

NUEVOS DETERMINANTES MOLECULARES EN LA RESPUESTA A ISQUEMIA CEREBRAL

M. Carme Gubern Mérida

Per citar o enllaçar aquest document:

Para citar o enlazar este documento:

Use this url to cite or link to this publication:

<http://hdl.handle.net/10803/362102>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

TESIS DOCTORAL

**NUEVOS DETERMINANTES MOLECULARES EN LA
RESPUESTA A ISQUEMIA CEREBRAL**

M^a Carme Gubern Mérida

2015



TESIS DOCTORAL

**NUEVOS DETERMINANTES MOLECULARES EN LA
RESPUESTA A ISQUEMIA CEREBRAL**

M^a Carme Gubern Mérida

2015

Ciències Experimentals i Sostenibilitat

Dirigida por: Dra. Judith Mallolas Jiménez y Dra. M^a del Mar Castellanos Rodrigo

Tutor: Dra. Teresa Puig Miquel

Memoria presentada para optar al título de Doctora por la Universitat de Girona



Judith Mallolas Jiménez, Doctora en Farmàcia i **M^a del Mar Castellanos Rodrigo**, Doctora en Medicina i Investigadora Principal del Grup d'Investigació en Patologia Cerebrovascular de l'Institut de Recerca Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta (IdIBGi)

Declaren que,

La **M^a Carme Gubern Mérida** ha realitzat sota la seva direcció i supervisió el treball de recerca titulat "**Nuevos determinantes moleculares en la respuesta a isquemia cerebral**". És la seva intenció presentar-lo com a treball de tesi i així optar al Títol de Doctora per la Universitat de Girona (UdG). Per la dedicació, rigor i serietat del mateix pot àmpliament ser defensat per aquest fi. Els sotasignants volen informar que han dirigit i supervisat personalment els experiments i el treball reflectits en el mateix. Consideren que aquest treball de recerca té els requisits de qualitat necessaris per ser presentat i defensat com a treball de tesi.

Per a què així consti, firmem el present certificat a Girona, dia 17 de Juliol de 2015.

Dra. Judith Mallolas Jiménez

Dra. M^a del Mar Castellanos Rodrigo

A en Jordi, a la Núria i als meus pares.

Papa, allà on siguis sé que t'en sentiràs orgullós.

El moment de conquerir el cim no seria ni la meitat de precios si no hi hagués valls fosques per travessar.

Hellen Keller.

Agradecimientos

Este trabajo se ha desarrollado en el laboratorio del *Institut d'Investigació Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta* (IdIBGi) dentro del Grupo de Investigación en Patología Cerebrovascular. Los modelos experimentales *in vivo* y parte de los experimentos *in vitro* se han llevado a cabo en el laboratorio de la Unidad de Investigación Neurovascular (UIN) de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) dirigida por los Dres. Ignacio Lizasoain y María Ángeles Moro. Esta colaboración ha sido crucial para el aprendizaje de los modelos experimentales de isquemia *in vivo* e *in vitro* y la obtención de las muestras cerebrales de rata. Ambos grupos forman parte de la Red de Investigación Cooperativa de Enfermedades Vasculares Cerebrales (INVICTUS) (RD07/0026/2002 y RD06/0026/0005).

El trabajo realizado en la presente tesis doctoral se ha financiado principalmente a través de las ayudas concedidas en los proyectos de investigación PROFIT (CIT 090100-2005-15, CIT 090100-2007-43 y CIT 090000-2008-11), del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) y del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), y el proyecto FIS (PI070322), del MINECO y del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). Asimismo, parte de la financiación se ha llevado a cabo mediante fondos privados del Grupo de Investigación en Patología Cerebrovascular del IdIBGi y en menor medida ha corrido a cargo de los proyectos colaborativos financiados por el Centro de Innovación y Desarrollo Empresarial (CIDEM) de la *Generalitat de Catalunya* (RDITSCON07-1-0006) y de la Red INVICTUS. Por su parte, la Red INVICTUS junto con la Beca BE para estancias fuera de Catalunya 2007BE-100293 concedida por la *Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca* (AGAUR) de la *Generalitat de Catalunya* también han financiado parcialmente las estancias en el laboratorio de la UIN de la UCM.



AGRAÏMENTS

Tesi acabada!...i et passen pel cap molts moments viscuts i persones amb les que has compartit aquesta etapa de la teva vida per les que segur em quedo curta de paraules per agrair el seu grà de sorra per tirar endavant la tesi doctoral que teniu entre mans.

En primer lloc, vull agrair a les meves directores, la Dra. Judith Mallolas i la Dra. Mar Castellanos, així com al Dr. Joaquín Serena, que m'obrissin les portes del grup de patologia cerebrovascular. Gràcies per confiar en mi i per tot l'ajut i suport que m'heu donat durant aquests anys en els que he crescut científicament però també com a persona.

A les meves companyes de grup i sobretot amigues, Rocío i Susanna, m'heu ajudat moltíssim i hem compartit moltes coses, espero seguir tenint-vos a prop sempre.

A la Dra. M^a Angeles Moro y al Dr. Ignacio Lizasoain, así como a todos los compañeros de la unidad de investigación neurovascular (UIN) de la UCM (en especial a Olivia, Víctor, Roberto, Iván, Isaac y Mónica), les agradezco mucho la buena acogida en su laboratorio, el soporte, los buenos consejos y los ánimos para seguir adelante.

A tots els companys i companyes de laboratori de l'IDIBGI, als que continuem treballant junts i als que heu agafat nous camins, moltes gràcies per estar sempre disposats a donar un cop de mà i molt més.

A tot el personal d'administració i de suport a la recerca de l'IDIBGI i a l'Esther de la biblioteca, per tot l'ajut sempre que ho he necessitat.

Gràcies a tots els amics (saltencs, gironins, banyolins, universitaris...) per la vostra amistat, suport i per totes les estones viscudes que t'ajuden a desconnectar de la feina.

A tota la meva família que està sempre al meu costat i em fa sentir molt estimada, en especial:

A mis titos madrileños (Juan y Chari), por cuidarme y hacerme sentir como en casa en mis temporadas en Madrid. Muchísimas gracias por todo (me debéis una visita!).

Als meus sogres (Joaquim i Teresa), cunyats (Lluís i Geno) i nebots (Marçal i Genís), per cuidar-me, interessar-se per mi i recolzar-me sempre. Moltes gràcies Geno per estar sempre disponible, per escoltar-me i pels teus bons consells.

Al meu germà (Albert) i cunyada (Dymphie) (i en Nino que no falti!) per ser-hi sempre tot i la distància. Albert, ho saps, ets el meu gran germà petit, un orgull per mi, per la teva empena i desimboltura.

Als meus pares (Pere i Rosario), per donar-m'ho tot, creure en mi i empenya'm endavant en la vida. Sou un exemple a seguir. Papa, tot i que no podem compartir aquest i molts altres moments importants que malauradament t'has perdut et continuo sentint ben a prop. Mama, gracias por conocerme tanto y estar siempre a mi lado, por tu fuerza y por tirar siempre del carro. Eres una gran mujer.

Per últim, al meu company (Jordi) i a la nostra petita (Núria). A tu Jordi, gràcies per compartir la vida amb mi, per ser com ets, per fer-me sentir especial i donar-me sempre aquella empeneta que em feia falta per tirar endavant.... I a tu Núria, per la teva alegria i energia que s'encomana, amb qui aprenc i creixo cada dia, ets el meu tresor!

MOLTÍSSIMES GRÀCIES A TOTS!

Publicaciones derivadas de esta tesis:

Gubern C, Hurtado O, Rodríguez R, Morales JR, Romera VG, Moro MA, Lizasoain I, Serena J, Mallolas J. Validation of housekeeping genes for quantitative real-time PCR in in-vivo and in-vitro models of cerebral ischaemia. *BMC Mol Biol.* 2009;10:57. FI: 2.848. Q2 Bioquímica y Biología Molecular.

Gubern C, Camós S, Hurtado O, Rodríguez R, Romera VG, Sobrado M, Cañadas R, Moro MA, Lizasoain I, Serena J, Mallolas J, CastellanosM. Characterisation of Gcf2/Lrrfip1 in experimental cerebral ischaemia and its role as a modulator of Akt, mTOR and β -catenin signalling pathways. *Neuroscience.* 2014;268C:48-65. FI (2013): 3.327. Q2 Neurociencias.

Gubern C, Camós S, Ballesteros I, Rodríguez R, Romera VG, Cañadas R, Lizasoain I, Moro MA, Serena J, Mallolas J, Castellanos M. miRNA expression is modulated over time after focal ischaemia: up-regulation of miR-347 promotes neuronal apoptosis. *FEBS J.* 2013;280(23):6233-46. FI: 3.986. Q2 Bioquímica y Biología Molecular.

Estas publicaciones se han adjuntado en el Anexo I.

Lista de abreviaturas

18S	<i>Eukaryotic 18SrRNA</i>
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Micromolar
°C	Grados centígrados
%	Por ciento
-Ctrl	Control negativo
A	Adenina
ACC	Arteria carótida común
ACM	Arteria cerebral media
Acs14	<i>Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4</i>
Ago	<i>Argonaute</i>
AIT	Ataque isquémico transitorio
Arf3	<i>ADP-ribosylation factor 3</i>
ATP	Adenosina trifosfato
β2m	<i>β-2-microglobulin</i>
Bcl2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
BHE	Barrera hematoencefálica
Bnip3l	<i>BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3-like</i>
BSA	Albúmina sérica bovina
Btg2	<i>BTG family, member 2</i>
C	Citosina
Ca²⁺	Calcio
CaCl₂	Cloruro Cálcico
cDNA	DNA complementario (<i>complementary DNA</i>)

c-Fos	<i>Finkel-Biskis-Jinkins (FBJ) murine osteosarcoma viral oncogene</i>
c-Jun	<i>Jun proto-oncogene</i>
cm²	Centímetro cuadrado
CN	Control negativo
Cox-2	<i>Cyclooxygenase-2</i>
C_T	Ciclo umbral (<i>cycle threshold</i>)
CTRL	Control
ddH₂O	Agua bidestilada
dH₂O	Agua destilada
DIV	Día in vitro
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
DpysI5	<i>Dihydropyrimidinase-like 5</i>
Dvl	<i>Dishevelled</i>
Dvl3	<i>Dishevelled Segment Polarity Protein 3</i>
E	Día embrionario
EAAT2	<i>Excitatory amino acid transporter 2</i>
EEM	Error estándar de la media
FBS	Suero bovino fetal (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
Flap-1	<i>Fli-1 leucine-rich repeat associated protein 1</i>
Fli-1	<i>Flightless-1</i>
FSC	Flujo sanguíneo cerebral
FT	Factor de transcripción
G	Guanina
Gapdh	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>

GCF2	<i>GC-binding factor 2</i>
GET	Genes de expresión temprana
GLT-1	<i>Glutamate transporter 1</i>
Gusb	<i>Glucuronidase, beta</i>
HIF-1	<i>Hypoxia Inducible Factor 1</i>
Hprt	<i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>
HSP	Proteínas de choque térmico (<i>heat shock proteins</i>)
IL-1β	<i>Interleukin-1 beta</i>
IP	Ioduro de propidio
Kb	Kilobase
KCl	Cloruro potásico
kDa	Kilodalton
l	Litro
LDH	Lactato deshidrogenasa
LRR	<i>Leucine rich repeat</i>
LRRFIP1	<i>Leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1</i>
MFI	Intensidad media de fluorescencia (<i>Mean fluorescence intensity</i>)
Mg²⁺	Magnesio
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
min	minuto/minutos
miRISC	miRNA <i>RNA-induced silencing complex</i>
miRNAs	microRNAs
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i>
mRNA	RNA mensajero (<i>messenger RNA</i>)

MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide</i>
Myd88	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>
NaCl	Cloruro sódico
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor κB</i>
NLS	Señal de localización nuclear (<i>Nuclear Localization Signal</i>)
nM	Nanomolar
Oaz1	<i>Ornithine decarboxylase antienzyme 1</i>
OMS	Organización mundial de la salud
P	Día postnatal
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PDZ	Acrónimo que combina las primeras letras de tres proteínas - proteína de densidad postsináptica (PSD95), una proteína supresora de tumores en <i>Drosophila</i> (DlgA), y la proteína zonula occludens-1 (ZO-1) - que fueron en las primeras en las cuales se descubrió el dominio PDZ
PFA	Paraformaldehído
Phyhip	<i>Phytanoyl-CoA 2-hydroxylase interacting protein</i>
pMCAO	Oclusión permanente de la arteria cerebral media (<i>Permanent middle cerebral artery occlusion</i>)
POG	Privación de oxígeno y glucosa
Ppia	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerasa</i>
PVDF	Polifloruro de vinilideno
qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>

RNA	Ácido ribonucleico (<i>ribonucleic acid</i>)
Rpl13a	<i>Ribosomal Protein L13A</i>
rpm	Revoluciones por minuto
rt-PA	Activador tisular del plasminógeno recombinante (<i>Recombinant Tissue Plasminogen Activator</i>)
Sdha	<i>Succinate dehydrogenase complex, subunit A</i>
siCTRL	siRNAs control
siLrrfip1	siRNAs contra Lrrfip1
SNC	Sistema nervioso central
T	Timina
Ta	Temperatura de <i>annealing</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TNFα	<i>Tumour Necrosis Factor alpha</i>
t-PA	Activador tisular del plasminógeno (<i>Tissue Plasminogen Activator</i>)
TRIP	<i>TAR RNA interacting protein</i>
tRNA	RNA total
UNV	Unidad neurovascular
UV	Ultravioleta
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
Ywhaz	<i>Tyrosine 3-monooxygenase</i>

Índice de figuras

Figura 1.1. Territorios vasculares cerebrales.	13
Figura 1.2. Clasificación de la enfermedad cerebrovascular según su etiología.	13
Figura 1.3. Diferentes áreas de flujo sanguíneo en la isquemia cerebral.	16
Figura 1.4. Componentes de la unidad neurovascular.	17
Figura 1.5. Mecanismos nocivos y protectores desencadenados por la isquemia cerebral.	18
Figura 1.6. Representación esquemática de las interacciones multicelulares que median el daño y la reparación en la unidad neurovascular.	18
Figura 1.7. Representación de las cinco ondas temporales de expresión génica.	25
Figura 1.8. Localización celular de los EAATs.	29
Figura 1.9. Análisis de la funcionalidad del polimorfismo -181A/C en el promotor de EAAT2 y análisis de la expresión de Gcf2/Lrrfp1 en cerebro isquémico.	31
Figura 1.10. Biogénesis y mecanismo de acción de los miRNAs.	38
Figura 4.1. Arteria carótida común aislada para su oclusión.	60
Figura 4.2. Procedimiento quirúrgico de la pMCAO hasta la cauterización de la ACM.	61
Figura 4.3. Representación de los estudios realizados tras la isquemia experimental <i>in vivo</i> .	62
Figura 4.4. Imagen de la cámara de anoxia introducida en la estufa para mantener el cultivo a 37°C durante la POG.	63
Figura 4.5. Representación de los estudios realizados tras la isquemia experimental <i>in vitro</i> .	64

Figura 4.6. Representación de los experimentos de silenciamiento mediante siRNAs en cultivo primario de astrocitos.	68
Figura 4.7. Representación de los experimentos de sobreexpresión de los miRNAs miR-347 y miR-21 en cultivo primario de neuronas corticales.	71
Figura 4.8. Esquema de trabajo del ensayo FlexmiR.	86
Figura 4.9. Curva de amplificación de la qPCR.	90
Figura 4.10. Esquema de la preparación del sándwich para la transferencia del <i>western blot</i> .	98
Figura 5A.1. Efecto de la POG en astrocitos sobre la expresión de los controles endógenos (A) <i>Gapdh</i> , (B) <i>Hprt</i> , (C) <i>Ppia</i> , (D) <i>18SrRNA</i> , (E) $\beta 2m$, (F) <i>Oaz1</i> , (G) <i>Gusb</i> , (H) <i>Ywhaz</i> , (I) <i>Sdha</i> y (J) <i>Rpl13a</i> .	116
Figura 5A.2. Efecto de la pMCAO sobre la expresión de los controles endógenos (A) $\beta 2m$, (B) <i>Rpl13a</i> , (C) <i>Oaz1</i> , (D) <i>Ppia</i> , (E) <i>Gusb</i> , (F) <i>18SrRNA</i> , (G) <i>Gapdh</i> , (H) <i>Sdha</i> , (I) <i>Hprt</i> e (J) <i>Ywhaz</i> .	118
Figure 5A.3. Estabilidad de la expresión génica y determinación del número óptimo de los controles endógenos validados para el modelo de isquemia <i>in vivo</i> mediante el análisis con geNorm.	119
Figura 5A.4. Efecto de la pMCAO sobre la expresión de los controles endógenos (A) <i>Sdha</i> e (B) <i>Ywhaz</i> .	120
Figura 5A.5. Efecto del control endógeno utilizado sobre la expresión de los genes <i>Bcl2</i> y <i>Cox-2</i> después de la pMCAO.	122
Figura 5B.1. Gen <i>Lrrfip1</i> y transcritos putativos.	127
Figura 5B.2. Expresión de los transcritos de <i>Lrrfip1</i> en corteza cerebral control (C) y 24 horas después de la pMCAO (24H) detectadas mediante PCR convencional.	131

- Figura 5B.3.** Representación esquemática de los distintos dominios descritos en las isoformas 3, 4 y 5 humanas y 2 de ratón de *Lrrfip1* y su presencia o ausencia en las isoformas identificadas de rata (*Lrrfip1*, *CRA_g*, *CRA_h*, *CRA_i*, *CRA_a*). **135**
- Figura 5B.4.** Mapas de expresión génica (hibridación in situ (ISH)) en cerebro de ratón, plano sagital, de los transcritos ortólogos identificados en cerebro de rata *rLrrfip1* y *rFlap-1-CRA_g*. **136**
- Figura 5B.5.** Patrón de expresión de los transcritos de *Lrrfip1* de rata (*rLrrfip1* (NM_001014269); *CRA_g* y *rFlap-1*) y de la proteína de referencia *rLrrfip1* en corteza cerebral de ratas control y a los 30 minutos, 2, 6, 24, 72 horas, 7 y 14 días después de la pMCAO. **138**
- Figura 5B.6.** Localización celular de *rLrrfip1* en cerebro de rata tras isquemia focal. **140**
- Figura 5B.7.** Expresión de los transcritos de *Lrrfip1* en astrocitos corticales de rata en condiciones control (C) y 24 horas después de la POG (24H) detectados mediante PCR convencional. **141**
- Figura 5B.8.** Expresión de los transcritos de *Lrrfip1* y expresión y localización subcelular de la proteína *rLrrfip1* de referencia (NP_001014291) en astrocitos de rata control y a distintos tiempos después de la POG. **142**
- Figura 5B.9.** Determinación de las condiciones óptimas de transfección de siRNAs en cultivo primario de astrocitos corticales de rata mediante MTT (A y B), qPCR (C) y *western blot* (D). **143**
- Figura 5B.10.** Identificación de los controles endógenos válidos para los experimentos de silenciamiento génico mediante siRNAs. **144**

Figura 5B.11. Análisis de la expresión mediante *western blot* de (A) rLrrfip1, (B-D) porcentaje de las formas fosforiladas de β -catenina (Ser552), Akt (Ser473) y mTOR (Ser2448) respecto a la proteína total y (E) GLT-1 en astrocitos transfectados con siRNAs control (siCTRL) y siRNAs contra Lrrfip1 (siLrrfip1), 6 días después de la transfección. También se analizó (F) la expresión del mRNA de GLT-1 y (G) la recaptación de glutamato.

145

Figura 5C.1. Identificación de miRNAs controles endógenos y validación de perfiles de expresión de miRNAs mediante qPCR.

152

Figura 5C.2. La expresión de las dianas predichas *Acs14*, *Arf3*, *Btg2* y *Dpysl5* está regulada de forma diferencial tras la isquemia focal en corteza cerebral de rata.

167

Figura 5C.3. Determinación de las condiciones óptimas de transfección de mimetizadores de miRNAs en cultivo primario de neuronas corticales de rata mediante MTT (A y B) y *western blot* (C).

169

Figura 5C.4. El aumento de expresión del miR-347 induce el aumento de la expresión de *Acs14*, *Bnip3l* y *Phyhip*, así como de apoptosis neuronal.

171

Figura 5C.5. 4.5SRNA y Y1 son miRNAs de referencia adecuados para la cuantificación relativa de miRNAs en neuronas corticales transfectadas con mimetizadores de miRNAs.

172

Figura 5C.6. *Sdha* e *Ywhaz* son los genes de referencia adecuados para la cuantificación relativa de la expresión génica en neuronas corticales transfectadas con mimetizadores de miRNAs.

173

Figura 5C.7. La privación de suero (PS) induce la disminución de la expresión de *Acs14* y *Bnip3l*.

174

Figura 5C.8. *Sdha* e *Ywhaz* son genes de referencia idóneos para la cuantificación relativa de la expresión génica en neuronas corticales privadas de suero (PS).

174

Índice de tablas

Tabla 1.1. Factores de riesgo de enfermedad cerebrovascular.	11
Tabla 1.2. Genes validados como controles endógenos en modelos de isquemia cerebral <i>in vivo</i> y posibles nuevos candidatos para este modelo y el modelo de isquemia experimental <i>in vitro</i> .	36
Tabla 4.1. <i>Primers</i> utilizados para la identificación mediante PCR de los transcritos de <i>Lrrfip1</i> expresados en cerebro de rata. Secuencias de los <i>primers</i> y amplicones esperados.	78
Tabla 4.2. Secuencias de los <i>primers</i> y las sondas de los <i>Custom TaqMan® Assays</i> diseñados.	91
Tabla 4.3. <i>TaqMan® Gene Expression Assays</i> utilizados para los análisis de expresión génica mediante qPCR.	91
Tabla 4.4. <i>TaqMan® MicroRNA Assays</i> utilizados para los análisis de expresión de miRNAs mediante qPCR.	92
Tabla 4.5. Composición gel apilador y geles separadores de western blot.	97
Tabla 4.6. Anticuerpos primarios y diluciones utilizadas para el análisis de proteínas mediante <i>western blot</i> .	100
Tabla 5A.1. Valores de estabilidad de los controles endógenos validados obtenidos con NormFinder.	120
Tabla 5A.2. Validación de controles endógenos en el modelo pMCAO en distintos trabajos publicados.	121
Tabla 5B.1. Transcritos putativos de <i>Lrrfip1</i> recogidos en NCBI y Ensembl.	126
Tabla 5B.2. Identificación de transcritos de <i>Lrrfip1</i> expresados en corteza cerebral de rata. Productos de amplificación esperados y detectados mediante PCR (Tabla 4.1).	129

- Tabla 5B.3.** Información del cDNA y proteína de los transcritos de *Lrrfip1* identificados. Homología de la secuencia de aminoácidos de las nuevas isoformas de rata respecto a la proteína de referencia NP_001014291 (*Lrrfip1*). **133**
- Tabla 5B.4.** Homología de la secuencia de aminoácidos entre las nuevas isoformas de rata detectadas. **133**
- Tabla 5B.5.** Conservación de los dominios y características descritas en las isoformas *Lrrfip1* humanas y de ratón en las isoformas identificadas en cerebro de rata. Homología de las isoformas de rata respecto a las isoformas *Lrrfip1* humanas y de ratón descritas en NCBI. Los valores de homología $\geq 80\%$ están marcados en negrita. Las isoformas humanas y de ratón no descritas en la literatura están marcadas en gris. Las isoformas de ratón y humanas que podrían corresponder a alguna de las isoformas de rata de acuerdo al grado de homología, número de aminoácidos y estructura exónica están subrayadas. **134**
- Tabla 5C.1.** Resultados del ensayo multiplex FlexmiR. miRNAs con cambios significativos de expresión tras la pMCAO. Los miRNAs se han agrupado según si su expresión aumenta, disminuye o presenta un perfil de expresión bifásico en la fase isquémica analizada en relación al tejido control. **150**
- Tabla 5C.2.** miRNAs expresados en corteza cerebral sin cambios de expresión tras pMCAO. Los miRNAs están ordenados de mayor a menor expresión en cerebro control (columna log2 control). **151**
- Tabla 5C.3.** Dianas predichas y validadas de los miRNAs diferencialmente expresados en la isquemia cerebral previamente descritas por presentar alteración en cerebro post-isquémico o por participar en procesos cerebrales fisiológicos o patológicos. **154**

Tabla 5C.4. Clasificación de las cuarenta y siete dianas predichas recogidas en la Tabla 5C.3 según sus funciones (ver referencias en Tabla 5C.3). Veinticinco dianas han sido previamente relacionadas con isquemia o daño cerebral y veintidós tienen roles conocidos en procesos fisiopatológicos cerebrales pero no han sido asociadas a isquemia cerebral.

165

ÍNDICE

Agradecimientos	i
Publicaciones derivadas de esta tesis	v
Lista de abreviaturas	vii
Índice de figuras	xiii
Índice de tablas	xvii
Resum	1
Resumen	3
Summary	5
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. LA ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR	9
1.1.1. Definición	9
1.1.2. Epidemiología	9
1.1.3. Factores de riesgo	10
1.1.4. Clasificación	11
1.1.5. Tratamiento del ictus isquémico en fase aguda	14
1.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL	15
1.2.1. Mecanismos de daño celular y tisular	19
1.2.1.1. Desequilibrio iónico y excitotoxicidad	19
1.2.1.2. Estrés oxidativo y nitrosativo	19
1.2.1.3. Despolarizaciones peri-infarto	20
1.2.1.4. Inflamación	20
1.2.1.5. Necrosis y apoptosis	21
1.2.1.6. Disrupción de la BHE	22
1.2.1.7. Infiltración de leucocitos	22
1.2.2. Mecanismos de reparación	22
1.2.3. Expresión génica	23
1.3. MODELOS EXPERIMENTALES DE ISQUEMIA CEREBRAL	26
1.3.1. Modelos de isquemia cerebral focal <i>in vivo</i>	26
1.3.2. Modelos de isquemia cerebral <i>in vitro</i>	27

1.4. EXCITOTOXICIDAD Y GLT-1/EAAT2: GCF2/LRRFIP1 NUEVA PROTEÍNA DE INTERÉS	28
1.4.1. <i>Gcf2/Lrrfip1</i>	31
1.5. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA	33
1.5.1. Controles endógenos en modelos experimentales de isquemia cerebral	35
1.6. MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	36
1.6.1. miRNAs	37
1.6.1.1. miRNAs en el ictus y en la isquemia cerebral experimental	38
2. HIPÓTESIS	41
3. OBJETIVOS	45
4. METODOLOGÍA	49
4.1 HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS	51
4.1.1. Pubmed	51
4.1.2. Ensembl/NCBI	51
4.1.3. Primer 3	51
4.1.4. BLAST (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)	52
4.1.5. <i>Translate and Compute pl/Mw tools</i>	52
4.1.6. ClustalW2	52
4.1.7. <i>Allen Mouse Brain Atlas</i>	53
4.1.8. geNorm y NormFinder	53
4.1.9. microRNA.org (<i>miRanda-mirSVR algorithms</i>) y miRecords	53
4.1.10. <i>Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software</i>	54
4.2 CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS CORTICALES DE RATA	54
4.2.1 Obtención y procesamiento de las cortezas cerebrales	54
4.2.2 Obtención de cultivo primario de neuronas corticales	56
4.2.3 Obtención de cultivo primario de astrocitos corticales	57
4.3 MODELOS EXPERIMENTALES	59
4.3.1 Isquemia experimental <i>in vivo</i>	59
4.3.1.1 Modelo de isquemia cerebral focal: oclusión permanente de la arteria cerebral media (pMCAO, <i>permanent middle cerebral artery occlusion</i>)	59

4.3.1.2	Grupos experimentales y recogida de muestras	61
4.3.2	Isquemia experimental <i>in vitro</i>	62
4.3.2.1	Privación de oxígeno y glucosa (POG) en astrocitos corticales de rata	62
4.3.2.2	Grupos experimentales y recogida de muestras	64
4.3.3	Modelo <i>in vitro</i> de apoptosis: privación de suero	65
4.4	ESTUDIOS FUNCIONALES	65
4.4.1	Transfección de siRNAs en cultivo primario de astrocitos corticales de rata	66
4.4.1.1	siRNAs y reactivo de transfección	66
4.4.1.2	Optimización de las condiciones de transfección en astrocitos	66
4.4.1.3	Transfección de siRNAs contra Gcf2/Lrrfip1 en astrocitos	67
4.4.2	Transfección de mimetizadores de miRNAs en cultivo primario de neuronas corticales de rata	69
4.4.2.1	Mimetizadores miRNAs y reactivo de transfección	69
4.4.2.2	Optimización de las condiciones de transfección en neuronas	69
4.4.2.3	Transfección de mimetizadores de los miRNAs miR-347 y miR-21 en neuronas	70
4.5	PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DEL RNA	72
4.5.1	Protocolo de recogida de muestras, extracción y cuantificación de RNA	73
4.5.2	Identificación de los transcritos de <i>Lrrfip1</i> expresados en corteza cerebral de rata mediante PCR y secuenciación	75
4.5.2.1	Retrotranscripción de RNA total (tRNA) y mRNA	75
4.5.2.2	Reacción en cadena de la polimerasa estándar (PCR)	76
4.5.2.2.1	Selección de <i>primers</i>	77
4.5.2.2.2	Visualización en gel de agarosa	81
4.5.2.3	Secuenciación automática	82
4.5.3	Determinación del perfil de expresión de los miRNAs: Ensayo FlexmiR	84
4.5.4	Análisis de la expresión de los miRNAs y dianas seleccionadas y de los transcritos de <i>Lrrfip1</i> identificados	87
4.5.4.1	Retrotranscripción de miRNAs	87
4.5.4.2	Cuantificación relativa de la expresión génica	88
4.5.4.2.1	PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)	89

4.5.4.2.2	Validación de controles endógenos: Método $2^{-\Delta C_T}$	93
4.6	PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE PROTEÍNA	94
4.6.1	Protocolo de recogida de muestras, extracción y cuantificación de proteína	94
4.6.2	<i>Western blot</i>	95
4.6.3	Inmunofluorescencia	100
4.6.3.1	Inmunohistofluorescencia	101
4.6.3.2	Inmunocitofluorescencia	103
4.7	ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD CELULAR	104
4.7.1	Ensayo de bromuro de 3-(4,5-Dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)	104
4.7.2	Ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH)	105
4.7.3	Anexina V/Ioduro de propidio (IP)	106
4.8	RECAPTACIÓN DE GLUTAMATO TRITIADO ($[^3\text{H}]$ GLUTAMATO)	107
4.9	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	108
5.	RESULTADOS	109
5A.	Objetivo1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LA ISQUEMIA CEREBRAL: CONTROLES ENDÓGENOS EN LOS MODELOS DE ISQUEMIA EXPERIMENTAL	113
5A.1	IDENTIFICACIÓN DE CONTROLES ENDÓGENOS ÓPTIMOS PARA EL MODELO DE ISQUEMIA <i>IN VITRO</i>	115
5A.2	IDENTIFICACIÓN DE CONTROLES ENDÓGENOS ÓPTIMOS PARA EL MODELO DE ISQUEMIA <i>IN VIVO</i>	117
5B.	Objetivo 2. CARACTERIZACIÓN DE <i>GCF2/LRRFIP1</i> EN CEREBRO Y EN ISQUEMIA EXPERIMENTAL	123
5B.1	CARACTERIZACIÓN DE <i>LRRFIP1</i> EN CEREBRO DE RATA	125
5B.1.1	Predicción <i>in silico</i> de nuevas variantes transcripcionales de <i>Lrrfip1</i> de rata	125
5B.1.2	Expresión de transcritos de <i>Lrrfip1</i> en corteza cerebral de rata	128
5B.1.3	Caracterización de las isoformas de <i>Lrrfip1</i> expresadas en corteza cerebral de rata	132
5B.1.4	Expresión y distribución espacial de los transcritos ortólogos a rLrrfip1, rFlap-1 y CRA_g en el cerebro de ratón	135
5B.2	EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE <i>LRRFIP1</i> TRAS LA ISQUEMIA CEREBRAL	137

5B.2.1	Perfiles de expresión de los transcritos rLrrfp1, CRA_g y rFlap-1, y de la isoforma rLrrfp1 tras isquemia focal	137
5B.2.2	Expresión y localización celular de la isoforma rLrrfp1 en corteza cerebral después de pMCAO	139
5B.2.3	Perfiles de expresión de los transcritos rLrrfp1, CRA_g y rFlap-1, expresión y localización subcelular de la isoforma rLrrfp1 en astrocitos sometidos a POG	140
5B.3	IDENTIFICACIÓN DE DIANAS Y ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN DE rLRRFIP1 MEDIANTE TÉCNICAS DE SILENCIACIÓN <i>IN VITRO</i>	142
5B.3.1	Determinación de las condiciones óptimas de transfección de siRNAs en astrocitos corticales	142
5B.3.2	Efecto de la silenciación de rLrrfp1 sobre la expresión de p- β -catenin (Ser552), p-Akt (Ser473), p-mTOR (Ser2448) y GLT-1 y sobre la recaptación de glutamato en astrocitos	144
5C.	Objetivo 3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LA ISQUEMIA CEREBRAL: EXPRESIÓN TEMPORAL DE LOS miRNAs Y DE SUS mRNA DIANA TRAS LA ISQUEMIA EXPERIMENTAL	147
5C.1	IDENTIFICACIÓN DE miRNAs DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS TRAS LA ISQUEMIA CEREBRAL, PREDICCIÓN Y ANÁLISIS DE SUS mRNA DIANA PARA SU VALIDACIÓN	149
5C.1.1	Perfiles de expresión de los miRNAs en corteza cerebral de rata tras isquemia focal mediante ensayo multiplex FlexmiR	149
5C.1.2	Selección de controles endógenos y validación de perfiles de expresión de miRNAs mediante qPCR	149
5C.1.3	Predicción de mRNAs diana de los miRNAs diferencialmente expresados en la isquemia cerebral y análisis de función de dichas dianas	152
5C.1.4	Análisis de la expresión de las dianas de miRNAs seleccionadas, <i>Acs14</i> , <i>Arf3</i> , <i>Btg2</i> y <i>Dpysl5</i> , después de la pMCAO	165
5C.2	SELECCIÓN DEL miR-347: ANÁLISI DE SU FUNCIÓN MEDIANTE TÉCNICAS DE SOBREENPRESIÓN <i>IN VITRO</i> Y MODELO DE APOPTOSIS NEURONAL	168
5C.2.1	Condiciones óptimas de transfección de mimetizadores de miRNAs en neuronas corticales de rata. Validación con el miR-1 y su diana <i>Pdcd4</i> como controles positivos	168

5C.2.2	Efecto de la sobreexpresión del miR-347 sobre la viabilidad celular y la expresión de sus dianas potenciales, <i>Acs14</i> , <i>Bnip3l</i> y <i>Phyhip</i> , en neuronas corticales	169
5C.2.3	Efecto de un modelo <i>in vitro</i> de apoptosis sobre la expresión de <i>Acs14</i> y <i>Bnip3l</i> en neuronas corticales	173
6.	DISCUSIÓN	175
6.1	VALIDACIÓN DE CONTROLES ENDÓGENOS EN LOS ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA	177
6.2	<i>GCF2/LRRFIP1</i> EN CEREBRO Y EN ISQUEMIA CEREBRAL	180
6.3	miRNAs Y SUS mRNAs DIANA EN ISQUEMIA CEREBRAL	184
6.4	DISCUSIÓN GENERAL	189
7.	CONCLUSIONES	191
8.	BIBLIOGRAFÍA	195
9.	ANEXOS	215
	Anexo I. Publicaciones derivadas de la tesis doctoral	217
	Anexo II. Secuencias nucleotídicas de los seis amplicones no esperados y detectados de <i>Lrrfip1</i> mediante PCR convencional y secuenciación automática (apartado 5B.1.2)	261
	Anexo III. Secuencias nucleotídicas de los transcritos y secuencias aminoacídicas de las isoformas de <i>Lrrfip1</i> detectados en corteza cerebral (apartado 5B.1.3)	263
	Anexo IV. Dominios y características descritas para las isoformas humanas (LRRFIP1, GCF2 AND TRIP) y de ratón (Flap-1) (apartado 5B.1.3)	268
	Anexo V. Potenciales mRNAs diana de los miRNAs diferencialmente expresados tras la isquemia. Resultados obtenidos mediante los sitios web microRNA.org y miRecords (apartado 5C.1.3)	270

Resum

L'ictus és la tercera causa de mort i primera causa de discapacitat als països industrialitzats. Es tracta d'una malaltia amb una fisiopatologia complexa i per la qual existeix una única opció terapèutica eficaç fins al moment, la teràpia trombolítica amb activador tissular del plasminogen recombinant (rt-PA). La isquèmia cerebral és un potent estímul que provoca un patró espai-temporal específic i dinàmic d'inducció gènica pel que els estudis d'expressió gènica en models d'isquèmia cerebral experimental poden contribuir a la comprensió de la fisiopatologia de l'ictus isquèmic i a la identificació de marcadors pronòstic i de potencials dianes terapèutiques. En aquest context, la normalització dels resultats d'expressió relativa mitjançant PCR quantitativa a temps real (qPCR) utilitzant controls endògens o gens de referència adequats és un requisit crucial per obtenir conclusions fiables. Com a part del treball que constitueix aquesta tesi doctoral s'han determinat els gens de referència òptims per a l'anàlisi de l'expressió gènica mitjançant qPCR en els diferents models d'isquèmia i condicions experimentals detallades en la mateixa. Els resultats obtinguts mostren que els controls endògens són específics per a cada condició experimental i que han de validar-se en cada ocasió tot i que existeixin controls prèviament descrits.

D'altra banda, el nostre grup va descriure la sobreexpressió de *Gcf2/Lrrfip1* en isquèmia cerebral, gen pel qual s'han descrit diferents isoformes amb diferents funcions en humà i ratolí però que ha estat poc estudiat i pel qual es desconeix el seu rol precís en cervell. En aquesta tesi doctoral, i continuant aquesta línia de treball, s'ha caracteritzat *Lrrfip1* en cervell, definint les variants transcripcionals expressades en còrtex cerebral de rata, els seus perfils d'expressió i localització subcel·lular en condicions d'isquèmia i la seva possible funció cerebral. Els resultats obtinguts demostren que *Gcf2/Lrrfip1* es presenta com un gen amb diverses isoformes diferencialment expressades en resposta a la isquèmia cerebral, sent rLrrfip1 la isoforma principal amb un possible rol protector a través de l'activació de vies pro-supervivència (Akt, mTOR i β -catenina) i promovent l'expressió del transportador de glutamat Glt-1/Eaat2.

Finalment, malgrat el gran nombre de molècules descrites que varien la seva expressió després de la isquèmia, poc es coneix sobre els mecanismes que regulen aquesta expressió. Diversos treballs han mostrat l'expressió diferencial en la fase aguda de la resposta isquèmica cerebral dels miRNAs, potents reguladors post-transcripcionals de l'expressió gènica. En aquesta tesi doctoral s'ha analitzat l'expressió dels miRNAs en còrtex cerebral de rata, des de la fase aguda fins a la fase tardana de la isquèmia, amb l'objectiu d'identificar miRNAs específics relacionats amb isquèmia, elucidar els seus rols i identificar

dianes putatives d'aquests miRNAs potencialment implicades en la fisiopatologia de l'ictus. Els resultats obtinguts demostren que la isquèmia cerebral induïx canvis significatius i diferents patrons d'expressió en múltiples miRNAs des de la fase aguda fins a la fase tardana, fase que no havia estat avaluada fins al moment, i que aquests miRNAs tenen com a potencials dianes gens implicats en funcions cerebrals o prèviament relacionats amb isquèmia. Específicament, l'anàlisi del miR-347 i de les dianes *Acs14* i *Arf3* suggereixen que aquest miRNA juga un rol important en la regulació de la mort neuronal i que *Acs14* i *Arf3* han de ser tingudes en compte com a noves proteïnes d'estudi per la seva possible implicació en la fisiopatologia de l'ictus.

En conjunt, les troballes d'aquesta tesi doctoral mostren la importància de realitzar de manera precisa els estudis d'expressió gènica i aporten nous coneixements sobre molècules i vies de senyalització regulades per la isquèmia i possiblement implicades en la fisiopatologia de l'ictus.

Resumen

El ictus es la tercera causa de muerte y primera causa de discapacidad en los países industrializados. Se trata de una enfermedad con una fisiopatología compleja y para la que existe una única opción terapéutica eficaz hasta el momento, la terapia trombolítica con activador tisular del plasminógeno recombinante (rt-PA). La isquemia cerebral es un potente estímulo que provoca un patrón espacio-temporal específico y dinámico de inducción génica por lo que los estudios de expresión génica en modelos de isquemia cerebral experimental pueden contribuir a la comprensión de la fisiopatología del ictus isquémico y a la identificación de marcadores pronóstico y de potenciales dianas terapéuticas. En este contexto, la normalización de los resultados de expresión relativa mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) utilizando controles endógenos o genes de referencia adecuados es un prerrequisito crucial para obtener conclusiones fiables. Como parte del trabajo que constituye esta tesis doctoral se han determinado los genes de referencia óptimos para el análisis de la expresión génica mediante qPCR en los distintos modelos de isquemia y condiciones experimentales detalladas en la misma. Los resultados obtenidos muestran que los controles endógenos son específicos para cada condición experimental y que deben validarse en cada ocasión a pesar de que existan controles previamente descritos.

Por otro lado, nuestro grupo describió la sobreexpresión de *Gcf2/Lrrfip1* en isquemia cerebral, gen para el que se han descrito distintas isoformas con distintas funciones en humano y ratón pero que ha sido poco estudiado y para el que se desconoce su rol preciso en cerebro. En esta tesis doctoral, y continuando esta línea de trabajo, se ha caracterizado *Lrrfip1* en cerebro, definiendo las variantes transcripcionales expresadas en corteza cerebral de rata, sus perfiles de expresión y localización subcelular en condiciones de isquemia y su posible función cerebral. Los resultados obtenidos demuestran que *Gcf2/Lrrfip1* se presenta como un gen con diversas isoformas diferencialmente expresadas en respuesta a la isquemia cerebral, siendo rLrrfip1 la isoforma principal con un posible rol protector a través de la activación de vías pro-supervivencia (Akt, mTOR y β -catenina) y promoviendo la expresión del transportador de glutamato Glt-1/Eaat2.

Finalmente, a pesar del gran número de moléculas descritas que varían su expresión después de la isquemia, poco se conoce acerca de los mecanismos que regulan esta expresión. Diversos trabajos han mostrado la expresión diferencial en la fase aguda de la respuesta isquémica cerebral de los miRNAs, potentes reguladores post-transcripcionales de la expresión génica. En esta tesis doctoral se ha analizado la expresión de los miRNAs en corteza cerebral de rata, desde la fase aguda hasta la fase tardía de la isquemia, con el

objetivo de identificar miRNAs específicos relacionados con isquemia, elucidar sus roles e identificar dianas putativas de estos miRNAs potencialmente implicadas en la fisiopatología del ictus. Los resultados obtenidos demuestran que la isquemia cerebral induce cambios significativos y distintos patrones de expresión en múltiples miRNAs desde la fase aguda hasta la fase tardía, fase que no había sido evaluada hasta el momento, y que estos miRNAs tienen como potenciales dianas genes implicados en funciones cerebrales o previamente relacionados con isquemia. Específicamente, el análisis del miR-347 y de las dianas *Acs14* y *Arf3* sugieren que este miRNA juega un rol importante en la regulación de la muerte neuronal y que *Acs14* y *Arf3* deben ser tenidas en cuenta como nuevas proteínas de estudio por su posible implicación en la fisiopatología del ictus.

En conjunto, los hallazgos de esta tesis doctoral muestran la importancia de realizar de manera precisa los estudios de expresión génica y aportan nuevos conocimientos acerca de moléculas y vías de señalización reguladas por la isquemia y posiblemente implicadas en la fisiopatología del ictus.

Summary

Stroke is the third cause of death and first cause of disability in industrialised countries. It is a disease with a complex physiopathology and for which there is currently only one effective therapeutic option: thrombolytic therapy with recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA). Stroke is a strong stimulus that provokes a specific and dynamic temporal and spatial pattern of gene induction for which the models of gene expression in stroke models may contribute to our understanding of its physiopathology and to the identification of prognostic markers and potential therapeutic targets. In this context, the normalisation of the results of relative expression through real time quantitative PCR (qPCR) using suitable endogenous controls or reference genes is a crucial prerequisite for obtaining reliable conclusions. As part of the work that makes up this doctoral thesis, the optimum reference genes for the analysis of gene expression through qPCR in the different stroke models and experimental conditions described in the thesis have been determined. The results obtained show that the endogenous controls are specific for each experimental condition and that they must be validated on each individual occasion despite the existence of previously described controls.

Our group has reported the overexpression of *Gcf2/Lrrfip1* in cerebral ischaemia, a gene for which different isoforms have been described with different functions in humans and mice but which has been little studied and whose precise role in brain is unknown. In this doctoral thesis, and continuing with this line of study, *Lrrfip1* has been characterised in brain, defining the transcriptional variants expressed in the cerebral cortex of rat, its expression profiles and subcellular localisation in ischaemic conditions and its possible cerebral function. The results obtained show that *Gcf2/Lrrfip1* presents as a gene with diverse isoforms that are differentially expressed in response to stroke and that rLrrfip1, which has a possible protector role through the activation of the pro-survival pathways (Akt, mTOR and β -catenin) and which promotes the expression of glutamate transporter Glt-1/Eaat2, is the main isoform.

Finally, despite the large number of molecules described that vary their expression after stroke, little is known about the mechanisms that regulate this expression. Several studies have shown the differential expression of the miRNAs, which are strong post-transcriptional regulators of gene expression, in the acute phase of the cerebral ischaemic response. In this doctoral thesis, the expression of miRNAs in the cerebral cortex of rat from the acute to late phases of ischaemia have been analysed with the aim of identifying miRNAs that are specifically related to stroke, elucidating their roles and identifying putative targets of these miRNAs that are potentially involved in the physiopathology of stroke. The results obtained show that stroke induces significant changes and distinct expression patterns in many

SUMMARY

miRNAs from the acute to the late phase, which has yet to be evaluated, and that the potential targets of these miRNAs are genes that are involved in cerebral functions or which have previously been associated with ischaemia. Specifically, the analysis of miR-347 and of the targets *Acs14* and *Arf3* suggest that this miRNA plays an important role in the regulation of neuronal death and that *Acs14* and *Arf3* must be taken into account as new proteins to be studied given their possible involvement in the physiopathology of stroke.

