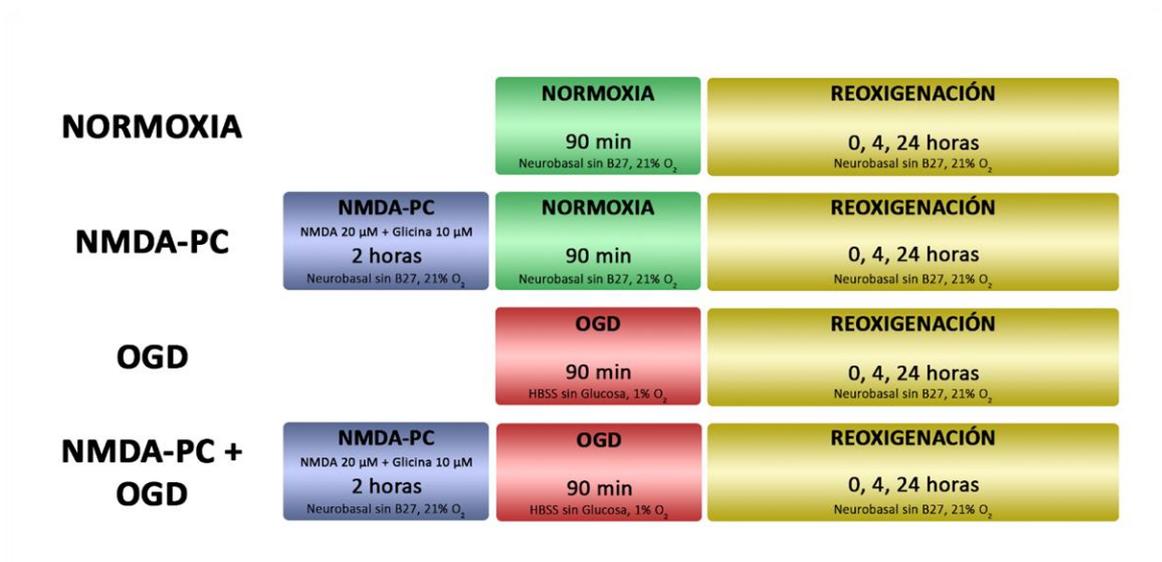
4.1.1. Precondicionamiento neuronal e isquemia experimental (NMDA-PC + OGD)

Las neuronas se incubaron en medio Neurobasal sin B27 y en presencia de NMDA 20 μ M (Sigma-Aldrich) y de glicina 10 μ M (Sigma-Aldrich), cofactor esencial del NMDA-R de glutamato, a 37°C en condiciones estándar de cultivo (aire 95 %, CO₂ 5 %, O₂ 21 %). El periodo de incubación fue de 2 horas, tras las cuáles se realizó el modelo de isquemia experimental u OGD.

4.1.2. Precondicionamiento neuronal (NMDA-PC)

Las neuronas se expusieron al modelo de PC mediante estimulación de los NMDA-R durante las 2 horas, tras las cuales no se aplicó ningún estímulo dañino.

Finalmente, en las cuatro condiciones (Nx, NMDA-PC, OGD y NMDA-PC+OGD), las neuronas se incubaron en condiciones de Normoxia a distintos tiempos de reoxigenación (0, 4 o 24 horas) en medio neurobasal y en ausencia de B27.



Esquema 12. Modelo de preconditionamiento farmacológico en cultivo de neuronas corticales de ratón. Esquema de las condiciones y tiempos utilizados durante el desarrollo experimental del modelo de NMDA-PC y posterior isquemia experimental (NMDA-PC+OGD). Paralelamente, las neuronas se incubaron en condiciones de isquemia experimental (OGD), de normoxia (Nx) o de preconditionamiento sin daño posterior (NMDA-PC).

4.2. MODELO EXPERIMENTAL DE PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO

El IPC es la primera forma descrita de inducción de tolerancia isquémica. Este modelo se basa en la aplicación de breves episodios de isquemia subletal previos al daño isquémico letal (K Kitagawa et al., 1990; Murry et al., 1986). El efecto protector del IPC dependerá de la duración del estímulo y del intervalo de aplicación entre éste y el daño, entre otros (Takaaki Kirino, 2002).

El modelo de IPC utilizado consistió en someter a las neuronas a un breve episodio de isquemia experimental de 20 minutos y 2 horas antes de un daño isquémico letal o prolongado (OGD), explicado previamente en el Apartado 3 de Material y Métodos de la presente memoria. Este modelo ha sido validado previamente por otros autores y se utiliza como herramienta experimental con objeto de inducir una tolerancia temprana neuronal (Grabb & Choi, 1999; Lin, Chen, & Gean, 2008).

4.2.1. Precondicionamiento isquémico neuronal e isquemia experimental (IPC + OGD)

Las neuronas se incubaron, durante 20 minutos, a 37°C en el incubador de hipoxia (N₂ 95 %, CO₂ 5 %, O₂ < 1 %), sustituyendo el medio de cultivo completo por HBSS previamente gaseado durante 5 minutos con N₂ comercial, tiempo necesario para reducir los niveles de O₂ por debajo del 1%. Tras ello, el medio fue reemplazado por Neurobasal sin B27 y las neuronas se mantuvieron en una atmosfera estándar de cultivo (aire 95 %, CO₂ 5 %, O₂ 21 %) durante un tiempo de reoxigenación de 2 horas.

A continuación, se realizó el modelo de OGD siguiendo el protocolo previamente descrito.

4.2.2. Precondicionamiento neuronal (IPC)

Paralelamente, las neuronas se sometieron al modelo de precondicionamiento isquémico de 20 minutos, tras los cuales no se realizó ningún daño. Posteriormente, las neuronas se incubaron a distintos tiempos de reoxigenación (0, 4 o 24 horas) en medio Neurobasal sin suplemento antioxidante B27 y en presencia de oxígeno.



Esquema 13. Modelo de precondicionamiento isquémico en neuronas corticales de ratón en cultivo primario. Esquema que muestra las condiciones y tiempos utilizados durante el desarrollo experimental del modelo de IPC previo a la isquemia experimental (IPC+OGD). Paralelamente, las neuronas se incubaron en condiciones de isquemia experimental (OGD), de normoxia (Nx) o de precondicionamiento sin daño posterior (IPC).

5. TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS

El resto de los tratamientos farmacológicos utilizados en el presente trabajo se recogen en la tabla siguiente (Tabla 4). En la presente memoria, la duración y el momento de aplicación de cada uno de los tratamientos se especifica en los experimentos donde se utilizaron.

COMPUESTO	FUNCIÓN	PROCEDENCIA	CONCENTRACIÓN
Dizocilpina (MK-801)	Antagonista no-competitivo de los NMDA-R	Sigma-Aldrich	10 μ M
Nutlin-3a	Inhibidor de la unión MDM2-p53	Sigma-Aldrich	2 μ M
Etopósido	Derivado de la podofilotoxina, inductor de apoptosis	Sigma-Aldrich	1 μ M
Wortmanina	Inhibidor covalente de las fosfoinositol-3-kinasas (PI3Ks)	Sigma-Aldrich	100nM

Tabla 4. Inhibidores farmacológicos empleados durante el desarrollo de los modelos de preconditionamiento e isquemia experimental. La tabla recoge los distintos inhibidores empleados, su función y procedencia, así como la concentración a la que se utilizaron.

6. TRANSFECCIONES CELULARES

6.1. SILENCIAMIENTO GÉNICO

La reducción en la expresión específica de algunas proteínas se realizó utilizando la técnica del silenciamiento de RNA de interferencia o siRNA (*small interfering RNA*). Los siRNA se introdujeron en las neuronas mediante lipotransfección, sirviéndonos para ello del reactivo catiónico *Lipofectamine RNAiMAXTM* (Invitrogen) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, la Lipofectamina[®] se diluyó previamente en el medio Opti-MEM[®] (Gibco). Paralelamente, se prepararon diluciones con el siRNA diana

y siRNA control y se mezclaron siguiendo una proporción 1:1. A continuación, las mezclas se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente para facilitar la formación de los liposomas con el siRNA. Por último, las soluciones de siRNA-Lipofectamina® se añadieron sobre el medio de cultivo, a una concentración final de 9 nM (Maria Delgado-Esteban et al., 2007; Jimenez-Blasco et al., 2015).

La eficiencia de los silenciamiento génicos se verificó utilizando la técnica de la transferencia tipo Western (ver Apartado 7) y la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-qPCR) (ver Apartado 11). Los siRNA utilizados fueron los siguientes:

siRNA	DIANA	SECUENCIA 5´-3´	CONDICIONES	CASA COMERCIAL
SiControl	Control negativo N° 1 Silencer™ Select. Sin similitud significativa con secuencias genéticas de ratón		9 nM 72 horas	Ambion® Invitrogen®
siAkt	<i>Akt</i>	CUCAAGUACUCAUCCAGA	9 nM 72 horas	Ambion® Invitrogen®

Tabla 5. Secuencias de los siRNAs utilizados durante los experimentos de silenciamiento. Se muestran las secuencias de la hebra sentido, así como las condiciones de transfección de cada uno de los siRNA utilizados en los experimentos.

6.2. TRANSFECCIONES CON PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN

En la expresión ectópica de *MDM2* se empleó el plásmido MDM2p-Mdm2-YFP regalo de Uri Alon y Galit Lahav (Addgene plásmido # 53962; <http://n2t.net/addgene:53962>; RRID: Addgene_53962) para la transfección de células de mamíferos. Dicho plásmido permite la expresión de la proteína MDM2 fusionada a la región C-terminal de la proteína amarilla fluorescente (YFP, *yellow fluorescent protein*) y bajo el promotor humano de *MDM2*. Así, podemos seguir la localización celular de la proteína, comprobar la eficiencia de transfección mediante microscopía y seleccionar las células transformadas analizándolas por citometría de flujo.

Las neuronas se transfectaron 24 horas antes de su incubación en las cuatro condiciones (Nx, IPC, OGD y IPC+OGD) descritas previamente. Para ello, se trataron con el reactivo catiónico *Lipofectamina LTX Plus Reagent™* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, California, EE. UU.), y con el plásmido MDM2p-Mdm2-YFP (p-Mdm2-YFP), a una concentración final de 1,5 $\mu\text{g}/10^6$ células. Paralelamente, se transfectaron neuronas con el plásmido control vacío (p-YFP) (Veas-Pérez de Tudela, Maestre, et al., 2015).

La transfección se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. La Lipofectamina® se diluyó en el medio Opti-MEM® y se prepararon diluciones del plásmido control y del plásmido de expresión ectópica de MDM2. Ambas soluciones se mezclaron en proporción 1:1 y se incubaron 5 minutos, facilitando la formación de los liposomas que contendrán el ADN plasmídico en su interior. Finalmente, el complejo plásmido - Lipofectamina® se añadió al cultivo. La expresión se verificó mediante transferencia tipo *Western*.

7. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ANÁLISIS DE TRANSFERENCIA TIPO *WESTERN BLOT*

7.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

7.1.1. Extracción de proteínas totales

La obtención del extracto proteico total se realizó de la siguiente manera: se lavaron las células con PBS (NaCl 136 mM; KCl 2,7 mM; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7,8 mM; KH_2PO_4 1,7 mM; pH 7,4) a 4°C y se lisaron con tampón de lisis NP-40 1 % (1 % nonidet NP40, EDTA dipotásico 0,5 M, Tris 1 M pH 8,0; NaCl 5 M, 10 % glicerol) suplementado con inhibidores de fosfatasa (Na_3VO_4 1 mM; NaF 10 mM) y de proteasas (fluoruro de

fenilmetilsulfonilo 100 μ M; aprotinina 50 μ g/ml; leupeptina 50 μ g/ml; pepstatina 50 μ g/m; anti-papaína 50 μ g/ml; amastatina 50 μ g/ml; bestatina 50 μ g/ml y el inhibidor de tripsina soybean 10 μ g/ml). Los lisados se mantuvieron en hielo 10 minutos y se agitaron a 4°C en un orbital vertical durante 20 minutos. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 13.000 x g durante 10 minutos y se transfirió el sobrenadante (proteínas celulares) a un tubo limpio para su congelación a -80°C.

7.1.2. Fraccionamiento subcelular de proteínas

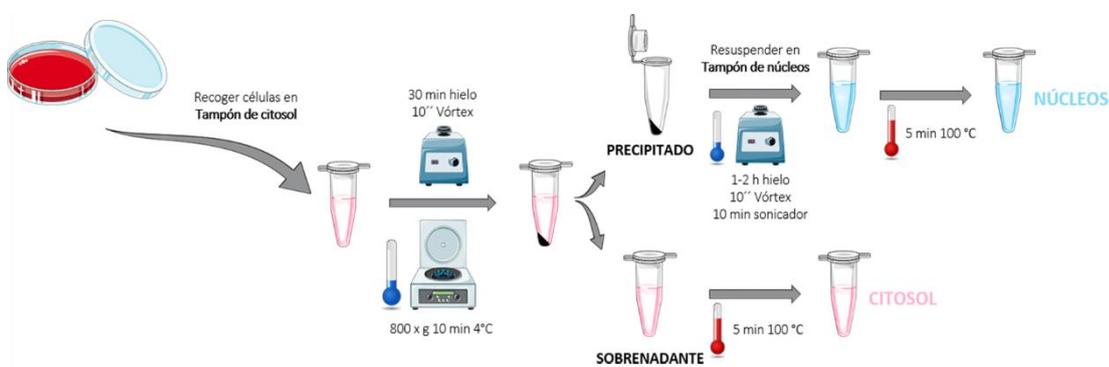
Fracción nuclear y citosólica

El aislamiento de las fracciones nuclear y citosólica de las neuronas se llevó a cabo siguiendo el protocolo de fraccionamiento subcelular diferencial utilizado previamente en nuestro laboratorio (Maria Delgado-Esteban et al., 2013; Gomez-Sanchez et al., 2011; Veas-Pérez de Tudela, Maestre, et al., 2015) (Esquema 14). Este método se basa en el uso, en primer lugar, de una solución de lisis débil (tampón de citosoles) que fragmenta las membranas celulares dejando los núcleos intactos. Posteriormente, en una segunda fase, los lisados se tratan con una solución de lisis fuerte (tampón de núcleos) que permite la rotura de los núcleos celulares y la obtención de dichas proteínas.

Para ello, las neuronas se sembraron en placas de 60 cm² y, tras los experimentos, se lavaron con PBS suplementado con MgCl₂ 1 mM a 4°C. Seguidamente, se lisaron las células y se recogieron en tampón de citosoles (HEPES 10 mM pH 7,9; MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, NP40 0,1 % v/v y sacarosa 300 mM) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas. La muestra se resuspendió 15 veces con micropipeta y se mantuvo en hielo al menos 30 minutos, intercalando ciclos de resuspensión-reposo en frío. Tras los ciclos, se comprobó el aislamiento de los núcleos intactos y la rotura de las membranas plasmáticas con un microscopio de campo claro. Posteriormente, se centrifugó a 800 x g durante 10 minutos a 4°C con objeto de separar el contenido citosólico (sobrenadante) del nuclear (precipitado o *pellet*). Así, la

fracción citosólica se traspasó a un tubo nuevo, dónde se hirvió durante 5 minutos y se congeló a -80°C .

A su vez, la fracción nuclear (*pellet*) se resuspendió en tampón de núcleos (HEPES 50 mM pH 7,9; MgCl_2 1,5 mM, KCl 10 mM, NaCl 0,5 mM, EDTA 1 mM, NP40 1 % v/v) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas, con ayuda de una micropipeta y se dejó durante 1 hora en hielo. Finalmente, se hirvió 5 minutos y se sonicó durante 10 minutos, congelándose los núcleos aislados a -80°C (Veas-Pérez de Tudela, Maestre, et al., 2015).



Esquema 14. Método de fraccionamiento subcelular. El esquema muestra las distintas fases del fraccionamiento nuclear y citosólico.

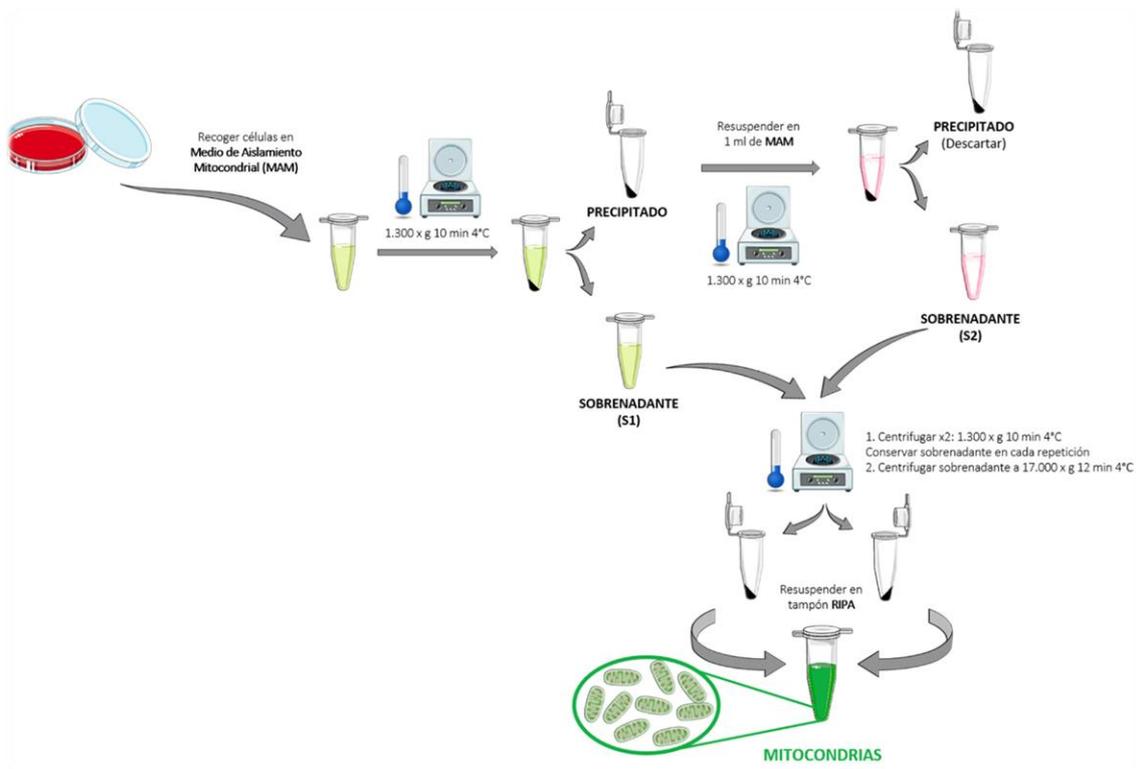
Fracción mitocondrial

Con objeto de aislar la fracción mitocondrial, se utilizó un protocolo de fraccionamiento diferencial (A Almeida & Medina, 1998) resumido en el Esquema 15. Para ello, las neuronas se sembraron en placas de 145 cm^2 y se lavaron con PBS a 4°C para su lisis posterior en medio de aislamiento mitocondrial (MAM; sacarosa 320 mM, EDTA dipotásico 1 mM, Tris-HCl 10 mM ajustada a pH 7,4), suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas.

Tras centrifugar a $600 \times g$ durante 5 minutos a 4°C , el precipitado celular se resuspendió en 1 ml de MAM y se sometió a un proceso de homogeneización con pistilo de teflón para el lisado de la membrana plasmática, manteniendo intactas las mitocondrias. Tras 18-20 agitaciones a 600 rpm, se retiró una alícuota de homogenado

celular y lo restante se centrifugó a 1.300 x g durante 10 minutos, conservando el sobrenadante (S1) con la fracción mitocondrial.

El precipitado se resuspendió en 1 ml de MAM, se centrifugó a 1.300 x g durante 10 minutos y se conservó el nuevo sobrenadante (S2). Este protocolo se repitió hasta dos veces más con cada una de las fracciones (S1 y S2), hasta la completa desaparición del precipitado. Ambas fracciones se sometieron a una nueva centrifugación de 17.000 x g durante 10 minutos a 4°C y se mantuvieron los precipitados. Se obtiene así la fracción mitocondrial, la cual se resuspende en tampón RIPA (dodecilsulfato sódico; SDS al 1 %, EDTA 10 mM, Triton Tx-100 al 1 % v/v, NaCl 150 mM, Na₂PO₄ 10 mM a pH 7,0) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa.

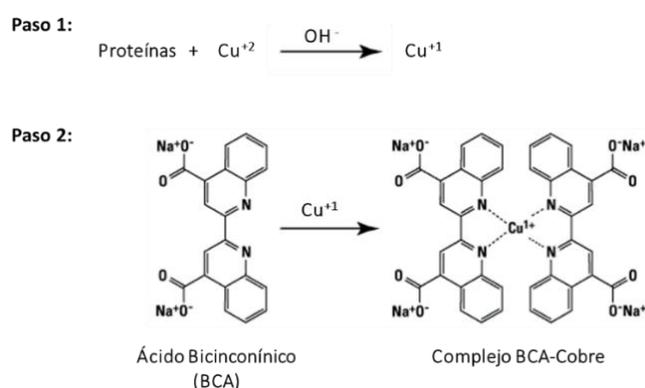


Esquema 15. Método de fraccionamiento subcelular.

7.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

La cuantificación de la concentración de proteínas de las muestras se realizó mediante el ensayo del ácido bicinonónico (BCA; *Pierce™*, ThermoScientific, Illinois, EE. UU). Este

método colorimétrico está basado en la reducción del Cu^{2+} (azul) a Cu^{1+} , en presencia de proteínas y medio alcalino (reacción de Biuret). La cantidad de Cu^{2+} reducido es proporcional a la cantidad de proteína presente en la solución. Así, el catión Cu^{1+} generado reacciona con el BCA, generándose un complejo de color púrpura que absorbe luz a una longitud de onda de 562 nm y que es proporcional a la concentración de proteínas de la muestra. La absorbancia se midió espectrofotométricamente en un *Multiskan Ascent* (Thermo Electron Corp, Basingstoke, Reino Unido) y se calcularon las concentraciones utilizando la albúmina sérica bovina (BSA) como estándar para el cálculo de la recta patrón. Las determinaciones se realizaron por triplicado.



Esquema 16. Método del ácido bicinconínico (BCA) para la determinación de la concentración de proteínas.

7.3. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN SDS-PAGE

Con objeto de analizar la expresión de las proteínas de interés, los extractos proteicos, previa determinación de su concentración por el método de BCA, se sometieron a una electroforesis en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS) (condiciones desnaturizantes). Para ello, en función del peso molecular de las proteínas objeto de estudio, se utilizaron geles de distintos porcentajes de acrilamida. Los geles utilizados están constituidos por:

- Un gel concentrador o *stacking*, en la parte superior, de porcentaje constante de acrilamida (acrilamida: bisacrilamida 29: 1 (Bio-Rad Laboratories, California, EEUU) al 3 % en Tris-HCl 1 M pH 6,8 con SDS 10 %; persulfato amónico (PSA) 10 % y TEMED (N,N,N,N'-tetrametilendiamina) 0,1 %.
- Un gel separador o *running*, en la parte inferior, de distintos porcentajes de acrilamida: 8, 10, 12 o 15 % en Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 con SDS 10 %, PSA 10 % y TEMED 0,08 %.

Los geles empleados para la expresión de caspasa-3 activa se fabricaron con una acrilamida de distinto porcentaje (acrilamida: bisacrilamida 29,2: 0,8).

La muestra proteica (10-100 µg) se resuspendió en tampón de carga (β -mercaptoetanol 4 % v/v, SDS 8 % p/v, azul de bromofenol 0,02 % p/v, glicerol 4 % v/v y Tris-base 250 mM), se hirvió 5 minutos a 100°C y se centrifugó a 13.000 x g durante 5 minutos. Para la identificación de los pesos moleculares se utilizó un marcador de peso molecular (*Page Ruler™ Prestained Protein Ladder*, Thermo Scientific).

Posteriormente, las proteínas se separaron utilizando un sistema de electroforesis vertical (*MiniProtean-3®*, BioRad Laboratories, California, EE. UU.) y tampón de electroforesis (Tris 25 mM; glicina 200 mM y SDS al 0,1 % p/v, pH 8,3). Una vez concluida la electroforesis, los geles se sometieron a electrotransferencia e inmunodetección mediante la técnica de Western Blot que se describe a continuación.

7.4. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR *WESTERN BLOT*

Las proteínas separadas en geles SDS-PAGE se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa (Hybond®, Amersham Biosciences, Nueva Jersey, EE. UU) utilizando el sistema *Mini-Transblot* (Bio-Rad) y tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20 % v/v, pH 8,3). Con objeto de comprobar la correcta

transferencia de proteínas, las membranas de nitrocelulosa se tiñeron con una solución de rojo Ponceau (Sigma-Aldrich) durante 5 minutos. Seguidamente, se eliminó la tinción realizando lavados con TTBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, Tween-20 al 0,1 % v/v; pH 7,5).

Para evitar la formación de las uniones inespecíficas de los anticuerpos, las membranas se bloquearon durante 1 hora con leche desnatada (Sveltesse, Nestle) al 5 % p/v en TTBS a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron a 4°C y durante toda la noche, en una solución de BSA o leche al 2 % p/v en TTBS que contenía el anticuerpo primario frente a la proteína de estudio y que se recoge en la tabla siguiente:

ANTICUERPO	ESPECIE	DILUCIÓN	REFERENCIA	CASA COMERCIAL
Anticuerpos Primarios				
p53	Ratón	1/1.000	(Clon 1C12) 2524	Cell Signaling
pp53 (Ser15)	Ratón	1/500	9286	Cell Signaling
p21	Ratón	1/500	556431	BD
PUMA	Conejo	1/1.000	Ab54288	Abcam
Caspasa 3 activa (Asp-175)	Conejo	1/1.000	96615	Cell Signaling
MDM2	Ratón	1/500	(Clon 2A10) Ab-16895	Abcam
Lámina B	Ratón	1/1.000	Sc-374015	Santa Cruz
GAPDH	Ratón	1/40.000	4300	Ambion
Akt	Conejo	1/1.000	9272	Cell Signalling
pAkt (Ser473)	Conejo	1/500	9271	Cell Signalling
pMDM2 (Ser166)	Conejo	1/500	Ab131355	Abcam
GFP	Conejo	1/1000	Ab290	Abcam
Anticuerpos Secundarios				
Ratón	Cabra	1/10.000	170-6516	BioRad
Conejo	Cabra	1/10.000	Sc-2030	Santa cruz

Tabla 6. Anticuerpos utilizados durante el análisis de la expresión proteica por transferencia tipo *Western*. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la inmunodetección de proteínas por transferencia tipo *Western blot*, especificando su especie, dilución empleada, referencia y casa comercial.

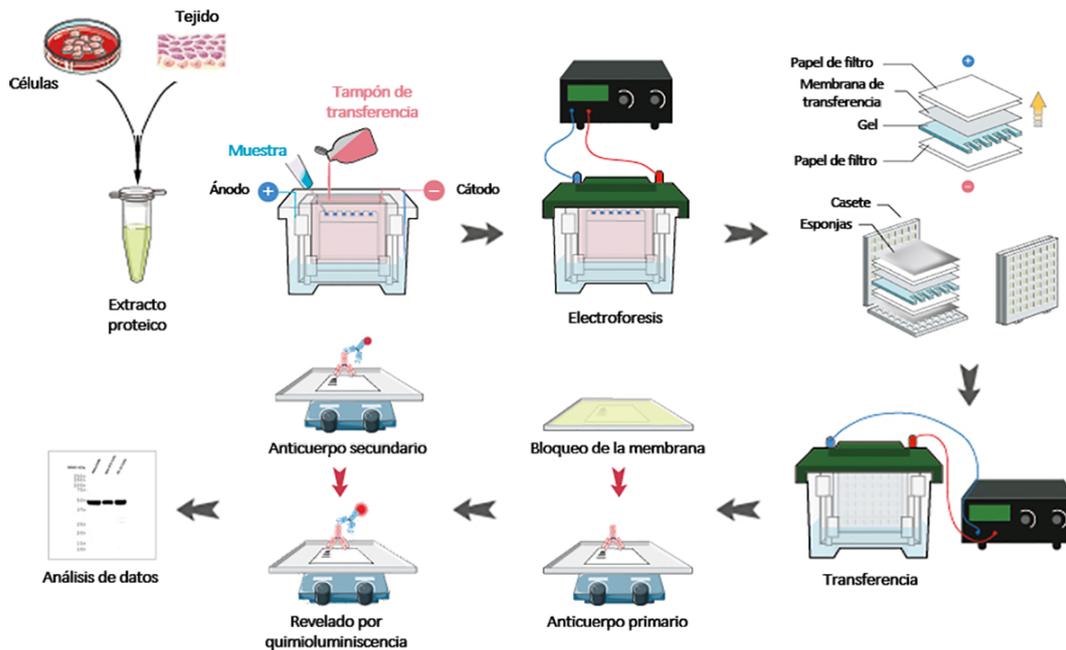
Como control de carga se utilizó anti-GAPDH (Ambion, Austin, Texas, EE.UU.) para extractos totales y fracción citosólica, y anti-Lámina B (Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg, Alemania) para la fracción nuclear.

Al día siguiente, con objeto de eliminar el exceso de anticuerpo primario, las membranas se lavaron 3 veces durante 5 minutos con TTBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes, conjugados con la peroxidasa de rábano, recogidos en la Tabla 6. Dicha incubación se realizó en TTBS con leche al 2 % durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron 3 lavados en TTBS y un último lavado en TBS (TTBS sin Tween-20), para evitar la posible interferencia del Tween-20 con algunos reactivos de revelado utilizados. Finalmente, para la detección de la proteína de interés, las membranas se incubaron con los reactivos de quimioluminiscencia (ver Tabla 7) y siguiendo en cada caso las instrucciones del fabricante:

REACTIVO	CASA COMERCIAL
<i>Super Signal™ West Dura Extended Duration Substrate</i>	Thermo Scientific™
<i>SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate</i>	Thermo Scientific™
<i>Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate</i>	Thermo Scientific™
<i>Immobilon Western Chemiluminiscent HRP Substrate</i>	Merck Millipore
<i>Western Blotting Luminol Reagent</i>	Santa Cruz Biotechnology

Tabla 7. Reactivos de quimioluminiscencia utilizados para la detección de proteínas por *Western blot*.

Para la detección de la señal emitida, las membranas se expusieron a una película de autorradiografía (*Fuji Medical X-Ray Film*, Fujifilm) durante distintos tiempos. Las cuantificaciones se llevaron a cabo con el software *ImageJ64* y normalizando las condiciones de estudio con el control de carga. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias de cantidad relativa de proteína y en referencia a la condición control del experimento.



Esquema 17. Esquema del método de análisis de la expresión proteica mediante transferencia *Western blot*. Se muestra la electroforesis SDS-PAGE seguida de la transferencia a membranas de nitrocelulosa e inmunodetección por quimioluminiscencia. Creado y modificado a partir de imágenes de *CD Creative Diagnostics*®.

7.5. “STRIPPING” DE MEMBRANAS DE NITROCELULOSA

Ocasionalmente, las membranas de nitrocelulosa del *Western Blot* se reutilizaron para incubarlas de nuevo con un anticuerpo primario distinto al inicial. Para ello, se realizó un *stripping*, incubando las membranas en el tampón *Restore Western Blot Stripping Buffer* (Thermo Scientific) durante 10 minutos. Posteriormente, se lavaron 3 veces con TTBS a temperatura ambiente y se bloqueó la membrana con leche al 5 % (p/v). Finalmente, se reincubaron de nuevo con distintos anticuerpos, siguiendo el protocolo descrito anteriormente para la inmunodetección y transferencia tipo *Western*.

7.6. INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

La inmunoprecipitación es una técnica de aislamiento de proteínas de una solución utilizando un anticuerpo que se une específicamente a ella. De este modo, se puede determinar interacciones proteína-proteína, así como la detección de posibles complejos formados entre ellas.

7.6.1. Unión del anticuerpo a las *Dynabeads*[®]

Para inmunoprecipitar proteínas, utilizamos proteína A *Dynabeads*[®] (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, California, EE. UU.), compuesta por gránulos superparamagnéticos uniformes de 2,8 μm con proteína A recombinante (aproximadamente 45 kDa) unida por enlace covalente a la superficie.

Se realizaron 3 lavados con PBS pH 8,0 en un volumen cuatro veces superior al volumen de las *Dynabeads*[®], sirviéndonos para ello del *DynaMag*[™], una superficie imantada que permitirá la retención del material unido a las *Dynabeads*[®]. Posteriormente, se incubó la solución de gránulos magnéticos con el anticuerpo específico de la proteína a inmunoprecipitar, en PBS pH 8,0 durante toda la noche a 4°C en agitación orbital.

7.6.2. Crosslinking

A continuación, se llevó a cabo la unión covalente o *crosslinking* del anticuerpo con los gránulos magnéticos, evitando de esta forma una posterior co-elución con la proteína de interés.

Para ello, se resuspendieron las *Dynabeads*[®] en una solución de BS3 (bis (Sulfosuccinilmidil suberato; Thermo Scientific) 5 mM en tampón de conjugación (Tetraborato sódico 0,1 M, ácido bórico 0,1 M, pH 9,0) y durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo Tris HCl 1 M pH 7,5 durante

15 minutos y realizando un lavado posterior con tampón de almacenamiento (Tetraborato sódico 0,1 M, ácido bórico 0,1 M, pH 8,0). Finalmente, se almacenaron a 4°C hasta su uso.

7.6.3. Inmunoprecipitación con las *Dynabeads*[®]

Los extractos proteicos (80-100 µg) obtenidos en tampón NP-40 (Ver apartado 7.1. de Material y Métodos) se incubaron con 10 µl de *Dynabeads*[®] unidas al anticuerpo frente a la proteína de interés durante la noche, a 4°C y en agitación orbital. A continuación, se lavaron con PBS pH 8,0 para descartar las proteínas no ligadas, y se resuspendieron en 30 µl de tampón de carga. Por último, con el fin de eluir la proteína unida al anticuerpo, se calentaron las muestras a 70°C durante 10 minutos. Con ayuda del *DynaMag*[™] se aislaron las partículas magnéticas del inmunoprecipitado, utilizando este último para la detección de proteínas por análisis tipo *Western Blot* (Ver Apartado 7).

Las *Dynabeads*[®] se reutilizaron 2-3 veces, lavándose y conservándose en tampón de almacenamiento a 4°C.



Esquema 18. Inmunoprecipitación de proteínas mediante proteína A *Dynabeads*[®]. El esquema muestra las distintas etapas del método, desde la unión del anticuerpo a las *Dynabeads*[®] y *crosslinking* hasta la inmunoprecipitación de proteínas de interés mediante el *DynaMag*[™].

8. DETERMINACIÓN DE LA APOPTOSIS NEURONAL POR CITOMETRÍA DE FLUJO

La muerte celular por apoptosis se determinó mediante la técnica de la citometría de flujo, tras incubar las células con anexina V conjugada con el fluorocromo APC o alofococianina (Anexina V-APC, Immunostep, Salamanca, España) y 7-amino-actinomicina D (7-AAD) (Becton Dickinson Biosciences, Nueva Jersey, EE. UU). El método se basa en la detección de la fosfatidilserina (PS), un fosfolípido situado en la monocapa lipídica interna de las membranas celulares intactas, pero que se transloca al exterior en las células apoptóticas, quedando así expuesto a la superficie celular.

La anexina V es una proteína anticoagulante vascular con una gran afinidad por la PS. Por este motivo, unida a un fluorocromo adecuado, permite la identificación de las células apoptóticas a través de su unión a dicho fosfolípido en el exterior de la célula. No obstante, la anexina V también es capaz de unirse a la PS situada en el interior de las células que han perdido su integridad de membrana (consideradas como necróticas). Por ello, junto a la anexina V se utilizó 7-AAD, un colorante impermeable a la membrana plasmática que se une específicamente al ADN de las células necróticas. Así, sólo aquellas células inmunorreactivas para la anexina V, que mostraron ser negativas para el 7-AAD, (Anexina V⁺/7-AAD⁻) se consideraron neuronas apoptóticas (Maria Delgado-Esteban et al., 2013; Gomez-Sanchez et al., 2011).

En el análisis de la muerte por apoptosis mediante citometría de flujo, las neuronas se recolectaron suavemente con EDTA tetrasódico 1 mM en PBS y se resuspendieron en tampón de conjugación (HEPES 10 mM; NaCl 140 mM; CaCl₂ 2,5 mM; pH 7,4). Posteriormente, se incubaron con Anexina V-APC y 7-AAD durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, tras la incubación, se añadió tampón de conjugación suficiente para conseguir una concentración celular de aproximadamente 10⁶ células/ml.

La detección de las señales correspondientes a la anexina V y del 7-AAD se realizó en los canales FL4 y FL3 respectivamente, en un citómetro de flujo *FACScalibur* (BD Biosciences), equipado con un haz láser de argón de 15 mW sintonizado a 488 nm y

utilizando el programa *CellQuest™* para adquisición de eventos. El análisis de los resultados se realizó con el programa *Paint-A-Gate™ PRO* de BD Biosciences. El umbral del analizador se ajustó en el canal correspondiente del citómetro de flujo para excluir la mayoría de los restos o agregados celulares. Con ello, se descartó el ruido de fondo debido a la ruptura de neuritas y extensiones celulares, y a los dobletes o tripletes formados por uniones intercelulares.

Los resultados se expresaron como porcentaje de neuronas apoptóticas, siendo estas las células positivas para Anexina-V y negativas para 7-AAD (Anexina V⁺/7-AAD⁻) (Imagen 3). En cada ensayo experimental, se seleccionaron entre 50.000 y 00.000 eventos y se realizaron los análisis por triplicado para cada una de las condiciones estudiadas.

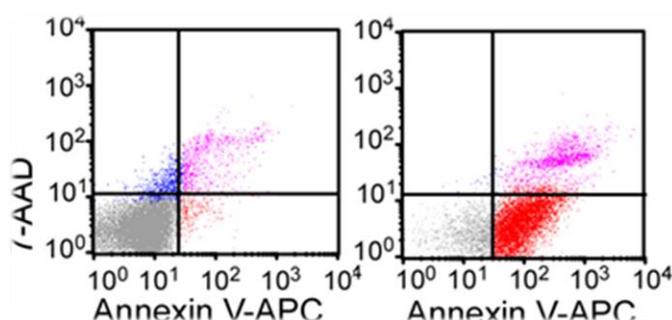


Imagen 3. Registros tipo de citometría de flujo previa tinción con Anexina V-APC y 7-AAD. Se consideran las células anexina V-APC⁺/7AAD⁻ (rojo) como apoptóticas.

9. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA ($\Delta\Psi_m$) COMO ÍNDICE DE INTEGRIDAD MITOCONDRIAL

La mitocondria juega un papel fundamental en la fisiología celular, generando la mayoría de la energía celular (ATP) mediante el proceso de fosforilación oxidativa. La cadena de transporte de electrones mitocondrial permitirá la transferencia de los

electrones, promoviendo un gradiente electroquímico que conducirá a la síntesis de ATP.

El correcto funcionamiento de los complejos mitocondriales permitirá la generación de un potencial de membrana mitocondrial, parámetro clave para evaluar la función de dicho orgánulo (Chen, 1988). Así, una disminución del potencial de membrana mitocondrial se relacionará con un daño celular.

La evaluación del potencial de membrana se realizó mediante citometría de flujo, siguiendo las instrucciones del sistema comercial *MitoProbe™ DiIC₁ Assay Kit for Flow Cytometry* (Molecular Probes, Invitrogen, Oregón, EE. UU). La sonda DiIC₁(5) (1,1',3,3,3',3'-hexametilindolcarbocianina) (Imagen 4), debido a su carácter catiónico, se acumula en las mitocondrias polarizadas. Cuando las células se someten a condiciones o agentes que alteran el potencial mitocondrial, la tinción con DiIC₁(5) disminuye, siendo un índice de despolarización mitocondrial.

Las células se resuspendieron en PBS y se incubaron con 50 nM de la sonda comercial durante 30 minutos a 37°C, utilizando un baño con agitación suave y protegidas de la luz. Tras la incubación, se eliminó el exceso de sonda mediante centrifugación a 700 x g durante 3 minutos, resuspendiéndose las células sedimentadas en PBS.

El potencial determinado se expresó como porcentaje. Para definir el valor basal de $\Delta\Psi_m$ (0 %), se incubaron las células con el desacoplador mitocondrial cianuro de carbonilo 3-clorofenilhidrazona (CCCP) 10 μ M durante 15 minutos, anotándose el valor de la intensidad de fluorescencia. La señal de fluorescencia se analizó en el canal FL4 del citómetro de flujo *FACScalibur* (BD Biosciences) y se evaluaron entre 50.000-100.000 eventos por triplicado y condición, utilizando los programas *CellQuest™* para adquisición de eventos y *Paint-A-Gate™ PRO* para el análisis de estos (BD Biosciences) (Gomez-Sanchez et al., 2011; Veas-Pérez de Tudela, Maestre, et al., 2015).

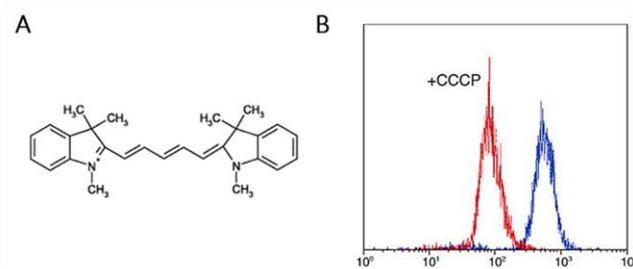


Imagen 4. Análisis del potencial de membrana mitocondrial utilizando la sonda DilC₁. **(A):** Estructura de la sonda DilC₁, con alto carácter hidrofóbico, apta para atravesar las membranas mitocondriales. **(B):** Registro tipo de citometría de flujo que muestra el marcaje con la sonda catiónica DilC₁ (azul) de fluorescencia y el efecto junto con el desacoplador CCCP (rojo).

10. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA CASPASA 3

Las caspasas son enzimas mediadoras de los procesos de apoptosis y muerte celular, siendo la caspasa-3 una de las principales efectoras. Por ello, se utilizó la medida de la actividad de la enzima caspasa-3 como marcador apoptótico. La detección de su actividad se llevó a cabo mediante el método de fluorimetría *Caspase 3 Assay Kit, Fluorimetric* (Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este ensayo se basa en la hidrólisis del péptido sustrato *Ac-DEVD-AMC* (acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-metilcumarina) por la caspasa-3, resultando en la liberación de la fracción fluorescente *AMC* (7-amino-4-metilcumarina).

Para ello, las células se lisaron con tampón de lisis (HEPES 50 mM, CHAPS 5 mM, DTT 5 mM, pH 7,4) durante 20 minutos en hielo. A continuación, se añadió la mezcla de reacción que contiene el péptido sustrato *Ac-DEVD-AMC* (HEPES 20 mM, EDTA 2 mM, CHAPS 0,1 %, DTT 5 mM, *Ac-DEVD-AMC* 16 μ M, pH 7,4) y se mezcló previa transferencia a la placa de ensayo. La fluorescencia se midió durante 90 minutos, en intervalos de 15 minutos, en un *Fluoroskan Ascent FL* (Thermo Scientific) ($\lambda_{exc}=360$ nm, $\lambda_{em}=460$ nm). Los resultados se expresaron en nmol/ (min x mg proteína).



Esquema 19. Determinación de la actividad de la Caspasa 3. *Ac-DEVD-AMC*: acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-metilcumarina; *Ac-DEVD*: acetil-Asp-Glu-Val-Asp; *AMC*: 7-amino-4-metilcumarina.

Las longitudes de onda de excitación y de emisión de AMC son 360 nm y 460 nm, respectivamente. La concentración del AMC liberado puede calcularse a partir de una curva estándar determinada con soluciones de AMC definidas.

11. OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DEL RNA

11.1. EXTRACCIÓN DEL RNA TOTAL

La extracción de RNA se llevó a cabo con el kit comercial *Genelute™ Mammalian Total RNA Kit* (Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante. Tras 9 días en cultivo, las neuronas se lisaron con una mezcla de β -mercaptoetanol y solución de lisis (Sigma-Aldrich) en proporción 1:100 (v/v). A fin de evitar la degradación del RNA, los raspadores se trataron con solución libre de RNAsas (*RNase away*; Sigma) y agua di-etil piro-carbonato (DEPC) previo a la recogida de las células. Los lisados se filtraron a través de una columna de filtración (*Genelute Filtration Column*; Sigma-Aldrich) y se centrifugaron a 16.000 x g para eliminar los restos celulares y el ADN. Seguidamente, se añadió un volumen equivalente de etanol al 70 % en agua DEPC libre de RNAsas y se mezcló en un agitador vórtex. A continuación, se hizo pasar por una columna de unión (*Genelute Binding Column*; Sigma-Aldrich) donde se retuvo el RNA,

eliminándose el filtrado, para lavarse posteriormente con solución de lavado (*Wash Solution 1*).

Para evitar posibles contaminaciones de ADN genómico, la columna que contenía el RNA aislado se trató con 100 U de DNAsa I (DNase I, RNase-free, Roche) durante 15 minutos a temperatura ambiente, en un tampón de Tris-HCl 400 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 60 mM y CaCl₂ 10 mM; pH 7,9. Se lavó la columna de forma sucesiva con soluciones de lavado (*Wash Solution 1* y *Wash Solution 2 Concentrate/ethanol*; Sigma-Aldrich) para eliminar los restos de ADN restantes y permitir un secado de la columna. Por último, se eluyó el contenido de la columna con 50 µl de solución de elución (*Elution Solution*; Sigma-Aldrich) mediante centrifugado a 16.000 x g durante 1 minuto.

La concentración del RNA purificado se cuantificó con un espectrofotómetro UV-Vis *Nanodrop 2000* (Thermo Scientific). La ratio de absorbancia calculada entre 260 nm y 280 nm (A_{260} / A_{280}), que determina la pureza del RNA, fue de 1,8 - 2. La muestra se mantuvo congelada a -80°C hasta su uso posterior.

11.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL O CUANTITATIVA (RT-qPCR)

La técnica de RT-qPCR permite analizar la expresión diferencial de los genes de interés (Ver Tabla 8) y cuantificarlos de forma relativa respecto a un control interno de expresión constante (*housekeeping gene*).

Los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea gracias a la emisión de fluorescencia por parte de un fluorocromo, el *SYBR Green* (Applied Biosystems), el cual se intercala entre las hebras de ADN bicatenario. De esta forma, la fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de producto de PCR amplificado (amplicón).

Previo al análisis de la expresión de los genes de estudio, se procedió a la puesta a punto de la concentración de cada oligonucleótido empleado como cebador (*primer*) y se calcularon las eficiencias de amplificación de los cebadores diseñados con los

softwares *Geneious* (Biomatters Limited, Auckland, Nueva Zelanda) y *Amplifix* (Universidad de Marsella, Marsella, Francia). Se consideraron óptimas las eficiencias comprendidas entre el 85 y el 115 % (*Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR, Applied Biosystems*). Las eficiencias de cada *primer* son necesarias para poder comparar la expresión de los distintos genes mediante el Método Comparativo de Ct ($\Delta\Delta C_t$).

Las condiciones en las que se emplearon los distintos oligonucleótidos se resumen en la siguiente tabla:

GEN DIANA	SECUENCIA FORWARD 5' → 3'	SECUENCIA REVERSE 5' → 3'	CONC. (μ M)	EFICIENCIA (%)
<i>p53</i>	Producto comercial (BIORAD)		–	95 %
<i>MDM2</i>	CAGCAGCGAGTCCACAGAGA	TCCTGATCCAGGCAATCACCA	0,2	102 %
<i>Gapdh</i>	TCAGCAATGCCTCCTGCACC	GCATGGACTGTGGTCATGA	0,3	108 %

Tabla 8. Secuencias de oligonucleótidos empleados durante la RT-qPCR. Se muestra la secuencia y la concentración optimizada para la RT-qPCR de cada uno de los cebadores utilizados, así como el cálculo de las eficiencias para cada gen de estudio.

La cuantificación de la expresión de los distintos genes se hizo mediante el empleo del kit comercial *Power SYBR® Green RNA-to-Ct™ 1-Step Kit* (Applied Biosystems, California, EE.UU.), que permite acoplar la retrotranscripción y la amplificación en un único paso. Se dispuso inicialmente de 100 ng de RNA y un volumen final por reacción de 20 μ l. Todas las reacciones se desarrollaron en un termociclador *Mastercycler®ep Realplex* (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), llevando triplicados en cada caso.

El perfil de cada reacción fue el siguiente: un ciclo de 30 minutos a 48°C (etapa de retrotranscripción), un ciclo de 10 minutos a 95°C (activación de la enzima ADN polimerasa), 40 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturalización) y 1 minuto a 60°C (anillamiento y elongación).

El valor que se obtuvo por cada reacción fue el C_t (*threshold cycle*), el cual representa el número de ciclo en el que la fluorescencia emitida por el *SYBR Green* es detectable dentro de la fase lineal. Así, se obtuvo el C_t para cada uno de los genes de estudio,

incluyendo el *housekeeping* (*Gapdh*). El incremento de C_t (ΔC_t) es el valor del C_t de cada muestra normalizado frente al control interno (*Gapdh*). El Método Comparativo de C_t relaciona el número de copias del RNA mensajero entre las distintas condiciones, que se obtiene al final de una reacción optimizada empleando la fórmula (Bustin et al. 2009):

$$2^{-\Delta\Delta C_t}$$
$$2^{-[(C_{tmuestra} - C_{tGapdh}) - (C_{tcalibrador} - C_{tGapdh})]}$$

Consideramos calibrador la condición sobre la que se compara la expresión y se relativizan los resultados, dándole un valor de 1. Niveles de expresión igual a 1 indican que la muestra problema presenta la misma expresión de un determinado gen que el control. Niveles superiores a 1 indican que hay un incremento de expresión con respecto al control, y niveles inferiores a 1 indican que la expresión disminuye con respecto al control. Los resultados se mostraron en unidades arbitrarias de expresión (*fold*) entre la muestra problema y un calibrador o control (en nuestro caso, el gen *GAPDH*).