Taken together, the findings presented in this doctoral thesis show the importance of performing gene expression studies in a highly precise manner and contribute new knowledge related to molecules and signalling pathways regulated by ischaemia and which are possibly involved in the physiopathology of stroke.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR

1.1.1 Definición

Las enfermedades cerebrovasculares son alteraciones transitorias (ataque isquémico transitorio –AIT-) o definitivas (ictus), del funcionamiento de una o varias zonas del encéfalo (cerebro, cerebelo, tronco cerebral) que aparecen como consecuencia de un trastorno de la circulación sanguínea cerebral. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el ictus como un síndrome clínico, presumiblemente de origen vascular, que se caracteriza por el desarrollo rápido de signos de afectación neurológica focal (a veces global) que duran más de 24 horas o llevan a la muerte [1]. Se trata de una emergencia médica, donde cada minuto que transcurre desde el inicio de los síntomas es fundamental en el pronóstico funcional de los pacientes afectados. El término ictus proviene del latín y significa golpe, refiriéndose a la repentina parálisis sufrida por el paciente. Otros términos sinónimos utilizados son ataque cerebral, infarto cerebral, hemorragia o derrame cerebral. Su equivalente en inglés es *stroke*.

1.1.2 Epidemiología

El ictus es responsable de un 9% de las muertes en todo el mundo. Constituye actualmente la tercera causa de muerte, la segunda causa de demencia y la primera causa de discapacidad a nivel mundial [2]. En España, el ictus es responsable del 10% de la mortalidad global y constituye la segunda causa de muerte en varón y primera en la mujer adulta [3]. Actualmente se estima que 500 personas de cada 100.000 habitantes viven con secuelas de un ictus pero debido a que la tasa de mortalidad en el ictus está disminuyendo más rápidamente que su tasa de incidencia se prevé que este número aumente en los próximos años, lo que supondrá un incremento de la demanda de los sistemas de asistencia médica y social [4]. Además, la OMS prevé un incremento de su incidencia del 27% hasta el año 2025 [5].

Por otro lado, entre el 25 y el 35% de los pacientes que sufren un infarto cerebral presentan un empeoramiento de los síntomas (deterioro neurológico) en las siguientes 48-72 horas desde el inicio de los mismos [6,7]. La relevancia del deterioro neurológico no radica sólo en su elevada incidencia, sino en su importancia como predictor de mal pronóstico vital y funcional. La ausencia de tratamiento capaz de prevenirlo o reducir sus consecuencias justifica la investigación de los mecanismos subyacentes con la esperanza de poder llegar a predecir el deterioro y en un futuro prevenirlo.

1.1.3 Factores de riesgo

El ictus es una enfermedad multifactorial y con una parte genética compleja. Existen varios factores de riesgo, o circunstancias que hacen que las probabilidades de sufrir un ictus aumenten, cuyo conocimiento y control es indispensable para la prevención de la enfermedad cerebrovascular. Algunos factores de riesgo no pueden modificarse, como por ejemplo la historia familiar o la edad. En cambio hay otros factores de riesgo modificables que su corrección puede disminuir la posibilidad de sufrir un ictus (Tabla 1.1). Estos factores normalmente coexisten y tienen efectos importantes sobre la estructura y función de los vasos sanguíneos. Las alteraciones vasculares producidas aumentan la vulnerabilidad del cerebro a la isquemia después de una oclusión arterial [8]. El estudio INTERSTROKE ha puesto recientemente de manifiesto que 10 factores de riesgo pueden explicar el 90% del riesgo de ictus isquémico [9]. Según los expertos, el aumento en la incidencia de la enfermedad cerebrovascular no puede únicamente atribuirse a los factores de riesgo clásicos como la hipertensión, la diabetes de tipo II o al tabaquismo, sino que parecen existir otros factores implicados que pueden influir en su incidencia [10,11,12], lo que hace necesario un mayor conocimiento de la epidemiología y de la fisiopatología del ictus con el objetivo de obtener el avance necesario en la prevención, diagnóstico y tratamiento, y reducir el impacto de esta enfermedad en la sociedad.

En este sentido, numerosos datos en modelos animales y en humanos demuestran la participación de la predisposición genética en la aparición del ictus. La prevalencia de ictus es cinco veces mayor en gemelos monocigóticos que en dicigóticos y tener historia familiar de muerte por ictus o enfermedad coronaria aumenta el riesgo relativo de padecerlo. Muchos de los factores de riesgo asociados a las enfermedades cerebrovasculares como la diabetes y la hipertensión arterial tienen además un componente hereditario, por lo que muchos *loci* genéticos contribuyen en mayor o menor medida al fenotipo del ictus. Además, existen formas monogénicas de enfermedades cerebrovasculares, como son la arteriopatía cerebral autosómica dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatías (CADASIL) y la enfermedad de Fabry, entre otras, de las que se conocen las alteraciones genéticas (mutaciones) que las inducen y en las que los individuos portadores de la mutación desarrollaran un ictus en algún momento de su vida. Sin embargo, los trastornos monogénicos explican sólo una pequeña parte de los ictus, por lo que la contribución genética al ictus debe ser multifactorial y compleja.

Tabla 1.1. Factores de riesgo de enfermedad cerebrovascular (Adaptada de Sacco RL, *et al.*, 1997 [13])

Bien documentados	Menos documentados
<p>Modificables:</p> <p>Hipertensión arterial</p> <p>Cardiopatía</p> <p> Fibrilación auricular</p> <p> Endocarditis infecciosa</p> <p> Estenosis infecciosa</p> <p> Estenosis mitral</p> <p> Infarto de miocardio reciente</p> <p>Tabaquismo</p> <p>Anemia de célula falciformes</p> <p>Enfermedad vascular cerebral previa</p> <p>Estenosis carotídea sintomática</p> <p>Posiblemente modificables:</p> <p>Hiperhomocistinemia</p> <p>Estados protrombóticos</p> <p>Hipertrofia ventricular izquierda</p> <p>No modificables:</p> <p>Edad</p> <p>Sexo</p> <p>Factores hereditarios</p> <p>Raza/Etnia</p> <p>Localización geográfica</p> <p>Nivel sociocultural</p>	<p>Posiblemente modificables:</p> <p>Cardiopatías</p> <p> Miocardiopatía</p> <p> Discinesia de la pared ventricular</p> <p> Endocarditis no bacteriana</p> <p> Calcificación del anillo mitral</p> <p> Estenosis aórtica</p> <p> Prolapso mitral</p> <p> Foramen oval permeable</p> <p> Aneurisma del septo</p> <p> Contraste ecocardiográfico espontáneo</p> <p>Uso de anticonceptivos orales</p> <p>Consumo de drogas</p> <p>Inactividad física</p> <p>Obesidad</p> <p>Hematocrito elevado</p> <p>Factores dietéticos</p> <p>Hiperinsulinemia o resistencia a la insulina</p> <p>Desencadenantes agudos (estrés)</p> <p>Infecciones</p> <p>Migraña</p> <p>No modificables:</p> <p>Estación y clima</p>

1.1.4 Clasificación

El 80-85% de los ictus son de tipo isquémico y el 15-20% restante son hemorrágicos. La hemorragia se produce por la rotura de un vaso sanguíneo del cerebro, liberándose sangre dentro de la cavidad cerebral que produce daño debido al edema y al desplazamiento de las estructuras cerebrales de la línea media por compresión. En el caso de la isquemia, el daño se produce por una reducción o bloqueo total del flujo sanguíneo en distintas partes del

cerebro, lo que se traduce en un déficit en la llegada de oxígeno y glucosa a las células cerebrales y la alteración de su función normal. Es en el ictus isquémico en el que se centra esta tesis doctoral.

Según la porción del cerebro que esté afectada se distinguen dos tipos de isquemia [14]:

- **Focal**: producida por oclusión de un vaso, debido a trombosis o embolismo. Sólo resulta dañada una parte del cerebro y el tamaño y posición de la zona infartada depende del vaso que se ha ocluido. En este caso el flujo sanguíneo vuelve a la normalidad cuando desaparece la causa de la oclusión. En función de la duración de la isquemia, se distingue entre AIT o infarto cerebral. El AIT se define como un trastorno episódico y focal de la circulación encefálica o retiniana de inicio habitualmente brusco que determina la aparición de alteraciones neurológicas en forma de signos o síntomas de duración breve (normalmente minutos), con reperusión completa en el transcurso de una hora o menos y sin evidencias de infarto en las pruebas de neuroimagen [15]. El infarto cerebral se define como el conjunto de manifestaciones clínicas, de imagen o patológicas, que aparecen como consecuencia de una alteración cuantitativa o cualitativa del flujo sanguíneo cerebral en un territorio encefálico que determina la aparición de un déficit neurológico de duración habitualmente mayor de 24 horas, expresión de una necrosis del tejido cerebral [4].

El territorio vascular afectado dependerá de la arteria cerebral ocluida (Figura 1.1). El 65% de los infartos isquémicos que resultan de una oclusión vascular presentan lesiones en el territorio de la arteria cerebral media (ACM), siendo por lo tanto la ACM y sus ramificaciones las arterias más frecuentemente implicadas en el ictus isquémico [16]. La ACM, rama terminal de la carótida interna, es el más largo y complejo de los vasos intracerebrales.

- **Global**: afecta a la totalidad del cerebro, y suele ser el resultado de la disminución sistémica del flujo sanguíneo. Puede deberse a una disminución en la presión sanguínea o a una disminución del volumen de sangre. Esta alteración no se incluye en el concepto de ictus.

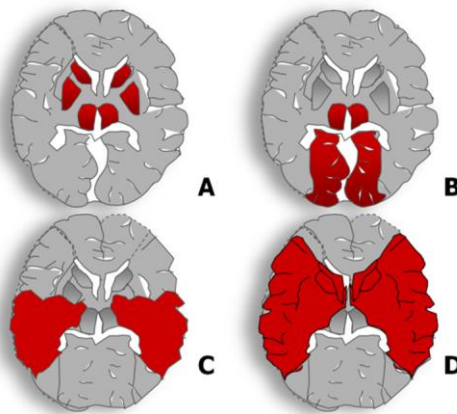


Figura 1.1. Territorios vasculares cerebrales. Localización del infarto según oclusión de: A. Arterias perforantes y lenticuloestriadas (infartos lacunares). B. Arteria cerebral posterior. C y D. Arteria cerebral media, infarto incompleto (rama parietal) y completo.

Es importante determinar el mecanismo etiopatogénico responsable del ictus isquémico para poder efectuar un tratamiento adecuado y una prevención secundaria eficaz. En función de dicho mecanismo, el ictus isquémico se considera que puede ser de origen: aterotrombótico, cardioembólico, enfermedad oclusiva de pequeño vaso o lacunar, de origen poco frecuente e indeterminado [17,18,19] (Figura 1.2).

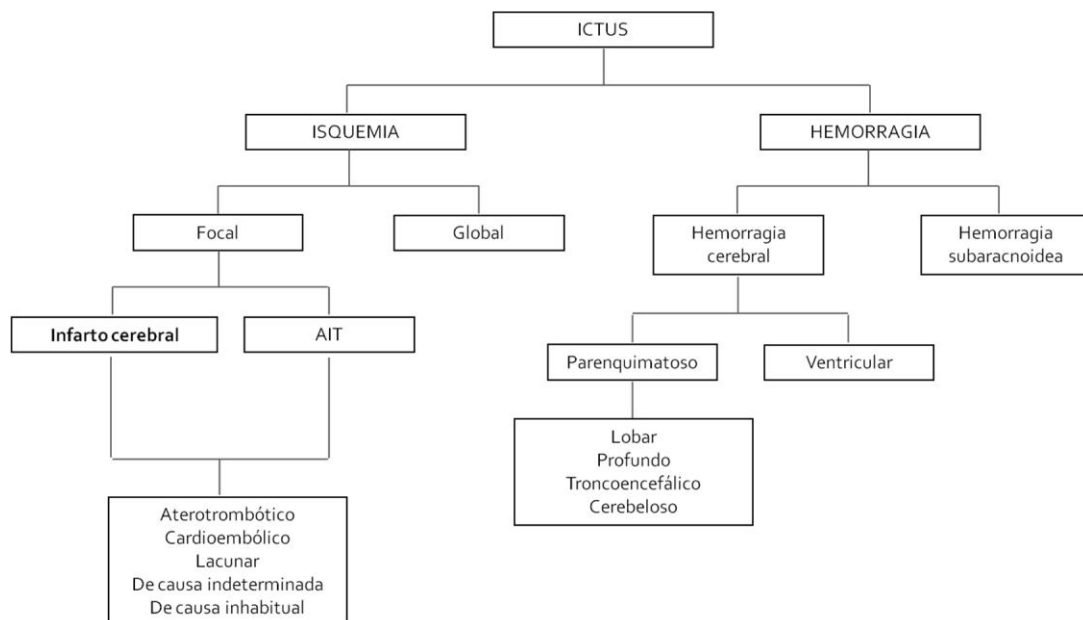


Figura 1.2. Clasificación de la enfermedad cerebrovascular según su etiología (Adaptada de Díez-Tejedor E *et al.*, 2001 [18]).

1.1.5 Tratamiento del ictus isquémico en fase aguda

La evolución de los pacientes tras un ictus se establece clásicamente en tres fases: aguda, subaguda y crónica. Los rangos de tiempo que caracterizan estas fases no están claros y varían significativamente en la literatura. Principalmente, en la mayoría de los estudios, los primeros tres a siete días se conocen como fase aguda (desde el inicio de los síntomas hasta la finalización del empeoramiento neurológico y estabilización médica del paciente), del primer al sexto mes se define como fase subaguda (periodo en el que se presenta una mejora funcional progresiva) y la fase crónica (periodo de estabilización funcional) comienza después de los tres a seis meses [20].

La intervención terapéutica en la fase aguda del ictus es crucial en el pronóstico funcional de los pacientes. Uno de los avances más importantes en el manejo de pacientes con ictus agudo en los últimos años ha sido la instauración de unidades de ictus en los hospitales. El ingreso de pacientes con ictus en estas unidades de monitorización semiintensiva reduce la mortalidad en un 20% y mejora la respuesta funcional en un porcentaje similar, lo que supone que evita la muerte o la incapacidad de aproximadamente 50 de cada 1000 pacientes que han sufrido un ictus [4].

Desde el punto de vista terapéutico, el objetivo es la restauración temprana del flujo sanguíneo para limitar el daño cerebral después de un ictus. El único fármaco actualmente aprobado con fines recanalizadores es el tratamiento trombolítico con el activador tisular del plasminógeno (t-PA) recombinante (rt-PA). Este fármaco fue aprobado en el 1997 por la *Food and Drug Administration* (FDA), y es el primer y único tratamiento farmacológico efectivo del que se dispone hasta el momento en el tratamiento del ictus isquémico agudo. El tratamiento con rt-PA evita la muerte o dependencia en 1 de cada 7 pacientes tratados. De cada 100 pacientes tratados, 32 se benefician de la administración del fármaco, lo que supone que estarán independientes o presentarán una mínima discapacidad a los 3 meses de evolución [21]. Sin embargo, a pesar de la eficacia, el volumen de pacientes que reciben este tratamiento es bajo (<5% de los pacientes candidatos) [22]. Ello se debe fundamentalmente a la estrecha ventana terapéutica de la que se dispone para su administración ya que el fármaco ha demostrado su eficacia cuando se administra en las 4.5h iniciales de la evolución de la isquemia [23]. Por otro lado, la administración de tratamiento trombolítico con rt-PA se asocia a efectos adversos, el más importante de los cuales es la posibilidad de aparición de una transformación hemorragia sintomática que se observa en 8% de los casos y que puede aumentar la gravedad del ictus o incluso conducir a la muerte [4].

En los últimos años se han testado otras estrategias terapéuticas en la fase aguda del ictus isquémico, fundamentalmente dirigidas al bloqueo de alguna de las reacciones moleculares que conducen a la muerte neuronal en la isquemia mediante el uso de fármacos denominados neuroprotectores como son los agentes estabilizadores de calcio, agentes anti-excitotóxicos, anti-oxidantes, agentes anti-apoptóticos o anti-inflamatorios (para revisión [24]). Sin embargo, esta neuroprotección farmacológica, que es claramente eficaz en modelos animales de isquemia cerebral, no se ha mostrado beneficiosa en pacientes con infarto cerebral a pesar del gran número de agentes estudiados en los numerosos ensayos clínicos llevados a cabo [25,26].

Ante las pocas opciones terapéuticas efectivas disponibles se continúan desarrollando estudios tanto a nivel pre-clínico como clínico con el objetivo de encontrar nuevas estrategias terapéuticas efectivas en pacientes con ictus isquémico. En base a la complejidad de la fisiopatología de la isquemia cerebral, que se describe en el siguiente apartado, y a los resultados decepcionantes de los ensayos clínicos realizados usando un único agente, se tiende a considerar que para el tratamiento del ictus es necesaria una aproximación pleiotrópica dirigida a diversos eventos patogénicos, en múltiples tipos celulares y teniendo en consideración el curso temporal del evento isquémico, ya que algunas de las dianas moleculares en la terapia ictal tienen roles bifásicos en la fisiopatología del ictus, siendo principalmente dañinos durante la fase aguda pero contribuyendo a la recuperación neurovascular en la fase tardía o crónica [24,27,28]. El objetivo del tratamiento debe incluir tanto la prevención de la muerte celular como el rescate de la función neurovascular integrada [29]. Actualmente se están buscando opciones terapéuticas dirigidas a potenciar señales o substratos endógenos de remodelación neurovascular que pueden tener ventanas terapéuticas más largas en el ictus [27,29].

1.2 FISIOPATOLOGÍA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL

El cerebro es uno de los órganos más sensibles a cualquier tipo de daño y es necesario un flujo sanguíneo constante para que las células puedan recibir la cantidad necesaria de oxígeno y glucosa para su correcto funcionamiento. Si este suministro se interrumpe las células sufrirán un daño que dependiendo del tiempo que se mantenga puede llegar incluso a producir la muerte celular [14]. De aquí que el ictus sea una emergencia neurológica, ya que una actuación adecuada en las primeras horas es fundamental para salvar el tejido cerebral. El flujo sanguíneo cerebral (FSC) en condiciones normales es mayor de 50ml/100g/min. La oclusión arterial responsable del ictus isquémico produce una disminución del FSC que no es uniforme en toda la zona isquémica lo que permite distinguir

diferentes zonas en función de la disminución de dicho flujo: el *core* isquémico o núcleo del infarto en que el FSC es $< 10\text{ml}/100\text{g}/\text{min}$, lo que produce una muerte celular rápida; una zona de oligohemia en que el FSC es $> 22\text{ml}/100\text{g}/\text{min}$ y que sólo evolucionará a zona de infarto en condiciones especialmente adversas; y una zona que se conoce como penumbra isquémica con FSC entre 10 y $22\text{ml}/100\text{g}/\text{min}$ en la que el consumo de glucosa es suficiente para la supervivencia tisular, pero que progresará a *core* si no se restablece una perfusión adecuada [30,31] (Figura 1.3). El núcleo o *core* del infarto se acepta como tejido irreversiblemente dañado en el que existe una disminución inferior al 20% de los niveles basales de flujo sanguíneo, agotamiento de las reservas energéticas (ATP, Adenosina trifosfato) y fallo irreversible del metabolismo energético [28]. En cambio, en la penumbra isquémica existe una disminución significativa de la perfusión tisular que es apenas suficiente para mantener los niveles basales de ATP y del metabolismo de oxígeno así como el gradiente iónico normal lo que hace que el tejido esté funcionalmente dañado pero sea potencialmente salvable [28,32].

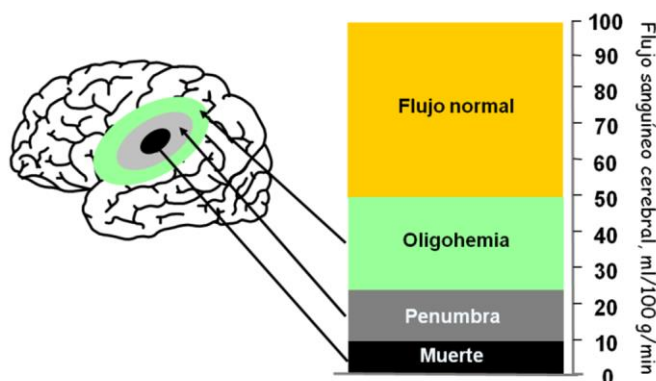


Figura 1.3. Diferentes áreas de flujo sanguíneo en la isquemia cerebral (Modificado de Castillo J *et al.*, 2003 [25]).

En la compleja fisiopatología del ictus están implicados numerosos eventos iónicos, bioquímicos y celulares interrelacionados y coordinados en tiempo y espacio. A pesar de que las vías moleculares de muerte neuronal han sido estudiadas más en detalle, todos los mecanismos activados por la isquemia cerebral afectan a los distintos componentes de la unidad neurovascular (UNV). En efecto, la introducción en el año 2001 del concepto de UNV ha llevado al abandono del enfoque puramente neurocéntrico en la fisiopatología del ictus y a la adquisición de una visión más integrada en la que se tienen en cuenta las interacciones dinámicas entre los distintos tipos celulares que contribuyen a la función y disfunción del cerebro. La UNV está formada por neuronas, astrocitos, microglía, células endoteliales de la

barrera hematoencefálica (BHE), pericitos y componentes de la matriz extracelular (Figura 1.4).

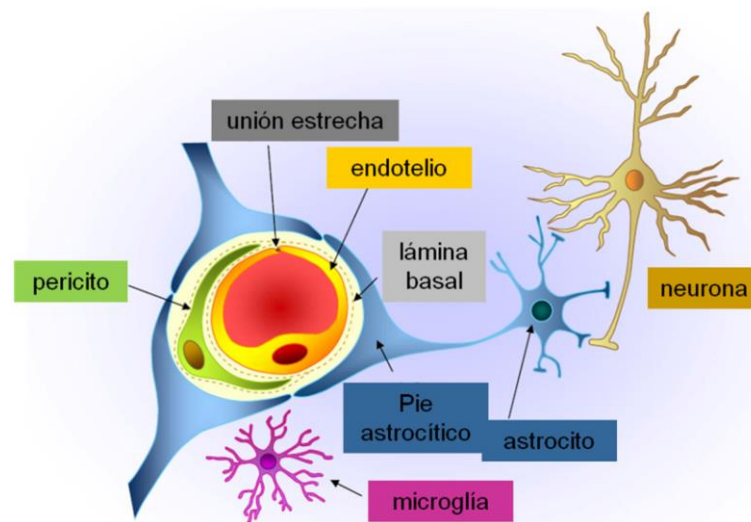


Figura 1.4. Componentes de la unidad neurovascular (Adaptado de Abbott NJ and Yusof SR (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. Front. Pharmacol. Conference. doi:10.3389/conf.fphar.2010.02.00002).

La isquemia cerebral desencadena respuestas coordinadas a nivel de esta interfaz neurovascular en las diferentes etapas evolutivas de la isquemia. Junto con los mecanismos de daño activados por la isquemia, en el tejido cerebral también se activan mecanismos de protección endógenos, igual de complejos que los mecanismos de daño (Figura 1.5), y en los que participan los distintos componentes de la UNV para proporcionar los sustratos neurovasculares críticos para la plasticidad funcional y la remodelación (Figura 1.6) [27,33,34]. A continuación se describen los principales mecanismos implicados en los procesos de daño (apartado 1.2.1) y reparación (apartado 1.2.2), así como los cambios en la expresión génica inducidos por la isquemia cerebral (apartado 1.2.3). En conjunto, la información que se describe a continuación muestra que múltiples vías de señalización influyen en la evolución del ictus y que por lo tanto pueden existir aún múltiples vías por explorar a fin de identificar potenciales dianas terapéuticas.

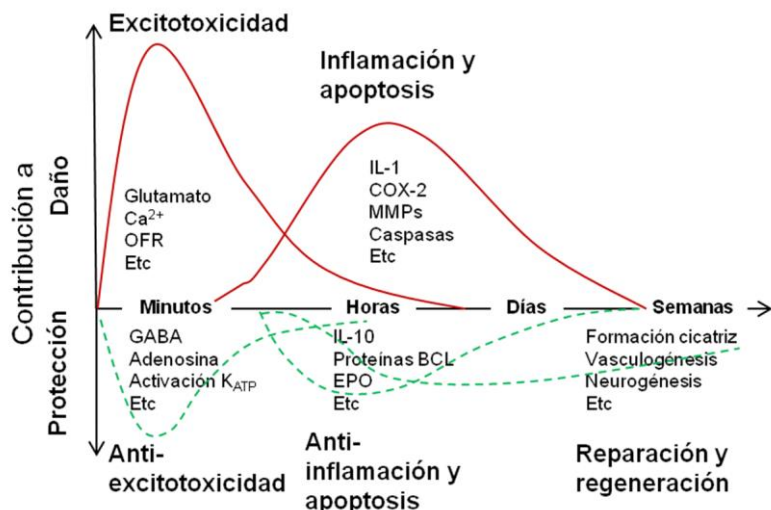


Figura 1.5. Mecanismos nocivos y protectores desencadenados por la isquemia cerebral. Las líneas rojas hacen referencia a los principales mecanismos de destrucción tisular en el ictus mientras que las líneas verdes hacen referencia a las respuestas protectoras desencadenadas en el tejido (Modificado de Dirnagl U *et al.*, 2003 [33]).

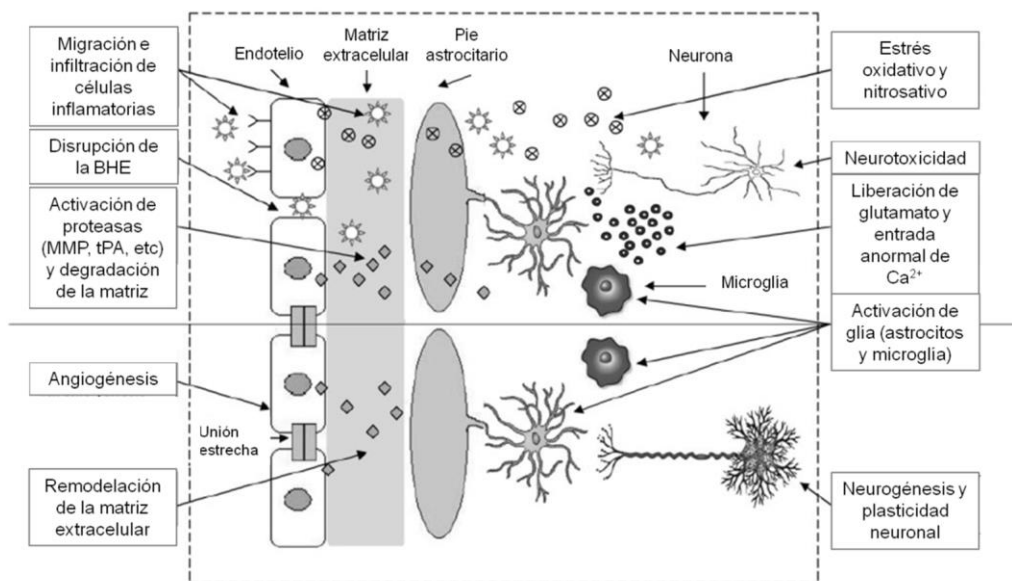


Figura 1.6. Representación esquemática de las interacciones multicelulares que median el daño y la reparación en la unidad neurovascular. Durante el daño, la BHE se altera, la inflamación es perjudicial y predomina la neurotoxicidad. En cambio, durante la reparación, se activan mecanismos endógenos que implican angiogénesis y neurogénesis, reacciones gliales tróficas y reclutamiento de moléculas anti-inflamación y la remodelación de la matriz extracelular. Finalmente, la señalización célula-célula entre los distintos elementos de la UNV es necesaria para dar soporte a la plasticidad neuronal y a la compensación funcional y la recuperación (Modificado de Xing C *et al.*, 2012 [34]).

1.2.1 Mecanismos de daño celular y tisular

En este apartado se describen los principales mecanismos de daño celular y tisular en isquemia cerebral como son desequilibrio iónico y excitotoxicidad, estrés oxidativo y nitrosativo, despolarizaciones peri-infarto, inflamación, necrosis y apoptosis, disrupción de la BHE e infiltración de leucocitos.

1.2.1.1 Desequilibrio iónico y excitotoxicidad

Con la reducción del flujo sanguíneo cerebral y la disminución de la llegada de oxígeno y glucosa se produce una caída importante de los niveles de ATP que compromete el funcionamiento de las bombas Na^+/K^+ dependientes de ATP encargadas de mantener la homeostasis de estos cationes en las células. El fallo energético da lugar a una caída rápida del K^+ intracelular que induce la despolarización neuronal, lo que conduce a la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y a la liberación al medio extracelular de cantidades excesivas de glutamato y otros aminoácidos excitadores. El glutamato liberado estimula receptores de membrana ionotrópicos, de transmisión rápida, fundamentalmente AMPA (2-amino-3-(hidroxi-5-metil-5-metilisoxazol-4-il)-propionato) y NMDA (N-metil-D-aspartato), y receptores de glutamato metabotrópicos, mGluR, de transmisión más lenta. Los receptores ionotrópicos están asociados a canales iónicos y su actividad da lugar a un aumento de la permeabilidad al Na^+ , K^+ y/o Ca^{2+} , de manera que la estimulación de los receptores NMDA es responsable del aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular y de la activación de la cascada isquémica dependiente de Ca^{2+} que acabará produciendo la muerte celular [35,36,37]. Por tanto, la excitotoxicidad y la sobrecarga de calcio son los principales factores que contribuyen a la muerte celular en las fases iniciales de la isquemia cerebral.

1.2.1.2 Estrés oxidativo y nitrosativo

El cerebro es particularmente vulnerable al ataque mediado por radicales libres ya que tiene un sistema de defensa antioxidante limitado. El estrés oxidativo y el nitrosativo son potentes mediadores de daño isquémico. En cuanto al estrés oxidativo, el ambiente redox de las células modula cascadas de transducción de señal que decantan la balanza entre vías pro-muerte o pro-supervivencia. En el estrés nitrosativo por su parte, especies reactivas de oxígeno y quizá especies reactivas de nitrógeno actúan directamente como ejecutores de muerte celular [29]. Los radicales libres son moléculas altamente reactivas con uno o más electrones desapareados que pueden reaccionar con DNA, proteínas y lípidos causando distintos grados de daño y disfunción. La isquemia produce un aumento en la formación de

radicales libres como el anión superóxido, el radical hidroxilo y el óxido nítrico. Las fuentes principales de especies reactivas de oxígeno durante el daño isquémico son (1) la mitocondria, que produce anión superóxido durante el proceso de transporte de electrones, (2) el metabolismo del ácido araquidónico, a través de las vías ciclooxigenasa y lipooxigenasa, y (3), la microglía activada y los leucocitos periféricos infiltrantes, vía el sistema oxidasa NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) tras la reperfusión del tejido isquémico. Tanto las especies reactivas de nitrógeno como los radicales libres de oxígeno aumentan el daño tisular y están implicadas en la activación de múltiples vías de señalización que desencadenan la muerte celular tras la isquemia, como apoptosis e inflamación [24].

1.2.1.3 Despolarizaciones peri-infarto

La falta de aporte energético y la liberación de K^+ y glutamato causan la despolarización de las neuronas y la glía. En el *core* las células sufren despolarización anóxica y nunca se repolarizan. En la zona de penumbra, las células pueden repolarizarse, pero a expensas de consumir energía. Esas mismas células pueden volver a despolarizarse en respuesta al aumento de los niveles de glutamato y/o K^+ que se acumulan en el espacio extracelular (despolarizaciones peri-infarto). La existencia de estas despolarizaciones ha sido demostrada en modelos animales de isquemia cerebral y mediante electrofisiología y pruebas de neuroimagen se ha demostrado también su existencia en pacientes con ictus isquémico. Estas despolarizaciones repetitivas incrementan el volumen de tejido dañado, se ha descrito en modelos animales que una única despolarización expande el área de hipoperfusión grave en más de un 20% [29,36], y se ha demostrado que este incremento del volumen de tejido dañado está mediado por el glutamato [38].

1.2.1.4 Inflamación

La isquemia cerebral induce una reacción inflamatoria en el tejido afectado que puede mantenerse durante días o incluso semanas. Ya en las fases iniciales, la isquemia estimula la expresión de factores de transcripción (FTs), como $NF-\kappa\beta$ (*Nuclear Factor $\kappa\beta$*) o HIF-1 (*Hypoxia Inducible Factor 1*) entre otros, implicados en la activación de genes pro-inflamatorios, como $TNF\alpha$ (*Tumour Necrosis Factor alpha*), $IL-1\beta$ (*Interleukin-1 beta*) y $Cox-2$ (*Cyclooxygenase-2*), en células endoteliales, astrocitos, microglía y neuronas [24,36]. Por su parte el sistema inmune innato a través de su familia de receptores TLR (*Toll-like receptors*) también juega un papel en la inflamación post-isquemia. Además de su función en detección

y defensa frente a patógenos, estos receptores se activan también por moléculas endógenas asociadas a daño celular y tisular. Se ha demostrado que la isquemia cerebral induce varios TLRs y que su activación conlleva la activación de FTs pro-inflamatorios y la generación de citoquinas y quimioquinas [39].

Actualmente está aceptado que la inflamación contribuye a incrementar el daño isquémico y a exacerbar el déficit neurológico focal en la fase aguda [39]. En cambio, en etapas tardías la inflamación promueve eventos necesarios para la reparación tisular [29]. A la microglía, en concreto a la activada, se le atribuye un rol importante pro-inflamatorio tras un ictus especialmente en la zona peri-infarto. Por su parte, los astrocitos también contribuyen en el proceso inflamatorio inducido por la isquemia y pueden producir tanto citoquinas pro-inflamatorias como factores neuroprotectores. Debido a este rol dual de la glía (microglía y astrocitos) su efecto sobre el tejido cerebral puede variar a distintos tiempos tras un insulto isquémico, con actividades protectoras o regenerativas, en días o semanas tras el inicio de la isquemia [24].

1.2.1.5 Necrosis y apoptosis

Los principales mecanismos de muerte celular tras un ictus son la necrosis y la apoptosis. Estos procesos pueden estar inducidos por múltiples desencadenantes, como la sobrecarga de Ca^{2+} o el estrés oxidativo. Según la naturaleza e intensidad del estímulo, el tipo celular y el estado de maduración o fase del ciclo celular en que se encuentra, los activadores de muerte celular pueden promover la necrosis o la apoptosis. La mitocondria juega un papel importante en ambos casos, siendo un reservorio de proteínas pro- y anti-apoptóticas, como Bcl2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*) y Bax (*Bcl2-associated X protein*), respectivamente, y del citocromo C [29,36].

En el *core* o núcleo del infarto la disminución severa de los niveles de ATP produce acidosis y la pérdida de la homeostasis iónica dando lugar a la muerte celular por necrosis. Este proceso de muerte celular se produce en minutos en esta área y se caracteriza morfológicamente por hinchazón celular y rotura de las membranas. En cambio, la muerte celular isquémica no es igual cuando existe una disponibilidad limitada de ATP, como ocurre en la zona peri-infarto, donde el insulto es menos severo y la muerte celular es más lenta ya que depende de la activación de genes específicos que finalmente pueden dar lugar a apoptosis, proceso de muerte celular programada con el que se eliminan de manera organizada las células [24,27,29].

1.2.1.6 Disrupción de la BHE

La BHE responde al daño isquémico con un aumento de la permeabilidad y disminución de su función de barrera, junto con la degradación de la lámina basal de la pared del vaso. Todo ello favorece la interacción del endotelio cerebral con células del SNC extravasculares (astrocitos, microglía y neuronas), así como con células intravasculares (plaquetas y leucocitos), y todas estas interacciones contribuyen al aumento del daño isquémico. Como resultado la vasculatura cerebral asume el siguiente fenotipo: (1) baja perfusión capilar del tejido cerebral, (2) pro-adhesión de células circulantes, (3) pro-inflamación, (4) pro-trombosis y (5) disminución de la función de barrera endotelial [24].

1.2.1.7 Infiltración de leucocitos

Múltiples evidencias implican a los leucocitos en la patogénesis del daño isquémico. En concreto se considera que median el daño tisular inducido por la reperfusión y la disfunción microvascular. Los leucocitos polimorfonucleares, principalmente los neutrófilos, están relacionados con el mal pronóstico del ictus. Los neutrófilos se adhieren al endotelio vascular del cerebro isquémico en la fase aguda e infiltran en el parénquima cerebral. En cambio, la relevancia patológica del reclutamiento de linfocitos en el cerebro después de un ictus sigue siendo incierta, aunque parece que los linfocitos T participan también en el daño post-reperfusión [24].

1.2.2 Mecanismos de reparación

Estudios de resonancia magnética funcional en animales han demostrado que las áreas peri-ictus son altamente plásticas [40,41]. La plasticidad cerebral, donde las regiones cerebrales sanas asumen funciones que antes realizaban las áreas lesionadas, es en gran parte responsable de la recuperación neurológica observada en pacientes semanas o meses después de haber sufrido un ictus [42]. Los mecanismos moleculares y celulares de plasticidad cerebral que se consideran implicados en la recuperación post-ictus son la neurogénesis, la angiogénesis y la gliogénesis.

En el cerebro adulto de los mamíferos existen áreas focales de neurogénesis en la zona subventricular y en la zona subgranular. En condiciones normales, las neuronas recién nacidas migran hacia las regiones olfatorias y el hipocampo, mientras que tras la isquemia cerebral estas nuevas células parecen aumentar y los neuroblastos son redirigidos hacia el tejido cerebral dañado, posiblemente como un intento endógeno del cerebro de repararse a sí mismo. Por su parte, la remodelación vascular también juega un papel importante en la

recuperación del ictus. Se ha detectado angiogénesis en regiones peri-ictus en modelos murinos de isquemia cerebral y también en pacientes con ictus. Actualmente se conoce que la respuesta angiogénica y neurogénica están estrechamente correguladas tras un ictus y otros procesos que cursan con daño cerebral. Los mecanismos moleculares de ambos procesos están conservados evolutivamente por lo que mediadores y vías de señalización similares están implicados en ambos fenómenos. Los neuroblastos migran a través de rutas perivasculares. La promoción de la neurogénesis favorece la regeneración vascular y, viceversa, la estimulación de la angiogénesis mejora la neurogénesis. Por su parte, el proceso de gliogénesis tiene el mismo origen que el proceso de neurogénesis, debido a que las células precursoras neuronales multipotenciales (que constituyen las primeras células precursoras propiamente neurales e incluyen precursores bipotenciales neuro-gliales, neuroblastos y glioblastos) son capaces de diferenciarse dando lugar tanto a neuronas como a células gliales. Se han descrito diferentes factores externos, principalmente morfógenos, que regulan la función de los precursores multipotenciales después del daño isquémico, promoviendo la formación de células gliales [43,44]. De modo que parece probable que la recuperación cerebral tras un ictus comprenda procesos interdependientes de plasticidad y remodelación neurovascular que se llevan a cabo a través de múltiples vías de señalización y mediadores comunes [27,29].

1.2.3 Expresión génica

La isquemia cerebral focal es un estímulo potente que provoca un patrón espacio-temporal específico y dinámico de inducción génica que incluye tanto la expresión de nuevos genes, como el incremento o disminución de los que ya se expresan en condiciones de normalidad. La detección de los cambios génicos producidos por la isquemia y el estudio de la proteómica es el primer paso para la comprensión de las diferentes vías moleculares implicadas en el ictus. La tecnología de los microarrays de DNA ha permitido el mapeo del curso temporal de la respuesta génica diferencial de miles de genes en el cerebro desencadenada por un insulto isquémico [24,45,46].

Se han descrito cinco ondas o fases temporales de expresión génica tras la isquemia cerebral en las que se activan (1) genes de expresión temprana (GET), (2) proteínas de choque térmico (HSP, *heat shock proteins*), (3) mediadores inflamatorios como citoquinas y moléculas de adhesión, (4) proteasas e inhibidores de proteasas y, finalmente, (5) factores de remodelación y reparación (Figura 1.7) [47]. Actualmente se sabe que las diferentes

ondas de expresión génica se entremezclan y se puede encontrar la expresión de distintos de estos genes en diferentes momentos evolutivos del proceso isquémico.

Los GET son genes activados transitoriamente y de forma rápida en respuesta a una gran variedad de estímulos celulares, entre ellos la isquemia. Representan un mecanismo de respuesta activado a nivel transcripcional en respuesta al estímulo y que ocurre antes de que se sintetizen nuevas proteínas [48]. Además, la mayor parte de los GET codifican para FTs con una función reguladora [49]. Tras la isquemia cerebral existe un claro incremento de estos genes, entre los cuales encontramos, *c-Fos (Finkel-Biskis-Jinkins (FBJ) murine osteosarcoma viral oncogene)*, *FOS-B (FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B)*, *FOSL1 (fos-like antigen 1)*, *c-Jun (jun proto-oncogene)* y *JUN-B (jun B proto-oncogene)*. Varias publicaciones sugieren que la activación sostenida de estos FTs provoca la muerte celular [50,51].

Las HSP son proteínas implicadas en procesos de remodelación de proteínas desnaturalizadas. Su RNA mensajero (mRNA) se expresa entre 1 y 2 horas tras la isquemia y desaparece en 1 ó 2 días [52]. En concreto se ha descrito un aumento de expresión de HSP-27 y HSP-70 tras isquemia focal [53] y pueden tener un papel protector [54].

La tercera onda génica aparece entre 1-3 horas tras la isquemia con un pico máximo a las 12-24 horas. Las citoquinas representan una familia pleiotrópica de polipéptidos (8-26kDa) que regulan la activación, proliferación y diferenciación celular [55,56]. En condiciones normales, son prácticamente indetectables en cerebro pero después de un estímulo nocivo la expresión de citoquinas pro- y anti-inflamatorias aumenta rápidamente. Las principales citoquinas pro-inflamatorias son la IL-1 β y el TNF α [57] y las principales anti-inflamatorias son el TGF- β (*Transforming growth factor beta*) y la IL-10 (*Interleukin-10*) [57,58]. A pesar de esta división, estas citoquinas no pueden clasificarse así de manera inequívoca, ya que pueden ejercer efectos neurotóxicos a la vez que neuroprotectores según el contexto fisiológico y bioquímico cerebral [56,58,59]. Las citoquinas, a su vez, inducen la expresión de moléculas de adhesión y quimioquinas que median la adhesión y extravasación de leucocitos en el tejido isquémico [60,61,62].

La cuarta onda génica da lugar a la activación de proteasas e inhibidores de proteasas. Ambas se encargan de la remodelación de la matriz extracelular, proceso biológico fundamental para el crecimiento y desarrollo normal, así como para la reparación del SNC. Los principales enzimas remodeladores de la matriz extracelular son las metaloproteasas de matriz (MMPs, *Matrix metalloproteinases*) y los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs, *Tissue inhibitors of metalloproteinases*). Durante la respuesta neuroinflamatoria inducida por la isquemia cerebral, la expresión y activación anormal de estos enzimas

conduce a la desestabilización de la matriz extracelular, dando lugar a la apertura de la BHE y evitando la señalización celular normal lo que conduce finalmente a la muerte celular. Algunos de estos enzimas sobreexpresados tras la isquemia cerebral son MMP-9, MMP-2 y TIMP-1 entre otros [63].

Por último, la activación de factores de remodelación y reparación permite la recuperación funcional del tejido mediante los mecanismos descritos en el apartado 1.2.2 de esta sección. Alguno de estos factores son el VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), promotor de la angiogénesis, la supervivencia neuronal, la neurogénesis y la plasticidad cerebral después de la fase aguda [64], o las proteínas BMP (*Bone Morphogenetic Proteins*), miembros de la superfamilia TGF- β involucrados en supervivencia y proliferación neuronal y que se considera que pueden ser importantes para la recuperación del daño isquémico [65].

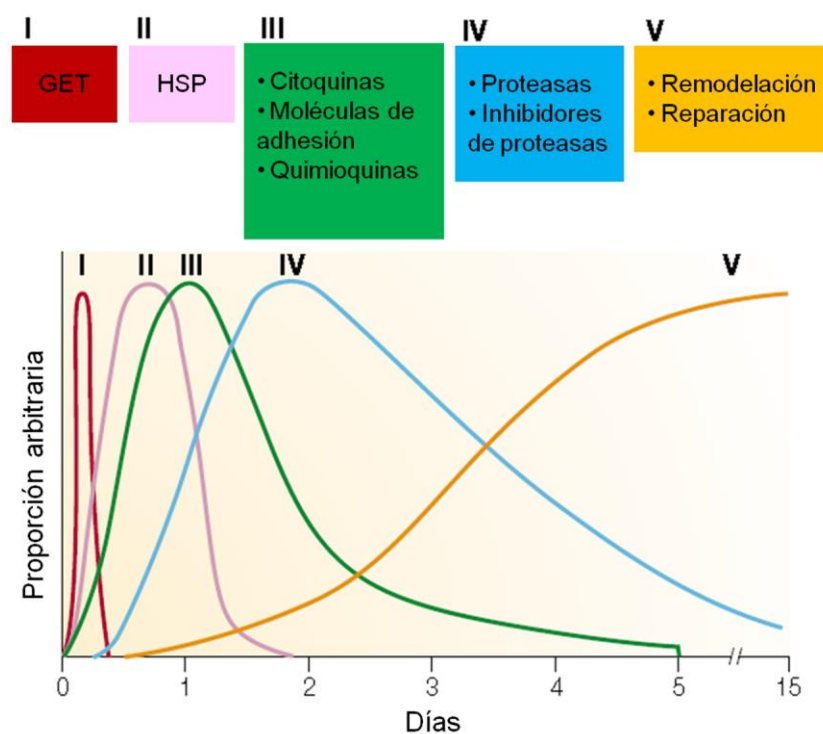


Figura 1.7. Representación de las cinco ondas temporales de expresión génica. GET: genes de expresión temprana; HSP: proteínas de choque térmico (Adaptado de Allan SM *et al.*, 2001 [47]).

El conocimiento acerca de todos estos mecanismos implicados en la fisiopatología del ictus ha sido posible en gran medida gracias a modelos experimentales de isquemia cerebral *in vivo* e *in vitro*. A continuación se hace una breve descripción de estos modelos

experimentales para seguidamente profundizar en dos conceptos introducidos en esta sección, el mecanismo de excitotoxicidad y las proteínas implicadas en la regulación de los niveles de glutamato extracelular (apartado 1.4) y el estudio de la expresión génica (apartado 1.5) y de sus mecanismos reguladores (apartado 1.6).

1.3 MODELOS EXPERIMENTALES DE ISQUEMIA CEREBRAL

Tal como se ha dicho en el apartado anterior, los modelos experimentales de isquemia cerebral han sido fundamentales para aumentar la comprensión sobre los mecanismos fisiopatológicos de la isquemia cerebral, así como su perfil temporal. Este conocimiento es imprescindible para la identificación de nuevas dianas terapéuticas y el diseño y aplicación de tratamientos eficaces para el ictus.

Para que un modelo animal pueda ser considerado de utilidad debe ser fiable, fácil de realizar, reproducible, tener una baja variabilidad entre individuos e investigadores y debe reflejar lo más fielmente posible las condiciones clínicas que trata de imitar. Se han desarrollado varios modelos experimentales de isquemia cerebral y aunque se han utilizado distintos animales, los más frecuentemente utilizados son los roedores, ya que se trata de animales pequeños de fácil manejo, con una anatomía craneal y circulatoria similar a la humana y en los que es fácil controlar la severidad, duración y localización de la oclusión del vaso. Los modelos de isquemia focal son los que mejor reproducen el ictus humano y, por tanto, son los más ampliamente utilizados junto con los modelos *in vitro* en cultivos primarios celulares (para revisión [24,66]).

1.3.1 Modelos de isquemia cerebral focal *in vivo*

Como se ha descrito anteriormente, la isquemia en el territorio de la ACM es la principal causa de infarto y por este motivo la gran mayoría de modelos experimentales de isquemia cerebral focal que se han desarrollado consisten en la oclusión transcraneal (mediante electrocoagulación o ligadura) o intraluminal de esta arteria. Puede diferenciarse entre modelos de isquemia transitoria, en los que la fase de isquemia (máximo 3 horas) va seguida de una fase de reperfusión, o de isquemia permanente, si sólo se produce la isquemia y se mantiene durante uno o más días. Con la oclusión transitoria la extensión del núcleo del infarto en la penumbra es lenta y permite una zona peri-infarto más prolongada y consistente, en cambio, la oclusión permanente el núcleo se expande en la penumbra mucho más rápidamente y los volúmenes de infarto son más reproducibles [67]. Cabe

también mencionar que existen otros modelos menos invasivos que se asemejan más a un infarto isquémico humano de origen embólico pero, sin embargo, se trata de modelos complejos con elevada variabilidad entre animales y baja reproducibilidad respecto a las lesiones producidas por lo que su uso no está tan extendido. Se trata de los modelos de oclusión intraluminal de la ACM mediante embolia con un coágulo de sangre (autólogo o heterólogo), que permiten estudiar el efecto de agentes trombolíticos junto con otras medidas terapéuticas [68], y del uso de ratas espontáneamente hipertensas propensas a presentar infartos cerebrales cuando se exponen a una dieta rica en sal desde que tienen seis semanas de vida [69].

El modelo de isquemia cerebral *in vivo* utilizado en esta tesis es el modelo de oclusión permanente de la rama distal de la ACM (pMCAO, *permanent middle cerebral artery occlusion*) descrito por Tamura *et al.* con el que se obtienen infartos reproducibles a nivel cortical [67,70,71].

1.3.2 Modelos de isquemia cerebral *in vitro*

A pesar de que los modelos de isquemia *in vitro* no pueden reproducir las complejas condiciones funcionales y estructurales del cerebro isquémico, la complejidad del SNC requiere también de estrategias simples de estudio que pueden ayudarnos. Estos modelos permiten un mayor control de las variables que influyen en la lesión producida, con un coste económico bajo y, por lo tanto, son herramientas valiosas y sencillas a utilizar junto con estudios complementarios imprescindibles en animales [66,72]. Se ha demostrado que existen similitudes en la manera como se comportan las células cerebrales aisladas en condiciones de estrés y la manera en que se comportan las mismas células *in vivo* en el ictus [73]. Los cultivos primarios de neuronas o astrocitos de corteza cerebral, hipocampo o cerebelo de ratas o ratones embrionarios o perinatales son algunos de los tipos celulares utilizados para el estudio del daño isquémico *in vitro*. Los modelos de isquemia *in vitro* consisten en la incubación de los cultivos celulares en medios carentes de oxígeno y/o glucosa para reproducir la interrupción del aporte de oxígeno y nutrientes al parénquima cerebral que sucede durante un episodio isquémico. Si se mantiene la glucosa se trata de experimentos en condiciones de anoxia (o hipoxia) mientras que si se elimina la glucosa se denomina modelo de privación de oxígeno y glucosa (POG) [24,66] que ha sido el modelo de isquemia *in vitro* utilizado en este trabajo. Los cultivos neuronales se obtienen de embriones de ratas o ratones entre el día embrionario 15 y 17 (E15-17) y los de astrocitos de animales neonatos de 1 o 2 días (día postnatal P1-P2) [74,75]. Los astrocitos representan alrededor del 50% de la población celular del cerebro adulto y además de

proporcionar soporte estructural, metabólico y trófico a las neuronas se va dilucidando su rol de protección neuronal frente a estímulos nocivos así como su contribución a angiogénesis, plasticidad neuronal y recuperación funcional en los días y semanas siguientes a un ictus [76]. Por lo tanto estudiar los distintos tipos celulares en condiciones *in vitro* es importante para entender su función e implicación en la patología del ictus.

1.4 EXCITOTOXICIDAD Y GLT-1/EAAT2: GCF2/LRRFIP1 NUEVA PROTEÍNA DE INTERÉS

Como se ha descrito en el apartado 1.2.1.1 de esta sección, la liberación de glutamato es el proceso primario de la cascada de reacciones moleculares que se desencadenan como consecuencia de la isquemia y que pueden actuar de manera secuencial o simultánea potenciando la muerte retardada de las células adyacentes y distantes a la zona central de necrosis. Este fenómeno, conocido como excitotoxicidad, fue descrito por Olney *et al.*, para referirse a la neurodegeneración promovida por aminoácidos excitadores [77]. El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del SNC y está implicado en transmisión sináptica rápida y en procesos fisiológicos más complejos como memoria, aprendizaje, plasticidad y muerte neuronal. Se sintetiza en el citoplasma y se almacena en vesículas sinápticas gracias a la actividad de los transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTs, *Vesicular glutamate transporters*) [78]. En sinapsis inactivas las concentraciones extracelulares de glutamato son de rango nanomolar, pero la estimulación de la liberación de glutamato en las terminales presinápticas hace que esta concentración aumente hasta un rango milimolar [79]. Para detener la acción del glutamato y mantener sus niveles extracelulares por debajo de niveles tóxicos para las células actúan los transportadores de aminoácidos excitadores sodio (Na⁺) dependientes, que debido a su elevada afinidad por el glutamato, lo eliminan rápidamente del medio extracelular. Se conocen cinco subtipos de transportadores de aminoácidos excitadores. En humanos a estos transportadores se les ha denominado EAATs (*Excitatory amino acid transporter*) (EAAT1-5), mientras que en el resto de mamíferos la nomenclatura para EAAT1-3 es diferente y se denominan: GLAST (*Glutamate aspartate transporter*), equivalente a EAAT1 humano [80], GLT-1 (*Glutamate transporter 1*), equivalente a EAAT2 humano [81] y EAAC1 (*Excitatory amino acid carrier 1*), equivalente a EAAT3 humano [82]. GLAST se localiza principalmente en la membrana plasmática de células gliales y es el transportador de glutamato que aparece durante el desarrollo del SNC. En el adulto aparece en la glía del cerebelo y con menor expresión en el resto del cerebro y en la médula espinal [83]; GLT-1 se localiza en la membrana plasmática de la astrogliya y se

expresa después del nacimiento [81]; EAAC1 es un transportador neuronal con elevada expresión en membranas de neuronas post-sinápticas [82]; EAAT4 tiene una expresión limitada a las células de Purkinje del cerebelo [84]; y por último, EAAT5 se expresa en células ganglionares de la retina [85]. De todos ellos, el principal transportador de glutamato es GLT-1/EAAT2, presente en astrocitos y responsable del 90% de la recaptación de glutamato en cerebro adulto [78] (Figura 1.8).

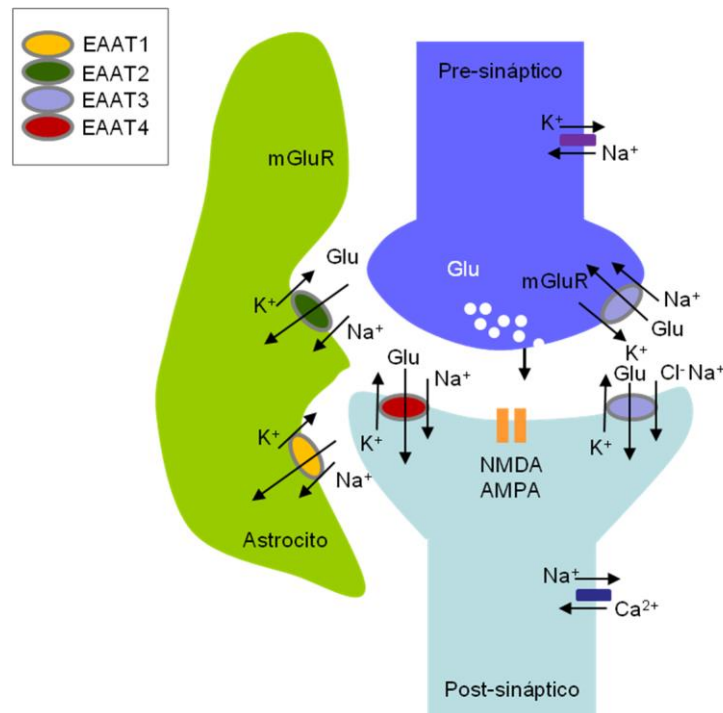


Figura 1.8. Localización celular de los EAATs (Modificado de Maragakis and Rothstein, 2001 [86]).

El funcionamiento óptimo de GLT-1/EAAT2 es esencial para minimizar el daño neuronal tras un ictus ya que la isquemia cerebral induce regulación a la baja (*downregulation*) de este transportador, lo que contribuye a la muerte neuronal [87,88]. En la regulación de la expresión de *GLT-1/EAAT2* participan mecanismos transcripcionales, post-transcripcionales y/o post-traduccionales, pero el mecanismo exacto de regulación se desconoce [78]. Recientemente se ha descrito que la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR regula la expresión de este transportador en astrocitos [89] y a nivel transcripcional se sabe que sus regiones promotoras presentan elementos bien definidos como son los elementos-cis (caja TATA y CAAT) y varias secuencias consenso para diferentes FTs como Sp1, Nf- κ B o NFAT entre otros [90]. Con esta base, nuestro grupo se planteó hace años dentro de sus líneas de

investigación, la posible identificación de polimorfismos funcionales en el promotor del gen *GLT-1/EAAT2* en pacientes de ictus, partiendo de la hipótesis de una susceptibilidad genética individual al daño excitotóxico en base a que (1) los niveles de glutamato en plasma y líquido cefalorraquídeo (LCR) en los pacientes con ictus isquémico que sufrían deterioro neurológico temprano eran 3 veces superiores a los niveles en los pacientes que se mantenían estables o mejoraban [91] y, por otro lado, que (2) los niveles de glutamato detectados en el momento del ingreso se mantenían elevados hasta las 24 horas de evolución en aquellos pacientes con deterioro neurológico en las 48 horas siguientes al inicio de la isquemia, mientras que volvían a valores dentro de la normalidad en las primeras 6 horas desde el inicio de la isquemia en pacientes que no se deterioraban [92]. Como resultado de la investigación llevada a cabo, nuestro grupo identificó un nuevo polimorfismo en el promotor del gen *GLT-1/EAAT2* consistente en un cambio de adenina (A) por citosina (C), 181 pares de bases (pb) antes del inicio de la transcripción, que presenta una prevalencia comparable entre sujetos sanos y pacientes de ictus, lo que sugiere que no se trata de un polimorfismo de susceptibilidad a sufrir un ictus. La presencia del polimorfismo se asoció a concentraciones más elevadas de glutamato plasmático al ingreso y a las 24 horas de evolución, y a una mayor frecuencia de deterioro neurológico de los pacientes. El análisis bioinformático de la región promotora que incluye el polimorfismo puso de manifiesto que la secuencia que contiene el polimorfismo corresponde a un sitio de unión putativo del FT regulador AP-2 (*Activator protein-2*) y que el polimorfismo elimina esta secuencia y crea una nueva secuencia consenso de unión del FT GCF2 (*GC-binding factor 2*) o LRRFIP1 (*Leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1*) [93]. AP-2 es un FT activador inducible por ácido retinoico que se expresa durante el desarrollo cerebral y en tejido adulto [94,95]. Por su parte, GCF2/LRRFIP1 es un factor represor de la transcripción, entre otras funciones, que se expresa en la mayoría de tejidos humanos, siendo su expresión más elevada en leucocitos [96]. En el apartado 1.4.1 se describe la información disponible sobre *GCF2/LRRFIP1* en detalle.

El análisis de la funcionalidad del polimorfismo identificado mediante experimentos *in vitro* y de la expresión de *Gcf2/Lrrfip1* en cerebro de rata isquémico mostró los siguientes resultados. Por un lado, el polimorfismo disminuía la actividad del promotor (Figura 1.9A), lo que se puede correlacionar con menor expresión de EAAT2 y concentraciones más elevadas de glutamato en los pacientes con el genotipo mutado. Por su parte, *Gcf2/Lrrfip1* se sobreexpresaba tras isquemia experimental (Figura 1.9B) en corteza cerebral y núcleo estriado (núcleo subcortical localizado en el límite inferior de los ventrículos laterales) de cerebro de rata sometida al modelo de oclusión permanente de la arteria cerebral media

(pMCAO) a las 2 y 24 horas después de la oclusión. En cambio, no se detectó expresión de la proteína ni en corteza ni en estriado de rata *sham* (rata control en la que se expone la ACM pero no se ocluye) (Figura 1.9B) [93].

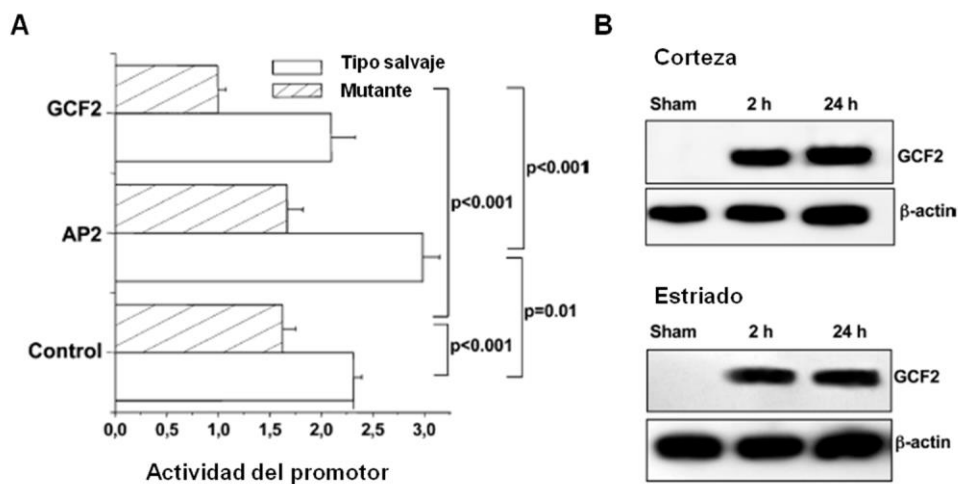


Figura 1.9. Análisis de la funcionalidad del polimorfismo -181A/C en el promotor de EAAT2 y análisis de la expresión de Gcf2/Lrrfip1 en cerebro isquémico. (A) Actividad de las construcciones del promotor salvaje y mutado de EAAT2 transfectadas en cultivos de astrocitos de rata corticales, solos o cotransfectados con AP2 o GCF2. (B) Expresión de GCF2 en corteza y estriado de ratas sham y 2 y 24h después de la pMCAO (Modificado de Mallolas J *et al.*, 2006 [93]).

1.4.1 Gcf2/Lrrfip1

GCF2/LRRFIP1 pertenece a una pequeña familia de proteínas cuya función y regulación han sido poco estudiadas [97]. Se sabe que este gen codifica diferentes isoformas en humano y ratón que parecen estar diferencialmente reguladas [96,98,99,100,101]. GCF2/LRRFIP1 tiene una expresión ubicua [96,98] y se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma, según la línea celular y la condición estudiada [96,97,102,103,104,105].

En humano el gen *LRRFIP1* se localiza en la región 2q37.3 y codifica como mínimo cinco isoformas, de las cuales se han estudiado tres, denominadas GCF2 (isoforma 5 en la base de datos NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)), LRRFIP1 (isoforma 3 en NCBI) y TRIP (*TAR RNA interacting protein*) (isoforma 4 en NCBI). Para cada una de ellas se han descrito diferentes funciones: (1) GCF2 es represor transcripcional del receptor EGFR (*Epidermal growth factor receptor*), del virus SV40 (*Simian virus 40*), del virus RSV (*Rous sarcoma virus*) [100], de TNF α [101], de Igf2 (*insulin-like growth factor 2*) [106] y del

promotor polimórfico de EAAT2 [93]; (2) LRRFIP1 es un sensor intracelular de patógenos y modulador de la respuesta inmunitaria innata independientemente de los TLRs [97,107]; y (3) TRIP es una proteína de unión a RNA y posible regulador de la traducción de mRNA, y se postula que su función concreta es estabilizar los transcritos mientras son dirigidos a regiones subcelulares específicas donde el producto de traducción es necesario [98,105]. Los dominios y características descritas en estas tres isoformas son: (1) una señal putativa de localización nuclear (NLS, *Nuclear localization signal*) [100], (2) un dominio de unión a DNA [96], (3) un dominio de unión a RNA [105], (4) un dominio de interacción con el dominio PDZ (acrónimo de PSD-95, DLG, ZO1) de la fosfoproteína citoplasmática Dvl3 (*Dishevelled Segment Polarity Protein 3*), molécula clave en la cascada de señalización Wnt [102,108] y (4) una región de unión a repetición rica en leucina (*LRR-binding region*), presente en el dominio que forma una estructura tipo hélice superenrollada (*coiled-coil*), que permite la interacción con Fli-1 (*Flightless-1*), proteína de unión a actina y reguladora del citoesqueleto [98,99,105], a través de su motivo LRR [98]. Los motivos o dominios LRR se encuentran conservados en la mayoría de organismos y están normalmente implicados en interacciones proteína-proteína. Muchas de estas proteínas son moléculas de adhesión, receptores o factores de transducción de señal [98]. En la isoforma LRRFIP1 se ha identificado también un dominio de unión de RNA de doble cadena [107]. La secuencia de aminoácidos de GCF2 indica la presencia de sitios potenciales de fosforilación por quinasas dependientes de cAMP, calcio y tirosina y puntos de N-glicosilación [100] responsables de modificaciones post-traduccionales. Otras proteínas con las que se ha descrito que pueden interaccionar las distintas isoformas de LRRFIP1 son TLR3, un sensor innato de infección viral [107] y DBN1 (*Drebrin 1*), implicado en la formación de espinas dendríticas y en la estabilización de ZO (*zonula occludens, tight junctions*) [108,109]. A través de todas las posibles interacciones y según la respuesta detectada a distintos estímulos (NGF (*Nerve growth factor*), PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*)), se considera que todas o individualmente cada una de las isoformas puede tener un rol regulador sobre la diferenciación y la proliferación celular [105,108,110,111], la reorganización del citoesqueleto (migración, morfología celular) y las vías de transducción de señal [97,102,108].

En relación con patología humana, *GCF2/LRRFIP1* ha sido identificado como uno de los genes asociados con cáncer [112] que promueve invasión celular y metástasis a través de la activación RhoA (*Ras homolog gene family, member A*) [97,102,113] y, por otro lado, polimorfismos del gen se han asociado con infarto de miocardio [108], adiposidad e inflamación [114].

El gen *Lrrfip1* de ratón se localiza en la región 1D del cromosoma 1 y codifica como mínimo tres isoformas de las que se han estudiado dos, denominadas Flap-1 (*Fli-1 leucine-rich repeat associated protein 1*) (isoforma 2 en NCBI) y *Lrrfip1* (isoforma 1 en NCBI). La primera, Flap-1, interacciona con Fli-1 y con Myd88 (*Myeloid differentiation factor 88*) y regula positivamente la respuesta inmunitaria TLR y la activación de NF- κ B a través de su interacción con Myd88 [99,100,107,115]. Esta isoforma presenta en su secuencia una región característica rica en serina (*Serine-rich region*; PS50324). Por otro lado, *Lrrfip1* ha sido descrito como un sensor intracelular de patógenos que regula la respuesta inmunitaria innata a través de una vía dependiente de β -catenina [104]. Ambos, Flap-1 y *Lrrfip1*, promueven la activación de β -catenina y *Lrrfip1* induce su fosforilación en Ser552 [104,116]. Dado que la activación de la quinasa Akt resulta en la fosforilación de β -catenina en Ser552 [117], se ha postulado que la vía fosfatidilinositol-3-OH-Akt puede estar implicada en la activación de β -catenina corriente abajo (*downstream*) de *Lrrfip1* [118].

Por último, el gen *Lrrfip1* de rata se localiza en la región 9q36. No se dispone de información acerca de las posibles isoformas ni se ha caracterizado la proteína. En cuanto a su expresión y función, además de nuestro trabajo en que describimos su sobreexpresión en isquemia cerebral [93], hasta el momento sólo otro trabajo ha descrito una inducción de su expresión por daño arterial, en un modelo *in vitro* de daño mecánico en células vasculares endoteliales y en un modelo *in vivo* de daño por cateterismo de la arteria carótida, y le atribuye la función de represor transcripcional del factor PDGF-A (*Platelet-derived growth factor alpha chain*) [110].

Por tanto, *LRRFIP1* aparece como un gen de interés a través del cual distintas isoformas pueden modular múltiples vías de señalización implicadas en daño y recuperación cerebral después de un ictus, como por ejemplo la neuroinflamación y el daño cerebral isquémico inducido por la señalización TLR [119] o la neurogénesis post-ictus inducida por la señalización β -catenina [120]. A pesar de que se ha descrito la sobreexpresión de *Lrrfip1* en isquemia cerebral [93], su expresión y función cerebral no han sido estudiadas.

1.5 ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA

Como se ha comentado en el apartado 1.2.3 de esta sección, la isquemia focal es un potente estímulo que provoca una respuesta cerebral a través de cambios en la expresión de múltiples genes [45,46]. El análisis de estos genes diferencialmente regulados por el insulto isquémico mediante estudios de expresión génica permite la identificación de nuevos marcadores y, con ello, de potenciales dianas terapéuticas. Una de las técnicas

ampliamente utilizadas para los estudios de expresión génica es la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) cuantitativa a tiempo real (qPCR), desarrollada en el año 1992 por Higuchi y colaboradores [121], que consiste en una PCR en la que se puede cuantificar el producto que se está amplificando durante la reacción gracias a la monitorización de la fluorescencia generada por los fluorocromos introducidos en la reacción de amplificación. Sus ventajas son su sensibilidad, la detección en tiempo real del progreso de la reacción, la velocidad de análisis y la medición precisa del mRNA presente en la muestra, incluso de genes con niveles de expresión muy bajos [122]. Sin embargo, para conseguir el máximo potencial analítico de esta técnica y resultados fiables es imprescindible utilizar los métodos de normalización adecuados y validar los resultados. La cuantificación de la expresión génica puede realizarse en términos absolutos o relativos. Para la normalización, en los estudios de cuantificación absoluta debe utilizarse una recta patrón preparada con una dilución seriada de una solución de concentración conocida. En cambio, en los estudios de cuantificación relativa respecto a un control de la condición experimental testada, el resultado se obtiene en relación a un gen control, gen de referencia o control endógeno que permite normalizar de manera efectiva las diferencias entre las muestras analizadas debidas a errores o variaciones durante la preparación o procesamiento de las muestras [123]. En los estudios de expresión génica en respuesta a una condición experimental, como es la isquemia, la cuantificación relativa de la expresión génica mediante qPCR es un método ampliamente utilizado, ya sea para el estudio de genes específicos de interés o para la validación de resultados obtenidos mediante *microarrays* [124,125].

El gen control endógeno ideal debería ser uno cuyo mRNA tuviese una expresión constante en todas las muestras de estudio, independientemente del tipo de tejido, enfermedad, medicación o condición experimental, y a su vez, debería tener niveles de expresión comparables con el gen en estudio [126,127]. Por tanto, este gen debería únicamente reflejar la variabilidad debida a imperfecciones de la tecnología utilizada y del procesamiento de muestras. A pesar de que inicialmente se consideró que los genes básicos del metabolismo, denominados genes *Housekeeping*, que por definición están implicados en procesos esenciales de supervivencia celular y deben expresarse de forma estable y no regulada, cumplieran todas estas condiciones, no existe un gen de referencia ideal. A partir de la evaluación de distintos genes se ha demostrado que la idoneidad de un gen de referencia en particular depende del tipo de insulto, lesión y condición experimental aplicada al cultivo celular o al animal experimental [123,128,129]. Por tanto, la selección de controles endógenos candidatos a partir de estudios previos similares y su evaluación y validación es

imprescindible antes de utilizarlos en cada caso individual para evitar imprecisiones que pueden surgir de la utilización de genes de referencia inadecuados [123,126,128,130,131,132]. Se recomienda utilizar un mínimo de dos genes control para evitar errores de normalización relativamente grandes y aumentar la resolución y precisión de los resultados. Asimismo se han desarrollado aproximaciones estadísticas y algoritmos para elegir la pareja óptima de genes de referencia [123].

1.5.1 Controles endógenos en modelos experimentales de isquemia cerebral

Hasta el momento, no se han descrito controles endógenos validados para el modelo de isquemia *in vitro* de POG. En cambio, para el modelo *in vivo* de MCAO se aceptan como genes control los genes *Gapdh* (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) [128,133,134], *Ppia* (*Peptidyl-prolyl cis-trans isomerasa*) [133,134,135], *Rpl13a* (*Ribosomal Protein L13A*) [135] y *Hprt* (*Hypoxanthine phosphoribosyltransferase*) [128].

Otros genes de referencia validados para otras condiciones experimentales en cerebro o patología isquémica o ampliamente utilizados que podrían ser controles endógenos válidos para los modelos de isquemia experimental utilizados en esta tesis son β 2m (*Beta-2 microglobulin*) [136], *18S rRNA* (*18S ribosomal RNA*) [136], *Gusb* (*Glucoronidase B*) [137], *Sdha* (*Succinate dehydrogenase complex, subunit A*) [126,137,138], *Ywhaz* (*Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide*) [126,138] y *Oaz1* [139] (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Genes validados como controles endógenos en modelos de isquemia cerebral *in vivo* y posibles nuevos candidatos para este modelo y el modelo de isquemia experimental *in vitro*.

Gen	Validado como control endógeno	Referencias
<i>Hprt</i>	Isquemia cerebral <i>in vivo</i>	[128]
<i>Ppia</i>	Isquemia cerebral <i>in vivo</i>	[133,134,135]
<i>Rpl13a</i>	Isquemia cerebral <i>in vivo</i>	[135]
<i>Gapdh</i>	Isquemia cerebral <i>in vivo</i>	[128,133,134]
<i>β2m</i>	Fibroblastos estimulados con suero	[136]
18S rRNA	Fibroblastos estimulados con suero	[136]
<i>Gusb</i>	Daño traumático cerebral	[137]
<i>Sdha</i>	Tejido cerebral humano, daño traumático cerebral y modelo de paro cardíaco por asfixia en rata	[126,137,138]
<i>Ywhaz</i>	Tejido cerebral humano y modelo de paro cardíaco por asfixia en rata	[126,138]
<i>Oaz1</i>	Metanálisis de muestras humanas. Sugerido como adecuado en condiciones experimentales que conllevan un elevado recambio proteico	[139]

1.6 MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

A pesar del gran número de moléculas descritas que se sobreexpresan o reducen su expresión después de la isquemia cerebral, se sabe poco acerca de los mecanismos que regulan la expresión de las mismas. El rol de los FTs en la regulación de la expresión génica está ampliamente estudiado [140,141,142,143,144] y, como se ha comentado en el apartado 1.2.1.4, la isquemia cerebral estimula la expresión de FTs como NF-κβ o HIF-1 implicados en la activación de genes pro-inflamatorios [24,36]. Sin embargo, mediante una aproximación computacional, combinando la información de resultados de análisis de microarray en un modelo murino de ictus y la detección *in silico* de sitios de unión de FTs en las regiones promotoras de los genes del array, se ha demostrado que no siempre existe una relación directa entre los FTs y sus genes diana [145], lo que indica que mecanismos reguladores a nivel post-transcripcional, como los microRNAs (miRNAs), pueden estar también implicados en la regulación de la expresión.

1.6.1 miRNAs

Los miRNAs son una familia de RNAs de pequeño tamaño no codificantes y altamente conservados, desde los organismos invertebrados hasta los vertebrados, identificados como potentes reguladores post-transcripcionales de la expresión génica [146,147]. Se trata de moléculas de RNA endógenas de cadena sencilla, de entre 18 y 25 nucleótidos, que regulan la síntesis de proteínas por emparejamiento de bases al extremo 3'UTR (*untranslated region*) de sus mRNA dianas [147]. Se ha predicho que los miRNAs controlan la actividad de más del 60% de todos los genes codificantes de proteínas, ya sea mediante represión de la traducción y/o deadenilación y posterior degradación del mRNA diana, o mediante la activación de la traducción del mRNA en ciertas condiciones celulares o dependiendo de la etapa del ciclo celular [148,149,150]. Un mRNA puede ser diana de múltiples miRNAs distintos, a la vez que cada uno de estos miRNAs tiene la capacidad de regular la expresión de cientos e incluso miles de mRNAs.

Los miRNAs son transcritos principalmente de regiones intrónicas por la RNA polimerasa II generando un transcrito primario precursor (pri-miRNAs) de varias kilobases (kb) de longitud que muestran una estructura horquilla en lazo (*stem-loop*), donde se encuentran las secuencias de los miRNAs maduros. En el núcleo, el enzima nuclear RNAasa III Drosha reconoce esta estructura y la procesa con ayuda de la proteína DGCR8 (*DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8*), generando precursores intermedios con una morfología de horquilla (*hairpin*) denominados pre-miRNAs (60-80 pb). Los pre-miRNAs pasan al citoplasma en un proceso mediado por la proteína Exportina 5 y allí otro enzima RNAasa III, Dicer, los reconoce y corta el bucle del extremo, liberando un fragmento de doble cadena de aproximadamente 21 nucleótidos. Una de las dos hebras de este dúplex de RNA se une a la proteína AGO2, de la familia de proteínas de unión a RNA Ago (*Argonaute*), para generar el complejo multiproteico efector denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*), miRISC o miRNP (*miRNA ribonucleoprotein complex*) mientras que la otra cadena es degradada. El complejo miRISC usa el miRNA como guía para asociarlo con las regiones 3'UTR de sus mRNAs diana con una secuencia complementaria a la del miRNA. Si la complementariedad es perfecta AGO2 junto con la proteína de andamiaje (*scaffolding protein*) GW182 (denominada así debido a su peso molecular y a la presencia de repeticiones de glicina (G) y triptófano (W)), y otros componentes del complejo miRISC, promueve la rotura/corte del mRNA, mientras que si es imperfecta inhibe la traducción y en algunos casos promueve la deadenilación, con la consiguiente degradación del mRNA, en células proliferativas. En cambio, en células quiescentes se ha descrito que los niveles de la proteína GW182 disminuyen drásticamente y AGO2 forma complejo con la proteína FXR1 (*Fragile-X mental*

retardation related protein 1), junto con otros componentes del miRISC, promoviendo la activación de la traducción cuando la complementariedad es imperfecta [147,149] (Figura 1.10).

Desde el descubrimiento de los primeros miRNAs endógenos, *lin-4* y *let-7* en *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) [151,152] muchos han sido los miRNAs identificados en humanos y los diferentes estudios realizados indican que estos elementos reguladores juegan un papel fundamental en muchos procesos biológicos como el desarrollo [153], la diferenciación y la proliferación celular [154], o en procesos patológicos.

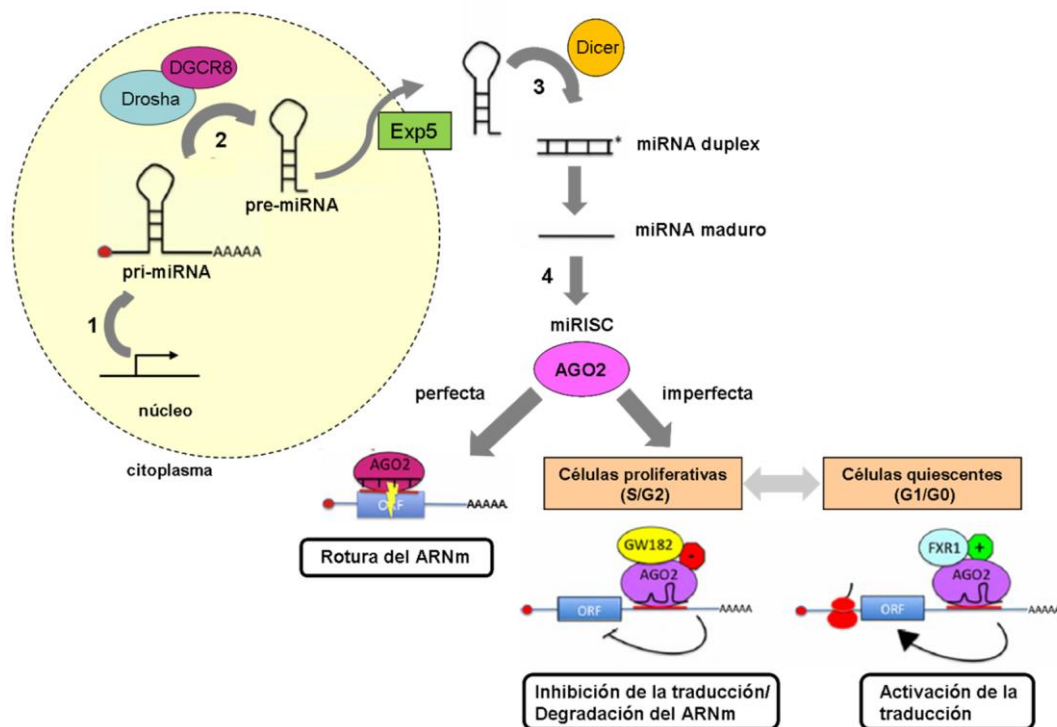


Figura 1.10. Biogénesis y mecanismo de acción de los miRNAs. * indica la cadena de RNA degradada (Modificado de Breving and Esquela-Kerscher, 2010 [150]).

1.6.1.1 miRNAs en el ictus y en la isquemia cerebral experimental

Los miRNAs son abundantes en el SNC donde se ha identificado que tienen patrones de expresión espacio-temporales específicos y de tipo celular y desempeñan un papel clave en el desarrollo y la función cerebrales [155,156]. El análisis del perfil de expresión de los miRNAs en estudios pre-clínicos y clínicos ha demostrado que los miRNAs se expresan diferencialmente en sangre y cerebro después de un ictus isquémico [157,158,159,160,161]

y en preconditionamiento isquémico [162,163] lo que sugiere que pueden jugar un papel significativo en la regulación de los mecanismos activados tras un ictus a través de sus genes diana a la vez que ser útiles como biomarcadores.

A nivel clínico se ha realizado un estudio que ha analizado el perfil de expresión de miRNAs en sangre de controles y pacientes jóvenes con ictus en población asiática. Este trabajo ha demostrado que existe una expresión diferencial sanguínea de los miRNAs en respuesta a la isquemia cerebral y los miRNAs diferencialmente expresados se han relacionado con distintos procesos celulares que incluyen angiogénesis, función endotelial, función neuronal, hipoxia o respuesta inmune, entre otros. A su vez, se detectaron diferentes patrones de expresión en los pacientes respecto a los controles que se podían clasificar según etiología y pronóstico del paciente, dando soporte al uso de los miRNAs como biomarcadores diagnósticos en una patología con diferentes etiologías como es el ictus isquémico [161].

Respecto a los estudios pre-clínicos, durante el tiempo de realización de esta tesis, varios trabajos han demostrado la expresión diferencial de los miRNAs en respuesta a la lesión isquémica en modelos de isquemia focal *in vivo* [157,158,159] e *in vitro* [160].

El estudio *in vitro* ha demostrado que los perfiles de expresión de los miRNAs en respuesta a la POG difieren significativamente según el tipo celular y están regulados en el tiempo, lo que sugiere su implicación en la respuesta celular a la lesión isquémica. En concreto, se ha analizado el perfil de expresión de miRNAs en neuronas y astrocitos en un curso temporal de 0 a 24h, y en dicho análisis se ha demostrado que en ambos tipos celulares los miRNAs miR-21 y miR-29b aumentan (con magnitudes y cursos temporales distintos según el tipo celular) mientras que el miR-30b, el miR-107 y el miR-137 no varían su expresión en neuronas y en cambio aumentan en astrocitos [160].

Los estudios *in vivo* realizados hasta el momento han analizado mediante arrays los perfiles de expresión de los miRNAs en cerebro de rata isquémico, y en algún caso a nivel sanguíneo, en distintos cursos temporales en la fase aguda y subaguda de la isquemia cerebral. Estos trabajos han demostrado que los miRNAs están activamente regulados por la isquemia cerebral, mostrando distintos patrones de expresión temporales durante la respuesta isquémica, y que son potenciales biomarcadores sanguíneos de daño cerebral, ya que miRNAs con expresión aumentada o disminuida en cerebro isquémico también se han detectado a nivel sanguíneo [157,158,159]. Mientras que la expresión de los miRNAs se modifica por la isquemia, ésta no altera la expresión de proteínas implicadas en la biogénesis de estos pequeños RNAs, como Drosha o Dicer, lo que da mayor soporte al papel regulador de los miRNAs en la isquemia cerebral [157]. Por otro lado, mediante la predicción de mRNA dianas se ha determinado que estas dianas codifican para genes

inflamatorios, FTs, HSPs, factores de crecimiento, canales iónicos y receptores de neurotransmisores que se han mostrado alterados después de la isquemia cerebral [157] y para alguno de los miRNAs se confirmó que la expresión de sus mRNA dianas estaba regulada en paralelo. Así, la disminución de los miRNAs miR-132 y miR-338 después de la MCAO se correlacionó con un aumento de expresión de sus respectivas dianas, MMP-9 y transgreлина [158]. Por último, Liu *et al.*, ha demostrado que la expresión de los miRNAs en cerebro y sangre es distinta en función del daño cerebral producido y ha identificado un miRNA en sangre (miR-298) y uno en cerebro (miR-155) con la misma regulación en todas las condiciones experimentales analizadas (isquemia cerebral, hemorragia cerebral o estatus epiléptico), por lo que se considera que a través de su estudio y el de sus dianas se pueden identificar mecanismos comunes de daño en los distintos procesos patológicos [159].

Además de estos estudios en los que se ha explorado la expresión temporal de los miRNAs, otros trabajos han definido la función de miRNAs específicos en el daño isquémico cerebral. Algunos ejemplos son, (1) el miR-21, que protege las neuronas de la muerte celular apoptótica inducida por la POG [164], (2) el miR-497, que promueve la muerte neuronal isquémica y su inhibición resulta en disminución del volumen de infarto y mejora del déficit neurológico inducido por la MCAO [165], o (3) el miR-15a, que promueve la disrupción de la BHE [166]. Son muchos los miRNAs descritos regulados por la isquemia cerebral, por lo que quedan muchos por explorar y definir su función.

Ante la regulación espacio-temporal demostrada en la expresión de los miRNAs y, ya que la respuesta fisiopatológica del ictus puede durar incluso semanas o meses, sería interesante evaluar su perfil de expresión más allá del curso temporal estudiado hasta el momento después de la lesión isquémica (máximo de 72h). La identificación de miRNAs implicados en la regulación de los mecanismos de daño y reparación activados después de un ictus, la elucidación de la importancia funcional de miRNAs específicos en la respuesta isquémica, y el estudio de los potenciales mRNA dianas puede aumentar nuestro conocimiento de la fisiopatología del ictus y conducir a la identificación de nuevas dianas terapéuticas con el fin de minimizar el deterioro neurológico y mejorar la recuperación funcional de los pacientes.

2. HIPÓTESIS

La isquemia cerebral es una enfermedad compleja y un potente inductor de la expresión génica. Sin embargo, a pesar del gran número de genes que varían su expresión en respuesta a la isquemia, poco se conoce acerca de los mecanismos que regulan esta expresión. Los estudios de expresión génica, así como el estudio de sus mecanismos reguladores, permiten la identificación de nuevos marcadores y potenciales dianas terapéuticas y la comprensión de las diferentes vías moleculares implicadas en esta patología.

1- La normalización de los resultados de expresión relativa mediante qPCR utilizando controles endógenos o genes de referencia adecuados es un prerequisite crucial para obtener conclusiones fiables sobre los cambios en la expresión génica inducidos por la isquemia cerebral. Se ha demostrado que la idoneidad de estos genes control depende del tipo de insulto, lesión y condición experimental testada. Mientras que se han descrito controles endógenos válidos para diferentes modelos de isquemia cerebral *in vivo*, entre ellos el modelo *in vivo* de oclusión permanente de la arteria cerebral media (pMCAO), para el modelo *in vitro* de privación de oxígeno y glucosa (POG) en cultivo primario de astrocitos corticales, no existen genes de referencia validados. Proponemos que para cada modelo de isquemia (pMCAO y POG) o condición experimental (transfección de siRNAs y miRNAs y modelo de apoptosis) utilizado en esta tesis doctoral los genes de referencia pueden ser distintos y es necesaria su evaluación y validación a pesar de que existan controles endógenos previamente descritos.

2- Nuestro grupo describió la sobreexpresión de *Gcf2/Lrrfip1* en isquemia cerebral, gen para el que se han descrito distintas isoformas con distintas funciones en humano y ratón pero poco estudiado y para el que se desconoce su rol preciso en cerebro. Proponemos que *Gcf2/Lrrfip1* puede ser un nuevo gen de interés en la respuesta a isquemia cerebral a través del cual distintas isoformas pueden modular múltiples vías de señalización implicadas en esta patología.

3- Diferentes trabajos han mostrado la expresión diferencial en la fase aguda de la respuesta isquémica cerebral de los miRNAs, potentes reguladores post-transcripcionales de la expresión génica. Proponemos que los miRNAs están diferencialmente regulados en la isquemia cerebral en función del tiempo de evolución de la isquemia cerebral y que a través

HIPÓTESIS

del análisis de sus mRNAs diana se pueden identificar nuevas proteínas posiblemente implicadas en la fisiopatología del ictus.

3. OBJETIVOS

Para comprobar las hipótesis planteadas nos fijamos los siguientes objetivos:

1- Definir los genes de referencia válidos para los estudios de expresión génica en nuestros modelos experimentales de isquemia: modelo *in vivo* de oclusión permanente de la arteria cerebral media (pMCAO) de rata y modelo *in vitro* de privación de oxígeno y glucosa (POG) en cultivo primario de astrocitos corticales

Para ello nos fijamos como objetivos concretos:

1.1- Validar los controles endógenos previamente descritos para modelos de isquemia experimental *in vivo* en el modelo de rata sometida a pMCAO y definir y validar nuevos genes de referencia óptimos para este modelo experimental.

1.2- Definir y validar los controles endógenos óptimos para el modelo de isquemia experimental *in vitro* en cultivo primario de astrocitos corticales sometidos a POG.

2- Caracterizar el gen *Gcf2/Lrrfip1* en cerebro de rata en condiciones de isquemia cerebral y analizar su posible función en esta patología.

Para ello nos fijamos los siguientes objetivos concretos:

2.1- Identificar y caracterizar las variantes transcripcionales de *Gcf2/Lrrfip1* expresadas en corteza cerebral de rata en condiciones normales.

2.2- Definir los perfiles de expresión temporales de los transcritos e isoformas identificadas y su localización celular y subcelular en corteza cerebral de rata tras pMCAO mediante qPCR, *western blot* e inmunohistofluorescencia.

2.3- Definir los perfiles de expresión temporales de los transcritos e isoformas identificadas y su localización subcelular en cultivo de astrocitos corticales tras POG mediante qPCR, *western blot* e inmunocitofluorescencia.

2.4- Identificar genes diana de *Gcf2/Lrrfip1* y analizar *in vitro* la posible función de *Gcf2/Lrrfip1* en isquemia cerebral mediante silenciamiento con siRNAs en cultivo de astrocitos.

2.4.1- Seleccionar genes diana putativos de *Gcf2/Lrrfip1* a partir de la información disponible en la bibliografía.

2.4.2-Establecer las condiciones óptimas de transfección de los siRNAs.

2.4.2-Definir los controles endógenos óptimos para los análisis de expresión génica para esta condición experimental.

2.4.3- Analizar el efecto de la silenciamiento de *Gcf2/Lrrfip1* sobre la expresión de los genes diana identificados y sobre la recaptación de glutamato.

3- Definir el perfil de expresión temporal de los miRNAs desde la fase aguda hasta la fase tardía de la isquemia en el modelo pMCAO para identificar miRNAs específicamente relacionados con esta patología, elucidar sus roles e identificar posibles dianas de estos miRNAs implicadas en la fisiopatología del ictus:

3.1- Analizar los perfiles de expresión temporales de los miRNAs en corteza cerebral de rata tras pMCAO mediante ensayo de expresión multiplex FlexmiR.

3.2- Identificar los controles endógenos óptimos y validar los perfiles de expresión de los miRNAs mediante qPCR.

3.3- Predecir dianas de los miRNAs diferencialmente expresados tras isquemia focal y analizar *in silico* la función de dichas dianas.

3.4- Analizar los perfiles de expresión temporal de las dianas seleccionadas en corteza cerebral tras pMCAO mediante qPCR y *western blot*.

3.5- Analizar *in vitro* la posible función de miRNAs diferencialmente expresados tras isquemia focal y validar sus dianas putativas mediante técnicas de inhibición/sobreexpresión de miRNAs en cultivos primarios corticales.

3.5.1-Establecer las condiciones óptimas de transfección para la inhibición/sobreexpresión de miRNAs.

3.5.2-Definir los controles endógenos óptimos para los análisis de expresión génica para esta condición experimental.

3.5.3-Analizar el efecto de la inhibición/sobreexpresión de miRNAs diferencialmente expresados sobre la viabilidad celular y sobre la expresión de sus putativas dianas.

4. METODOLOGÍA

4.1 HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

4.1.1 Pubmed

Toda la bibliografía utilizada en esta tesis se obtuvo de Pubmed, una de las bases bibliográficas más completas en el área biomédica. Cubre las áreas de medicina, oncología, enfermería, odontología, veterinaria, salud pública y ciencias preclínicas. PubMed comprende más de 24 millones de citas de la literatura biomédica de MEDLINE, revistas de ciencias biológicas, y libros *online*, con una cobertura temporal desde 1831 y se actualiza diariamente (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

4.1.2 Ensembl/NCBI

Para la caracterización del gen *Lrrfip1* en corteza cerebral de rata (objetivo 2.1) se utilizaron como candidatos los transcritos conocidos y predicciones de *Ensembl Genome Browser* (Gene ID: ENSRNOG00000019892) (<http://www.ensembl.org/index.html>) [167] y Entrez Gene de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (Gene ID: 367314) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). Las predicciones de Ensembl se basan en evidencias experimentales recogidas en bases de datos públicas (UniProt/Swiss-Prot, UniProt/TrEMBL, NCBI RefSeq, cDNA en EMBL), llamados "*Ensembl known genes*", y en la similitud de secuencia de proteína o DNA complementario (cDNA) con especies relacionadas, "*Ensembl novel genes*". De *Entrez Gene* de NCBI se obtuvo la secuencia de referencia (RefSeq) y secuencias relacionadas (*Related Sequences*). Las secuencias relacionadas recogidas en NCBI son obtenidas mediante búsquedas con el programa BLAST, a partir de la secuencia de referencia, en bases de datos de secuencias o secuencias relacionadas vía *Entrez Nucleotide*, *Entrez Protein*, or BLink. Para nombrar los transcritos candidatos se ha utilizado la nomenclatura de Ensembl ENSRNOT (*Ensembl Rattus Norvegicus Transcript*) y el nombre adjudicado a cada transcrito en NCBI, CRA (de CRA_a a CRA_k).