12. INMUNOCITOQUÍMICA Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Para los ensayos de inmunocitoquímica, las neuronas se sembraron sobre cubreobjetos de cristal esterilizados al fuego y tratados con una solución de poli-L-orнитина 15 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma-Aldrich) y fibronectina 1 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma-Aldrich).

A los 9 días el cultivo y tras los experimentos, las neuronas se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4 % (v/v) en PBS durante 20 minutos. A continuación, se incubaron con glicina 0,1 M en PBS durante 20 minutos y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,25 % (v/v) en PBS durante 5 minutos. Posteriormente, se incubaron

en una solución de bloqueo (Triton X-100 al 0,1 % v/v y suero de cabra al 10 % v/v en PBS) a temperatura ambiente durante 1 hora.

Los anticuerpos primarios se prepararon en una solución de incubación compuesta por suero de cabra al 5 % en PBS, y se pusieron en contacto con las muestras durante la noche a 4°C en agitación suave. Al día siguiente, se lavaron con PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con los fluoróforos Cy2 o Cy3 a una dilución 1/500 (Jackson ImmunoResearch, Pennsylvania, EE. UU.) en suero de cabra al 5 % en PBS. Se mantuvieron durante 1 hora a temperatura ambiente, en oscuridad y agitación suave. Tras ello, se lavaron con PBS para retirar el anticuerpo sobrante, y se incubaron durante 10 minutos con el marcador nuclear DAPI 30 µM (Sigma-Aldrich). Los anticuerpos utilizados se recogen en la tabla siguiente:

ANTICUERPO	ESPECIE	DILUCIÓN	REFERENCIA	CASA COMERCIAL
Anticuerpos Primarios				
MAP-2	Ratón	1/300	M#1406	Sigma-Aldrich
p53	Ratón	1/200	(Clon 1C12) 2524	Cell Signaling
Caspasa 3 activa (Asp-175)	Conejo	1/300	96615	Cell Signaling
MDM2	Conejo	1/500	Ab-38618	Abcam
pAkt (Ser473)	Conejo	1/500	9271	Cell Signaling
COX IV	Conejo	1/500	Ab-16056	Abcam
GFP	Conejo	1/1000	Ab290	Abcam
Anticuerpos Secundarios				
IgG Cy2	Ratón	1/500	115.225.003	Jackson ImmunoResearch
IgG Cy2	Conejo	1/500	111.225.003	Jackson ImmunoResearch
IgG Cy3	Ratón	1/500	111.165.003	Jackson ImmunoResearch
IgG Cy3	Conejo	1/500	111.175.003	Jackson ImmunoResearch

Tabla 9. Anticuerpos utilizados durante la inmunocitoquímica. Se especifican los anticuerpos primarios y secundarios utilizados, indicándose su especie, dilución empleada, referencia y casa comercial.

Finalmente, se lavaron dos veces con PBS y una vez con agua estéril, tras lo cual se montaron sobre los portaobjetos utilizando el reactivo *Slow Fade Antifade*[®] (Molecular Probes, Oregon, USA) para evitar la pérdida de fluorescencia. La visualización y adquisición de microfotografías se llevó a cabo utilizando un microscopio invertido *Nikon Eclipse Ti-E* (Nikon, Tokio, Japón) y un *spinning disk Roper Scientific* con microscopio *Olympus IX81* (Olympus[®], Tokyo, Japón). Las imágenes se procesaron con el software *ImageJ64*.

Para la cuantificación de la longitud media de las neuritas se utilizó la tinción MAP-2 y el *plugin NeuronJ 1.4.0* (Image J). La degeneración dendrítica se determinó mediante el análisis de la densidad de las neuritas positivas para MAP-2 en cada uno de los grupos de estudio. El porcentaje de máxima intensidad se analizó en el núcleo, mediante la herramienta *Fixed Length Line Tool* (Image J).

13. MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL *IN VIVO*

El modelo experimental de ictus isquémico desarrollado fue de oclusión-reperfusión transitoria de la arteria cerebral media (ACM) o tMCAO (*transient middle cerebral artery occlusion*) mediante la técnica del filamento intraluminal en rata (Esquema 20). Este procedimiento quirúrgico consiste en la inserción intraluminal de un filamento hasta el origen de la ACM para producir una oclusión durante un determinado periodo de tiempo, provocando una isquemia transitoria en el territorio de la ACM (Koizumi, Yoshida, Nakazawa, & Ooneda, 1986; Longa, Weinstein, Carlson, & Cummins, 1989). Tras la oclusión, se procede a la restauración del flujo sanguíneo con la retirada del filamento.

Este modelo es utilizado ampliamente en investigación preclínica debido a la similitud con lo ocurrido en pacientes de ictus isquémico, donde se encuentra afectada principalmente la arterial cerebral media, extendiéndose el daño desde la zona del

estriado hasta la corteza cerebral. Asimismo, la reperfusión cerebral tras la extracción del filamento ocurre de una forma similar a lo ocurrido con el uso de fármacos trombolíticos o técnicas de trombectomía mecánica en el procedimiento clínico (Shahjouei et al., 2016).

El modelo tMCAO *in vivo* se desarrolló gracias a la colaboración con el grupo de investigación del Prof. Juan B Salom, de la Unidad Mixta de Investigación Cerebrovascular (UMIC) del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe y del Departamento de Fisiología de la Universidad de Valencia.

La técnica se realizó en ratas macho Wistar (300–350 g, Charles River, Barcelona, España). Los animales se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de 5 mg/kg diazepam (Almirall Prodesfarma, Barcelona, España), 100 mg/kg ketamina (Ketolar®, Parke-Davis, El Prat de Llobregat, Barcelona, España) y 0.3 mg/kg atropina (B. Braun Medical, Rubí, Barcelona, España) para permitir la intubación orotraqueal y ventilación asistida mediante un respirador (Harvard Rodent Ventilator, mod. 683, Holliston, MA, USA). Durante la operación, la anestesia se mantuvo con una mezcla de 0.5-1 % de sevoflurano (Sevorane®, Abbott Laboratories, Madrid, España) en una mezcla de nitrógeno (70 %) y oxígeno (30 %).

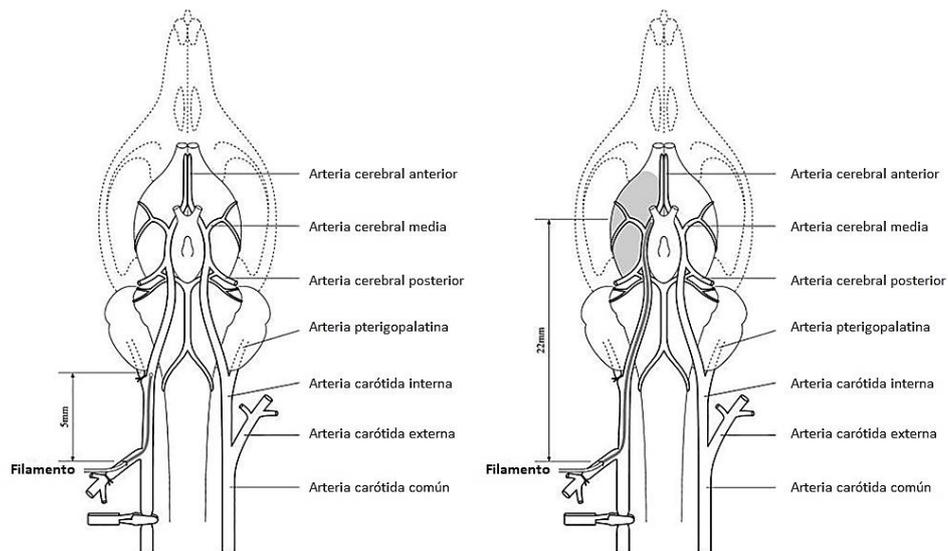
La temperatura corporal se monitorizó durante todo el experimento con la ayuda de una sonda rectal conectada a un medidor de temperatura, manteniéndose constante a 37°C con la ayuda de una manta calefactora. Para controlar la perfusión cerebral (CP) en la región de la ACM que sería ocluida, se utilizó una sonda láser-Doppler (Probe 418, Perimed AB) (Burguete et al., 2006). Para su colocación, se situó al animal previamente anestesiado decúbito prono y se realizó una incisión longitudinal en la línea media de la cabeza, exponiéndose el cráneo al exterior. Con la ayuda de un microscopio quirúrgico, se situó la fibra óptica, fijada al cráneo con cemento dental, que conectó con la sonda láser-Doppler.

A continuación, se colocó al animal decúbito supino y se expuso la arteria carótida común derecha tras una incisión longitudinal en la línea media del cuello, separando posteriormente las glándulas submaxilares y los músculos omohioideo y esternohioideo. Seguidamente, se disecaron las arterias carótida común y carótida externa, termo-coagulando las dos primeras ramas de la última: arteria occipital y

arteria tiroidea superior. Por encima de ambas ramificaciones se colocaron dos ligaduras y se cortó la arteria carótida externa entre ambas. La arteria carótida interna se disecó, separándola del vago y del cuerpo carotideo, hasta visualizar la bifurcación donde surge la arteria pterigopalatina que se ligó en la parte distal. En ese momento, se introdujo un filamento de nilón con la punta redondeada, que permitió la oclusión de la ACM. Para dicha oclusión, se colocaron dos clips microvasculares, uno en la arteria carótida común y otro en la arteria carótida interna, interrumpiendo de forma momentánea el flujo sanguíneo, y se realizó una incisión en el extremo de la arteria carótida interna para introducir el filamento. Tras comprobar que el filamento se encontraba en la luz de la arteria, se colocó una ligadura que impidió la pérdida de sangre por la incisión, se retiraron los clips y se restauró la circulación sanguínea.

Inmediatamente, se hizo avanzar el filamento hasta el origen de la ACM en el polígono de Willis y se comprobó la oclusión por un descenso brusco de la CP. La oclusión se mantuvo durante 60 minutos, tras los cuales se retiró el filamento, permitiendo una reperusión que se puso de manifiesto por la recuperación de los valores de la CP. Finalmente, se suturaron las heridas quirúrgicas y se estableció al animal con libre acceso para la comida y el agua.

Durante el periodo postoperatorio, se suministró como analgésico 0,1 mg/kg buprenorfina (Buprex, Schering-Plough, San Agustín de Guadalix, Madrid, España) de forma subcutánea y se mantuvieron durante 24 horas tras la cirugía. De forma paralela, se llevaron animales control o SHAM, los cuales se sometieron al mismo procedimiento quirúrgico, salvo la oclusión de la ACM.



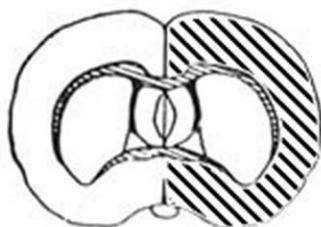
Esquema 20. Modelo experimental de isquemia cerebral transitoria (tMCAO) *in vivo*. Se representan las principales arterias involucradas en el modelo de cirugía de isquemia cerebral transitoria, así como el recorrido del filamento hasta la arteria cerebral media (ACM) para su oclusión. Modificado de Kelsen J et al (2010).

Finalmente, se procedió a la eutanasia de los animales previamente anestesiados y se realizaron secciones coronales de 2 mm de grosor de los cerebros mediante el uso de un *tissue slicer* (Stoelting Wood Dale, IL, USA) en una parte del cerebro. Así, se midió el tamaño del infarto cerebral mediante la tinción con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC), un indicador redox de tejidos metabólicamente activos/inactivos. El TTC se reduce a 1,3,5-trifenilformazán, de color rojo, en aquellas regiones metabólicamente activas (tejido vivo), mientras que permanece blanco en las zonas metabólicamente inactivas (tejido muerto), como la zona dañada tras la oclusión (Bederson et al., 1986). La parte restante de cada cerebro se separó en ambos hemisferios: ipsilateral (hemisferio dañado) y contralateral (hemisferio contrario al dañado); se diseccionaron las zonas de la corteza cerebral y el estriado y se congelaron en nitrógeno líquido, conservándose a -80°C para el análisis de la expresión de proteínas se realizó mediante la técnica de *Western Blot* (descrita previamente en el apartado 7 de Material y Métodos).

14. MODELO DE PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

Diversos estudios han descrito cómo pequeños periodos de isquemia cerebral previos a un daño mayor (IPC) inducen tolerancia isquémica, lo que promueve la reducción de las lesiones causadas tras la isquemia cerebral. Para inducir el IPC se desarrolló el modelo de cirugía anteriormente descrito (ver Modelo experimental de isquemia cerebral transitoria *in vivo*) con ciertas modificaciones.

Para ello, los animales se sometieron a una breve oclusión transitoria de la ACM durante 10 minutos, seguida de un periodo de recuperación de 24 horas. Tras este periodo, se realizó de nuevo una oclusión transitoria de la ACM durante 60 minutos con un periodo postoperatorio de 24 horas y se llevó a cabo la eutanasia para una posterior medida del infarto cerebral (TTC) y recogida de muestras para *Western Blot*.



Esquema 21. Representación de una sección coronal del cerebro de la rata. La región remarcada constituye la corteza cerebral ipsilateral, la cual se procesará para el análisis de las proteínas mediante la transferencia tipo *Western*.

Paralelamente, se realizaron condiciones control de preconditionamiento isquémico sin daño posterior (IPC). Para ello, se les realizó la cirugía de IPC durante 10 minutos sin daño isquémico posterior.

Todos los protocolos que implican manipulación de animales vivos han sido aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (Valencia).



Esquema 22. Modelo experimental de preconditionamiento isquémico *in vivo*. Se indican los procedimientos y tiempos utilizados durante el desarrollo experimental del preconditionamiento e isquemia experimental (IPC+tMCAO) *in vivo*. Paralelamente, se realizó la cirugía de animales sin preconditionamiento y oclusión de la ACM durante 60 minutos (SHAM+tMCAO), de los animales preconditionados (IPC+SHAM) y de los controles para ambas cirugías (SHAM+SHAM).

15. ESTUDIO CLÍNICO

Se realizó un estudio prospectivo observacional en pacientes con ictus isquémico, definido como infarto del sistema nervioso central (Easton et al., 2009), ingresados en los Hospitales Universitarios de Salamanca, Valladolid y de Lleida, durante los años 2012-2015. Los pacientes sufrieron AIT previo, o no, al ictus isquémico.

15.1. POBLACIÓN DE PACIENTES

Se reclutaron cohortes de pacientes ingresados por ictus isquémico en el Hospital Universitario de Valladolid, Hospital Universitario de Salamanca y Hospital Universitario Arnau de Vilanova de Lleida.

Dentro de cada cohorte, se seleccionaron los pacientes con un AIT previo y un subconjunto aleatorio de pacientes sin AIT. Los datos de los pacientes se recogieron de forma prospectiva y se incluyeron en una base de datos. La información recogida incluía datos demográficos, factores de riesgo vascular, datos de presentación clínica,

magnitud del daño neurológico (recogido mediante la escala de ictus del *National Institute of Health: NIHSS*) (Wityk, Pessin, Kaplan, & Caplan, 1994), y situación funcional a los 3 meses. La etiología de los infartos se asignó de acuerdo a las categorías de la clasificación TOAST (Adams et al., 1993).

El criterio de inclusión en la muestra fue el de pacientes consecutivos, previamente independientes, que presentaban un AIT en el mes previo al ictus isquémico y pacientes sin AIT. Los pacientes ingresaron en las primeras 24 horas desde el inicio de los síntomas (o desde el inicio del sueño, en aquellos de presentación al despertar).

Se excluyeron pacientes con hemorragia intracerebral, que presentaran un AIT en un tiempo superior a un mes previo al ictus, con datos clínicos insuficientes o falta de consentimiento informado. Finalmente se incluyeron en la cohorte un total de 85 pacientes. Los datos clínicos y epidemiológicos fueron tomados de las historias clínicas de los pacientes. Todos los pacientes, o sus familiares, fueron debidamente informados y proporcionaron su consentimiento informado antes de participar en el estudio. El protocolo del estudio fue aprobado por los Comités Éticos locales.

15.2. VARIABLES CLÍNICAS

Los pacientes se ingresaron durante la fase aguda del infarto cerebral, en la Unidad de Neurología de los tres Hospitales que colaboraron en el estudio y mencionados previamente. Su manejo diagnóstico y terapéutico se ajustó a las guías *ad hoc* publicadas por el Grupo de Enfermedades Cerebrovasculares de la Sociedad Española de Neurología (Alonso de Leciana et al., 2014). Los resultados se incluyeron en el estudio clínico mostrado en la memoria de la presente Tesis doctoral.

En cuanto a la etiología, los infartos se agruparon en: aterotrombóticos, cardioembólicos, lacunares, otras causas infrecuentes e indeterminados. Entre los datos demográficos y clínicos de referencia se encuentran la edad, sexo, grado de discapacidad basado en la escala de Rankin modificada (mRS, *modified Rankin scale*), antecedentes médicos, factores de riesgo vascular y tratamiento previo.

El electrocardiograma de 12 derivaciones, así como la Tomografía Computarizada craneal (TC) o la Resonancia Magnética (MRI) se realizaron en el momento de ingreso. Los detalles de AIT se obtuvieron de los informes médicos del paciente, utilizándose las definiciones estándar de AIT e ictus. La cuantificación del defecto neurológico mediante la NIHSS (*National Institute of Health Stroke Scale*), fue realizada por neurólogos con certificación acreditativa de dicha formación.

Se consideró como variable dependiente principal la situación funcional de los pacientes a los 3 meses tras el infarto cerebral, cuantificada mediante la escala de Rankin modificada (Rankin-m, Tabla X) (Banks & Marotta, 2007). Se categorizó considerando mal pronóstico aquellos con puntuaciones >2 y buen pronóstico si la puntuación fue ≤2.

RANKIN-M	GRADO DE DISCAPACIDAD	CARACTERÍSTICAS
0	Sin síntomas	
1	Sin incapacidad importante	Capaz de realizar sus actividades y obligaciones habituales
2	Incapacidad leve	Incapaz de realizar algunas de las actividades previas, pero capaz de velar por sus intereses y asuntos sin ayuda
3	Incapacidad moderada	Síntomas que restringen significativamente su estilo de vida o impiden su subsistencia totalmente autónoma
4	Incapacidad moderadamente severa	Síntomas que impiden claramente su subsistencia independiente, aunque sin necesidad de atención continua
5	Incapacidad severa	Totalmente dependiente, necesitando asistencia constante día y noche
6	Muerte	

Tabla 10. Escala de Rankin modificada (Rankin-m) para la evaluación del grado de discapacidad funcional de los pacientes tras un ictus. Modificada de Banks & Marotta 2007.

15.3. GENOTIPADO DEL POLIMORFISMO ARG72PRO DE TP53

Para la determinación del polimorfismo humano *Arg72Pro* de *Tp53* se empleó la técnica de PCR-RFLP descrita previamente en el Apartado 1.3. de Material y Métodos.

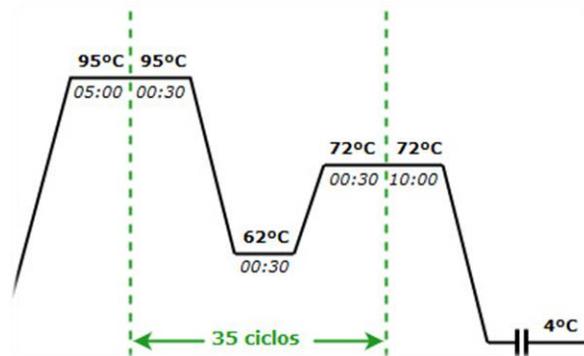
15.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las muestras de ADN procedentes de la sangre de los pacientes se amplificaron en un termociclador automático Eppendorf. La PCR se realizó en un volumen final de 12 μ l que contenía: 150 ng de ADN genómico, $MgCl_2$ 1,5 mM, desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 200 μ M, 10 pmol de cada oligonucleótido cebador (sentido y anti-sentido) y 0,3 U de Taq polimerasa (Promega®, Promega Biotech Ibérica). El fragmento amplificado se compuso de 291 pares de bases del exón 4. Los oligonucleótidos empleados para la amplificación por PCR fueron los siguientes:

OLIGONUCLEÓTIDOS	TÉCNICA EMPLEADA	GENOTIPADO
5'- TCTACAGTCCCCCTTGCCGT 3'	PCR-RFLP	Pro-p53
5'- CTGACCGTGCAAGTCACAGA 3'		Arg-p53

Tabla 11. Oligonucleótidos utilizados en la identificación genotípica de los pacientes. Se indican las secuencias de los cebadores empleados en la identificación genotípica de los pacientes mediante la técnica de PCR-RFLP.

Las condiciones experimentales utilizadas se representan en el Esquema 23.



Esquema 23. Esquema de PCR para la identificación genotípica del polimorfismo humano *Arg72Pro* de *Tp53*. Se muestran las temperaturas y tiempos en las diferentes etapas, y el número de ciclos de amplificación realizados durante la PCR.

La discriminación alélica se llevó a cabo mediante RFLP, analizando el tamaño de los fragmentos generados tras la digestión del ADN con endonucleasas de restricción. El producto de la PCR fue digerido a 37°C con la enzima de restricción BstUI (Bsh1236I, Fermentas Life Sciences) que reconoce el sitio de corte generado en la secuencia por el cambio de Citosina a Guanina.

15.3.2. Electroforesis en gel de agarosa

Los fragmentos generados tras la digestión se separaron por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 3 % (Gibco BRL Life Technologies), para identificar los distintos genotipos. La electroforesis se llevó a cabo en tampón TAE/EDTA, utilizando como marcador del peso molecular el ADN de un plásmido construido especialmente (pUC, fago λ y secuencia del genoma de levadura) previamente digerido con enzimas de restricción, lo que genera una mezcla de fragmentos de ADN de diferente tamaño (1,0 - 0,1 Kb, Biotools). Para monitorizar la migración del ADN durante la electroforesis se incluyeron dos colorantes en el tampón de carga: xileno-cianol y azul de bromofenol. Finalmente, los fragmentos de ADN amplificados se visualizaron en el gel de agarosa utilizando Midori Green Advance (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), que emite fluorescencia al ser expuesto a

la luz UV (254 nm). Los resultados obtenidos fueron visualizados mediante un transiluminador Gel Doc XR y el software *Quantity One* (Imagen 5).

En todos los casos, la identificación genotípica de los pacientes la realizó personal de laboratorio que desconocía la situación clínica de los pacientes.

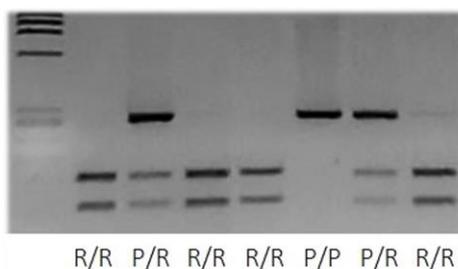


Imagen 5. Genotipado de muestras humanas por PCR-RFLP. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados de PCR. R/R: pacientes homocigotos *Arg/Arg*; P/R: pacientes heterocigotos *Pro/Arg*; P/P: pacientes homocigotos *Pro/Pro*.

16. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Todas las determinaciones se realizaron, al menos, por triplicado en cultivos de neuronas corticales diferentes. Los valores se expresaron como medias \pm S.E.M. (error estándar de la media) de, al menos, tres experimentos independientes. La significatividad se determinó mediante el test de la *t de Student* (para comparaciones entre dos únicos grupos de valores).

Para los experimentos desarrollados *in vivo*, se utilizaron 20 ratas macho Wistar, de las cuales si hicieron exclusiones siguiendo los siguientes criterios: 1) No se observó una caída de la perfusión cerebral (CP) tras la oclusión del filamento (sin isquemia), n=1; 2) No se produjo una recuperación del CP tras la retirada del filamento (sin reperfusión), n=1; 3) No se observa infarto cerebral tras patrón isquemia-reperfusión, n=4; 4) Muerte previa a las 24 horas de recuperación, n=1. La composición final de los grupos experimentales tras las exclusiones: SHAM (n=2), IPC (n=2), SHAM+ tMCAO (n=5) e IPC+ tMCAO (n=4).

En cuanto a los resultados clínicos se planteó primero un análisis descriptivo mediante porcentajes para las variables categóricas y medias (con desviación estándar) o medianas (cuartiles) para las variables cuantitativas continuas dependiendo de si seguían una distribución normal o no, respectivamente. Se empleó el test de Kolmogorov- Smirnov para probar la normalidad de la distribución. Se compararon las diferencias de las variables en función del pronóstico a los 3 meses (utilizada como variable de agrupación) de pacientes que presentaban o no un AIT un mes previo al infarto cerebral. Las proporciones se compararon usando la prueba del *Chi* cuadrado y el test de Fisher. La prueba *t de Student* (datos normales) o *U* de Mann-Whitney (datos no normales) se utilizaron para comparar variables cuantitativas entre grupos.

Puesto que el alelo *Pro* ejerce un efecto dominante sobre el *Arg* (Biros et al., 2002; Bonafé et al., 2004), se realizó una dicotomización tratando los heterocigotos *Arg/Pro* y los homocigotos *Pro/Pro* como una única categoría, que hemos denominado *Pro*, en contraste con los homocigotos *Arg/Arg*, que denominamos *Arg*.

En todos los casos, un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos se realizaron con ayuda del software SPSS® Statistics 22.0 para Macintosh (SPSS Ibérica, IBM Company, Madrid, Spain).

Resultados

1. EL NMDA-PC PROMUEVE LA TOLERANCIA ISQUÉMICA A TRAVÉS DE LA DESESTABILIZACIÓN DE P53

El cerebro es un órgano que precisa de un aporte continuo de oxígeno y glucosa para poder generar la energía necesaria que le permita mantener el potencial sináptico neuronal. Un fallo en el transporte de dichos componentes, como consecuencia de una alteración en el flujo sanguíneo cerebral, puede provocar un daño isquémico letal que conducirá a la muerte neuronal (Bolaños, 2016; Mergenthaler et al., 2004).

En este contexto, se ha observado cómo numerosos órganos del cuerpo tales como el riñón, el corazón o el propio cerebro presentan una tolerancia temporal frente a la isquemia. Este fenómeno de resistencia transitoria frente al daño se produce como consecuencia de la activación de una serie de mecanismos adaptativos endógenos inducidos tras la exposición previa a un estímulo de baja intensidad o PC (Gidday, 2006; Takaaki Kirino, 2002; Stenzel-Poore, Stevens, King, & Simon, 2007; Y. Wang et al., 2015). Por lo tanto, el desarrollo de un modelo de PC robusto constituirá una herramienta experimental efectiva para el estudio de los mecanismos implicados en dicha neuroprotección durante la tolerancia isquémica (Ulrich Dirnagl et al., 2009; Stetler et al., 2008).

1.1. EL NMDA-PC, PREVIENE LA APOPTOSIS INDUCIDA TRAS LA ISQUEMIA EXPERIMENTAL, PROMOVRIENDO LA NEUROPROTECCIÓN

Como se ha descrito previamente en la Introducción, existe una gran variedad de estímulos capaces de inducir TI, entre los que se encuentra el empleo de agentes farmacológicos como anestésicos, lipopolisacáridos, ácido 3-nitropropiónico o NMDA. Dentro de la gran complejidad de mecanismos moleculares inducidos tras la aplicación de diversos estímulos, existe un factor común a gran parte de ellos: la activación de los NMDA-R (Grabb & Choi, 1999; Lai et al., 2014; Severino, Muller, Vandresen-Filho, & Tasca, 2011).

Estos receptores son canales catiónicos permeables al Na^+ , K^+ y Ca^{2+} que se encuentran mediando numerosas funciones neuronales como la transmisión sináptica excitatoria, la plasticidad, la regeneración o la supervivencia entre otras (Castellano, Cestari, & Ciamei, 2001; Cull-Candy, Brickley, & Farrant, 2001; McDonald, Silverstein, & Johnston, 1990). Para su activación y apertura, precisan de la unión de dos agonistas diferentes de forma simultánea, glutamato y glicina (presentes durante la neurotransmisión sináptica), así como la despolarización de la membrana celular (canales voltaje-dependientes). Sin embargo, dichos receptores no siempre presentan funciones fisiológicas en el organismo. Su excesiva activación, debido al incremento masivo de la concentración de glutamato durante un proceso excitotóxico como la isquemia, conllevará un aumento masivo del calcio intracelular y la consiguiente activación de la apoptosis (Lai et al., 2014; Severino et al., 2011).

Así, se ha descrito un papel dual en estos receptores, siendo participes no sólo de procesos patológicos sino también de vías de supervivencia neuronal (Grabb & Choi, 1999; Hardingham & Bading, 2003, 2010; Soriano et al., 2006). La estimulación con una dosis moderada de NMDA, derivado aminoácido agonista del NMDA-R, promueve la tolerancia isquémica a través de la activación de diversas vías de señalización, algunas de las cuales aún se desconocen (Kato et al., 1992; Severino et al., 2011; Soriano et al., 2006; Tao & Zhao, 1998).

Uno de los objetivos clave del presente trabajo es estudiar los mecanismos moleculares responsables de la TI. Para llevarlo a cabo, nos planteamos el diseño experimental de un modelo de preconditionamiento capaz de inducir neuroprotección frente a la isquemia. En este sentido, utilizamos un modelo de tipo farmacológico, descrito previamente en el Apartado 4 de Material y Métodos, basado en la estimulación de los NMDA-R del glutamato con una dosis subtóxica del agonista NMDA (Esquema 24). La concentración de NMDA 20 μ M fue validada en trabajos previos de investigación (Jimenez-Blasco et al., 2015; Soriano et al., 2006) como dosis subtóxica capaz de activar los NMDA-R de manera fisiológica. Tras el PC, las neuronas se sometieron a la isquemia experimental de 90 minutos (condición NMDA-PC + OGD) y posterior periodo de reoxigenación.

	2 HORAS	90 MINUTOS	4/24 HORAS
NORMOXIA (NX)	CAMBIO DE MEDIO	CAMBIO DE MEDIO	CAMBIO DE MEDIO
NMDA-PC	NMDA 20 μ M	CAMBIO DE MEDIO	CAMBIO DE MEDIO
OGD	CAMBIO DE MEDIO	OGD	CAMBIO DE MEDIO
NMDA-PC + OGD	NMDA 20 μ M	OGD	CAMBIO DE MEDIO

Esquema 24. Modelo de PC farmacológico con NMDA (NMDA-PC) en cultivo primario de neuronas corticales *in vitro*.

Para comprobar si nuestro modelo de PC era capaz de inducir una neuroprotección frente a la isquemia, determinamos la apoptosis neuronal por citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 1, la OGD produjo un aumento de los niveles de apoptosis neuronal de manera tiempo-dependiente, que se previno con el NMDA-PC.

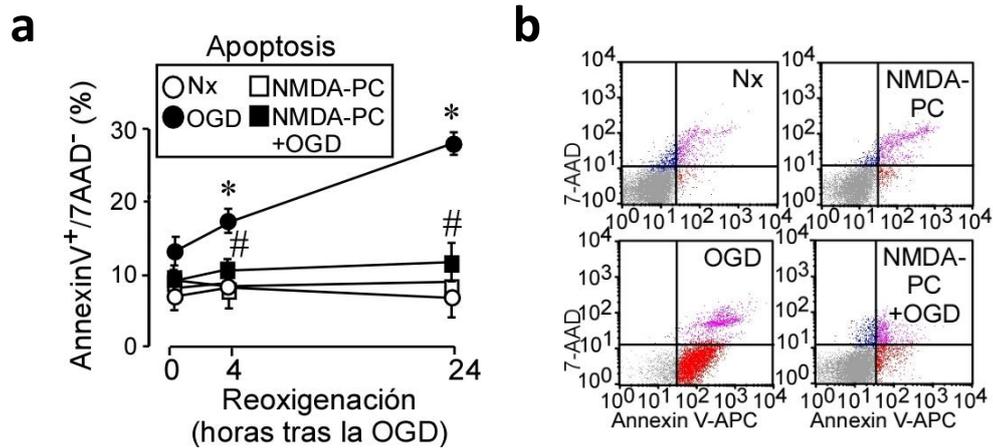


Figura 1. El modelo de preconditionamiento farmacológico con NMDA (NMDA-PC) previene la muerte neuronal por apoptosis inducida tras la isquemia. Neuronas corticales de ratón en cultivo primario (9-10 DIV) se expusieron a un modelo validado *in vitro* de preconditionamiento farmacológico con NMDA 20 μ M durante 2 horas (NMDA-PC) previo a la isquemia experimental de 90 minutos (OGD). La apoptosis neuronal se determinó mediante citometría de flujo, considerándose células apoptóticas las Anexina V-APC⁺/7AAD⁻. (a) La OGD indujo la muerte neuronal por apoptosis, que se previno por el NMDA-PC. (b) El registro de citometría de flujo muestra cómo el NMDA-PC previno la apoptosis neuronal tras la isquemia. En la condición NMDA-PC + OGD se observa una disminución en el porcentaje de neuronas apoptóticas (rojo) respecto a la condición de OGD. Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 5 cultivos independientes) y se utilizó la *t* de Student para comparaciones entre grupos. * p < 0,05 versus Nx; # p < 0,05 versus OGD.

Para confirmar estos resultados, se determinó la apoptosis neuronal, tras 4 horas de reoxigenación, a través del análisis de la actividad de la caspasa-3, proteasa efectora de la vía de apoptosis neuronal (Elmore, 2007). De este modo, pudimos comprobar como el NMDA-PC previno la activación de la caspasa-3 inducida tras la isquemia (Figura 2 y 3a), lo que corrobora los resultados anteriores.

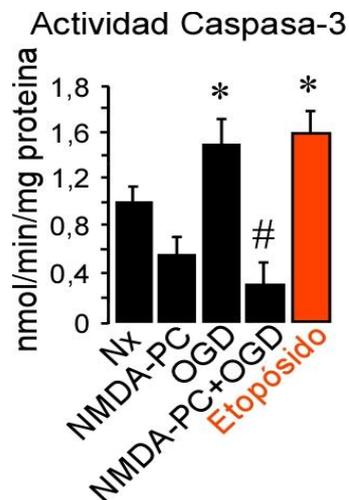
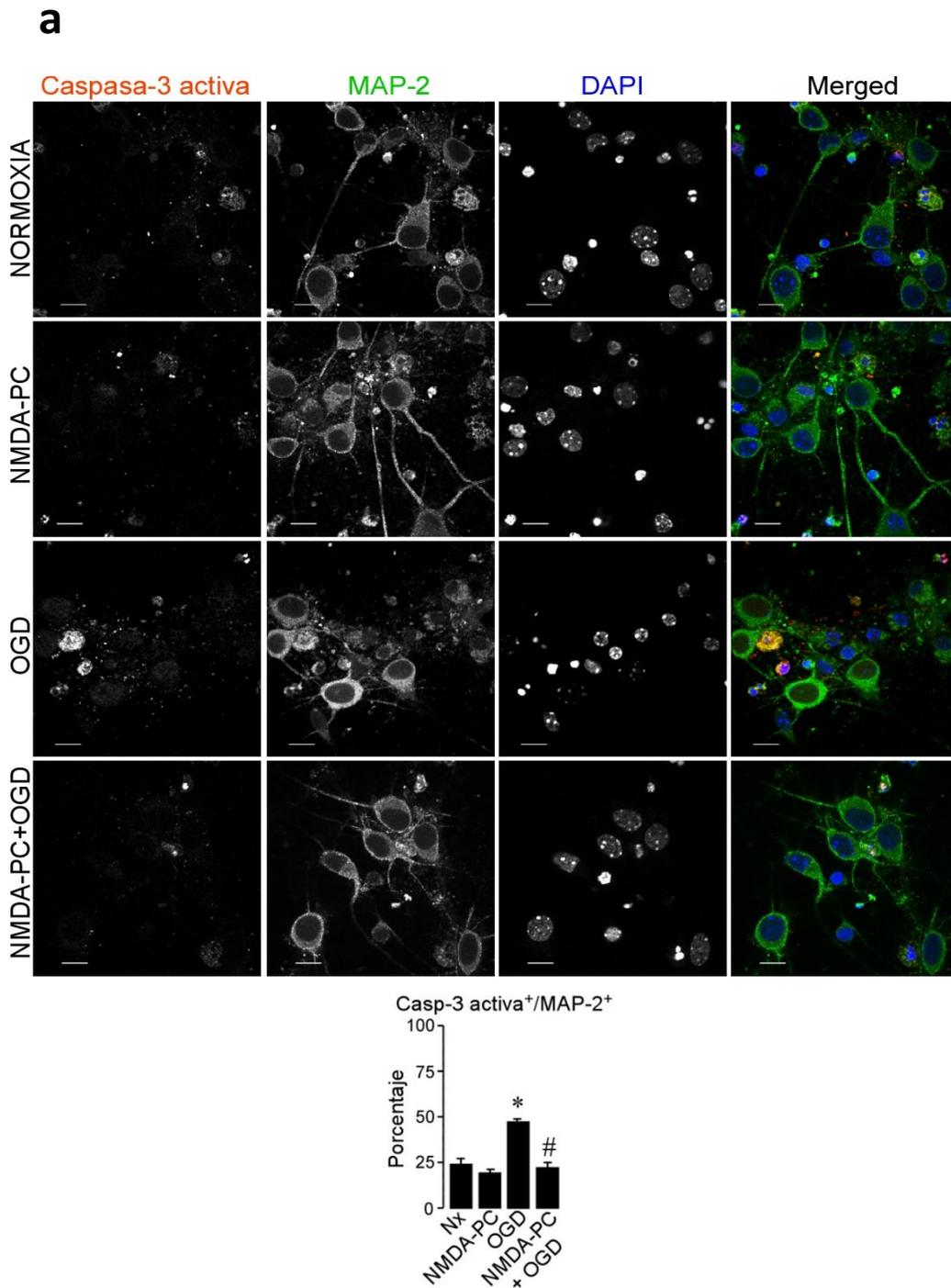


Figura 2. El NMDA-PC previene la activación de la caspasa-3 inducida tras la isquemia. Neuronas corticales en cultivo primario se expusieron al modelo *in vitro* de NMDA-PC. Tras 4 horas de reoxigenación, se analizó la actividad de la caspasa-3 por fluorimetría. Se utilizaron como control de apoptosis las neuronas tratadas con el inductor apoptótico etopósido (10 μ M, 24 horas). Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 5 cultivos independientes) y se utilizó la *t* de Student para comparaciones entre grupos. * p < 0,05 versus Nx; # p < 0,05 versus OGD.

Finalmente, determinamos el nivel de degeneración neurítica, que se produce como consecuencia del daño neuronal tras la isquemia, mediante el análisis de la longitud de las neuritas, así como del área del marcador específico de neuronas MAP-2 (*Microtubule-Associated Protein 2*). De este modo, observamos como el NMDA-PC evitó la degeneración neuronal asociada a la isquemia (Figura 3a y 3b), confirmándose el carácter neuroprotector del PC y validándose como modelo *in vitro* capaz de inducir tolerancia frente a la isquemia neuronal.



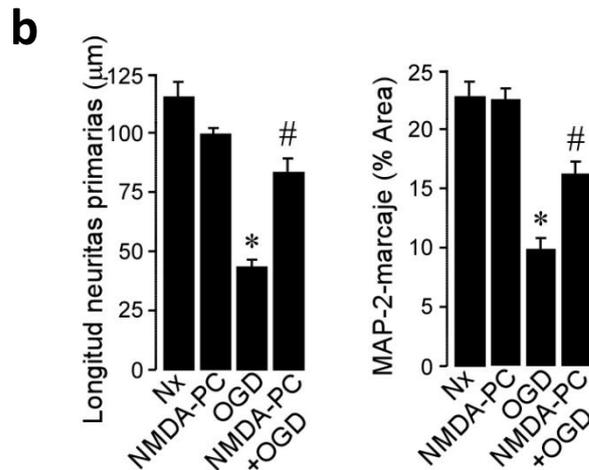


Figura 3. El NMDA-PC previene la activación de la caspasa-3, así como la degeneración dendrítica causada por la OGD. Neuronas corticales en cultivo primario se expusieron al modelo *in vitro* de NMDA-PC y se detectó la activación de la caspasa-3 mediante microscopía de fluorescencia, a las 4 horas de reoxigenación (a). Se utilizó MAP-2 (verde) como marcador neuronal y DAPI (azul) como sonda nuclear. Barra de escala: 50 µm. (b) La degeneración neurítica se analizó a través de la cuantificación de la longitud de las neuritas y del área de marcaje de MAP-2. Los datos son medias ± S.E.M. de 60 neuronas por grupo (n = 3 cultivos independientes). * p < 0,05 versus Nx; # p < 0,05

1.2. EL NMDA-PC INDUCE LA DESESTABILIZACIÓN DE P53 A LAS 4 HORAS DE REOXIGENACIÓN TRAS LA ISQUEMIA EXPERIMENTAL

Una vez establecido un modelo de NMDA-PC *in vitro*, capaz de inducir TI, nos decidimos a investigar los mecanismos moleculares neuroprotectores desencadenados durante el PC. Entre las proteínas clave del proceso de apoptosis neuronal cabe destacar p53, cuya función es esencial en el balance neurodegeneración/neurorreparación tras la isquemia cerebral. Dicha proteína actúa como sensor de estrés celular, activándose y acumulándose en situaciones de daño neuronal como la excitotoxicidad o isquemia cerebral (Broughton et al., 2009; Gomez-Sanchez et al., 2011; Gudkov & Komarova, 2010; Hong et al., 2010; Morrison & Kinoshita, 2000; Sakhi et al., 1994). De hecho, se ha descrito que la delección o inhibición farmacológica de p53 confiere resistencia frente al daño isquémico

(Crumrine et al., 1994; Tomasevic, Kamme, Stubberöd, Wieloch, & Wieloch, 1999). Debido a la importancia de p53 en los procesos de apoptosis neuronal desencadenados tras la isquemia, nos planteamos estudiar si esta proteína podía encontrarse implicada en el control de las vías de neuroprotección inducidas por el PC. Primeramente, analizamos la expresión de la proteína p53 en las neuronas tras la isquemia, a distintos tiempos de reoxigenación. De acuerdo con resultados previos del grupo (Gomez-Sanchez et al., 2011), observamos como la reoxigenación tras la isquemia promovió, de forma tiempo-dependiente, la estabilización y acumulación de p53 (Figura 4). El tiempo de reoxigenación al cual observamos una mayor acumulación de la proteína, las 4 horas de reoxigenación, será el utilizado en todos nuestros experimentos.

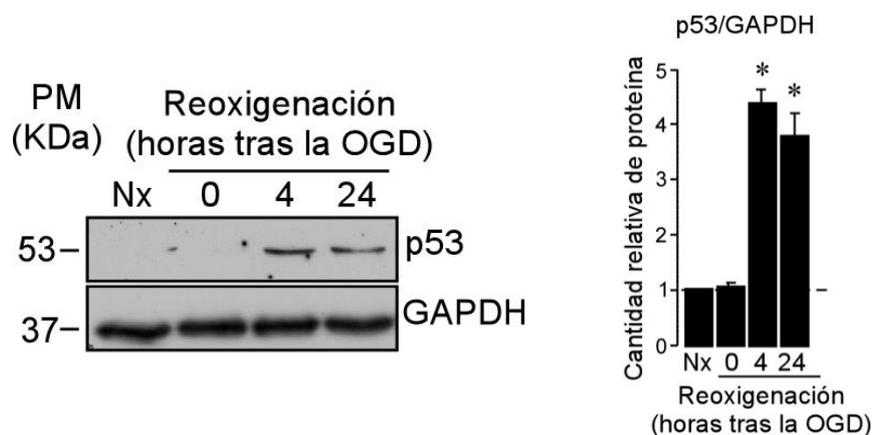


Figura 4. La reoxigenación induce la estabilización y acumulación de p53 de manera tiempo-dependiente tras la isquemia. Neuronas corticales en cultivo primario se expusieron al modelo de isquemia experimental *in vitro* (OGD). Se analizaron los niveles de expresión de la proteína p53 mediante transferencia tipo *Western*. La expresión de la GAPDH se utilizó como control de carga. La cuantificación se normalizó frente a la Nx. Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 3 cultivos independientes) y se utilizó la *t* de *Student* para comparaciones entre grupos. * $p < 0,05$ versus Nx.

A continuación, medimos la expresión de p53 en nuestro modelo de NMDA-PC. Como se observa en la Figura 5 y 7, el NMDA-PC previno la acumulación de p53 inducida a las 4 horas de reoxigenación tras la isquemia. Además, el NMDA-PC evitó la estabilización funcional de la proteína, lo que se correspondía con una disminución de la expresión de sus principales dianas moleculares p21 y PUMA (*p53 upregulated modulator of*

apoptosis) (Figura 7). De hecho, el NMDA-PC previo a la isquemia impidió la estabilización nuclear de p53, clave para el desarrollo de su actividad transcripcional y la activación de genes pro-apoptóticos responsables en conjunto del daño neuronal (Figura 5).

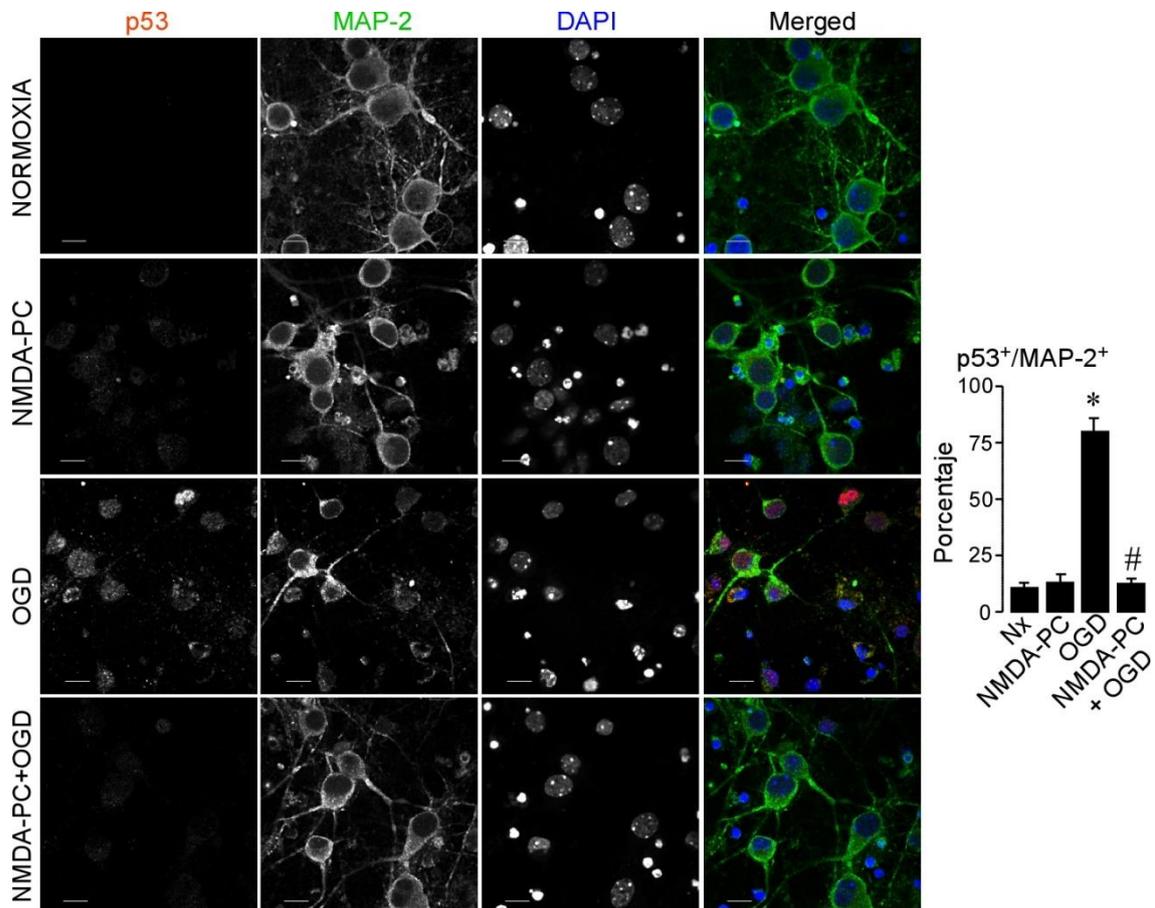


Figura 5. El NMDA-PC promueve la desestabilización de p53 y evita su acumulación en el núcleo tras la OGD. Neuronas corticales en cultivo primario se expusieron al modelo validado *in vitro* de NMDA-PC y se analizó, mediante microscopía de fluorescencia, la expresión de las proteínas p53 (rojo), Map-2 (verde) y el marcador nuclear DAPI (azul). Barra de escala: 10 μ m. Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 3 cultivos independientes). * p < 0,05 versus Nx; # p < 0,05 versus OGD.

Para corroborar si la bajada en la expresión de la proteína observada se correspondía con una disminución en la expresión del gen *Tp53*, analizamos los niveles de su RNA mensajero mediante RT-PCR. Tras el análisis, no observamos cambios significativos en la expresión del gen, de modo que la caída en los niveles de expresión de p53 podría ser debida a mecanismos de regulación postraduccionales (Figura 6).

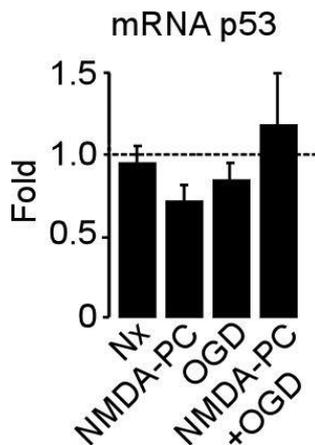


Figura 6. Los niveles de mRNA de p53 permanecen inalterados en neuronas expuestas al NMDA-PC previo a la OGD. Neuronas corticales en cultivo primario se expusieron al modelo *in vitro* de NMDA-PC y se analizó la expresión relativa de *p53* mediante RT-qPCR a las 4 horas de reoxigenación. Se empleó *Gapdh* como control interno de expresión. Los resultados se expresan normalizados respecto a la Nx. Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 3 cultivos independientes).