4.1.3 Primer 3

Se trata de un programa ampliamente utilizado para el diseño de *primers* para PCR (<http://frodo.wi.mit.edu/>) [168]. Primer 3 se utilizó para el diseño de una batería de *primers* que permitió determinar cuáles de los transcritos de *Lrrfip1* recogidos en Ensembl y NCBI se expresan en corteza cerebral de rata (objetivo 2.1).

4.1.4 BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)

Herramienta bioinformática que identifica regiones similares entre secuencias de nucleótidos y aminoácidos. El programa compara las secuencias de nucleótidos o proteínas que introducimos con las secuencias existentes en las bases de datos y calcula la significación estadística de las similitudes (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Este programa se ha utilizado para comprobar que los *primers* diseñados para el análisis de *Lrrfip1* eran específicos para este gen y su idoneidad para la amplificación mediante PCR de los fragmentos de interés (objetivo 2.1).

4.1.5 *Translate and Compute pI/Mw tools*

Las herramientas *Translate* (<http://web.expasy.org/translate/>) y *Compute pI/Mw* (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html) de *Expasy (Expert Protein Analysis System)* se usaron para obtener la secuencia y número exacto de aminoácidos y los pesos moleculares teóricos de las isoformas de *Lrrfip1* identificadas en corteza cerebral de rata (objetivo 2.1). La herramienta *Compute pI/Mw* calcula el peso molecular de las proteínas mediante la suma de masas isotópicas promedio de los aminoácidos presentes en la proteína y la masa isotópica media de una molécula de agua (http://web.expasy.org/compute_pi/).

4.1.6 ClustalW2

Programa que permite la alineación múltiple de secuencias de nucleótidos o aminoácidos y calcula el mejor grado de alineación entre las secuencias mostrando el nivel de identidad, similitud y diferencia entre ellas (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Clustalw2 se ha utilizado para determinar (1) el grado de similitud entre los transcritos e isoformas identificadas de *Lrrfip1* en corteza cerebral de rata y con las variantes conocidas humanas y de ratón, (2) el grado de conservación en las isoformas de *Lrrfip1* identificadas de los dominios y características descritas en las isoformas conocidas humanas y de ratón y (3) los transcritos ortólogos en ratón analizados en el *Allen Mouse Brain Atlas*. Este *software* también se ha usado para alinear los productos de secuenciación de amplicones no esperados en las PCRs para la caracterización de *Lrrfip1* y determinar a que transcrito corresponden (objetivo 2.1).

4.1.7 **Allen Mouse Brain Atlas**

La base de datos de patrones de expresión génica en cerebro de ratón *Allen Mouse Brain Atlas* se usó para analizar los niveles de expresión y distribución espacial de los ortólogos de los transcritos identificados en cerebro de rata rLrrfp1, CRA_a' y CRA_g en el cerebro de ratón (objetivos 2.1 y 2.2). La visualización de los datos del atlas de expresión génica, obtenidos por hibridación in situ (ISH, *in situ hybridization*), se realizó mediante el *software Brain Explorer 2* (<http://mouse.brain-map.org/>) [169].

4.1.8 **geNorm y NormFinder**

Los programas geNorm [170] y NormFinder [171] se utilizaron para determinar los controles endógenos óptimos para la normalización de los resultados de expresión génica (apartado 4.5.4.2) en las distintas condiciones experimentales analizadas en esta tesis doctoral (objetivos 1.1, 1.2, 2.4.3 y 3.5.2). Ambos programas requieren un mínimo de 3 genes candidatos y 2 muestras por grupo experimental para aplicar sus métodos matemáticos. El programa geNorm calcula un valor M de estabilidad de cada gen, que es la media de la variación del gen comparado con el resto de genes de referencia candidatos, y da como resultado la mejor combinación de 2 controles endógenos. Un valor M bajo indica mayor estabilidad del gen y se ha establecido arbitrariamente que este debe ser inferior a 1.5 para los genes seleccionados. A su vez, este programa también calcula un valor de variación por parejas V (*pairwise variation value*) para determinar el beneficio de la adición de genes de referencia adicionales para el proceso de normalización. Un valor V de corte de 0.15 indica buena estabilidad de la combinación de genes de referencia [170]. Por su parte, NormFinder calcula un valor de estabilidad estimado a partir de la comparación de las variaciones intra-grupos e inter-grupos, determina el gen de referencia óptimo y sugiere la mejor combinación de 2 genes candidatos, la media geométrica de los cuales puede usarse para la normalización. Igual que en el programa geNorm un valor de estabilidad bajo indica mayor estabilidad de los genes de referencia, sin embargo para este programa no hay establecido un valor de estabilidad de corte.

4.1.9 **microRNA.org (miRanda-mirSVR algorithms) y miRecords**

La predicción de mRNAs diana (*targets*) de los miRNAs diferencialmente expresados en respuesta a la isquemia cerebral se realizó mediante el *software* microRNA.org (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>) (objetivo 3.3). Este *software* usa para la predicción el algoritmo miRanda-mirSVR el cual permite la búsqueda al mismo tiempo de

mRNAs diana para múltiples miRNAs [172,173]. La predicción de mRNAs diana se realizó agrupando los miRNAs según sus perfiles de expresión tras la isquemia cerebral. mRNAs diana validados experimentalmente para algunos de los miRNAs detectados se obtuvieron de miRecords (<http://mirecords.biolead.org/>) [174].

4.1.10 Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software

La información sobre las funciones biológicas en las que están implicados los genes dianas predichos y experimentalmente validados para los miRNAs diferencialmente expresados tras isquemia cerebral se obtuvo mediante el *software Ingenuity Pathway Analysis (IPA)* (*Ingenuity Systems, Inc*; <http://www.ingenuity.com/>) (objetivo 3.3).

4.2 CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS CORTICALES DE RATA

Debido a la falta de estabulario en nuestro centro y gracias a la colaboración establecida con la Unidad de Investigación Neurovascular (UIN) de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), todos los experimentos realizados con animales se han desarrollado en la UCM conforme indica el comité para el bienestar animal de esta universidad según las leyes de la Unión Europea (86/609/CEE) y del Estado Español (RD223/88). En esta tesis se ha trabajado con cultivo primario de neuronas y de astrocitos corticales de rata.

4.2.1 Obtención y procesamiento de las cortezas cerebrales

La formación de los distintos tipos celulares en la corteza tiene lugar en diferentes fases, que prácticamente se solapan. Primero se desarrollan las neuronas, seguidas por los astrocitos, y por último los oligodendrocitos. En el caso de las ratas, la neurogénesis en la zona ventricular comienza en el día embrionario 12 (E12), alcanza su cota máxima en E14 y remite en E17. La mayor parte de los astrocitos que se forman lo hacen entre día postnatal 0 y 2 (P0 y P2), mientras que los oligodendrocitos lo harán más tarde, en P14. Las células que se aíslan en las fases de desarrollo prenatal temprano se diferencian en neuronas, mientras que las que se aíslan en las últimas fases de desarrollo prenatal y en las primeras de desarrollo postnatal darán lugar a células gliales [175]. Así, para la preparación de cultivos primarios de neuronas corticales (apartado 4.2.2) se usaron fetos de ratas Wistar en el día E16 mientras que para los cultivos primarios de astrocitos corticales (apartado 4.2.3) se usaron ratas Wistar neonatas de día P0-P1. Los procedimientos comunes para la obtención de ambos cultivos fueron los siguientes:

1. Disección de cerebros:

- a. Se lavó la cabeza y la parte superior del cuerpo de los fetos y neonatos en un recipiente con etanol al 95% y a continuación en una solución de lavado de fetos (dH_2O estéril + 150mM NaCl + 8mM Na_2HPO_4 ($2\text{H}_2\text{O}$) + 2.7mM KCl + 1.5mM KH_2PO_4 + 2.6mM NaHCO_3 (Sigma–Aldrich, St. Louis, Misuri, EEUU); ajustando el pH a 7.4) para retirar los restos de etanol.
- b. Con una tijera, previamente esterilizada en etanol al 95%, se cortó la cabeza por la base del cráneo y se introdujo en una placa de petri P60 (60mm) (Corning Life Sciences, Amsterdam, Holanda) con medio de disección L-15 Medium Leibovitz (Sigma-Aldrich). Este medio contiene una concentración elevada de piruvato que permite al cultivo incrementar la producción endógena de CO_2 haciéndolo independiente de la aportación exógena de éste.

2. Obtención de las cortezas cerebrales y homogeneización:

- a. Trabajando debajo de la lupa (Nikon SMZ-1; Nikon Corporation, Amsterdam, Holanda) se procesaron las cabezas una a una.
- b. Se pasó la cabeza a una nueva placa P60 (Corning Life Sciences) con medio L15 limpio colocada sobre hielo y se extrajo el cerebro, pasándolo seguidamente a otra placa P60 con medio L15 limpio.
- c. Tras retirar las meninges y los vasos sanguíneos, importante para la pureza del cultivo, se diseccionó el cerebro hasta quedarse sólo con las cortezas de los dos hemisferios que se transfirieron a una nueva placa P60 con tampón fosfato salino (PBS) 1X estéril (Gibco, Life Technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU) colocada sobre hielo.
- d. Una vez realizado este proceso con todas las cabezas se homogenizaron las cortezas, pasando a trabajar en la campana de cultivos de flujo laminar y seguridad biológica clase II (Biolla; Telstar, Terrassa, España) a temperatura ambiente. Inicialmente se realizó de forma mecánica con tijeras. A continuación se recogió el homogenizado de la placa con una pipeta Pasteur estéril y se transfirió a un tubo falcon de 15ml (Corning Life Sciences) dónde se continuó la homogeneización pasando varias veces, pero no más de diez, el homogenizado por 3 pipetas Pasteur estériles estrechadas en la llama. Se empezó con la pipeta Pasteur de mayor diámetro, continuando con una pipeta de diámetro intermedio y acabando con una de pequeño diámetro para disgregar completamente el tejido.

- e. Cuando se tuvo el tejido completamente disgregado se añadió PBS 1X estéril hasta un volumen de 10ml y se centrifugó (Jouan CR4i; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU) 5 minutos a 900rpm a temperatura ambiente.
 - f. Se decantó el sobrenadante, se añadió 1ml del medio de cultivo o de crecimiento correspondiente (apartados 4.2.2 y 4.2.3) y se volvió a homogeneizar con las 3 pipetas, añadiendo progresivamente más medio hasta un volumen de 11ml.
 - g. Después se dejó reposar unos segundos el homogenizado y se recogieron 10ml de sobrenadante.
3. Contaje de células y siembra:
- a. En función de la densidad celular esperada se diluyó la suspensión celular con azul de tripán (Sigma-Aldrich) en un volumen final mínimo de 20µl y se cargaron 10µl de la dilución en el hemocitómetro o cámara de Neubauer (Marienfeld-Superior, Lauda-Königshofen, Alemania) para realizar el contaje celular en el microscopio invertido (Axiovert 40CFL, Zeiss, Thornwood, Nueva York, EEUU)
 - b. La concentración de la suspensión celular se calculó mediante la siguiente fórmula:
$$\text{Concentración inicial (células/ml)} = \text{media contaje}^a \times \text{Fd}^b \times 10000^c$$

^a: media del contaje de células de los 4-8 cuadrantes de la cámara de Neubauer
^b: factor de dilución de la suspensión celular en la mezcla con azul de tripán
^c: factor de corrección asociado a la cámara de Neubauer
 - c. Una vez determinada la concentración celular de partida, la suspensión celular se diluyó con el medio de crecimiento correspondiente, según el tipo celular (apartado 4.2.2 y 4.2.3), y a la concentración celular final deseada según el experimento (apartados 4.3.2.1, 4.3.3, 4.4.1 y 4.4.2), se sembraron las células en frascos (*flasks*) o placas de cultivo y se mantuvieron en cultivo en el incubador a 37°C y atmosfera húmeda compuesta por 95% de aire y 5% de CO₂.

4.2.2 Obtención de cultivo primario de neuronas corticales

En esta tesis doctoral se ha utilizado el cultivo primario de neuronas corticales para el modelo in vitro de apoptosis (apartado 4.3.3) y los experimentos de transfección de mimetizadores de miRNAs (apartado 4.4.2) (objetivo 3.5).

Para conseguir cultivos puros de neuronas corticales se utilizaron cerebros de fetos de rata Wistar en el día E16, según un método puesto a punto en el laboratorio del Dr. Lizasoain y la Dra. Moro [176] que se describe a continuación:

1. Las neuronas obtenidas por disociación mecánica (apartado 4.2.1) se sembraron en placas de 6 pocillos (Corning Life Sciences) previamente tratadas con poli-L-lisina (20µg/ml; Sigma-Aldrich), para facilitar su adhesión, a la densidad necesaria para los experimentos de privación de suero (apartado 4.3.3) y de transfección de mimetizadores de miRNAs (apartado 4.4.2) (objetivo 3.5), en un medio de incubación que contiene medio mínimo esencial Eagle (MEM, *Minimum Essential Medium*) (Gibco), suplementado con 33mM glucosa (Sigma-Aldrich), 2mM glutamina (Sigma-Aldrich), 10% suero de caballo (Gibco), 10% suero bovino fetal (FBS, *fetal bovine serum*) (Gibco) y 16mg/l gentamicina (Sigma-Aldrich), y se mantuvieron en un incubador (NU4750; Nuair, Plymouth, Minnesota, EEUU) a 37°C en atmósfera húmeda compuesta por 95% de aire y 5% de CO₂.
2. En el día 4 *in vitro* (DIV4), el medio se cambió por medio de crecimiento neuronal con la misma composición que el medio de incubación acabado de describir, pero sin suero fetal, y se añadió citosina-D-arabinósido (10µM; Sigma-Aldrich) con el objetivo de inhibir el crecimiento de células gliales.
3. El medio se cambió dos veces por semana con el mismo medio de crecimiento neuronal pero sin citosina-D-arabinósido y los experimentos se realizaron en el DIV10-12.

4.2.3 Obtención de cultivo primario de astrocitos corticales

En esta tesis doctoral se ha utilizado el cultivo de astrocitos para los experimentos de privación de oxígeno y glucosa (apartado 4.3.2.1) (objetivos 1.2 y 2.3) y de transfección de siRNAs (apartado 4.4.1) (objetivo 2.4). Para alguno de los experimentos funcionales de silenciamiento mediante siRNAs (apartado 4.4.1) se usó cultivo primario puro de astrocitos corticales de rata comerciales (Innoprot, Derio, Bizkaia, España) obtenidos mediante el mismo procedimiento que se describe a continuación.

El cultivo primario de astrocitos se obtuvo a partir de corteza cerebral de ratas Wistar neonatas P0, según un método descrito anteriormente por McCarthy KD y de Vellis J [75]:

1. Los astrocitos obtenidos por disociación mecánica (apartado 4.2.1) se sembraron en *flasks* de 75cm² (Corning Life Sciences) previamente tratados con poli-L-lisina (20µg/ml; Sigma-Aldrich) a una densidad de 2x10⁵ células/cm² en 13-15ml con medio de crecimiento de astrocitos (BME (*Basal Medium Eagle* 1X) (Gibco) suplementado con 10% medio denominado AG compuesto por 0.03% glutamina, 0.3% glucosa, penicilina (50U.I/ml), estreptomina (50U.I/ml) (Sigma-Aldrich) y 10% FBS).

2. Se mantuvieron en cultivo hasta llegar a confluencia en el incubador a 37°C y atmosfera húmeda compuesta por 95% de aire y 5% de CO₂, cambiando el medio 2-3 veces por semana.
3. Alrededor de las dos semanas los cultivos llegaron a confluencia y en este punto el cultivo era un cultivo mixto de astrocitos y oligodendrocitos separado en monocapas, siendo la más superficial la de oligodendrocitos. Para obtener un cultivo puro de astrocitos, el día antes de la resiembra se dejaron los *flasks* en agitación (SSI5; Shellab, Sheldon Manufacturing, Inc, Cornelius, Oregon, EEUU) a 250rpm en estufa a 37°C durante toda la noche, mínimo 12 horas, de manera que al día siguiente al aspirar el medio se descartó la capa superficial de oligodendrocitos despegados con la agitación, obteniendo un cultivo de una pureza $\geq 95\%$. El procotolo utilizado para replantar los astrocitos en placas (Corning Life Sciences) tratadas con poli-L-lisina (20µg/ml; Sigma-Aldrich) fue el siguiente:
 - a. Se lavaron un par de veces los *flasks* con 10ml de *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) (Gibco), solución que no contiene Ca²⁺ ni Mg²⁺ de manera que se retiraron estos iones que inactivan la tripsina.
 - b. Se añadieron 5ml de tripsina (Gibco) y se dejaron actuar 5 minutos.
 - c. Pasado este tiempo se golpeó el flask por los laterales para favorecer la desadhesión de los astrocitos, se añadieron 5ml de medio de crecimiento de astrocitos, y se recogió la suspensión celular en un tubo falcon estéril de 50ml (Corning Life Sciences).
 - d. Se añadieron otros 10ml de medio de crecimiento y se recogieron en el mismo tubo.
 - e. Se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 900-1000rpm a temperatura ambiente.
 - f. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet o botón celular en medio de crecimiento fresco.
 - g. Finalmente, se realizó el contaje como se ha descrito previamente (apartado 4.2.1), ajustando posteriormente la densidad de siembra según el tipo de placa necesaria para el experimento. Cuando se sembraron astrocitos para experimentos de transfección de siRNAs (apartado 4.4.1) el medio de crecimiento no contiene antibiótico.

4.3 MODELOS EXPERIMENTALES

4.3.1 Isquemia experimental *in vivo*

Para los experimentos de esta tesis doctoral se usaron ratas Fischer macho (Harlan Laboratories Inc., IN) con un peso comprendido entre 250 y 300 gramos. Los animales se estabularon en condiciones controladas, con un ciclo de luz oscuridad 12/12 horas y con libre acceso a comida y agua.

Se han utilizado un total de 35 ratas, 5 de ellas controles, y el resto sometidas al modelo de isquemia cerebral focal que se describe a continuación. Tres animales se descartaron durante la cirugía por sangrado abundante o muerte antes de las 24 horas post-MCAO.

4.3.1.1 Modelo de isquemia cerebral focal: oclusión permanente de la arteria cerebral media (pMCAO, *permanent middle cerebral artery occlusion*)

El modelo de isquemia cerebral focal utilizado fue descrito por Tamura *et al.* en el año 1981 y, se perfeccionó más tarde por Benderson *et al.* y Brint *et al.*, siendo uno de los modelos más utilizados para el estudio de enfermedades cerebrovasculares [71,177,178]. Consiste en la oclusión permanente de la arteria carótida común (ACC) y de la arteria cerebral media (ACM) distal izquierdas. Con este modelo se obtienen infartos reproducibles en el córtex parietal y sensori-motor, limitándose los cambios característicos de la necrosis isquémica a estructuras corticales mientras que estructuras subcorticales y los ganglios basales no suelen afectarse.

El procedimiento quirúrgico fue el siguiente:

1. Se anestesió el animal con una mezcla de aire y oxígeno 80/20 y una inducción inicial de isoflurano al 5% que disminuyó al 1,5-2% durante la cirugía. La temperatura se controló mediante una sonda rectal y un sistema de control de temperatura (*Temperature control unit* HB101/2. Panlab, Harvard Apparatus, Cornellà, Barcelona, España), manteniéndose a $36\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.
2. Oclusión permanente de la ACC: Se colocó el animal en posición decúbito supino y, tras rasurar y desinfectar con solución yodada la zona media ventral del cuello del animal, se realizó una incisión por encima del esternón en la línea media dejando a la vista los músculos del cuello que se separaron con ayuda de unas pinzas curvas hasta exponer la ACC y disecarla con cuidado. Una vez aislada, se ocluyó la luz del vaso por ligadura con doble nudo utilizando hilo de nylon 3/0 (Lorca Marín S.A., Murcia, España). Finalmente se cerró la incisión y se desinfectó la herida con solución yodada (Figura 4.1).

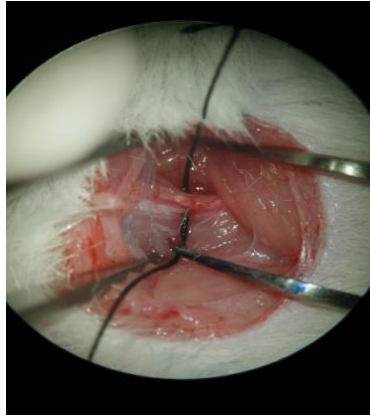


Figura 4.1. Arteria carótida común aislada para su oclusión.

- Oclusión permanente de la ACM: Para la oclusión de la ACM se colocó el animal recostado sobre el lado derecho. Tras rasurar y desinfectar con solución yodada la zona próxima al ojo izquierdo, se realizó una incisión de 1 cm en la línea que une el canto lateral del ojo y el canal auditivo externo, exponiendo así el músculo temporal. Se realizó un corte en la cresta sagital y se separó el músculo del hueso con dos cortes más, perpendiculares al primero, dejando a la vista el hueso temporal. Con la ayuda de una lupa binocular (Nikon SMZ-1; Nikon Corporation) se realizó una craneotomía en el hueso temporal mediante el uso de un microtorno (Drill Freedom H00, Stoelting, Wood Dale, Illinois, EEUU) con una fresa de 1.4 mm de diámetro, de forma que al retirar el hueso se dejó a la vista la ACM y se retiraron las meninges con unas pinzas Dumont 5 de microcirugía (Dumont #5 Forceps – Dumoxel Biologie. Fine Sciences Tools, Heidelberg, Alemania). A continuación, con la ayuda de un gancho (Sinsky Lens Manip Hook 0.15; World Precision Instruments, Inc.; Sarasota, Florida, EEUU) y de un micromanipulador (WPI M3301; World Precision Instruments, Inc.) se levantó la ACM unos milímetros y se ocluyó la luz del vaso mediante electrocoagulación (Geiger Model-100, Stolteing). Finalizada la oclusión se cerró la incisión y se desinfectó la herida con solución yodada (Figura 4.2).
- Cuando el animal empezó a recuperarse de la anestesia se devolvió a su jaula con comida y agua *ad libitum*.

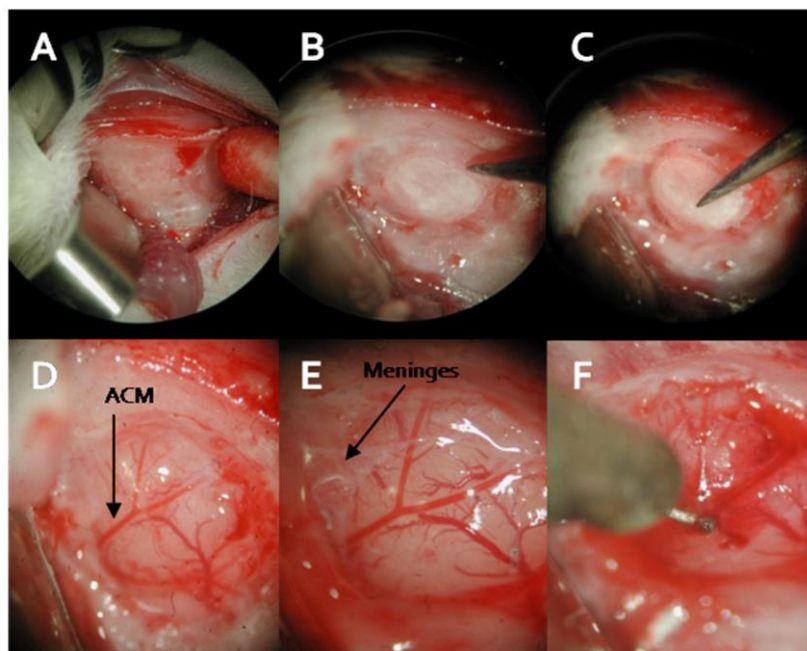


Figura 4.2. Procedimiento quirúrgico de la pMCAO hasta la cauterización de la ACM: (A) Retirar el músculo temporal para acceder al cráneo. (B) Trepanación. (C) Retirar el cráneo. (D) Identificar la ACM. (E) Retirar las meninges para acceder al cerebro. (F) Levantar la ACM con la ayuda de un gancho y un micromanipulador para la cauterización.

4.3.1.2 Grupos experimentales y recogida de muestras

Para determinar el perfil de expresión temporal de genes y miRNAs (objetivos 1.1, 2.2, 3.1, 3.2 y 3.4) se sacrificaron las ratas a los siguientes tiempos después de la pMCAO: 30 minutos, 2, 6, 24 y 72 horas y 7 y 14 días ($n=5/\text{grupo}$). Con estos tiempos de recogida de muestra se pretendía abarcar desde la fase aguda hasta la fase crónica o tardía de la respuesta isquémica, con el objetivo de cubrir los múltiples mecanismos inducidos por la isquemia focal y evaluar la posible implicación de los genes y miRNAs analizados en esta tesis doctoral tanto en procesos de daño cerebral como de cerebroprotección o cerebroreparación. Al igual que en la patología humana los rangos de tiempo de las fases aguda, subaguda y crónica en los modelos experimentales varían según la publicación. En esta tesis se ha considerado fase aguda las primeras 24 horas, fase subaguda hasta las 96 horas y fase tardía a partir de las 96 horas tras la isquemia [179,180].

Las muestras de corteza cerebral se obtuvieron tras sacrificar el animal, extraer el cerebro del cráneo y colocarlo rápidamente sobre una superficie fría para procesarlo, evitando la degradación del tejido. En el cerebro se observó la oclusión de la arteria cerebral media, la zona infartada y la zona peri-infarto. Se descartó el cerebelo y el hemisferio contralateral y se aisló el infarto y peri-infarto de la corteza del hemisferio infartado delimitando el infarto

por los 4 costados. Del mismo modo se recogieron muestras control. Cada una de las muestras obtenidas se dividió por la mitad y se guardaron en microtubos estériles de 1,5ml (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) que se congelaron rápidamente en nieve carbónica y se guardaron en ultracongelador (Vip Series -86°C; Sanyo, Moriguchi, Osaka, Japón) a -80°C hasta que se procedió a la extracción del RNA total (apartado 4.5.1), de una de las partes, y a la obtención de proteína de la otra mitad (apartado 4.6.1).

Por otro lado, para estudios de inmunohistofluorescencia de la expresión y localización celular de Gcf2/Lrrfip1 (objetivo 2.2), se fijaron cerebros de otro grupo de animales control y animales sometidos a 24 horas de pMCAO. Los protocolos para la fijación del tejido y para realizar la inmunohistofluorescencia se describen en el apartado 4.6.3.1.

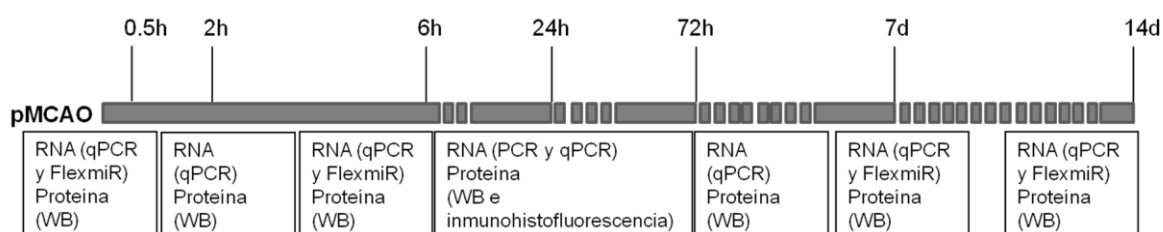


Figura 4.3. Representación de los estudios realizados tras la isquemia experimental *in vivo*. Se indica el tipo de muestra extraída a distintos tiempos tras la pMCAO y las técnicas utilizadas para el estudio de las mismas. La barra gris indica el tiempo de recogida de muestras después la oclusión de la ACM. h: horas, d: días.

4.3.2 Isquemia experimental *in vitro*

4.3.2.1 Privación de oxígeno y glucosa (POG) en astrocitos corticales de rata

Para simular un proceso isquémico los astrocitos obtenidos según se describe en el apartado 4.2.3 se sometieron a privación de oxígeno y glucosa (POG) siguiendo el método puesto a punto en el laboratorio de los doctores Lizasoain y Moro [181,182].

El medio de crecimiento en el que se hallaban los astrocitos se sustituyó por una solución de isquemia (130mM NaCl, 5.4mM KCl, 1.8mM CaCl₂, 0.8mM MgCl₂, 1.3mM NaH₂PO₄, 26mM NaHCO₃ y 2% FBS) carente de glucosa y equilibrada mediante burbujeo con una mezcla de gases compuesta por 95%N₂/5%CO₂, para desplazar completamente el oxígeno. Las células se trasladaron a una cámara de anoxia (Forma Scientific, Hucoa Erlöss, Madrid, España) que contenía los mismos gases que se utilizaron para el burbujeo de la solución de isquemia, atmósfera húmeda, una temperatura de 37°C y una presión constante de 0.15 bar, y se mantuvieron en estas condiciones de POG durante 180 minutos (Figura 4.4).

La POG se finalizó con la sustitución de la solución de isquemia por medio de reperfusión (BME suplementado con 0.6% glucosa, 0.029% glutamina, penicilina (50U.I./ml), estreptomicina (50U.I./ml) y 2% FBS) y con la reincorporación de las placas al incubador normóxico.

Las células control se incubaron con la solución de isquemia a la que se añadió 33mM glucosa y se mantuvieron en el incubador normóxico el tiempo que dura la POG. Una vez finalizado el tiempo de POG, la solución control se reemplazó por solución de reperfusión y las células se retornaron al incubador normóxico.



Figura 4.4. Imagen de la cámara de anoxia introducida en la estufa para mantener el cultivo a 37°C durante la POG.

El protocolo utilizado para placas de 6 pocillos (p6) (Corning Life Sciences) sembradas con 1.5×10^5 células/cm² o placas de 96 pocillos (p96) (Corning Life Sciences) sembradas con 3.3×10^4 células/cm² fue el siguiente:

1. Bajo campana de cultivos se aspiró el medio de crecimiento.
2. Se lavaron con 1ml/pocillo (p6) o 50µl/pocillo (p96) de solución POG o control, según correspondía, para habitar a las células.
3. Se aspiró la solución POG o control.
4. Se añadieron 1.5ml/pocillo (p6) o 75µl/pocillo (p96) de solución POG o control.
5. Se introdujeron durante 180 minutos:
 - a. las placas POG en cámara de anoxia.
 - b. las placas control en incubador normóxico.

6. Bajo campana de cultivos se paró la POG añadiendo 1ml/pocillo (p6) o 50µl/pocillo (p96) de solución de reperfusión tanto en placas POG como control para procesar del mismo modo todos los grupos experimentales.
7. Se aspiró completamente el medio.
8. Finalmente, se añadieron 1.5ml/pocillo (p6) o 75µl/pocillo (p96) de solución de reperfusión en las placas POG y control y se retornaron al incubador normóxico hasta la recogida de muestras.

4.3.2.2 Grupos experimentales y recogida de muestras

Para el análisis temporal de la expresión de controles endógenos (objetivo 1.2) y de las distintas variantes de *Gcf2/Lrrfip1* (objetivo 2.3) se recogieron muestras de astrocitos control y astrocitos sometidos a POG a distintos tiempos tras la reperfusión: 0, 30 minutos, 2, 6 y 24 horas (n=3/grupo) de tres experimentos independientes para la extracción de RNA (apartado 4.5.1) y proteína (apartado 4.6.1). Hasta su procesamiento las muestras se conservaron a -80°C.

Para el análisis de *Gcf2/Lrrfip1* mediante inmunocitofluorescencia (objetivo 2.3) los astrocitos se sembraron en placas de 96 pocillos óptimas para inmunofluorescencia (*96-well clear bottom imaging tissue culture plates*; Becton-Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, Nueva Jersey, EEUU) y se procesaron como se describe en el apartado 4.6.3.2 para realizar inmunocitofluorescencia en situación control y 24 horas después de la reperfusión de la POG (Figura 4.5).

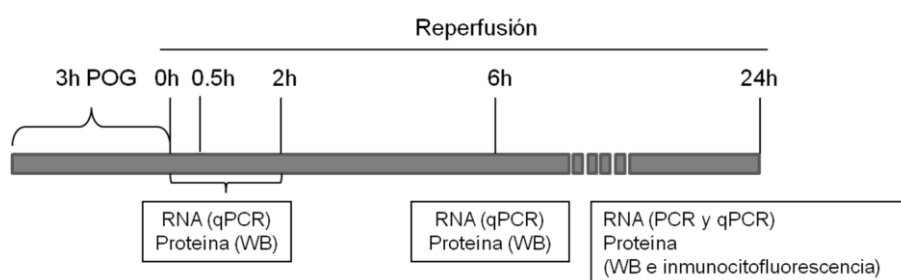


Figura 4.5. Representación de los estudios realizados tras la isquemia experimental *in vitro*. Se indica el tipo de muestra extraída tras 3 horas de POG y a distintos tiempos de reperfusión y las técnicas utilizadas para el estudio de las mismas. La barra gris indica el tiempo de recogida de muestras después de las 3 horas de POG. h: horas.

4.3.3 Modelo *in vitro* de apoptosis: privación de suero

Se utilizó la privación de suero en cultivo primario de neuronas corticales en DIV10-12 (apartado 4.2.2) como modelo *in vitro* de apoptosis [183,184] para determinar si la apoptosis inducida por la sobreexpresión del miR-347 era la responsable del aumento de expresión detectado de las proteínas *Acsl4*, *Bnip3l* y *Phyhip* (objetivo 3.5). Las neuronas fueron privadas de suero durante 48 horas según el siguiente protocolo para placa de 6 pocillos:

1. Se aspiró el medio de crecimiento y se realizaron dos lavados con 1mL de PBS 1X.
2. Se añadieron 2 mL de medio de cultivo de crecimiento neuronal sin suero de caballo.
3. Los controles se mantuvieron con medio completo de crecimiento neuronal.

Pasadas 48 horas las neuronas se recogieron para extraer proteína (apartado 4.6.1) y RNA (apartado 4.5.1) y analizar mediante *western blot* (apartado 4.6.2) y qPCR (apartado 4.5.4.2.1) la expresión de *Acsl4*, *Bnip3l* y *Phyhip*.

Los resultados de los modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* son el promedio de como mínimo dos experimentos independientes.

4.4 ESTUDIOS FUNCIONALES

Para identificar la posible función en cerebro e implicación en isquemia cerebral de *Gcf2/Lrrfip1* (objetivo 2.4) y del miR-347 (objetivo 3.5) se realizaron experimentos de interferencia del RNA (RNAi) mediante transfección de siRNAs contra *Gcf2/Lrrfip1* (apartado 4.4.1) y de un mimetizador del miR-347 (apartado 4.4.2), respectivamente. Los objetivos de estos estudios fueron, por un lado, inhibir la expresión de *Gcf2/Lrrfip1* para identificar sus genes diana y su posible función cerebral y, por otro lado, sobreexpresar el miR-347, imitando lo que ocurre tras la MCAO, para además de identificar su posible función cerebral validar si este miRNA regula la expresión de alguna de sus dianas predichas (*Acsl4*, *Bnip3l* y *Phyhip*). En ambos casos la transfección se realizó utilizando reactivos de transfección de base lipídica que captan eficazmente los siRNAs y los mimetizadores de miRNAs y los liberan eficientemente en el interior de la célula. En primer lugar se optimizaron las condiciones de transfección con el objetivo de establecer la dosis de siRNA y mimetizador de miRNA y de reactivo de transfección adecuada para obtener la máxima eficiencia de transfección y la mínima toxicidad para el cultivo.

4.4.1 Transfección de siRNAs en cultivo primario de astrocitos corticales de rata

Dado que los resultados obtenidos en el trabajo previo de nuestro grupo apuntaban a los astrocitos como células diana para las acciones de Gcf2/Lrrfip1 [93], la transfección de los siRNAs contra Gcf2/Lrrfip1 se realizó en cultivo primario de astrocitos corticales de rata (apartado 4.2.3).

4.4.1.1 siRNAs y reactivo de transfección

La interferencia del RNA (RNAi) es un mecanismo natural de regulación de la expresión génica que consiste en la silenciación específica de un gen a través de la degradación de su mRNA, suprimiendo así la expresión de la proteína que codifica. En este mecanismo participan moléculas de RNA de doble cadena presentes en el citoplasma celular que son digeridas por el enzima RNAasa III Dicer en moléculas más cortas de RNA de doble cadena denominadas siRNAs o *small interfering RNAs* (21-23 nucleótidos). Los siRNAs se unen al complejo proteico RISC que separa la doble cadena y selecciona la secuencia complementaria al mRNA diana como guía hasta su objetivo. Cuando el siRNA se une a su mRNA diana, endonucleasas presentes en el complejo RISC se encargan de cortar y destruir el mRNA, impidiendo así la síntesis de la proteína. Desde el descubrimiento de este mecanismo de regulación de la expresión génica la tecnología del RNAi se ha utilizado como herramienta de investigación mediante la transfección de siRNAs sintéticos para controlar la expresión de genes específicos [185].

En este trabajo se han utilizado los siRNAs sintéticos *ON-TARGETplus siRNA* (Dharmacon, Lafayette, Colorado, EEUU) diseñados para conseguir una silenciación génica eficiente y específica reduciendo los efectos indirectos e inespecíficos (*off-target effects*). De acuerdo con las instrucciones de la casa comercial se utilizó el reactivo de transfección DharmaFECT-1 para la transfección de los astrocitos.

4.4.1.2 Optimización de las condiciones de transfección en astrocitos

Para la transfección se sembraron los astrocitos a una densidad de 30.000 células/cm² en placas de 96 pocillos (Corning Life Sciences) tratadas con poli-L-lisina (20µg/ml; Sigma-Aldrich) con medio de crecimiento de astrocitos sin antibiótico 24 horas antes de la transfección, obteniendo con esta densidad de siembra la confluencia necesaria indicada por la casa comercial (70-90%) en el momento de la transfección. Para optimizar las condiciones de transfección (objetivo 2.4.2) se testaron tres cantidades de reactivo de

transfección DharmaFECT-1 (Dharmacon) (0.1, 0.3 y 0.5µl/pocillo) en placas de 96 pocillos. Los grupos de transfección fueron los siguientes:

1. *siCONTROL TOX™ Transfection Control* (50nM) (Dharmacon), siRNA citotóxico que permite determinar la eficiencia de transfección midiendo los niveles de muerte celular. Una vez el siRNA entra en la célula induce una fuerte respuesta que lleva a la apoptosis y muerte celular entre 24 y 72 horas después de la transfección. El grado de muerte celular se correlaciona con la eficiencia de transfección.
2. Control de simulación de la transfección o control *mock*, que sólo contiene reactivo de transfección y permite valorar la toxicidad propia del reactivo de transfección y seleccionar la mínima cantidad óptima a utilizar.
3. Células no tratadas, control respecto al que normalizar los resultados de los dos grupos anteriores y evaluar los cambios fenotípicos del cultivo inducidos por los reactivos utilizados.

El protocolo de transfección se detalla en el apartado 4.4.1.3.

A las 48 horas de la transfección se evaluó la viabilidad celular mediante ensayo bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide*) (apartado 4.7.1) para determinar las condiciones óptimas de transfección.

4.4.1.3 Transfección de siRNAs contra Gcf2/Lrrfip1 en astrocitos

Los estudios funcionales de Gcf2/Lrrfip1 en los astrocitos corticales se realizaron en placas de 6 pocillos tras extrapolar las condiciones de transfección optimizadas en el apartado anterior a este formato de placas. Las células se sembraron a una densidad de 3×10^3 astrocitos/cm² en placas de 6 pocillos (Corning Life Sciences) tratadas con poli-L-lisina (20µg/ml; Sigma-Aldrich) y medio de crecimiento sin antibiótico 24 horas antes de la transfección. De acuerdo a las condiciones óptimas establecidas en el apartado 4.4.1.2 y a las instrucciones de la casa comercial los astrocitos se transfectaron con una mezcla que contenía medio basal de crecimiento de astrocitos (sin suero ni antibiótico), 2.5µl/pocillo de reactivo de transfección DharmaFECT-1 (Dharmacon) y 50nM/pocillo de *ON-TARGETplus Non-Targeting Pool* siRNA (D-001810-10; Dharmacon) (control negativo, siCTRL) u *ON-TARGETplus SMARTpool Lrrfip1* siRNA (L-084833-01; Dharmacon) (siLrrfip1). En primer lugar se validaron las condiciones de transfección confirmando la silenciación del mRNA de Lrrfip1 a las 48-72 horas de la transfección mediante qPCR (apartado 4.5.4.2.1) y se analizó

la expresión mediante western blot (apartado 4.6.2) a 3, 4, 5 y 6 días post-transfección para determinar el momento de la silenciación de Lrrfip1 a nivel proteico.

Se realizaron un mínimo de dos experimentos independientes de silenciación de Lrrfip1 para determinar en astrocitos control (siCTRL) y con Lrrfip1 silenciado (siLrrfip1) la expresión de las proteínas de interés mediante western blot (apartado 4.6.2) y qPCR (apartado 4.5.4.2.1) y evaluar también la actividad de los transportadores de glutamato (apartado 4.8) (Figura 4.6).

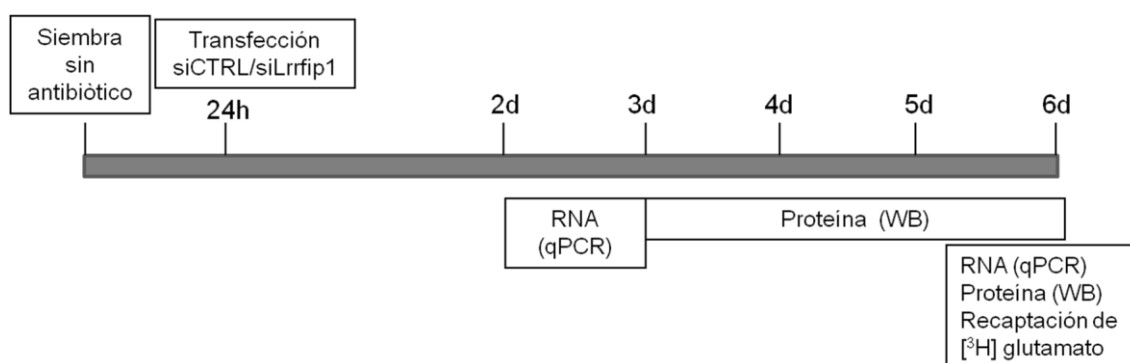


Figura 4.6. Representación de los experimentos de silenciación mediante siRNAs en cultivo primario de astrocitos. Se indica el protocolo experimental y el tipo de muestra extraída a distintos tiempos tras la transfección y las técnicas utilizadas para el estudio de las mismas. La barra gris indica el tiempo en que se ha realizado la transfección (24 horas post-siembra) y se han recogido las muestras. h: horas. d: día tras la transfección.

El protocolo de preparación de los reactivos y transfección de los siRNAs para placas (Corning Life Sciences) de 6 pocillos (p6) y de 96 pocillos (p96) (apartado 4.4.1.2) fue el siguiente:

1. Para una concentración final 50nM/pocillo se preparó una solución 1µM de cada uno de los siRNAs en 1X siRNA *Buffer* (Dharmacon).
2. En tubos separados se diluyó por pocillo:
 - a. Tubo 1: 100µl (p6) o 5µl (p96) de siRNA (siCTRL o siLrrfip1 del punto 1) + 100µl (p6) o 5µl (p96) de medio basal.
 - b. Tubo 2: 2.5µl (p6) o 0.1, 0.3 y 0.5µl (p96) de DharmaFECT-1 + 197.5µl (p6) o 9.9, 9.7 y 9.5µl (p96) de medio basal.
3. El contenido de cada tubo se mezcló pipeteando cuidadosamente y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente.

4. Se añadió el contenido del tubo 1 al tubo 2 y la mezcla, después de pipetearla cuidadosamente, se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente.
5. Se añadió a la mezcla anterior 1.6ml/pocillo (p6) o 80µl/pocillo (p96) de medio de crecimiento de astrocitos con suero pero sin antibiótico.
6. Se aspiró el medio del cultivo y se añadieron 2ml/pocillo (p6) o 100µl/pocillo (p96) de medio de transfección preparado en los puntos 5 y 6.
7. Se incubaron las células a 37°C en incubador con 5% de CO₂.
8. Finalmente, 24 horas después de la transfección el medio de transfección se reemplazó por medio completo de crecimiento de astrocitos y el cultivo se mantuvo hasta el momento de recogida de las muestras.

4.4.2 Transfección de mimetizadores de miRNAs en cultivo primario de neuronas corticales de rata

Dado que se ha identificado que el miR-347 se expresa en neuronas corticales [186] la transfección de los mimetizadores de miRNAs se realizó en cultivo primario de neuronas corticales de rata (apartado 4.2.2).

4.4.2.1 Mimetizadores miRNAs y reactivo de transfección

Los mimetizadores o mimics de los miRNAs son dúplex de RNA sintetizados químicamente en los cuales la secuencia con sentido es la misma que la del miRNA endógeno, con lo que se aumenta la cantidad del miRNA transfectado dentro de la célula. En este trabajo se han utilizado mimics y reactivo de transfección de Qiagen (Hilden, Alemania). En concreto se ha utilizado el reactivo *HiPerFect Transfection Reagent* que permite una transfección eficiente y elevada viabilidad celular al transfectar cultivo primario.

4.4.2.2 Optimización de las condiciones de transfección en neuronas

Para la optimización de las condiciones de transfección (objetivo 3.5.1) se testaron dos densidades de siembra (35.000 y 50.000 neuronas/cm²) y tres cantidades de reactivo de transfección *HiPerFect Transfection Reagent* (Qiagen) (0.5, 1.0 y 1.5µl/pocillo) en placas de 96 pocillos tratadas con poli-L-lisina (20µg/ml; Sigma-Aldrich). Los grupos de transfección fueron:

1. *AllStars Cell Death Control siRNA* (AllStars CD Ctrl; 50nM) (Qiagen), siRNA citotóxico que permite determinar la eficiencia de transfección midiendo los niveles de muerte celular.
2. Control de simulación de la transfección o control *mock*, que sólo contiene reactivo de transfección y permite valorar la toxicidad propia del reactivo de transfección y seleccionar la mínima cantidad óptima a utilizar.
3. Células no tratadas, control respecto al que normalizar los resultados de los dos grupos anteriores y evaluar los cambios fenotípicos del cultivo inducidos por los reactivos utilizados.

El protocolo de transfección se detalla en el apartado 4.4.2.3.

A las 48 horas de la transfección se evaluó la viabilidad celular mediante ensayo MTT (apartado 4.7.1) para determinar las condiciones óptimas de transfección.

Estas condiciones de transfección se validaron mediante un ensayo control basado en la transfección de un mimetizador del miRNA específico de músculo miR-1 (mimic: 5'-UGGAAUGUAAAGAAGUGUGUAU-3') (16.6nM) (Qiagen) y de un control negativo (-Ctrl; *AllStars Neg. Control siRNA*, Qiagen) (16.6nM). Este control negativo es un siRNA procesado por el complejo miRISC pero sin homología con ningún gen conocido de mamífero. Es válido como control negativo tanto para experimentos de transfección de siRNAs como de mimetizadores de miRNAs. Tras 48 y 72 horas de la transfección se recogieron células tratadas para el análisis de la expresión mediante western blot de la proteína Pdc4 (apartados 4.6.2), diana validada del miR-1[174].