Se han descrito numerosas modificaciones postraduccionales en la proteína p53, como son las acetilaciones, o-glicosilaciones o fosforilaciones (Kruse & Gu, 2008). En este sentido, se ha demostrado que la fosforilación de p53 promueve la estabilización de la proteína y su acumulación en la célula en situaciones de estrés como la isquemia (Crumrine et al., 1994; Y Li et al., 1994). Este hecho se comprobó en nuestros experimentos, tras analizar los niveles de la forma fosforilada y activa de p53, *phospho-p53* (pp53; Serina 15) tras el daño isquémico. Sin embargo, la activación de la proteína se previno en las neuronas preconditionadas previamente al daño. Esto confirma que el NMDA-PC evita la estabilización de p53 inducida a las 4 horas de reoxigenación tras la isquemia a través de mecanismos postraduccionales, tales como la fosforilación (Figura 7).

Todos estos resultados demuestran que el NMDA-PC previene la estabilización y acumulación de p53 y, en consecuencia, su activación promovida por la isquemia. Por lo tanto, la proteína p53 podría estar participando en los mecanismos mediadores de la tolerancia inducidos durante el preconditionamiento.

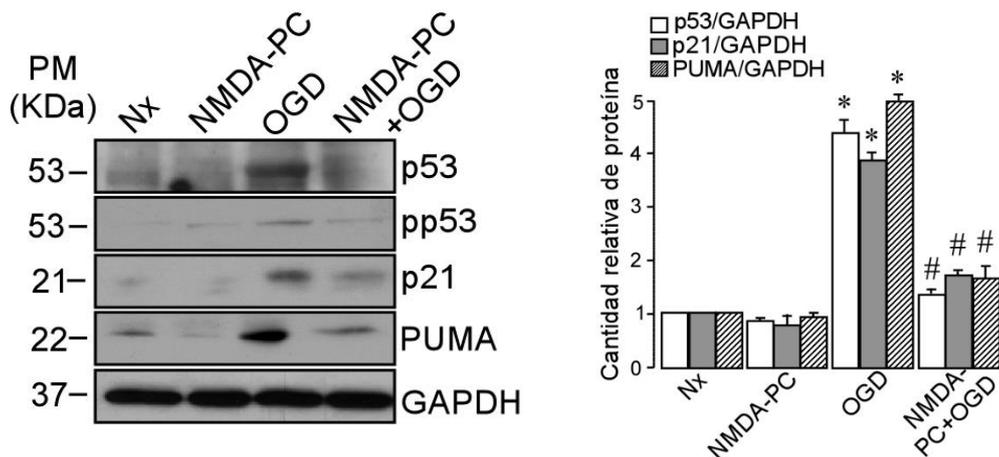


Figura 7. El NMDA-PC promueve la desestabilización de p53 mediada por mecanismos postraduccionales. Neuronas corticales en cultivo primario se expusieron al modelo *in vitro* de NMDA-PC. Se analizaron los niveles de expresión de las proteínas p53, sus dianas moleculares p21 y PUMA, así como de la forma fosforilada y activa de p53 (pp53, Ser 15), mediante transferencia tipo *Western*. La expresión de la GAPDH se utilizó como control de carga. La cuantificación se normalizó frente a la Nx. Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 3 cultivos independientes) y se utilizó la *t* de *Student* para comparaciones entre grupos. * p < 0,05 *versus* Nx; # p < 0,05 *versus* OGD.

1.3. LA DELECCIÓN GENÉTICA DE P53 PREVIENE LA APOPTOSIS NEURONAL, LO QUE PROMUEVE LA TOLERANCIA NEURONAL FRENTE A LA ISQUEMIA

Para poder confirmar la implicación de p53 en la TI, utilizamos una aproximación genética basada en el empleo de cultivos de neuronas corticales extraídas de ratones silvestres (*wild type; wt*) y de ratones que tenían delecionado el gen *p53* (*knock-out p53; ko*). En primer lugar, comprobamos la delección génica de *p53* mediante un análisis de expresión de la proteína por *Western blot*. Así, verificamos que la OGD indujo la estabilización de p53 en neuronas p53 *wt*, pero no en las neuronas p53 *ko*. Además, dicha estabilización se previno tras el PC, como ya habíamos observado previamente (Figuras 8 y 9).

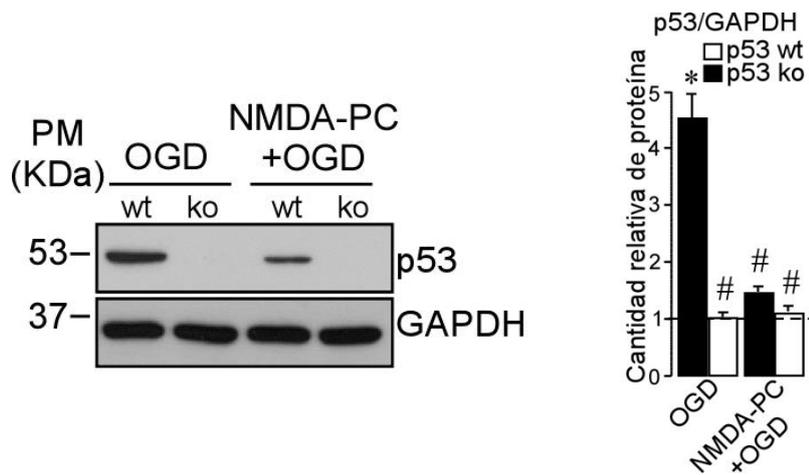
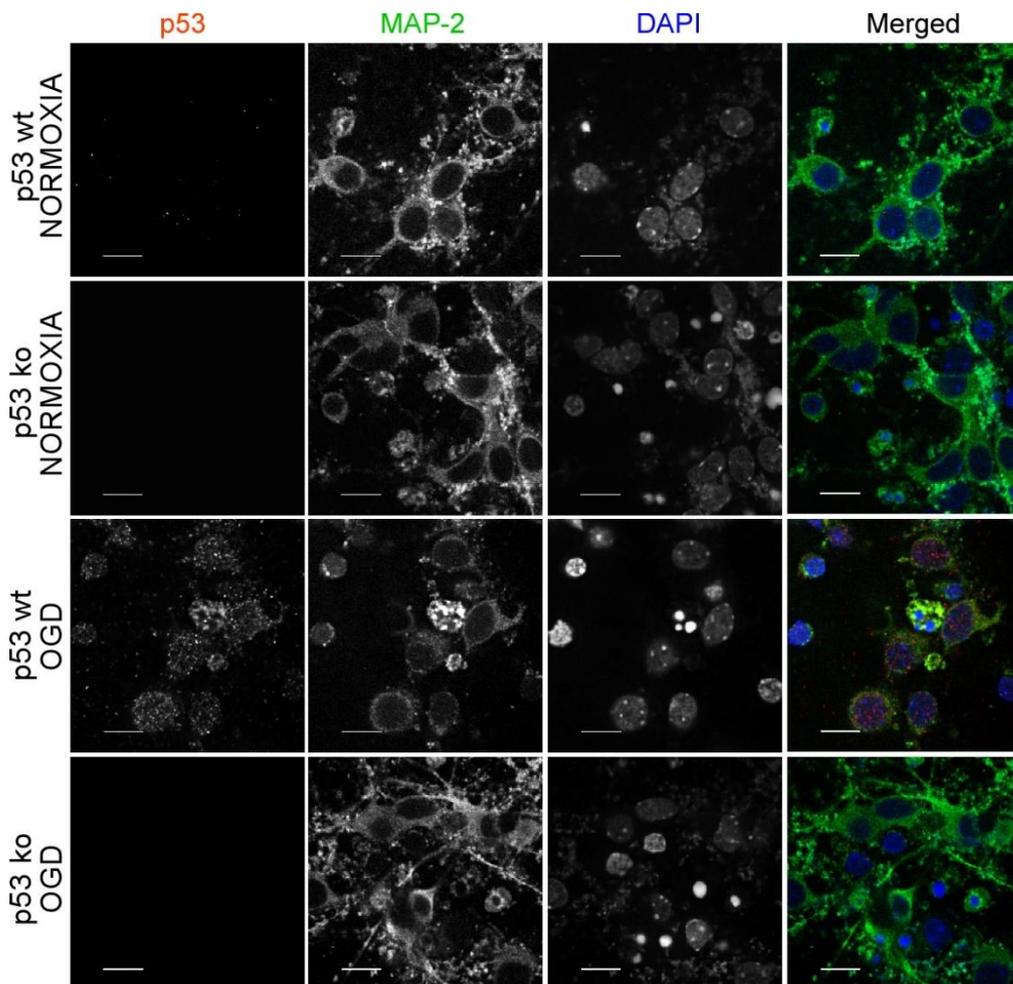


Figura 8. La OGD induce la estabilización de p53 en las neuronas *wild type*, pero no en las neuronas *knock-out* de p53. Las neuronas corticales en cultivo primario se obtuvieron de ratones p53 wt o p53 ko, y se expusieron a un modelo *in vitro* de NMDA-PC. Se analizó la expresión de la proteína p53 en ambos genotipos mediante transferencia tipo *Western blot*. La expresión de la GAPDH se utilizó como control de carga. La cuantificación se normalizó frente a la Nx. Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 3 cultivos independientes) y se utilizó la *t* de *Student* para comparaciones entre grupos. * p < 0,05 versus Nx; # p < 0,05 versus OGD.



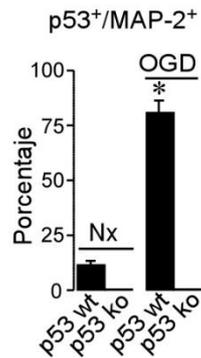


Figura 9. La OGD induce la estabilización de p53 en las neuronas *wild-type*, pero no en las neuronas *knock-out* de p53. Neuronas corticales en cultivo primario procedentes de ratones p53 wt o p53 ko se expusieron a un modelo validado *in vitro* de NMDA-PC. Las imágenes de microscopía de fluorescencia muestran la expresión de la proteína p53 (rojo), MAP-2 (verde) y el marcador nuclear DAPI (azul). Barra de escala: 15 μ m. Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 3 cultivos independientes). * p < 0,05 versus Nx.

Posteriormente, para corroborar si la proteína p53 se encontraba mediando la neuroprotección asociada al preconditionamiento, analizamos la apoptosis neuronal mediante citometría de flujo. La ausencia de p53 previno la muerte neuronal por apoptosis inducida a las 4 horas de reoxigenación tras la isquemia, promoviendo neuroprotección de una forma similar a la observada en las neuronas preconditionadas (Figura 10).

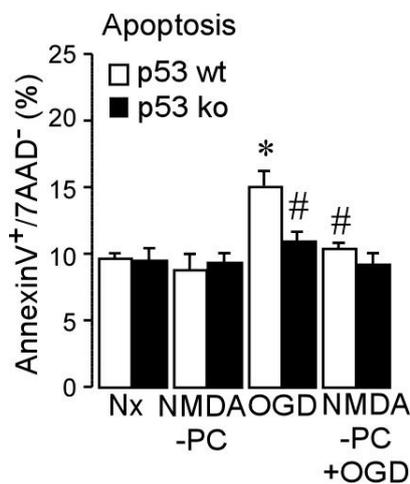
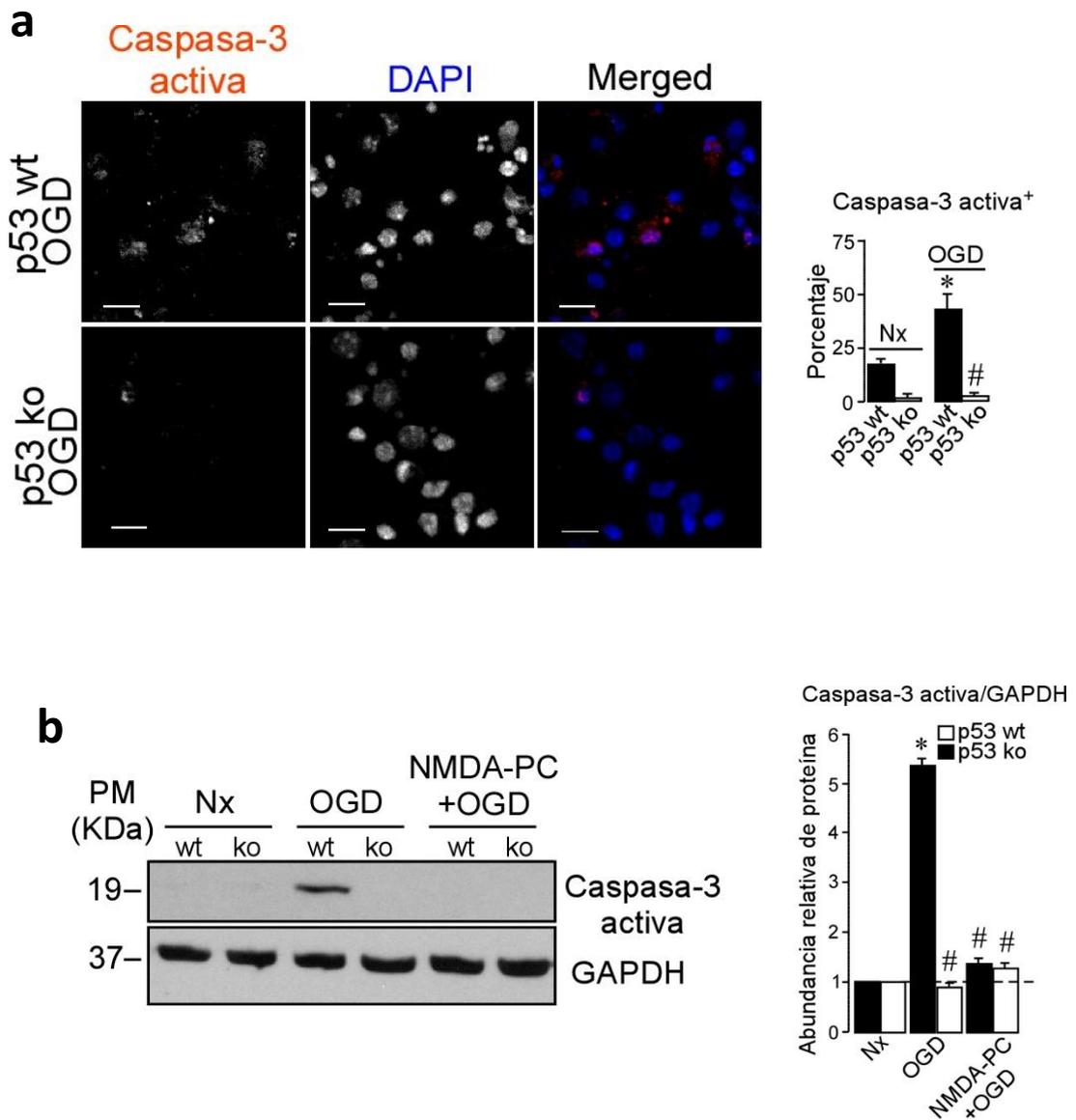


Figura 10. La delección génica de p53 previene la apoptosis neuronal inducida a las 4 horas de reoxigenación tras la isquemia. Neuronas corticales en cultivo primario procedentes de ratones p53 wt o p53 ko se expusieron a un modelo *in vitro* de NMDA-PC y se analizó la apoptosis neuronal mediante citometría de flujo. Se consideraron apoptóticas las neuronas Anexina V-APC⁺/7AAD⁻. Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 3 cultivos independientes) y se utilizó la t de Student para comparaciones entre grupos. * p < 0,05 versus Nx; # p < 0,05 versus OGD.

Finalmente, utilizamos una segunda aproximación experimental en el análisis de la apoptosis neuronal a través del estudio de la caspasa-3, proteína clave de la cascada de señalización apoptótica activada tras la isquemia. De acuerdo con los resultados previos, la ausencia de p53 evitó el aumento en la expresión de la caspasa-3 activa (Figura 11a y 11b). Además, se observó una disminución en la actividad de la caspasa-3 tras la isquemia, en las neuronas p53 ko, lo que previno la progresión de la cascada apoptótica neuronal (Figura 11c).



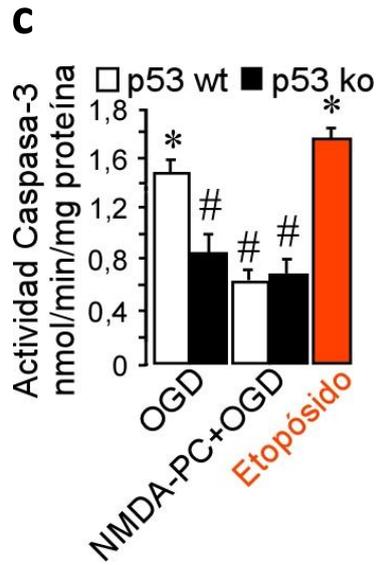


Figura 11. La ausencia de p53 previene la activación de la caspasa-3 y la subsiguiente apoptosis neuronal inducida a las 4 horas de reoxigenación tras la isquemia. Neuronas corticales en cultivo primario procedentes de ratones p53 wt o p53 ko se expusieron a un modelo *in vitro* de NMDA-PC. (a) Análisis de la expresión de la caspasa-3 activa mediante microscopía de fluorescencia (rojo), junto con la sonda nuclear DAPI (azul). Barra de escala: 20 μ m. (b) Análisis de la expresión de caspasa-3 activa mediante transferencia tipo *Western blot*. Se utilizó la expresión de la GAPDH como control de carga. La cuantificación se normalizó frente a la Nx. (c) Determinación de la actividad de la caspasa-3 mediante fluorimetría. Se utilizaron como control de apoptosis las neuronas tratadas con el inductor apoptótico etopósido (10 μ M, 24 horas). Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 3 cultivos independientes) y se utilizó la *t* de *Student* para comparaciones entre grupos. * p < 0,05 versus Nx; # p < 0,05 versus OGD.

Todos estos resultados demuestran que el NMDA-PC induce neuroprotección frente a la isquemia mediante la desestabilización de la proteína p53. La disminución de los niveles de la forma activa de p53 previene la activación de la vía p53/PUMA/Caspasa-3 y promueve la supervivencia neuronal.

2. LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA MDM2-P53 ES LA RESPONSABLE DE LA TOLERANCIA ISQUÉMICA NEURONAL ASOCIADA AL PC FRENTE A LA ISQUEMIA

Los resultados hasta el momento nos han permitido identificar a la proteína p53 como una diana clave en los mecanismos neuroprotectores inducidos tras el preconditionamiento. La desestabilización de p53, principalmente en el núcleo neuronal, previene su activación como factor transcripcional. De este modo, se frena la cascada de procesos pro-apoptóticos que se suceden tras la isquemia. Estos precedentes nos llevan a pensar en el papel fundamental que podría tener la regulación negativa de p53 en los mecanismos neuroprotectores.

Entre los numerosos reguladores de p53 descritos hasta la fecha (Dornan et al., 2004; L. Wang et al., 2011), cobra especial relevancia la E3 ubiquitina ligasa MDM2, principal regulador de la proteína p53. En condiciones fisiológicas, MDM2 se encarga de mantener unos niveles bajos de p53 en la célula a través de su ubiquitinación y posterior degradación en el proteosoma. Sin embargo, dicha regulación es incapaz de mantenerse en situaciones celulares comprometidas como la isquemia, provocando la estabilización y acumulación de p53, con el consecuente daño celular. La importancia de MDM2 en la regulación de los niveles de p53 nos sugiere que esta proteína podría desempeñar una función importante en la neuroprotección asociada al PC.

2.1. EL PRECONDICIONAMIENTO AUMENTA LOS NIVELES DE MDM2, LO QUE PROMUEVE LA DESESTABILIZACIÓN NUCLEAR Y CITOSÓLICA DE P53 TRAS LA ISQUEMIA

Con objeto de investigar la posible implicación de MDM2 en la TI, nos dispusimos a analizar sus niveles de expresión a las 4 horas de reoxigenación tras la isquemia, momento en que observábamos la estabilización de p53. Para ello, utilizamos

neuronas corticales de ratón en cultivo primario expuestas al modelo de NMDA-PC previamente establecido (Esquema 24) y analizamos la expresión proteica mediante transferencia tipo *Western blot*. Como se observa en la Figura 12, el NMDA-PC incrementó los niveles de expresión de la proteína MDM2, lo que condujo a la desestabilización de p53 tras la isquemia. Ese incremento de MDM2 promovido tras el preconditionamiento se observó además mediante inmunofluorescencia (Figura 14), confirmándose lo anterior.

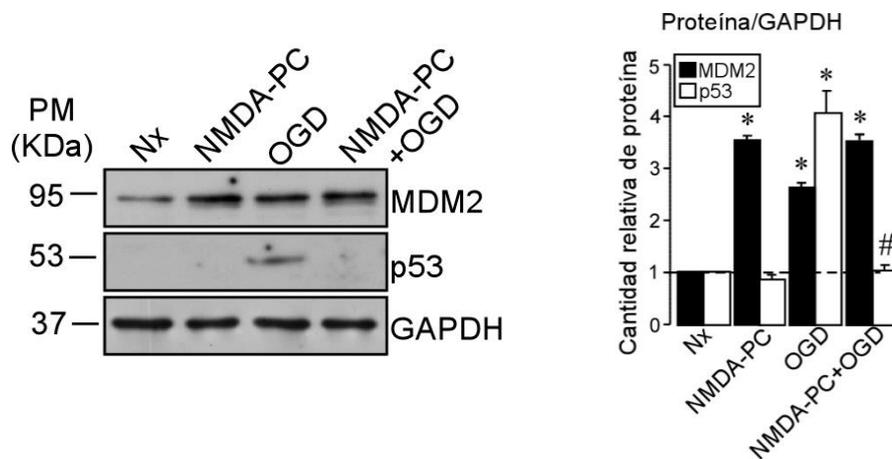


Figura 12. El NMDA-PC induce el aumento de los niveles de la proteína MDM2 a las 4 horas de reoxigenación tras la isquemia. Neuronas corticales en cultivo primario se expusieron a un modelo *in vitro* de NMDA-PC y se analizó la expresión de la proteína MDM2 y p53 mediante transferencia tipo *Western*. La expresión de la GAPDH se utilizó como control de carga. La cuantificación se normalizó frente a la Nx. Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 3 cultivos independientes) y se utilizó la *t* de Student para comparaciones entre grupos. * $p < 0,05$ versus Nx; # $p < 0,05$ versus OGD.

Considerando la importancia de la localización subcelular de la proteína MDM2, clave para la interacción y regulación de p53 (Freedman & Levine, 1998; O'Keefe, Li, & Zhang, 2003; Roth, Dobbstein, Freedman, Shenk, & Levine, 1998; Xirodimas, Saville, Edling, Lane, & Laín, 2001), analizamos la expresión de la proteína en los dos compartimentos celulares donde se ha descrito principalmente: núcleo y citosol. Para ello, se realizó un fraccionamiento subcelular y se estudiaron los niveles de MDM2 en los extractos citosólicos y nucleares de neuronas expuestas al modelo de NMDA-PC previo a la isquemia. Como se muestra en la Figura 13, el incremento de la proteína MDM2 se produjo en ambos compartimentos celulares, núcleo y citosol, a las 4 horas

de reoxigenación tras la OGD. Este aumento de MDM2 promovía la desestabilización de p53 en el núcleo, lo que evitaba la actividad transcripcional de p53, que se traducía en una disminución de los niveles de su diana molecular PUMA. Además, el incremento en la expresión de MDM2 en ambos compartimentos remarca la importancia de la dinámica núcleo/citosol de la proteína, pues su traslocación al citosol favorece la poli-ubiquitinación y posterior degradación de p53 en el proteosoma, promoviendo la inducción de un fenotipo neuroprotector.

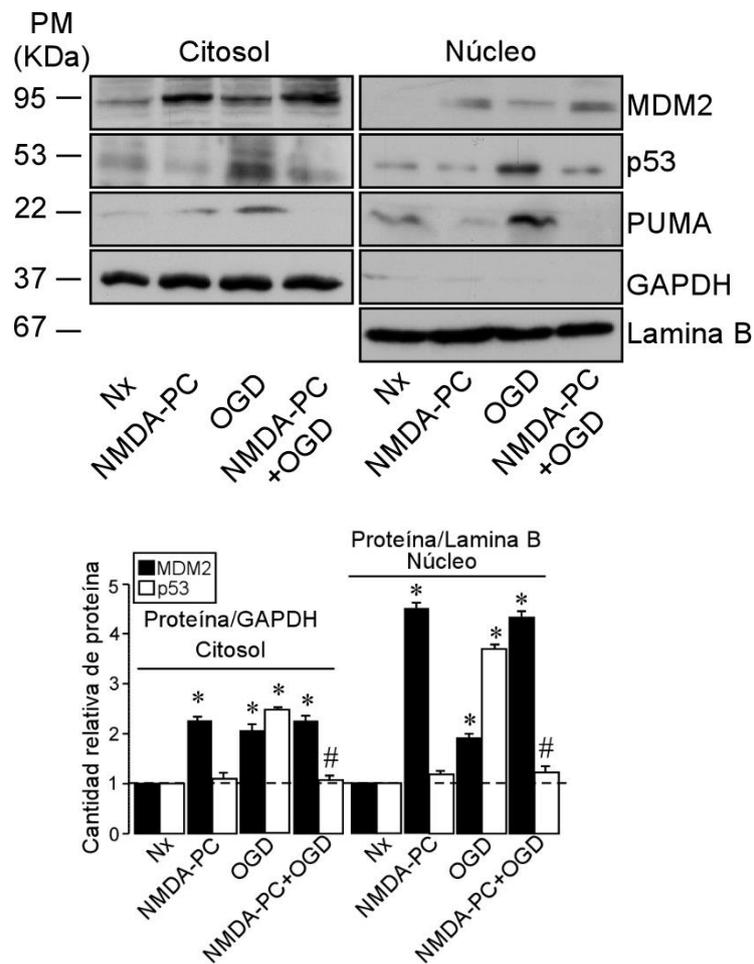


Figura 13. El NMDA-PC promueve el aumento de los niveles de la proteína MDM2 con la subsiguiente desestabilización nuclear y citosólica de p53. Neuronas corticales en cultivo primario se expusieron a un modelo *in vitro* de NMDA-PC y se analizó la expresión de la proteína MDM2, p53 y PUMA mediante transferencia tipo *Western*. La expresión de GAPDH y Lámina B se utilizaron como control de carga de la fracción citosólica y nuclear, respectivamente. La cuantificación se normalizó frente a la Nx. Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 3 cultivos independientes) y se utilizó la *t* de *Student* para comparaciones entre grupos. * p < 0,05 versus Nx; # p < 0,05 versus OGD.

La localización subcelular de MDM2 se confirmó mediante inmunofluorescencia, donde observamos como el NMDA-PC indujo un aumento en la proteína MDM2. En estas condiciones, la proteína se concentra principalmente en la región nuclear y perinuclear de las neuronas en proceso de apoptosis. Este hecho favorecería su interacción con p53 para su marcaje y posterior degradación (Figura 14). La disminución de los niveles de caspasa-3 activa observada tras el PC confirma su papel neuroprotector frente a la isquemia.

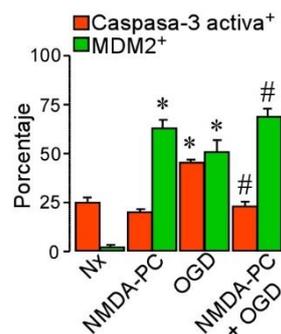
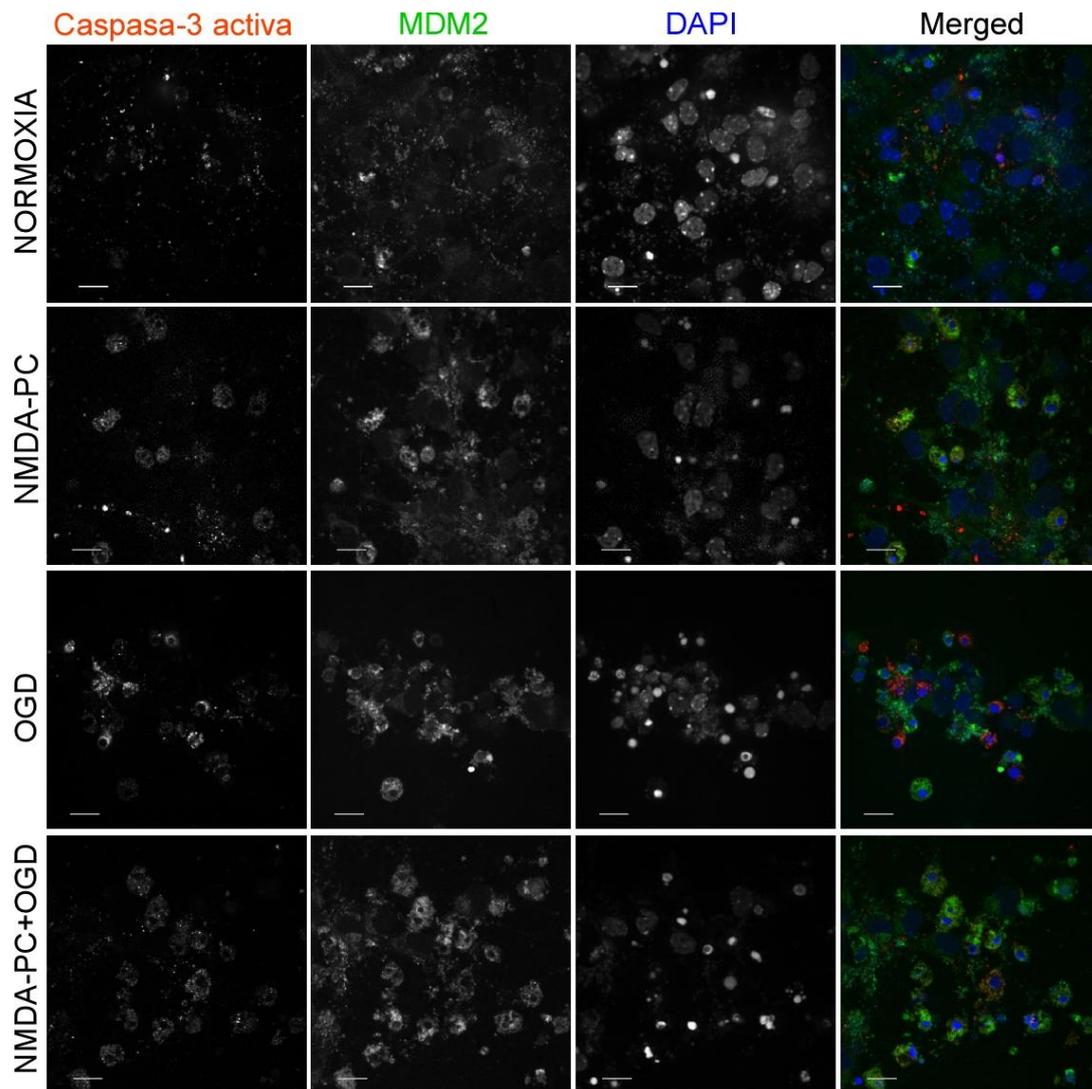


Figura 14. El NMDA-PC induce el aumento de los niveles de la proteína MDM2, nucleares y citosólicos, a las 4 horas de reoxigenación tras la isquemia. Neuronas corticales en cultivo primario se expusieron a un modelo *in vitro* de NMDA-PC y se analizó la expresión y localización subcelular de la proteína MDM2 (verde), junto a la proteína de apoptosis caspasa-3 activa (rojo) y la sonda nuclear DAPI (azul). Barra de escala: 20 μ m. Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 3 cultivos independientes) y se utilizó la *t* de Student para comparaciones entre grupos. * p < 0,05 versus Nx; # p < 0,05 versus OGD.

2.2. EL PRECONDICIONAMIENTO FAVORECE LA INTERACCIÓN MDM2-P53, LO QUE PREVIENE LA ESTABILIZACIÓN DE P53 INDUCIDA TRAS LA ISQUEMIA

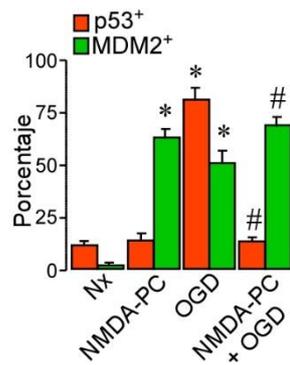
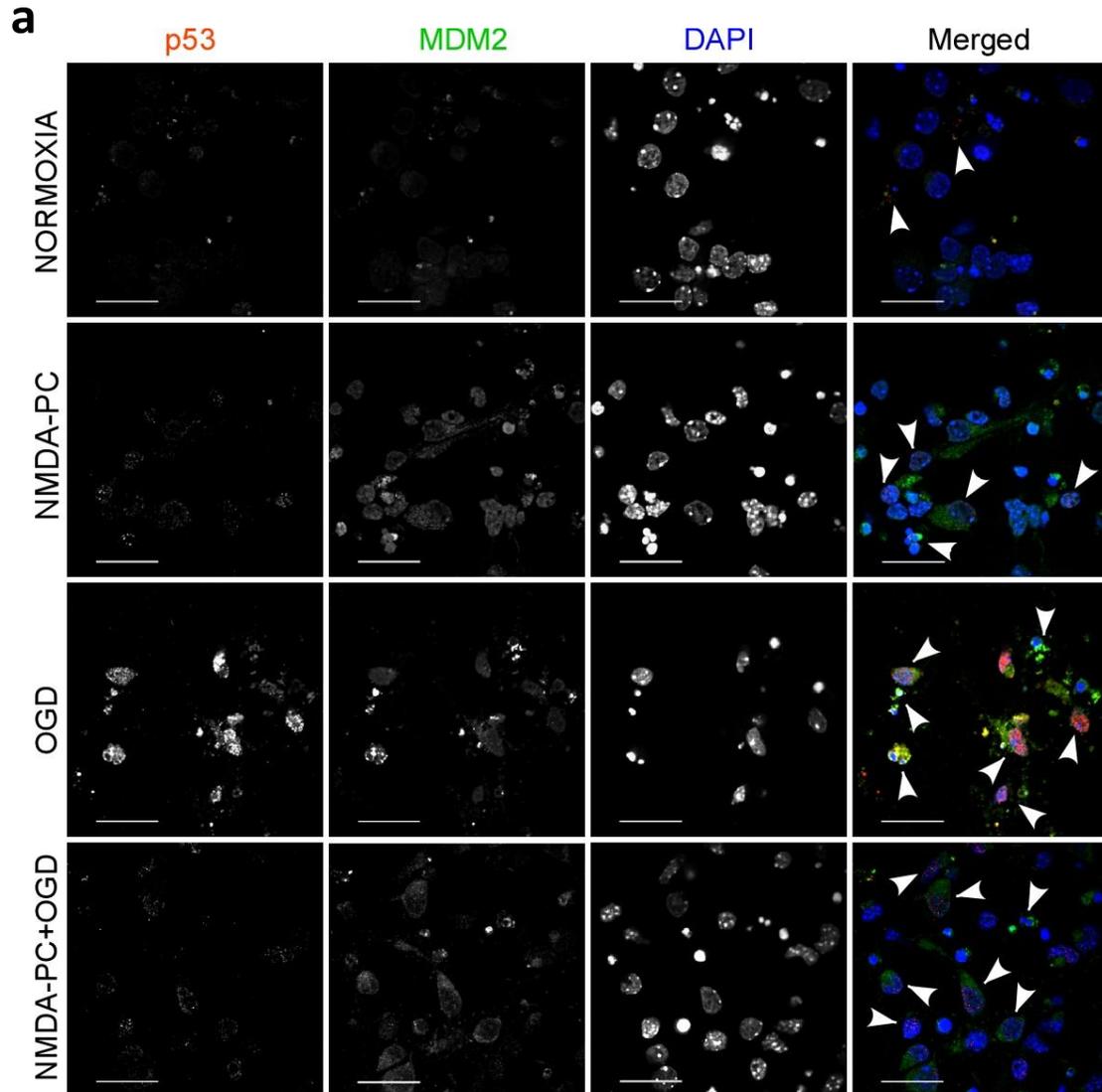
Como se comentó previamente en la Introducción, la proteína MDM2 interacciona con p53 en condiciones fisiológicas, lo permite la inhibición de la actividad transcripcional de esta última y facilita su degradación por el proteosoma (Haupt, Maya, Kazaz, & Oren, 1997; Moll & Petrenko, 2003; Momand, Zambetti, Olson, George, & Levine, 1992; Oliner et al., 1993). Sin embargo, determinadas situaciones de estrés celular provocan la alteración morfofuncional de ambas proteínas, evitando su interacción y provocando la acumulación de p53. Por lo tanto, dicha interacción es fundamental para el control de la estabilidad de p53 y el mantenimiento de la supervivencia celular (Manfredi, 2010; Nag et al., 2013).

En vista de la importancia de la conexión entre ambas proteínas en el control del daño celular y teniendo en cuenta el aumento de la proteína MDM2 observado tras el NMDA-PC, nos decidimos a investigar si el preconditionamiento podía estar afectando a la unión MDM2-p53.

Para ello, se tomaron microfotografías donde se observaba el aumento en los niveles de MDM2 y la mayor interacción entre ambas proteínas, lo que evitaba la acumulación de p53 a las 4 horas de reoxigenación tras la isquemia. Esta interacción se hacía más notable tras el PC, tanto en las neuronas pro- apoptóticas como en aquellas que mantienen aún su viabilidad celular. Aunque la OGD también indujo un aumento de la proteína MDM2 y su interacción con p53, esta no fue suficiente para promover su desestabilización (Figura 15a). Este hecho podría deberse a que los niveles de p53, durante la isquemia, sobrepasan la capacidad regulatoria de la proteína MDM2. De esta manera, el aumento promovido por p53 no es suficiente para recuperar la estabilidad celular, como se observa al analizar las abundancias relativas de cada proteína (p53/MDM2 y viceversa) (Figura 15b).

Para confirmar la interacción de p53 y MDM2, se realizaron experimentos de co- inmunoprecipitación que nos permitieron analizar la posible interacción de ambas

proteínas en nuestras condiciones experimentales. En este sentido, realizamos dos ensayos de co-inmunoprecipitación, uno con p53 y otro con MDM2, llevando como control una muestra sin inmunoprecipitar que denominamos INPUT. Como se observa en la Figura 15b, el NMDA-PC produjo un aumento en la interacción MDM2-p53, lo que se tradujo en una disminución en los niveles de p53 tras la isquemia.



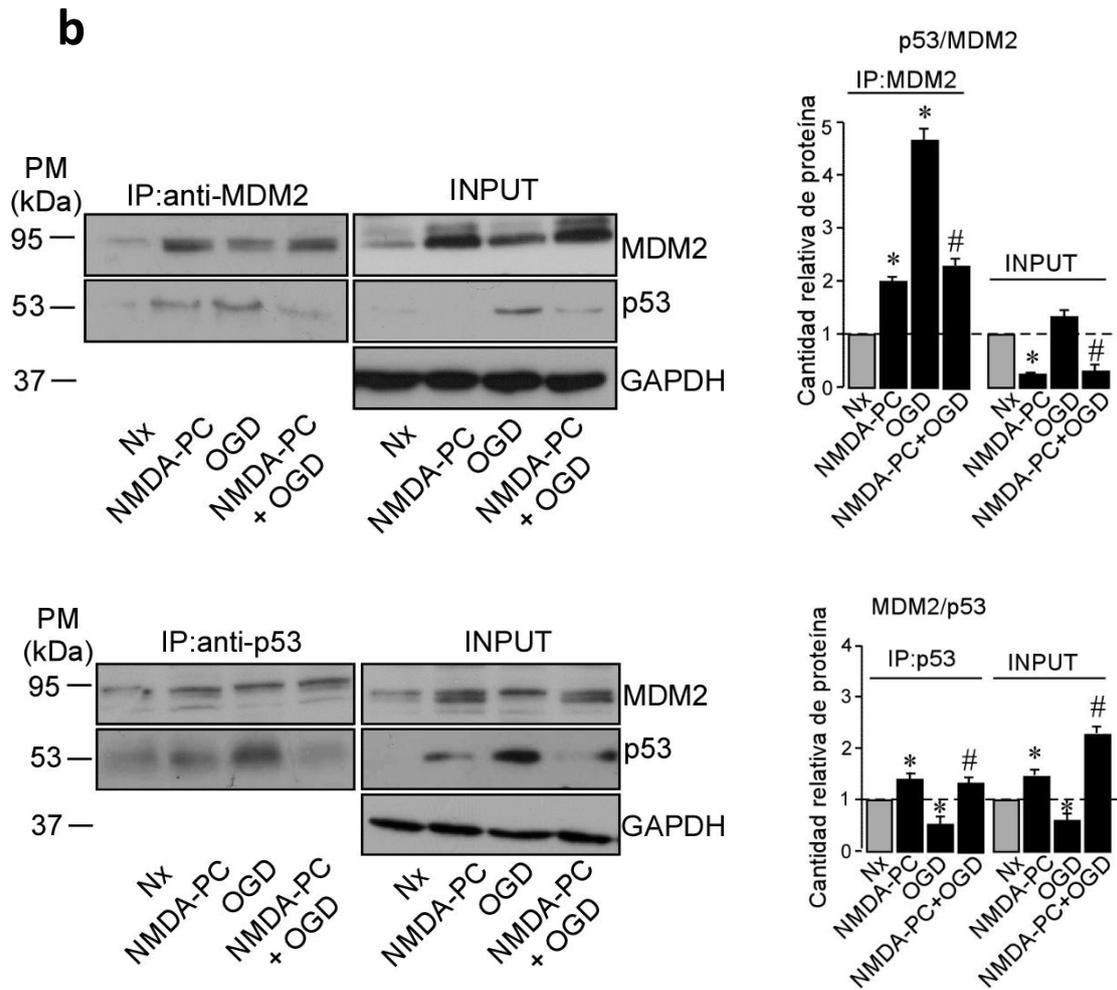


Figura 15. El NMDA-PC promueve la interacción MDM2-p53 y la desestabilización de p53 inducida tras la isquemia. Neuronas corticales en cultivo primario se expusieron a un modelo *in vitro* de NMDA-PC y se analizó la expresión y co-localización de las proteínas MDM2 y p53 por inmunofluorescencia (a), mediante el marcaje de p53 (rojo), MDM2 (verde) y la sonda nuclear DAPI (azul). Las puntas de flecha blancas indican las zonas de interacción MDM2-p53. Barra de escala: 20 μ m. (b) Se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación donde se inmunoprecipitaron MDM2 o p53, respectivamente, en cada una de las condiciones. Se analizaron los niveles de expresión de ambas proteínas mediante transferencia tipo *Western*. Como INPUT se utilizó una fracción del extracto celular. La expresión de la GAPDH se empleó como control de carga. La cuantificación se normalizó frente a la Nx. Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 3 cultivos independientes) y se utilizó la *t* de Student para comparaciones entre grupos. * p < 0,05 versus Nx; # p < 0,05 versus OGD.

A la vista de estos resultados, podemos confirmar que la activación subtóxica de los receptores NMDA, utilizada como PC, promueve el aumento de la proteína MDM2 y favorece su interacción con p53. Dicha interacción provoca la desestabilización nuclear y citosólica de p53, lo que previene la muerte neuronal por apoptosis mediada por p53 tras la isquemia.

2.3. LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LA INTERACCIÓN ENTRE MDM2 Y P53 EVITA LA NEUROPROTECCIÓN ASOCIADA AL PRECONDICIONAMIENTO FRENTE A LA ISQUEMIA

Para confirmar la función de la interacción MDM2-p53 en la neuroprotección asociada al preconditionamiento, utilizamos una aproximación farmacológica basada en el bloqueo de la unión entre ambas proteínas mediante un potente inhibidor denominado Nutlin-3a. Este fármaco actúa sobre la región de la proteína MDM2 que interacciona directamente con p53, evitando así su unión (Lyubomir T. Vassilev, 2004).

En primer lugar, realizamos un estudio dosis-respuesta con la finalidad de determinar la concentración necesaria para lograr la inhibición de la interacción MDM2-p53. Para ello, las neuronas se incubaron en presencia de la nutlin-3a, en un rango de concentraciones entre 0,1-10 μM , durante distintos periodos de tiempo. La toxicidad neuronal se determinó mediante el análisis de la apoptosis neuronal por citometría de flujo. Como se observa en la Figura 16, las neuronas tratadas con nutlin-3a mostraron un incremento de la apoptosis, de manera dosis-tiempo dependiente, respecto a las neuronas sin tratamiento (control).

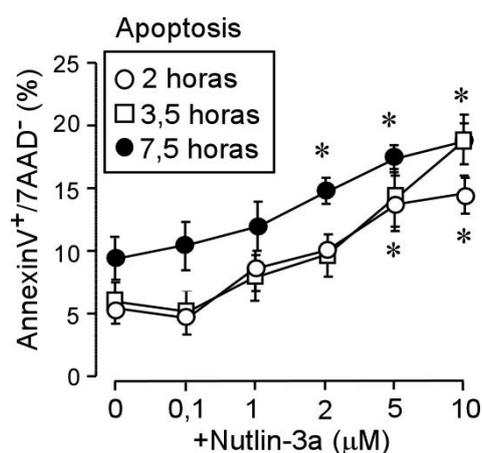


Figura 16. El inhibidor de la interacción entre MDM2 y p53, nutlin-3a, induce la apoptosis neuronal de manera dosis-tiempo dependiente. Neuronas corticales en cultivo primario se incubaron en presencia de nutlin-3a a distintas concentraciones, durante determinados periodos de tiempo. Se analizó la apoptosis neuronal mediante citometría de flujo, considerándose células apoptóticas las Anexina V-APC⁺/7AAD⁻. Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 3 cultivos independientes). * $p < 0,05$ versus control (neuronas sin tratamiento).

Entre las concentraciones que no inducían un aumento de la apoptosis, decidimos escoger la de 2 μM , y comprobamos si era eficaz en la inhibición de la interacción entre MDM2 y p53. Tal y como muestra la Figura 17a, el tratamiento de las neuronas con la dosis de 2 μM durante 2 horas fue suficiente para inducir un aumento en las proteínas MDM2 y p53, así como sus dianas transcripcionales p21 y PUMA. Sin embargo, dicha estabilización de p53 inducida tras el tratamiento no causó la activación de la caspasa-3, tal y como observamos en las Figura 17b.

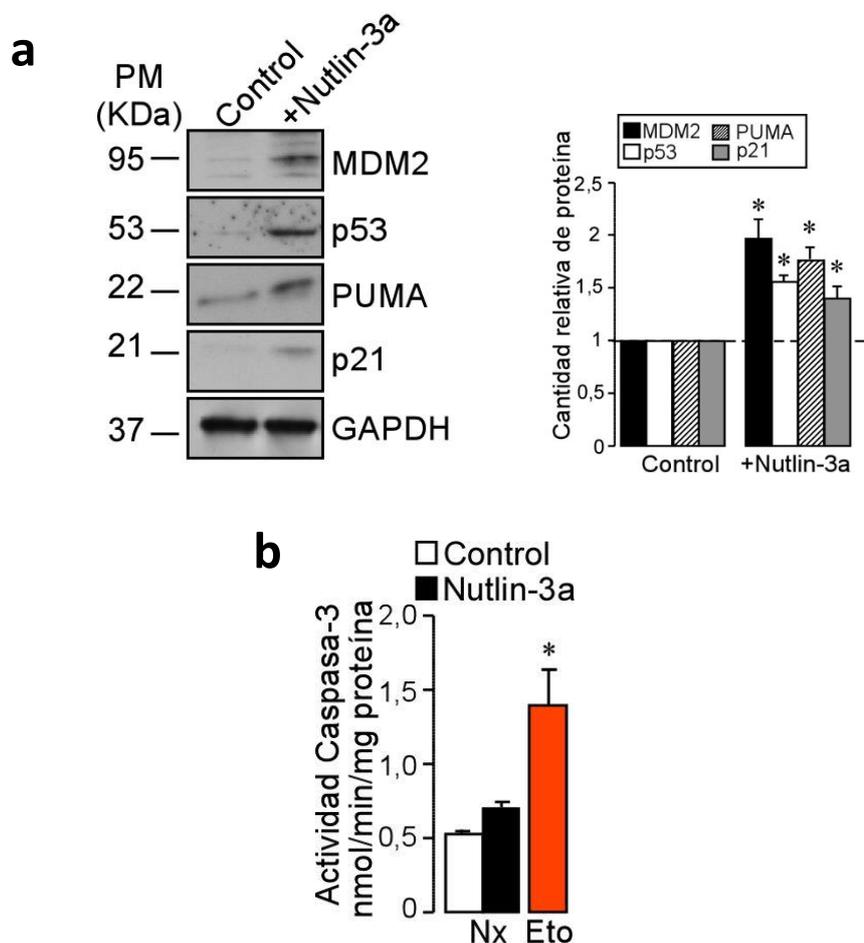
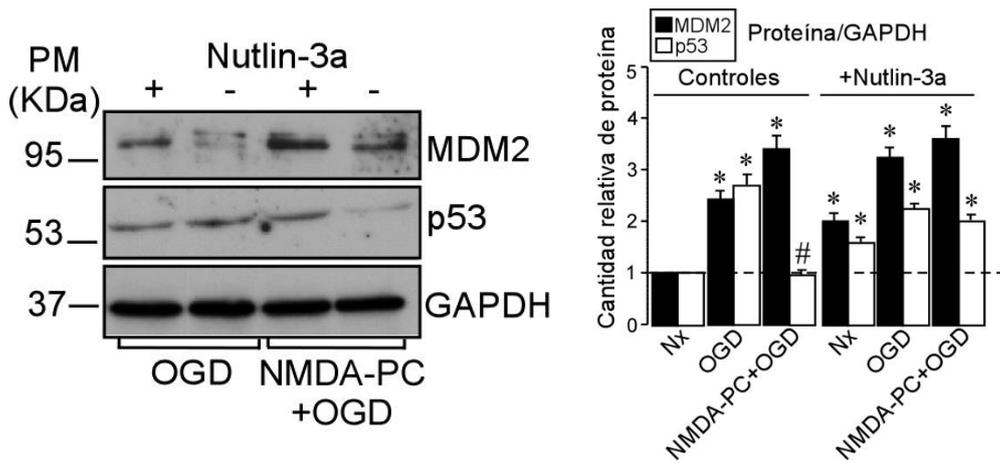


Figura 17. El tratamiento con nutlin-3a 2 μM durante 2 horas aumenta los niveles de MDM2 y p53 sin producir toxicidad. Neuronas corticales en cultivo primario se incubaron en condiciones de Normoxia (control) en presencia de nutlin-3a 2 μM durante 2 horas y se analizó la expresión de las proteínas MDM2 y p53, así como sus dianas transcripcionales p21 y PUMA, mediante transferencia tipo *Western* (a). La expresión de GAPDH se empleó como control de carga. La cuantificación se normalizó frente a la Nx. (b) La apoptosis neuronal se determinó mediante el análisis de la actividad de la caspasa-3 por fluorimetría. Se utilizaron como control de apoptosis las neuronas tratadas con el inductor apoptótico etopósido (10 μM , 24 horas). Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 3 cultivos independientes) y se utilizó la *t* de *Student* para comparaciones entre grupos. * $p < 0,05$ versus Nx; # $p < 0,05$ versus OGD.

Una vez seleccionada la dosis de nutlin3a que inhibía la interacción MDM2-p53 sin causar toxicidad, la utilizamos en cultivos neuronales expuestos a las cuatro condiciones experimentales previamente descritas (Nx, NMDA-PC, OGD y NMDA-PC+OGD). Como se observa en las Figuras 18a y 19, la inhibición farmacológica de la unión MDM2-p53 evitó la desestabilización de la proteína p53 inducida durante el PC, revocando su efecto neuroprotector. La pérdida de neuroprotección se corroboró mediante el análisis de la apoptosis neuronal (Figura 18b) y de caspasa-3 activa (Figura 18c), mediante citometría y fluorimetría, respectivamente. Así, observamos que la disminución del complejo MDM2-p53 evitó la supervivencia neuronal asociada al PC a las 4 horas de reoxigenación después de la isquemia (Figuras 18b y 18c).

a



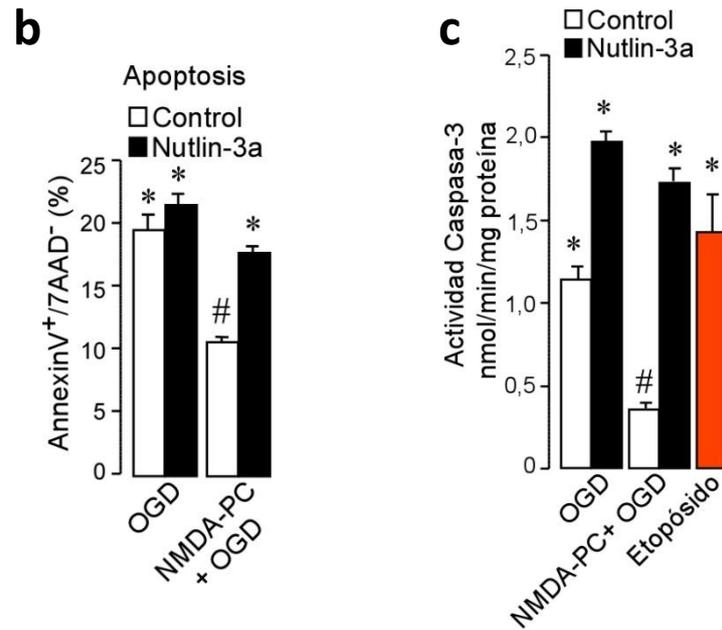


Figura 18. La inhibición específica del complejo MDM2-p53, utilizando nutlin-3a, evita la neuroprotección asociada al PC tras la isquemia. Neuronas corticales en cultivo primario se expusieron a un modelo *in vitro* de NMDA-PC en presencia (+) o ausencia (-) de 2 μ M del inhibidor nutlin-3a. Se analizó la expresión de p53, así como de su regulador MDM2, mediante transferencia tipo *Western blot*. La expresión de GAPDH se empleó como control de carga. La cuantificación se normalizó frente a la Nx. (b) Los niveles de apoptosis neuronal se determinaron mediante citometría de flujo, considerándose células apoptóticas las Anexina V-APC⁺/7 AAD⁻. (c) El análisis de la actividad de caspasa-3 se realizó por fluorimetría. Se utilizaron como control de apoptosis las neuronas tratadas con el inductor apoptótico etopósido (10 μ M, 24 horas). Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 3 cultivos independientes) y se utilizó la *t* de *Student* para comparaciones entre grupos. * p < 0,05 versus Nx; # p < 0,05 versus OGD.

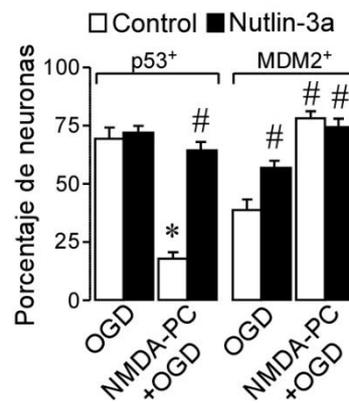
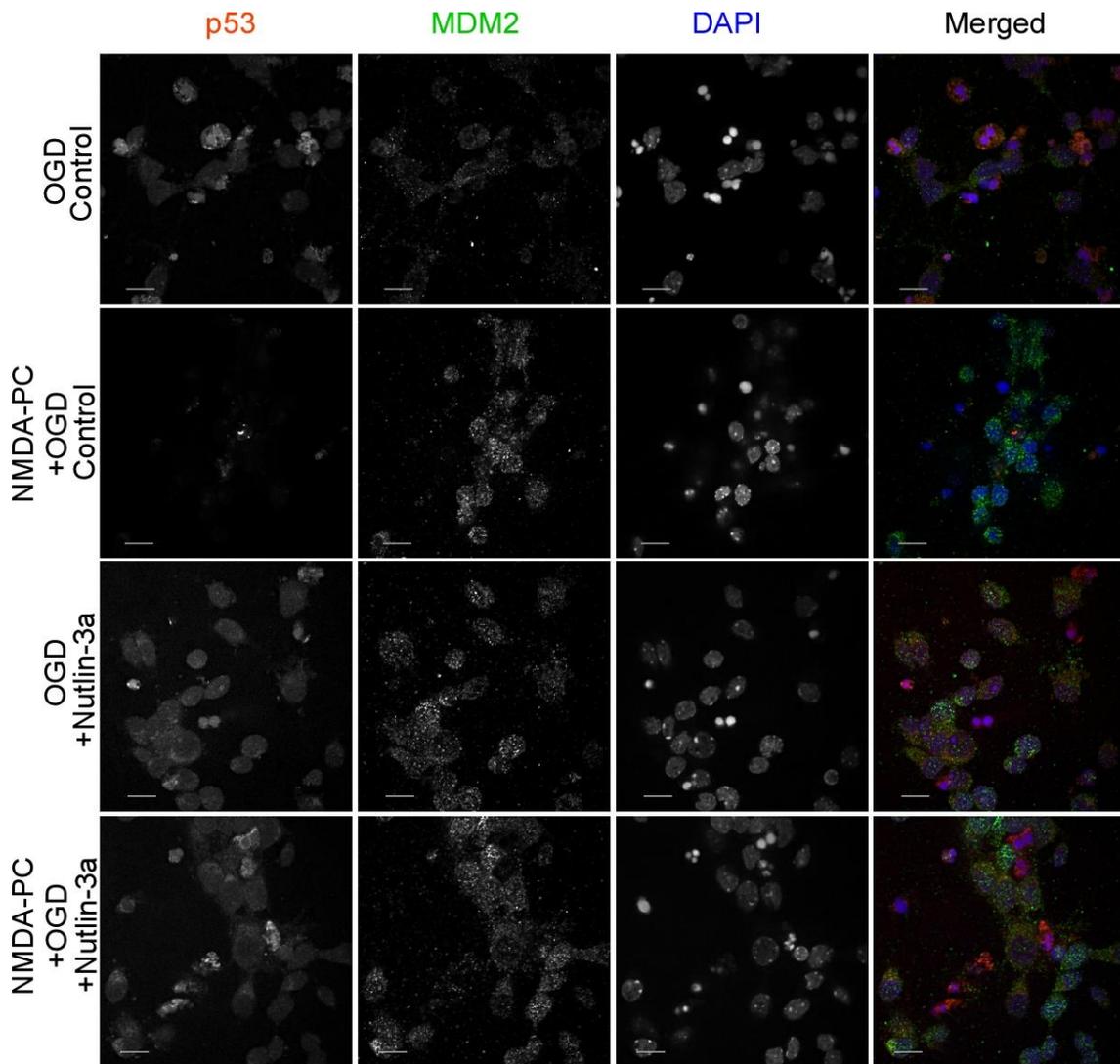
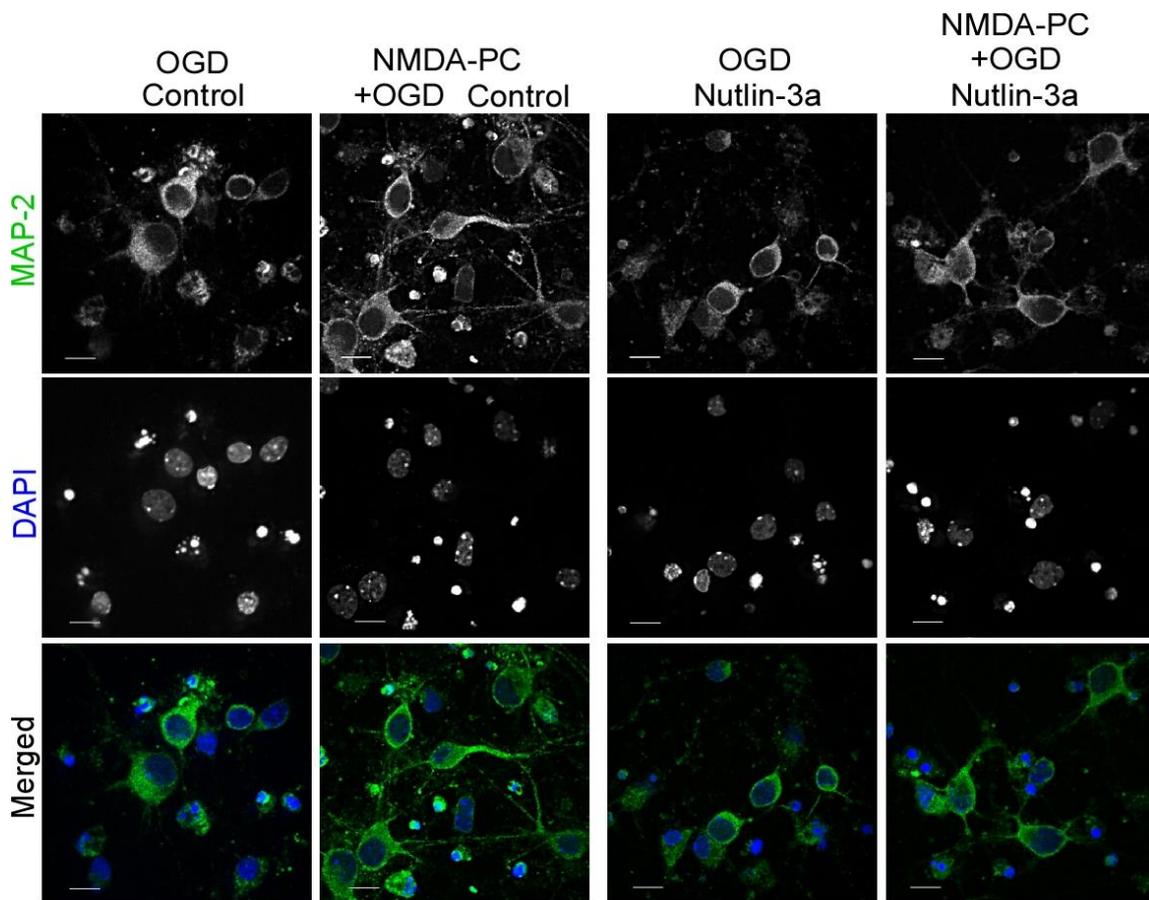


Figura 19. La inhibición del complejo MDM2-p53 previene la desestabilización de p53 asociada al PC tras la isquemia. Neuronas corticales en cultivo primario se expusieron a un modelo *in vitro* de NMDA-PC en presencia (+) o ausencia (-) de 2 μ M del inhibidor nutlin-3a durante las 2 horas de NMDA-PC. Se analizó la expresión de p53 (rojo), así como de su regulador MDM2 (verde), mediante microscopía de fluorescencia. Se empleó DAPI como sonda nuclear (azul). Barra de escala: 20 μ m. Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 3 cultivos independientes). * p < 0,05 versus Nx; # p < 0,05 versus OGD.

Previamente, describimos como el NMDA-PC no sólo previene la inducción de apoptosis neuronal, sino que además evita la degeneración de las neuritas tras la isquemia. En este sentido, nuevamente comprobamos como la preservación de la integridad neuronal tras la isquemia mediada por el NMDA-PC se previno completamente tras el tratamiento con la nutlin-3a, confirmando de nuevo la función esencial de la interacción MDM2-p53 en la neuroprotección (Figura 20).



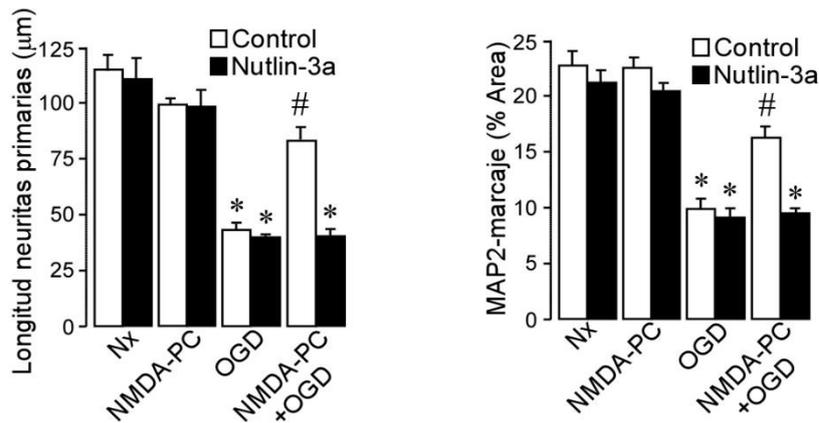


Figura 20. La inhibición específica del complejo MDM2-p53, utilizando nutlin-3a, evita la neuroprotección asociada al PC. Neuronas corticales en cultivo primario se expusieron a un modelo validado *in vitro* de NMDA-PC en presencia (+) o ausencia (-) del inhibidor nutlin-3a 2 µM durante las 2 horas de NMDA-PC. Se analizó la integridad neuronal mediante el marcaje de MAP-2 (verde) y la sonda nuclear DAPI (azul). Barra de escala: 10 µm. La degeneración de las neuritas se determinó a través de la cuantificación de la longitud de las neuritas y del área de marcaje de Map-2. Los datos son medias ± S.E.M. de 60 neuronas por grupo (n = 3 cultivos independientes). * p < 0,05 versus Nx; # p < 0,05 versus OGD.

Finalmente, quisimos verificar si la apoptosis neuronal inducida tras la ruptura de la interacción MDM2-p53 estaba mediada por p53. Para ello, realizamos el mismo tratamiento con nutlin-3a en cultivos de neuronas corticales obtenidas de ratones deficientes de *p53*, expuestos a las condiciones experimentales del modelo de PC. Tras determinar los niveles de apoptosis neuronal, pudimos observar como la inhibición del complejo MDM2-p53 evitó la neuroprotección inducida tras el NMDA-PC en las neuronas *wt*, respecto a las neuronas *p53 ko*, lo que reafirma a p53 como una pieza clave en los mecanismos neuroprotectores inducidos durante el PC (Figura 21).

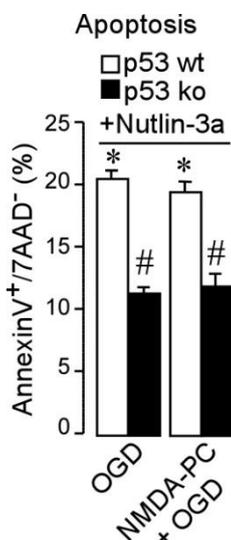
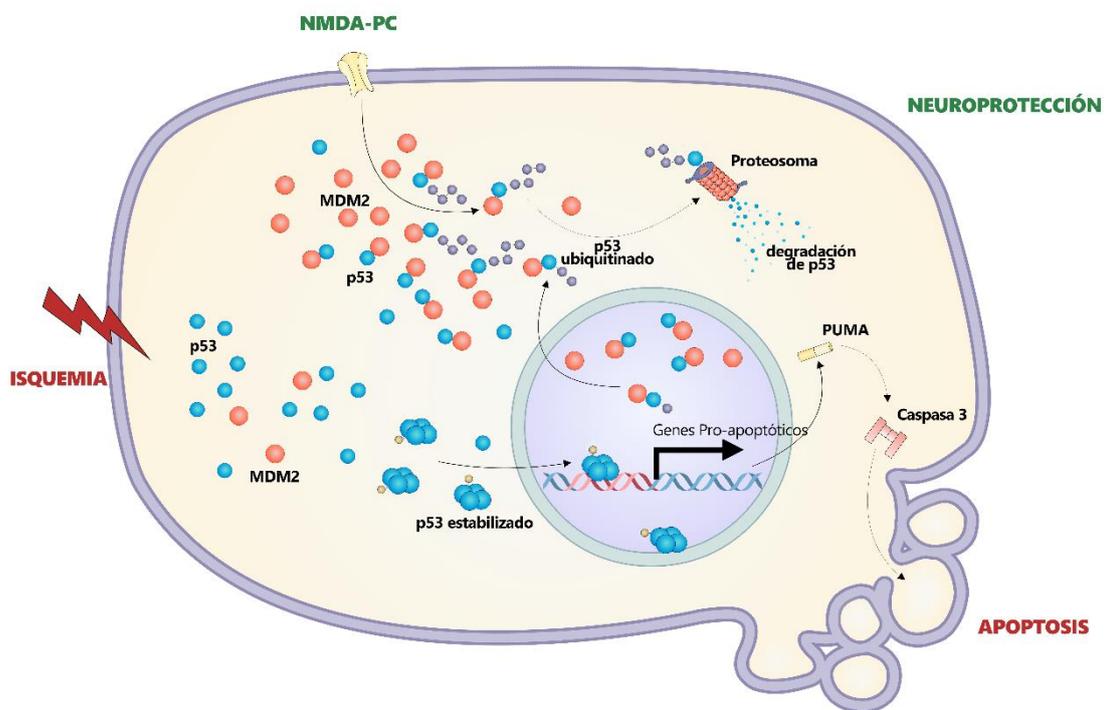


Figura 21. La inhibición de la interacción MDM2-p53 durante el PC induce un aumento de la apoptosis solo en las neuronas *wt* de p53, pero no en las neuronas *ko* de p53. Neuronas corticales en cultivo primario procedentes de ratones *p53 wt* o *p53 ko* se expusieron a un modelo *in vitro* de NMDA-PC en presencia (+) o ausencia (-) del inhibidor nutlin-3a 2 µM durante las 2 horas de NMDA-PC. Se determinó la apoptosis neuronal por citometría de flujo, considerándose las células apoptóticas las Anexina V-APC⁺/7 AAD⁻. Los datos son medias ± S.E.M. (n = 3 cultivos independientes) y se utilizó la *t* de Student para comparaciones entre grupos. * p < 0,05 versus Nx; # p < 0,05 versus OGD.

En resumen, todos estos resultados demuestran que el modelo de NMDA-PC *in vitro* confiere neuroprotección frente a la isquemia mediante el incremento de los niveles de expresión de la proteína MDM2. Además, el NMDA-PC promueve la interacción de MDM2 con p53 e induce su desestabilización a nivel nuclear y citosólico, previniendo la apoptosis neuronal a las 4 horas de reoxigenación tras la isquemia. Todo esto revela el papel fundamental de la vía MDM2-p53 en los mecanismos neuroprotectores asociados al PC, lo que convierte a la proteína MDM2 en una diana molecular clave en la tolerancia isquémica (Esquema 25).



Esquema 25. La vía MDM2-p53 desempeña un papel clave en la neuroprotección asociada al preconditionamiento frente a la isquemia. La estimulación subtóxica de los NMDA-R *in vitro* induce un aumento de la proteína MDM2, favoreciendo su interacción con p53 y promoviendo su desestabilización y posterior degradación por el proteosoma. Todo esto previene la activación de la vía p53/PUMA/caspasa-3 y evita la apoptosis neuronal inducida a las 4 horas de reoxigenación tras la isquemia.

3. EL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO ACTIVA LA VÍA DE SUPERVIVENCIA PI3K/AKT PROMOVRIENDO LA TOLERANCIA ISQUÉMICA NEURONAL

Uno de los objetivos principales de la presente Memoria se centra en la búsqueda de los mecanismos moleculares involucrados en la tolerancia isquémica tras el preconditionamiento. En este sentido, hemos descrito el papel principal de la vía MDM2-p53 en la neuroprotección asociada al PC. Sin embargo, la interacción MDM2-p53 no se encuentra aislada del resto de mecanismos moleculares celulares, sino que está inmersa en una compleja red que incluye entre otras la proteína kinasa Akt, cuya participación en vías de supervivencia celular se encuentra ampliamente reseñada (Datta, Brunet, & Greenberg, 1999; Franke, Hornik, Segev, Shostak, & Sugimoto, 2003; Gottlieb et al., 2002).

La importancia de la vía de señalización PI3K/Akt se ha estudiado principalmente en cáncer (Martini, De Santis, Braccini, Gulluni, & Hirsch, 2014; Whitman, Kaplan, Schaffhausen, Cantley, & Roberts, 1985) aunque recientemente se ha estudiado su implicación en los mecanismos neuroprotectores desencadenados tras el ictus. De hecho, se ha descrito su asociación con los mecanismos moleculares inducidos durante la tolerancia isquémica (Constantino et al., 2018; Lai et al., 2014), lo que la convierte en una posible diana en la neuroprotección frente a la isquemia (Gao et al., 2008; H. Zhao et al., 2005). Con estos antecedentes, nos propusimos el estudio de la vía de supervivencia PI3K/Akt en nuestro modelo de PC con objeto de dilucidar su función en la tolerancia isquémica.

3.1. EL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO FAVORECE EL AUMENTO DEL COMPLEJO MDM2-P53, LO QUE PREVIENE LA ACTIVACIÓN DE LA CASPASA-3 Y LA APOPTOSIS NEURONAL INDUCIDAS TRAS LA ISQUEMIA

Para desarrollar nuestro objetivo utilizamos, en este caso, un modelo más fisiológico de IPC. Este modelo, validado *in vitro*, consistía en la incubación de neuronas corticales de ratón en cultivo primario en ausencia de glucosa y oxígeno (OGD) durante 20 minutos previo al daño letal. Este periodo de tiempo de IPC, validado en trabajos previos de investigación (Grabb & Choi, 1999), se encontraba por debajo del umbral de daño. Tras el IPC, las neuronas se sometieron a la isquemia experimental de 90 minutos (condición IPC + OGD). La mayor estabilización de p53 se observó a las 4 horas de reoxigenación, tal y como habíamos comprobado previamente en el modelo de NMDA-PC (Figura 24).

Para determinar si el modelo de IPC era capaz de inducir TI, se analizaron los niveles de muerte celular por apoptosis mediante el empleo de dos técnicas diferentes, la citometría de flujo y la fluorimetría. Primero, analizamos la apoptosis neuronal mediante citometría de flujo. Como observamos en la Figura 22, el IPC previno el incremento de los niveles de apoptosis a las 4 horas de reoxigenación tras la isquemia, lo que demuestra el papel neuroprotector del IPC.

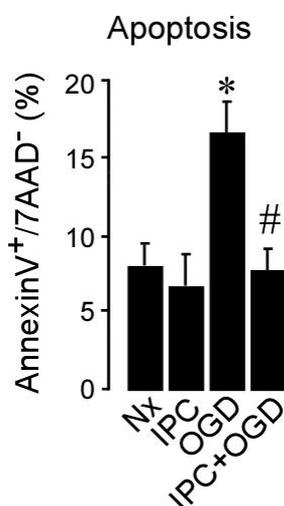


Figura 22. El preconditionamiento isquémico (IPC) previene la muerte neuronal por apoptosis inducida tras la isquemia. Neuronas corticales en cultivo primario se expusieron a un modelo *in vitro* de IPC durante 20 minutos previo a la OGD y se determinó la apoptosis neuronal por citometría de flujo, a las 4 horas de reoxigenación tras la isquemia. Se consideraron células apoptóticas las Anexina V-APC⁺/7 AAD⁻. Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 3 cultivos independientes) y se utilizó la *t* de Student para comparaciones entre grupos. * p < 0,05 versus Nx; # p < 0,05 versus OGD.

En segundo lugar, la efectividad del modelo de IPC se confirmó mediante el análisis de la actividad de la caspasa-3, como marcador de apoptosis, mediante fluorimetría y transferencia *Western blot*. Así, corroboramos como la activación de la caspasa-3 inducida tras la isquemia se prevenía en las neuronas preconditionadas (Figura 23a y 23b). Estos resultados validan el modelo de IPC *in vitro* desarrollado, lo que permite su utilidad como herramienta experimental en el estudio de la tolerancia isquémica.

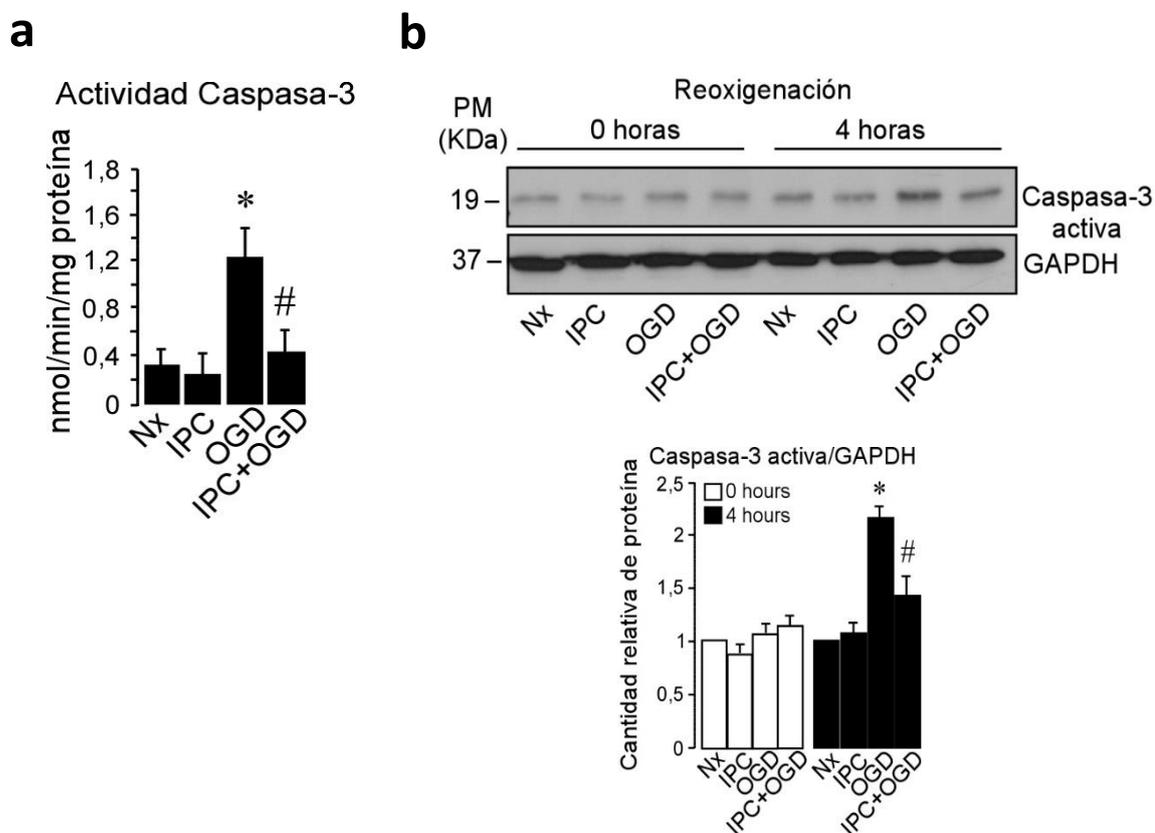


Figura 23. El preconditionamiento isquémico (IPC) evita la activación de la caspasa-3 y posterior muerte por apoptosis inducida tras la isquemia. Neuronas corticales en cultivo primario se expusieron a un modelo *in vitro* de IPC durante 20 minutos previo a la isquemia y se determinó la apoptosis neuronal mediante el análisis de la actividad de la caspasa-3. (a) Determinación de la actividad de la caspasa-3 por fluorimetría, a las 4 horas de reoxigenación tras la isquemia. Se utilizaron como control de apoptosis las neuronas tratadas con el inductor apoptótico etopósido (10 μ M, 24 horas). (b) Análisis de la expresión de caspasa-3 activa mediante transferencia tipo *Western*. La expresión de GAPDH se empleó como control de carga. La cuantificación se normalizó frente a la Nx. Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 3 cultivos independientes) y se utilizó la *t* de *Student* para comparaciones entre grupos. * $p < 0,05$ versus Nx; # $p < 0,05$ versus OGD.

Una vez validado el modelo de IPC *in vitro*, nuestro siguiente objetivo fue estudiar las vías de señalización responsables de la neuroprotección inducida tras el PC. El modelo de NMDA-PC *in vitro* previamente empleado permitió identificar la vía neuroprotectora MDM2-p53 en la tolerancia isquémica. En este sentido, nos preguntamos si el IPC podría tener un efecto neuroprotector frente a la isquemia mediado por la activación de esta vía. Para ello, analizamos los niveles de expresión de p53. Como observamos en la Figura 24, la estabilización de p53 inducida tras la isquemia se previno en las neuronas preconditionadas, lo que implicaba a p53 en los mecanismos neuroprotectores asociados al IPC. Además, la inhibición de los NMDA-R con el antagonista MK-801, durante el PC, evitaba el efecto neuroprotector, lo que demostraba la implicación de los receptores NMDA en la mediación de la TI asociada al IPC (Figura 24).

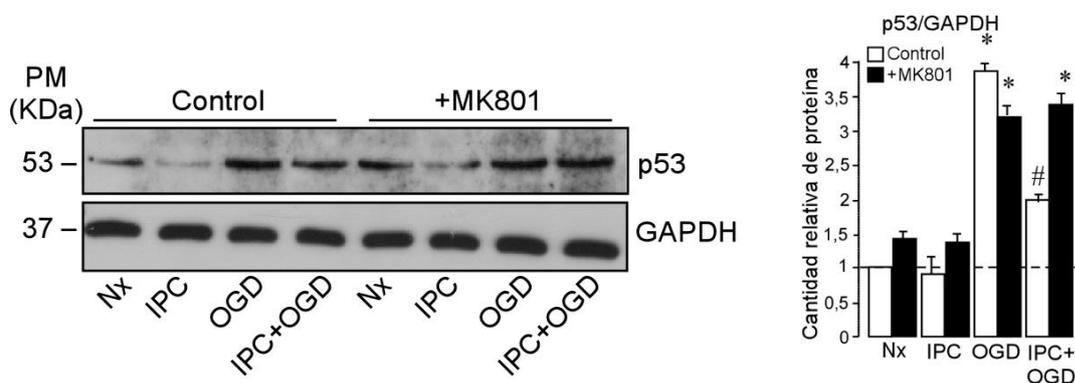


Figura 24. La tolerancia isquémica asociada al IPC se encuentra mediada por la activación de los receptores NMDA. Neuronas corticales en cultivo primario se incubaron, o no, en presencia del antagonista MK-801 (10 μ M) durante el periodo de exposición al modelo *in vitro* de IPC de 20 minutos previo a la isquemia y se analizó la expresión de la proteína p53 mediante transferencia tipo *Western*. La expresión de GAPDH se empleó como control de carga. La cuantificación se normalizó frente a la Nx. Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 3 cultivos independientes) y se utilizó la *t* de *Student* para comparaciones entre grupos. * p < 0,05 versus Nx; # p < 0,05 versus OGD.

La participación de la proteína p53 en la tolerancia inducida tras el IPC se corroboró mediante una segunda aproximación experimental. Para ello, utilizamos de nuevo neuronas corticales procedentes de embriones que tenían delecionado el gen *p53*. Como se muestra en la Figura 25, la ausencia de la proteína p53 previno la muerte neuronal por apoptosis inducida tras la isquemia en las neuronas *ko* de p53, pero no

en las *wt*. Por lo tanto, la proteína p53 se encontraba mediando la neuroprotección asociada al IPC.

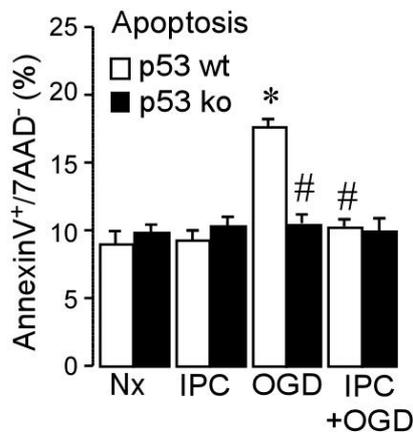


Figura 25. La ausencia de p53 previene la apoptosis neuronal inducida a las 4 horas de reoxigenación tras la isquemia. Neuronas corticales en cultivo primario procedentes de ratones p53 *wt* o p53 *ko* se expusieron a un modelo *in vitro* de IPC y se determinó la apoptosis neuronal mediante citometría de flujo. Se consideraron apoptóticas las neuronas Anexina V-APC⁺/7AAD⁻. Los datos son medias \pm S.E.M. ($n = 3$ cultivos independientes) y se utilizó la *t* de Student para comparaciones entre grupos. * $p < 0,05$ versus Nx; # $p < 0,05$ versus OGD

Así mismo, analizamos la expresión del principal regulador de p53, la proteína MDM2, en nuestras condiciones de estudio. Nuestros resultados mostraron un incremento en los niveles de MDM2 en las neuronas sometidas al IPC previo a la isquemia, lo que conllevaba la desestabilización de p53, principalmente en su forma fosforilada y activa *phospho-p53* (pp53; Serina 15) (Figura 26). Por lo tanto, podemos confirmar que el IPC induce la activación de la vía MDM2-p53, lo que evita la fosforilación y posterior estabilización de p53 y previene la apoptosis neuronal inducidas tras la isquemia.

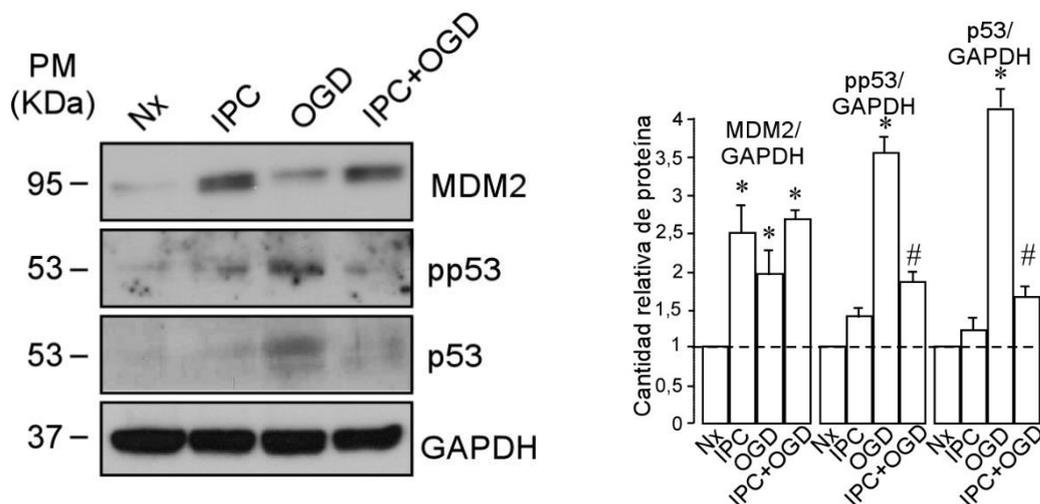


Figura 26. El IPC fomenta la activación de la vía neuroprotectora MDM2-p53 y previene la fosforilación y estabilización de p53 a las 4 horas de reoxigenación tras la isquemia. Neuronas corticales en cultivo primario se expusieron a un modelo *in vitro* de IPC durante 20 minutos previo a la isquemia y se analizó la expresión de la proteína p53, la forma activa *phospho-p53* (pp53; Serina 15) y MDM2 mediante transferencia tipo Western. La expresión de GAPDH se empleó como control de carga. La cuantificación se normalizó frente a la Nx. Los datos son medias \pm S.E.M. ($n = 3$ cultivos independientes) y se utilizó la *t* de Student para comparaciones entre grupos. * $p < 0,05$ versus Nx; # $p < 0,05$ versus OGD.

3.2. EL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO INDUCE LA FOSFORILACIÓN TEMPRANA Y TRANSITORIA DE AKT, LO QUE PROMUEVE LA ESTABILIZACIÓN, FOSFORILACIÓN Y SUBSIGUIENTE TRANSLOCACIÓN NUCLEAR DE MDM2

Una vez confirmada la implicación de la vía MDM2-p53 en la TI asociada al IPC, nos dispusimos a estudiar la función de la proteína Akt en dichos procesos neuroprotectores. Se sabe que la proteína kinasa Akt precisa de la fosforilación de dos residuos principales, Serina (Ser 473) y Treonina (Thr 308), para su activación (Franke et al., 2003; Vara et al., 2004). Una vez activa, modulará la función, mediante fosforilación, de numerosos sustratos moleculares entre los que se encuentra la proteína MDM2 (Gottlieb et al., 2002). Dada la importancia de ésta última en las vías de neuroprotección asociadas al PC, nos propusimos ahondar en los mecanismos reguladores que podían estar controlando su función, centrándonos en la proteína kinasa Akt.

En primer lugar, nos preguntamos si el IPC inducía la activación de la proteína Akt. Para ello, analizamos los niveles de expresión de la forma activa de Akt, *phospho-Akt* (pAkt; Serina 473), durante distintos tiempos de isquemia entre los que se encontraba el tiempo seleccionado para nuestro modelo de IPC. Así, la isquemia de 20 minutos indujo un aumento en la expresión de pAkt, que dejamos de observar a tiempos más prolongados. Esto nos sugería que la isquemia de 20 minutos, utilizada como estímulo subletal, es capaz de inducir la vía de supervivencia PI3K/Akt (Figura 27).

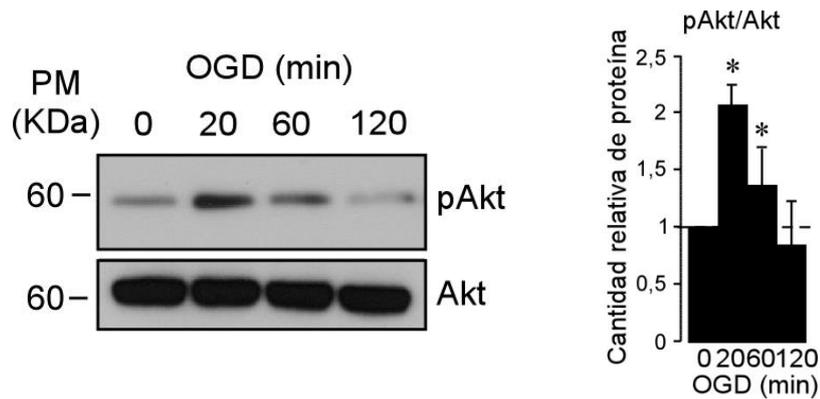


Figura 27. La isquemia induce la fosforilación temprana de Akt de manera tiempo-dependiente. Neuronas corticales en cultivo primario se expusieron a distintos tiempos de 0, 20, 60 y 120 minutos de isquemia experimental (OGD). Se analizó la expresión de la forma activa de Akt, *phospho*-Akt (pAkt; Serina 473) mediante transferencia tipo *Western*. Se realizó el ratio pAkt/Akt para conocer el grado de fosforilación de la proteína. La cuantificación se normalizó frente a la Nx. Los datos son medias \pm S.E.M. ($n = 3$ cultivos independientes) y se utilizó la *t* de *Student* para comparaciones entre grupos. * $p < 0,05$ versus Nx; # $p < 0,05$ versus OGD.

Sin embargo, analizando la expresión de *la forma fosforilada y activa de Akt* (p-Akt) a lo largo del tiempo, se observó un descenso de los niveles de la proteína activa durante las 2 horas tras el IPC. Estos niveles se recuperaron de nuevo a las 4 horas, momento en que observábamos el aumento de expresión de MDM2, y volvían a caer en el tiempo. Esto parece indicar una dinámica oscilatoria de activación de la proteína Akt, posiblemente en relación con la compleja red molecular en la que participa, regulándose transcripcionalmente por diversos factores como PI3K o PTEN, como se describe en la Introducción.

Aun así, la activación temprana de Akt durante el IPC era suficiente para promover la fosforilación de MDM2 en Serina 166, uno de los residuos fosforilables de MDM2 por Akt (Feng et al., 2004; L. D. Mayo & Donner, 2001; Milne et al., 2004). Por lo tanto, esto sugiere que la activación temprana y transitoria de Akt inducida por el IPC es suficiente para promover la fosforilación y estabilización en el tiempo de MDM2 (Figura 28).

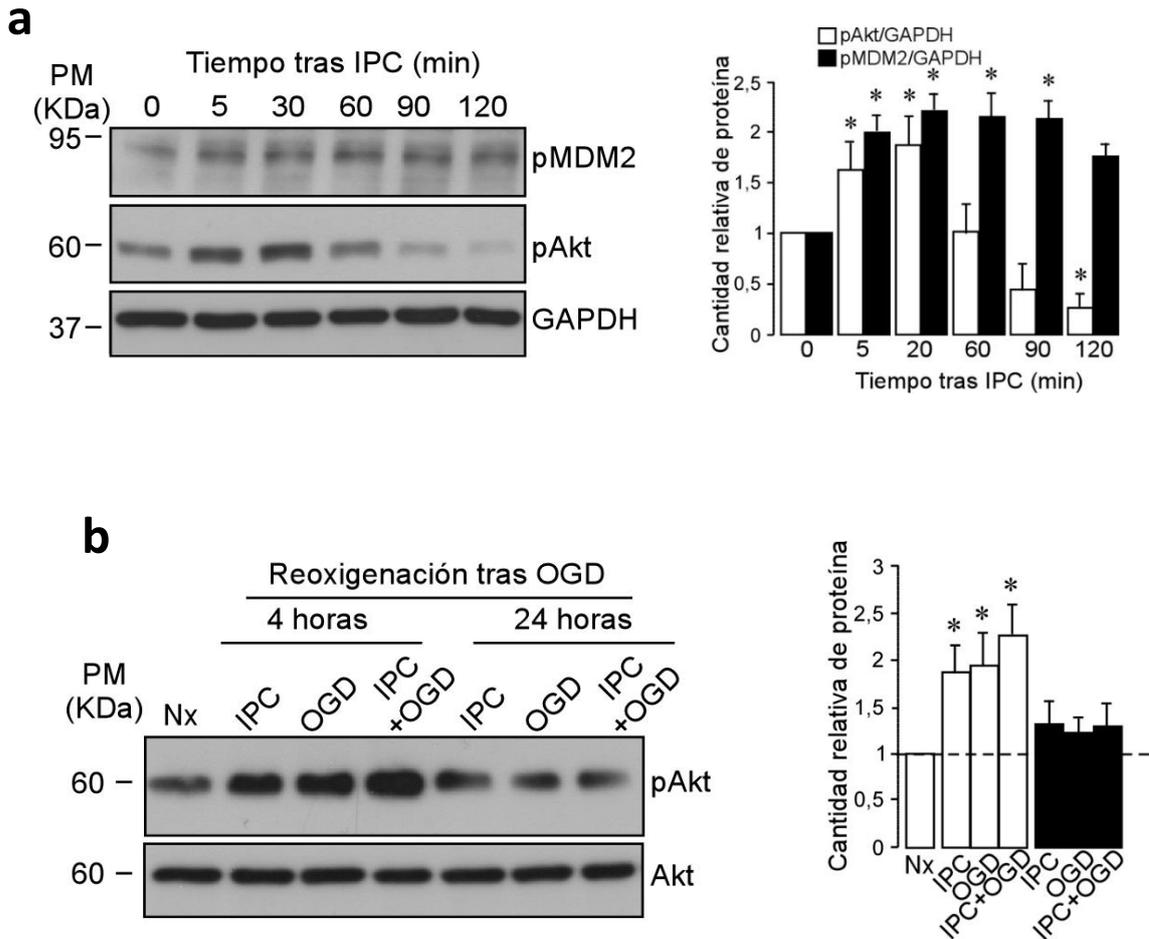
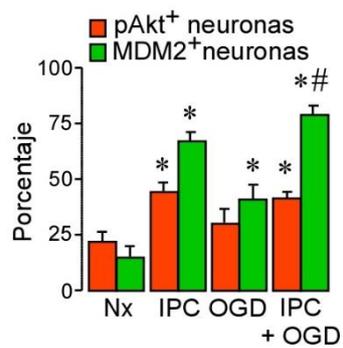
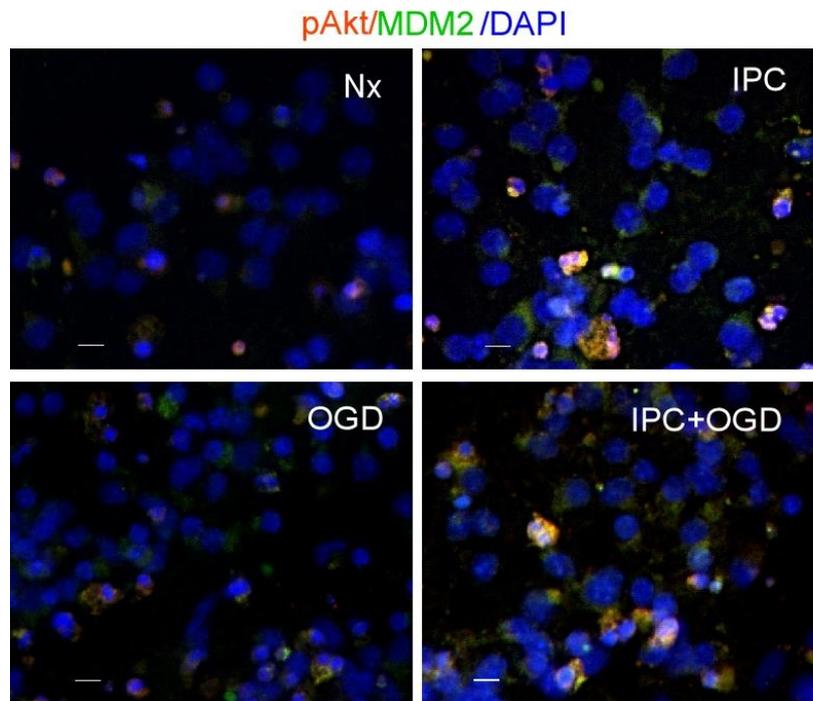


Figura 28. El IPC induce la fosforilación temprana de Akt y promueve la fosforilación y estabilización de MDM2. Neuronas corticales en cultivo primario se expusieron a un modelo *in vitro* de IPC durante 20 minutos previo a la isquemia y se analizó la expresión de la proteína pAkt (Serina 473) a las 4 y 24 horas de reoxygenación (b). En determinados casos, se recogió muestra a distintos tiempos tras el IPC y se analizó la expresión de las proteínas pAkt y pMDM2 (Serina 166) mediante transferencia tipo Western (a). La expresión de GAPDH se empleó como control de carga. Además, se realizó el ratio pAkt/Akt para conocer el grado de fosforilación proteica. La cuantificación se normalizó frente a la Nx. Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 3 cultivos independientes) y se utilizó la *t* de Student para comparaciones entre grupos. * $p < 0,05$ versus Nx; # $p < 0,05$ versus OGD.

La fosforilación de MDM2 es necesaria para su traslocación al núcleo celular, donde favorece la degradación de p53, evitando su estabilización y previniendo la muerte por apoptosis (Gottlieb et al., 2002; L. D. Mayo & Donner, 2001; Singh et al., 2016; B. P. Zhou et al., 2001). De hecho, tras analizar la localización subcelular de MDM2 mediante inmunocitoquímica, pudimos comprobar que la proteína MDM2 se localizó principalmente en el núcleo de las células preconditionadas. Además, los resultados

indicaban que MDM2 co-localizaba con la forma activa de Akt (pAkt) (Figura 29a). Esto mismo se corroboró mediante el fraccionamiento celular del núcleo y citosol, donde se observó un aumento de las proteínas MDM2 y pAkt mayoritariamente en el núcleo (Figura 29b).

a



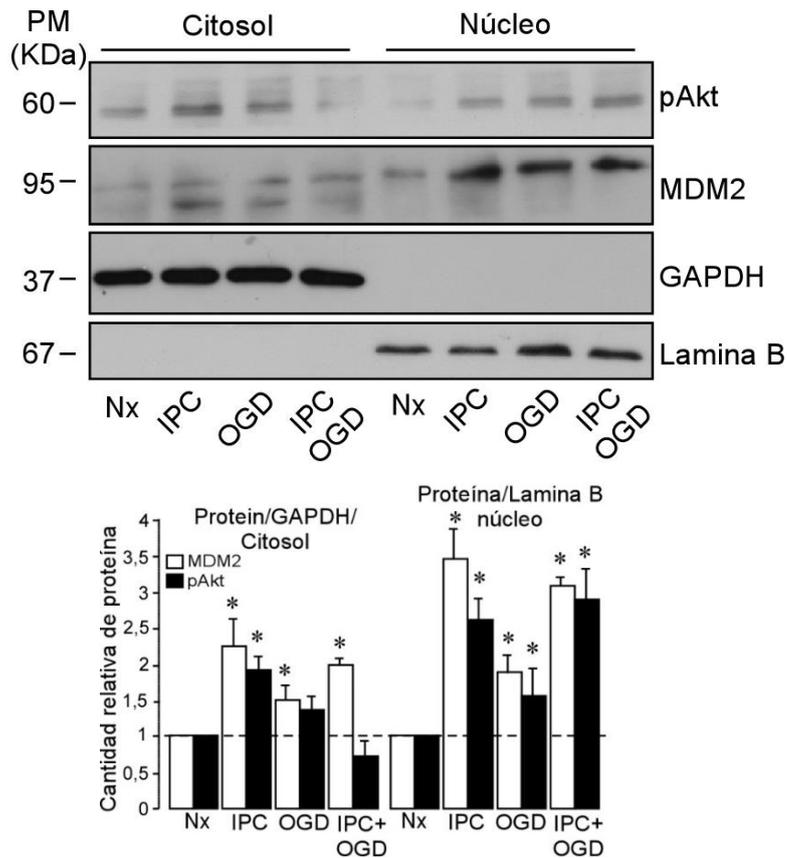
b

Figura 29. El IPC induce la fosforilación de Akt y su traslocación nuclear junto a MDM2. Neuronas corticales en cultivo primario se expusieron a un modelo *in vitro* de IPC previo a la isquemia y se analizó la expresión de la proteína pAkt (Serina 473; rojo) y MDM2 (verde) mediante microscopía de fluorescencia, utilizando DAPI (azul) como sonda nuclear (a). Barra de escala: 20 μ m. La detección de pAkt y MDM2 también se llevó a cabo por transferencia tipo *Western* (b), utilizando las fracciones nuclear y citosólica. La expresión de Lámina B y GAPDH se empleó como control de carga del núcleo y citosol, respectivamente. La cuantificación se normalizó frente a la Nx. Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 3 cultivos independientes) y se utilizó la *t* de *Student* para comparaciones entre grupos. * p < 0,05 versus Nx; # p < 0,05 versus OGD.