4.4.2.3 Transfección de mimetizadores de los miRNAs miR-347 y miR-21 en neuronas

Las condiciones determinadas en la optimización de la transfección (apartado 4.4.2.2), se extrapolaron a placas de 6 pocillos a fin de obtener mayor cantidad de muestra para su análisis posterior. Se sembraron las neuronas corticales a una densidad de 1×10^5 células/cm² en placas de 6 pocillos tratadas con poli-L-lisina (20µg/ml; Sigma-Aldrich) y se realizó la transfección de los mimetizadores entre los DIV10-12. Los mimetizadores del miR-347 (mimic: 5'-UGUCCCUCUGGGUCGCCCA-3') y miR-21 (mimic: 5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3') y el control negativo (-Ctrl; *AllStars Neg. Control siRNA*) (Qiagen) se transfectaron a una concentración final de 16.6nM (n=3/grupo) utilizando 16.7µl/pocillo de reactivo de transfección *HiperFect Transfection Reagent*. El mimetizador del miR-21 se transfectó como control adicional de la técnica ya que es un miRNA también

sobreexpresado después de isquemia para el que se ha descrito que protege las neuronas de la muerte isquémica [164].

Entre 60-65 horas después de la transfección se determinó la citotoxicidad celular mediante el ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH) (Promega, Fitchburg, Wisconsin, EEUU) (apartado 4.7.2), y las células se recogieron para evaluar la apoptosis celular mediante el ensayo anexina V/ioduro de propidio (IP) (Becton-Dickinson Biosciences) (apartado 4.7.3), para extraer proteína y analizar mediante western blot (apartados 4.6.1 y 4.6.2) la expresión de Acsl4, Bnip3l y Phyhip, y para extraer RNA y analizar mediante qPCR (apartados 4.5.1 y 4.5.4) la expresión del miR-347 y de Acsl4, Bnip3l y Phyhip (Figura 4.7).

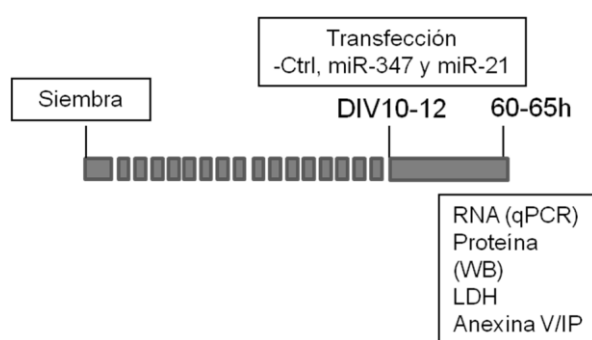


Figura 4.7. Representación de los experimentos de sobreexpresión de los miRNAs miR-347 y miR-21 en cultivo primario de neuronas corticales. Se indica el protocolo experimental y el tipo de muestra extraída 60-65 horas después de la transfección y las técnicas utilizadas para el estudio de las mismas. La barra gris indica el tiempo en que se ha realizado la transfección y se han recogido las muestras. DIV: día in vitro tras la siembra; h: horas tras la transfección.

El protocolo de transfección seguido en la optimización de las condiciones en placa de 96 pocillos y en la transfección posterior en placa de 6 pocillos, de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial (Qiagen) para cultivo primario de neuronas, fue el siguiente:

1. Los mimetizadores y controles se descongelaron en hielo. Posteriormente, a temperatura ambiente y bajo campana, se realizaron los siguientes pasos para cada pocillo según la placa era de 6 pocillos (p6) o de 96 pocillos (p96):
 - a. Cada uno de los mimetizadores y controles se diluyó en 250µl (p6) o 25µl (p96) de medio de crecimiento neuronal sin suero para una concentración final de 16.6nM en 2ml (p6) o 200µl (p96) y se mezclaron mediante vórtex (Scientific Industries, Bohemia, Nueva York, EEUU).

- b. Se diluyó el reactivo de transfección HiPerFect Transfection Reagent en medio de crecimiento neuronal sin suero añadiendo 16.7µl (p6) o 0.5, 1 y 1.5µl (p96) de reactivo a 233.3µl (p6) o 24.5, 24 y 23.5µl (p96) y se mezclaron mediante vórtex.
 - c. El reactivo de transfección diluido (punto b) se añadió al mimetizador o control diluido (punto a), obteniendo un volumen final 500µl/pocillo (p6) o 50µl/pocillo (p96).
 - d. Se mezclaron mediante 10 segundos de vórtex y se incubaron durante 5-10 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos de transfección.
2. Se aspiró el medio del cultivo y se añadió gota a gota 500µl/pocillo (p6) o 50µl/pocillo (p96) del correspondiente grupo de transfección agitando la placa para asegurar una distribución homogénea de los complejos de transfección.
 3. Pasada 1 hora de incubación de los complejos se añadió 1.5ml/pocillo (p6) o 150µl/pocillo (p96) de medio de crecimiento neuronal fresco completo con suero y antibiótico.
 4. Las células se incubaron *overnight* a 37°C en incubador de CO₂ y se cambió el medio aproximadamente a las 12 horas después de la transfección.

Para cada estudio de transfección de siRNAs o mimetizadores de miRNAs se realizaron 2 experimentos independientes.

4.5 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DEL RNA

Cuando se trabaja con RNA deben tomarse las máximas precauciones para evitar contaminaciones con RNAasas y su degradación. Las RNAasas son enzimas muy estables y activas que hidrolizan el RNA y no requieren cofactores para su función. Se trata de enzimas muy difíciles de inactivar por lo que es importante trabajar en un ambiente libre de RNAasas. Para ello es importante (1) utilizar guantes durante todo el proceso de manejo de muestras y material para la extracción y conservación de RNA, ya que las RNAasas están presentes en grandes cantidades en la piel y es la mayor vía de contaminación de RNAasas; (2) trabajar bajo campana de PCR; (3) utilizar pipetas específicas para el manejo de RNA; (4) trabajar lo más rápido posible y mantener los tubos cerrados siempre que sea posible, con el fin de evitar la degradación del RNA durante la manipulación; (5) utilizar agua, tubos y puntas testados y garantizados libres de RNAasa (*RNAasa-free*); y (6) mantener el RNA aislado en hielo y almacenarlo a -80°C para periodos largos de tiempo.

4.5.1 Protocolo de recogida de muestras, extracción y cuantificación de RNA

Las muestras de tejido aisladas de corteza cerebral (apartado 4.3.1.2) (objetivos 1.1, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2 y 3.4) se congelaron rápidamente a -80°C hasta el momento de la extracción.

Los astrocitos sometidos a POG (apartado 4.3.2.2) (objetivos 1.2 y 2.3) y los transfectados con siRNAs (apartado 4.4.1) (objetivo 2.4) así como las neuronas transfectadas con mimetizadores de los miRNAs (apartado 4.4.2) y las sometidas a privación de suero (apartado 4.3.3) (objetivo 3.5), se recogieron empleando el reactivo de lisis QIAzol (Qiagen), según el protocolo de la casa comercial, y se congelaron a -80°C hasta el momento de la extracción. El protocolo de recogida de las células con QIAzol fue el siguiente:

1. Se aspiró el medio del pocillo y se añadieron $700\mu\text{l}$ de QIAzol, para lisar las células.
2. Con la ayuda de un raspador de células (Sarstedt) se recogió todo el lisado celular en un microtubo de 1.5ml estéril y libre de RNAasas (Sarstedt).
3. El microtubo se vorteo durante 1 minuto para homogeneizar la muestra.

Tanto para la purificación del RNA a partir de tejido cerebral como de cultivo de astrocitos y neuronas se utilizaron kits de extracción comerciales de Qiagen, *miRNeasy[®] Mini Kit* y *RNeasy[®] Mini Kit*, respectivamente. *miRNeasy[®] Mini Kit* está diseñado para la purificación del RNA total (tRNA), incluyendo los miRNAs ($>18\text{nt}$), mientras que con el *RNeasy[®] Mini Kit* se obtiene RNA enriquecido en RNA mensajero (mRNA), ya que las columnas aíslan moléculas de RNA superiores a 200nt . Ambos combinan lisis de las muestras con fenol/guanidina y purificación del RNA (tRNA o mRNA) mediante membrana sílica-gel. La lisis y homogeneización de ambos tipos de muestras se realizó con el reactivo de lisis QIAzol, una solución monofásica de fenol y guanidina tiocianato que facilita la lisis de células y tejidos lipídicos, inhibe RNAasas y también elimina la mayoría de DNA y proteínas celulares mediante extracción orgánica. Muestras de células y tejido se homogeneizaron con el reactivo de lisis QIAzol y tras añadir cloroformo el homogeneizado se separaron mediante centrifugación en una fase acuosa superior, que contenía el RNA, una fase intermedia o interfase, que contenía el DNA, y una fase orgánica inferior que contenía las proteínas. La fase superior acuosa es la que se recogió, a la que se añadió etanol para proporcionarle a las moléculas de RNA las condiciones de unión adecuadas, y se transfirió a las columnas de extracción de los kits donde el RNA (tRNA o mRNA) se unió a la membrana mientras que fenoles y otros contaminantes fueron arrastrados de manera eficiente. Finalmente se eluyó en agua libre de RNAasas el tRNA o el mRNA de alta calidad. Para ambos kits se siguieron

las instrucciones de la casa comercial y se incluyó el paso opcional de digestión con DNAasa (Qiagen) para eliminar el DNA genómico, ya que este puede servir como molde en la reacción de PCR si los *primers* utilizados reconocen una secuencia interna de un exón.

A continuación se describe el protocolo de preparación de las muestras y de extracción realizado bajo cabina de PCR (Telstar Mini-V/PCR). Los pasos descritos, si no se indica lo contrario, fueron comunes para los dos kits utilizados y los dos tipos de muestras procesadas y se realizaron a temperatura ambiente:

1. Se extrajo la muestra de tejido del congelador o se descongeló la muestra celular ya recogida en QIAzol para seguir en el punto 3.
2. Se determinó la cantidad de tejido para no utilizar más de 100mg de tejido por columna, se introdujo en un tubo falcon de 15ml con 700µl de QIAzol y se homogeneizó durante 30-40 segundos con *Ultra-Turrax T25 basic* (IKA-Werke, Staufen, Alemania).
3. El homogenado se dejó reposar 5 minutos.
4. Se le añadieron 140µl de cloroformo (Sigma-Aldrich) y se vorteoó vigorosamente durante 15 segundos.
5. Se dejó reposar 2-3 minutos.
6. Se centrifugó a 12000g (MicroCL 17R, Thermo Fisher Scientific) durante 15 minutos a 4°C para obtener la separación de las fases. El volumen de la fase acuosa fue de 350µl aproximadamente.
7. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se añadieron 1.5 volúmenes (normalmente 525µl) de etanol 100% (*miRNeasy® Mini Kit*) o etanol 70% (*RNeasy® Mini Kit*) y se mezcló pipetando varias veces, pasando rápidamente al siguiente paso.
8. Se pipetearon 700µl de muestra, incluyendo precipitados, en la columna RNeasy mini colocada sobre un tubo colector de 2ml. Se tapó el tubo y se centrifugó durante 15 segundos a ≥ 10000 rpm. Se descartó el eluido.
9. Se repitió el paso 8 con la muestra restante.
10. Se añadieron 350µl de *Buffer RWT* (*miRNeasy® Mini Kit*) o *Buffer RW1* (*RNeasy® Mini Kit*) en la columna y se centrifugó durante 15 segundos a ≥ 10000 rpm. Se descartó el eluido.
11. La DNAasa se preparó mezclando por inversión 10µl de *DNasa I stock* + 70µl de *Buffer RDD* por cada columna utilizada.

12. Se añadieron 80µl de la mezcla de DNAasa directamente sobre la membrana y se dejó actuar durante 15 minutos.
13. Se pipetearon 350µl de *Buffer RWT (miRNeasy® Mini Kit)* o *Buffer RW1 (RNeasy® Mini Kit)* en la columna y se centrifugó durante 15 segundos a ≥ 10000 rpm. Se descartó el tubo colector con el eluido y se colocó la columna sobre un nuevo tubo colector de 2ml incluido en el kit.
14. Se pipetearon 500µl de *Buffer RPE* y se centrifugó durante 15 segundos a ≥ 10000 rpm. Se descartó el eluido.
15. Se añadieron 500µl más de *Buffer RPE en la columna* y se centrifugó durante 2 minutos a ≥ 10000 rpm. Se descartó el tubo colector con el eluido y se colocó la columna sobre un nuevo tubo colector.
16. Se centrifugó durante 1 minuto a máxima velocidad para eliminar el etanol residual que puede interferir en el procesamiento de las muestras. Se descartó el tubo colector y se colocó la columna sobre un microtubo de 1.5ml libre de RNAasas incluido en el kit.
17. Se pipeteó 30µl (muestras celulares) o 50µl (muestras tisulares) de agua libre de RNAasas directamente sobre la membrana, se dejó reposar durante 5 minutos y se centrifugó durante 1 minuto a ≥ 10000 rpm para eluir el RNA.
18. Finalmente, el RNA eluido se mantuvo en hielo para proceder a la cuantificación o congelar a -80°C .

La cuantificación del RNA se realizó mediante espectrofotometría (NanoPhotometer, Implen) midiendo la absorbancia a 260nm (A_{260}), asumiendo que 1 unidad de A_{260} equivale a 44µg/ml de RNA cadena sencilla (ssRNA, de *single stranded* RNA) en agua. La pureza se estimó a partir de la ratio $A_{260}/A_{280} > 1.8$ y la integridad del RNA se verificó mediante visualización en un gel de agarosa (apartado 4.5.2.2.2) al 1%, tras electroforesis, de los RNAs ribosomales (rRNAs), subunidades 18S (1874pb) y 28S (4718pb) en una ratio de 2:1 entre 28S:18S.

4.5.2 Identificación de los transcritos de *Lrrfip1* expresados en corteza cerebral de rata mediante PCR y secuenciación (objetivo 2.1)

4.5.2.1 Retrotranscripción de RNA total (tRNA) y mRNA

Para la conversión de RNA a DNA complementario (cDNA) de cadena sencilla, molde de las reacciones de amplificaciones posteriores y menos sensible a la degradación que el RNA,

se utilizó el *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) que mediante una mezcla de hexámeros al azar como *primers* asegura la conversión eficiente a cDNA de todas las moléculas de RNA presentes en la muestra y no introduce sesgos en el extremo 3' del transcrito como sí lo hace el método de retrotranscripción Oligo d(T)₁₆.

La reacción de retrotranscripción para cada muestra se realizó según instrucciones de la casa comercial:

1. Se mezclaron 10µl de muestra (0.1µg/µl) + 2µl de 10X RT (*Reverse Transcription*) *Buffer* + 0.8µl de 25X dNPT *mix* (100mM) + 2µl de 10X RT *Random Primers* + 1µl de *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* (50unidades/µl) + 4.2µl agua libre de nucleasas.
2. Las muestras se sometieron a las siguientes condiciones en el termociclador (*MyCycler™ Thermal Cycler* (Bio-Rad Life Sciences, Hercules, California, EEUU)): 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C, 5 segundos a 85°C y 4°C ∞.

Para todas las muestras se realizaron y analizaron dos retrotranscripciones independientes.

4.5.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa estándar (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (*Polymerase Chain Reaction*) es un método *in vitro* para la síntesis enzimática de secuencias definidas de DNA o cDNA. La reacción utiliza dos oligonucleótidos (*primers*) (apartado 4.5.2.2.1), *forward* (F) y reverso (R), que hibridan en cada una de las dos cadenas complementarias del DNA y que flanquean la secuencia a amplificar (secuencia diana) por el enzima DNA polimerasa de la bacteria *Thermus aquaticus*, denominada Taq DNA polimerasa. En este trabajo se ha amplificado cDNA para determinar los transcritos de *Lrrfip1* presentes en corteza cerebral de rata. Dado que los productos de la extensión de los *primers* sintetizados en cada ciclo de PCR pueden servir como molde en el siguiente ciclo, el número de copias del cDNA diana crece de forma exponencial, aproximadamente se dobla en cada ciclo. La reacción de PCR consta de diversos pasos:

1. Desnaturalización: consiste en la desnaturalización del DNA por fusión a temperatura elevada, a fin de convertir el DNA bicatenario en monocatenario. Inicialmente 5 minutos a 95°C para favorecer la desnaturalización completa del cDNA. Además, en cada ciclo existe un primer paso de desnaturalización de 1 minuto.
2. Unión de los *primers* (*annealing*) al DNA diana: normalmente la temperatura óptima de *annealing* debe determinarse empíricamente y es un factor determinante en el diseño de la PCR. Si la temperatura es demasiado alta no se produce la unión mientras que si es demasiado baja la unión inespecífica aumentará enormemente. Una estimación de la

temperatura de *annealing* (T_a) de los *primers* se puede obtener en base a la siguiente fórmula, $T_a = \text{Temperatura de } \textit{melting} (T_m) (4 \cdot (G+C) + 2 \cdot (A+T)) - 5^\circ\text{C}$.

3. Extensión de la cadena de DNA por incorporación de nuevos nucleótidos a partir de los *primers*: La extensión está catalizada por el enzima Taq DNA polimerasa en presencia de iones Mg^{+2} . Para fragmentos de hasta 3kb la extensión se realiza a 72°C . En general 1 minuto de extensión es suficiente para fragmentos de hasta 1kb.

Las fases de desnaturalización del DNA molde, unión de los *primers* y extensión de la cadena de DNA constituyen un “ciclo” reacción de amplificación por PCR. El número de ciclos debe determinarse empíricamente en función de la abundancia del gen de interés. En una PCR estándar se puede trabajar entre 25 y 40 ciclos, teniendo en cuenta que a medida que aumenta el número de ciclos se acumulan errores de incorporación de nucleótidos detectados como productos de amplificación inespecíficos.

Las reacciones de PCR descritas en esta tesis se prepararon del siguiente modo:

1. Se mezclaron $10\mu\text{l}$ de *Master Mix* (VWR, Radnor, Pensilvania, EEUU) (mezcla comercial que contiene el tampón para la polimerasa, Taq DNA polimerasa, dNTPs y MgCl_2) + 50ng de cada *primer* (F y R) + 300ng de cDNA molde + agua libre de nucleasas para alcanzar un volumen final de $25\mu\text{l}$.
2. Las muestras se introdujeron en el termociclador (*MyCycler™ Thermal Cycler* (Bio-Rad Life Sciences)) y se sometieron a las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos seguida de 25-40 ciclos a 95°C 1minuto, T_a de los *primers* 1 minuto y 72°C 1minuto. Finalmente una extensión final a 72°C durante 5-15 minutos. Las T_a oscilaron entre 56 y 62°C (Tabla 4.1).
3. Las muestras se conservaron a 4°C hasta su posterior análisis.

4.5.2.2.1 Selección de *primers*

Uno de los parámetros más importantes para la amplificación específica de un gen mediante la técnica de PCR es la selección de los *primers*. El diseño de los *primers* utilizados para determinar cuáles de los transcritos posibles de *Lrrfip1*, recogidos en Ensembl y NCBI (apartado 4.1.2), se expresaban en corteza cerebral de rata se realizó mediante el programa *online Primer 3* (apartado 4.1.3) de acceso libre. En general los *primers* deben tener entre 18 y 24 bases, sin estructuras secundarias internas, con un contenido en G/C entre el 40-60%, con una distribución equilibrada de dominios ricos en G/C y A/T y sin complementariedad entre ellos en el extremo 3', ya que podrían formar dímeros. Además, la pareja de *primers* debe tener una T_m similar que permita una T_a de entre 55 y 65°C .

Cuando se estudia un gen con elevada homología con otros miembros de la misma familia, el diseño de los *primers* debe realizarse en las regiones de menor homología, determinadas mediante el programa BLAST (apartado 4.1.4). Una vez seleccionados los *primers* se comprobó también mediante este programa, BLAST, que éstos sólo reconocían el gen de interés. En nuestro estudio sólo se pudo seguir este procedimiento para el transcrito de referencia recogido en NCBI, ya que BLAST sólo incluye en su base de datos los genes conocidos y bien establecidos, y no contiene las posibles variantes descritas en Ensembl o las secuencias relacionadas de NCBI (CRA_) no validadas experimentalmente que hemos analizado para la caracterización de *Lrrfip1* en cerebro de rata. En este caso, para determinar los transcritos que reconoce cada uno de los *primers* se realizó un alineamiento de las secuencias de todos los transcritos frente a cada uno de los *primers* con el programa ClustalW2 (apartado 4.1.6).

Se ha utilizado una combinación de 9 *primers* F y 11 *primers* R para identificar los transcritos candidatos expresados en corteza cerebral de rata control y 24 horas después de la pMCAO. La secuencia de los *primers* y los amplicones esperados con cada una de las PCRs se recogen en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. *Primers* utilizados para la identificación mediante PCR de los transcritos de *Lrrfip1* expresados en cerebro de rata. Secuencias de los *primers* y amplicones esperados.

<i>Primer</i>	Secuencia (5'-3')	Ta (°C)	Transcrito	Amplicones esperados (pb)
A	Lrrfip1-9F	58	NM_001014269	533
	Lrrfip1-3R		CRA_k	533
			ENSRNOT00000056683	485
B	Lrrfip1-1F	60	NM_001014269	1214
	Lrrfip1-3R			
C	Lrrfip1-1F Lrrfip1-2R	60	ENSRNOT00000026939	563
			ENSRNOT00000026961	452
			CRA_f	452
			CRA_b	452
			CRA_c	434

Tabla 4.1. Continuación

<i>Primer</i>	<i>Secuencia (5'-3')</i>	<i>Ta (°C)</i>	<i>Tránsito</i>	<i>Amplificones esperados (pb)</i>	
D	Lrrfip1-1F Lrrfip1-5R	GAGTCCAGAAGCGCAAAGA GCTCCAACAAACATTCCCGTT	60	ENSRNOT00000026961	1427
				ENSRNOT00000026939	1538
				CRA_b	1427
				CRA_c	1409
				CRA_f	1241
				CRA_d	911
				CRA_h	785
E	Lrrfip1-1F Lrrfip1-1R	GAGTCCAGAAGCGCAAAGA GGCCGTTGCTCACCTCAA	57	ENSRNOT00000026939	1892
				ENSRNOT00000026961	1781
				CRA_b	1781
				CRA_c	1763
				CRA_f	1595
				CRA_d	1265
				CRA_h	1139
F	Lrrfip1-3F Lrrfip1-6R	TGGATCCCAGTCCCTTAGTAGAAG GAGGTGGCCGCCATACT	62	ENSRNOT00000026939	268
				ENSRNOT00000026961	202
				CRA_f	202
				CRA_e	202
				CRA_a	202
				CRA_b	202
				CRA_c	202
G	Lrrfip1-4F Lrrfip1-7R	GACGACGCGCTCAACCA CCATTTTGTGTCCAGCCCATA	56	CRA_a	162
H	Lrrfip1-5F Lrrfip1-8R	AACGGCAGCAGAAAGAGGT CCCTGCATGTATTTGCCTTC	60	CRA_g	235
I	Lrrfip1-6F Lrrfip1-9R	GACTCTTTGGCTCCGACCTT TCTCTCCGTTGGTGGCTATT	55	CRA_a	951
				CRA_b	951
				CRA_c	951
				ENSRNOT00000026961	951
				ENSRNOT00000026939	951
				CRA_e	765
				CRA_f	765

Tabla 4.1. Continuación

<i>Primer</i>	<i>Secuencia (5'-3')</i>	<i>Ta (°C)</i>	<i>Tránsito</i>	<i>Amplicones esperados (pb)</i>	
J	Lrrfip1-3F Lrrfip1-9R	TGGATCCCAGTCCCTTAGTAGAAG TCTCTCCGTTGGTGGCTATT	62	ENSRNOT00000026939	1052
				CRA_a	986
				CRA_b	986
				CRA_c	986
				ENSRNOT00000026961	986
				CRA_e	800
				CRA_f	800
				CRA_h	506
K	Lrrfip1-7F Lrrfip1-10R	GAGGACGACGCGCTCAAC TGTTACGGGAGCCCTTCTCA	60	CRA_a	652
				CRA_e	559
				CRA_i	169
				CRA_g	169
L	Lrrfip1-2F Lrrfip1-5R	ATGGGCACACAGGGATCG GCTCCAACAAACATTCCCGTT	55	CRA_a	1534
				CRA_e	1255
				CRA_g	865
				CRA_i	793
M	Lrrfip1-1F Lrrfip1-11R	GAGTCCAGAAGCGCAAAGA CGTCCTGAATCTGGTCCTTTAACT	55	ENSRNOT00000026939	860
				ENSRNOT00000026961	749
				CRA_f	749
				CRA_b	749
				CRA_c	731
N	Lrrfip1-8F Lrrfip1-2R	CCCTGCCTACCCAGAATGG CCCTCCGAGCCCCATAGA	60	ENSRNOT00000026961	69
				ENSRNOT00000026939	69
				CRA_f	69
				CRA_e	69
				CRA_b	69
				CRA_c	69
				CRA_a	69

pb: pares de bases. Las letras en la columna gris (A-N) corresponden a cada una de las reacciones de PCR realizadas.

4.5.2.2.2 Visualización en gel de agarosa

Los productos amplificados con cada una de las reacciones de PCRs se separaron por tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio (BrEt). La electroforesis es un método de separación de moléculas (proteínas o ácidos nucleicos) que se basa en el movimiento de moléculas con carga eléctrica bajo la influencia de un campo eléctrico externo. La concentración de agarosa depende del tamaño esperado de los fragmentos, pudiendo ser desde una concentración mínima del 0.7% (amplicones grandes de varias kb) hasta una máxima del 4% (amplicones de 50-150pb). El BrEt es un agente intercalante de DNA que cuando se expone a luz ultravioleta (UV) emite una luz roja-anaranjada que se intensifica unas 20 veces después de haberse unido a una cadena de DNA, lo que permite la visualización de los productos de PCR amplificados.

El protocolo para la preparación y electroforesis de un gel fue el siguiente:

1. Se disolvieron Xg (según %) de agarosa (Ecogen) en Xml (según el tamaño de gel) de tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X (Invitrogen, Life Technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU) en un matraz Erlenmeyer mediante calor (preferiblemente en baño maría o microondas) hasta que el líquido fue completamente transparente. A fin de evitar que la concentración del gel de agarosa variase por la evaporación se pesó el Erlenmeyer previamente en frío para añadir, poco a poco y mezclando para evitar la polimerización de la agarosa al enfriarse, el volumen de agua perdida debido a la evaporación.
2. Se dejó enfriar hasta 50°C y se añadió el BrEt (0.5µg/ml) (Merck). La temperatura debe bajar hasta 50°C para evitar que el BrEt se degrade.
3. La mezcla se vertió en el portageles evitando la formación de burbujas, se colocó el peine para definir los pocillos de carga y se dejó polimerizar de 20 a 30 minutos.
4. Las muestras se prepararon mezclando el producto de PCR con tampón de carga 1X (stock 6X: 0.25%, azul de bromofenol 0.25% xilen cianol y 30% glicerol en agua destilada) en un volumen final entre 10 y 30µl, según el tamaño del pocillo. De tampón de carga se añadió 1/6 del volumen de muestra.
5. Para la electroforesis se introdujo el gel de agarosa/BrEt en la cubeta de electroforesis, se cubrió completamente con TBE 1X y se cargaron las muestras y el marcador de peso molecular (1Kb *DNA ladder* o TrackIT™ 100bp *DNA ladder*, Invitrogen). Se aplicó una corriente de 10V/cm al gel y el tiempo de carrera dependió del fragmento que se esperaba visualizar. Los fragmentos de DNA al tener carga negativa migraron del polo negativo al positivo.
6. Las bandas amplificadas se visualizaron mediante luz UV en un transiluminador (Linus).

4.5.2.3 Secuenciación automática

Los amplicones obtenidos en cada una de las reacciones de PCR fueron secuenciados para identificar a cuál de los transcritos recogidos en Ensembl y NCBI correspondían. Para ello se ha utilizado la secuenciación automática de DNA desarrollada por Applied Biosystems basada en la metodología de Sanger [187,188] mediante el secuenciador automático *ABI PRISM® 310 Genetic Analyser* (Applied Biosystems).

Previamente a la reacción de secuenciación se purificaron los productos de PCR:

1. Cuando se obtuvo un único amplicón en la PCR se realizó una purificación del producto de PCR mediante el kit ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, Ohio, EEUU) a fin de eliminar los dNTPs y *primers* residuales, no consumidos en la reacción de PCR, que podrían interferir en la reacción de secuenciación. Siguiendo instrucciones de la casa comercial se realizó el siguiente protocolo:
 - a. Se mezclaron 5µl de producto de PCR con 2µl de ExoSAP-IT.
 - b. Se incubaron en termociclador durante 15 minutos a 37°C seguidos de 15 minutos a 80°C con lo que se obtuvo el producto de PCR listo para la reacción de secuenciación.
2. Cuando las PCRs generaron más de un amplicón fue necesaria la purificación individual de cada banda previa a la secuenciación. Para ello se recortó la banda de interés del gel de agarosa y se usó el *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) con el que se disolvió la agarosa y mediante un sistema de columna y varios tampones se obtuvo finalmente el cDNA purificado listo para la reacción de secuenciación u otras aplicaciones. Según las instrucciones de la casa comercial el protocolo fue el siguiente:
 - a. Por cada 10mg de gel de agarosa se añadieron 10µl de *Capture buffer type 2* en el microtubo. Se mezclaron por inversión y se incubaron a 60°C hasta que se disolvió completamente la agarosa, mezclando cada 3 minutos aproximadamente.
 - b. Se centrifugó el microtubo mediante un pulso de centrifuga y se transfirieron 600µl de *Capture buffer type 2* con la muestra a una columna.
 - c. Se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente y seguidamente se centrifugó la columna durante 30 segundos a 16000g.
 - d. Se descartó el eluido y se repitieron los pasos 2 y 3 hasta cargar toda la muestra disuelta.

- e. Se añadieron 500µl de *Wash buffer type 1* a la columna y se centrifugó durante 30 segundos a 16000 x g.
- f. Se descartó el eluido y se colocó la columna sobre un microtubo de 1.5ml libre de endonucleasas.
- g. Se añadieron entre 10-50µl de *Elution buffer type 6* en el centro de la membrana de la columna y se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- h. Se centrifugó durante 1 minuto a 16000g para recuperar el cDNA purificado, que se puede procesar inmediatamente o guardar a -20°C.

En la reacción de secuenciación se utilizó el kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) con una polimerasa termoestable (AmpliTaq™ DNA polimerasa FS) que permite una reacción de secuenciación cíclica con didesoxiribonucleótidos (ddNTPs) marcados con un fluoróforo. Hay cuatro ddNTP con fluoróforos distintos, uno para cada nucleótido. La enzima AmpliTaq™ DNA polimerasa FS es una variante de la polimerasa de *Thermus aquaticus* que se caracteriza por no tener actividad correctora 3'-5', de manera que se evita la eliminación de los ddNTPs terminadores que se incorporan en la cadena y paran la síntesis. La técnica se basa en la síntesis de una cadena complementaria a la cadena molde hasta que se incorpora un ddNTP marcado fluorescentemente al cual le falta el grupo OH en 3' de la desoxirribosa, lo que provoca el paro de la síntesis de la cadena ya que la polimerasa en ausencia del extremo OH 3' de la desoxirribosa no puede seguir incorporando dNTPs. De este modo se van generando aleatoriamente fragmentos de distintos tamaños que son separados por electroforesis capilar con polímero POP6 (Applied Biosystems) en el secuenciador automático *ABI PRISM® 310 Genetic Analyser* (Applied Biosystems) y analizados posteriormente mediante el programa 310 Data Collection (Applied Biosystems).

De acuerdo a las instrucciones de la casa comercial se preparó la reacción de secuenciación con el *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) para cada muestra del siguiente modo:

1. Se mezclaron 4µl de *Ready reaction premix (2.5X)* + 2µl de *BigDye Sequencing Buffer (5X)* + 0.32µl de *primer F o R (10µM)* + xµl de producto de PCR de acuerdo al tamaño del amplicón (100-200bp = 1-3ng; 200-500bp = 3-10ng; 500-1000bp = 5-20ng; 1000-2000bp = 10-40ng) + agua hasta un volumen final de 20µl.

2. Las reacciones se sometieron en termociclador *GeneAmp PCR System 2700* (Applied Biosystems) a las siguientes condiciones: 5 minutos a 96°C, 25 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C y 4 minutos a 60°C, finalizando a 4°C.

Una vez completada la reacción de secuenciación se procesaron para analizarlas en el secuenciador del siguiente modo:

1. Se precipitó el cDNA, pasando la reacción de secuenciación a un microtubo eppendorf de 1.5ml y añadiendo 110µl de etanol al 60%. Se dejó 10 minutos a temperatura ambiente.
2. Se centrifugó a 14000rpm durante 20 minutos.
3. Se descartó el sobrenadante con cuidado evitando llevarse el *pellet* de cDNA y evitando que quedaran gotas de sobrenadante en las paredes. Los restos de etanol se dejaron evaporar a temperatura ambiente con el microtubo destapado. Una vez secos se guardaron a -20°C o se siguió con el paso 4.
4. Se añadieron 27µl de formamida (Applied Biosystems), se resuspendió el *pellet* vorteando 3-4 veces vigorosamente y se realizó un pulso en centrífuga a máxima velocidad.
5. Se incubó el microtubo durante 3 minutos a 98°C, se colocó sobre hielo, se realizó un pulso en centrífuga a máxima velocidad y se transfirió el contenido a un tubo de 0.5µl (Applied Biosystems) que se colocó en la gradilla del secuenciador para su lectura.

4.5.3 Determinación del perfil de expresión de los miRNAs: Ensayo FlexmiR

Se realizó un cribado para identificar miRNAs diferencialmente expresados en corteza cerebral de rata en respuesta a la isquemia (objetivo 3.1) a través del análisis del perfil de expresión de 442 miRNAs en muestras control y a distintos tiempos después de la pMCAO (30 minutos, 6 horas, 7 y 14 días (n=2/grupo)) mediante el sistema *FlexmiR™ microRNA Assay Kit* (Luminex, Austin, Texas, EEUU), ensayo para el que no es necesario enriquecer la muestra en RNAs pequeños. Concretamente, este kit incluye el kit de marcaje *Flexmi™ MicroRNA Labeling Kit* y los paneles de ensayos *FlexmiR™ MicroRNA Human Panel* (319 miRNAs en 5 *pools* de microesferas) y el *FlexmiR™ MicroRNA Mouse/Rat Panel* (123 miRNAs en 2 *pools* de microesferas). Un *pool* de microesferas consiste en una colección de 60-100 sondas de captura unidas a una mezcla de microesferas en un mismo vial. Dado que los paneles *FlexmiR™ MicroRNA* tienen más de 100 ensayos diana, cada kit específico para cada especie incluye distintos *pools* para lograr analizar la mayor parte de las secuencias recogidas en la base de datos miRBase. El sistema FlexmiR combina la tecnología de

sondas *Exiqon Locked Nucleic Acid* (LNA™) y la tecnología multiplex de microesferas (*beads*) Luminex xMAP® para crear un *array* en fase líquida. La integración de estas tecnologías permite la detección de manera precisa de miRNAs sin necesidad de amplificar o fraccionar la muestra de RNA. Cada microesfera lleva en su interior una combinación de fluoróforos específica para cada uno de los miRNAs en el *array* y lleva unida en su superficie una sonda LNA también específica para cada miRNA, esto permite discriminar entre miRNAs de la misma familia estrechamente relacionados. Las sondas LNA son sondas en las que se ha incorporado un LNA. Este ácido nucleico bloqueado (“locked”) es un análogo de ácido nucleico con una modificación en el anillo ribosa que le proporciona mayor temperatura de *melting* (T_m), lo que conlleva que las sondas que incorporan este LNA presentan mayor especificidad y sensibilidad que las sondas convencionales en los ensayos de hibridación, permitiendo discriminar entre miRNAs que pueden diferir únicamente en un sólo nucleótido. Asimismo, las T_m de las sondas se han normalizado a fin de optimizar la hibridación bajo las condiciones del ensayo. La corrección de posibles variaciones de marcaje e hibridación entre muestras se realizan mediante microesferas control presentes en cada *pool* que permiten evaluar la integridad del ensayo y normalizar los resultados intra- e inter-muestras. Además, cada *pool* contiene un control negativo, agua tratada de manera idéntica al RNA total durante todo el ensayo, que se usa para la sustracción del ruido de fondo (*background*).

El ensayo consiste en (Figura 4.8):

1. Marcaje con biotina del extremo 3' del RNA total.
2. Hibridación del RNA marcado con las sondas de captura LNA unidas a la microesfera xMAP marcada fluorescentemente.
3. Detección de los miRNAs biotinilados mediante reacción con estreptavidina-ficoeritrina conjugada (SAPE) a 1mg/ml.
4. Análisis de las muestras en el equipo Luminex 100™ instrument con Luminex100 IS 2.3 *software* (Luminex), para identificar la microesfera fluorescente y cuantificar la intensidad SAPE.

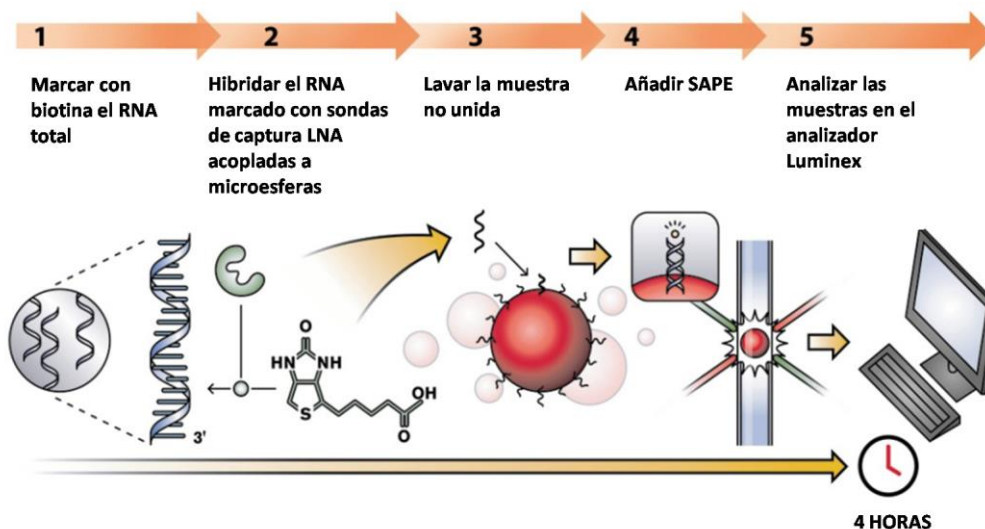


Figura 4.8. Esquema de trabajo del ensayo FlexmiR (modificado del manual de instrucciones del producto BG-FMIR-L20 de Luminex).

Según instrucciones de la casa comercial, los protocolos de biotilación, hibridación con sonda LNA y marcaje con SAPE de cada una de las muestras para los 7 *pools* del array fueron los siguientes:

1. Biotinilación:

- a. 3850ng de RNA total + 3.85µl de CIP (*Calf Intestinal Phosphatase*) Buffer + 3.85µl de CIP Enzyme + 3.08µl de Non-B (*Non-Biotinylated*) Controls + agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 26.95µl. Se incubó la mezcla 10 minutos a 37°C, 5 minutos a 95° y se mantuvo a 4°C hasta el siguiente paso
- b. 23.1µl de *Biotinylation Buffer* + 11.55µl de *Biotinylation Enzyme*, se añadieron a la mezcla del paso a, obteniendo un volumen final de 61,6µl. Se incubó 1 hora a 16°C, 15 minutos a 65°C y se mantuvo un máximo de 1 hora a 4°C hasta el siguiente paso.

2. Hibridación: Se mezclaron los 61.6µl de la reacción anterior con 107.8µl de *Hybridization Buffer* + 154µl de agua libre de nucleasas. En una placa de 96 pocillos se pusieron 8µl de las microesferas de los 7 *pools* en distintos pocillos y se añadieron 42µl de la mezcla anterior en cada uno. Se incubó 3 minutos a 95°C y 1 hora a 60°C, continuando enseguida con el paso 3.

3. SAPE: Se transfirieron los 50µl de cada pocillo a una placa filtrante (Millipore, Billerica, Massachusetts, EEUU) y se realizaron dos lavados con *wash buffer* precalentado a 60°C usando un colector de vacío (Millipore) y una bomba (Millipore). A continuación se añadieron 75µl/pocillo de SAPE (1:300) y se incubaron en oscuridad durante 30 minutos

agitando a 850-900rpm. Pasado este tiempo se transfirieron los 75µl a la placa de lectura y se analizaron las muestras en el Luminex 100™ instrument.

En cada una de las muestras y para cada miRNA de cada uno de los *pools* se analizaron un mínimo de 100 microesferas y la intensidad media de fluorescencia (MFI, *mean fluorescence intensity*) se recogió para el posterior análisis de datos. Sólo los miRNAs con valores de MFI como mínimo el doble de la intensidad del *background* en más de dos grupos analizados se consideró fiable y se analizaron con el programa *FlexmiR Data Analysis Software*, Version 2.0.23.0 (Luminex). Antes del análisis de los datos también se descartaron aquellos miRNAs humanos (hsa-) y de ratón (mmu-) sin homólogo descrito en rata (rno-). El análisis consistió en la sustracción del *background* individual para cada una de las microesferas y la normalización de los valores de MFI corregidos mediante la opción normalización por cuantiles (*quantile normalization*) del programa, la cual compara todos los puntos de datos y las intensidades de rango. Mediante análisis de la varianza (ANOVA) se identificaron diferencias significativas y la prueba t de Student se utilizó para comparar cada tiempo después de la pMCAO respecto a la media del grupo control, considerando significativo valores de $p < 0.05$.

4.5.4 Análisis de la expresión de los miRNAs y dianas seleccionadas y de los transcritos de *Lrrfip1* identificados

4.5.4.1 Retrotranscripción de miRNAs

Para validar los resultados obtenidos en el ensayo FlexmiR microRNA (objetivo 3.2), así como identificar miRNAs de referencia para la normalización de resultados de expresión, se realizó el análisis individual de la expresión mediante qPCR de U6snRNA, Y1 y snoRNA (como miRNAs de referencia) y de los miRNAs rno-miR-347, mmu/rno-miR-132 y mmu-miR-126-3p/rno-miR-126 identificados en el ensayo FlexmiR. Para ello se realizó previamente la retrotranscripción individual para cada miRNA en cada una de las muestras de RNA de corteza cerebral control y sometida a pMCAO a distintos tiempos, mediante el *TaqMan® miRNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) y el *primer* específico para la transcripción inversa de cada miRNA que contiene el ensayo *TaqMan® microRNA Assay* (Applied Biosystems). Este ensayo incluye *primer* para la retrotranscripción y el ensayo TaqMan (*primers* y sonda) para el análisis de expresión. Los *TaqMan® microRNA Assays* utilizados se recogen en la tabla 4.4 en el apartado 4.5.4.2.1.

La reacción de retrotranscripción de cada uno de los miRNAs para cada una de las muestras se realizó según instrucciones de la casa comercial:

1. Se mezclaron en un volumen final de 15µl, 7µl master mix (0.15µl 100mM dNTPs (con dTTP) + 1µl *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* 50U/µl + 1.5µl 10X *Reverse Transcription Buffer* + 0.19µl *RNase Inhibitor* 20U/µl + 4.16µl agua libre nucleasas) + 3µl 5X *Reverse Transcription (RT) Primer* + 5µl muestra (1.4ng/µl RNA total).
2. Las reacciones se sometieron a las siguientes condiciones en el termociclador (*MyCycler™ Thermal Cycler* (Bio-Rad Life Sciences)): 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C, 5 minutos a 85°C y 4°C ∞.

Las muestras obtenidas se conservaron a -20°C hasta su análisis (apartado 4.5.4.2).

4.5.4.2 Cuantificación relativa de la expresión génica

Mediante qPCR se ha analizado la expresión de (1) tres de los transcritos de *Lrrfip1* detectados en corteza cerebral de rata (rLrrfip1, CRA_g y rFlap-1), tanto en corteza cerebral control y tras la pMCAO como en cultivo primario de astrocitos control y sometidos a POG (objetivos 2.2 y 2.3), (2) un posible gen diana de *rLrrfip1* en astrocitos corticales (*Eaat2/GLT-1*) (objetivo 2.4.4), (3) cuatro posibles dianas de algunos de los miRNAs expresados diferencialmente tras la isquemia cerebral en corteza cerebral control y tras pMCAO (*Acsl4*, *Arf3*, *Btg2* y *Dpysl5*) (objetivo 3.4) y tres posibles dianas del miR-347 en neuronas corticales (*Acsl4*, *Bnip3l* y *Phyhip*) (objetivo 3.5.3) y, además, (4) se han validado los perfiles de expresión obtenidos con el ensayo FlexmiR (apartado 4.5.3) de tres miRNAs (miR-132, miR-347, miR-126) (objetivo 3.2).

Esta técnica consta de dos etapas:

1. Retrotranscripción:
 - a. Del tRNA o mRNA a cDNA (apartado 4.5.2.1)
 - b. De los miRNAs a cDNA (apartado 4.5.4.1)
2. PCR cuantitativa a tiempo real (apartado 4.5.4.2.1)

La cuantificación de la expresión génica puede ser absoluta o relativa. En nuestro caso hemos analizado la expresión relativa de cada uno de los mRNAs y miRNAs respecto a controles endógenos o genes de referencia (apartado 4.5.4.2.2) mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ [189], ya que no nos interesaba cuantificar los niveles absolutos de cada uno de ellos, sino comparar los niveles de expresión entre las muestras control y las muestras sometidas a los modelos de isquemia experimental a lo largo del tiempo o transfectadas con siRNAs o miRNAs.

4.5.4.2.1 PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

La qPCR es un método sensible y reproducible desarrollado en el 1992 [121] que consiste en una PCR en la que se puede cuantificar el producto que se está amplificando durante la reacción gracias a la monitorización de la fluorescencia generada por los fluorocromos introducidos en la reacción de amplificación. En el presente trabajo se ha utilizado la tecnología de Applied Biosystems: *TaqMan® Gene Expression Assays*, *TaqMan® MicroRNA Assays* y el sistema de detección *ABI Prism® 7000 Sequence Detection System*.

Los ensayos TaqMan® contienen una pareja de *primers* no marcados para amplificar la secuencia de interés y una sonda TaqMan® para detectar mediante fluorescencia la secuencia amplificada. Las sondas TaqMan® son sondas de hidrólisis que utilizan la actividad 5' exonucleasa de la enzima Taq polimerasa para generar fluorescencia. Se trata de sondas que tienen unido en el extremo 5' un fluorocromo (6-FAM) (denominado *reporter*) y en el extremo 3' un "secuestrador de fluorescencia" o *quencher* no fluorescente que impide la emisión de señal mientras la sonda esté intacta mediante la transferencia de energía tipo Förster entre el *reporter* y el *quencher*. Durante la amplificación, cuando la sonda se une a los ácidos nucleicos, la Taq polimerasa la hidroliza gracias a su actividad exonucleasa 5'-3', separando el *quencher* del *reporter* que de esta manera emitirá fluorescencia. Este proceso se repite en cada ciclo de la PCR y se produce un aumento de la fluorescencia proporcional a la cantidad de amplicones generados.