Para confirmar que el IPC promovía la interacción de pAkt con MDM2 a nivel nuclear, favoreciendo su fosforilación y activación, realizamos un ensayo de co-inmunoprecipitación de MDM2 y analizamos la expresión de ambas proteínas por transferencia tipo *Western*. Como observamos en la Figura 30, el IPC indujo un incremento sustancial en la interacción de ambas proteínas a nivel nuclear, lo que fomentó la fosforilación de MDM2 y la desestabilización de p53 tras la isquemia.

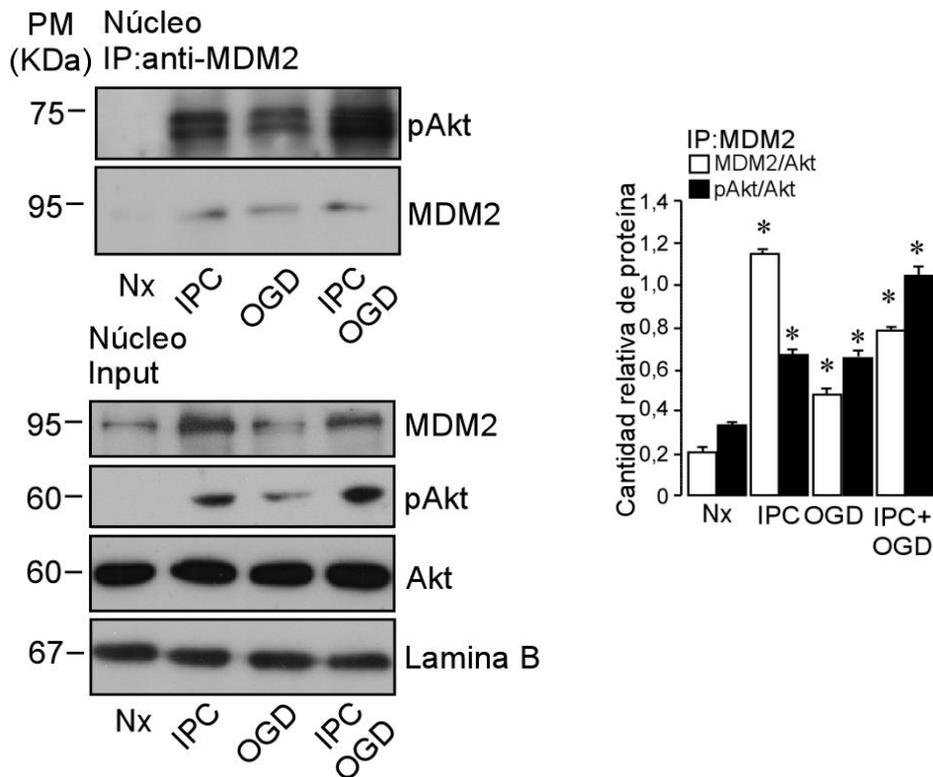


Figura 30. El IPC promueve la interacción de Akt y MDM2 a nivel nuclear. Neuronas corticales en cultivo primario se expusieron a un modelo *in vitro* de IPC previo a la isquemia. Tras 4 horas de reoxigenación, se analizó la interacción entre pAkt y MDM2 mediante co-inmunoprecipitación, donde se inmunoprecipitó la proteína MDM2 y se determinaron los niveles de expresión de pAkt mediante transferencia tipo *Western*. Una fracción del extracto celular se utilizó como INPUT. La expresión de Lámina B se utilizó como control de carga. Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 3 cultivos independientes) y se utilizó la *t* de *Student* para comparaciones entre grupos. * p < 0,05 versus Nx.

Por tanto, nuestros resultados hasta ahora demuestran que el IPC induce la activación temprana de la proteína Akt y promueve su interacción con MDM2 y traslocación nuclear, lo que podría ser clave en la neuroprotección asociada al IPC.

3.3. TANTO LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LA VÍA PI3K/AKT, COMO EL SILENCIAMIENTO GÉNICO DE LA PROTEÍNA AKT, PREVIENEN LA NEUROPROTECCIÓN ASOCIADA AL PRECONDICIONAMIENTO FRENTE A LA ISQUEMIA

Con objeto de comprobar la función de la vía PI3K/Akt en el desarrollo de la tolerancia isquémica asociada al IPC, se llevaron a cabo dos aproximaciones experimentales. Por un lado, inhibimos la activación de la proteína Akt mediante la utilización del inhibidor irreversible y específico de la PI3K, Wortmanina (Maria Delgado-Esteban et al., 2007). Así, las neuronas se incubaron durante 30 minutos en presencia de 100 nM del inhibidor, previo a la inducción del modelo de IPC, y se analizó la expresión de la forma activa pAkt y MDM2 por transferencia tipo *Western*. Como se observa en la Figura 31a, la inhibición farmacológica de PI3K con wortmanina evitó la fosforilación de Akt y la fosforilación de MDM2 mediada por el IPC, lo que provocó la pérdida de la neuroprotección. Este hecho se confirmó mediante el análisis de la apoptosis neuronal por citometría de flujo, donde observamos que el tratamiento con wortmanina evitó la prevención de la apoptosis neuronal asociada al IPC (Figura 31b).

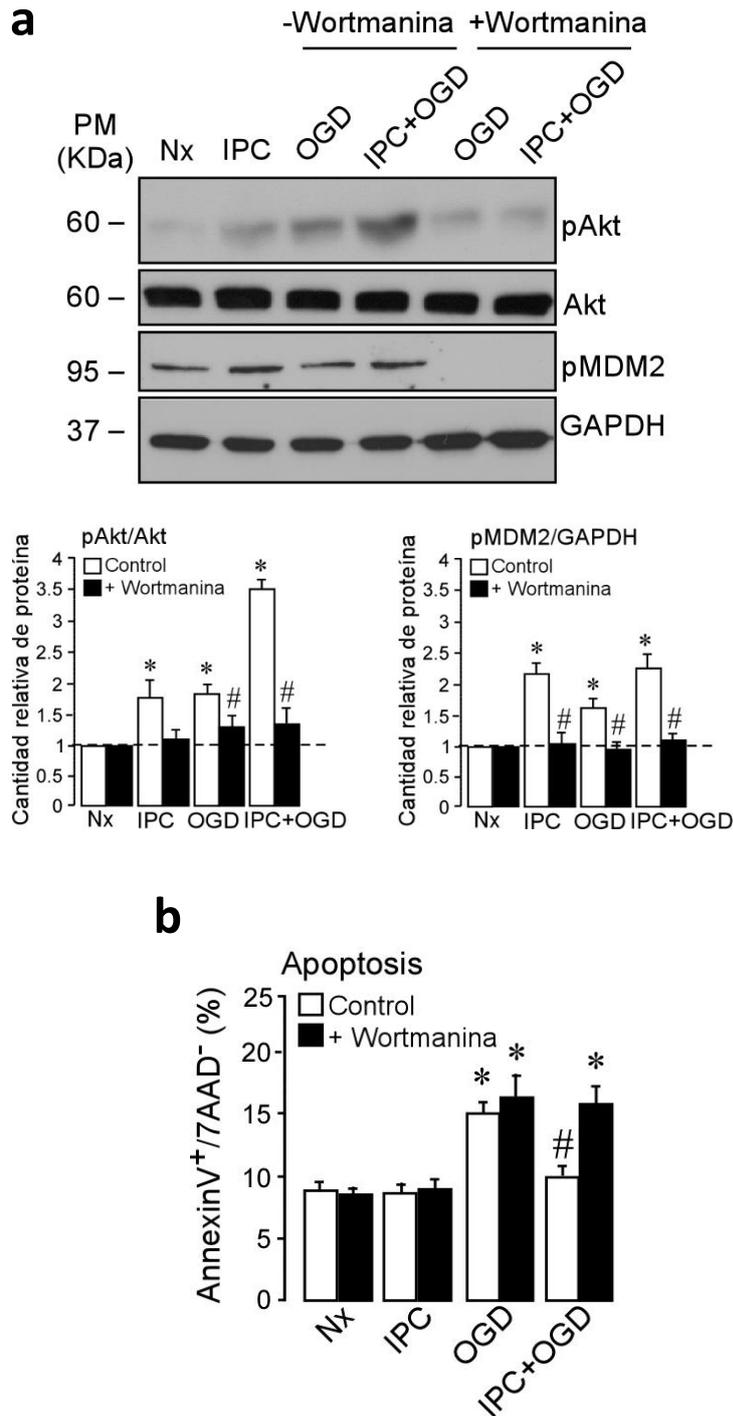


Figura 31. Durante el IPC, la inhibición de la vía PI3K evitó la activación de Akt y la fosforilación de MDM2, con el subsiguiente aumento de la muerte por apoptosis inducida tras la isquemia. Neuronas corticales en cultivo primario se incubaron en presencia, o no, del inhibidor wortmanina (100nmol/L) durante 30 minutos previos a la inducción del modelo *in vitro* de IPC. (a) La expresión de las proteínas pAkt y pMDM2 se analizó mediante transferencia tipo *Western*. Se realizó el ratio pAkt/Akt para conocer el grado de fosforilación de la proteína. La cuantificación se normalizó frente a la Nx. (b) La muerte neuronal por apoptosis se determinó por citometría de flujo. Se consideraron apoptóticas las neuronas Anexina V-APC⁺/7AAD⁻. Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 3 cultivos independientes) y se utilizó la *t* de *Student* para comparaciones entre grupos. * $p < 0,05$ versus Nx; # $p < 0,05$ versus OGD.

Por otro lado, se llevó a cabo una segunda aproximación basada en la reducción, de forma específica, de la expresión de Akt (isoforma Akt1 mayoritariamente) en las neuronas mediante el silenciamiento con siRNA. La eficiencia del siRNA se comprobó mediante transferencia tipo *Western*, donde observamos que la incubación de las neuronas con el siRNA durante 72 horas previas a la inducción del IPC produjo una reducción de aproximadamente el 50% en los niveles de Akt, así como de su forma activa pAkt (Figura 32). Este modelo nos permitió confirmar los resultados previos obtenidos con la inhibición farmacológica de PI3K. Así, el silenciamiento de Akt produjo una disminución en los niveles fosforilados de MDM2, sin afectar a los niveles de proteína (Figura 33).

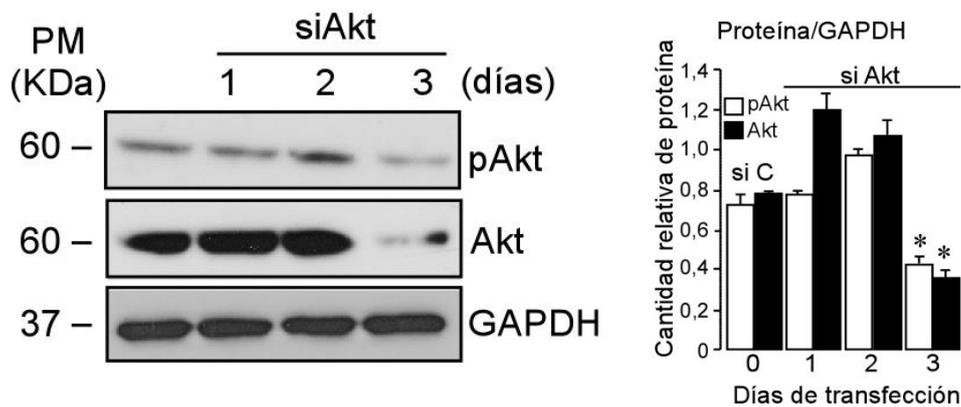


Figura 32. Análisis del silenciamiento de Akt en neuronas corticales de ratón. Neuronas corticales en cultivo primario se incubaron en presencia de RNA de interferencia frente a Akt (siAkt) durante 1, 2 y 3 días. La eficiencia del silenciamiento de Akt se comprobó mediante el análisis de la proteína Akt, y su forma activa pAkt, mediante transferencia tipo *Western*. La expresión de GAPDH se empleó como control de carga. Los datos son medias \pm S.E.M. ($n = 3$ cultivos independientes) y se utilizó la *t* de Student para comparaciones entre grupos. * $p < 0,05$ versus siControl.

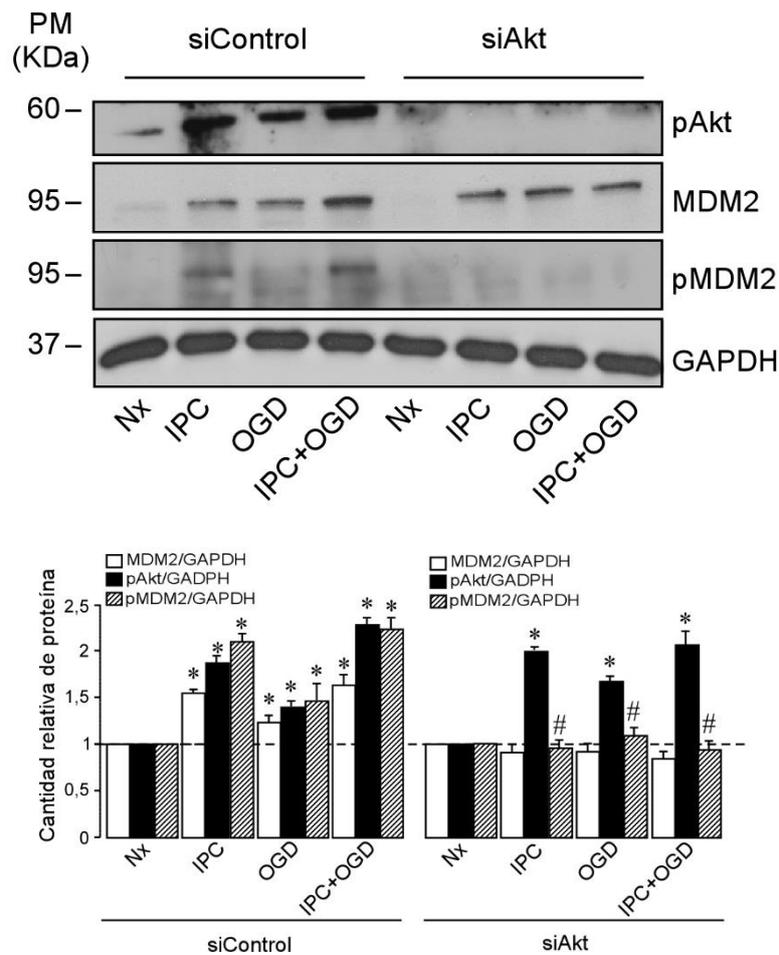


Figura 33. Durante el IPC, el silenciamiento de la proteína Akt evita la fosforilación de MDM2, con el subsiguiente aumento de la muerte por apoptosis inducida tras la isquemia. Neuronas corticales en cultivo primario se incubaron en presencia de RNA de interferencia frente a Akt (siAkt) durante 72 horas previas a la inducción del modelo *in vitro* de IPC. La expresión de las proteínas pAkt, MDM2 y pMDM2 se analizó mediante transferencia tipo *Western*. La expresión de GAPDH se empleó como control de carga. La cuantificación se normalizó frente a la Nx. Los datos son medias \pm S.E.M. ($n = 3$ cultivos independientes) y se utilizó la *t* de *Student* para comparaciones entre grupos. * $p < 0,05$ versus Nx; # $p < 0,05$ versus siControl.

Del mismo modo, el silenciamiento de Akt no previno la muerte por apoptosis en las neuronas preconditionadas, lo que condujo a la pérdida de la neuroprotección asociada al IPC (Figura 34).

Estos resultados demuestran la implicación de la vía PI3K/Akt en la tolerancia isquémica inducida tras el preconditionamiento, cuya activación es imprescindible para el desarrollo de la neuroprotección frente a la isquemia. Además, coinciden con trabajos previos que describen el papel principal de esta vía en la neuroprotección frente a la excitotoxicidad (Maria Delgado-Esteban et al., 2007) o el daño isquémico (Hillion et al., 2006; Shibata et al., 2002).

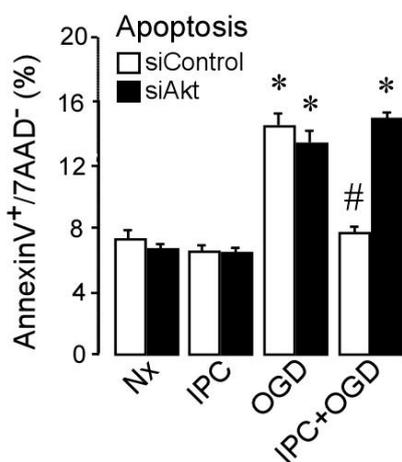
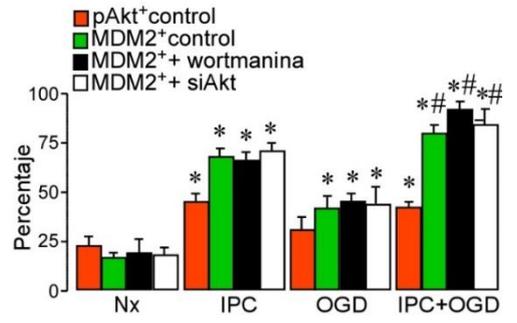
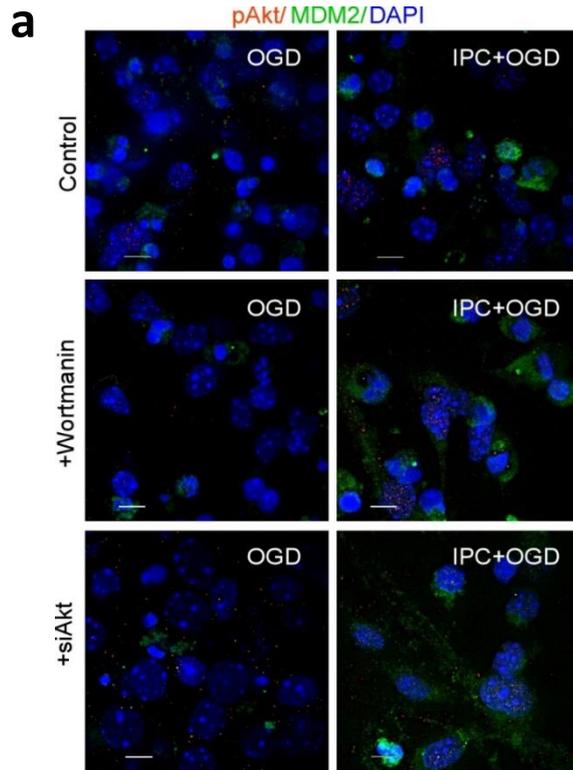


Figura 34. El silenciamiento de Akt no previene la muerte por apoptosis inducida tras la isquemia en neuronas preconditionadas. Neuronas corticales en cultivo primario se incubaron en presencia de siAkt durante 72 horas previas a la exposición al modelo *in vitro* de IPC. La muerte neuronal por apoptosis se determinó por citometría de flujo. Se consideraron apoptóticas las neuronas Anexina V-APC⁺/7 AAD⁻. Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 3 cultivos independientes) y se utilizó la *t* de Student para comparaciones entre grupos. * p < 0,05 versus siControl o Nx, # p < 0,05 versus OGD.

Teniendo en cuenta los resultados previos, donde describimos que la activación de Akt promueve la traslocación de MDM2 al núcleo, quisimos confirmar si la vía PI3K mediaba la neuroprotección a través del control del complejo MDM2-p53. Para ello, inhibimos farmacológicamente la vía PI3K y realizamos el silenciamiento génico la expresión de Akt. Tras esto, analizamos la expresión de las proteínas MDM2 y p53 por inmunofluorescencia. Como se observa en la Figura 35a, la inhibición de la vía PI3K previno la traslocación nuclear de MDM2 que se inducía tras el IPC, promoviendo su acumulación citosólica a las 4 horas de reoxigenación tras la isquemia. Además, la presencia de wortmanina o siAkt condujo a la estabilización de p53 en el núcleo, en neuronas preconditionadas, en comparación con aquellas neuronas en ausencia del inhibidor y tras la isquemia (Figura 35b).



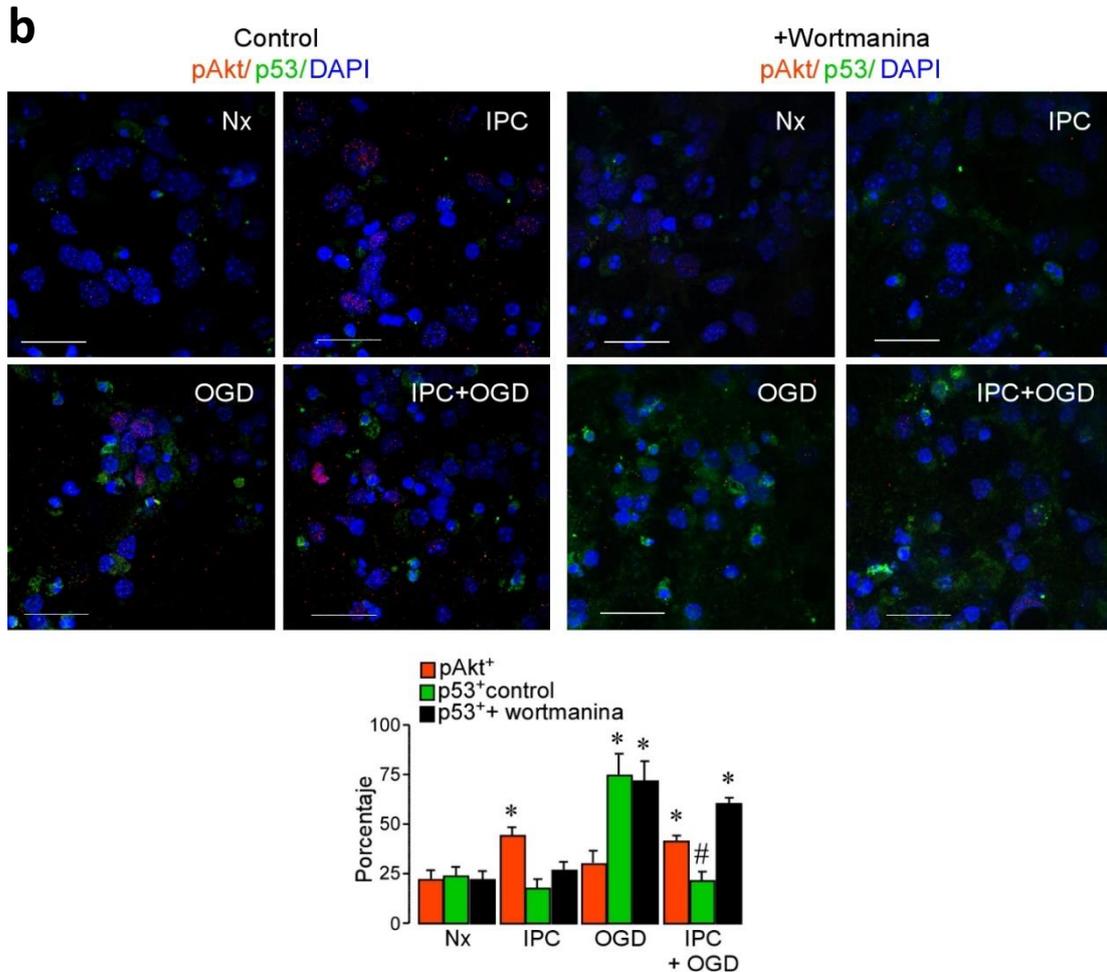


Figura 35. La vía inhibición de la vía PI3K/Akt y el silenciamiento génico de Akt evitan la neuroprotección mediada por IPC, frente a la isquemia, a través de la vía MDM2-p53. Neuronas corticales en cultivo primario se incubaron en presencia del siAkt durante 72 horas previas a la exposición al modelo *in vitro* de IPC. Por otro lado, neuronas corticales en cultivo primario se incubaron en presencia o no del inhibidor wortmanina (100nmol/L) durante 30 minutos previos a la inducción del modelo *in vitro* de IPC. La expresión de las proteínas pAkt (rojo), MDM2 (verde) y p53 (verde) se analizó por inmunofluorescencia, utilizándose DAPI (azul) como sonda nuclear. Barra de escala: 25 μ m. Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 3 cultivos independientes) y se utilizó la *t* de Student para comparaciones entre grupos. * p < 0,05 versus Nx, # p < 0,05 versus OGD.

A la vista de estos resultados, podemos afirmar que la vía PI3K/Akt induce neuroprotección frente a la isquemia mediante el control del complejo MDM2-p53. La activación temprana de Akt tras el IPC promueve la estabilización y activación de MDM2 y su traslocación al núcleo, lo que permite la desestabilización y degradación de la proteína p53 y previene la apoptosis neuronal inducida tras la isquemia.

3.4. LA INHIBICIÓN DE LA VÍA PI3K/AKT EVITA LA TRANSLOCACIÓN NUCLEAR DE MDM2 INDUCIDA POR EL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO EN NEURONAS CORTICALES DE RATÓN QUE EXPRESAN ECTÓPICAMENTE LA PROTEÍNA MDM2 HUMANA

Finalmente, quisimos confirmar los resultados anteriores y demostrar la importancia de la traslocación nuclear de MDM2 mediada por la vía PI3K durante el PC. Para ello, expresamos de manera ectópica la proteína MDM2 en las neuronas y las expusimos a las condiciones experimentales de estudio (Nx, IPC, OGD e IPC+OGD), en presencia o no del inhibidor wortmanina. Para llevar a cabo esta aproximación, utilizamos un plásmido comercial que expresaba la variante humana de MDM2 fusionada a la proteína amarilla fluorescente (YFP), lo que nos permitió detectar su localización subcelular. Como control de la transfección utilizamos un plásmido “vacío” que sólo expresaba YFP. En primer lugar, comprobamos la expresión de la proteína MDM2 en células HEK-293T que fueron transfectadas con el plásmido p-Mdm2-YFP o el plásmido vacío p-YFP como control durante 24 horas previas al experimento, mediante transferencia tipo *Western* (Figura 36).

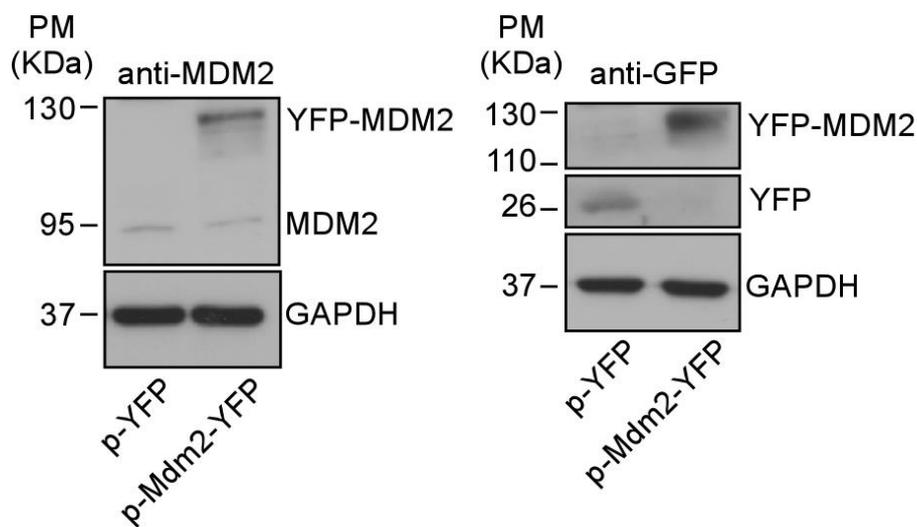
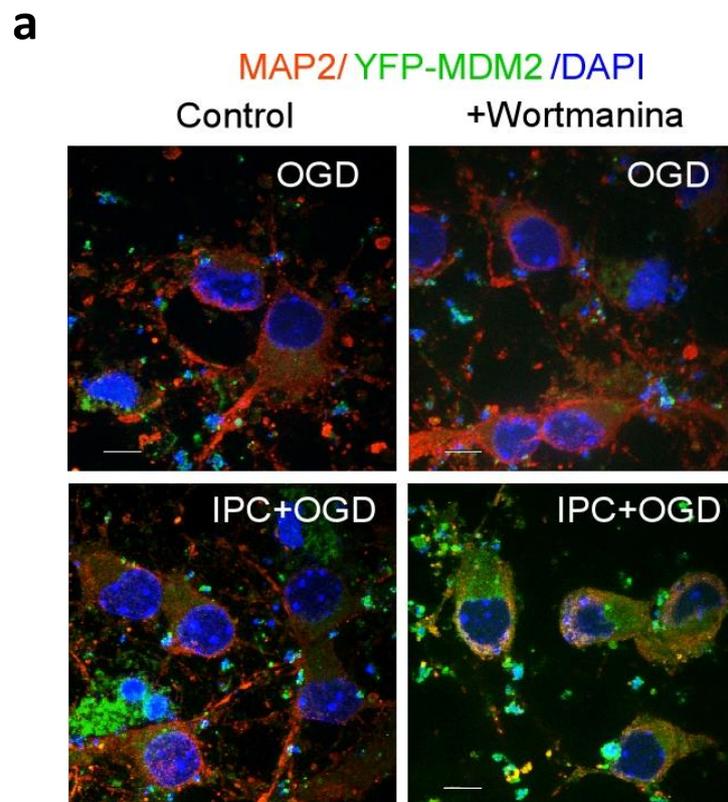
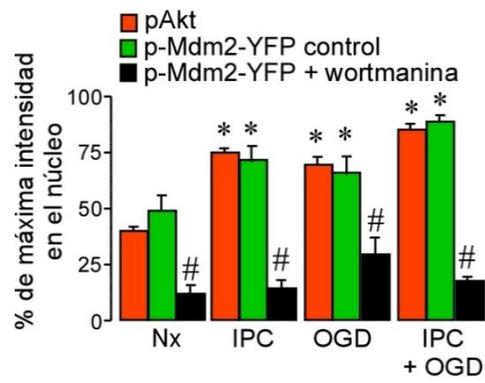
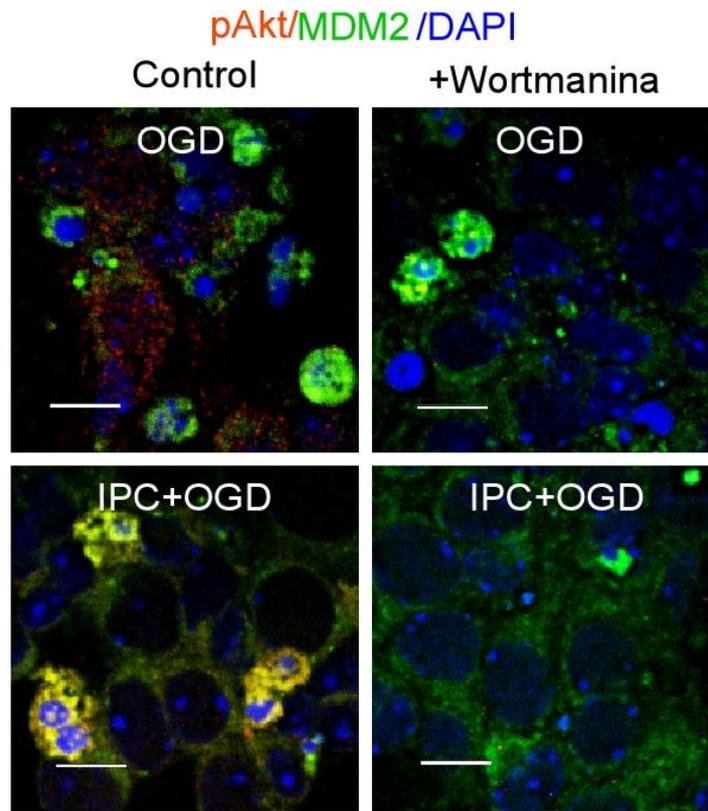


Figura 36. Análisis de la expresión ectópica de MDM2 humano en células HEK-293T. Células de la línea HEK293T se transfectaron con el vector de sobreexpresión de MDM2 (p-Mdm2-YFP) o el vector vacío como control (p-YFP) durante 24 horas. La expresión de la proteína MDM2 y GFP se analizó por transferencia tipo *Western*. La expresión de GAPDH se empleó como control de carga.

A continuación, analizamos la localización subcelular de MDM2 mediante microscopía de fluorescencia. Para ello, las neuronas corticales en cultivo primario se transfectaron con el vector p-Mdm2-YFP durante 24 horas previas a la realización del modelo de IPC *in vitro* y se incubaron en presencia, o no, del inhibidor de la vía PI3K/Akt. Como observamos en la Figura 37a, la proteína MDM2 se localizó principalmente en el núcleo de las neuronas preconditionadas a las 4 horas de reoxigenación tras la isquemia. Además, como comprobamos previamente en la Figura 29, y como se aprecia en la Figura 37b, MDM2 co-localizó con la proteína pAkt inducida tras el IPC. Sin embargo, la inhibición de la vía PI3K/Akt, con wortmanina, evitó la activación de Akt y, en consecuencia, la traslocación nuclear de MDM2 durante el IPC.



b



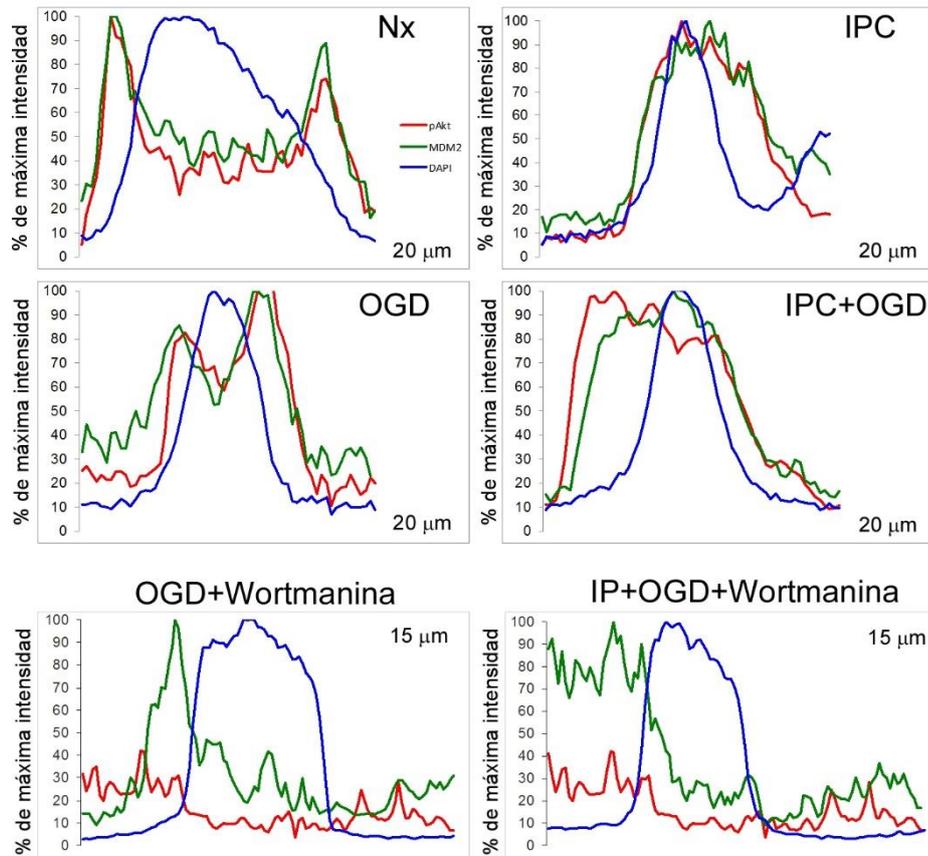
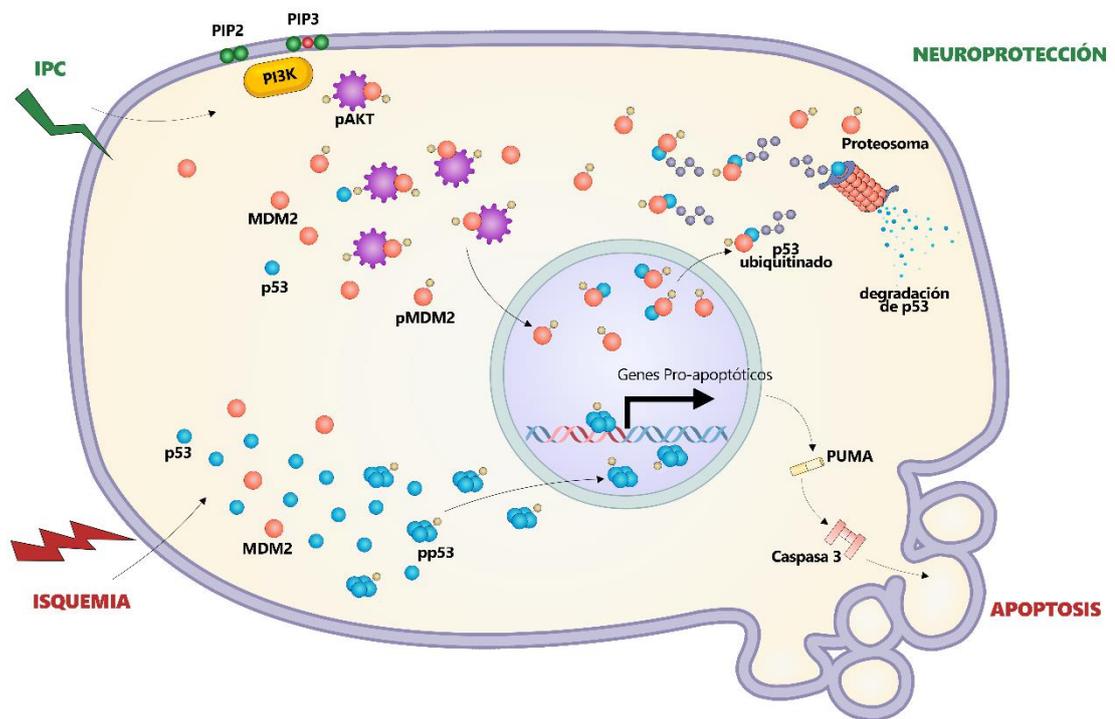
b

Figura 37. La inhibición de la vía PI3K/Akt previene la traslocación nuclear de MDM2. Neuronas corticales en cultivo primario se transfectaron con los plásmidos que expresan YFP-MDM2 (p-Mdm2-YFP) o YFP (p-YFP) durante 24 horas previas a su exposición al modelo *in vitro* de IPC. En algunos casos, las neuronas se incubaron en presencia de wortmanina (100nmol/L) durante 30 minutos previos a la inducción del modelo de IPC. (a) La expresión de las proteínas YFP-MDM2 (verde) y MAP-2 (rojo) se analizó por inmunofluorescencia, empleándose DAPI (azul) como sonda nuclear. Barra de escala: 6 μm . (b) La expresión de MDM2 y pAkt, así como su interacción, se comprobó mediante inmunofluorescencia, empleando DAPI (azul) como marcador nuclear. Barra de escala: 10 μm . Se analizó, en los núcleos celulares, el porcentaje de máxima intensidad. Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 3 cultivos independientes) y se utilizó la *t* de Student para comparaciones entre grupos. * $p < 0,05$ versus Normoxia, # $p < 0,05$ versus p-Mdm2-YFP Control.

Estos resultados, en conjunto, confirman el papel fundamental de Akt en la TI, cuya activación temprana tras el IPC promueve la traslocación de la proteína MDM2 al núcleo. Este cambio de localización es imprescindible para su interacción con el factor pro-apoptótico p53, favoreciendo su degradación y fomentando la supervivencia neuronal tras la isquemia (Esquema 26).



Esquema 26. La vía Akt-MDM2-p53 desempeña un papel fundamental en la neuroprotección asociada al preconditionamiento frente a la isquemia. El PC induce la fosforilación temprana de Akt, cuya activación promueve la fosforilación de MDM2 y su posterior translocación al núcleo celular. De este modo, se fomenta la formación del complejo MDM2/p53, clave para la desestabilización y degradación de p53. Todo esto previene la activación de la vía pro-apoptótica p53/PUMA/caspasa-3 y favorece la supervivencia neuronal a las 4 horas de reoxigenación tras la isquemia.

4. EL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO *IN VIVO* INDUCE EL AUMENTO DE LOS NIVELES DE LA PROTEÍNA MDM2 Y LA DESESTABILIZACIÓN DE P53, ATENUANDO EL CRECIMIENTO DEL VOLÚMEN DE INFARTO CEREBRAL TRAS LA ISQUEMIA

Hasta el momento, en la presente memoria, hemos descrito la relevancia de la vía Akt-MDM2-p53 en la neuroprotección asociada al PC mediante el desarrollo de un modelo *in vitro*, en neuronas corticales de ratón en cultivo primario. Así, hemos podido inducir TI y estudiar los mecanismos moleculares involucrados en ella. Sin embargo, la importancia de esta vía implica su trascendencia más allá de la descripción *in vitro*. Por ello quisimos comprobar la relevancia *in vivo* de los resultados obtenidos.

En colaboración con el grupo de investigación del Dr. Juan B. Salom del Hospital Universitario de la Fe de Valencia, desarrollamos un modelo de IPC validado *in vivo* basado en la cirugía de oclusión transitoria de la arteria cerebral media (tMCAO) en rata, que se ha descrito como modelo de isquemia cerebral focal *in vivo* (Koizumi et al., 1986; Longa et al., 1989; Masada et al., 2001).

4.1. EL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO, *IN VIVO*, ATENÚA EL CRECIMIENTO DEL TAMAÑO DEL INFARTO CEREBRAL TRAS LA ISQUEMIA

Para realizar una isquemia leve capaz de inducir neuroprotección sin llegar a causar daño cerebral (IPC), se realizó la cirugía de tMCAO durante un periodo corto de tiempo de 10 minutos previo a la isquemia cerebral de 60 minutos, tal y como se describe en el Apartado 4 de Material y Métodos. Las condiciones experimentales del modelo *in vivo* fueron las mismas de nuestro modelo *in vitro*, pero adecuadas a los procesos

quirúrgicos a desarrollar, detalladas en la Figura 38. Tras 24 horas de recuperación post-isquemia (reperfusión), se analizó la severidad del daño y la funcionalidad del modelo de IPC. Para ello, se extrajeron los cerebros y se realizaron secciones coronales de 2 mm de espesor que se tiñeron con TTC con el fin de determinar el volumen de infarto cerebral (Bederson et al., 1986). Como se muestra en la Figura 38, el IPC logró atenuar el crecimiento del infarto cerebral asociado a la isquemia, tanto en la corteza cerebral como el estriado, dos de las principales áreas cerebrales afectadas tras la isquemia.

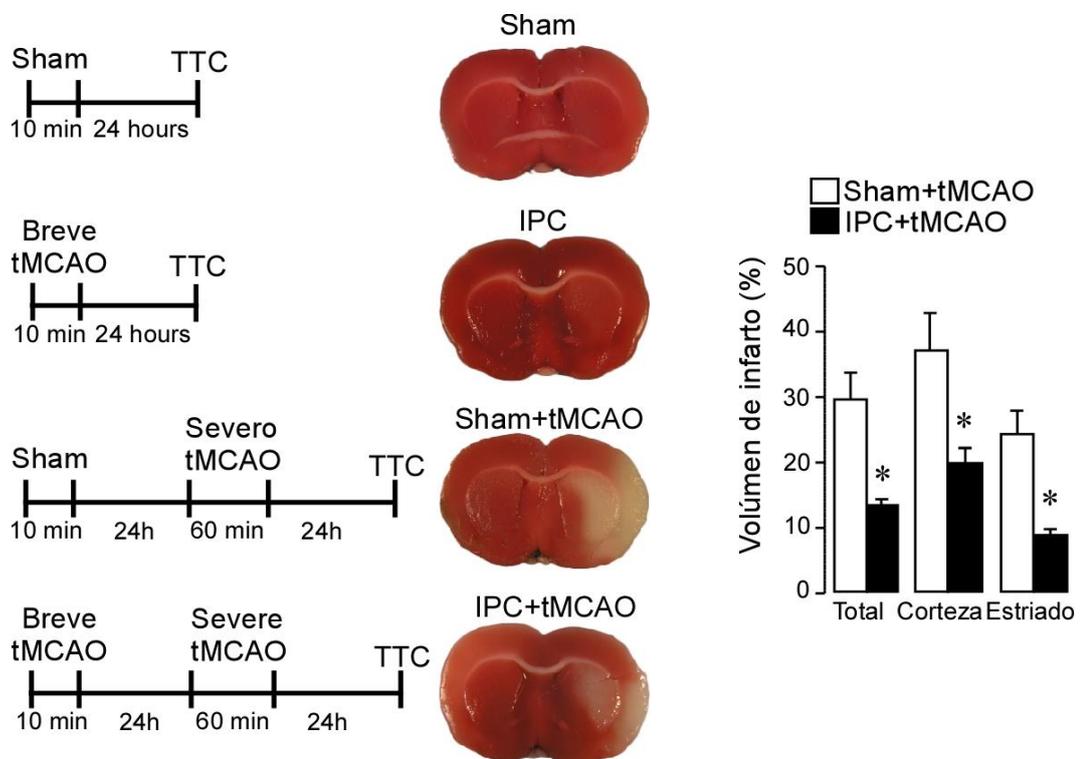
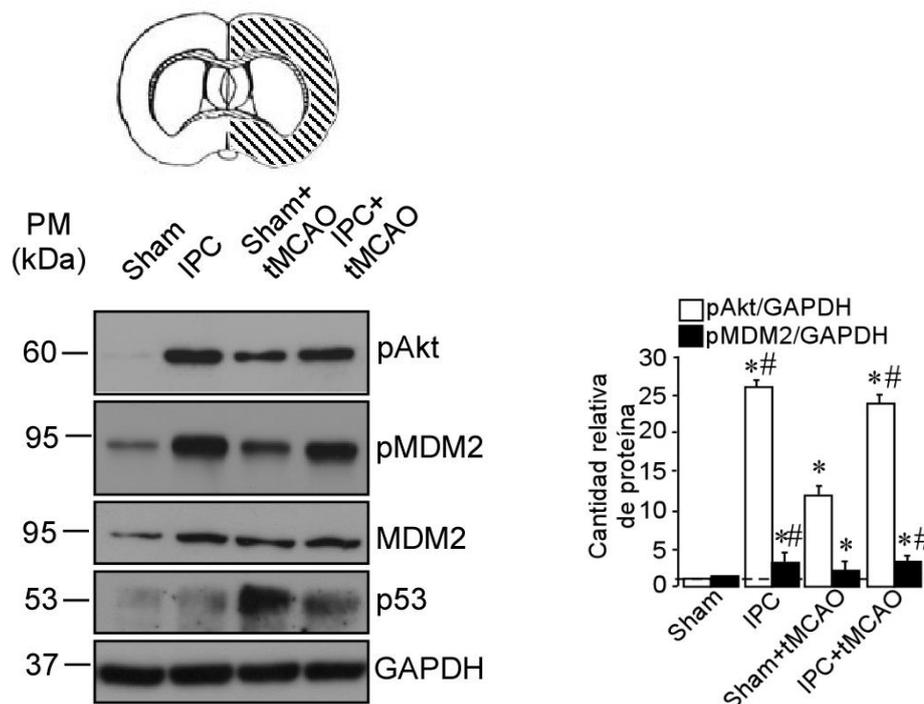


Figura 38. El preconditionamiento isquémico *in vivo* atenúa el aumento de tamaño del infarto cerebral inducido tras la isquemia. El modelo de IPC se desarrolló en rata y consistió en la oclusión transitoria de la arteria cerebral media durante 10 minutos previo a la cirugía de tMCAO de 60 minutos. En paralelo, ratas SHAM se sometieron al mismo procedimiento quirúrgico salvo la cirugía de tMCAO. El volumen de infarto se midió mediante la tinción con TTC, que permite observar el área dañada (blanco) frente al cerebro sano (rojo). Los datos son medias \pm S.E.M. (SHAM: n = 2; IPC: n = 2; SHAM + tMCAO: n = 5; IPC + tMCAO: n = 4) y se utilizó la *t* de Student para comparaciones entre grupos. * $p < 0,05$ versus SHAM; # $p < 0,05$ versus SHAM + tMCAO.

4.2. EL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO, *IN VIVO*, AUMENTA LOS NIVELES DE MDM2 E INDUCE LA DESESTABILIZACIÓN DE P53 TRAS LA ISQUEMIA

Con objeto de investigar la relevancia *in vivo* de la vía neuroprotectora Akt-MDM2-p53 previamente descrita en el modelo experimental de PC *in vitro*, se analizó la expresión de ambas proteínas en las condiciones experimentales del modelo fisiológico de IPC. Con este fin, se tomó una sección del cerebro del animal y se separaron ambos hemisferios, contralateral (hemisferio sano) e ipsilateral (hemisferio dañado). La corteza y estriado de cada hemisferio se diseccionaron y procesaron, y se determinó la expresión proteica mediante transferencia tipo *Western blot*.

Como se muestra en la Figura 39, el IPC *in vivo* indujo un incremento en los niveles de la forma activa pAkt, así como pMDM2. Este aumento de la actividad de MDM2 condujo a la desestabilización de p53 en la corteza ipsilateral, lo que previno el aumento del daño cerebral a las 24 horas de reperusión tras la isquemia. Así, pudimos corroborar los resultados previos obtenidos *in vitro*, lo que demuestra la relevancia de la vía de señalización Akt-MDM2-p53 en los mecanismos neuroprotectores inducidos tras el preconditionamiento.



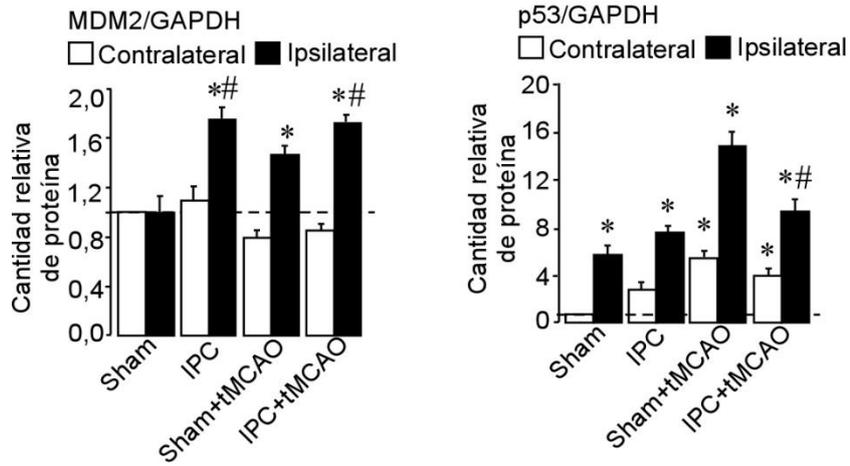


Figura 39. El preconditionamiento isquémico *in vivo* induce la fosforilación temprana de Akt, lo que conduce a la activación de MDM2 y promueve la desestabilización de p53 a las 24 horas de perfusión tras la isquemia. El modelo de IPC se desarrolló en rata y consistió en la oclusión transitoria de la arteria cerebral media durante 10 minutos previo a la cirugía de tMCAO de 60 minutos. Paralelamente, animales SHAM se sometieron al mismo procedimiento quirúrgico salvo la cirugía de tMCAO. Se analizó la expresión proteica de las proteínas pAkt, pMDM2, MDM2 y p53 mediante transferencia tipo Western. La expresión de GAPDH se empleó como control de carga. Los datos son medias \pm S.E.M. ($n = 5$ Western blot independientes) y se utilizó la *t* de Student para comparaciones entre grupos. * $p < 0,05$ versus SHAM; # $p < 0,05$ versus SHAM + tMCAO.

5. EL POLIMORFISMO HUMANO TP53 ARG72PRO MODULA LA NEUROPROTECCIÓN ASOCIADA AL PRECONDICIONAMIENTO EN RESPUESTA A LA ISQUEMIA. RELEVANCIA EN EL AIT

Como hemos descrito previamente, p53 es un factor de transcripción con un papel clave en el balance entre el daño y la supervivencia neuronal tras la isquemia. De hecho, nuestros resultados demuestran su implicación en las vías neuroprotectoras inducidas por el PC, lo que convierte a p53 en una diana molecular clave en el estudio de los mecanismos moleculares asociados a la TI.

El gen que codifica p53 contiene un sitio polimórfico (SNP), específico de humanos, situado en el codón 72 del exón 4 (*Arg72Pro p53*) que regula la actividad pro-apoptótica de la proteína. De hecho, resultados previos del grupo han demostrado que este polimorfismo modula la susceptibilidad de las neuronas a la isquemia y condiciona la reparación cerebral y, con ello, el pronóstico funcional de pacientes de ictus isquémico y hemorrágico (Gomez-Sanchez et al., 2011; Rodríguez et al., 2017).

En vista de la relevancia de p53 en la neuroprotección asociada al PC y teniendo en cuenta la influencia del polimorfismo *Arg72Pro* en la susceptibilidad neuronal a la isquemia, decidimos estudiar la posible función de este SNP en la TI neuronal.

5.1. EL PRECONDICIONAMIENTO PROMUEVE LA DESESTABILIZACIÓN DE P53 EN NEURONAS QUE EXPRESAN LA VARIANTE POLIMÓRFICA PRO72-P53, PERO NO EN AQUELLAS QUE EXPRESAN ARG72-P53, TRAS LA ISQUEMIA

Previamente, nuestro grupo identificó como la variante polimórfica Arginina (*Arg72-p53*) interacciona directamente con la proteína anti-apoptótica mitocondrial Bcl-xL,

incrementando la vulnerabilidad a la apoptosis tras la isquemia (Gomez-Sanchez et al., 2011). En vista de la distinta susceptibilidad a la muerte neuronal por apoptosis que confiere el polimorfismo de p53, quisimos analizar su posible implicación en la neuroprotección inducida por el PC.

Para ello, se realizaron cultivos primarios de neuronas corticales procedentes de ratones *knock-in* "humanizados" que expresaban las variantes polimórficas Arg72-p53 o Prolina (Pro72-p53), y se expusieron al modelo validado *in vitro* de NMDA-PC. Como se observa en la Figura 40a, la isquemia indujo una estabilización y activación de la proteína p53, confirmada por el aumento de expresión de su diana transcripcional PUMA, tanto en las neuronas Pro72-p53 como en las Arg72-p53. Esto indicaba que ambos genotipos presentaban la misma sensibilidad frente a la isquemia. Sin embargo, el NMDA-PC previno la estabilización de p53 en neuronas Pro72-p53, pero no en aquellas con la variante Arg72-p53. Aunque el aumento de los niveles de MDM2 promovido por el preconditionamiento se produjo en ambos genotipos, pudimos observar que solo las neuronas Pro72-p53 mostraban una desestabilización de p53 mediada por mecanismos moleculares dependientes de MDM2. Una posible explicación a esto podría hacer referencia a la localización subcelular de ambas variantes polimórficas, de modo que la traslocación mitocondrial de Arg-p53 podría evitar su interacción con la proteína MDM2 y prevenir la neuroprotección inducida por el IPC.

Como habíamos observado previamente, la disminución de los niveles de p53 tras el PC se debió a mecanismos postraduccionales, lo que confirmamos al verificar que el mRNA de p53 permanecía inalterado (Figura 40b).

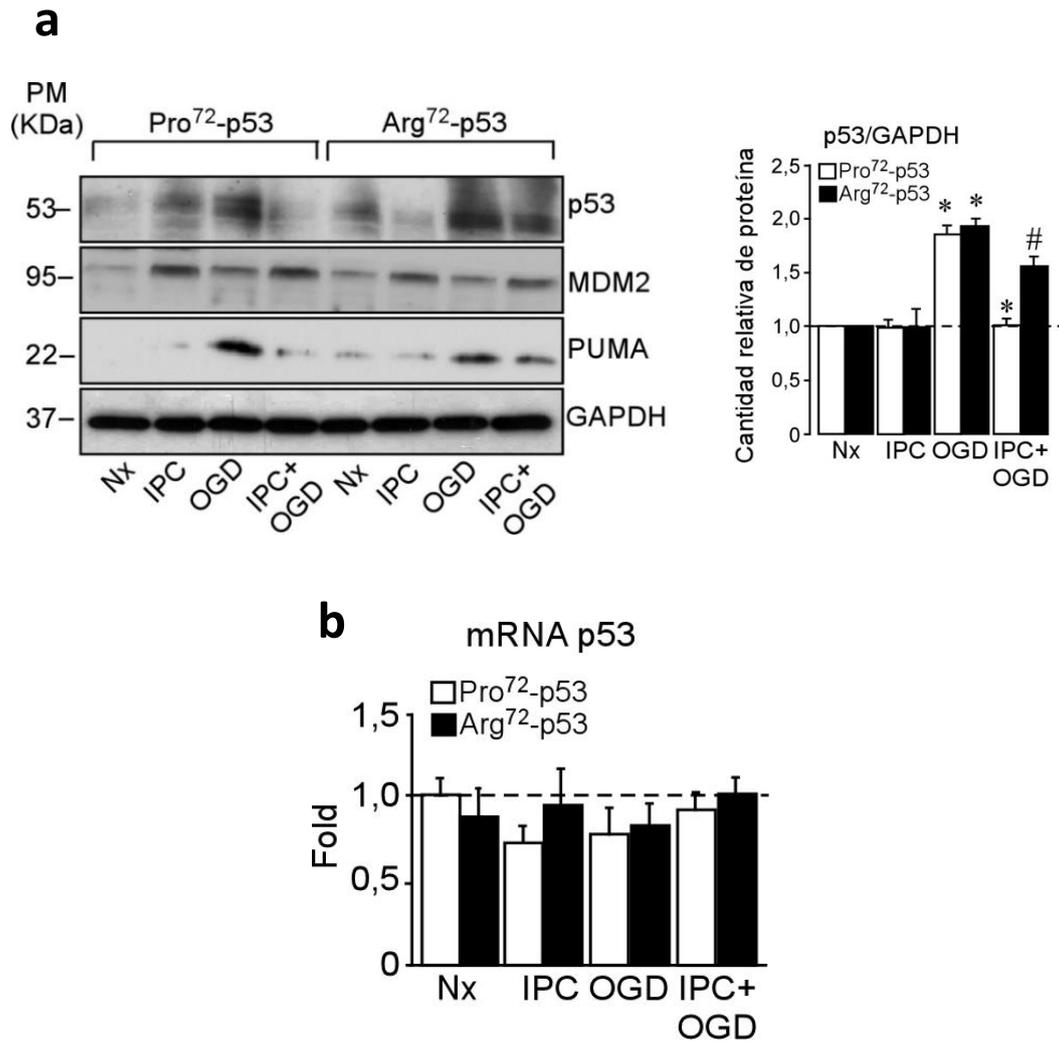


Figura 40. El NMDA-PC promueve la desestabilización de p53 en neuronas con la variante Pro72-p53. Neuronas corticales en cultivo primario procedentes de ratones *knock-in* “humanizados” para las variantes Pro72-p53 y Arg72-p53 se expusieron a un modelo *in vitro* de NMDA-PC y se analizó la expresión de p53, MDM2 y PUMA mediante transferencia tipo *Western blot* (a). La expresión de GAPDH se empleó como control de carga. La cuantificación se normalizó frente a la Nx. (b) La expresión relativa de *p53* se analizó mediante RT-qPCR a las 4 horas de reoxigenación. Se empleó *Gapdh* como control interno de expresión. Los resultados se expresan normalizados respecto a la Normoxia (Nx). Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 4 cultivos independientes) y se utilizó la *t* de *Student* para comparaciones entre grupos. * p < 0,05 versus Nx; # p < 0,05 versus OGD.

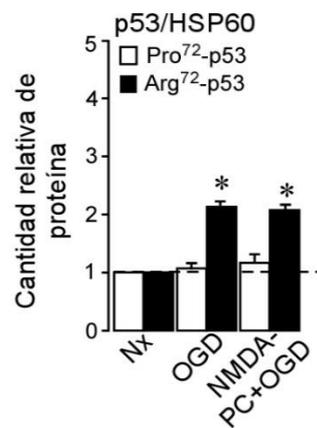
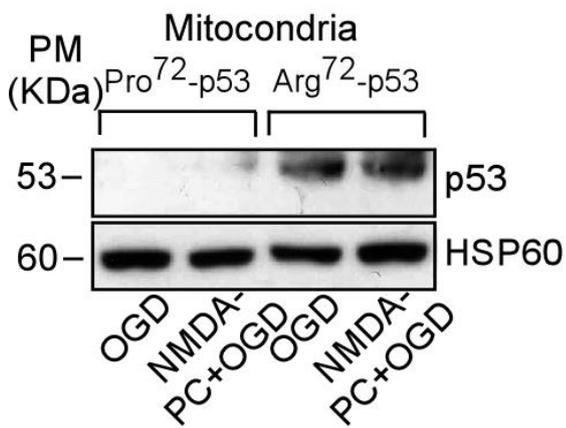
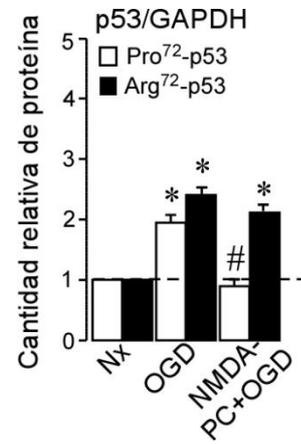
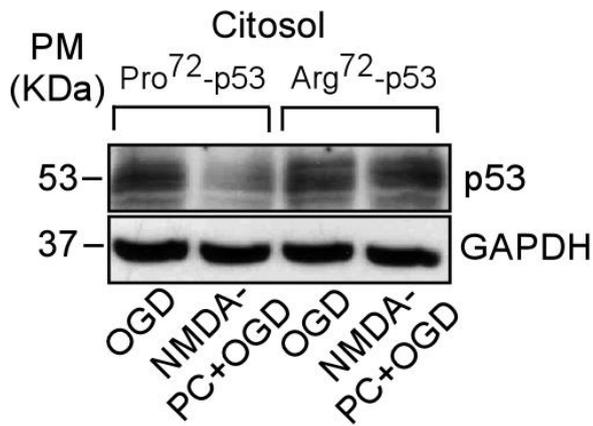
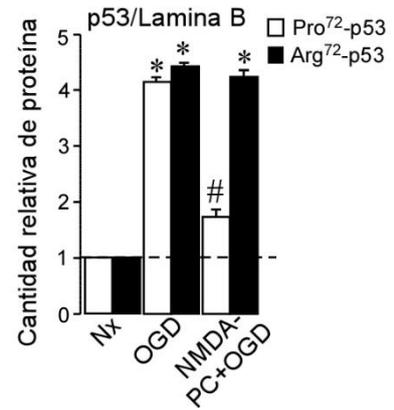
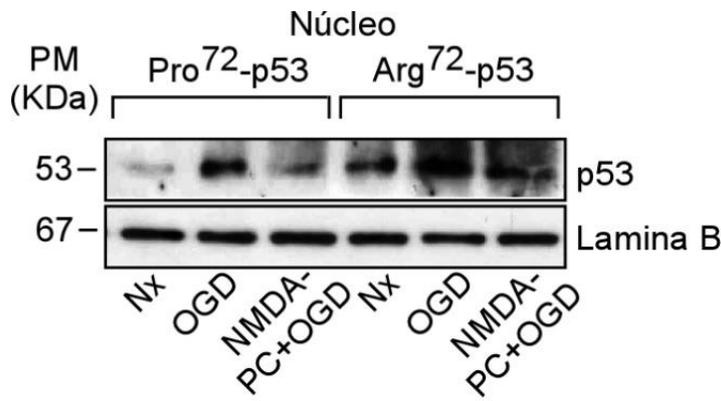
Estos resultados demuestran que el polimorfismo humano *Arg72Pro* de *Tp53* modula la desestabilización de p53 mediada por el PC frente a la isquemia. Esto podría indicar una distinta susceptibilidad de las neuronas que expresan cada una de las variantes polimórficas de p53 en respuesta al IPC.

5.2. EL PC PROMUEVE LA DESESTABILIZACIÓN MITOCONDRIAL DE LA PROTEÍNA P53 Y LA DISMINUCIÓN DEL POTENCIAL DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL EN NEURONAS PRO72-P53, PERO NO EN NEURONAS ARG72-P43 INDUCIDAS TRAS LA ISQUEMIA

Para desempeñar su papel como factor de transcripción, p53 debe de traslocarse al núcleo, donde ejerce su actividad transcripcional mediando la inducción de genes diana como p21 o PUMA. Por ello, el paso siguiente fue estudiar si el NMDA-PC estaba afectando a la localización subcelular de p53 en los distintos genotipos. Para ello, se realizó un fraccionamiento subcelular y se estudió la expresión de la proteína p53 en los distintos compartimentos celulares: citosol, núcleo y mitocondria.

Mientras que la traslocación nuclear de p53 tuvo lugar en ambas variantes genotípicas tras la isquemia, el NMDA-PC previno la estabilización de p53, a nivel citosólico y nuclear, únicamente en aquellas neuronas que presentaban la variante humanizada Pro72-p53. En el caso de las neuronas Arg72-p53, el NMDA-PC no logró evitar la acumulación de p53 a nivel mitocondrial inducida por la isquemia (Gomez-Sanchez et al., 2011), lo que explicaría su mayor susceptibilidad a la muerte neuronal (Figura 41a). Estos resultados se corroboraron mediante inmunocitoquímica, utilizando un marcador mitocondrial (COX IV), lo que confirmó que el NMDA-PC era incapaz de promover la desestabilización de p53 a nivel mitocondrial en las neuronas con genotipo Arginina (Figura 41b).

a



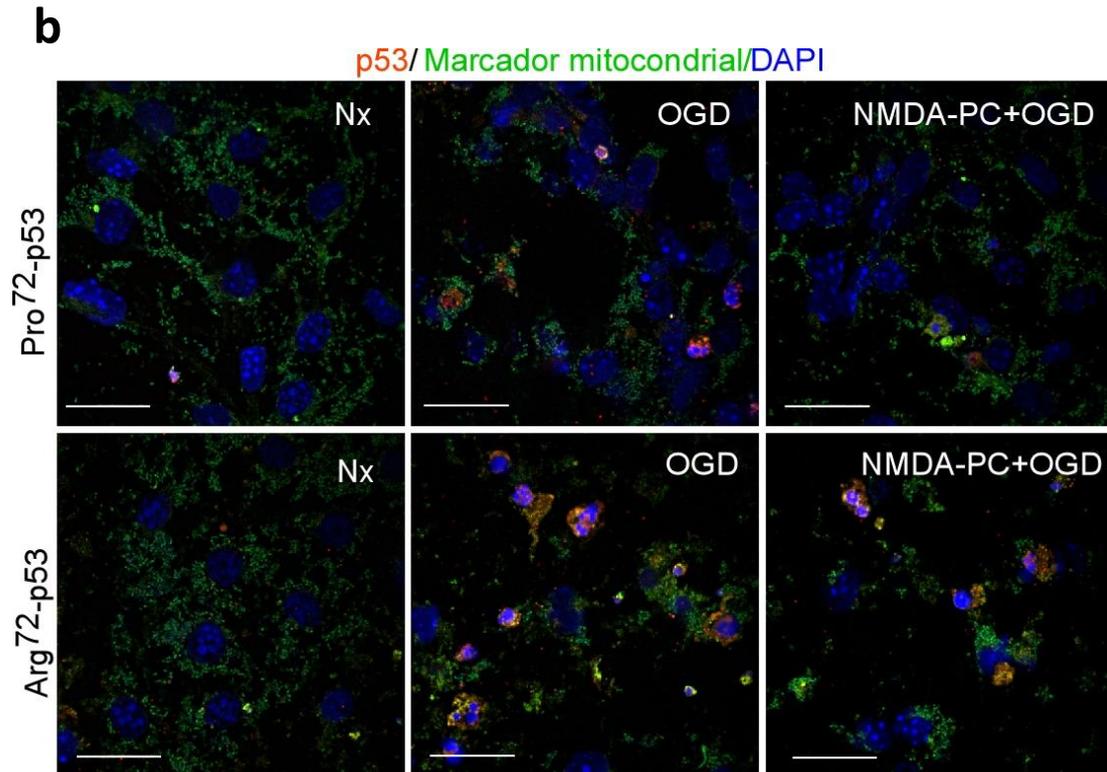


Figura 41. El NMDA-PC no previene la estabilización mitocondrial de p53 en neuronas Arg72-p53 inducida tras la isquemia. Neuronas corticales en cultivo primario procedentes de ratones *knock-in* “humanizados” para las variantes Pro72-p53 y Arg72-p53 se expusieron a un modelo *in vitro* de NMDA-PC y se analizó la expresión de p53 en núcleo, citosol y mitocondria mediante transferencia tipo *Western blot* (a). La expresión de las proteínas GAPDH, Lámina B y HSP60 (*Heat shock protein 60*) se emplearon como control de carga del citosol, núcleo y mitocondria, respectivamente. La cuantificación se normalizó frente a la Nx. (b) La localización subcelular de p53 se corroboró mediante inmunofluorescencia, detectando la proteína p53 (rojo), el marcador mitocondrial COX IV (verde) y la sonda nuclear DAPI (azul). Barra de escala: 20 μ m. Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 4 cultivos independientes) y se utilizó la *t* de *Student* para comparaciones entre grupos. * p < 0,05 versus Nx; # p < 0,05 versus OGD.

Por lo tanto, corroboramos que la variante Arg72-p53 no sólo se acumula en núcleo y citosol, sino que lo hace a nivel mitocondrial, lo que promueve la activación de la vía de apoptosis intrínseca o mitocondrial (Gomez-Sanchez et al., 2011). Basándonos en resultados previos de nuestro grupo que han destacado la importancia de la función mitocondrial en la supervivencia neuronal (A Almeida & Bolaños, 2001; Veas-Pérez de Tudela, Delgado-Esteban, et al., 2015), decidimos analizar el efecto del PC sobre el potencial de membrana mitocondrial. Como muestra la Figura 42, las neuronas precondicionadas que expresaban la variante polimórfica Pro72-p53 mantuvieron un potencial de membrana mitocondrial intacto tras la isquemia en contraste con aquellas

neuronas Arg72-p53, donde el fallo mitocondrial fue notable. Estos resultados se correspondían con los descritos previamente en el grupo, lo que confirmaba la mayor susceptibilidad de las neuronas Arg72-p53 a la disfunción mitocondrial asociada a p53, incapaz de prevenirse tras el NMDA-PC.

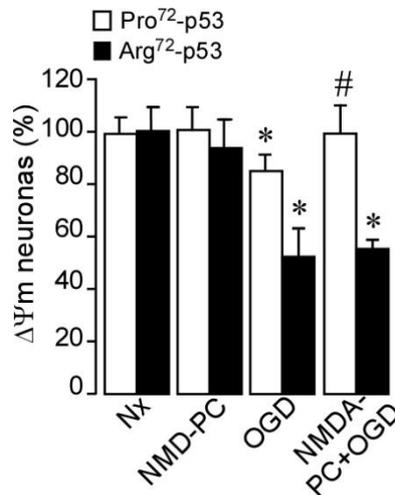


Figura 42. El NMDA-PC previene la disminución en el potencial de membrana mitocondrial inducido tras la isquemia en neuronas que expresan la variante polimórfica Pro72-p53, pero no en neuronas Arg72-p53. Neuronas corticales en cultivo primario procedentes de ratones *knock-in* “humanizados” para las variantes Pro72-p53 y Arg72-p53 se expusieron a un modelo *in vitro* de NMDA-PC previo a la isquemia. Se analizó el potencial de membrana mitocondrial mediante citometría de flujo, utilizando la sonda DiIC₁(5). La normalización se realizó frente a la condición de Normoxia (Nx). Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 4 cultivos independientes) y se utilizó la *t* de Student para comparaciones entre grupos. * p < 0,05 versus Nx; # p < 0,05 versus OGD.

5.3. EL PRECONDICIONAMIENTO PROMUEVE LA TOLERANCIA ISQUÉMICA, EVITANDO LA ACTIVACIÓN DE LA CASPASA-3 Y LA APOPTOSIS EN NEURONAS PRO72-P53, PERO NO EN NEURONAS ARG72-P53, TRAS LA ISQUEMIA.

A la vista de los resultados anteriores, donde demostramos la influencia del polimorfismo humano Arg72Pro de *Tp53* en la modulación de la estabilización de p53,

quisimos comprobar la relevancia del polimorfismo en la neuroprotección asociada al acondicionamiento.

Con este fin, se analizaron los niveles de apoptosis tras la isquemia en neuronas pertenecientes a ambos genotipos y previamente preconditionadas. Los resultados obtenidos mediante citometría de flujo mostraron un aumento de los niveles de apoptosis neuronal en ambos genotipos tras la OGD, de manera tiempo-dependiente. Este incremento en los niveles de muerte por apoptosis solo se previno en aquellas neuronas con la variante polimórfica Pro72-p53 (Figura 43). Así, se confirma el papel neuroprotector del NMDA-PC en las neuronas que presentan el genotipo Pro72-p53, pero no en aquellas Arg72-p53.

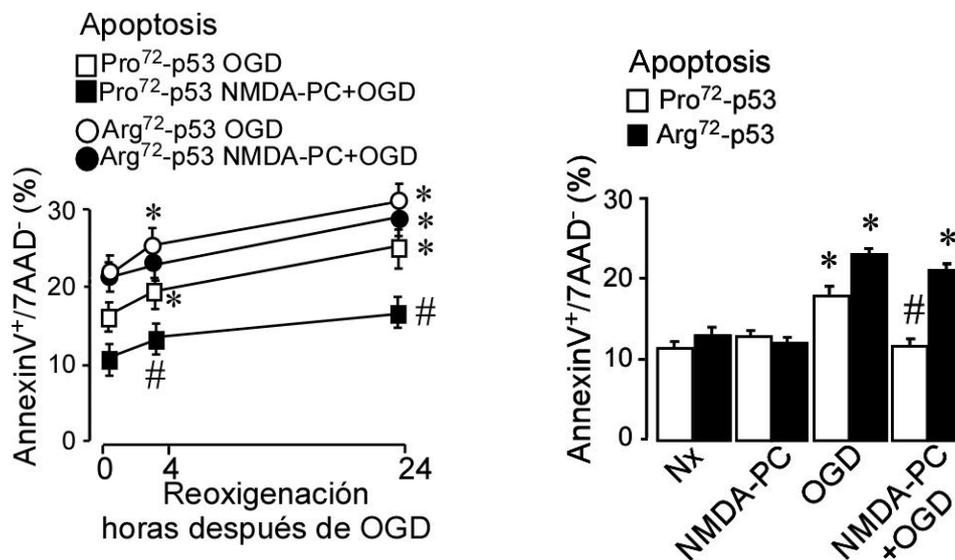


Figura 43. El NMDA-PC previene la apoptosis inducida tras la isquemia en neuronas Pro72-p53, pero no en neuronas Arg72-p53. Neuronas corticales en cultivo primario procedentes de ratones *knock-in* "humanizados" para las variantes Pro72-p53 y Arg72-p53 se expusieron a un modelo *in vitro* de NMDA-PC y se determinó la apoptosis neuronal por citometría de flujo. Se consideraron células apoptóticas las Anexina V-APC⁺/7AAD⁻. Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 3 cultivos independientes) y se utilizó la *t* de Student para comparaciones entre grupos. * p < 0,05 versus Nx; # p < 0,05 versus OGD.

Para corroborar los resultados, se realizó una segunda aproximación basada en el análisis de la actividad de la caspasa-3. Como se observa en la Figura 44a y 44b, el NMDA-PC fue incapaz de prevenir la activación de la caspasa-3 en las neuronas Arg72-p53 en comparación con las neuronas Pro72-p53. Esto confirmó la efectividad del

NMDA-PC en el control de la vía de muerte neuronal p53/PUMA/caspasa-3 en neuronas Pro72-p53, sin éxito en las neuronas Arg72-p53. Por lo tanto, se demuestra nuevamente la diferente susceptibilidad de las neuronas que expresan las diferentes variantes polimórficas de p53 en respuesta a la isquemia.

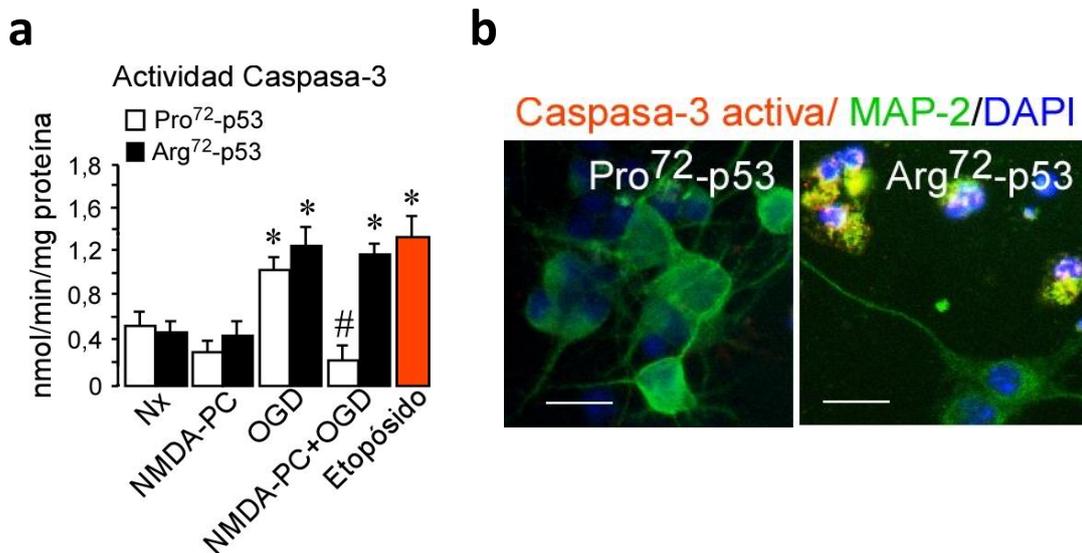


Figura 44. El NMDA-PC evita la activación de la caspasa-3 inducida tras la isquemia en neuronas Pro72-p53, pero no en neuronas Arg72-p53. Neuronas corticales en cultivo primario procedentes de ratones *knock-in* “humanizados” para las variantes Pro72-p53 y Arg72-p53 se expusieron a un modelo *in vitro* de NMDA-PC y se analizó la actividad de la caspasa-3 por fluorimetría (a). Se utilizaron como control de apoptosis las neuronas tratadas con el inductor apoptótico etopósido (10 μ M, 24 horas). (b) La expresión de la caspasa-3 (rojo) se detectó mediante inmunocitoquímica, utilizando MAP-2 (verde) como marcador neuronal y DAPI (azul) como sonda nuclear. Barra de escala: 25 μ m. Los datos son medias \pm S.E.M. (n = 3 cultivos independientes) y se utilizó la *t* de Student para comparaciones entre grupos. * $p < 0,05$ versus Nx; # $p < 0,05$ versus OGD.

Todos estos resultados demuestran la relevancia del polimorfismo humano *Arg72Pro* de *Tp53* en la modulación de la neuroprotección asociada al NMDA-PC mediante un mecanismo que implica la desestabilización de p53 a nivel nuclear y la prevención de la apoptosis neuronal. Además, las diferencias en la localización subcelular de p53 en ambos genotipos son las responsables, en parte, de la distinta susceptibilidad de las variantes polimórficas a la neuroprotección inducida por el NMDA-PC.

5.4. EL AIT SE ASOCIA CON UN MEJOR PRONÓSTICO FUNCIONAL EN PACIENTES CON ICTUS ISQUÉMICO QUE EXPRESAN LA VARIANTE ALÉLICA PRO72, RESPECTO A AQUELLOS PACIENTES CON GENOTIPO ARG/ARG DE P53

La investigación básica en el campo de la TI nos permite profundizar en los mecanismos moleculares responsables de la neuroprotección. Sin embargo, el IPC no sólo abarca el campo de la investigación, sino que también es transferible a la clínica. De hecho, se ha descrito que pacientes que sufren un AIT, correlato clínico del PC, previo a un ictus presentan un mejor pronóstico funcional que aquellos que no lo sufren (Keep, Wang, Xiang, Hua, & Xi, 2010; Stetler et al., 2014; W.-W. Wang et al., 2017). Por lo tanto, la translación a la clínica de estos mecanismos es fundamental para el desarrollo de terapias frente al daño isquémico cerebral.

Resultados previos de nuestro laboratorio han confirmado la importancia del polimorfismo humano *Arg72Pro* de *Tp53* en el ictus, modulando la susceptibilidad de las neuronas a la isquemia. Estos resultados se han confirmado en el ámbito clínico, donde la presencia de una variante alélica u otra condiciona la reparación cerebral, convirtiendo al polimorfismo *Arg72Pro* en un marcador genético predictor del pronóstico funcional de los pacientes con ictus isquémico y hemorrágico (Gomez-Sanchez et al., 2011; Rodríguez et al., 2017).

En relación a lo anterior, nosotros hemos descrito la relevancia del polimorfismo humano *Arg72Pro* de *Tp53* en la TI, modulando la distinta susceptibilidad que presentan las neuronas a la neuroprotección inducida por el PC *in vitro*. Este hecho podría tener repercusiones a nivel clínico y quizás explicaría las distintas respuestas de los pacientes que sufren un AIT (W.-W. Wang et al., 2017). Por ello, nuestro objetivo final fue analizar la relevancia clínica de nuestros resultados mediante el estudio de la posible asociación entre el polimorfismo humano *Arg72Pro* de *Tp53* y el pronóstico funcional de una cohorte de pacientes que han sufrido un AIT previo al ictus isquémico.

5.4.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO GENERAL DE LA COHORTE DE PACIENTES QUE PRESENTAN O NO UN AIT PREVIO AL ICTUS ISQUÉMICO

Se utilizó para el estudio una cohorte hospitalaria de 85 pacientes, distribuidos entre aquellos que presentaban un AIT en un mes previo al ictus isquémico (N = 25) y los que no presentaban un AIT (N = 60). Las edades de los pacientes de la cohorte estudiada fueron $71,20 \pm 13,1$ (AIT) y $72,64 \pm 13,1$ (No AIT) años, expresadas como media \pm desviación estándar.

La distribución por sexos, así como los factores de riesgo, factores etiológicos, afectación neurológica y estado funcional de los pacientes se recoge en la Tabla 12. El grado de afectación neurológica al ingreso se cuantificó mediante la escala NIHSS (*National Institute of Health Stroke Scale*) (Wityk et al., 1994) y la etiología de los infartos se asignó de acuerdo a las categorías de la clasificación TOAST (Adams et al., 1993).

La distribución de las distintas variantes polimórficas de *Arg72Pro Tp53* se muestra en Tabla 13. Como se ha descrito previamente, el alelo *Pro* ejerce un efecto dominante sobre el alelo *Arg* (Gomez-Sanchez et al., 2011). Por este motivo, se agruparon los genotipos *Arg/Pro* y *Pro/Pro* en un único grupo que se denominó Prolina (Pro). El segundo grupo, denominado Arginina (Arg) incluyó los individuos homocigotos *Arg/Arg*.

	AIT (N = 25)	No AIT (N = 60)
Género		
Varones, n (%)	14 (56)	33 (55)
Mujeres, n (%)	11 (44)	27 (45)
Factores de Riesgo		
Hipertensión, n (%)	16 (64)	40 (66.6)
Diabetes, n (%)	8 (32)	17 (28.3)
Tabaquismo, n (%)	7 (28)	8 (13.3)
Hiperlipidemia, n (%)	12 (48)	23 (38.3)
Fibrilación auricular, n (%)	4 (16)	14 (23.3)
NIHSS al ingreso		
Ictus leve, n (%)	12 (48)	21 (35)
Ictus moderado, n (%)	11 (44)	26 (43)
Ictus grave, n (%)	0	12 (20)
Ictus muy grave, n (%)	2 (8)	1 (1.6)
TOAST		
Cardioembólicos, n (%)	7 (28)	17 (28)
Aterotrombóticos, n (%)	5 (20)	13 (21.6)
Lacunares, n (%)	2 (8)	7 (11,6)
Indeterminados, n (%)	4 (16)	26 (43.3)
Otros, n (%)	2 (8)	2 (3.3)

Tabla 12. Características demográficas y clínicas de la cohorte de pacientes. Los pacientes ingresaron en la Unidad de Neurología del Hospital Universitario de Valladolid, el Hospital Universitario de Salamanca y el Hospital Universitario Arnau de Vilanova de Lleida. Se seleccionaron pacientes que sufrieron un AIT previo al ictus (AIT) y pacientes que no lo sufrieron (No AIT). Los datos se muestran como porcentajes (n, %).

Tp53 Arg72Pro	AIT (N = 25)	No AIT (N = 60)
Arg (Arg/Arg), n (%)	12 (48)	33 (55)
Pro (Arg/Pro y Pro/Pro), n (%)	13 (52)	27 (45)

Tabla 13. Distribución del polimorfismo Arg72Pro de Tp53.

5.4.2. EL POLIMORFISMO HUMANO ARG72PRO DE TP53 CONDICIONA EL PRONÓSTICO FUNCIONAL DE PACIENTES QUE HAN SUFRIDO UN AIT UN MES PREVIO AL ICTUS ISQUÉMICO

Para determinar el efecto del AIT en el pronóstico funcional tras el ictus, realizamos el análisis de la situación funcional de los pacientes que presentaban un AIT en el mes previo al ictus isquémico. La cuantificación del estado funcional a los 3 meses se realizó mediante la escala de Rankin modificada (Rankin-m, Tabla 10 de Material y Métodos) (Banks & Marotta, 2007). Esto nos permitió confirmar que los pacientes que sufrían un AIT previo al ictus presentaban mejor pronóstico funcional a los 3 meses del daño cerebral que aquellos pacientes sin AIT previo (Figura 45).

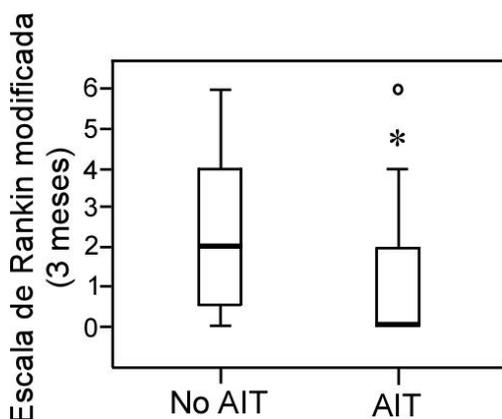


Figura 45. El AIT previo al ictus determina el estado funcional de los pacientes a los 3 meses tras un ictus isquémico. El estado funcional de los pacientes se cuantificó mediante la escala de Rankin modificada. Los pacientes con AIT en el mes previo al ictus presentan mejor situación funcional a los 3 meses tras el ictus isquémico que aquellos que no sufren un AIT. Los valores se expresan como medianas [rango intercuartílico]. Test de Fisher, * $p < 0.0001$ versus No AIT.

Este hecho demostraba la efectividad del PC (AIT clínico) en la reducción del daño cerebral tras la isquemia, convirtiéndolo en una herramienta terapéutica prometedora en el desarrollo de la neuroprotección frente al ictus (Aboa-Eboule et al., 2011; Moncayo et al., 2000; Wegener et al., 2004; W. Zhao et al., 2018).

En línea con los resultados obtenidos *in vitro*, y con objeto de estudiar su relevancia clínica, analizamos el posible efecto del polimorfismo *Arg72Pro* de *Tp53* en el estado funcional de pacientes que sufrían el AIT en el mes previo al ictus isquémico. Como se muestra la Figura 46, se produjo una reducción significativa en el valor de Rankin-m a los 3 meses del ictus isquémico en pacientes con el alelo dominante *Pro* (pacientes

Pro) que habían sufrido un AIT previo al ictus, respecto de aquellos que no habían experimentado el AIT previo. Sin embargo, este efecto no se evidenció en pacientes homocigotos *Arg/Arg* (pacientes *Arg*).

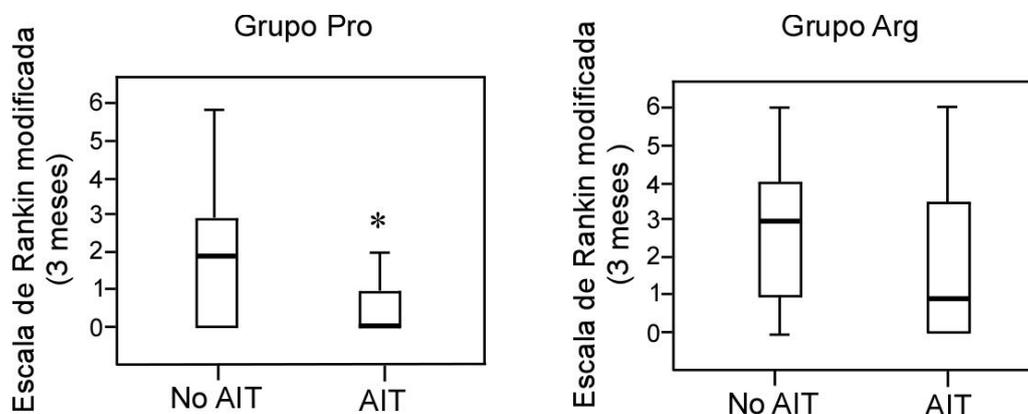


Figura 46. Asociación entre el polimorfismo *Arg72Pro* de *Tp53* y el estado funcional de los pacientes que sufren (o no) un AIT en el mes previo al ictus, a los 3 meses tras un ictus isquémico. El estado funcional de los pacientes se cuantificó mediante la escala de Rankin modificada. El AIT se asocia con un mejor pronóstico funcional en pacientes Pro. Los valores se expresan como medianas [rango intercuartílico]. Test de Fisher, *p < 0.0001 versus No AIT.

Aunque el AIT influía en el estado funcional de los pacientes de ambos genotipos, el 33 % de los pacientes homocigotos para *Arg* que sufrían un AIT previo tuvieron una situación funcional de Rankin-m > 2 asociado a mal pronóstico. Esto contrastaba con lo observado en los pacientes Pro, en cuyo caso el 100 % de los pacientes con AIT previo al ictus se encontró en una situación de Rankin-m ≤ 2 (buen pronóstico funcional) a los 3 meses tras el ictus isquémico (Tabla 14). Estos resultados inducen a pensar que el AIT desencadena un mecanismo neuroprotector más eficiente frente al daño cerebral en pacientes Pro, respecto a pacientes Arg, lo que se traduce en un mejor pronóstico funcional a los 3 meses del ictus isquémico.

	Buen pronóstico	Mal pronóstico	<i>p</i>
Pro, n (%)	13 (100%)	0	0.04
Arg, n (%)	8 (67 %)	4 (33 %)	

Tabla 14. Distribución del polimorfismo *Arg72Pro* de *Tp53* según el pronóstico funcional de pacientes con AIT en el mes previo al ictus, observado a los 3 meses tras el ictus isquémico. Los pacientes se clasificaron en buen pronóstico (mRS ≤ 2) o mal pronóstico (mRS > 2) funcional siguiendo la escala Rankin-m. Los valores se expresan como porcentaje (%).

Teniendo todo esto en cuenta, podemos confirmar la relevancia clínica del polimorfismo humano *Arg72Pro* de *Tp53* en la modulación de la respuesta de neuroprotección endógena asociada al AIT. Esto pone de manifiesto la posible consideración de este polimorfismo como biomarcador no invasivo para la predicción del pronóstico funcional en pacientes que hayan sufrido un AIT previo al ictus isquémico.

Discusión

En los últimos años, la tolerancia isquémica cerebral representa una vía importante de neuroprotección en desórdenes neurológicos como el ictus isquémico o el traumatismo cerebral (Dave, Thompson, Neumann, Perez-Pinzon, & Lin, 2014; M A Pérez-Pinzón, Alonso, Kraydieh, & Dietrich, 1999; Sandu et al., 2009). En concreto, el estudio de los mecanismos moleculares endógenos que se activan en respuesta a la isquemia es uno de los objetivos clave en la búsqueda de terapias neuroprotectoras para paliar la pérdida neuronal y el déficit neurológico tras la isquemia cerebral (A Almeida, Bolaños, & Moreno, 2005; Gomez-Sanchez et al., 2011; Jimenez-Blasco et al., 2015; Maestre et al., 2008; Rodríguez et al., 2018, 2017; Veas-Pérez de Tudela, Delgado-Esteban, et al., 2015).

En el presente trabajo de Tesis Doctoral, hemos identificado que las vías de señalización p53/PUMA/Caspasa-3 activa y Akt-MDM2-p53 son esenciales en la neuroprotección inducida por el PC, frente a un daño isquémico posterior. Además, cabe destacar que este estudio se basa en la utilización de modelos de preconditionamiento temprano, donde se ha descrito que uno de los mecanismos más relevantes es el control de la supervivencia y la muerte celular frente el daño isquémico (Ulrich Dirnagl et al., 2009; Kazuo Kitagawa et al., 1991; Stetler et al., 2008). Ambos modelos de PC utilizados en el presente trabajo (NMDA-PC y el IPC), han sido capaces de promover la protección neuronal frente a la isquemia. Esto corrobora la capacidad neuroprotectora del PC (Ulrich Dirnagl et al., 2009; J. Liu, Narasimhan, Yu, & Chan, 2005; Quireze et al., 2006; G.-P. Xu et al., 2002) y su funcionalidad como una herramienta eficaz en la identificación de los mecanismos moleculares involucrados en la supervivencia neuronal frente al daño isquémico.

Función de la vía de señalización Akt-MDM2-p53 en la tolerancia asociada al PC en respuesta al daño isquémico, en neuronas corticales en cultivo primario.

Aunque los mecanismos de la neuroprotección asociada al PC se desconocen, parece ser que el control de la apoptosis neuronal inducida tras la isquemia juega un papel

determinante. De hecho, resultados previos del grupo corroboran que la apoptosis se activa después de la isquemia cerebral y que su inhibición determina el buen pronóstico funcional en pacientes con ictus tanto isquémico como hemorrágico (Gomez-Sanchez et al., 2011). En este sentido, la proteína p53 es un conocido sensor de estrés celular, que posee un papel fundamental en el balance entre la muerte y la supervivencia neuronal (Kruiswijk et al., 2015; D. B. Wang et al., 2014a). Así, diversos modelos *in vivo* de isquemia cerebral demuestran que mientras que la activación de p53 en cerebro contribuye a la muerte neuronal por apoptosis, su delección génica previene dicha muerte (Crumrine et al., 1994; Culmsee et al., 2003; Endo et al., 2006; Yonekura et al., 2006). Este mismo efecto se ha observado en modelos *in vitro* de hipoxia e isquemia experimental (Banasiak & Haddad, 1998; Culmsee et al., 2003; Gomez-Sanchez et al., 2011). En este contexto, estudios realizados en corazón han revelado que la proteína p53 juega un papel importante en el PC (Mocanu & Yellon, 2003). De acuerdo con estos resultados, en el presente trabajo encontramos que la isquemia promueve la estabilización de p53 y que la delección genética de p53 previene la apoptosis neuronal inducida por la isquemia. Además, demostramos que el PC previene la estabilización de la proteína, evitando la apoptosis neuronal, mediada por p53, inducida tras la isquemia.

En base a estos estudios previos, nuestro objetivo ha sido estudiar el efecto del PC sobre la activación de la vías relacionadas con la muerte por apoptosis mediada por p53, inducidas en respuesta a la isquemia. De acuerdo con los estudios que indican que PUMA controla la activación de la caspasa-3 durante la isquemia, en cardiomiocitos y en células tumorales (YuZhen Li, Guo, Liu, Wang, & Song, 2015; Nakano & Vousden, 2001), nuestros resultados muestran que el PC previene la activación de la vía p53/PUMA/Caspasa-3 y promueve la neuroprotección frente al daño isquémico posterior. Es más, nosotros demostramos que, mientras que los niveles de mRNA de p53 no se alteran, la isquemia promueve la fosforilación y estabilización de p53, lo cual se previene por PC. Estos resultados nos sugieren que el PC evita la estabilización de p53 a través de un mecanismo postraduccional (fosforilación) y que éste sería responsable, al menos en parte, de la desestabilización de p53 y de la neuroprotección asociada al PC frente al daño isquémico.

En este contexto, el principal regulador negativo de la actividad de p53 es la E3 ubiquitina ligasa, MDM2. Un hecho relevante, que se ha descrito, es que la isquemia promueve la activación de numerosas kinasas que inducen distintas modificaciones postraduccionales (Lee et al., 2007; S. Saito et al., 2002) y alteran la afinidad de unión de ambas proteínas, evitando la degradación de p53, mediada por MDM2, por el proteosoma (Chao, 2015; Manfredi, 2010; Moll & Petrenko, 2003; Nag et al., 2013). En este sentido, nuestros resultados revelan que el PC promueve un aumento de los niveles de expresión de MDM2 y facilita su mayor interacción con p53, favoreciendo la prevención de la apoptosis neuronal tras la isquemia. Los resultados obtenidos demuestran como el aumento en la interacción del complejo MDM2/p53 promueve la desestabilización de la proteína p53, tanto a nivel nuclear como citosólico, lo que evita la inducción de la vía pro-apoptótica p53/PUMA/caspasa-3 y la muerte neuronal. Sin embargo, la interacción entre ambas proteínas también se observa durante la isquemia, aunque en este caso no es suficiente para prevenir la estabilización de p53 y la consiguiente muerte neuronal. Esto podría deberse a que los niveles de p53 sobrepasan la capacidad de la proteína MDM2 para degradarlos. De hecho, se ha observado la acumulación de proteínas poli-ubiquitinadas, así como la alteración en el funcionamiento del proteosoma tras el ictus (Asai et al., 2002; Ide et al., 1999; A. Saito et al., 2005). Además, durante la isquemia, se induce la forma fosforilada de p53 (pp53Ser15), la cual es incapaz de interactuar con MDM2 y degradarse por el proteosoma. Por lo tanto, el PC promueve una alteración del bucle de autorregulación negativo de MDM2-p53, lo que favorece el aumento en el control negativo de p53 y la supervivencia neuronal tras la isquemia. Estos resultados se encuentran en consonancia con estudios recientes, donde se describe la importancia del complejo MDM2/p53 en la neuroprotección asociada al post-condicionamiento en neuronas de la medula espinal (J. Li et al., 2017).