Durante la reacción de amplificación se mide la cantidad de fluorescencia emitida en cada ciclo de PCR y se registra el número de ciclos necesarios para generar un mínimo de fluorescencia, conocido como *Cycle Threshold* (C_T), el cual se establece en un punto de la fase de crecimiento exponencial de la curva de fluorescencia, antes de que se llegue a la fase *plateau* que corresponde a la saturación de la reacción de PCR (Figura 4.9). El valor C_T es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas de mRNA en la muestra y permite la cuantificación. Asumiendo una eficiencia del 100% en la PCR, la diferencia de 1 C_T equivale a una diferencia del doble en la cantidad inicial de muestra [190].

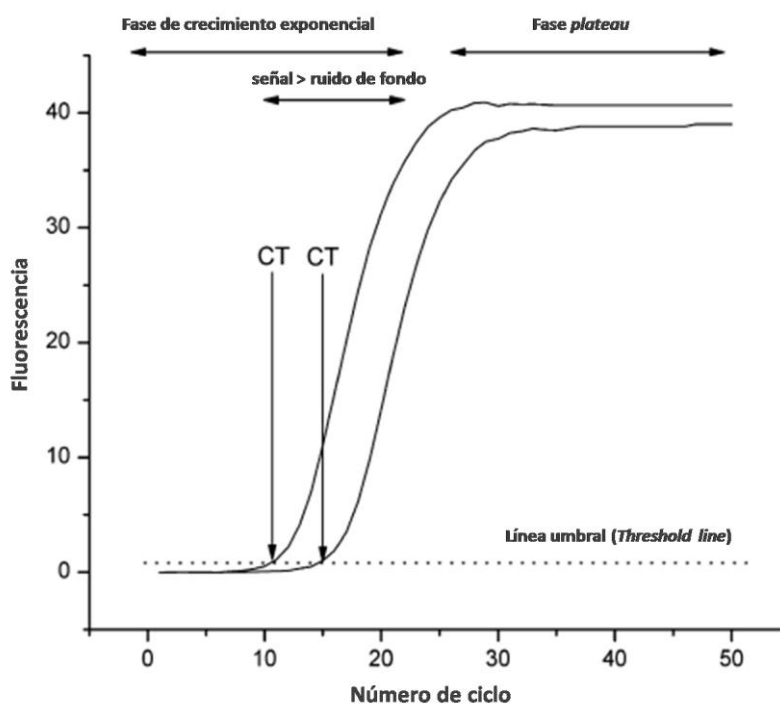


Figura 4.9. Curva de amplificación de la qPCR (extraído de Kubista *et al.*, 2006 [190]). CT: *Cycle Threshold*, que corresponde a el número de ciclos necesarios para generar un mínimo de fluorescencia durante la fase exponencial de la curva de fluorescencia que se usa para la cuantificación.

Para el análisis de expresión génica de los transcritos de *Lrrfip1* (objetivo 2.2 y 2.3) se diseñaron *Custom TaqMan® Assays* para analizar la expresión de 3 de los transcritos detectados mediante PCR convencional, siguiendo las instrucciones del *Custom TaqMan® Assays design and ordering Guide* (Part Number: 4367671; Applied Biosystems) (Tabla 4.2). Mediante este servicio se diseñan, sintetizan y entregan ensayos de calidad. Para ello es importante la selección y calidad de la secuencia por parte del cliente. Debe tenerse en cuenta si el gen de interés tiene o no variantes de *splicing*, si la secuencia seleccionada es exclusiva del gen o transcrito de interés y si existen en ella polimorfismos o regiones repetitivas. Unas 600pb es la longitud óptima de la secuencia para el diseño. El sitio de unión de la sonda debe estar cerca del centro de la secuencia e idealmente situarse entre el límite de dos exones, con lo que se excluye la amplificación y detección del DNA genómico. Por último es importante enmascarar regiones que no interesan, como polimorfismos o regiones homólogas en otro gen, para generar ensayos específicos del transcrito o gen de interés.

Tabla 4.2. Secuencias de los *primers* y las sondas de los *Custom TaqMan® Assays* diseñados.

Ensayo	Primers	Sonda (FAM)
Lrrfip1	5' CCCACTGCCTTGGGTATCA (F) 5' CTTGGTTTTCTTTACCCTGACTATCCA (R)	5' AAAACCAAAGTGAAAACCTC (F)
CRA_g	5' GGACACCGAGGCATCCAT (F) 5' GTCCTGAATCTGGTCCTTTAACTCA (R)	5' CAGGGAGATCAAGGAACTT (F)
CRA_a'	5' CCCTGCCTACCCAGAATGG (F) 5' CCCTCCGAGCCCCATAGA (R)	5' CCCCAGGCGTCCAT (F)

F:forward, R: reverse, FAM: 6-carboxyfluorescein

El resto de ensayos utilizados han sido *TaqMan® Gene Expression Assays* (Tabla 4.3) y *TaqMan® MicroRNA Assays* disponibles comercialmente (Tabla 4.4).

Tabla 4.3. *TaqMan® Gene Expression Assays* utilizados para los análisis de expresión génica mediante qPCR.

TaqMan® Gene Expression Assays		
Gen	Descripción	Ensayo*
Hprt	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase</i>	Rn01527840_m1
Gapdh	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	Rn99999916_s1
Oaz1	<i>Ornithine decarboxylase antizyme 1</i>	Rn00821793_g1
β2m	<i>β-2-microglobulin</i>	Rn00560865_m1
Ppia	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerasa</i>	Rn00690933_m1
Rpl13a	<i>Ribosomal Protein L 13A</i>	Rn00821946_g1
18S	<i>Eukaryotic 18SrRNA</i>	Hs99999901_s1
Ywhaz	<i>Tyrosine 3-monooxygenase</i>	Rn00755072_m1
Sdha	<i>Succinate dehydrogenase complex, subunit A</i>	Rn00590475_m1
Gusb	<i>Glucuronidase, beta</i>	Rn00566655_m1
Bcl2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>	Rn99999125_m1
Cox-2	<i>Cyclooxygenase-2</i>	Rn01483828_m1
Glit-1/Eaat2	<i>Glutamate transporter-1</i>	Rn00568080_m1
Acs14	<i>acyl-CoA synthetase long-chain family member 4</i>	Rn00671222_m1
Arf3	<i>ADP-ribosylation factor 3</i>	Rn02347948_m1
Btg2	<i>BTG family, member 2</i>	Rn00568504_m1
Dpysl5	<i>Dihydropyrimidinase-like 5</i>	Rn00576399_m1
Phyhip	<i>Phytanoyl-CoA 2-hydroxylase interacting protein</i>	Rn01468098_m1
Bnip3l	<i>BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3-like</i>	Rn00821653_g1

*: la codificación del ensayo indica “Rn” *Rattus norvegicus*; “Hs” *Homo sapiens*; “_m” ensayo que amplifica regiones exónicas (unión entre exones) y no amplifica DNA genómico; “_s” ensayo que amplifica una región intraexónica y detecta DNA genómico; “_g” ensayo que puede detectar DNA genómico.

Tabla 4.4. *TaqMan® MicroRNA Assays* utilizados para los análisis de expresión de miRNAs mediante qPCR.

TaqMan® MicroRNA Assays	
miRNA	Ensayo
U6snRNA	001973
Y1	001727
snoRNA	001718
4.5SRNA	001716
rno-miR-347	001334
mmu/rno-miR-132	000457
rno-miR-126	002228

Para la reacción de amplificación con los *TaqMan® Gene Expression Assays* se ha utilizado la *TaqMan® Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems), y para los *TaqMan® MicroRNA Assays* la *TaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG*(Applied Biosystems). Para la detección del transcrito CRA_a' en las muestras de corteza cerebral fue necesario un paso de preamplificación de las muestras, previo a la qPCR, con la *TaqMan® PreAmp Master Mix* (Applied Biosystems).

La reacción de amplificación de mRNAs y miRNAs se realizó siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Para los mRNAs se analizó cada muestra por triplicado y el protocolo fue el siguiente:

1. Se mezclaron, en un volumen final de 25µl, 1.25µl cDNA diluido en agua libre de nucleasas (cargando entre 1 y 100ng de cDNA según la abundancia del gen de estudio en las muestras) + 13.75µl de la mezcla formada por 1.25µl ensayo + 12.5µl Master Mix.
2. Se sometieron las muestras a las siguientes condiciones de amplificación: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

En el caso de los miRNAs se analizaron cuadruplicados de cada muestra según el siguiente protocolo:

1. Se mezclaron, en un volumen final de 20µl, 1.33µl miRNA RT + 1µl ensayo + 10µl Master Mix + 7.67µl agua libre de nucleasas.
2. Las condiciones de amplificación fueron las mismas que para los mRNAs pero sin el paso inicial de 2 minutos a 50°C.

Los resultados de la amplificación se obtuvieron mediante el programa 7000 System SDS Software v1.2.3 (Applied Biosystems) y con el método de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta C_T}$ [189] se obtuvieron los resultados de expresión. Este método consiste en la normalización de los

resultados de expresión de cada gen o miRNA en estudio respecto a los controles endógenos óptimos (apartado 4.5.4.2.2) para la condición experimental evaluada con la siguiente fórmula: $\Delta\Delta C_T = (C_{T\text{muestraX gen o miRNA}} - C_{T\text{muestraX endógeno}}) - (C_{T\text{ promedio muestras control gen o miRNA}} - C_{T\text{ promedio muestras control endógeno}})$.

4.5.4.2.2 Validación de controles endógenos: Método $2^{-\Delta C'_T}$

Como ya se ha mencionado, la selección de los controles endógenos es uno de los puntos más importantes en el diseño experimental de un estudio de cuantificación relativa, ya que deben normalizar los resultados de expresión corrigiéndolos en función de las diferencias que pueda haber en la cantidad de cDNA cargada en la reacción sin que afecte a su propia expresión la condición experimental que se esté evaluando. Recomiendan normalizar los resultados de expresión con un mínimo de 2 controles endógenos. Los genes analizados como posibles controles endógenos han sido: *Hprt*, *Gapdh*, *Oaz1*, *$\beta 2m$* , *Ppia*, *Rpl13a*, *18S*, *Ywhaz*, *Sdha* y *Gusb* para mRNAs, y U6snRNA, Y1, snoRNA y 4.5SRNA para miRNAs.

En esta tesis doctoral se han validado controles endógenos óptimos para el modelo de isquemia experimental *in vivo* (pMCAO) (para mRNAs y miRNAs) (objetivos 1.1 y 3.2, respectivamente), el modelo de isquemia experimental *in vitro* (POG) en astrocitos (objetivo 1.2), el modelo *in vitro* de apoptosis en neuronas (objetivo 3.5) y los experimentos de transfección de siRNAs en astrocitos (objetivo 2.4.3) y miRNAs en neuronas (objetivo 3.5.2) mediante qPCR y el método $2^{-\Delta C'_T}$ ($\Delta C'_T = C_{T\text{muestraX}} - C_{T\text{ promedio muestras control}}$), derivación del método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, y los programas geNorm y NormFinder (apartado 4.1.8). En primer lugar mediante el método $2^{-\Delta C'_T}$ y el análisis estadístico ANOVA seguido de Dunnett's post hoc se identificaron los controles endógenos candidatos con expresión invariable ($p > 0.05$) en cada una de las condiciones experimentales estudiadas. A continuación, entre estos controles endógenos, mediante los programas geNorm y NormFinder, se identificaron los genes con expresión más estable y la mejor combinación para la normalización de los resultados de expresión.

4.6 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE PROTEÍNA

4.6.1 Protocolo de recogida de muestras, extracción y cuantificación de proteínas

Según si se trataba de muestras de tejido o de cultivo celular se siguieron distintos protocolos. Para el tejido el protocolo de recogida de la muestra y extracción de proteína fue el siguiente:

1. Las muestras aisladas de corteza cerebral (apartado 4.3.1.2) (objetivos 2.2 y 3.4) se congelaron rápidamente a -80°C hasta el momento de la extracción.
2. La extracción de proteína se realizó homogeneizando las muestras de corteza cerebral mediante sonicación (Sonicador Q125; Biogen Científica S.L, Madrid, España) durante 10-12 segundos en un *buffer* de homogeneización preparado en *buffer* fosfato 0.1M que contiene cóctel inhibidor de proteasas (serinproteasas, cisteinproteasas y metaloproteasas) y 0.1% de Nonidet P40 (Roche, Basilea, Suiza), y manteniendo las muestras en hielo.
3. Seguidamente se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 13000g a 4°C y se recogió el sobrenadante que se guardó a -80°C hasta su uso después de realizar la cuantificación.

Para las muestras de cultivo celular se siguió el siguiente protocolo de recogida de las células y extracción de proteína:

1. Las muestras de astrocitos sometidos a POG (apartado 4.3.2.1) (objetivo 2.3) y astrocitos transfectados con siRNAs (apartado 4.4.1) (objetivo 2.4) así como las neuronas transfectadas con mimetizadores de miRNAs (apartado 4.4.2) y neuronas sometidas a privación de suero (apartado 4.3.3) (objetivo 3.5), se recogieron del siguiente modo:
 - a. Se aspiró el medio.
 - b. Se añadieron 500 μl de PBS 1X con 1% FBS y con la ayuda de un raspador de células (Sarstedt) se recogieron las células en un microtubo de 1.5ml (Sarstedt).
 - c. Se repitió el paso 2.
 - d. Se centrifugó el microtubo 10 minutos a 3000rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante.
 - e. El pellet celular se congeló a -80°C hasta el momento de la extracción.
2. Las muestras celulares fueron homogeneizadas usando *Lysis buffer* (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, EEUU) con cóctel inhibidor de proteasas (Roche)

y 1% PMSF (Sigma-Aldrich) mediante vorteo cada 5 minutos durante 30 minutos manteniendo las muestras en hielo.

4. Seguidamente se centrifugaron durante 10 minutos a 13000g a 4°C y se recogió el sobrenadante que se guardó a -80°C hasta su uso después de realizar la cuantificación.

Para la cuantificación de la proteína se utilizó el *Protein Assay Kit* (Bio-Rad Life Sciences) basado en el método Bradford, procedimiento simple y preciso para determinar la concentración de proteína soluble [191]. Consiste en la unión del colorante Comassie Blue G-250 a las proteínas, el cual al unirse, ocasiona un cambio de la absorción máxima del colorante desde 465 a 595nm. Extrapolando los valores de absorbancia a la recta patrón hecha con diferentes concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA) se calcula la concentración relativa de proteína. El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. Se preparó una recta patrón mediante diluciones seriadas de BSA en agua bidestilada (ddH₂O) en microtubos de 1.5ml, partiendo de la dilución madre o *stock* de concentración 1.48mg/ml. Las diluciones de proteína BSA fueron las siguientes: 0.4mg/ml, 0.2mg/ml, 0.1mg/ml, 0.05mg/ml, 0.025mg/ml y 0mg/ml.
2. Se diluyeron las muestras en ddH₂O y en microtubos de 1.5ml. Las muestras de corteza cerebral se diluyeron 1/40 y las muestras de neuronas y astrocitos 1/5 o 1/10.
1. Según instrucciones de la casa comercial se diluyó 1/4 (v/v) en agua y se filtró en papel Whatman N°1 el reactivo *Protein Assay Kit* 1/4 (v/v) y se mantuvo a temperatura ambiente para realizar el ensayo.
2. Se pipetearon 10µl/pocillo de cada estándar y muestra, por duplicado, en placa de 96 pocillos (Corning Life Sciences).
3. Se añadieron 200µl/pocillo de reactivo, evitando la formación de burbujas y eliminando las existentes.
4. Se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Finalmente, se realizó la lectura a 595nm en el equipo SpectraMax340PC384 (Molecular Devices, Sunnyvale, California, EEUU).

4.6.2 **Western blot**

El *western blot* es una técnica semicuantitativa que permite la detección de proteínas específicas en una muestra determinada. Con esta técnica se ha analizado la expresión de (1) la isoforma rLrrfp1 en corteza cerebral control y tras la pMCAO y en cultivo primario de astrocitos control y sometidos a POG (objetivos 2.2 y 2.3, respectivamente), (2) cuatro

posibles genes diana de rLrrfip1 en astrocitos corticales (*mTOR*, *Akt*, *β-catenin* y *Eaat2/GLT1*) (objetivo 2.4.4), (3) cuatro posibles dianas de algunos de los miRNAs expresados diferencialmente tras la isquemia cerebral en corteza cerebral control y tras pMCAO (*Acs14*, *Arf3*, *Btg2* y *Dpysl5*) (objetivo 3.4) y (4) tres posibles dianas del miR-347 en neuronas corticales (*Acs14*, *Bnip3l* y *Phyhip*) (objetivo 3.5.3).

El *western blot* consiste en:

1. Separación de las proteínas según su peso molecular y su carga mediante electroforesis en gel SDS de poliacrilamida (SDS-PAGE).
2. Transferencia a membrana de polifloruro de vinilideno (PVDF) y bloqueo
3. Detección mediante anticuerpos primarios específicos y anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa.

Los protocolos de preparación de muestras, electroforesis, transferencia, bloqueo y detección fueron los siguientes:

1. Preparación de muestras:
 - a. Las muestras obtenidas según se describe en el apartado anterior fueron diluidas a la concentración deseada (60µg de proteína de corteza cerebral y de 1 a 10µg de proteína cultivo celular) con cóctel de homogeneización (Roche) y se mezclaron en una ratio 1:1 con el tampón de preparación *Laemmli Sample Buffer* (Bio-Rad Life Sciences), el cual asegura una óptima resolución de las bandas de proteínas en geles SDS-PAGE. Este *buffer* contiene β-mercaptoetanol que ocasiona la rotura de las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas y mantiene los polipéptidos en estado desnaturalizado, consiguiendo que la separación de las proteínas sea sólo en función de su peso molecular. A su vez el dodecilsulfato sódico (SDS) (Sigma-Aldrich) también favorece la desnaturalización de las proteínas y forma complejos con ellas confiriéndoles carga negativa, lo que permite que todas las proteínas migren en el mismo sentido al aplicar la corriente eléctrica durante la electroforesis y transferencia.
 - b. Se centrifugaron las mezclas con un pulso de centrifuga y se hirvieron durante 5 minutos a 95°C en un termo-bloc (JP Selecta, Barcelona, España), manteniéndolas posteriormente en hielo hasta su uso.
2. Electroforesis: El soporte físico dónde se separaron las proteínas durante la electroforesis estaba constituido por fibras de monómeros de acrilamida entrecruzados con bisacrilamida (Bio-Rad Life Sciences), ratio 37:1, que polimerizan en disolución en

presencia de radicales libres formando una matriz reticular de consistencia gelatinosa. Los radicales libres necesarios son aportados por el persulfato amónico y quedan estabilizados por el Temed (N,N,N',N'-tetrametilen-diamina) (Bio-Rad Life Sciences). Se polimerizaron dos tipos de gel, uno inferior o separador y uno superior o apilador. El gel apilador permite que las proteínas se concentren en una banda estrecha antes de entrar en el gel separador, aumentando así la resolución al provocar que toda la muestra entre en la fase separadora al mismo tiempo. El gel separador permite la separación de las proteínas. La concentración del gel de acrilamida separador se elige en función del peso molecular de las proteínas que se quieren estudiar. En esta tesis se utilizaron geles verticales de 9cm x 6cm x 1.5mm compuestos por geles separadores al 7, 10 o 13% y con gel apilador al 4% (Tabla 4.5), el equipo Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad Life Sciences) y el siguiente protocolo de electroforesis:

- a. Se cargaron las muestras y el marcador de peso molecular de proteínas (*Precision Plus Protein™ Kaleidoscope Standards; Bio-Rad Life Sciences*).
- b. Se llenó la cubeta con tampón de electroforesis (TE) 1X preparado a partir de TE 10X (0.25M TRIS, 1.92M Glicina y 1% SDS (Sigma-Aldrich), en agua destilada y ajustando a pH 8-9).
- c. Se aplicó una corriente eléctrica constante de 100-150V durante 45 minutos-1hora.

Tabla 4.5. Composición gel apilador y geles separadores de *western blot*.

	Apilador (5ml)	Separador (15ml)		
	4%	7%	10%	13%
30% Acrylamide/Bis	660µl	3.5ml	5ml	6.5ml
0.5M Tris-HCl, pH 6.8	1.26ml	-	-	-
1.5M Tris-HCl, pH 8.8	-	3.75ml	3.75ml	3.75ml
10%SDS	50µl	150µl	150µl	150µl
Agua destilada	3ml	7.5ml	6ml	4.5ml
TEMED	5µl	7.5µl	7.5µl	7.5µl
10% APS	25µl	75µl	75µl	75µl

3. Transferencia y bloqueo: Tras separar las proteínas por peso molecular y carga en el gel de acrilamida éstas se transfirieron a la membrana de PVDF (Bio-Rad Life Sciences) por electrotransferencia con el equipo Mini Trans-blot (Bio-Rad Life Sciences) utilizando un método sándwich en el que se apilaron desde el polo negativo hacia el positivo una esponja y papel de filtro (o Whatmann) (Bio-Rad Life Sciences) empapados con tampón

de transferencia, el gel de acrilamida, la membrana de PVDF y otra vez el papel de filtro y la esponja empapados con tampón de transferencia (Figura 4.10). El objetivo era desplazar las proteínas del gel, cargadas negativamente, hacia el polo positivo de manera que quedasen atrapadas en la membrana, siendo ésta una réplica del patrón proteico del gel de acrilamida.

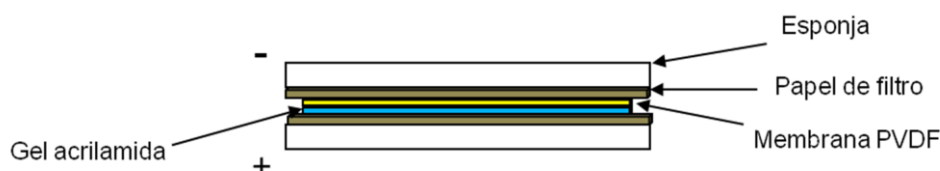


Figura 4.10. Esquema de la preparación del sándwich para la transferencia de proteínas del gel a la membrana durante el protocolo del *western blot*.

El protocolo de transferencia y bloqueo fue el siguiente:

- a. Se montó el sándwich de transferencia habiendo previamente activado la membrana de PVDF (30 segundos en metanol + 4 minutos en agua destilada) y evitando la formación de burbujas.
 - b. Se llenó la cubeta con tampón de transferencia, el mismo que el TE pero refrigerado.
 - c. Se introdujo la cubeta en un recipiente con hielo y se aplicó un amperaje constante de 400mA durante 75-90 minutos.
 - d. Finalizada la transferencia se extrajo la membrana y se bloqueó durante 1 hora con PBS-Tween (PBS 1X + 0.1% Tween 20 (Bio-Rad Life Sciences)) + 5% leche descremada en polvo, para bloquear los sitios de unión de la membrana que han quedado libres y favorecer que los anticuerpos se unan específicamente a sus proteínas diana presentes en la membrana.
 - e. Se realizó un lavado con PBS-Tween de 5 minutos en agitación.
4. Detección y análisis de resultados: Tras el bloqueo se detectó la proteína de interés mediante un anticuerpo primario que reconocía los puntos antigénicos presentes en la membrana y un anticuerpo secundario que reconocía específicamente la región constante del anticuerpo primario utilizado. El anticuerpo secundario lleva unida una molécula de peroxidasa de rábano (HRP) que permite la localización de los puntos de la membrana donde se ha unido el anticuerpo primario durante el revelado. El método utilizado para el revelado fue el sistema de detección ECL (*enhanced*

chemiluminescence), en el cual se conjuga el anticuerpo secundario-HRP y el sustrato luminol quimioluminiscente. En presencia de peróxido de hidrógeno, HRP cataliza el luminol y este emite luminiscencia.

- a. Se diluyó el anticuerpo primario en PBS-Tween (Tabla 4.6) y se incubó la membrana toda la noche a 4°C en agitación.
- b. Se realizaron 4 lavados de 5 minutos con PBS-Tween a temperatura ambiente y en agitación.
- c. Se diluyó el anticuerpo secundario, específico para el primario utilizado, en PBS-Tween 5% leche descremada en polvo y se incubó la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Los anticuerpos secundarios utilizados, fueron *donkey anti-goat IgG-HRP* (sc-2020, 1/5000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, EEUU), *anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody* (7074S, 1/5000; Cell Signaling Technology) y *goat anti-Mouse IgG* (401215, 1/10000; Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).
- d. Se realizaron 4 lavados de 5 minutos con PBS-Tween a temperatura ambiente y en agitación.
- e. Se cubrió la membrana con la solución de revelado y se mantuvo en oscuridad durante 3 minutos a temperatura ambiente. Los sustratos de revelado utilizados fueron, enumerados de menor a mayor sensibilidad, *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Fisher Scientific), *Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate* (Millipore) y *SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate* (Thermo Fisher Scientific), preparados según instrucciones de las casas comerciales. Se eligió uno u otro sustrato en función de la concentración de la proteína de interés en la muestra de estudio.
- f. Se eliminó el exceso de solución de revelado sobre papel de filtro y se colocó la membrana en un cassette de autoradiografía (Agfa, Mortsel, Bélgica) donde se capta la luz emitida (fotones) en films autoradiográficos (Kodak, Rochester, Nueva York, EEUU) y se revela manualmente en cámara oscura o automáticamente mediante el equipo Gel Logic 2200 Imaging System (Kodak).
- g. El resultado obtenido en el revelado fueron bandas oscuras que correspondían a la proteína de interés y el peso molecular de la proteína se pudo estimar en comparación con la migración de las bandas del marcador de peso molecular. La cuantificación de la expresión de la proteína de interés se obtuvo mediante

densimetría de las bandas con el *software* Kodak MI 5.0 SE version (Kodak) y se utilizó la β -actina (Santa Cruz Biotechnology) como control de carga de la muestra.

Tabla 4.6. Anticuerpos primarios y diluciones utilizadas para el análisis de proteínas mediante *western blot*.

Proteína	Dilución	Referencia
Lrrfip1*	1:1000	sc-68386 ^a
β -catenina fosforilada en Ser552	1:1000	9566 ^b
β -catenina	1:1000	9581 ^b
Akt fosforilada en Ser473	1:1000	4058 ^b
Akt	1:1000	9272 ^b
mTOR fosforilado en Ser2448	1:1000	2971 ^b
mTOR	1:1000	2983 ^b
Glt-1/Eaat2	1:1000	ab41621 ^c
Pdcd4	1:1000	9535 ^b
Acs14	1:1000 (corteza) 1:3000 (neuronas)	sc-134507 ^a
Arf3	1:200	sc-135841 ^a
Btg2	1:200	sc-33775 ^a
Bnip3l	1:1000	sc-28240 ^a
Phyhip	1:200	sc-133911 ^a
Dpysl5	1:2000	ab36203 ^c
β -actina	1:1000	sc-47778 ^a

* este anticuerpo solo reconoce la isoforma mayoritaria de Lrrfip1 (NP_001014291).

^a Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, EEUU; ^b Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, EEUU; ^c Abcam, Cambridge, Reino Unido.

4.6.3 Inmunofluorescencia

Para determinar en qué tipos celulares se expresaba rLrrfip1 en corteza cerebral de rata, su localización subcelular en astrocitos y, los cambios de expresión y localización tras los modelos de isquemia experimental (pMCAO y POG), se realizó doble inmunofluorescencia en secciones cerebrales (apartado 4.6.3.1) (objetivo 2.2) y en cultivo de astrocitos (apartado 4.6.3.2) (objetivo 2.3). Esta técnica, igual que el *western blot*, se basa en la detección de proteínas de interés mediante anticuerpos primarios específicos y anticuerpos secundarios conjugados con un fluorocromo para la visualización.

4.6.3.1 Inmunohistofluorescencia

Veinticuatro horas después de la pMCAO, ratas sometidas al modelo de isquemia experimental y ratas control (n=2/grupo) fueron anestesiadas con pentobarbital sódico y perfundidas a través del ventrículo izquierdo con tampón fosfato 0.1M primero, para lavar los vasos sanguíneos, y seguidamente con PFA (Sigma-Aldrich) al 4% para fijar el cerebro. Se extrajeron los cerebros y se fijaron durante 4 horas a temperatura ambiente en PFA al 4%. Seguidamente se mantuvieron los cerebros durante 72 horas en sacarosa al 30% a 4°C para conseguir crioprotección en la congelación posterior. De cada uno de los cerebros congelados se obtuvieron secciones seriadas coronales de 40 µm de espesor mediante el uso de un microtomo de deslizamiento (Leica SM2000R; Leica Biosystems, Wetzlar, Alemania) y se guardaron hasta su procesamiento a -20°C en tubos con líquido anti-congelante compuesto por PBS 1X + 30% de etilenglicol (Sigma-Aldrich) + 30% de glicerol (Sigma-Aldrich).

Una serie completa de cada cerebro se montó ordenadamente en portaobjetos Superfrost Plus (Thermo Fisher Scientific) y se identificó el tejido infartado del neocórtex mediante la tinción de Nissl con violeta de cresilo, colorante acidófilo que tiñe el núcleo celular y el retículo endoplásmico rugoso de las neuronas. El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. Los portaobjetos con los cortes pegados se lavan con agua destilada durante 1-3 minutos.
2. Se tiñen con violeta de cresilo al 1% durante 5-10 minutos.
3. Se lavan con agua destilada durante 1 minuto aproximadamente.
4. Se diferencian en alcohol-acético (etanol 70% con ácido acético) durante 15 segundos aproximadamente.
5. Finalmente, se deshidratan con etanol 96% y etanol 100%, se aclaran y se montan.

Secciones adyacentes a las identificadas con infarto mediante tinción de Nissl fueron procesadas para inmunohistofluorescencia en flotación según el siguiente protocolo:

1. Se lavaron los cortes seleccionados durante 15 minutos con PBS1X.
2. Se realizó el desenmascaramiento antigénico con tampón citrato (95ml ácido cítrico 0.1M + 415ml citrato sódico 0.1M + agua destilada (Vf=1l), pH 6) en un incubador a 92°C durante 10-15 minutos. El desenmascaramiento antigénico es necesario para desbloquear el acceso de los anticuerpos a los epítomos de los antígenos, ya que el formaldehído forma enlaces cruzados estables entre las proteínas que pueden impedir el reconocimiento por el anticuerpo.

3. Se dejaron enfriar los cortes durante 20 minutos y se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS 1X.
4. Se permeabilizaron y bloquearon durante 1 hora con 5% BSA + 0.3% Tritón™ X-100 en PBS 1X.
5. Se incubaron *overnight* a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios diluidos en la misma solución de permeabilización y bloqueo descrita en el punto 4: anticuerpo policlonal de conejo contra Lrrfip1 (1:20; Santa Cruz Biotechnology) + anticuerpo monoclonal de ratón contra el núcleo de neuronas (NeuN) (1:100; Millipore) o contra la proteína acídica fibrilar glial, marcador específico de astrocitos (*glial fibrillary acidic protein*, GFAP) (1:500; Millipore).
6. Se lavaron los cortes 3 veces durante 10 minutos en PBS + 0.3% Tritón™ X-100.
7. Se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad con los anticuerpos secundarios correspondientes diluidos en 2% BSA + 0.3% Tritón™ X-100 en PBS 1X. En concreto se usó un anticuerpo de origen cabra contra IgG de conejo unido al fluoróforo Alexa Fluor 488 (Alexa Fluor® 488 *goat anti-rabbit* IgGs (1:40; Invitrogen), para la detección de rLrrfip1, y un anticuerpo de origen cabra contra IgG de ratón unido al fluoróforo Alexa Fluor 594 (Alexa Fluor® 594 *goat anti-mouse* IgGs (1:40; Invitrogen, Molecular Probes) para la detección del tipo celular.
8. Se lavaron 3 veces durante 10 minutos en PBS + 0.3% Tritón™ X-100 y en oscuridad.
9. Se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente con 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride (DAPI) (300nM; Invitrogen), marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN y permite la identificación de los núcleos celulares.
10. Se lavaron los cortes 3 veces durante 10 minutos en PBS + 0.3% Tritón™ X-100 y se montaron los cortes sobre portaobjetos (Thermo Fisher Scientific) que se dejaron secar *overnight* a temperatura ambiente en oscuridad.
11. Finalmente, se lavaron los portaobjetos en agua destilada y se cubrieron los cortes con medio de montaje (Polysciences Inc., Warrington, Pensilvania, EEUU) y un cubreobjetos (Thermo Fisher Scientific).

La adquisición de imágenes se realizó con el equipo BD Pathway™ 855 Bioimager System (Becton-Dickinson Biosciences), sistema que permite el análisis de células vivas y fijadas a partir de una óptica de precisión y un programa para la adquisición de imágenes y su análisis exhaustivo (BD Attovision™, Becton-Dickinson Biosciences). El equipo permite

utilizar el modo confocal (z-stack o secciones Z) y el enfoque automático basado en láser, cuando se requiere un mayor control sobre la adquisición de las imágenes. El modo confocal permite reconstruir tridimensionalmente muestras a partir de la captura de planos ópticos de ésta mediante la excitación con el láser. El uso del modo confocal evita el cruce de canales, proporcionando imágenes de alta resolución sin la fluorescencia de fondo y permite determinar la colocalización perfectamente. En concreto, las imágenes se obtuvieron en modo confocal a través de diferentes canales para Alexa Fluor® 488 (pseudo-color verde), Alexa Fluor® 594 (pseudo-color rojo) y DAPI (pseudo-color azul) del Sistema 855 Pathway BD con el objetivo 20X (NA 075 Olympus). Para cada uno de los canales se usó siempre la misma configuración para todas las muestras analizadas. Se adquirieron 5 secciones Z separadas entre sí por 2.2µm de cada corte y se fusionaron las 5 en una única imagen. Tanto la adquisición como la fusión de imágenes se llevaron a cabo con el *software* BDAttovision™ (Becton-Dickinson Biosciences). Todas las secciones cerebrales se procesaron conjuntamente y se realizaron controles en paralelo sin anticuerpo primario, pero sí con anticuerpo secundario, que mostraron niveles muy bajos de marcaje inespecífico.

4.6.3.2 Inmunocitofluorescencia

Para realizar la inmunofluorescencia en astrocitos POG y control veinticuatro horas después de la reperusión de la POG (apartado 4.3.2) se siguió el siguiente protocolo:

1. Se aspiró el medio de reperusión y se realizó un lavado con PBS 1X.
2. Se fijaron las células con PFA al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Se lavaron con PBS 1X y en este punto se guardaron en PBS 1X a 4°C hasta seguir con el siguiente punto.
4. Las células se permeabilizaron durante 10 minutos con PBS 1X + 0.25% Tritón™ X-100.
5. Se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBS 1X.
6. Se bloquearon durante 30 minutos con PBS 1X + 5% BSA a temperatura ambiente.
7. Se incubaron *overnight* a 4°C con anticuerpos primarios contra rLrrfip1 (policlonal de conejo; 1:50; Santa Cruz Biotechnology) y GFAP (monoclonal de ratón; 1:100; Millipore) diluidos en la solución de bloqueo (punto 6).
8. Se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBS 1X.
9. Se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad con anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 594 (1:40; Invitrogen), para la detección de rLrrfip1 y GFAP, respectivamente.

10. Se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBS 1X.
11. Los núcleos se marcaron mediante DAPI (300nM) durante 5 minutos a temperatura ambiente.
12. Finalmente, las células se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBS 1X, y se dejó el último lavado en el pocillo.

Igual que para la inmunohistofluorescencia (apartado 4.6.3.1), la adquisición de imágenes se realizó mediante el equipo *BD Pathway™ 855 Bioimager System* (Becton-Dickinson Biosciences) con un objetivo 40X (NA 075 Olympus) y mediante el uso de diferentes canales para Alexa Fluor® 488 (pseudo-color verde), Alexa Fluor® 594 (pseudo-color rojo) y DAPI (pseudo-color azul). Para cada uno de los canales se usó siempre la misma configuración y la adquisición y la fusión de imágenes de los distintos canales se llevaron a cabo según el procedimiento recomendado por la casa comercial mediante el *software* BDAttovision™ (Becton-Dickinson Biosciences).

4.7 ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD CELULAR

Las condiciones óptimas de transfección de mimetizadores de siRNAs (apartado 4.4.1.2) (objetivo 2.4.2) y miRNAs (apartado 4.4.2.2) (objetivo 3.5.1) se establecieron con el análisis de la muerte celular inducida por siRNAs citotóxicos mediante el método MTT (apartado 4.7.1).

Por otro lado, entre 60 y 65 horas después de transfectar neuronas corticales con mimetizadores de miRNAs (apartado 4.4.2) se evaluó la viabilidad celular (LDH) (apartado 4.7.2) y la muerte apoptótica (apartado 4.7.3) en los distintos grupos experimentales.

4.7.1 Ensayo de bromuro de 3-(4,5-Dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)

Este método se basa en la evaluación de la función mitocondrial como índice de viabilidad celular a través de la reducción por parte de las células metabólicamente activas de las sales de tetrazolio (bromuro 3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio; MTT) (Sigma-Aldrich) en el compuesto final formazán, mediante la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa [192]. El formazán forma precipitados de color lila que posteriormente son solubilizados con DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma-Aldrich). La coloración se cuantifica en un lector de microplacas y la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

El protocolo en placa de 96 pocillos fue el siguiente:

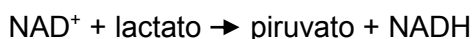
1. Se aspiró el medio de cultivo de todos los pocillos.
2. Se añadieron 100µl/pocillo de medio completo.
3. Se añadieron 10µl/pocillo de solución MTT 0.5% (sales de tetrazolio diluidas en PBS 1X).
4. Se incubaron a 37°C durante 3 horas.
5. Se aspiró el medio, se añadieron 100µl/pocillo de DMSO y se golpeó suavemente la placa para ayudar a disolver los cristales de formazán.
6. Se realizó la lectura a 570nm (SpectraMax340PC384; Molecular Devices).

La viabilidad celular se expresó como un porcentaje respecto el valor obtenido de los cultivos del grupo control de dos experimentos independientes.

4.7.2 Ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH)

En las neuronas transfectadas con mimetizadores de los miRNAs miR-347 y miR-21 (objetivo 3.5) se analizó la liberación de LDH, enzima citosólica estable que se libera tras la lisis celular y es considerada un marcador de daño celular [193]. Su liberación al medio extracelular se determinó mediante el kit comercial *CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay* (Promega). Se trata de un ensayo colorimétrico que resulta de la conversión de una sal de tetrazolio (iodonitrotetrazolium, INT) en un producto rojo de formazán. La cantidad de color generada es proporcional al número de células lisadas. La reacción química general de este ensayo es la siguiente:

LDH



Diaforasa



El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. Se recogieron 120µl de sobrenadante de cada grupo experimental, por duplicado, en una placa de 96 pocillos y se centrifugaron durante 4 minutos a 250g.
2. Se transfirieron 50µl/pocillo al fondo de una placa nueva de 96 pocillos.
3. Se añadieron 50µl/pocillo de *Substrate Mix* reconstituido y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.

4. Finalmente, se añadieron 50µl/pocillo de *Stop Solution*, se eliminaron las burbujas existentes y se realizó la lectura de la absorbancia a 490nm (SpectraMax340PC384; Molecular Devices).

El ensayo LDH se midió en un mínimo de 4 pocillos diferentes por experimento y se realizaron dos experimentos independientes. La liberación de LDH se expresó como porcentaje respecto al LDH total celular comparado con el control negativo de transfección (-Ctrl).

4.7.3 Anexina V/Ioduro de propidio (IP)

La muerte celular por apoptosis de las neuronas transfectadas con mimetizadores de los miRNAs miR-347 o miR-21 (objetivo 3.5) se determinó mediante citometría de flujo tras teñir las neuronas con anexina V conjugada con FITC (*Fluorescein IsoThioCyanate*) e ioduro de propidio (IP) (Becton-Dickinson Biosciences). El método se basa en la detección de la fosfatidilserina, que en las células apoptóticas transloca del interior al exterior de la membrana plasmática. La anexina V es una proteína anticoagulante vascular que no es capaz de difundir a través de la membrana y que posee una gran afinidad por la fosfatidilserina. Por ello, unida a un fluorocromo adecuado, permite la identificación de las células apoptóticas tras su unión a la fosfatidilserina localizada en su superficie celular. Ya que la anexina V también es capaz de unirse a la fosfatidilserina en el interior de aquellas células que no tienen intacta su membrana plasmática (consideradas células necróticas), junto con la anexina V se utilizó la tinción con IP, que se une al DNA de las células necróticas que han perdido la integridad de la membrana. Así, sólo aquellas células inmunoreactivas para la anexina V que mostraron ser negativas para el IP se consideraron apoptóticas [194].

El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. Se aspiró el medio, se lavaron con PBS 1X y se recolectaron las neuronas suavemente mediante incubación con *Enzyme-Free Cell Dissociation Solution* (Millipore).
2. Se centrifugaron durante 5 minutos a 1500rpm.
3. Se lavaron 3 veces con PBS 1X frío centrifugando durante 5 minutos a 1500rpm entre lavado y lavado.
4. Se incubaron durante 15 minutos con 5µl Anexina V-FITC y 10µl IP, siguiendo las instrucciones del fabricante.
5. Finalment se realizó el análisis de las señales de la anexina V-FITC y del IP en los canales FL1 y FL2, respectivamente, de un citómetro de flujo *FACScalibur* (Becton-

Dickinson Biosciences) utilizando los programas *CellQuest*TM (Becton-Dickinson Biosciences) y FlowJo (TreeStar Inc., Ashland, Oregon, EEUU).

Se consideraron células apoptóticas aquellas anexina V-FITC⁺ e IP⁻. Los resultados se expresaron como porcentaje de neuronas apoptóticas y fueron el promedio de dos experimentos independientes.

4.8 RECAPTACIÓN DE GLUTAMATO TRITIADO (³H] GLUTAMATO)

La actividad de los transportadores de glutamato de los astrocitos transfectados con los siRNAs contra *Lrrfip1* (objetivo 2.4) se midió utilizando una técnica que permite la determinación de la captación de [³H] glutamato por parte de los cultivos de astrocitos, método puesto a punto anteriormente en el laboratorio del Dr. Lizasoain y la Dra. Moro [176]. Esta determinación se llevó a cabo 6 días después de la transfección de siCTRL o siLrrfip1 siRNAs en astrocitos corticales. La mitad de los pocillos de cada grupo experimental se lavaron con solución control compuesta por: H₂O, 144 mM NaCl, 5.4mM KCl, 1.8mM CaCl₂, 0.8mM MgCl₂, 10mM HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfónico), 33mM glucosa y pH ajustado a 7.4 a 37°C, mientras que la otra mitad se lavaron en una solución con la misma composición, pero en la que el Na⁺ había sido sustituido de forma equiosmótica por colina, lo que nos permitía estudiar la actividad de los transportadores de glutamato dependientes de Na⁺. Una vez lavados los cultivos se incubaron las células durante 90 segundos con la solución Na⁺ o colina correspondiente, pero que contenía glutamato frío (3μM) (Sigma Aldrich) y [³H] glutamato (8 μCi/ml) (Amersham). Se utilizó este tiempo para la captación porque, según experimentos anteriores, la captación de glutamato durante este periodo de tiempo sigue una cinética lineal. Al final del periodo de incubación se retiró la solución y se lisaron las células utilizando ácido perclórico 0,3M. Dado que el [³H] glutamato es un compuesto radioactivo todo el procedimiento se realizó en la Instalación Radiactiva Central (IRC) de la Facultad de Medicina de la UCM.

El protocolo seguido fue el siguiente:

1. Se colocaron las placas en un baño a 37°C y se lavaron las células con la solución correspondiente, sodio o colina, sin glutamato. Se realizaron dos lavados rápidos y el tercero se dejó 5 minutos.
2. Se aspiró el medio y se pusieron 400μl de solución correspondiente ya con glutamato, dejando un intervalo de 10 segundos entre pocillo y pocillo porque la recogida debía de hacerse en el tiempo exacto de 90 segundos.

3. Pasados los 90 segundos se aspiró la solución de cada pocillo, también dejando un intervalo de 10 segundos, y se añadieron 400µl de perclórico 0.3M frío para lisar las células.
4. Se introdujeron las placas en el congelador 15 minutos, para favorecer la lisis celular. Pasado este tiempo, se rascaron cada pocillo con un raspador de células (Sartstedt) y se recogió todo el lisado celular en el tubo de centelleo (Molecular Devices) que contenía 2ml de líquido de centelleo (*Emulsifier-SafeTM*; PerkinElmer, Waltham, Massachussets, EEUU).
5. Se vortearon bien los tubos y se realizó la lectura en el contador de centelleo líquido (*Wallac Win Spectral, T1414 Liquid Scintillation Counter*, PerkinElmer).

La recaptación de [³H] glutamato se calculó restando a la recaptación de las células a las que no se les había retirado el Na⁺ la recaptación inespecífica de las células incubadas con colina. Los resultados se obtuvieron mediante el promedio de tres experimentos independientes.

4.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como media ± error estándar de la media (EEM) o como porcentaje del número de experimentos indicados en cada apartado.

Las diferencias significativas entre las distintas condiciones experimentales se determinaron mediante análisis de la varianza (ANOVA) seguido del contraste de Dunnett o mediante la prueba t de Student, comparando cada grupo experimental respecto a la media de su control. Cuando los datos no presentaban una distribución normal se utilizaron los tests de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney.

El análisis estadístico se realizó con la versión 11.5.0 del *software* SPSS (IBM). Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # $p < 0.001$).

5. RESULTADOS

En este apartado se describen los resultados obtenidos en la presente tesis, recogidos en tres capítulos. Cada uno de ellos corresponde a uno de los objetivos principales. Parte de estos resultados han sido publicados en tres artículos científicos (Anexo I).

5A. Objetivo 1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LA ISQUEMIA CEREBRAL: CONTROLES ENDÓGENOS EN LOS MODELOS DE ISQUEMIA EXPERIMENTAL

5A.1 IDENTIFICACIÓN DE CONTROLES ENDÓGENOS ÓPTIMOS PARA EL MODELO DE ISQUEMIA *IN VITRO*

Los resultados de expresión génica de *Gapdh*, *Hprt*, *Ppia*, *18SrRNA*, *β 2m*, *Oaz1*, *Gusb*, *Ywhaz*, *Sdha* y *Rpl13a* en astrocitos sometidos a POG (apartado 4.3.2.1) y recogidos a los 0 y 30 minutos y a las 2, 6, 24 y 48 horas después de la reperusión se muestran en la Figura 5A.1.