Además, demostramos que el bloqueo en la interacción entre MDM2 y p53 con su inhibidor específico, nutlin-3a (Shen & Maki, 2011; L. T. Vassilev et al., 2004; Lyubomir T. Vassilev, 2004; Y. Zhao, Aguilar, Bernard, & Wang, 2015), evita la neuroprotección mediada por el PC frente al daño isquémico. Durante el PC, la inhibición en la interacción de ambas proteínas evita la desestabilización de p53 y promueve la

activación de la caspasa-3 y la degeneración dendrítica después de la isquemia. Todos estos resultados, en su conjunto, apoyan la idea del impacto beneficioso del aumento de MDM2 producido por el PC y resaltan la función esencial de la interacción entre ambas proteínas en la desestabilización de p53 y la subsiguiente neuroprotección inducida por el PC frente a la isquemia. Por lo tanto, nuestros resultados señalan a MDM2 como una potencial diana terapéutica a tener en cuenta en la TI neuronal.

En células tumorales, se sabe que la proteína Akt promueve la traslocación de MDM2 al núcleo, favoreciendo la degradación de p53 y limitando la activación de los procesos pro-apoptóticos (Dudek et al., 1997; Gottlieb et al., 2002; L. D. Mayo & Donner, 2001; Ogawara et al., 2002). Así, la vía PI3K/Akt constituye uno de los mecanismos moleculares involucrados en el control de la supervivencia celular (Franke et al., 2003; Marte & Downward, 1997) en modelos de excitotoxicidad en neuronas corticales (Maria Delgado-Esteban et al., 2007) y su estudio es uno de los objetivos principales en el desarrollo de terapias antitumorales (Engelman, 2009; Fruman & Rommel, 2014; Janku, 2017; P. Liu, Cheng, Roberts, & Zhao, 2009). Además, su papel antagónico a p53, ha suscitado un creciente interés en el estudio de los mecanismos involucrados en la progresión neurodegenerativa (Ahn, 2014; Noshita, Lewén, Sugawara, & Chan, 2002; H. Zhao et al., 2005).

Numerosos trabajos *in vitro* (Bhuiyan et al., 2011; Hillion et al., 2006) e *in vivo* (Pignataro et al., 2012; Y. Zhang et al., 2007) sugieren la posible implicación de la vía PI3K/Akt en el PC cerebral y en otros tejidos como el hígado y el corazón (Armstrong, 2004; Carini et al., 2004; Mocanu, Bell, & Yellon, 2002). En relación con estos estudios, nuestros resultados demuestran que el PC promueve la fosforilación temprana de Akt (Ser473), lo que favorece la fosforilación de la proteína MDM2 (Ser166), aumentando su traslocación al núcleo celular. Además, éste cambio de localización celular de MDM2 es clave en la formación del complejo MDM2/p53 mediado por PC, y un factor esencial en la desestabilización de p53 y la supervivencia neuronal tras la isquemia. De hecho, la inactivación de Akt mediante la inhibición específica de PI3K o de la delección génica de Akt, durante el PC, evitan la desestabilización de p53 y la supervivencia neuronal asociada al PC y en respuesta a la isquemia. Así, todos estos resultados han permitido la identificación de la vía Akt-MDM2-p53 como vía de señalización esencial

en la supervivencia neuronal asociada al PC, lo que ha permitido esclarecer algunos de los mecanismos moleculares más relevantes implicados en la TI cerebral.

Función de la vía Akt-MDM2-p53 en la tolerancia cerebral asociada al preconditionamiento *in vivo*, frente al daño isquémico

Con el objetivo de comprobar, *in vivo*, la implicación de la vía Akt-MDM2-p53 en la neuroprotección asociada al PC y frente a la isquemia, utilizamos un modelo de oclusión de la arteria cerebral media en cerebro de rata. Estos resultados muestran que el PC atenúa el crecimiento del infarto cerebral inducido tras la isquemia, a través de la activación de la vía PI3K/Akt, la fosforilación de MDM2 (Ser 166), el aumento en los niveles de la proteína MDM2 y la posterior desestabilización de p53 tras la isquemia prolongada.

Todos estos resultados obtenidos, *in vitro* e *in vivo*, corroboran que el PC temprano proporciona neuroprotección al prevenir la muerte neuronal (necrosis y apoptosis) inducida por la isquemia. No obstante, se han descrito otros mecanismos de preconditionamiento a largo plazo, implicados en la TI y compatibles con los aquí mostrados, como son la inflamación o la activación astrocítica entre otros (Barreto, Gonzalez, Torres, & Morales, 2011). Estos, y futuros estudios, ayudarán a tener un mayor conocimiento del impacto de la vía MDM2-p53 en la neuroprotección asociada al condicionamiento previo o posterior al daño isquémico cerebral.

La función del polimorfismo *Arg72Pro* de *Tp53* en el pronóstico funcional de pacientes con ictus isquémico y ataque isquémico transitorio previo

En la actualidad, el AIT se considera el equivalente clínico del PC cerebral (Johnston, 2004; Marler et al., 2000; W.-W. Wang et al., 2017). En este contexto, diversos estudios demuestran que pacientes que sufren un AIT durante el mes previo al ictus

isquémico, presentan mejor pronóstico funcional que aquellos pacientes que no han sufrido un AIT (Aboa-Eboule et al., 2011; Moncayo et al., 2000; W.-W. Wang et al., 2017; Wegener et al., 2004). En relación con estudios clínicos previos, nuestros resultados han confirmado un papel neuroprotector del AIT durante el primer mes previo al ictus isquémico. Sin embargo, la variabilidad genética interindividual puede alterar la respuesta funcional tras un proceso isquémico de pacientes con un cuadro clínico similar (Angeles Almeida, 2013; Imyanitov, 2009). Si las variaciones se encuentran en genes apoptóticos, éstas pueden presentar una relevancia funcional en la muerte neuronal (Angeles Almeida, 2013; Gomez-Sanchez et al., 2011; Rodríguez et al., 2018). En este sentido, se ha descrito el polimorfismo humano *Arg72Pro* en el gen *Tp53*, cuya alteración de un único nucleótido condiciona la síntesis de la variante polimórfica prolina (Pro72-p53) o arginina (Arg72-p53), condiciona la respuesta apoptótica celular (Bonafé et al., 2004; Dumont et al., 2003; Gomez-Sanchez et al., 2011). Así, se ha definido una mayor capacidad pro-apoptótica de la variante arginina de p53 respecto a la variante prolina, regulando la distinta susceptibilidad neuronal a la muerte tras la isquemia (Bonafé et al., 2004; Gomez-Sanchez et al., 2011). Además, estudios recientes de nuestro grupo han demostrado que el polimorfismo *Arg72Pro* del gen humano *p53* condiciona el pronóstico funcional de pacientes de ictus isquémico y hemorrágico (Gomez-Sanchez et al., 2011) y determina la neovascularización y recuperación neurológica tras el ictus hemorrágico (Rodríguez et al., 2017). Aun así, a pesar de la importancia de la descripción de polimorfismos con valor pronóstico en el ictus (Gomez-Sanchez et al., 2011; Liepert, Heller, Behnisch, & Schoenfeld, 2013; Rodríguez et al., 2018, 2017; Z. Zhang et al., 2014), apenas existen trabajos sobre el papel de las variables genéticas en el AIT (Ormerod et al., 2017). En este sentido, nuestros resultados implican por primera vez al SNP *Arg72Pro* de *Tp53* en el pronóstico funcional de pacientes con AIT previo al ictus isquémico y describen una función moduladora del polimorfismo en la TI inducida por el PC. Así, neuronas precondicionadas que expresan la variante polimórfica humana Pro72-p53 exhiben una mayor neuroprotección asociada al PC que aquellas neuronas que expresan la variante Arg72-p53. Ya que nuestros resultados no muestran una expresión diferencial de la proteína MDM2 en ambas variantes polimórficas, cabe esperar que la localización subcelular de p53 pueda tener un papel fundamental en la distinta susceptibilidad de

ambos genotipos de *Tp53* a la TI. Los estudios previos describen que, en respuesta a la isquemia, una fracción de la forma estable de p53 se trasloca a la mitocondria y promueve la activación de la vía intrínseca de la apoptosis celular (Dumont et al., 2003; Marchenko et al., 2000; Sansome et al., 2001). De hecho, resultados del grupo han descrito una mayor avidéz de la variante Arg72-p53 por la fracción mitocondrial, promoviendo la activación de la vía de las caspasas en respuesta al daño isquémico (Gomez-Sanchez et al., 2011). En este sentido, nuestros resultados demuestran que el PC no previene la estabilización mitocondrial de la variante Arg72-p53. En cambio, la localización nuclear de Pro72-p53 podría ser clave en la interacción con MDM2, favoreciendo la desestabilización de p53. Así, se ha descrito una mayor capacidad de interacción Arg72-p53 con MDM2, lo que facilitaría su localización mitocondrial (Boyd, Tsai, & Jacks, 2000; Dumont et al., 2003; Geyer, Yu, & Maki, 2000), evitándose la degradación de p53 en el citosol. Estos estudios apoyarían nuestros resultados, resaltando la importancia de la localización subcelular de las proteínas en los procesos de muerte/supervivencia neuronal.

La relevancia del polimorfismo en la TI se ha corroborado en una cohorte de pacientes que habían sufrido un AIT, un mes previo al ictus isquémico. Así, el AIT se asocia con un mejor pronóstico funcional en pacientes de ictus isquémico, con una mayor eficacia en aquellos que expresan la variante alélica Pro, respecto a los que portaban el genotipo Arg/Arg. Estos resultados demuestran la función del polimorfismo *Arg72Pro* del gen humano *Tp53* en la modulación de la neuroprotección asociada al PC, pudiendo ser considerado como un biomarcador molecular, no invasivo y de carácter predictivo del pronóstico funcional de pacientes con ictus isquémico y AIT previo.

Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral, podemos concluir que:

1. Los dos modelos de preconditionamiento utilizados, basados en la estimulación subtóxica de los receptores NMDA del glutamato (NMDA-PC), o en el estímulo isquémico subletal (IPC), previenen la activación de la caspasa-3 y la apoptosis inducida después de 4 horas de reoxigenación tras la isquemia, confirmando así la tolerancia en neuronas corticales de ratón en cultivo primario.
2. La delección de p53 previene totalmente la muerte por apoptosis inducida a las 4 horas de reoxigenación tras la isquemia, de manera similar al PC, en neuronas corticales en cultivo primario. El PC previene de forma tiempo-dependiente, y por un mecanismo postraduccional, la fosforilación y estabilización de p53 (pp53-Ser15) y de sus dianas moleculares PUMA y p21, inducidas después de 4 horas de reoxigenación tras la isquemia experimental *in vitro*. Estos resultados corroboran la implicación de p53 en la muerte por apoptosis inducida tras la isquemia y demuestran su posible función en la neuroprotección asociada al PC.
3. La neuroprotección asociada al PC se debe al aumento en los niveles de expresión de la proteína E3 ubiquitina ligasa MDM2, lo que favorece su interacción con p53, en neuronas corticales en respuesta al daño isquémico. Así, el PC induce la interacción MDM2/p53 y promueve la desestabilización de p53 en el núcleo tras la isquemia.
4. La inhibición específica de la interacción entre MDM2 y p53, con nutlin-3a, evita la desestabilización de p53 y la inactivación de la vía apoptótica p53/PUMA/Caspasa-3 inducida durante el PC, con la subsiguiente pérdida de neuroprotección frente a la isquemia experimental *in vitro*. Esto demuestra que la interacción MDM2/p53 es esencial en la tolerancia neuronal asociada al PC frente al daño isquémico.

5. Durante el PC, la fosforilación temprana de la proteína Akt promueve la estabilización y fosforilación de MDM2, favoreciendo su traslocación al núcleo. Este cambio de localización facilita la formación del complejo MDM2/p53, lo que permite la desestabilización de p53 y su posterior degradación. Este mecanismo asociado al PC se previene mediante la inhibición de la PI3K o el silenciamiento génico de Akt, lo que demuestra la implicación de la vía PI3K/Akt en la tolerancia neuronal a las 4 horas de reoxigenación después de la isquemia experimental en cultivo de neuronas corticales.
6. El PC promueve, *in vivo*, la reducción del tamaño de infarto, tanto en la corteza como el estriado en cerebro de rata, inducido tras la isquemia. En los animales precondicionados, el efecto neuroprotector se acompaña de la fosforilación y activación de Akt (Ser473) y de MDM2 (Ser 166), el aumento de MDM2 y la desestabilización de p53, en respuesta a la isquemia prolongada y letal.
7. El PC promueve la desestabilización nuclear y citosólica de p53 en las neuronas corticales que expresan la variante polimórfica humana Pro72-p53, pero no en aquellas que expresan la variante polimórfica Arg72-p53. Además, en estas últimas, el PC es incapaz de prevenir la estabilización mitocondrial de p53. Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que las variantes polimórficas humanas, Pro-p53 y Arg-p53, poseen diferente susceptibilidad a la neuroprotección inducida por el PC y frente al daño isquémico.
8. Nuestros resultados corroboran la asociación entre el AIT y el mejor pronóstico funcional a los tres meses, en pacientes que han sufrido un ictus isquémico. Además, los pacientes que expresan la variante alélica Pro72-p53, presentan un mejor pronóstico funcional, respecto a aquellos que expresan la variante polimórfica Arg72-p53. Esto pone de manifiesto la relevancia clínica del polimorfismo *Arg72Pro* de *Tp53* en la modulación de la neuroprotección endógena asociada al AIT previo al ictus isquémico.

Conclusión final

Los resultados del presente trabajo de Tesis doctoral obtenidos mediante el uso de distintos modelos de PC, uno farmacológico (NDMA-PC) y otro más fisiológico (IPC), nos ha permitido identificar *in vitro* e *in vivo* algunos mecanismos moleculares esenciales involucrados en la TI. Entre estos mecanismos se encuentran las vías de señalización p53/PUMA/caspasa-3 y Akt-MDM2-p53, con una papel clave en el balance entre la supervivencia y la muerte tras la isquemia. El presente estudio destaca la gran relevancia que tiene el conocimiento de los mecanismos intrínsecos de la TI, así como los factores que la modulan. Además, hemos identificado la función moduladora del polimorfismo *Arg72Pro* de *Tp53* en la supervivencia neuronal asociada al PC y su relevancia en el pronóstico funcional de pacientes que experimentan un AIT. Todos estos resultados demuestran que el PC es una herramienta eficaz en la búsqueda de biomarcadores y en el desarrollo de estrategias neuroprotectoras preventivas frente a desórdenes neurológicos, como el AIT y el ictus isquémico.

Bibliografía

- Aboa-Eboule, C., Bejot, Y., Osseby, G.-V., Rouaud, O., Binquet, C., Marie, C., ... Bonithon-Kopp, C. (2011). Influence of prior transient ischaemic attack on stroke prognosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *82*(9), 993–1000. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2010.209171>
- Adams, H. P., Bendixen, B. H., Kappelle, L. J., Biller, J., Love, B. B., Gordon, D. L., & Marsh, E. E. (1993). Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*, *24*(1), 35–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7678184>
- Ahn, J.-Y. (2014). Neuroprotection signaling of nuclear akt in neuronal cells. *Experimental Neurobiology*, *23*(3), 200–206. <https://doi.org/10.5607/en.2014.23.3.200>
- Allen, C. L., & Bayraktutan, U. (2009). Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *International Journal of Stroke: Official Journal of the International Stroke Society*, *4*(6), 461–470. <https://doi.org/10.1111/j.1747-4949.2009.00387.x>
- Almeida, A. (2013). Genetic determinants of neuronal vulnerability to apoptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *70*(1), 71–88. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1029-y>
- Almeida, A., & Bolaños, J. P. (2001). A transient inhibition of mitochondrial ATP synthesis by nitric oxide synthase activation triggered apoptosis in primary cortical neurons. *Journal of Neurochemistry*, *77*(2), 676–690. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11299330>
- Almeida, A., Bolaños, J. P., & Moreno, S. (2005). Cdh1/Hct1-APC Is Essential for the Survival of Postmitotic Neurons. *Journal of Neuroscience*, *25*(36), 8115–8121. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1143-05.2005>
- Almeida, A., Delgado-Esteban, M., Bolaños, J. P., & Medina, J. M. (2002). Oxygen and glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurones but not in astrocytes in primary culture. *Journal of Neurochemistry*, *81*(2), 207–217. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12064468>
- Almeida, A., & Medina, J. M. (1998). A rapid method for the isolation of metabolically active mitochondria from rat neurons and astrocytes in primary culture. *Brain Research. Brain Research Protocols*, *2*(3), 209–214. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9507134>
- Alonso de Leciana, M., Egido, J. A., Casado, I., Ribó, M., Dávalos, A., Masjuan, J., ... Spanish Neurological Society. (2014). Guía para el tratamiento del infarto cerebral agudo. *Neurología*, *29*(2), 102–122. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2011.09.012>
- Andreotti, F., & Pasceri, V. (1996). Ischaemic preconditioning. *Lancet (London, England)*, *348*(9021), 204. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)66158-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(05)66158-2)
- Armstrong, S. (2004). Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, *61*(3), 427–436. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.09.031>

- Asai, A., Tanahashi, N., Qiu, J., Saito, N., Chi, S., Kawahara, N., ... Kirino, T. (2002). Selective Proteasomal Dysfunction in the Hippocampal CA1 Region after Transient Forebrain Ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 22(6), 705–710. <https://doi.org/10.1097/00004647-200206000-00009>
- Astrup, J., Siesjö, B. K., & Symon, L. (1981). Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke*, 12(6), 723–725. <https://doi.org/10.1161/01.STR.12.6.723>
- Bai, L., & Zhu, W.-G. (2006). p 53 : Structure , Function and Therapeutic Applications. Retrieved from <https://www.semanticscholar.org/paper/p-53-%3A-Structure-%2C-Function-and-Therapeutic-Bai-Zhu/8ed9f4d5c61dda26c523c197a731982a2b03470b>
- Banasiak, K. J., & Haddad, G. G. (1998). Hypoxia-induced apoptosis: effect of hypoxic severity and role of p53 in neuronal cell death. *Brain Research*, 797(2), 295–304. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(98\)00286-8](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)00286-8)
- Banks, J. L., & Marotta, C. A. (2007). Outcomes validity and reliability of the modified Rankin scale: implications for stroke clinical trials: a literature review and synthesis. *Stroke*, 38(3), 1091–1096. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000258355.23810.c6>
- Barreto, G. E., Gonzalez, J., Torres, Y., & Morales, L. (2011). Astrocytic-neuronal crosstalk: Implications for neuroprotection from brain injury. *Neuroscience Research*, 71(2), 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2011.06.004>
- Bederson, J. B., Pitts, L. H., Germano, S. M., Nishimura, M. C., Davis, R. L., & Bartkowski, H. M. (1986). Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke*, 17(6), 1304–1308. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2433817>
- Benardete, E. A., & Bergold, P. J. (2009). Genomic analysis of ischemic preconditioning in adult rat hippocampal slice cultures. *Brain Research*, 1292, 107–122. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.07.027>
- Benjamin, E. J., Muntner, P., Alonso, A., Bittencourt, M. S., Callaway, C. W., Carson, A. P., ... American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. (2019). Heart Disease and Stroke Statistics—2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 139(10), e56--e528. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000659>
- Bergui, M., Stura, G., Daniele, D., Cerrato, P., Bernardino, M., & Bradac, G. B. (2006). Mechanical Thrombolysis in Ischemic Stroke Attributable to Basilar Artery Occlusion as First-Line Treatment. *Stroke*, 37(1), 145–150. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000195178.20019.dc>
- Bevan, S., Traylor, M., Adib-Samii, P., Malik, R., Paul, N. L. M., Jackson, C., ... Markus, H. S. (2012). Genetic Heritability of Ischemic Stroke and the Contribution of Previously Reported Candidate Gene and Genomewide Associations. *Stroke*, 43(12), 3161–3167. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.112.665760>

- Bhuiyan, M. I. H., Jung, S. Y., Kim, H. J., Lee, Y. S., & Jin, C. (2011). Major role of the PI3K/Akt pathway in ischemic tolerance induced by sublethal oxygen-glucose deprivation in cortical neurons in vitro. *Archives of Pharmacal Research*, *34*(6), 1023–1034. <https://doi.org/10.1007/s12272-011-0620-3>
- Biros, E., Kalina, I., Kohút, A., Bogyiová, E., Salagovic, J., & Sulla, I. (2002). Allelic and haplotype frequencies of the p53 polymorphisms in brain tumor patients. *Physiological Research*, *51*(1), 59–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12071291>
- Blanco, M., Lizasoain, I., Sobrino, T., Vivancos, J., & Castillo, J. (2006). Ischemic preconditioning: A novel target for neuroprotective therapy. *Cerebrovascular Diseases*.
- Boehme, A. K., Kulick, E. R., Canning, M., Alvord, T., Khaksari, B., Omran, S., ... Elkind, M. S. V. (2018). Infections Increase the Risk of 30-Day Readmissions Among Stroke Survivors. *Stroke*, *49*(12), 2999–3005. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.022837>
- Bolaños, J. P. (2016). Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neuronal activity. *Journal of Neurochemistry*, *139*, 115–125. <https://doi.org/10.1111/jnc.13486>
- Bolaños, J. P., Moro, M. A., Lizasoain, I., & Almeida, A. (2009). Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke: Therapeutic implications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *61*(14), 1299–1315. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.05.009>
- Bonafé, M., Salvioli, S., Barbi, C., Trapassi, C., Tocco, F., Storci, G., ... Franceschi, C. (2004). The different apoptotic potential of the p53 codon 72 alleles increases with age and modulates in vivo ischaemia-induced cell death. *Cell Death & Differentiation*, *11*(9), 962–973. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401415>
- Bordet, R., Deplanque, D., Maboudou, P., Puisieux, F., Pu, Q., Robin, E., ... Dupuis, B. (2000). Increase in Endogenous Brain Superoxide Dismutase as a Potential Mechanism of Lipopolysaccharide-Induced Brain Ischemic Tolerance. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *20*(8), 1190–1196. <https://doi.org/10.1097/00004647-200008000-00004>
- Boyd, S. D., Tsai, K. Y., & Jacks, T. (2000). An intact HDM2 RING-finger domain is required for nuclear exclusion of p53. *Nature Cell Biology*, *2*(9), 563–568. <https://doi.org/10.1038/35023500>
- Brady, C. A., & Attardi, L. D. (2010). p53 at a glance. *Journal of Cell Science*, *123*(15), 2527–2532. <https://doi.org/10.1242/jcs.064501>
- Brooks, C. L., & Gu, W. (2003). Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, *15*(2), 164–171. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12648672>
- Broughton, B. R. S., Reutens, D. C., & Sobey, C. G. (2009). Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*, *40*(5), e331–9. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.531632>

- Brouns, R., & Deyn, P. P. De. (2009). The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke, *111*, 483–495. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2009.04.001>
- Burguete, M. C., Torregrosa Pérez-Asensio, G. F. J., Castelló-Ruiz, M., Salom Gil, J. B. J. V, Alborch, E., Gil, J. V, & Alborch, E. (2006). Dietary phytoestrogens improve stroke outcome after transient focal cerebral ischemia in rats. *European Journal of Neuroscience*, *23*(3), 703–710. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04599.x>
- Campbell, B. C. V, Mitchell, P. J., Kleinig, T. J., Dewey, H. M., Churilov, L., Yassi, N., ... Davis, S. M. (2015). Endovascular Therapy for Ischemic Stroke with Perfusion-Imaging Selection. *New England Journal of Medicine*, *372*(11), 1009–1018. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1414792>
- Cargill, M., Altshuler, D., Ireland, J., Sklar, P., Ardlie, K., Patil, N., ... Lander, E. S. (1999). Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nature Genetics*, *22*(3), 231–238. <https://doi.org/10.1038/10290>
- Carini, R., Grazia De Cesaris, M., Splendore, R., Baldanzi, G., Nitti, M. P., Alchera, E., ... Albano, E. (2004). Role of phosphatidylinositol 3-kinase in the development of hepatocyte preconditioning. *Gastroenterology*, *127*(3), 914–923. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15362046>
- Castellano, C., Cestari, V., & Ciamei, A. (2001). NMDA receptors and learning and memory processes. *Current Drug Targets*, *2*(3), 273–283. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11554552>
- Castillo, J., Moro, M. Á., Blanco, M., Leira, R., Serena, J., Lizasoain, I., & Dávalos, A. (2003). The release of tumor necrosis factor- α is associated with ischemic tolerance in human stroke. *Annals of Neurology*, *54*(6), 811–819. <https://doi.org/10.1002/ana.10765>
- Castillo, J., Rama, R., & Dávalos, A. (2000). Nitric oxide-related brain damage in acute ischemic stroke. *Stroke*, *31*(4), 852–857. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10753987>
- Catanese, L., Tarsia, J., & Fisher, M. (2017). Acute Ischemic Stroke Therapy Overview. *Circulation Research*, *120*(3), 541–558. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309278>
- Centeno, J. M., Orti, M., Salom, J. B., Sick, T. J., & Pérez-Pinzón, M. A. (1999). Nitric oxide is involved in anoxic preconditioning neuroprotection in rat hippocampal slices. *Brain Research*, *836*(1–2), 62–69. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10415405>
- Chamorro, Á., Dirnagl, U., Urra, X., & Planas, A. M. (2016). Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. *The Lancet Neurology*, *15*(8), 869–881. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)00114-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)00114-9)
- Chan, P. H. (2004). Mitochondria and Neuronal Death/Survival Signaling Pathways in Cerebral Ischemia. *Neurochemical Research*, *29*(11), 1943–1949. <https://doi.org/10.1007/s11064-004-6869-x>

- Chan, W. M., Siu, W. Y., Lau, A., & Poon, R. Y. C. (2004). How many mutant p53 molecules are needed to inactivate a tetramer? *Molecular and Cellular Biology*, 24(8), 3536–3551. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.8.3536-3551.2004>
- Chao, C. C.-K. (2015). Mechanisms of p53 degradation. *Clinica Chimica Acta*, 438, 139–147. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2014.08.015>
- Che, R., Zhao, W., Ma, Q., Jiang, F., Wu, L., Yu, Z., ... Ji, X. (2019). rt-PA with remote ischemic postconditioning for acute ischemic stroke. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 6(2), 364–372. <https://doi.org/10.1002/acn3.713>
- Chen, L. B. (1988). Mitochondrial Membrane Potential in Living Cells. *Annual Review of Cell Biology*, 4(1), 155–181. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.04.110188.001103>
- Chipuk, J. E., Bouchier-Hayes, L., Kuwana, T., Newmeyer, D. D., & Green, D. R. (2005). PUMA Couples the Nuclear and Cytoplasmic Proapoptotic Function of p53. *Science*, 309(5741), 1732–1735. <https://doi.org/10.1126/science.1114297>
- Ciccone, A., Valvassori, L., Nichelatti, M., Sgoifo, A., Ponzio, M., Sterzi, R., ... SYNTHESIS Expansion Investigators. (2013). Endovascular Treatment for Acute Ischemic Stroke. *New England Journal of Medicine*, 368(10), 904–913. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1213701>
- Clarke, D. D., & Sokoloff, L. (1994). Circulation and energy metabolism of the brain. In: *Basic Neurochemistry*, 645–660.
- Cohen, M. V, Yang, X. M., & Downey, J. M. (1994). Conscious rabbits become tolerant to multiple episodes of ischemic preconditioning. *Circulation Research*, 74(5), 998–1004. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8156647>
- Constantino, L. C., Binder, L. B., Vandresen-Filho, S., Viola, G. G., Ludka, F. K., Lopes, M. W., ... Tasca, C. I. (2018). Role of Phosphatidylinositol-3 Kinase Pathway in NMDA Preconditioning: Different Mechanisms for Seizures and Hippocampal Neuronal Degeneration Induced by Quinolinic Acid. *Neurotoxicity Research*, 34(3), 452–462. <https://doi.org/10.1007/s12640-018-9903-5>
- Cramer, S. C., & Procaccio, V. (2012). Correlation between genetic polymorphisms and stroke recovery: Analysis of the GAIN Americas and GAIN International Studies. *European Journal of Neurology*, 19(5), 718–724. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2011.03615.x>
- Crumrine, R. C., Thomas, A. L., & Morgan, P. F. (1994). Attenuation of p53 Expression Protects against Focal Ischemic Damage in Transgenic Mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 14(6), 887–891. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1994.119>
- Cull-Candy, S., Brickley, S., & Farrant, M. (2001). NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(3), 327–335. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11399431>
- Culmsee, C., & Mattson, M. P. (2005). p53 in neuronal apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331(3), 761–777. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.149>

- Culmsee, C., Siewe, J., Junker, V., Retiounskaia, M., Schwarz, S., Camandola, S., ... Krieglstein, J. (2003). *Reciprocal inhibition of p53 and nuclear factor-kappaB transcriptional activities determines cell survival or death in neurons*. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* (Vol. 23). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-24-08586.2003>
- Datta, S. R., Brunet, A., & Greenberg, M. E. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & Development*, *13*(22), 2905–2927. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10579998>
- Dave, K. R., Thompson, J. W., Neumann, J. T., Perez-Pinzon, M. A., & Lin, H. W. (2014). Neurovascular Mechanisms of Ischemia Tolerance Against Brain Injury. In *Vascular Mechanisms in CNS Trauma* (pp. 179–200). https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8690-9_10
- de Oca Luna, R. M., Wagner, D. S., & Lozano, G. (1995). Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature*, *378*(6553), 203–206. <https://doi.org/10.1038/378203a0>
- Deb, P., Sharma, S., & Hassan, K. M. (2010). Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. *Pathophysiology: The Official Journal of the International Society for Pathophysiology*, *17*(3), 197–218. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2009.12.001>
- del Zoppo, G. J., & Hallenbeck, J. M. (2000). Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. *Thrombosis Research*, *98*(3), 73–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10812160>
- Delgado-Esteban, M., Almeida, A., & Bolaños, J. P. (2002). D-Glucose Prevents Glutathione Oxidation and Mitochondrial Damage After Glutamate Receptor Stimulation in Rat Cortical Primary Neurons. *Journal of Neurochemistry*, *75*(4), 1618–1624. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0751618.x>
- Delgado-Esteban, M., García-Higuera, I., Maestre, C., Moreno, S., & Almeida, A. (2013). APC/C-Cdh1 coordinates neurogenesis and cortical size during development. *Nature Communications*, *4*(1), 2879. <https://doi.org/10.1038/ncomms3879>
- Delgado-Esteban, M., Martin-Zanca, D., Andres-Martin, L., Almeida, A., & Bolaños, J. P. (2007). Inhibition of PTEN by peroxynitrite activates the phosphoinositide-3-kinase/Akt neuroprotective signaling pathway. *Journal of Neurochemistry*, *102*(1), 194–205. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04450.x>
- Della-Morte, D., Dave, K. R., DeFazio, R. A., Bao, Y. C., Raval, A. P., & Perez-Pinzon, M. A. (2009). Resveratrol pretreatment protects rat brain from cerebral ischemic damage via a sirtuin 1–uncoupling protein 2 pathway. *Neuroscience*, *159*(3), 993–1002. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.01.017>
- Dirnagl, U., Becker, K., & Meisel, A. (2009). Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use. *The Lancet Neurology*, *8*(4), 398–412. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70054-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70054-7)
- Dirnagl, U., Iadecola, C., & Moskowitz, M. A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in Neurosciences*, *22*(9), 391–397. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10441299>

- Dirnagl, U., Simon, R. P., & Hallenbeck, J. M. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection, 26 *Trends in Neurosciences* § (2003). [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00071-7](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00071-7)
- Dong, Y., & Benveniste, E. N. (2001). Immune function of astrocytes. *Glia*, 36(2), 180–190. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11596126>
- Donnan, G. A., & Davis, S. M. (2008). Breaking the 3 h barrier for treatment of acute ischaemic stroke. *The Lancet Neurology*, 7(11), 981–982. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70230-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70230-8)
- Dornan, D., Wertz, I., Shimizu, H., Arnott, D., Frantz, G. D., Dowd, P., ... Dixit, V. M. (2004). The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. *Nature*, 429(6987), 86–92. <https://doi.org/10.1038/nature02514>
- Dudek, H., Datta, S. R., Franke, T. F., Birnbaum, M. J., Yao, R., Cooper, G. M., ... Greenberg, M. E. (1997). Regulation of Neuronal Survival by the Serine-Threonine Protein Kinase Akt. *Science*, 275(5300), 661–665. <https://doi.org/10.1126/science.275.5300.661>
- Dumont, P., Leu, J. I.-J., Della Pietra, A. C., George, D. L., & Murphy, M. (2003). The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nature Genetics*, 33(3), 357–365. <https://doi.org/10.1038/ng1093>
- Durukan, A., & Tatlisumak, T. (2007). Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 87(1), 179–197. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2007.04.015>
- Durukan, A., & Tatlisumak, T. (2010). Preconditioning-induced ischemic tolerance: a window into endogenous gearing for cerebroprotection. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/2040-7378-2-2>
- Easton, J. D., Saver, J. L., Albers, G. W., Alberts, M. J., Chaturvedi, S., Feldmann, E., ... Sacco, R. L. (2009). Definition and Evaluation of Transient Ischemic Attack. *Stroke*, 40(6), 2276–2293. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.192218>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Emberson, J., Lees, K. R., Lyden, P., Blackwell, L., Albers, G., Bluhmki, E., ... Stroke Thrombolysis Trialists' Collaborative Group. (2014). Effect of treatment delay, age, and stroke severity on the effects of intravenous thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet (London, England)*, 384(9958), 1929–1935. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60584-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60584-5)
- Endo, H., Kamada, H., Nito, C., Nishi, T., & Chan, P. H. (2006). Mitochondrial Translocation of p53 Mediates Release of Cytochrome c and Hippocampal CA1 Neuronal Death after Transient Global Cerebral Ischemia in Rats. *Journal of Neuroscience*, 26(30), 7974–7983. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0897-06.2006>

- Engelman, J. A. (2009). Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nature Reviews Cancer*, 9(8), 550–562. <https://doi.org/10.1038/nrc2664>
- Feng, J., Tamaskovic, R., Yang, Z., Brazil, D. P., Merlo, A., Hess, D., & Hemmings, B. A. (2004). Stabilization of Mdm2 via Decreased Ubiquitination Is Mediated by Protein Kinase B/Akt-dependent Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 279(34), 35510–35517. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404936200>
- Fernández-Gómez, F. J., Hernández, F., Argandoña, L., Galindo, M. F., Segura, T., & Jordán, J. (2008). Pharmacology of neuroprotection in acute ischemic stroke. *Revista de Neurología*, 47(5), 253–260. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18780272>
- Filichia, E., Shen, H., Zhou, X., Qi, X., Jin, K., Greig, N., ... Luo, Y. (2015). Forebrain neuronal specific ablation of p53 gene provides protection in a cortical ischemic stroke model. *Neuroscience*, 295, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.03.018>
- Finlay, C. A., Hinds, P. W., & Levine, A. J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*, 57(7), 1083–1093. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2525423>
- Fisher, M., & Saver, J. L. (2015). Future directions of acute ischaemic stroke therapy. *The Lancet Neurology*, 14(7), 758–767. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00054-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00054-X)
- Fletcher, L., Kohli, S., Sprague, S. M., Scranton, R. A., Lipton, S. A., Parra, A., ... Digicaylioglu, M. (2009). Intranasal delivery of erythropoietin plus insulin-like growth factor-I for acute neuroprotection in stroke. *Journal of Neurosurgery*, 111(1), 164–170. <https://doi.org/10.3171/2009.2.JNS081199>
- Franke, T. F., Hornik, C. P., Segev, L., Shostak, G. A., & Sugimoto, C. (2003). PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene*, 22(56), 8983–8998. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207115>
- Freedman, D. A., & Levine, A. J. (1998). Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. *Molecular and Cellular Biology*, 18(12), 7288–7293. <https://doi.org/10.1128/mcb.18.12.7288>
- Freeman, D. J., Li, A. G., Wei, G., Li, H.-H., Kertesz, N., Lesche, R., ... Wu, H. (2003). PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Cell*, 3(2), 117–130. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12620407>
- Fruman, D. A., & Rommel, C. (2014). PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(2), 140–156. <https://doi.org/10.1038/nrd4204>
- Gallego-Fabrega, C., Carrera, C., Muiño, E., Montaner, J., Krupinski, J., & Fernandez-Cadenas, I. (2015). DNA methylation levels are highly correlated between pooled samples and averaged values when analysed using the Infinium HumanMethylation450 BeadChip array. *Clinical Epigenetics*, 7(1), 78. <https://doi.org/10.1186/s13148-015-0097-x>

- Gao, X., Zhang, H., Steinberg, G., & Zhao, H. (2010). The Akt pathway is involved in rapid ischemic tolerance in focal ischemia in Rats. *Translational Stroke Research*, 1(3), 202–209. <https://doi.org/10.1007/s12975-010-0017-5>
- Gao, X., Zhang, H., Takahashi, T., Hsieh, J., Liao, J., Steinberg, G. K., & Zhao, H. (2008). The Akt signaling pathway contributes to postconditioning's protection against stroke; the protection is associated with the MAPK and PKC pathways. *Journal of Neurochemistry*, 105(3), 943–955. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05218.x>
- Gardener, H., Wright, C. B., Rundek, T., & Sacco, R. L. (2015). Brain health and shared risk factors for dementia and stroke. *Nature Reviews Neurology*, 11(11), 651–657. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.195>
- George, P. M., & Steinberg, G. K. (2015). Novel Stroke Therapeutics: Unraveling Stroke Pathophysiology and Its Impact on Clinical Treatments. *Neuron*, 87(2), 297–309. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.05.041>
- Geyer, R. K., Yu, Z. K., & Maki, C. G. (2000). The MDM2 RING-finger domain is required to promote p53 nuclear export. *Nature Cell Biology*, 2(9), 569–573. <https://doi.org/10.1038/35023507>
- Gidday, J. M. (2006). Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(6), 437–448. <https://doi.org/10.1038/nrn1927>
- Gidday, J. M., Shah, A. R., Maceren, R. G., Wang, Q., Pelligrino, D. A., Holtzman, D. M., & Park, T. S. (1999). Nitric Oxide Mediates Cerebral Ischemic Tolerance in a Neonatal Rat Model of Hypoxic Preconditioning. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 19(3), 331–340. <https://doi.org/10.1097/00004647-199903000-00011>
- Giralt-Steinhauer, E., Jiménez-Conde, J., Soriano Tárraga, C., Mola, M., Rodríguez-Campello, A., Cuadrado-Godia, E., ... Roquer, J. (2014). Aproximación al conocimiento de las bases genéticas del ictus. Consorcio español de genética del ictus. *Neurología*, 29(9), 560–566. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2013.04.005>
- Gomez-Sanchez, J. C., Delgado-Esteban, M., Rodriguez-Hernandez, I., Sobrino, T., Perez de la Ossa, N., Reverte, S., ... Almeida, A. (2011). The human Tp53 Arg72Pro polymorphism explains different functional prognosis in stroke. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(3), 429–437. <https://doi.org/10.1084/jem.20101523>
- Gottlieb, T. M., Leal, J. F. M., Seger, R., Taya, Y., & Oren, M. (2002). Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene*, 21(8), 1299–1303. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205181>
- Goyal, M., Menon, B. K., van Zwam, W. H., Dippel, D. W. J., Mitchell, P. J., Demchuk, A. M., ... Collaborators, H. (2016). Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *The Lancet*, 387(10029), 1723–1731. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00163-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00163-X)
- Grabb, M. C., & Choi, D. W. (1999). Ischemic tolerance in murine cortical cell culture: critical role for NMDA receptors. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(5), 1657–1662.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-05-01657.1999>

- Green, D. R., & Kroemer, G. (2009). Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*, *458*(7242), 1127–1130. <https://doi.org/10.1038/nature07986>
- Gu, B., & Zhu, W.-G. (2012). Surf the post-translational modification network of p53 regulation. *International Journal of Biological Sciences*, *8*(5), 672–684. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4283>
- Gudkov, A. V., & Komarova, E. A. (2010). Pathologies Associated with the p53 Response. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(7), a001180–a001180. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001180>
- Guo, Y., Li, P., Guo, Q., Shang, K., Yan, D., Du, S., & Lu, Y. (2013). Pathophysiology and Biomarkers in Acute Ischemic Stroke-A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *12*(6), 1097–1105. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i6.35>
- Hafner, A., Bulyk, M. L., Jambhekar, A., & Lahav, G. (2019). The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *20*(4), 199–210. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0110-x>
- Hahn, C. D., Manlihot, C., Schmidt, M. R., Nielsen, T. T., & Redington, A. N. (2011). Remote Ischemic Pre-Conditioning. *Stroke*, *42*(10), 2960–2962. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.622340>
- Hankey, G. J., & Wee, C.-K. (2016). Predicting Early Recurrent Stroke With the Recurrence Risk Estimator. *JAMA Neurology*, *73*(4), 376. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.5047>
- Hardingham, G. E., & Bading, H. (2003). The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends in Neurosciences*, *26*(2), 81–89. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)00040-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)00040-1)
- Hardingham, G. E., & Bading, H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, *11*(10), 682–696. <https://doi.org/10.1038/nrn2911>
- Hardingham, G. E., Fukunaga, Y., & Bading, H. (2002). Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nature Neuroscience*, *5*(5), 405–414. <https://doi.org/10.1038/nn835>
- Harris, S. L., & Levine, A. J. (2005). The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*, *24*(17), 2899–2908. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208615>
- Haupt, Y., Maya, R., Kazanietz, A., & Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, *387*(6630), 296–299. <https://doi.org/10.1038/387296a0>
- Hess, D. C., Blauenfeldt, R. A., Andersen, G., Hougaard, K. D., Hoda, M. N., Ding, Y., & Ji, X. (2015). Remote ischaemic conditioning—a new paradigm of self-protection in the brain. *Nature Reviews Neurology*, *11*(12), 698–710. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.223>
- Hillion, J. A., Li, Y., Maric, D., Takanohashi, A., Klimanis, D., Barker, J. L., ... Hallenbeck, J. M. (2006). Involvement of Akt in preconditioning-induced tolerance to ischemia in PC12 cells, *26*(10). <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600286>

- Hirayama, Y., Ikeda-Matsuo, Y., Notomi, S., Enaida, H., Kinouchi, H., & Koizumi, S. (2015). Astrocyte-Mediated Ischemic Tolerance. *Journal of Neuroscience*, *35*(9), 3794–3805. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4218-14.2015>
- Hirayama, Y., & Koizumi, S. (2018). Astrocytes and ischemic tolerance. *Neuroscience Research*, *126*, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.11.013>
- Hofseth, L. J., Hussain, S. P., & Harris, C. C. (2004). p53: 25 years after its discovery. *Trends in Pharmacological Sciences*, *25*(4), 177–181. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.02.009>
- Honda, R., & Yasuda, H. (1999). Association of p19ARF with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *The EMBO Journal*, *18*(1), 22–27. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.1.22>
- Hong, L.-Z., Zhao, X.-Y., & Zhang, H.-L. (2010). p53-mediated neuronal cell death in ischemic brain injury. *Neuroscience Bulletin*, *26*(3), 232–240. <https://doi.org/10.1007/s12264-010-1111-0>
- Hossmann, K.-A. (2006). Pathophysiology and Therapy of Experimental Stroke. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *26*(7–8), 1055–1081. <https://doi.org/10.1007/s10571-006-9008-1>
- Hougaard, K. D., Hjort, N., Zeidler, D., Sørensen, L., Nørgaard, A., Hansen, T. M., ... Andersen, G. (2014). Remote Ischemic Preconditioning as an Adjunct Therapy to Thrombolysis in Patients With Acute Ischemic Stroke. *Stroke*, *45*(1), 159–167. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.113.001346>
- Hougaard, K. D., Hjort, N., Zeidler, D., Sørensen, L., Nørgaard, A., Thomsen, R. B., ... Andersen, G. (2013). Remote Ischemic Preconditioning in Thrombolysed Stroke Patients: Randomized Study of Activating Endogenous Neuroprotection – Design and MRI Measurements. *International Journal of Stroke*, *8*(2), 141–146. <https://doi.org/10.1111/j.1747-4949.2012.00786.x>
- Huang, L., Yan, Z., Liao, X., Li, Y., Yang, J., Wang, Z.-G., ... Yuan, Z.-M. (2011). The p53 inhibitors MDM2/MDMX complex is required for control of p53 activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(29), 12001–12006. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102309108>
- Ide, T., Takada, K., Qiu, J. H., Saito, N., Kawahara, N., Asai, A., & Kirino, T. (1999). Ubiquitin Stress Response in Postischemic Hippocampal Neurons under Nontolerant and Tolerant Conditions. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *19*(7), 750–756. <https://doi.org/10.1097/00004647-199907000-00004>
- Imyanitov, E. N. (2009). Gene polymorphisms, apoptotic capacity and cancer risk. *Human Genetics*, *125*(3), 239–246. <https://doi.org/10.1007/s00439-009-0636-7>
- Janku, F. (2017). Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway inhibitors in solid tumors: From laboratory to patients. *Cancer Treatment Reviews*, *59*, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.07.005>
- JANOFF, A. (1964). ALTERATIONS IN LYSOSOMES (INTRACELLULAR ENZYMES) DURING SHOCK; EFFECTS OF PRECONDITIONING (TOLERANCE) AND PROTECTIVE DRUGS.

- International Anesthesiology Clinics*, 2, 251–269. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14125012>
- Jiang, X., Andjelkovic, A. V., Zhu, L., Yang, T., Bennett, M. V. L., Chen, J., ... Shi, Y. (2018). Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke. *Progress in Neurobiology*, 163–164, 144–171. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.10.001>
- Jimenez-Blasco, D., Santofimia-Castaño, P., Gonzalez, A., Almeida, A., Bolaños, J. P., Santofimia-Castan??, P., ... Bolaños, J. P. (2015). Astrocyte NMDA receptors' activity sustains neuronal survival through a Cdk5-Nrf2 pathway. *Cell Death and Differentiation*, 22(11), 1877–1889. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.49>
- Jin, R., Liu, L., Zhang, S., Nanda, A., & Li, G. (2013). Role of Inflammation and Its Mediators in Acute Ischemic Stroke. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 6(5), 834–851. <https://doi.org/10.1007/s12265-013-9508-6>
- Joerger, A. C., & Fersht, A. R. (2008). Structural Biology of the Tumor Suppressor p53. *Annual Review of Biochemistry*, 77(1), 557–582. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.060806.091238>
- Joerger, A. C., & Fersht, A. R. (2010). The Tumor Suppressor p53: From Structures to Drug Discovery. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(6), a000919–a000919. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000919>
- Joerger, A. C., & Fersht, A. R. (2016). The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches. *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), 375–404. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014710>
- Johnston, S. C. (2004). Ischemic Preconditioning From Transient Ischemic Attacks?: Data From the Northern California TIA Study. *Stroke*, 35(11_suppl_1), 2680–2682. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000143322.20491.0f>
- Jover-Mengual, T., Castelló-Ruiz, M., Burguete, M. C., Jorques, M., López-Morales, M. A., Aliena-Valero, A., ... Salom, J. B. (2017). Molecular mechanisms mediating the neuroprotective role of the selective estrogen receptor modulator, bazedoxifene, in acute ischemic stroke: A comparative study with 17β-estradiol. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.05.001>
- Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M., & Korthuis, R. J. (2012). Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. In *International review of cell and molecular biology* (Vol. 298, pp. 229–317). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7>
- Kamada, R., Toguchi, Y., Nomura, T., Imagawa, T., & Sakaguchi, K. (2016). Tetramer formation of tumor suppressor protein p53: Structure, function, and applications. *Biopolymers*, 106(4), 598–612. <https://doi.org/10.1002/bip.22772>
- Kamijo, T., Weber, J. D., Zambetti, G., Zindy, F., Roussel, M. F., & Sherr, C. J. (1998). Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(14), 8292–8297. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.14.8292>
- Kastenhuber, E. R., & Lowe, S. W. (2017). Putting p53 in Context. *Cell*, 170(6), 1062–1078. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.028>

- Kato, H., Araki, T., Murase, K., & Kogure, K. (1992). Induction of tolerance to ischemia: alterations in second-messenger systems in the gerbil hippocampus. *Brain Research Bulletin*, 29(5), 559–565. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1330218>
- Katsura, K., Kristián, T., & Siesjö, B. K. (1994). Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochemical Society Transactions*, 22(4), 991–996. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7698500>
- Keep, R. F., Wang, M. M., Xiang, J., Hua, Y., & Xi, G. (2010). Is there a place for cerebral preconditioning in the clinic? *Translational Stroke Research*, 1(1), 4–18. <https://doi.org/10.1007/s12975-009-0007-7>
- Kern, S. E., Kinzler, K. W., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P., Prives, C., & Vogelstein, B. (1991). Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science (New York, N.Y.)*, 252(5013), 1708–1711. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2047879>
- Khatri, R., McKinney, A. M., Swenson, B., & Janardhan, V. (2012). Blood-brain barrier, reperfusion injury, and hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Neurology*, 79(Issue 13, Supplement 1), S52–S57. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182697e70>
- Khoury, N., Koronowski, K. B., & Perez-Pinzon, M. A. (2016). Long-term window of ischemic tolerance: An evolutionarily conserved form of metabolic plasticity regulated by epigenetic modifications? *Journal of Neurology & Neuromedicine*, 1(2), 6–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27796011>
- Kim, J. M., Kim, Y. J., & Kim, D. M. (2012). Increased expression of oxyproteins in the optic nerve head of an in vivo model of optic nerve ischemia. *BMC Ophthalmology*, 12(1), 63. <https://doi.org/10.1186/1471-2415-12-63>
- Kirino, T. (2002). Ischemic Tolerance. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 22(11), 1283–1296. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000040942.89393.88>
- Kirino, T., Nakagomi, T., Kanemitsu, H., & Tamura, A. (1996). Ischemic tolerance. *Advances in Neurology*, 71, 505–511. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8790824>
- Kirino, T., Tsujita, Y., & Tamura, A. (1991). Induced Tolerance to Ischemia in Gerbil Hippocampal Neurons. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 11(2), 299–307. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1991.62>
- Kitagawa, K., Matsumoto, M., Kuwabara, K., Tagaya, M., Ohtsuki, T., Hata, R., ... Kamada, T. (1991). 'Ischemic tolerance' phenomenon detected in various brain regions. *Brain Research*, 561(2), 203–211. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91596-S](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91596-S)
- Kitagawa, K., Matsumoto, M., Tagaya, M., Hata, R., Ueda, H., Niinobe, M., ... Mikoshiba, K. (1990). "Ischemic tolerance" phenomenon found in the brain. *Brain Research*, 528(1), 21–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2245337>
- Koch, S., Della-Morte, D., Dave, K. R., Sacco, R. L., & Perez-Pinzon, M. A. (2014). Biomarkers for ischemic preconditioning: finding the responders. *Journal of*

Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 34(6), 933–941.
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.42>

- Koch, T. G., Berg, L. C., & Betts, D. H. (2009). Current and future regenerative medicine - principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*, 50(2), 155–165. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19412395>
- Koizumi, J., Yoshida, Y., Nakazawa, T., & Ooneda, G. (1986). Experimental studies of ischemic brain edema. *Nosotchu*, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.3995/jstroke.8.1>
- Kruiswijk, F., Labuschagne, C. F., & Vousden, K. H. (2015). p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(7), 393–405. <https://doi.org/10.1038/nrm4007>
- Kruse, J.-P., & Gu, W. (2008). SnapShot: p53 Posttranslational Modifications. *Cell*, 133(5), 930–930.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.020>
- Kunz, A., Park, L., Abe, T., Gallo, E. F., Anrather, J., Zhou, P., & Iadecola, C. (2007). Neurovascular Protection by Ischemic Tolerance: Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species. *Journal of Neuroscience*, 27(27), 7083–7093. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1645-07.2007>
- Lahav, G., Rosenfeld, N., Sigal, A., Geva-Zatorsky, N., Levine, A. J., Elowitz, M. B., & Alon, U. (2004). Dynamics of the p53-Mdm2 feedback loop in individual cells. *Nature Genetics*, 36(2), 147–150. <https://doi.org/10.1038/ng1293>
- Lai, T. W., Zhang, S., & Wang, Y. T. (2014). Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. *Progress in Neurobiology*, 115(C), 157–188. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.11.006>
- Landman, T. R. J., Schoon, Y., Warlé, M. C., de Leeuw, F.-E., & Thijssen, D. H. J. (2019). Remote Ischemic Conditioning as an Additional Treatment for Acute Ischemic Stroke. *Stroke*, 50(7), 1934–1939. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.119.025494>
- LANE, D. P., & CRAWFORD, L. V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SY40-transformed cells. *Nature*, 278(5701), 261–263. <https://doi.org/10.1038/278261a0>
- Lapresa, R., Agulla, J., Sánchez-Morán, I., Zamarreño, R., Prieto, E., Bolaños, J. P., & Almeida, A. (2019). Amyloid- β promotes neurotoxicity by Cdk5-induced p53 stabilization. *Neuropharmacology*, 146, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.11.019>
- Lavin, M. F., & Gueven, N. (2006). The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death & Differentiation*, 13(6), 941–950. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401925>
- Lee, J.-H., Kim, H.-S., Lee, S.-J., & Kim, K.-T. (2007). Stabilization and activation of p53 induced by Cdk5 contributes to neuronal cell death. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 13), 2259–2271. <https://doi.org/10.1242/jcs.03468>

- Lehotský, J., Burda, J., Danielisová, V., Gottlieb, M., Kaplán, P., Saniová, B., ... Saniová, B. (2009). Ischemic tolerance: The mechanisms of neuroprotective strategy. *Anatomical Record*, *292*(12), 2002–2012. <https://doi.org/10.1002/ar.20970>
- Levine, A. J., Hu, W., & Feng, Z. (2006). The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death & Differentiation*, *13*(6), 1027–1036. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401910>
- Levine, A. J., Momand, J., & Finlay, C. A. (1991). The p53 tumour suppressor gene. *Nature*, *351*(6326), 453–456. <https://doi.org/10.1038/351453a0>
- Li, J., Chen, G., Gao, X., Shen, C., Zhou, P., Wu, X., ... Xie, R. (2017). p53 participates in the protective effects of ischemic post-conditioning against OGD-reperfusion injury in primary cultured spinal cord neurons. *Neuroscience Letters*, *638*(12), 129–134. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.12.037>
- Li, Y., Guo, Q., Liu, X., Wang, C., & Song, D. (2015). PUMA-mediated mitochondrial apoptotic disruption by hypoxic postconditioning. *Apoptosis*, *20*(8), 1026–1032. <https://doi.org/10.1007/s10495-015-1127-z>
- Li, Y., Jenkins, C. W., Nichols, M. A., & Xiong, Y. (1994). Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene*, *9*(8), 2261–2268. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7913544>
- Liepert, J., Heller, A., Behnisch, G., & Schoenfeld, A. (2013). Catechol- O - Methyltransferase Polymorphism Influences Outcome After Ischemic Stroke. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, *27*(6), 491–496. <https://doi.org/10.1177/1545968313481282>
- Lim, S. Y., Yellon, D. M., & Hausenloy, D. J. (2010). The neural and humoral pathways in remote limb ischemic preconditioning. *Basic Research in Cardiology*, *105*(5), 651–655. <https://doi.org/10.1007/s00395-010-0099-y>
- Lin, C.-H. H., Chen, P.-S. S., & Gean, P.-W. W. (2008). Glutamate preconditioning prevents neuronal death induced by combined oxygen-glucose deprivation in cultured cortical neurons. *European Journal of Pharmacology*, *589*(1–3), 85–93. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2008.05.047>
- Linzer, D. I., & Levine, A. J. (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, *17*(1), 43–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/222475>
- Liu, J., Narasimhan, P., Yu, F., & Chan, P. H. (2005). Neuroprotection by Hypoxic Preconditioning Involves Oxidative Stress-Mediated Expression of Hypoxia-Inducible Factor and Erythropoietin. *Stroke*, *36*(6), 1264–1269. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000166180.91042.02>
- Liu, P., Cheng, H., Roberts, T. M., & Zhao, J. J. (2009). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, *8*(8), 627–644. <https://doi.org/10.1038/nrd2926>
- Liu, X., Sheng, R., & Qin, Z. (2009). The neuroprotective mechanism of brain ischemic preconditioning. *Acta Pharmacologica Sinica*, *30*(8), 1071–1080.

<https://doi.org/10.1038/aps.2009.105>

- Liu, Y., & Bodmer, W. F. (2006). Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(4), 976–981. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510146103>
- Lo, E. H., Dalkara, T., & Moskowitz, M. A. (2003). Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nature Reviews Neuroscience*, *4*(5), 399–414. <https://doi.org/10.1038/nrn1106>
- Longa, E. Z., Weinstein, P. R., Carlson, S., & Cummins, R. (1989). Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, *20*(1), 84–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2643202>
- Love, S. (1999). Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, *9*(1), 119–131. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9989455>
- Love, S. (2003). Apoptosis and brain ischaemia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *27*(2), 267–282. [https://doi.org/10.1016/S0278-5846\(03\)00022-8](https://doi.org/10.1016/S0278-5846(03)00022-8)
- Lu, G.-W., Yu, S., Li, R.-H., Cui, X.-Y., & Gao, C.-Y. (2005). Hypoxic Preconditioning: A Novel Intrinsic Cytoprotective Strategy. *Molecular Neurobiology*, *31*(1–3), 255–272. <https://doi.org/10.1385/MN:31:1-3:255>
- Maestre, C., Delgado-Esteban, M., Gomez-Sanchez, J. C., Bolaños, J. P., & Almeida, A. (2008). Cdk5 phosphorylates Cdh1 and modulates cyclin B1 stability in excitotoxicity. *The EMBO Journal*, *27*(20), 2736–2745. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.195>
- Maguire, J. M., Bevan, S., Stanne, T. M., Lorenzen, E., Fernandez-Cadenas, I., Hankey, G. J., ... Lindgren, A. (2017). GISCOME – Genetics of Ischaemic Stroke Functional Outcome network: A protocol for an international multicentre genetic association study. *European Stroke Journal*, *2*(3), 229–237. <https://doi.org/10.1177/2396987317704547>
- Maguire, J., Thakkinstian, A., Levi, C., Lincz, L., Bisset, L., Sturm, J., ... Attia, J. (2011). Impact of COX-2 rs5275 and rs20417 and GPIIIa rs5918 Polymorphisms on 90-Day Ischemic Stroke Functional Outcome: A Novel Finding. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, *20*(2), 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2009.10.011>
- Manfredi, J. J. (2010). The Mdm2-p53 relationship evolves: Mdm2 swings both ways as an oncogene and a tumor suppressor. *Genes & Development*, *24*(15), 1580–1589. <https://doi.org/10.1101/gad.1941710>
- Manning, B. D., & Toker, A. (2017). AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*, *169*(3), 381–405. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.001>
- Mar, J., Álvarez-Sabín, J., Oliva, J., Becerra, V., Casado, M. Á., Yébenes, M., ... Masjuan, J. (2013). Los costes del ictus en España según su etiología. El protocolo del estudio CONOCES. *Neurología*, *28*(6), 332–339. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2012.07.004>

- Marchenko, N. D., Zaika, A., & Moll, U. M. (2000). Death Signal-induced Localization of p53 Protein to Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 275(21), 16202–16212. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.21.16202>
- Marei, H. E., Hasan, A., Rizzi, R., Althani, A., Afifi, N., Cenciarelli, C., ... Shuaib, A. (2018). Potential of Stem Cell-Based Therapy for Ischemic Stroke. *Frontiers in Neurology*, 9, 34. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00034>
- Marine, J.-C., & Jochemsen, A. G. (2004). Mdmx and Mdm2: brothers in arms? *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 3(7), 900–904. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15254433>
- Marler, J. R., Tilley, B. C., Lu, M., Brott, T. G., Lyden, P. C., Grotta, J. C., ... Kwiatkowski, T. P. (2000). Early stroke treatment associated with better outcome: the NINDS rt-PA stroke study. *Neurology*, 55(11), 1649–1655. <https://doi.org/10.1212/wnl.55.11.1649>
- Marte, B. M., & Downward, J. (1997). PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends in Biochemical Sciences*, 22(9), 355–358. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9301337>
- Martelli, A. M., Tabellini, G., Bressanin, D., Ognibene, A., Goto, K., Cocco, L., & Evangelisti, C. (2012). The emerging multiple roles of nuclear Akt. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1823(12), 2168–2178. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2012.08.017>
- Martin, L. J., Brambrink, A., Koehler, R. C., & Traystman, R. J. (1997). Primary sensory and forebrain motor systems in the newborn brain are preferentially damaged by hypoxia-ischemia. *The Journal of Comparative Neurology*, 377(2), 262–285. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19970113\)377:2<262::AID-CNE8>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19970113)377:2<262::AID-CNE8>3.0.CO;2-1)
- Martini, M., De Santis, M. C., Braccini, L., Gulluni, F., & Hirsch, E. (2014). PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Annals of Medicine*, 46(6), 372–383. <https://doi.org/10.3109/07853890.2014.912836>
- Masada, T., Hua, Y., Xi, G., Yang, G.-Y., Hoff, J. T., & Keep, R. F. (2001). Attenuation of intracerebral hemorrhage and thrombin-induced brain edema by overexpression of interleukin-1 receptor antagonist. *Journal of Neurosurgery*, 95(4), 680–686. <https://doi.org/10.3171/jns.2001.95.4.0680>
- Matarin, M., Brown, W. M., Singleton, A., Hardy, J. A., Meschia, J. F., & Investigators, I. (2008). Whole Genome Analyses Suggest Ischemic Stroke and Heart Disease Share an Association With Polymorphisms on Chromosome 9p21. *Stroke*, 39(5), 1586–1589. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.502963>
- Matlashewski, G., Pim, D., Banks, L., & Crawford, L. (1987). Alternative splicing of human p53 transcripts. *Oncogene Research*, 1(1), 77–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2453013>
- Mayo, L. D., & Donner, D. B. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), 11598–11603. <https://doi.org/10.1073/pnas.181181198>

- Mayo, L. D., & Donner, D. B. (2002). The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(9), 462–467. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12217521>
- McDonald, J. W., Silverstein, F. S., & Johnston, M. V. (1990). Magnesium reduces N-methyl-D-aspartate (NMDA)-mediated brain injury in perinatal rats. *Neuroscience Letters*, 109(1–2), 234–238. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2179770>
- Meller, R., & Simon, R. P. (2013). Tolerance to ischemia - an increasingly complex biology. *Translational Stroke Research*, 4(1), 40–50. <https://doi.org/10.1007/s12975-012-0246-x>
- Mergenthaler, P., Dirnagl, U., & Meisel, A. (2004). Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metabolic Brain Disease*, 19(3–4), 151–167. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15554412>
- Meulmeester, E., Pereg, Y., Shiloh, Y., & Jochemsen, A. G. (2005). ATM-Mediated Phosphorylations Inhibit Mdmx/Mdm2 Stabilization by HAUSP in Favor of p53 Activation. *Cell Cycle*, 4(9), 1166–1170. <https://doi.org/10.4161/cc.4.9.1981>
- Milne, D., Kampanis, P., Nicol, S., Dias, S., Campbell, D. G., Fuller-Pace, F., & Meek, D. (2004). A novel site of AKT-mediated phosphorylation in the human MDM2 oncoprotein. *FEBS Letters*, 577(1–2), 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.09.081>
- Mocanu, M. M., Bell, R. M., & Yellon, D. M. (2002). PI3 Kinase and not p42/p44 Appears to be Implicated in the Protection Conferred by Ischemic Preconditioning. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34(6), 661–668. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2002.2006>
- Mocanu, M. M., & Yellon, D. M. (2003). p53 down-regulation: a new molecular mechanism involved in ischaemic preconditioning. *FEBS Letters*, 555(2), 302–306. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)01260-2](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)01260-2)
- Moll, U. M., & Petrenko, O. (2003). The MDM2-p53 Interaction, 1(December), 1001–1008. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81871-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81871-1)
- Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D., & Levine, A. J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, 69(7), 1237–1245. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1535557>
- Moncayo, J., de Freitas, G. R., Bogousslavsky, J., Altieri, M., & van Melle, G. (2000). Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect? *Neurology*, 54(11), 2089–2094. <https://doi.org/10.1212/wnl.54.11.2089>
- Morrison, R. S., & Kinoshita, Y. (2000). The role of p53 in neuronal cell death. *Cell Death and Differentiation*, 7(10), 868–879. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400741>
- Murry, C. E., Jennings, R. B., & Reimer, K. A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74(5), 1124–1136. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3769170>

- N, T. V., Sangwan, A., Sharma, B., Majid, A., & GK, R. (2015). Cerebral Ischemic Preconditioning: the Road So Far.... *Molecular Neurobiology*, 53(4), 2579–2593. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9278-z>
- Nag, S., Qin, J., Srivenugopal, K. S., Wang, M., & Zhang, R. (2013). The MDM2-p53 pathway revisited. *Journal of Biomedical Research*, 27(4), 254–271. <https://doi.org/10.7555/JBR.27.20130030>
- Nagy, Z., & Nardai, S. (2017). Cerebral ischemia/reperfusion injury: From bench space to bedside. *Brain Research Bulletin*, 134, 30–37. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2017.06.011>
- NAKAJIMA, T., IWABUCHI, S., MIYAZAKI, H., OKUMA, Y., KUWABARA, M., NOMURA, Y., & KAWAHARA, K. (2004). Preconditioning Prevents Ischemia-Induced Neuronal Death Through Persistent Akt Activation in the Penumbra Region of the Rat Brain. *Journal of Veterinary Medical Science*, 66(5), 521–527. <https://doi.org/10.1292/jvms.66.521>
- Nakamura, H., Katsumata, T., Nishiyama, Y., Otori, T., Katsura, K., & Katayama, Y. (2006). Effect of ischemic preconditioning on cerebral blood flow after subsequent lethal ischemia in gerbils. *Life Sciences*, 78(15), 1713–1719. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.08.008>
- Nakano, K., & Vousden, K. H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Molecular Cell*, 7(3), 683–694. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11463392>
- Narayanan, S. V., Dave, K. R., & Perez-Pinzon, M. A. (2013). Ischemic preconditioning and clinical scenarios. *Current Opinion in Neurology*, 26(1), 1–7. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e32835bf200>
- Narayanan, S. V., Dave, K. R., & Perez-Pinzon, M. A. (2017). Ischemic Preconditioning Protects Astrocytes against Oxygen Glucose Deprivation Via the Nuclear Erythroid 2-Related Factor 2 Pathway. *Translational Stroke Research*, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s12975-017-0574-y>
- Noshita, N., Lewén, A., Sugawara, T., & Chan, P. H. (2002). Akt Phosphorylation and Neuronal Survival after Traumatic Brain Injury in Mice. *Neurobiology of Disease*, 9(3), 294–304. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2002.0482>
- O’Keefe, K., Li, H., & Zhang, Y. (2003). Nucleocytoplasmic shuttling of p53 is essential for MDM2-mediated cytoplasmic degradation but not ubiquitination. *Molecular and Cellular Biology*, 23(18), 6396–6405. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.18.6396-6405.2003>
- Obrenovitch, T. P. (2008). Molecular Physiology of Preconditioning-Induced Brain Tolerance to Ischemia. *Physiological Reviews*, 88(1), 211–247. <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2006>
- Ogawara, Y., Kishishita, S., Obata, T., Isazawa, Y., Suzuki, T., Tanaka, K., ... Gotoh, Y. (2002). Akt Enhances Mdm2-mediated Ubiquitination and Degradation of p53. *Journal of Biological Chemistry*, 277(24), 21843–21850. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109745200>

- Ohtsuki, T., Ruetzler, C. A., Tasaki, K., & Hallenbeck, J. M. (1996). Interleukin-1 mediates induction of tolerance to global ischemia in gerbil hippocampal CA1 neurons. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *16*(6), 1137–1142. <https://doi.org/10.1097/00004647-199611000-00007>
- Oliner, J. D., Pietenpol, J. A., Thiagalingam, S., Gyuris, J., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1993). Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature*, *362*(6423), 857–860. <https://doi.org/10.1038/362857a0>
- Olson, D. C., Marechal, V., Momand, J., Chen, J., Romocki, C., & Levine, A. J. (1993). Identification and characterization of multiple mdm-2 proteins and mdm-2-p53 protein complexes. *Oncogene*, *8*(9), 2353–2360. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7689721>
- Ormerod, J. O. M., Evans, J. D. W., Contractor, H., Beretta, M., Arif, S., Fernandez, B. O., ... Ashrafian, H. (2017). Human Second Window Pre-Conditioning and Post-Conditioning by Nitrite Is Influenced by a Common Polymorphism in Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase. *JACC. Basic to Translational Science*, *2*(1), 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2016.11.006>
- Ottani, F., Galvani, M., Ferrini, D., Sorbello, F., Limonetti, P., Pantoli, D., & Rusticali, F. (1995). Prodromal Angina Limits Infarct Size. *Circulation*, *91*(2), 291–297. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.91.2.291>
- Paciaroni, M., Caso, V., & Agnelli, G. (2009). The Concept of Ischemic Penumbra in Acute Stroke and Therapeutic Opportunities. *European Neurology*, *61*(6), 321–330. <https://doi.org/10.1159/000210544>
- Paraskevopoulou, M. D., & Tschlis, P. N. (2017). A perspective on AKT 25-plus years after its discovery. *Science Signaling*, *10*(486), eaan8791. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aan8791>
- Pei, J., You, X., & Fu, Q. (2015). Inflammation in the pathogenesis of ischemic stroke. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, *20*, 772–783. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25553478>
- Pérez-Pinzón, M. A. (2004). Neuroprotective Effects of Ischemic Preconditioning in Brain Mitochondria Following Cerebral Ischemia. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *36*(4), 323–327. <https://doi.org/10.1023/B:JOB.0000041762.47544.ff>
- Pérez-Pinzón, M. A., Alonso, O., Kraydieh, S., & Dietrich, W. D. (1999). Induction of tolerance against traumatic brain injury by ischemic preconditioning. *Neuroreport*, *10*(14), 2951–2954. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10549803>
- Pérez-Pinzón, M. A., Xu, G. P., Mumford, P. L., Dietrich, W. D., Rosenthal, M., & Sick, T. J. (1997). Rapid ischemic preconditioning protects rats from cerebral anoxia/ischemia. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *428*, 155–161. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9500042>
- Pietsch, E. C., Humbey, O., & Murphy, M. E. (2006). Polymorphisms in the p53 pathway. *Oncogene*, *25*(11), 1602–1611. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209367>

- Pignataro, G., Boscia, F., Esposito, E., Sirabella, R., Cuomo, O., Vinciguerra, A., ... Annunziato, L. (2012). NCX1 and NCX3: Two new effectors of delayed preconditioning in brain ischemia. *Neurobiology of Disease*, *45*(1), 616–623. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.10.007>
- Pignataro, G., Meller, R., Inoue, K., Ordonez, A. N., Ashley, M. D., Zhigang, X., ... Simon, R. P. (2008). In Vivo and In Vitro Characterization of a Novel Neuroprotective Strategy for Stroke: Ischemic Postconditioning. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *28*(2), 232–241. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600559>
- Portilla, E. C., Muñoz, W., & Sierra, C. H. (2014). Genes y variantes polimórficas asociadas a la enfermedad cardiovascular. *Revista Colombiana de Cardiología*, *21*(5), 318–326. <https://doi.org/10.1016/J.RCCAR.2014.09.003>
- Pradillo, J. M., Fernández-López, D., García-Yébenes, I., Sobrado, M., Hurtado, O., Moro, M. A., & Lizasoain, I. (2009). Toll-like receptor 4 is involved in neuroprotection afforded by ischemic preconditioning. *Journal of Neurochemistry*, *109*(1), 287–294. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05972.x>
- Pradillo, J. M., Hurtado, O., Romera, C., Cárdenas, A., Fernández-Tomé, P., Alonso-Escolano, D., ... Lizasoain, I. (2006). TNFR1 mediates increased neuronal membrane EAAT3 expression after in vivo cerebral ischemic preconditioning. *Neuroscience*, *138*(4), 1171–1178. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.12.010>
- Pradillo, J. M., Romera, C., Hurtado, O., Cárdenas, A., Moro, M. A., Leza, J. C., ... Lizasoain, I. (2005). TNFR1 upregulation mediates tolerance after brain ischemic preconditioning. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *25*(2), 193–203. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600019>
- Prass, K., & Dirnagl, U. (1998). Glutamate antagonists in therapy of stroke. *Restorative Neurology and Neuroscience*, *13*(1–2), 3–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12671283>
- Quireze, C., de Souza Montero, E. F., Leitão, R. M. C., Juliano, Y., Fagundes, D. J., & Polide-Figueiredo, L. F. (2006). Ischemic Preconditioning Prevents Apoptotic Cell Death and Necrosis in Early and Intermediate Phases of Liver Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Journal of Investigative Surgery*, *19*(4), 229–236. <https://doi.org/10.1080/08941930600778206>
- Raff, M. C., Barres, B. A., Burne, J. F., Coles, H. S., Ishizaki, Y., & Jacobson, M. D. (1993). Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science (New York, N.Y.)*, *262*(5134), 695–700. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8235590>
- Ramos-Cabrer, P., Campos, F., Sobrino, T., & Castillo, J. (2011). Targeting the Ischemic Penumbra. *Stroke*, *42*(1, Supplement 1), S7–S11. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.596684>
- Riley, T., Sontag, E., Chen, P., & Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *9*(5), 402–412.

<https://doi.org/10.1038/nrm2395>

- Rodríguez, C., Ramos-Araque, M. E., Domínguez-Martínez, M., Sobrino, T., Sánchez-Morán, I., Agulla, J., ... Almeida, A. (2018). Single-Nucleotide Polymorphism 309T>Gin the MDM2 Promoter Determines Functional Outcome After Stroke. *Stroke*, *49*(10), 2437–2444. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.022529>
- Rodríguez, C., Sobrino, T., Agulla, J., Bobo-Jiménez, V., Ramos-Araque, M. E., Duarte, J. J., ... Almeida, Á. (2017). Neovascularization and functional recovery after intracerebral hemorrhage is conditioned by the Tp53 Arg72Pro single-nucleotide polymorphism. *Cell Death and Differentiation*, *24*(1), 144–154. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.109>
- Roth, J., Dobbstein, M., Freedman, D. A., Shenk, T., & Levine, A. J. (1998). Nucleocytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *The EMBO Journal*, *17*(2), 554–564. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.2.554>
- Rufini, A., Tucci, P., Celardo, I., & Melino, G. (2013). Senescence and aging: the critical roles of p53. *Oncogene*, *32*(43), 5129–5143. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.640>
- Rybnikova, E., & Samoilov, M. (2015). Epigenetic mechanisms of hypoxic preconditioning. *SpringerPlus*, *4*(S1), L39. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-4-S1-L39>
- Saenger, A. K., & Christenson, R. H. (2010). Stroke biomarkers: progress and challenges for diagnosis, prognosis, differentiation, and treatment. *Clinical Chemistry*, *56*(1), 21–33. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.133801>
- Saito, A., Maier, C. M., Narasimhan, P., Nishi, T., Song, Y. S., Yu, F., ... Chan, P. H. (2005). Oxidative Stress and Neuronal Death/Survival Signaling in Cerebral Ischemia. *Molecular Neurobiology*, *31*(1–3), 105–116. <https://doi.org/10.1385/MN:31:1-3:105>
- Saito, S., Goodarzi, A. A., Higashimoto, Y., Noda, Y., Lees-Miller, S. P., Appella, E., & Anderson, C. W. (2002). ATM Mediates Phosphorylation at Multiple p53 Sites, Including Ser 46, in Response to Ionizing Radiation. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(15), 12491–12494. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200093200>
- Sakamuro, D., Sabbatini, P., White, E., & Prendergast, G. C. (1997). The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene*, *15*(8), 887–898. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201263>
- Sakhi, S., Bruce, A., Sun, N., Tocco, G., Baudry, M., & Schreiber, S. S. (1994). p53 induction is associated with neuronal damage in the central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(16), 7525–7529. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.16.7525>
- Saldaña-Meyer, R., & Recillas-Targa, F. (2011). Transcriptional and epigenetic regulation of the p53 tumor suppressor gene. *Epigenetics*, *6*(9), 1068–1077. <https://doi.org/10.4161/epi.6.9.16683>
- Sandu, N., Cornelius, J., Filis, A., Arasho, B., Perez-Pinzon, M., & Schaller, B. (2009).

- Ischemic tolerance in stroke treatment. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 7(10), 1255–1261. <https://doi.org/10.1586/erc.09.90>
- Sangeetha, R., Ramesh, V., Kamath, S., Christopher, R., Bhat, D., Arvinda, H., & Chakrabarti, D. (2019). Effect of remote ischemic preconditioning on cerebral vasospasm and biomarkers of cerebral ischemia in aneurysmal subarachnoid hemorrhage (ERVAS): A protocol for a randomized, controlled pilot trial. *Brain Circulation*, 5(1), 12. https://doi.org/10.4103/bc.bc_26_18
- Sansome, C., Zaika, A., Marchenko, N. D., & Moll, U. M. (2001). Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria. Detection by immunofluorescence on whole cells. *FEBS Letters*, 488(3), 110–115. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)02368-1](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)02368-1)
- Santi, S. A., & Lee, H. (2010). The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 298(3), C580–C591. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00375.2009>
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science*, 307(5712), 1098–1101. <https://doi.org/10.1126/science.1106148>
- Sattler, R., & Tymianski, M. (2001). Molecular Mechanisms of Glutamate Receptor-Mediated Excitotoxic Neuronal Cell Death. *Molecular Neurobiology*, 24(1–3), 107–130. <https://doi.org/10.1385/MN:24:1-3:107>
- Schaller, B. (2005). Ischemic preconditioning as induction of ischemic tolerance after transient ischemic attacks in human brain: its clinical relevance. *Neuroscience Letters*, 377(3), 206–211. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.12.004>
- Schuler, M., Bossy-Wetzler, E., Goldstein, J. C., Fitzgerald, P., & Green, D. R. (2000). p53 Induces Apoptosis by Caspase Activation through Mitochondrial Cytochrome c Release. *Journal of Biological Chemistry*, 275(10), 7337–7342. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.10.7337>
- Schultz, J. E. J., Qian, Y. Z., Gross, G. J., & Kukreja, R. C. (1997). The Ischemia-selective KATPChannel Antagonist, 5-Hydroxydecanoate, Blocks Ischemic Preconditioning in the Rat Heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 29(3), 1055–1060. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1996.0358>
- Severino, P. C., Muller, G. do A. S., Vandresen-Filho, S., & Tasca, C. I. (2011). Cell signaling in NMDA preconditioning and neuroprotection in convulsions induced by quinolinic acid. *Life Sciences*, 89(15–16), 570–576. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.05.014>
- Shahjouei, S., Cai, P. Y., Ansari, S., Sharififar, S., Azari, H., Ganji, S., & Zand, R. (2016). Middle Cerebral Artery Occlusion Model of Stroke in Rodents: A Step-by-Step Approach. *Journal of Vascular and Interventional Neurology*, 8(5), 1–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26958146>
- Sharp, F. R., Ran, R., Lu, A., Tang, Y., Strauss, K. I., Glass, T., ... Bernaudin, M. (2004). Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury. *NeuroRX*, 1(1), 26–35. <https://doi.org/10.1602/neurorx.1.1.26>

- Shen, H., & Maki, C. G. (2011). Pharmacologic activation of p53 by small-molecule MDM2 antagonists. *Current Pharmaceutical Design*, *17*(6), 560–568. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21391906>
- Shi, D., & Gu, W. (2012). Dual Roles of MDM2 in the Regulation of p53: Ubiquitination Dependent and Ubiquitination Independent Mechanisms of MDM2 Repression of p53 Activity. *Genes & Cancer*, *3*(3–4), 240. <https://doi.org/10.1177/1947601912455199>
- Shibata, M., Yamawaki, T., Sasaki, T., Hattori, H., Hamada, J., Fukuuchi, Y., ... Miura, M. (2002). Upregulation of Akt phosphorylation at the early stage of middle cerebral artery occlusion in mice. *Brain Research*, *942*(1–2), 1–10. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)02474-5](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)02474-5)
- Shvarts, A., Steegenga, W. T., Riteco, N., van Laar, T., Dekker, P., Bazuine, M., ... Jochemsen, A. G. (1996). MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. *The EMBO Journal*, *15*(19), 5349–5357. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=452278&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Sims, N. R., & Anderson, M. F. (2002). Mitochondrial contributions to tissue damage in stroke. *Neurochemistry International*, *40*(6), 511–526. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11850108>
- Singh, S. K., Qiao, Z., Song, L., Jani, V., Rice, W., Eng, E., ... Liu, W.-L. (2016). Structural visualization of the p53/RNA polymerase II assembly. *Genes & Development*, *30*(22), 2527–2537. <https://doi.org/10.1101/gad.285692.116>
- Smith, W. S., Sung, G., Saver, J., Budzik, R., Duckwiler, G., Liebeskind, D. S., ... Silverman, I. E. (2008). Mechanical Thrombectomy for Acute Ischemic Stroke. *Stroke*, *39*(4), 1205–1212. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.497115>
- Sofroniew, M. V. (2015). Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nature Reviews Neuroscience*, *16*(5), 249–263. <https://doi.org/10.1038/nrn3898>
- Song, R., Tian, K., Wang, W., & Wang, L. (2015). P53 suppresses cell proliferation, metastasis, and angiogenesis of osteosarcoma through inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway. *International Journal of Surgery*, *20*, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2015.04.050>
- Soriano, F. X., Papadia, S., Hofmann, F., Hardingham, N. R., Bading, H., & Hardingham, G. E. (2006). Preconditioning doses of NMDA promote neuroprotection by enhancing neuronal excitability. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *26*(17), 4509–4518. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0455-06.2006>
- Soussi, T., & Kroemer, G. (2018). MDM2-TP53 Crossregulation: An Underestimated Target to Promote Loss of TP53 Function and Cell Survival. *Trends in Cancer*, *4*(9), 602–605. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2018.07.001>
- Speidel, D., Helmbold, H., & Deppert, W. (2006). Dissection of transcriptional and non-transcriptional p53 activities in the response to genotoxic stress. *Oncogene*, *25*(6), 940–953. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209126>

- Steiger, H.-J., & Hänggi, D. (2007). Ischaemic preconditioning of the brain, mechanisms and applications. *Acta Neurochirurgica*, *149*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00701-006-1057-1>
- Stenzel-Poore, M. P., Stevens, S. L., King, J. S., & Simon, R. P. (2007). Preconditioning Reprograms the Response to Ischemic Injury and Primes the Emergence of Unique Endogenous Neuroprotective Phenotypes. *Stroke*, *38*(2), 680–685. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000251444.56487.4c>
- Stenzel-Poore, M. P., Stevens, S. L., Xiong, Z., Lessov, N. S., Harrington, C. A., Mori, M., ... Simon, R. P. (2003). Effect of ischaemic preconditioning on genomic response to cerebral ischaemia: Similarity to neuroprotective strategies in hibernation and hypoxia-tolerant states. *Lancet*, *362*(9389), 1028–1037.
- Stetler, R. A., Leak, R. K., Gan, Y., Li, P., Zhang, F., Hu, X., ... Gao, Y. (2014). Preconditioning provides neuroprotection in models of CNS disease: Paradigms and clinical significance. *Progress in Neurobiology*, *114*, 58–83. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.11.005>
- Stetler, R. A., Zhang, F., Liu, C., & Chen, J. (2008). Chapter 9 Ischemic tolerance as an active and intrinsic neuroprotective mechanism. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 92, pp. 171–195). [https://doi.org/10.1016/S0072-9752\(08\)01909-X](https://doi.org/10.1016/S0072-9752(08)01909-X)
- Stoica, B. A., & Faden, A. I. (2010). Cell death mechanisms and modulation in traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*, *7*(1), 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2009.10.023>
- Szybińska, A., & Leśniak, W. (2017). P53 Dysfunction in Neurodegenerative Diseases - The Cause or Effect of Pathological Changes? *Aging and Disease*, *8*(4), 506. <https://doi.org/10.14336/AD.2016.1120>
- Takahata, Y., & Shimoji, K. (1986). Brain injury improves survival of mice following brain ischemia. *Brain Research*, *381*(2), 368–371. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3756510>
- Takano, K., Latour, L. L., Formato, J. E., Carano, R. A. D., Helmer, K. G., Hasegawa, Y., ... Fisher, M. (1996). The role of spreading depression in focal ischemia evaluated by diffusion mapping. *Annals of Neurology*, *39*(3), 308–318. <https://doi.org/10.1002/ana.410390307>
- Tanaka, E., Niiyama, S., Sato, S., Yamada, A., & Higashi, H. (2003). Arachidonic Acid Metabolites Contribute to the Irreversible Depolarization Induced by In Vitro Ischemia. *Journal of Neurophysiology*, *90*(5), 3213–3223. <https://doi.org/10.1152/jn.00542.2003>
- Tanaka, T., Yamashita, K., & Watanabe, M. (2018). Potential therapeutic targets of TP53 gene in the context of its classically canonical functions and its latest non-canonical functions in human cancer. *Oncotarget*, *9*(22), 16234–16247. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24611>
- Tang, Y., Zhao, W., Chen, Y., Zhao, Y., & Gu, W. (2008). Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell*, *133*(4), 612–626. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.025>

- Tao, Y. X., & Zhao, Z. Q. (1998). NMDA receptors mediating Fos expression in rat spinal cord induced by subcutaneous injection of formalin. *Zhongguo Yao Li Xue Bao = Acta Pharmacologica Sinica*, 19(6), 506–509. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10437133>
- Tauskela, J. S., Comas, T., Hewitt, K., Monette, R., Paris, J., Hogan, M., & Morley, P. (2001). Cross-tolerance to otherwise lethal N-methyl-D-aspartate and oxygen-glucose deprivation in preconditioned cortical cultures. *Neuroscience*, 107(4), 571–584. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11720781>
- Taylor, R. C., Cullen, S. P., & Martin, S. J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(3), 231–241. <https://doi.org/10.1038/nrm2312>
- Tedeschi, A., & Di Giovanni, S. (2009). The non-apoptotic role of p53 in neuronal biology: enlightening the dark side of the moon. *EMBO Reports*, 10(6), 576–583. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.89>
- Teveroni, E., Lucà, R., Pellegrino, M., Ciolli, G., Pontecorvi, A., & Moretti, F. (2016). Peptides and peptidomimetics in the p53/MDM2/MDM4 circuitry - a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 26(12), 1417–1429. <https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1233179>
- Thomas, M., Kalita, A., Labrecque, S., Pim, D., Banks, L., & Matlashewski, G. (1999). Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Molecular and Cellular Biology*, 19(2), 1092–1100. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.2.1092>
- Toledo, F., & Wahl, G. M. (2006). Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nature Reviews Cancer*, 6(12), 909–923. <https://doi.org/10.1038/nrc2012>
- Tomasevic, G., Kamme, F., Stubberöd, P., Wieloch, M., & Wieloch, T. (1999). The tumor suppressor p53 and its response gene p21WAF1/Cip1 are not markers of neuronal death following transient global cerebral ischemia. *Neuroscience*, 90(3), 781–792. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10218779>
- Tournier-Lasserre, E. (2002). New Players in the Genetics of Stroke. *New England Journal of Medicine*, 347(21), 1711–1712. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr022035>
- Touzani, O., Roussel, S., & MacKenzie, E. T. (2001). The ischaemic penumbra. *Current Opinion in Neurology*, 14(1), 83–88. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11176222>
- Traylor, M., Farrall, M., Holliday, E. G., Sudlow, C., Hopewell, J. C., Cheng, Y.-C., ... International Stroke Genetics Consortium. (2012). Genetic risk factors for ischaemic stroke and its subtypes (the METASTROKE Collaboration): a meta-analysis of genome-wide association studies. *The Lancet Neurology*, 11(11), 951–962. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70234-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70234-X)
- Trendelenburg, G., & Dirnagl, U. (2005). Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia: focus on ischemic preconditioning. *Glia*, 50(4), 307–320. <https://doi.org/10.1002/glia.20204>

- Vara, J. Á. F., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., & González-Barón, M. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews*, *30*(2), 193–204. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2003.07.007>
- Vassilev, L. T. (2004). Small-Molecule Antagonists of p53-MDM2 Binding: Research Tools and Potential Therapeutics. *Cell Cycle*, *3*(4), 417–419. <https://doi.org/10.4161/cc.3.4.801>
- Vassilev, L. T., Vu, B. T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., ... Liu, E. A. (2004). In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2. *Science*, *303*(5659), 844–848. <https://doi.org/10.1126/science.1092472>
- Veas-Pérez de Tudela, M., Delgado-Esteban, M., Maestre, C., Bobo-Jiménez, V., Jiménez-Blasco, D., Vecino, R., ... Almeida, A. (2015). Regulation of Bcl-xL-ATP Synthase Interaction by Mitochondrial Cyclin B1-Cyclin-Dependent Kinase-1 Determines Neuronal Survival. *Journal of Neuroscience*, *35*(25), 9287–9301. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4712-14.2015>
- Veas-Pérez de Tudela, M., Maestre, C., Delgado-Esteban, M., Bolaños, J. P., & Almeida, A. (2015). Cdk5-mediated inhibition of APC/C-Cdh1 switches on the cyclin D1-Cdk4-pRb pathway causing aberrant S-phase entry of postmitotic neurons. *Scientific Reports*, *5*, 18180. <https://doi.org/10.1038/srep18180>
- Vicente-Gutierrez, C., Bonora, N., Bobo-Jimenez, V., Jimenez-Blasco, D., Lopez-Fabuel, I., Fernandez, E., ... Bolaños, J. P. (2019). Astrocytic mitochondrial ROS modulate brain metabolism and mouse behaviour. *Nature Metabolism*, *1*(2), 201–211. <https://doi.org/10.1038/s42255-018-0031-6>
- Vousden, K. H., & Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*, *137*(3), 413–431. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.037>
- Wang, D. B., Kinoshita, C., Kinoshita, Y., & Morrison, R. S. (2014a). Biochimica et Biophysica Acta p53 and mitochondrial function in neurons. *BBA - Molecular Basis of Disease*, *1842*(8), 1186–1197. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.12.015>
- Wang, D. B., Kinoshita, C., Kinoshita, Y., & Morrison, R. S. (2014b). p53 and mitochondrial function in neurons. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*.
- Wang, L., He, G., Zhang, P., Wang, X., Jiang, M., & Yu, L. (2011). Interplay between MDM2, MDMX, Pirh2 and COP1: the negative regulators of p53. *Molecular Biology Reports*, *38*(1), 229–236. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0099-x>
- WANG, Q., TANG, X., & YENARI, M. (2007). The inflammatory response in stroke. *Journal of Neuroimmunology*, *184*(1–2), 53–68. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.11.014>
- Wang, W.-W., Chen, D.-Z., Zhao, M., Yang, X.-F., & Gong, D.-R. (2017). Prior transient ischemic attacks may have a neuroprotective effect in patients with ischemic stroke. *Archives of Medical Science: AMS*, *13*(5), 1057–1061. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63744>
- Wang, Y., Reis, C., Applegate, R., II, Stier, G., Martin, R., & Zhang, J. H. (2015). Ischemic conditioning-induced endogenous brain protection: Applications pre-, per- or

- post-stroke. *Experimental Neurology*, 272, 26–40.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.04.009>
- Wee, K. B., & Aguda, B. D. (2006). Akt versus p53 in a Network of Oncogenes and Tumor Suppressor Genes Regulating Cell Survival and Death. *Biophysical Journal*, 91(3), 857–865. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.077693>
- Wee, K. B., Surana, U., & Aguda, B. D. (2009). Oscillations of the p53-Akt Network: Implications on Cell Survival and Death. *PLoS ONE*, 4(2), e4407. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004407>
- Wegener, S., Gottschalk, B., Jovanovic, V., Knab, R., Fiebach, J. B., Schellinger, P. D., ... MRI in Acute Stroke Study Group of the German Competence Network Stroke. (2004). Transient Ischemic Attacks Before Ischemic Stroke: Preconditioning the Human Brain? *Stroke*, 35(3), 616–621. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000115767.17923.6A>
- Weih, M., Kallenberg, K., Bergk, A., Dirnagl, U., Harms, L., Wernecke, K. D., & Einhäupl, K. M. (1999). Attenuated stroke severity after prodromal TIA: a role for ischemic tolerance in the brain? *Stroke*, 30(9), 1851–1854. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10471435>
- Weinstein, J. R., Schulze, J., Lee, R. V., Phillips, H., Zierath, D., Tanzi, P., ... Becker, K. J. (2014). Functional Polymorphisms in Toll-like Receptor 4 Are Associated With Worse Outcome in Acute Ischemic Stroke Patients. *Neuroreport*, 25(8), 580. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000140>
- White, B. C., Sullivan, J. M., DeGracia, D. J., O’Neil, B. J., Neumar, R. W., Grossman, L. I., ... Krause, G. S. (2000). Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *Journal of the Neurological Sciences*, 179(S 1-2), 1–33. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(00\)00386-5](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(00)00386-5)
- Whiteley, W., Chong, W. L., Sengupta, A., & Sandercock, P. (2009). Blood Markers for the Prognosis of Ischemic Stroke. *Stroke*, 40(5), e380–9. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.528752>
- Whitman, M., Kaplan, D. R., Schaffhausen, B., Cantley, L., & Roberts, T. M. (1985). Association of phosphatidylinositol kinase activity with polyoma middle-T competent for transformation. *Nature*, 315(6016), 239–242. <https://doi.org/10.1038/315239a0>
- Wityk, R. J., Pessin, M. S., Kaplan, R. F., & Caplan, L. R. (1994). Serial assessment of acute stroke using the NIH Stroke Scale. *Stroke*, 25(2), 362–365. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8303746>
- Wu, X., Bayle, J. H., Olson, D., & Levine, A. J. (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes & Development*, 7(7a), 1126–1132. <https://doi.org/10.1101/gad.7.7a.1126>
- Xiang, J., Andjelkovic, A. V., Zhou, N., Hua, Y., Xi, G., Wang, M. M., & Keep, R. F. (2018). Is there a central role for the cerebral endothelium and the vasculature in the brain response to conditioning stimuli? *Conditioning Medicine*, 1(5), 220–232. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30906928>

- Xie, R., Wang, P., Ji, X., & Zhao, H. (2013). Ischemic post-conditioning facilitates brain recovery after stroke by promoting Akt/mTOR activity in nude rats. *Journal of Neurochemistry*, *127*(5), 723–732. <https://doi.org/10.1111/jnc.12342>
- Xirodimas, D., Saville, M. K., Edling, C., Lane, D. P., & Laín, S. (2001). Different effects of p14ARF on the levels of ubiquitinated p53 and Mdm2 in vivo. *Oncogene*, *20*(36), 4972–4983. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204656>
- Xu, G.-P., Dave, K. R., Vivero, R., Schmidt-Kastner, R., Sick, T. J., & Pérez-Pinzón, M. A. (2002). Improvement in neuronal survival after ischemic preconditioning in hippocampal slice cultures. *Brain Research*, *952*(2), 153–158. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)02988-8](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)02988-8)
- Xu, H., Lu, A., & Sharp, F. R. (2011). Regional genome transcriptional response of adult mouse brain to hypoxia. *BMC Genomics*, *12*(1), 499. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-499>
- Yenari, M. A., Giffard, R. G., Sapolsky, R. M., & Steinberg, G. K. (1999). The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70). *Molecular Medicine Today*, *5*(12), 525–531. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10562718>
- Yonekura, I., Takai, K., Asai, A., Kawahara, N., & Kirino, T. (2006). p53 Potentiates Hippocampal Neuronal Death Caused by Global Ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *26*(10), 1332–1340. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600293>
- Yuan, C.-Q., Zhan, Y., Zhao, T.-J., Liu, H., Zhang, Y., & Ni, M.-N. (2009). A Death-Survival Switch in Cell: Cross Talk between Akt and p53. In *2009 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering* (pp. 1–4). <https://doi.org/10.1109/ICBBE.2009.5162164>
- Yuan, J., Lipinski, M., & Degtarev, A. (2003). Diversity in the Mechanisms of Neuronal Cell Death. *Neuron*, *40*(2), 401–413. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00601-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00601-9)
- YUNOKI, M., KANDA, T., SUZUKI, K., UNEDA, A., HIRASHITA, K., & YOSHINO, K. (2017). Ischemic Tolerance of the Brain and Spinal Cord: A Review. *Neurologia Medico-Chirurgica*, *57*(11), 590–600. <https://doi.org/10.2176/nmc.ra.2017-0062>
- Zhang, Y., Park, T. S., & Gidday, J. M. (2007). Hypoxic preconditioning protects human brain endothelium from ischemic apoptosis by Akt-dependent survivin activation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *292*(6), H2573–H2581. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01098.2006>
- Zhang, Z. G., & Chopp, M. (2009). Neurorestorative therapies for stroke: underlying mechanisms and translation to the clinic. *The Lancet Neurology*, *8*(5), 491–500. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70061-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70061-4)
- Zhang, Z., Xu, G., Zhu, W., Cao, L., Bai, W., Xiong, Y., ... Liu, X. (2014). Chromosome 12p13 variants predict recurrence of ischaemic stroke in a Chinese population. *European Journal of Neurology*, *21*(11), 1400–1405. <https://doi.org/10.1111/ene.12508>

- Zhao, H., Sapolsky, R. M., & Steinberg, G. K. (2006a). Interrupting Reperfusion as a Stroke Therapy: Ischemic Postconditioning Reduces Infarct Size after Focal Ischemia in Rats. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *26*(9), 1114–1121. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600348>
- Zhao, H., Sapolsky, R. M., & Steinberg, G. K. (2006b). Phosphoinositide-3-Kinase/Akt Survival Signal Pathways Are Implicated in Neuronal Survival After Stroke. *Molecular Neurobiology*, *34*(3), 249–270. <https://doi.org/10.1385/MN:34:3:249>
- Zhao, H., Shimohata, T., Wang, J. Q., Sun, G., Schaal, D. W., Sapolsky, R. M., & Steinberg, G. K. (2005). Akt Contributes to Neuroprotection by Hypothermia against Cerebral Ischemia in Rats. *Journal of Neuroscience*, *25*(42), 9794–9806. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3163-05.2005>
- Zhao, T., Zhang, X., Zhao, Y., Zhang, L., Bai, X., Zhang, J., ... Cui, L. (2014). Pretreatment by Evodiamine is Neuroprotective in Cerebral Ischemia: Up-Regulated pAkt, pGSK3 β , Down-Regulated NF- κ B Expression, and Ameliorated BBB Permeability. *Neurochemical Research*, *39*(8), 1612–1620. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1356-5>
- Zhao, W., Zhang, J., Sadowsky, M. G., Meng, R., Ding, Y., & Ji, X. (2018). Remote ischaemic conditioning for preventing and treating ischaemic stroke. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, *7*, CD012503. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012503.pub2>
- Zhao, Y., Aguilar, A., Bernard, D., & Wang, S. (2015). Small-Molecule Inhibitors of the MDM2–p53 Protein–Protein Interaction (MDM2 Inhibitors) in Clinical Trials for Cancer Treatment. *Journal of Medicinal Chemistry*, *58*(3), 1038–1052. <https://doi.org/10.1021/jm501092z>
- Zhou, A.-M., Li, W.-B., Li, Q.-J., Liu, H.-Q., Feng, R.-F., & Zhao, H.-G. (2004). A short cerebral ischemic preconditioning up-regulates adenosine receptors in the hippocampal CA1 region of rats. *Neuroscience Research*, *48*(4), 397–404. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2003.12.010>
- Zhou, B. P., Liao, Y., Xia, W., Zou, Y., Spohn, B., & Hung, M.-C. (2001). HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nature Cell Biology*, *3*(11), 973–982. <https://doi.org/10.1038/ncb1101-973>
- Zhu, F., Dolle, M. E. T., Berton, T. R., Kuiper, R. V., Capps, C., Espejo, A., ... Johnson, D. G. (2010). Mouse Models for the p53 R72P Polymorphism Mimic Human Phenotypes. *Cancer Research*, *70*(14), 5851–5859. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4646>
- Zilfou, J. T., & Lowe, S. W. (2009). Tumor Suppressive Functions of p53. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *1*(5), a001883--a001883. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001883>




ibfg

Robert Kerner