Se detectaron cambios significativos en la expresión respecto al grupo control de los controles endógenos candidatos *Gapdh*, *Hprt*, *Ppia*, *18SrRNA*, *β 2m*, *Oaz1*, *Gusb* e *Ywhaz* ($p < 0.001$ global en todos los casos) (Figura 5A.1A-H, respectivamente). En concreto, aumentó significativamente la expresión de *Gapdh* a tiempo 0 ($p < 0.05$; Figura 5A.1A), de *Hprt* a los 0 ($p < 0.001$), 30 minutos ($p < 0.01$) y a las 6 horas ($p < 0.001$) (Figura 5A.1B), de *Ppia* a los 0 y 30 minutos ($p < 0.001$ en ambos casos), y a las 2 y 6 horas ($p < 0.05$ en ambos casos) (Figura 5A.1C) y disminuyó significativamente la expresión de *18SrRNA* a las 24 ($p < 0.01$) y 48 horas ($p < 0.001$) (Figura 5A.1D), de *β 2m* a los 0 ($p < 0.01$), 30 minutos y a las 6 ($p < 0.001$ en ambos casos) y 24 horas ($p < 0.05$) (Figura 5A.1E), de *Oaz1* a las 24 ($p < 0.01$) y 48 horas ($p < 0.05$) (Figura 5A.1F) y de *Gusb* a las 2 horas ($p < 0.001$; Figura 5A.1G). En cambio, el análisis de expresión de *Sdha* y *Rpl13a* mostró que ambos controles endógenos candidatos no varían significativamente su expresión después de la reperusión en los tiempos analizados ($p = 0.065$ y $p = 0.244$, respectivamente) (Figura 5A.1I-J).

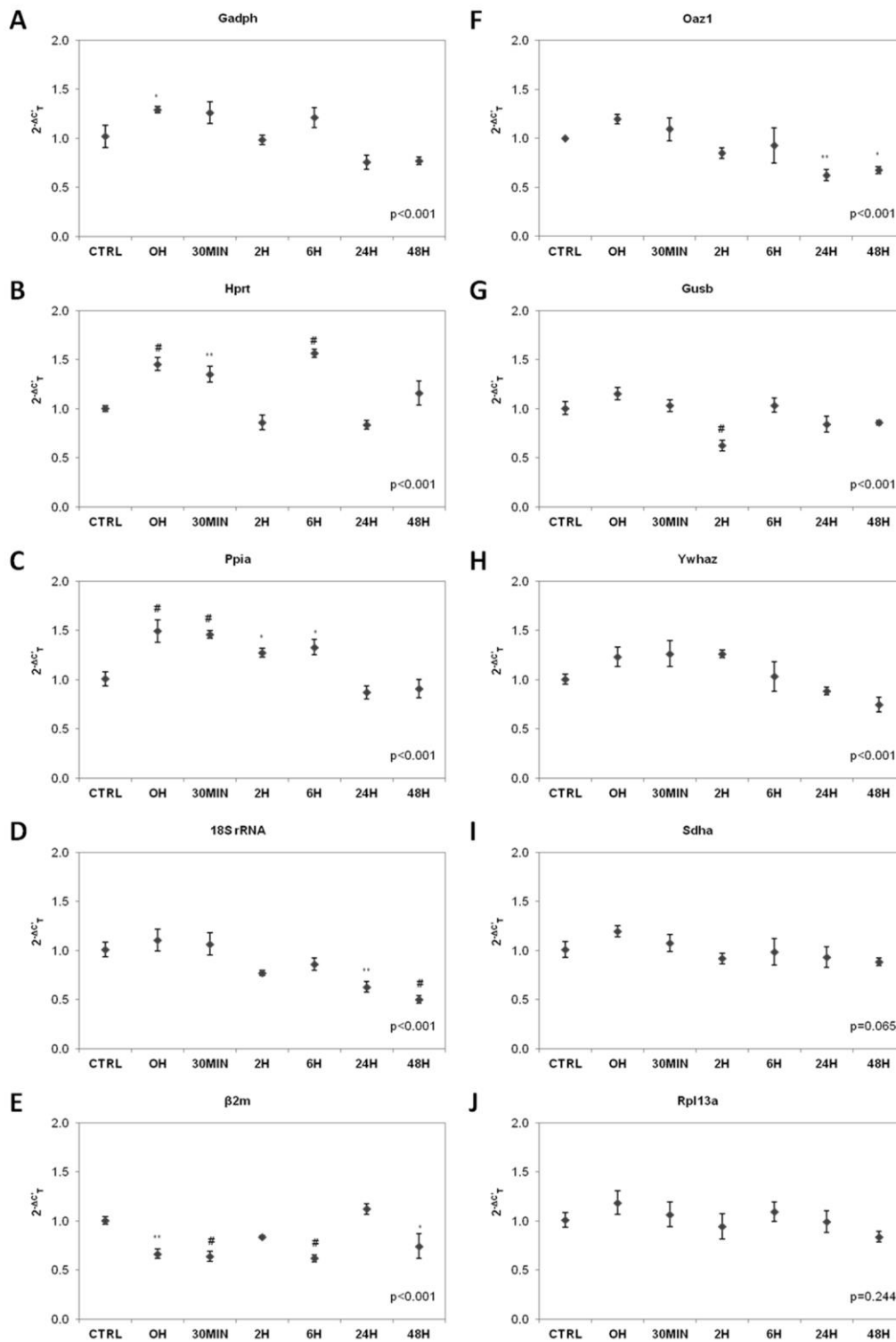


Figura 5A.1. Efecto de la POG en astrocitos sobre la expresión de los controles endógenos (A) *Gapdh*, (B) *Hprt*, (C) *Ppia*, (D) *18SrRNA*, (E) $\beta 2m$, (F) *Oaz1*, (G) *Gusb*, (H) *Ywhaz*, (I) *Sdha* y (J) *Rpl13a*. Análisis de la expresión a los distintos tiempos tras la POG mediante el método $2^{-\Delta C_T}$. Los datos representados son la media \pm EEM; n=3.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # $p < 0.001$ respecto al control (CTRL).

5A.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS CONTROLES ENDÓGENOS ÓPTIMOS PARA EL MODELO DE ISQUEMIA *IN VIVO*

Los resultados de expresión génica de *β2m*, *Rpl13a*, *Oaz1*, *Gapdh*, *Ppia*, *Gusb*, *18SrRNA*, *Sdha*, *Ywhaz* y *Hprt* en las muestras de corteza cerebral de rata recogidas a los 30 minutos, 2, 6, 24, 48 y 72 horas después de la pMCAO (apartado 4.3.1.1) se muestran en la Figura 5A.2.

Se detectaron cambios significativos en la expresión respecto al grupo control de los genes de referencia candidatos *β2m* ($p < 0.001$), *Rpl13a* ($p < 0.01$), *Oaz1* ($p < 0.01$), *Ppia* ($p < 0.001$), *Gusb* ($p < 0.001$), *18SrRNA* ($p < 0.05$) y *Gapdh* ($p < 0.001$) (Figura 5A.2A-G, respectivamente). Concretamente, aumentó significativamente la expresión de *β2m* a las 48 y 72 horas ($p < 0.001$ en ambos casos) (Figura 5A.2A), de *Rpl13a* a las 72 horas ($p < 0.05$; Figura 5A.2B) y de *Gusb* a las 48 ($p < 0.01$) y 72 horas ($p < 0.001$) (Figura 5A.2E), y, disminuyó la expresión de *Ppia* a las 2 y 6 horas ($p < 0.01$ en ambos casos) (Figura 5A.2D), de *18SrRNA* a las 48 ($p < 0.05$) y 72 horas ($p < 0.01$) (Figura 5A.2F) y de *Gapdh* a los 30 minutos ($p < 0.01$), y a las 2 ($p < 0.05$) y 6 horas ($p < 0.01$) (Figura 5A.2G). En cambio, los perfiles de expresión de *Sdha*, *Hprt* e *Ywhaz* no se modificaron respecto al grupo control en ninguno de los tiempos analizados después de la pMCAO ($p = 0.067$, $p = 0.236$ y $p = 0.244$, respectivamente) (Figura 5A.2H-J, respectivamente).

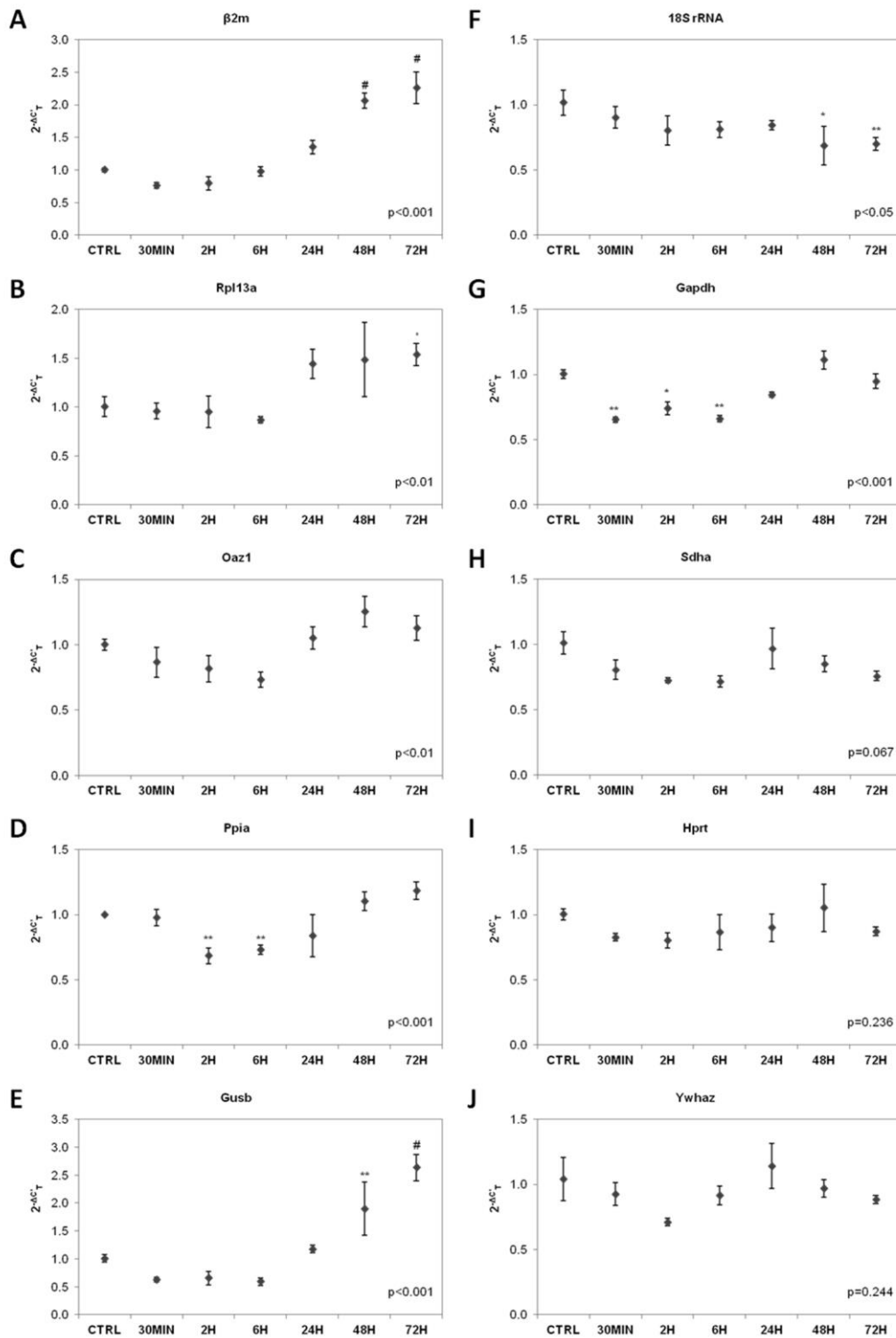


Figura 5A.2. Efecto de la pMCAO sobre la expresión de los controles endógenos (A) $\beta 2m$, (B) *Rpl13a*, (C) *Oaz1*, (D) *Ppia*, (E) *Gusb*, (F) *18SrRNA*, (G) *Gapdh*, (H) *Sdha*, (I) *Hprt* e (J) *Ywhaz*. Análisis de la expresión a los distintos tiempos tras la isquemia mediante el método $2^{-\Delta C_T}$. Los datos representados son la media \pm EEM; n=6.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # $p < 0.001$ respecto al control (CTRL).

La estabilidad de estos tres genes (*Sdha*, *Hprt* e *Ywhaz*) se evaluó mediante los algoritmos geNorm y NormFinder (apartado 4.1.8). El algoritmo geNorm identificó según el valor de estabilidad M *Ywhaz* y *Sdha* como la combinación más estable de controles endógenos para los modelos de isquemia *in vivo* (Figura 5A.3A). En la Figura 5A.3B se muestra el valor de variación por parejas (V; pairwise variation value) entre 2 factores de normalización sobre un número creciente de genes. Como sólo se han analizado tres genes, la figura muestra el valor de variación por parejas (V) de $V2/3$ (0.000). Dado que el valor V es inferior al punto de corte establecido de 0.15 [170] dos genes son suficientes para la normalización, en nuestro caso *Ywhaz* y *Sdha*. NormFinder identificó *Ywhaz* como el gen más estable con un valor de estabilidad de 0.023 y, al igual que geNorm, la mejor combinación de dos genes para la normalización fueron *Ywhaz* y *Sdha* con un valor de estabilidad de 0.022 (Tabla 5A.1).

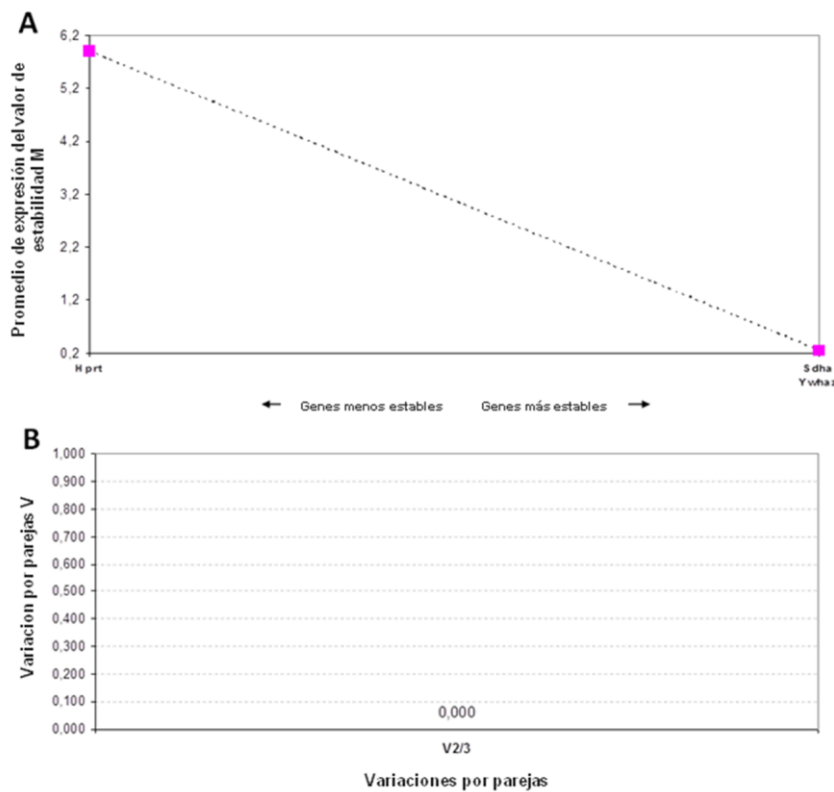


Figure 5A.3. Estabilidad de la expresión génica y determinación del número óptimo de los controles endógenos validados para el modelo de isquemia *in vivo* mediante el análisis con geNorm. (A) Gráfico de estabilidad de expresión que muestra los valores promedio de estabilidad M. (B) Análisis de variación por parejas para determinar el número óptimo de genes de referencia para utilizar en la normalización de los resultados de qPCR. El uso de los 2 genes más estables es suficiente para una normalización adecuada (punto de corte 0.15 según [170]).

Tabla 5A.1. Valores de estabilidad de los controles endógenos validados obtenidos con NormFinder.

Clasificación	Gen	Valor de estabilidad
1	<i>Ywhaz</i>	0.023
2	<i>Sdha</i>	0.034
3	<i>Hprt</i>	0.066
Mejor combinación de dos genes <i>Sdha</i> e <i>Ywhaz</i>		0.022

En negrita se indica el gen con mayor estabilidad y la mejor combinación de genes para la normalización de los resultados de expresión.

Posteriormente se alargó el patrón temporal de análisis de la expresión hasta 7 y 14 días después de la pMCAO (apartado 4.3.1.1) y se confirmó que *Sdha* e *Ywhaz* mantenían una expresión estable ($p=0.625$ y $p=0.493$, respectivamente) y, por tanto, seguían siendo controles endógenos válidos (Figura 5A.4A-B, respectivamente). En la tabla 5A.2 se resumen las metodologías utilizadas y los resultados obtenidos en los trabajos previamente publicados de validación de controles endógenos en el modelo de isquemia cerebral experimental *in vivo* de pMCAO y en nuestro trabajo.

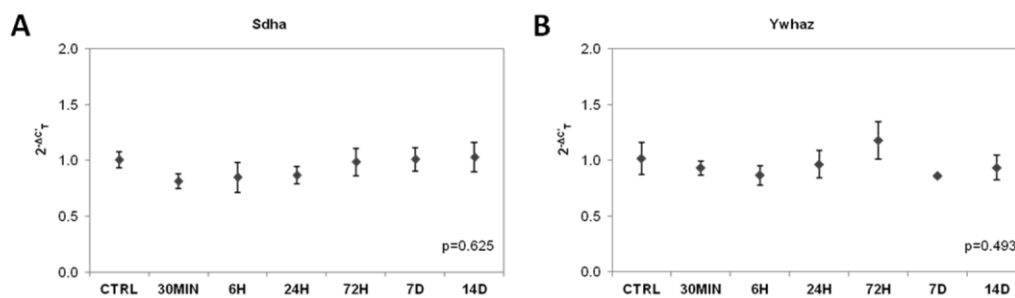


Figura 5A.4. Efecto de la pMCAO sobre la expresión de los controles endógenos (A) *Sdha* e (B) *Ywhaz*. Análisis de la expresión mediante el método $2^{-\Delta C_T}$. Los datos representados son la media \pm EEM; $n=6$.

Tabla 5A.2. Validación de controles endógenos en el modelo pMCAO en distintos trabajos publicados.

	Harrison DC [133]	Medhurst AD [134]	Meldgaard M [128]	Tian YF [135]	Gubern C
Modelo isquemia focal	pMCAO filamento intraluminal	pMCAO filamento intraluminal	pMCAO electrocoagulación	pMCAO filamento intraluminal	pMCAO electrocoagulación
Animal	Ratas macho Sprague-Dawley	Ratas macho Sprague-Dawley	Ratones macho SJL	Ratas macho Sprague-Dawley	Ratas macho Fisher
Muestra recogida	Toda la corteza infartada	Toda la corteza infartada	Todo el hemisferio infartado	Penumbra isquémica cortical	Área cortical infartada y peri-infartada
Curso temporal	Naive, 3, 6, 12 y 24h (pMCAO y sham)	Hemisferio contralateral, 6 y 24h	Sham, 30min, 1, 2, 4, 6, 12, 24 y 48h, 5 y 10d	Sham, 2h, 24h, 3, 7 y 21d	Sham, 30min, 2, 6, 24, 48 y 72h, 7 y 14d
qPCR	Custom TaqMan assays	Custom TaqMan assays	Custom TaqMan assays	SyberGreen	Inventoried TaqMan assays
Método de análisis	Curva estándar	Curva estándar	%mRNA= $100 \times (1+E)^{-\Delta C_T}$	$2^{-\Delta C_T}$	$2^{-\Delta C_T}$
Análisis estadístico	ANOVA	Student's unpaired t-test	Kruskal-Wallis + Dunn's	ANOVA + Tukey	ANOVA + Dunnett's
Genes control validados	<i>Ppia</i> y <i>Gapdh</i>	<i>Ppia</i> y <i>Gapdh</i>	<i>Hprt</i> y <i>Gapdh</i>	<i>Rpl13a</i> y <i>Ppia</i>	<i>Hprt</i> , <i>Sdha</i> e <i>Ywhaz</i>
Genes control no validados	<i>β-actin</i>			<i>Gapdh</i> , <i>β-actin</i>	<i>Oaz1</i> , <i>Gapdh</i> , <i>Ppia</i> , <i>Rpl13a</i> , <i>β2m</i> , <i>Gusb</i> , <i>18SrRNA</i>

Finalmente, se valoró el efecto del control endógeno utilizado sobre la expresión de dos genes implicados en isquemia cerebral, ciclooxigenasa-2 (*Cox-2*) y *Bcl2*. Cada gen se normalizó con los endógenos validados para el modelo *in vivo* (*Sdha* e *Ywhaz*), un endógeno que varía su expresión a tiempos tardíos post-pMCAO (*Gusb* y *β2m*, respectivamente) y *Gapdh*, que varía su expresión a tiempos tempranos post-pMCAO (Figura 5A.5). *Bcl2* no varió su expresión tras isquemia al normalizarlo con los endógenos validados (p=0.402) (Figura 5A.5A), disminuyó significativamente la expresión desde las 24 hasta las 72 horas post-pMCAO (p<0.001 en todos los tiempos) al utilizar *β2m* como gen de referencia (Figura 5A.5B) y disminuyó su expresión a las 24 y 48 horas (p<0.05 en ambos casos) al normalizar con *Gapdh* (Figura 5A.5C). Por su parte, *Cox-2* mostró un aumento significativo en su expresión a las 2 y 6 horas post-pMCAO (p<0.001 en ambos casos) con todos los controles utilizados (Figura 5A.5D-F), y este aumento fue también significativo a las 24 horas (p<0.001) con el gen de referencia *Gapdh* (Figura 5A.5F).

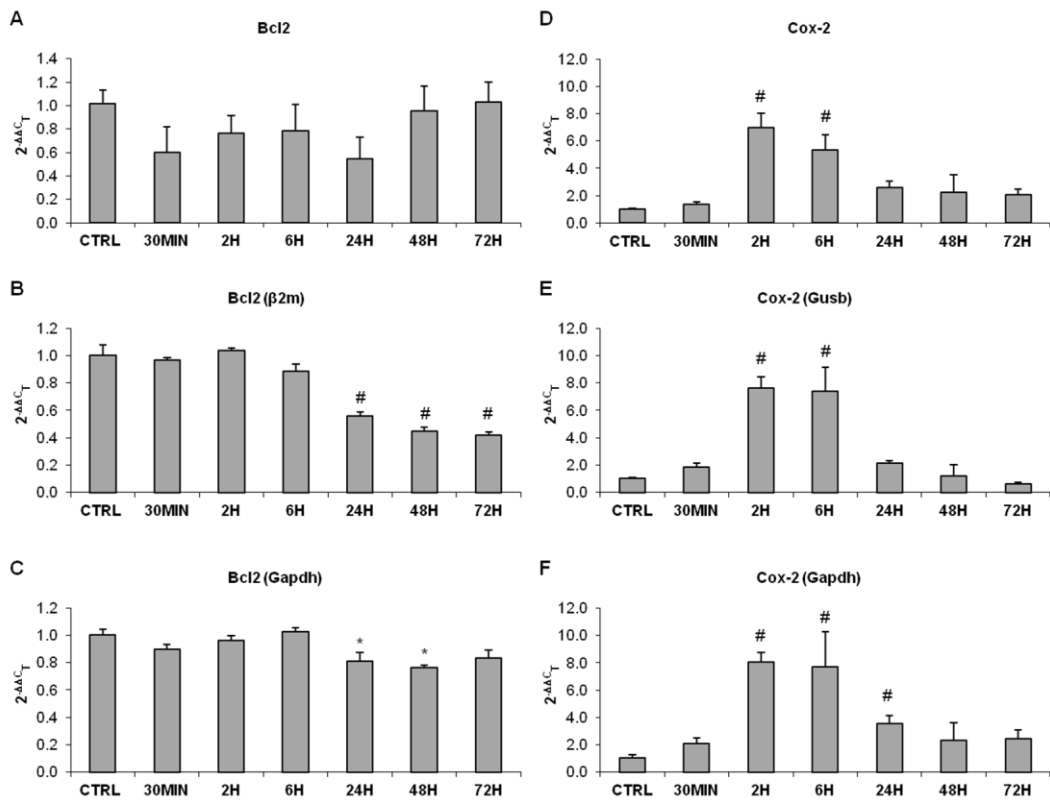


Figura 5A.5. Efecto del control endógeno utilizado sobre la expresión de los genes *Bcl2* y *Cox-2* después de la pMCAO. *Bcl2* normalizado con (A) *Sdha* e *Ywhaz*, (B) $\beta 2m$ y (C) *Gapdh*. *Cox-2* normalizado con (D) *Sdha* e *Ywhaz*, (E) *Gusb* y (F) *Gapdh*. Análisis de la expresión mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Los datos representados son la media \pm EEM; n=5/6.

*p<0.05, #p<0.001 respecto al control (CTRL).

5B. Objetivo 2. CARACTERIZACIÓN DE *GCF2/LRRFIP1* EN CEREBRO Y EN ISQUEMIA EXPERIMENTAL

5B.1 CARACTERIZACIÓN DE *LRRFIP1* EN CEREBRO DE RATA

5B.1.1 Predicción *in silico* de nuevas variantes transcripcionales de *Lrrfip1* de rata

Se obtuvieron dieciséis transcritos candidatos según las predicciones de Ensembl y las anotaciones recogidas en NCBI (apartado 4.1.2) (Tabla 5B.1). Los resultados obtenidos en el análisis de homología de los transcritos respecto a la secuencia de referencia en NCBI (NM_001014269) (apartado 4.1.6) mostraron que la homología de los transcritos ENSRNOT00000050191 y CRA_j era del 100% y que ambos tenían la misma longitud que la secuencia de referencia, 2217 pb. Un 100% de homología también se obtuvo para los transcritos ENSRNOT00000056683 y CRA_k pero ambos eran más cortos que NM_001014269 (2157 y 2094 pb, respectivamente). En concreto, el transcrito CRA_k no contenía el exón 1 de NM_001014269 y el transcrito ENSRNOT00000056683 tenía dos deleciones en el exón 8, una de 48 pb y otra de 12 pb. El resto de nuevas variantes mostraron un grado de homología con la secuencia de referencia de entre un 75% (CRA_h) y un 46% (CRA_a). Por lo tanto, tras descartar los transcritos ENSRNOT00000050191 y CRA_j, catorce transcritos se tuvieron en cuenta en el análisis (Figura 5B.1).

Tabla 5B.1. Tránscrios putativos de *Lrrfip1* recogidos en NCBI y Ensembl.

Identificador						
		Tránsito	Proteína	pb cDNA	aa	Puntuación cDNA
NCBI	Lrrfip1	NM_001014269	NP_001014291	2217	738	
	CRA_j	rCT55363	EDL92049	2217	738	100
	CRA_k	rCT55364	EDL92050	2094	697	100
	CRA_i	rCT55362	EDL92048	1215	404	74
	CRA_h	rCT55361	EDL92047	1245	414	75
	CRA_g	rCT55360	EDL92046	1287	428	70
	CRA_f	rCT55359	EDL92045	1701	566	55
	CRA_e	rCT55358	EDL92044	1677	558	54
	CRA_d	rCT55357	EDL92043	1731	456	68
	CRA_a	rCT55354	EDL92040	1956	651	46
	CRA_b	rCT55355	EDL92041	1887	628	50
	CRA_c	rCT55356	EDL92042	1869	622	50
	Ensembl		ENSRNOT00000050191	ENSRNOP00000045021	2217	738
		ENSRNOT00000056683	ENSRNOP00000053522	2157	718	100
		ENSRNOT00000026961	ENSRNOP00000026961	1887	628	50
		ENSRNOT00000026939	ENSRNOP00000026939	1998	665	47

Puntuación cDNA= porcentaje de homología de la secuencia de cDNA de todos los tránscrios putativos respecto a la secuencia de referencia NM_001014269. aa, número de amino ácidos; pb, pares de bases.

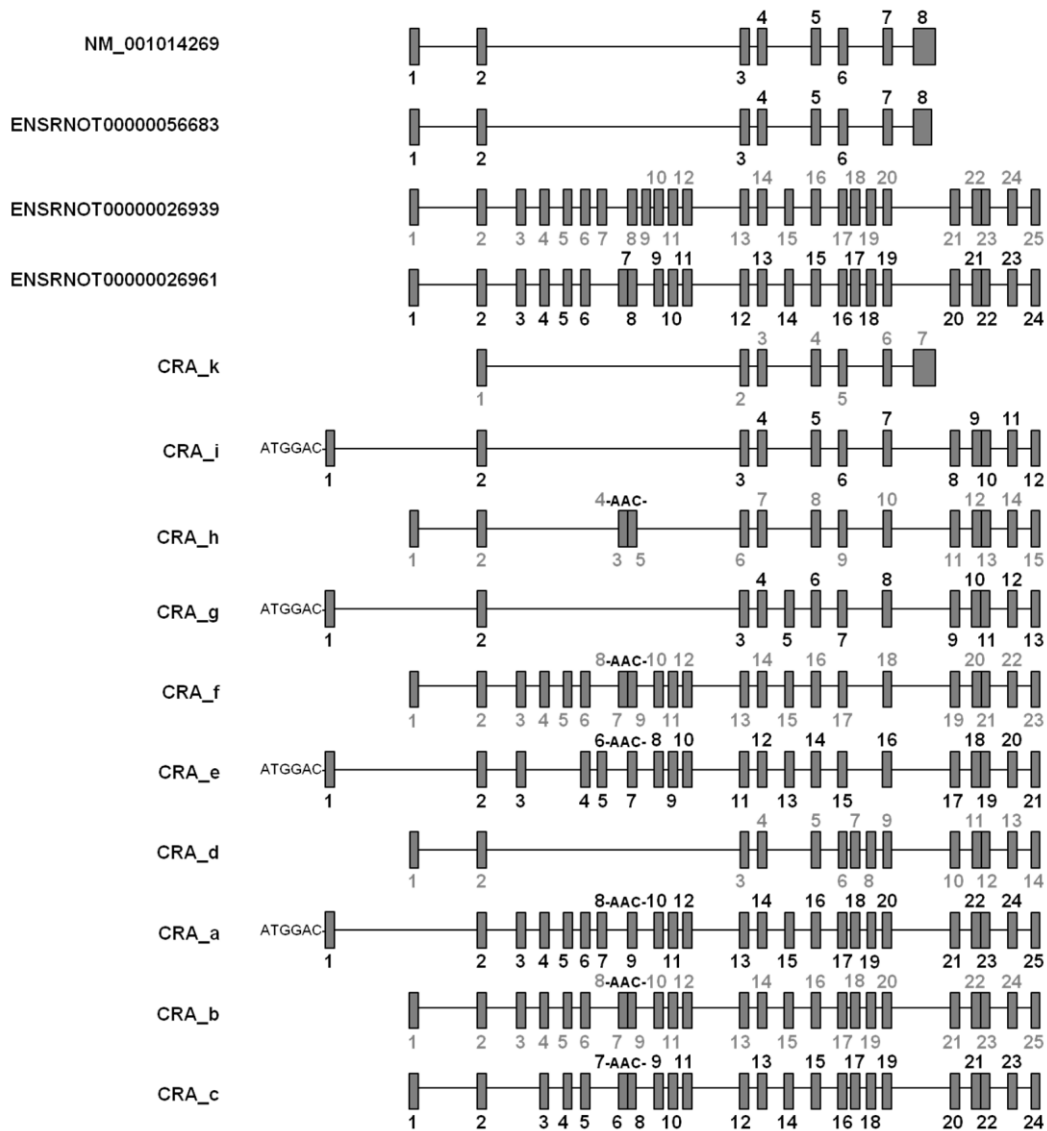


Figura 5B.1. Gen *Lrrfip1* y transcritos putativos. Representación esquemática de la organización génica de *Lrrfip1* (NM_001014269) y de los transcritos candidatos obtenidos de las predicciones de Ensembl (GeneID: ENSRNOG00000019892) y la base de datos NCBI (GeneID 367314). Los transcritos de Ensembl y las predicciones de NCBI se han nombrado usando la nomenclatura ENSRNOT y CRA, respectivamente (apartado 4.1.2). Los exones se representan como barras verticales numeradas. La numeración está en gris y negro para facilitar la identificación visual de los exones de cada transcrito en la figura. -AAC- corresponde a un triplete de nucleótidos no recogido en ninguna de las secuencias de Ensembl ni de NCBI.

5B.1.2 Expresión de transcritos de *Lrrfip1* en corteza cerebral de rata

Se realizaron catorce amplificaciones mediante PCR distintas (apartado 4.5.2.2) para identificar las variantes de *Lrrfip1* expresadas en corteza cerebral de rata. Tras su secuenciación, los resultados esperados y obtenidos para cada una de ellas (PCR A a PCR N) se muestran en la Tabla 5B.2.

En la figura 5B.2A se muestran los resultados de las catorce reacciones de PCR (PCR-A a PCR-N). Así pues, la expresión de los transcritos NM_001014269, CRA_i y CRA_g se detectó en corteza cerebral de rata control y en condiciones de isquemia (PCR-A a PCR-N). El transcrito NM_001014269 fue detectado con las PCRs A y B, respectivamente. Amplicones correspondientes a los transcritos CRA_i y CRA_g se detectaron con las PCRs K y L y las PCRs H, K y L, respectivamente. Los transcritos CRA_a y CRA_h fueron detectados con algunas modificaciones en la secuencia de nucleótidos y se renombraron como CRA_a' y CRA_h'. El transcrito CRA_a' no contenía el exón 15 del transcrito CRA_a y se detectó en las PCRs I (879 pb), J (914 pb) y L (1462 pb)) y otros fragmentos correspondientes a este transcrito fueron detectados con las PCRs G y N. Por su parte, el transcrito CRA_h' amplificado mediante las PCRs D (725 pb) y E (1018 pb) carecía de los exones 3 a 5 presentes en el transcrito CRA_h. También fueron detectados y secuenciados seis productos de amplificación inesperados correspondientes a: (1) una secuencia de 314 pb (Figura 5B.2A-C), (2) un amplicón de 124 pb (Figura 5B.2A-F), (3) una secuencia de 475 pb (Figura 5B.2A-K), (4) una secuencia de 245 pb (Figura 5B.2A-K), (5) un fragmento de 305 pb (Figura 5B.2A-M), y, (6) una secuencia de 114 pb compuesta por los exones 10 y 11 del transcrito CRA_a separados entre sí por una secuencia de 45 pb no coincidente con ninguna secuencia disponible (Figura 5B.2A-N). Las secuencias obtenidas de cada uno de los 6 amplicones se recogen en el Anexo II. En la Figura 5B.2B se representan gráficamente los transcritos y amplicones detectados con las distintas PCRs realizadas.

Estos resultados muestran que al menos cinco transcritos distintos de *Lrrfip1* se expresan en corteza cerebral de rata: *Lrrfip1* (NM_001014269), CRA_i, CRA_g, CRA_h' y CRA_a'.

Tabla 5B.2. Identificación de transcritos de *Lrrfip1* expresados en corteza cerebral de rata. Productos de amplificación esperados y detectados mediante PCR (Tabla 4.1).

PCR	Tránsito	Amplicones esperados	Amplicones detectados
		pb	pb
A	NM_001014269	533	533 (NM_001014269)
	CRA_k	533	
	ENSRNOT00000056683	485	
B	NM_001014269	1214	1214 (NM_001014269)
C	ENSRNOT00000026939	563	314 (desconocido)
	ENSRNOT00000026961	452	344-396 (desconocido)
	CRA_f	452	
	CRA_b	452	
	CRA_c	434	
D	ENSRNOT00000026961	1427	725 (CRA_h')
	ENSRNOT00000026939	1538	
	CRA_b	1427	
	CRA_c	1409	
	CRA_f	1241	
	CRA_d	911	
	CRA_h	785	
E	ENSRNOT00000026939	1892	1018 (CRA_h')
	ENSRNOT00000026961	1781	
	CRA_b	1781	
	CRA_c	1763	
	CRA_f	1595	
	CRA_d	1265	
	CRA_h	1139	
F	ENSRNOT00000026939	268	124 (desconocido)
	ENSRNOT00000026961	202	
	CRA_f	202	
	CRA_e	202	Bandas débiles entre 300-200 pb, alrededor de 200 pb y por debajo de 100pb
	CRA_a	202	
	CRA_b	202	
	CRA_c	202	
G	CRA_a	162	162 (CRA_a')
H	CRA_g	235	235 (CRA_g)

Tabla 5B.2. Continuación

PCR	Tránsito	Amplicones esperados	Amplicones detectados
		pb	pb
I	CRA_a	951	879 (CRA_a')
	CRA_b	951	
	CRA_c	951	
	ENSRNOT00000026961	951	
	ENSRNOT00000026939	951	
	CRA_e	765	
	CRA_f	765	
J	ENSRNOT00000026939	1052	914 (CRA_a')
	CRA_a	986	
	CRA_b	986	
	CRA_c	986	
	ENSRNOT00000026961	986	
	CRA_e	800	
	CRA_f	800	
	CRA_h	506	
K	CRA_a	652	>500 (desconocido)
	CRA_e	559	475 (desconocido)
	CRA_i	169	245 (desconocido)
	CRA_g	169	169 (CRA_g y CRA_i)
L	CRA_a	1534	1462 (CRA_a')
	CRA_e	1255	865 (CRA_g)
	CRA_g	865	793 (CRA_i)
	CRA_i	793	Bandas débiles alrededor de 1018pb
M	ENSRNOT00000026939	860	305 (desconocido)
	ENSRNOT00000026961	749	
	CRA_f	749	
	CRA_b	749	
	CRA_c	731	
N	ENSRNOT00000026961	69	114 (desconocido)
	ENSRNOT00000026939	69	69 (CRA_a')
	CRA_f	69	
	CRA_e	69	
	CRA_b	69	
	CRA_c	69	
	CRA_a	69	

pb, pares de bases.

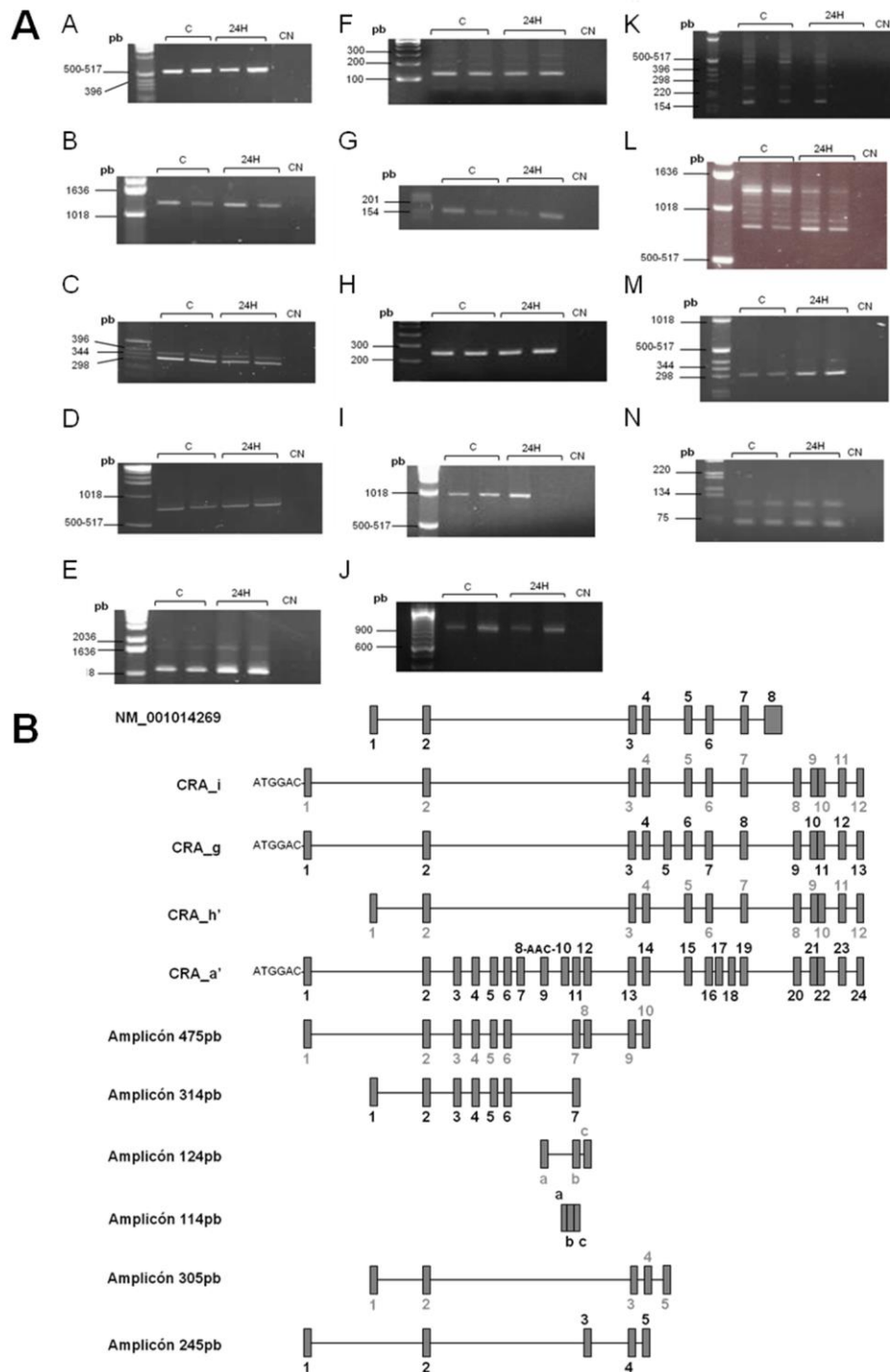


Figura 5B.2. Expresión de los transcritos de *Lrrfip1* en corteza cerebral control (C) y 24 horas después de la pMCAO (24H) detectadas mediante PCR convencional. CN: control negativo de la PCR. Pb: pares de bases. Respecto a la Tabla 5B.2: (A) A-PCR A; B-PCR B; C-PCR C; D-PCR D; E-PCR E; F-PCR F; G-PCR G; H-PCR H; I-PCR I; J-PCR J; K-PCR K; L-PCR L; M-PCR M; y N-PCR N. (B) Representación esquemática de los transcritos y amplicones detectados. Los exones se representan como barras verticales.

5B.1.3 Caracterización de las isoformas de *Lrrfip1* expresadas en corteza cerebral de rata

Los nuevos transcritos de *Lrrfip1* identificados en corteza cerebral (CRA_a', CRA_g, CRA_i y CRA_h') codifican proteínas de 627, 428, 404 y 394 aminoácidos con pesos moleculares de 71.2, 48.9, 46.1 y 44.9kDa, respectivamente, ambos calculados teóricamente como se describe en el apartado 4.1.5. Las secuencias de cada uno de los transcritos identificados y de sus isoformas correspondientes se recogen en el Anexo III.

En la Tabla 5B.3, se resume la información a nivel de cDNA y de proteína de las nuevas variantes y su homología respecto a la proteína *Lrrfip1* de referencia (NP_001014291), que consta de 738 aminoácidos (83kDa). Tal como se recoge en esta tabla, el transcrito con mayor homología con *Lrrfip1* fue CRA_h', con una homología del 65%. En cambio, las nuevas variantes entre sí compartían un elevado grado de homología (94-100%) (Tabla 5B.4).

En la tabla 5B.5 se recoge el grado de homología de las isoformas identificadas en rata respecto a las isoformas humanas y de ratón recogidas en NCBI, así como los resultados del análisis de presencia o ausencia en las isoformas identificadas en rata de los dominios y de las características previamente descritas en las isoformas humanas y de ratón de *Lrrfip1*. El análisis de homología de las isoformas de rata respecto a las isoformas humanas y de ratón mostró que *Lrrfip1* conservaba un 84% de homología con la isoforma 1 de ratón; CRA_h', CRA_i, CRA_g y CRA_a' compartían un elevado grado de homología con la isoforma 2 de ratón, nombrada Flap-1, la isoforma 3 de ratón y las isoformas 1 y 2 humanas (87-90%); y, ninguna de las isoformas era similar a las isoformas 3, 4 y 5 humanas. Respecto a los dominios proteicos, sólo la proteína de referencia *Lrrfip1* (NP_001014291) contenía la señal de localización nuclear (NLS) (100%) y el dominio de unión a RNA (80%). Ninguna de las isoformas contenía ni el dominio de unión a DNA ni el de unión a RNA de doble cadena. En cambio, todas las isoformas contenían las secuencias de interacción con Fli-I (LRR-binding region) (97%) y Dvl (96%) mientras que sólo la isoforma CRA_a' contenía la región rica en serina de interacción con Myd88 (90%). En la figura 5B.3 se representan los distintos dominios y características que se han descrito en algunas isoformas humanas y de ratón de *Lrrfip1*, en concreto las isoformas 3, 4 y 5 humanas y la 2 de ratón, y los detectados en las isoformas identificadas de rata. Las secuencias de cada dominio y característica se recogen en el Anexo IV.

Teniendo en cuenta los resultados recogidos en este apartado, la estructura exónica de cada uno los transcritos y el número de aminoácidos de cada una de las isoformas (Ensembl), consideramos que la proteína de referencia *Lrrfip1* (NP_001014291) podría ser el ortólogo de la isoforma 1 de ratón, por lo que la denominamos de ahora en adelante *rLrrfip1*; *CRA_a'*, el ortólogo de la isoforma Flap-1 de ratón, ya que también contiene la región rica en serinas (serine-rich region) descrita para esta proteína, denominada *rFlap-1*; *CRA_g*, el ortólogo de la isoforma 3 de ratón; y *CRA_h'*, el ortólogo de la isoforma 2 humana.

Tabla 5B.3. Información del cDNA y proteína de los transcritos de *Lrrfip1* identificados. Homología de la secuencia de aminoácidos de las nuevas isoformas de rata respecto a la proteína de referencia NP_001014291 (*Lrrfip1*).

	cDNA		Proteína		
	Nº de exones	pb	Nº de aa	PM (kDa)	Puntuación
Lrrfip1	8	2217	738	83	
CRA_i	12	1215	404	46.1	59
CRA_h'	12	1185	394	44.9	65
CRA_g	13	1287	428	48.9	56
CRA_a'	24	1830	627	71.2	38

Nº=número; pb=pares de bases; aa=aminoácidos; PM=peso molecular; Puntuación=porcentaje de homología respecto a *Lrrfip1* (NP_001014291). Las secuencias de cada transcrito identificado y de su isoforma correspondiente se encuentra en el Anexo III.

Tabla 5B.4. Homología de la secuencia de aminoácidos entre las nuevas isoformas de rata detectadas.

Isoformas		Puntuación
CRA_h'	CRA_i	95
CRA_h'	CRA_g	95
CRA_h'	CRA_a'	95
CRA_i	CRA_g	100
CRA_i	CRA_a'	100
CRA_g	CRA_a'	94

Puntuación=porcentaje de homología entre las distintas isoformas. Las secuencias de cada transcrito identificado y de su isoforma correspondiente se encuentra en el Anexo III.

Tabla 5B.5. Conservación de los dominios y características descritas en las isoformas Lrrfip1 humanas y de ratón en las isoformas identificadas en cerebro de rata. Homología de las isoformas de rata respecto a las isoformas Lrrfip1 humanas y de ratón descritas en NCBI. Los valores de homología $\geq 80\%$ están marcados en negrita. Las isoformas humanas y de ratón no descritas en la literatura están marcadas en gris. Las isoformas de ratón y humanas que podrían corresponder a alguna de las isoformas de rata de acuerdo al grado de homología, número de aminoácidos y estructura exónica están subrayadas.

					Secuencia de interacción con			Isoformas de ratón			Isoformas humanas				
	NLS	Dominio de unión a DNA	Dominio de unión a RNA	Dominio de unión a RNA de doble cadena	Myd88	FLII	Dvl								
				Región rica en serina (Flap-1)	Región de unión a LRR (Dominio coiled-coil)	42-208aa isoforma 5 humana	1	2 (Flap-1)	3	1	2	3 (LRRFIP1)	4 (TRIP)	5 (GCF2)	
Lrrfip1	100%	46%	80%	70%	10%	97%	96%	<u>84%</u>	40%	55%	35%	61%	54%	54%	54%
CRA_h'	28%	13%	25%	63%	10%	97%	96%	69%	97%	92%	88%	<u>91%</u>	59%	59%	59%
CRA_i	28%	13%	25%	63%	10%	97%	96%	62%	90%	97%	93%	87%	54%	54%	54%
CRA_g	28%	20%	25%	70%	10%	97%	96%	59%	91%	<u>97%</u>	93%	87%	57%	51%	51%
CRA_a'	28%	15%	15%	72%	90%	97%	96%	38%	<u>90%</u>	92%	<u>88%</u>	87%	39%	39%	35%

Lrrfip1=NP_001014291; NLS=señal de localización nuclear (*Nuclear Localization Signal*); Myd88= myeloid differentiation factor88; FLII= Flightless-I; LRR= leucine-rich repeat; Dvl=dishevelled. Isoforma 1 de ratón= NP_001104781; Isoforma 2 de ratón= NP_032541; Isoforma 3 de ratón= NP_001104782; Isoforma 1 humana= NP_001131022; Isoforma 2 humana= NP_001131023; Isoforma 3 humana= NP_001131024; Isoforma 4 humana= NP_004726; Isoforma 5 humana= NP_001131025. Las secuencias de cada dominio y característica se encuentran en el Anexo IV.

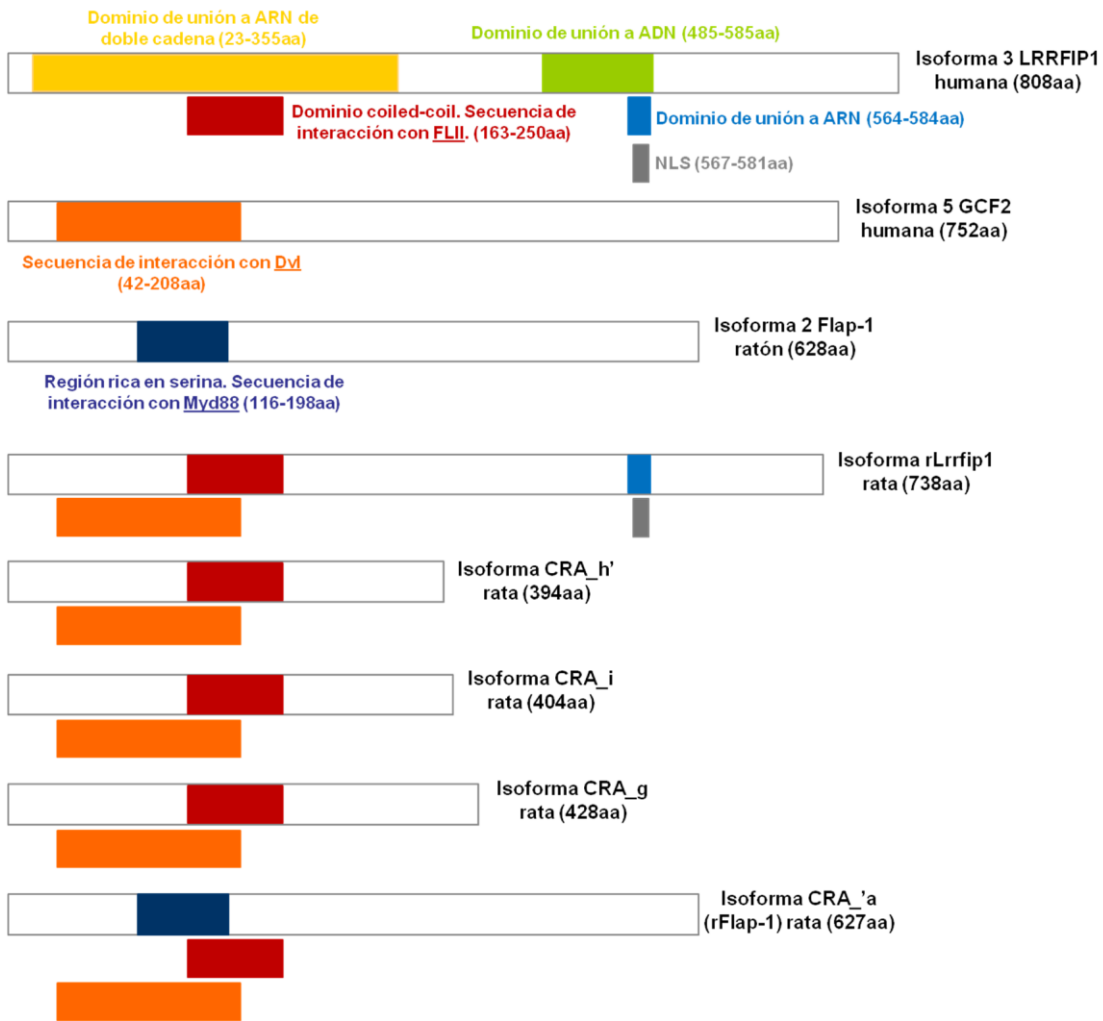


Figura 5B.3. Representación esquemática de los distintos dominios descritos en las isoformas 3, 4 y 5 humanas y 2 de ratón de *Lrrfip1* y su presencia o ausencia en las isoformas identificadas de rata (*Lrrfip1*, *CRA_g*, *CRA_h'*, *CRA_i*, *CRA_a'*). Los dominios representados en la isoforma 3 humana también están presentes en las isoformas 4 y 5, excepto el dominio de unión a RNA de doble cadena que es específico de esta isoforma. NLS=señal de localización nuclear (*Nuclear Localization Signal*); *Myd88*= *myeloid differentiation factor88*; *FLII*= *Flightless-I*; *LRR*= *leucine-rich repeat*; *Dvl*=*dishevelled*. Isoforma 3 humana= NP_001131024; Isoforma 4 humana= NP_004726; Isoforma 5 humana= NP_001131025. Isoforma 2 de ratón= NP_032541. Las secuencias de cada dominio y característica se encuentran en el Anexo IV.

5B.1.4 Expresión y distribución espacial de los transcritos ortólogos a *rLrrfip1*, *rFlap-1* y *CRA_g* en el cerebro de ratón

Los resultados obtenidos tras interrogar *Mouse Allen Brain Atlas* para *Lrrfip1* fueron los siguientes. El atlas proporciona un mapa de expresión génica en cerebro de ratón del ortólogo del transcrito *rLrrfip1* individualmente y de los ortólogos de *rFlap-1* y *CRA_g* (*rFlap-*

1-CRA_g) analizados conjuntamente. Los resultados mostraron que los transcritos rLrrfip1 y rFlap-1-CRA_g tienen niveles de expresión bajos en cerebro y diferente distribución espacial: rLrrfip1 se expresa principalmente en la corteza cerebral y rFlap-1-CRA_g en el mesencéfalo (Figura 5B.4)

Específicamente, en el cerebro rFlap-1-CRA_g se expresa en corteza cerebral y en los ganglios basales, concretamente en estriado, mientras que rLrrfip1 sólo está presente en la corteza cerebral. Los tres transcritos están principalmente expresados en la placa cortical de la corteza cerebral: rFlap-1-CRA_g tiene una expresión baja en todas las áreas del isocórtex mientras que rLrrfip1 sólo se detecta con niveles bajos de expresión en las áreas somatomotora, somatosensorial, gustativa, insular agranular y retrosplenial. rLrrfip1 y rFlap-1-CRA_g están presentes en el área piriforme de las áreas olfativas y en las regiones retrohipocampal e hipocampal, respectivamente, de la formación hipocampal. En el tronco del encéfalo, rLrrfip1 se expresa en un nivel bajo principalmente en el romboencéfalo, específicamente en la médula, no se expresa en el diencefalo y tiene una baja expresión en el mesencéfalo. En cambio, rFlap-1-CRA_g se expresa principalmente con niveles altos en el mesencéfalo y tiene una expresión baja tanto en el diencefalo, principalmente en el tálamo, y en el romboencéfalo, principalmente en la médula. Finalmente, rLrrfip1 es prácticamente indetectable en el cerebelo mientras que rFlap-1-CRA_g tiene niveles medios de expresión en la corteza cerebelosa y bajos en los núcleos cerebelares.

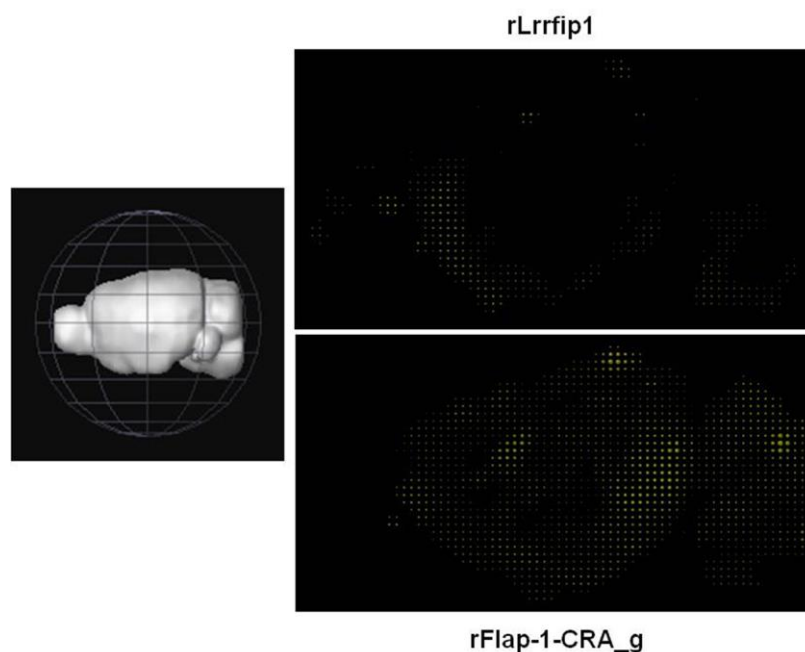


Figura 5B.4. Mapas de expresión génica (hibridación in situ (ISH)) en cerebro de ratón, plano sagital, de los transcritos ortólogos identificados en cerebro de rata rLrrfip1 y rFlap-1-CRA_g. Mapas obtenidos del *Mouse Allen Brain Atlas* y visualizados con el *software Brain Explorer 2*.

5B.2 EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE *LRRFIP1* TRAS LA ISQUEMIA CEREBRAL

5B.2.1 Perfiles de expresión de los transcritos rLrrfip1, CRA_g y rFlap-1, y de la isoforma rLrrfip1 tras isquemia focal

El diseño de ensayos de expresión específicos sólo fue posible para tres (rLrrfip1, CRA_g y rFlap-1) de los cinco transcritos identificados. El ensayo para el transcrito CRA_g cuantificaba conjuntamente este transcrito y el transcrito correspondiente al amplicón de 305 pb detectado en la PCR M (Figura 5B.2A-M). Debido a la elevada homología en la arquitectura exónica de los transcritos CRA_i y CRA_h' respecto al resto de transcritos no fue posible diseñar ensayos específicos para analizarlos individualmente. Respecto al análisis de la proteína, el anticuerpo utilizado reconocía específicamente la proteína de referencia publicada en NCBI (NP_001014291), rLrrfip1. Los perfiles de expresión de cada uno de los transcritos (rLrrfip1, CRA_g, y rFlap-1) y de la proteína rLrrfip1 se muestran en la Figura 5B.5.

Los valores promedio C_T obtenidos en el grupo control de los transcritos rLrrfip1 y CRA_g fueron 27.03 ± 0.2 y 29.89 ± 0.3 , respectivamente.

La expresión del transcrito rLrrfip1 aumentó significativamente desde las 2 horas después de la pMCAO ($p < 0.001$) hasta un pico de expresión a las 24 horas ($p < 0.01$), el cual fue tres veces mayor que los valores control. Este pico de expresión se mantuvo hasta los 7 días después de la pMCAO ($p < 0.001$ a 72 horas y $p < 0.05$ a 7 días) y a los 14 días la expresión disminuyó pero aún se mantuvo por encima del control ($p < 0.01$) (Figura 5B.5A). El análisis conjunto del transcritos CRA_g y del amplicón de 305 pb identificado mostró un aumento significativo desde los 30 minutos hasta los 7 días, siendo el máximo nivel de expresión detectado a las 6 horas (2.4 veces superior al control; $p < 0.05$ a 30 minutos, 6 horas, 72 horas y 7 días; $p < 0.001$ a 24 horas; Figura 5B.5C). El patrón de expresión del transcrito rFlap-1 mostró un aumento significativo a las 6 y 24 horas (2.6 y 2.4 veces superior al control, respectivamente, $p < 0.001$; Figura 5B.5D).

A nivel proteico, se detectó la expresión de rLrrfip1 en condiciones control e isquémicas y una sobreexpresión de rLrrfip1 en todos los tiempos post-MCAO analizados (Figura 5B.5B). rLrrfip1 aumentó gradualmente desde los 30 minutos hasta las 24 horas, tiempo en el que alcanzó el máximo nivel de expresión, 4 veces superior al control ($p < 0.001$ a 6h; $p < 0.01$ a 24h). Después, desde las 72 horas hasta los 14 días, rLrrfip1 disminuyó gradualmente sin llegar a alcanzar los niveles control ($p < 0.01$ a 72h; $p < 0.05$ a 7d).

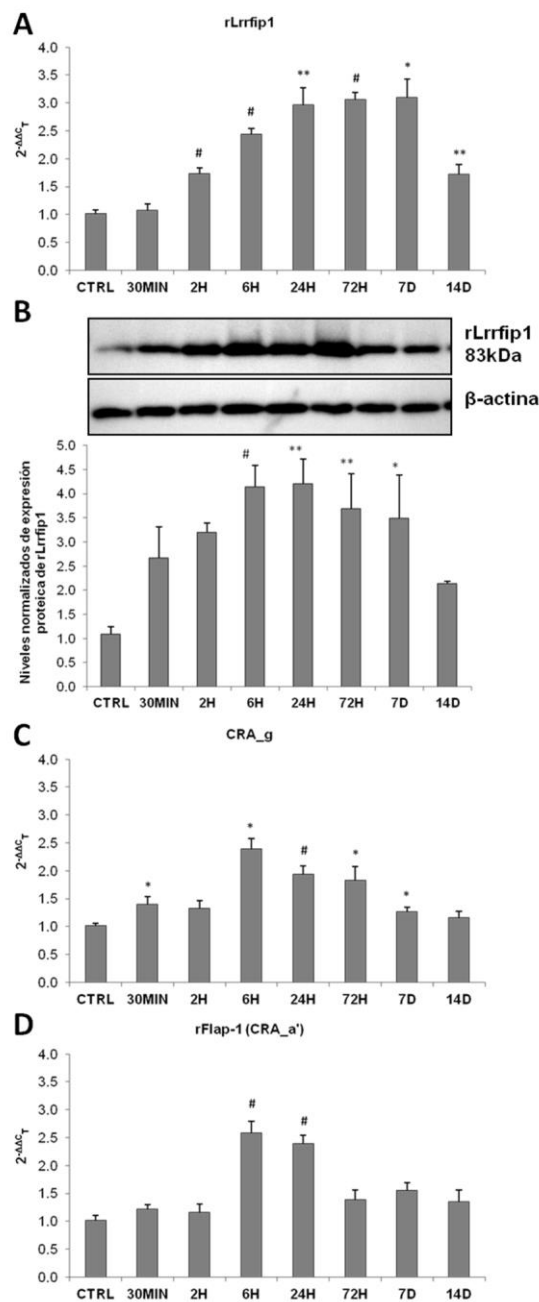


Figura 5B.5. Patrón de expresión de los transcritos de *Lrrfp1* de rata (rLrrfp1 (NM_001014269), CRA_g y rFlap-1) y de la proteína de referencia rLrrfp1 en corteza cerebral de ratas control y a los 30 minutos, 2, 6, 24, 72 horas, 7 y 14 días después de la pMCAO. Perfil de expresión analizado mediante qPCR de los transcritos rLrrfp1 (A), CRA_g (C) y rFlap-1 (D). Resultados obtenidos mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ y normalizados con los controles endógenos *Sdha* e *Ywhaz*. Los datos representados son la media \pm EEM; n=3-5. (B) Patrón de expresión de la proteína rLrrfp1 en isquemia cerebral mediante *western blot*. Los datos del análisis densimétrico de las bandas son la media \pm EEM; n=3-5. La β -actina se utilizó como control de carga. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # $p < 0.001$ respecto al grupo control (CTRL).

5B.2.2 Expresión y localización celular de la isoforma rLrrfip1 en corteza cerebral después de pMCAO

De acuerdo a la tinción mediante doble inmunofluorescencia en secciones cerebrales equivalentes del territorio de la ACM (apartado 4.6.3.1), rLrrfip1 se expresa y su expresión aumenta después de la pMCAO en neuronas corticales (células NeuN positivas) y astrocitos (células GFAP positivas) (Figura 5B.6). Los animales control mostraron una inmunoreactividad baja a rLrrfip1 en neuronas, con apariencia redondeada, y astrocitos (Figuras 5B.6A y E, respectivamente). Lo mismo se detectó en el tejido cerebral contralateral de los animales expuestos a la pMCAO (Figuras 5B.6D y H, respectivamente). La isquemia permanente indujo un aumento en la expresión de rLrrfip1 principalmente en el soma y neuritas de neuronas localizadas en el área peri-infarto (NeuN-positivas, Figura 5B.6C). Además, la expresión de rLrrfip1 también aumentó en células reactivas astrogliales en el *core* y principalmente en el área peri-infarto (GFAP-positivas, Figuras 5B.6F-G) después de la isquemia. No se detectó colocalización de Lrrfip1 con la tinción nuclear, DAPI, de estas células. La tinción con el marcador celular de astrocitos reactivos fue muy baja en animales control y en el hemisferio contralateral de animales expuestos a pMCAO (Figuras 5B.6E y H, respectivamente).

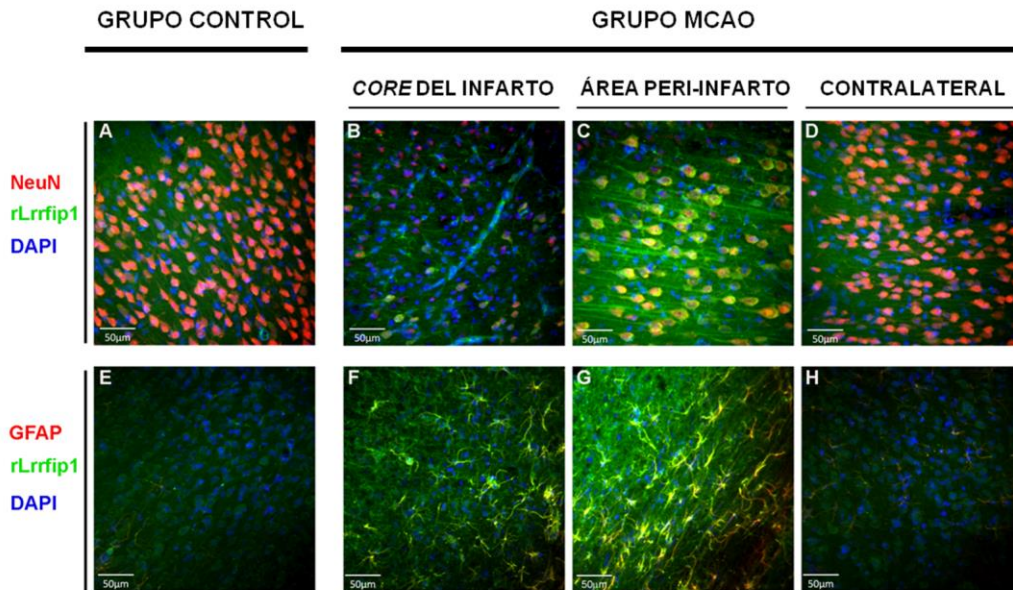


Figura 5B.6. Localización celular de rLrrfip1 en cerebro de rata tras isquemia focal. Doble inmunofluorescencia de rLrrfip1 (verde) y marcadores celulares (rojo) de neuronas (NeuN) y astrocitos (GFAP) localizados en el núcleo o core del infarto (B y F), área peri-infarto (C y G) y tejido contralateral (D y H) en secciones cerebrales de animales isquémicos (MCAO) y en secciones cerebrales de animales control (A y E). Se utilizó DAPI para teñir los núcleos de las células (azul).

5B.2.3 Perfiles de expresión de los transcritos rLrrfip1, CRA_g y rFlap-1, y expresión y localización subcelular de la isoforma rLrrfip1 en astrocitos sometidos a POG

Dado que los resultados previos del grupo señalaban a los astrocitos como principales dianas de las acciones de *Lrrfip1* [93], centramos el análisis del perfil de expresión de los transcritos y de la isoforma rLrrfip1 no sólo en las muestras cerebrales de animales expuestos a pMCAO, sino también en cultivo de astrocitos de rata sometidos a isquemia *in vitro* mediante la privación de oxígeno y glucosa (POG) (apartado 4.3.2.1). En primer lugar, previamente al análisis mediante qPCR (apartado 4.5.4.2.1), confirmamos que los distintos transcritos (rLrrfip1, CRA_g y rFlap-1) se expresaban en astrocitos mediante PCR convencional (apartado 4.5.2.2) (Figura 5B.7). rLrrfip1 aumentó gradualmente desde las 0 hasta las 2 horas después de la reperusión, alcanzando la máxima expresión a las 2 horas (4.2 veces mayor que el control; $p < 0.01$ a 0 y 30 minutos; $p < 0.001$ a 2 horas; Figura 5B.8A). CRA_g aumentó desde las 0 hasta las 2 horas después de la reperusión alcanzando niveles similares de expresión en todos los tiempos (2.4-3 veces mayor que el control;

$p < 0.001$ a 0, 30 minutos y 2 horas; Figura 5B.8B). El perfil de expresión de rFlap-1 mostró un patrón bifásico, primero aumentó desde los 0 a los 30 minutos ($p < 0.05$ a 0h; $p < 0.01$ a 30min), volviendo a los niveles control a las 2 horas y aumentando significativamente y alcanzando el máximo de expresión a las 6 horas (2.3 veces mayor que el control; $p < 0.001$; Figura 5B.8C). A nivel de proteína, rLrrfip1 aumentó gradualmente desde las 5 hasta las 24 horas después de la reperusión ($p < 0.01$ a 24 horas; Figura 5B.8D). La doble inmunofluorescencia (apartado 4.6.3.2) mostró un aumento significativo de la expresión de rLrrfip1 y GFAP en el grupo POG ($p < 0.001$ y $p < 0.01$, respectivamente) y rLrrfip1 se localizó en el citoplasma de astrocitos control y expuestos a POG 24 horas después de la reperusión (Figura 5B.8E).

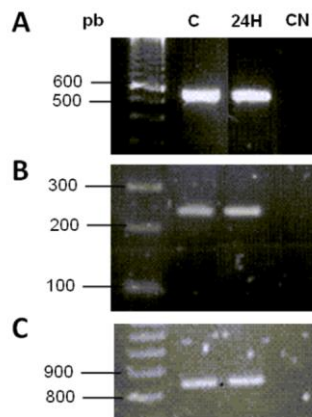


Figura 5B.7. Expresión de los transcritos de *Lrrfip1* en astrocitos corticales de rata en condiciones control (C) y 24 horas después de la POG (24H) detectados mediante PCR convencional. CN: control negativo de la PCR. Pb: pares de bases. Según los datos recogidos en la Tabla 5B.2 estos transcritos corresponderían a: (A) rLrrfip1 (PCR A; 533pb); (B) CRA_g (PCR I; 235pb) y (C) rFlap-1 (PCR J; 879pb).

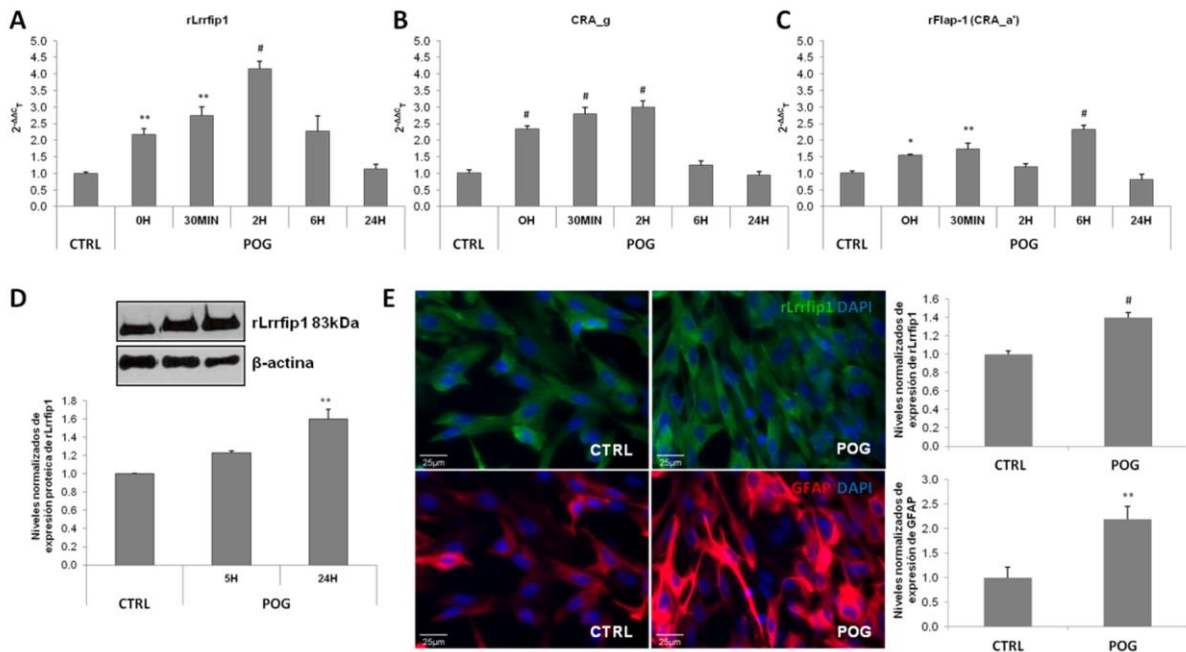


Figura 5B.8. Expresión de los transcritos de *Lrrfp1* y expresión y localización subcelular de la proteína rLrrfp1 de referencia (NP_001014291) en astrocitos de rata control y a distintos tiempos después de la POG. Perfiles de expresión de (A) rLrrfp1 (NM_0001014269), (B) CRA_g y (C) rFlap-1 (CRA_a') en control, 0, 30 minutos, 2, 6 y 24 horas después de la reperusión analizados mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ y los controles endógenos *Sdha* y *Rpl13a*. Los datos representados son la media \pm EMM; n=3. (D) Perfil de expresión proteico de rLrrfp1 en control, 5 y 24 horas después de la reperusión. Los datos del análisis densimétrico de las bandas son la media \pm EMM; n=3. La β -actina se utilizó como control de carga. (E) Doble inmunofluorescencia de rLrrfp1 (verde) y el marcador celular de astrocitos, GFAP (rojo), en astrocitos control (CTRL) y sometidos a POG, fijados 24 horas después de la reperusión. DAPI se utilizó para marcar los núcleos de las células (azul).

* p<0.05, ** p<0.01, # p<0.001 respecto al grupo control (CTRL).

5B.3 IDENTIFICACIÓN DE DIANAS Y ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN DE rLRRFIP1 MEDIANTE TÉCNICAS DE SILENCIACIÓN *IN VITRO*

5B.3.1 Determinación de las condiciones óptimas de transfección de siRNAs en astrocitos corticales

Con el objetivo de realizar estudios funcionales se determinaron las condiciones óptimas de transfección de siRNAs en cultivo primario de astrocitos corticales de rata. Se evaluó la toxicidad del reactivo de transfección y la eficiencia de transfección mediante un siRNA citotóxico y el método MTT (apartados 4.4.1 y 4.7.1). La toxicidad del reactivo de

transfección aumentaba cuanto mayor cantidad de reactivo se utilizaba (Figura 5B.9A) y la mayor eficiencia de transfección (~60%) se obtuvo con 0.1µl de DharmaFECT-1 (Figura 5B.9B). Estas condiciones de transfección se validaron al confirmar la disminución de la expresión del mRNA de rLrrfip1 72 horas después de la transfección ($p < 0.001$; Figura 5B.9C) y de la proteína 6 días después de la transfección ($p < 0.001$; Figura 5B.9D).

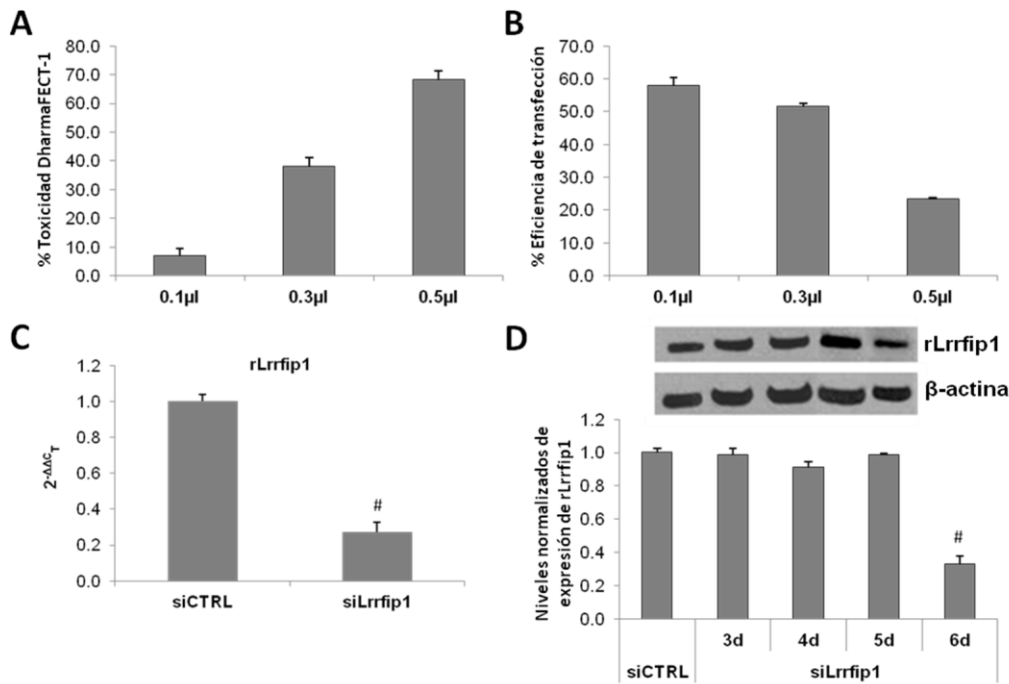


Figura 5B.9. Determinación de las condiciones óptimas de transfección de siRNAs en cultivo primario de astrocitos corticales de rata mediante MTT (A y B), qPCR (C) y *western blot* (D). (A) Toxicidad del reactivo de transfección (DharmaFECT-1, grupo *Mock*). (B) Eficiencia de transfección (grupo siCONTROL TOXTransfection Control – grupo *Mock*). Análisis de la expresión de rLrrfip1 mediante (C) qPCR, 72 horas después de la transfección, y (D) *western blot*, a los 3, 4, 5 y 6 días después de la transfección. # $p < 0.001$ respecto al control negativo (siCTRL).

Para el análisis de expresión del mRNA mediante qPCR se identificaron los controles endógenos óptimos para la normalización de los resultados en esta condición experimental. Se evaluó la expresión de los genes validados para los modelos de isquemia *in vivo* e *in vitro*, *Hprt*, *Ywhaz*, *Rpl13a* y *Sdha* (Figura 5B.10A-D, respectivamente). Los cuatro genes mostraron una tendencia a aumentar de expresión en el grupo transfectado con los siRNAs contra Lrrfip1 (siLrrfip1) pero se seleccionaron *Hprt* e *Ywhaz* como endógenos válidos ya

que ambos no presentaron diferencias significativas de expresión entre los grupos ($p > 0.05$) y el aumento no era superior a 1.5.

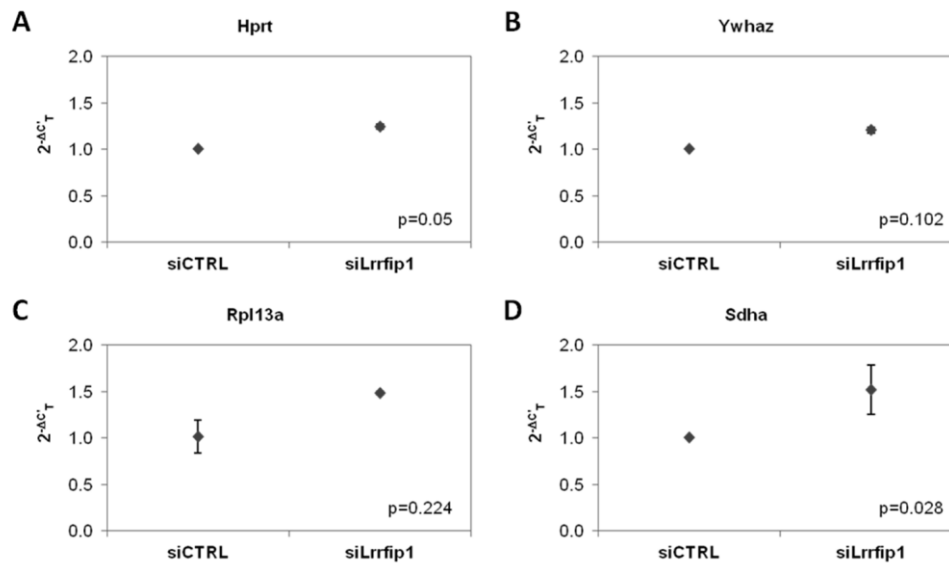


Figura 5B.10. Identificación de los controles endógenos válidos para los experimentos de silenciamiento génico mediante siRNAs. (A) *Hprt*, (B) *Ywhaz*, (C) *Rpl13a* y (D) *Ywhaz*. Análisis de la expresión mediante el método $2^{-\Delta C_T}$. Los datos son la media \pm EEM; $n=3$.

5B.3.2 Efecto de la silenciamiento de rLrrfip1 sobre la expresión de p- β -catenina (Ser552), p-Akt (Ser473), p-mTOR (Ser2448) y GLT-1 y sobre la recaptación de glutamato en astrocitos

Como identificamos que la proteína de referencia rLrrfip1 de rata podría ser la ortóloga de la isoforma 1 de ratón, decidimos determinar si ésta también regula la activación de β -catenina y la actividad Akt en astrocitos [104,117,118]; además, siguiendo nuestro trabajo previo [93], decidimos determinar si rLrrfip1 regula fisiológicamente la expresión del transportador GLT-1/Eaat2 en estas células. Tras transfectar astrocitos de rata con siRNAs específicos contra Lrrfip1 (apartado 4.4.1) se detectó la inhibición de rLrrfip1 seis días después de la transfección (39%; $p < 0.01$; Figura 5B.11A). La disminución de la expresión de rLrrfip1 se correlacionó con la reducción de la expresión de las formas fosforiladas de β -catenina (Ser552; 33%; $p < 0.01$), Akt (Ser473; 32%; $p < 0.01$) y mTOR (Ser2448; 29%; $p < 0.05$) (Figuras 5B.11B-D, respectivamente). Además, al analizar la expresión de GLT-1 confirmamos una reducción de la expresión de la proteína (37%; $p < 0.01$) y del mRNA (41%; $p < 0.001$) en los astrocitos transfectados con siLrrfip1 (Figuras 5B.11E-F, respectivamente)

que se correlacionó con una reducción en la recaptación de glutamato (apartado 4.8) (39%; $p < 0.001$; Figura 5B.11G).

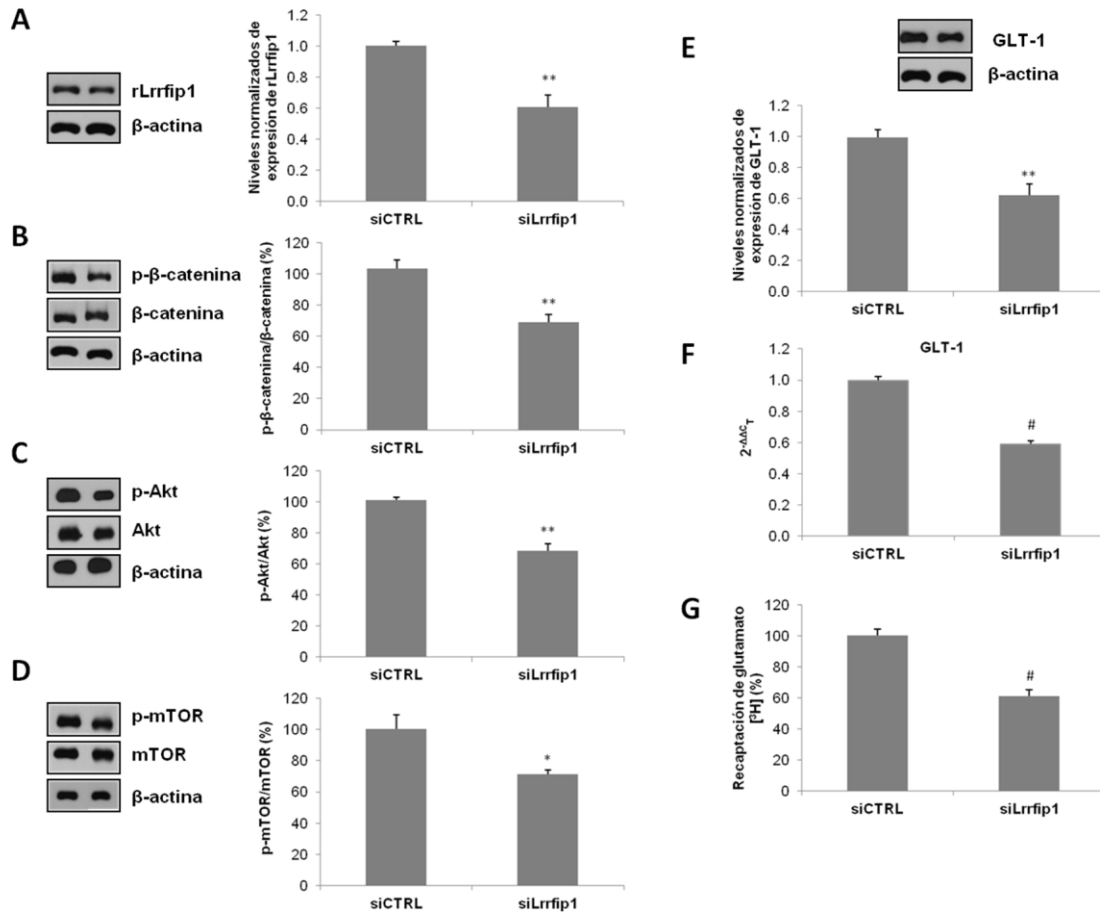


Figura 5B.11. Análisis de la expresión mediante *western blot* de (A) rLrrfp1, (B-D) porcentaje de las formas fosforiladas de β-catenina (Ser552), Akt (Ser473) y mTOR (Ser2448) respecto a la proteína total y (E) GLT-1 en astrocitos transfectados con siRNAs control (siCTRL) y siRNAs contra Lrrfp1 (siLrrfp1), 6 días después de la transfección. También se analizó (F) la expresión del mRNA de GLT-1 y (G) la recaptación de glutamato. Los datos representados son la media ± EMM de 2-3 experimentos independientes.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # $p < 0.001$ respecto al grupo siCTRL.

5C. Objetivo 3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LA ISQUEMIA CEREBRAL: EXPRESIÓN TEMPORAL DE LOS miRNAs Y DE SUS mRNA DIANA TRAS LA ISQUEMIA EXPERIMENTAL

5C.1 IDENTIFICACIÓN DE miRNAs DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS TRAS LA ISQUEMIA CEREBRAL, PREDICCIÓN Y ANÁLISIS DE SUS mRNA DIANA PARA SU VALIDACIÓN

5C.1.1 Perfiles de expresión de los miRNAs en corteza cerebral de rata tras isquemia focal mediante ensayo multiplex FlexmiR

Con el fin de identificar los miRNAs expresados de manera diferencial tras la isquemia cerebral se analizaron de forma simultánea, mediante ensayo multiplex, un total de cuatrocientos cuarenta y dos miRNAs en las muestras de corteza cerebral de rata control y de ratas sometidas a pMCAO. De estos, se seleccionaron para el análisis ciento doce miRNAs (25.3%) para el posterior estudio ya que fueron detectados con una intensidad media de fluorescencia (MFI) de como mínimo el doble de la fluorescencia del ruido de fondo o *background* en al menos dos de los grupos estudiados. La expresión de los miRNAs cambió rápidamente después de la isquemia focal y fue particularmente interesante que los cambios de expresión de los miRNAs también ocurrieran en la fase tardía, a los siete y catorce días después de la MCAO. Treinta y dos miRNAs (28.6%) sufrieron cambios significativos en su expresión después de la isquemia mostrando distintos patrones de expresión (Tabla 5C.1), mientras que los ochenta miRNAs restantes no variaron su expresión en condiciones de isquemia (Tabla 5C.2).

5C.1.2 Selección de controles endógenos y validación de perfiles de expresión de miRNAs mediante qPCR

Con el objetivo de validar los perfiles de expresión del ensayo multiplex se seleccionaron tres miRNAs elegidos al azar (uno que aumentaba (miR-347), uno que disminuía (miR-132), y uno que no variaba su expresión (miR-126) después de la pMCAO). En primer lugar se establecieron los miRNAs de referencia adecuados para la cuantificación relativa de nuestras muestras. Los miRNAs de referencia evaluados, Y1, snoRNA y U6snRNA, mostraron una expresión invariable (Figura 5C.1A-C, respectivamente). U6snRNA fue el miRNA control endógeno más estable (valor de estabilidad de 0.057) mientras que snoRNA y Y1 fueron la mejor combinación identificada por NormFinder para la normalización de los datos (valor de estabilidad 0.061). Los perfiles de expresión obtenidos mediante qPCR de los miRNAs mmu/rno-miR-132, rno-miR-347 y mmu-miR-126-3p/rno-miR-126 fueron los mismos que los detectados con el ensayo multiplex FlexmiR (Figura 5C.1D-F, respectivamente).

Tabla 5C.1. Resultados del ensayo multiplex FlexmiR. miRNAs con cambios significativos de expresión tras la pMCAO. Los miRNAs se han agrupado según si su expresión aumenta, disminuye o presenta un perfil de expresión bifásico en la fase isquémica analizada en relación al tejido control.

Expresión	Fase isquémica	miRNA	valor p	Nivel de cambio				p (t-test)			
				30min	6h	7d	14d	30min	6h	7d	14d
Disminuida	Aguda y tardía	mmu/rno-miR-138	0.034	-1.5	-1.7	-2.0	-1.6	0.041	0.058	0.100	0.089
		mmu/rno-miR-30d	0.143	-1.3	-1.5	-1.2	-1.3	0.023	0.023	0.133	0.316
		mmu-miR-129-3p/rno-miR-129*	0.073	-1.4	-1.7	-1.6	-1.5	0.153	0.007	0.024	0.018
		mmu/rno-miR-30e	0.001	-2.1	-2.0	-1.6	-1.4	0.005	0.033	0.039	0.072
		mmu/rno-miR-292-3p	0.127	-2.9	-1.7	-1.7	-1.3	0.112	0.031	0.035	0.085
		mmu/rno-miR-30a-3p	0.049	-4.7	-3.0	-2.5	-1.1	0.081	0.188	0.243	0.918
		mmu/rno-miR-98	0.045	-1.3	-1.2	-1.3	1.2	0.095	0.002	0.111	0.336
		mmu/rno-miR-292-5p	0.019	-2.2	-1.6	-1.7	1.6	0.078	0.099	0.116	0.197
		mmu/rno-let-7c	0.029	-1.5	-1.3	-1.1	1.3	0.132	0.332	0.609	0.367
		rno-let-7a	0.012	-1.7	-1.6	-2.1	1.2	0.017	0.056	0.136	0.245
	mmu/rno-miR-99b	0.014	-5.0	-1.3	1.5	-1.4	0.045	0.341	0.427	0.198	
	Aguda	hsa-miR-493-5p	0.047	-1.2	-1.4	1.1	1.1	0.252	0.171	0.032	0.032
		mmu/rno-let-7i	0.004	-1.8	-1.8	-1.0	1.1	0.039	0.089	0.849	0.497
		mmu/rno-miR-23b	0.025	-1.6	-1.7	-1.2	-1.0	0.077	0.148	0.483	0.894
		mmu/rno-miR-341	0.048	-1.2	-1.1	1.1	1.3	0.296	0.321	0.455	0.085
		mmu/rno-let-7e	0.101	-1.5	-1.1	-1.1	-1.2	0.032	0.423	0.423	0.157
		mmu/rno-miR-338	0.033	-1.1	-1.6	-1.3	1.2	0.531	0.083	0.394	0.333
	Tardía	mmu-miR-434-3p	0.000	-1.1	-1.2	nd	-2.8	0.823	0.760	0.000	0.314
mmu/rno-miR-132		0.066	-1.4	-1.4	-2.2	-2.8	0.014	0.020	0.209	0.050	
Aumentada	Aguda y tardía	mmu/rno-miR-487b	0.013	2.2	2.4	2.5	2.1	0.027	0.036	0.033	0.095
		rno-miR-347	0.010	1.9	2.5	2.6	2.4	0.026	0.051	0.030	0.089
		mmu/rno-miR-320	0.075	2.6	2.1	1.6	1.7	0.059	0.081	0.021	0.039
		mmu/rno-miR-324-5p	0.003	3.5	3.8	1.8	2.4	0.006	0.007	0.175	0.016
		mmu/rno-miR-212	0.012	1.4	1.5	2.5	1.8	0.223	0.037	0.005	0.003
		mmu/rno-miR-21	0.048	11.0	9.2	108.2	62.5	0.215	0.390	0.150	0.183
	Aguda	mmu/rno-miR-351	0.011	2.4	3.6	-1.0	-1.4	0.011	0.051	0.973	0.551
		mmu/rno-miR-483	0.035	2.7	5.3	1.1	-2.2	0.015	0.050	0.728	0.494
		mmu/rno-miR-494	0.003	3.2	2.5	1.0	-1.2	0.018	0.037	0.565	0.377
		mmu/rno-miR-542-5p	0.000	38.4	16.4	2.5	1.1	0.003	0.037	0.206	0.882
		rno-miR-327	0.002	3.8	4.7	1.6	-1.3	0.006	0.029	0.358	0.504
Bifásica		mmu/rno-miR-542-3p	0.000	1.3	2.1	-1.6	-2.0	0.021	0.074	0.003	0.026
		mmu/rno-miR-185	0.021	1.3	1.6	1.4	-1.7	0.315	0.000	0.059	0.111

mmu, rno, hsa: especies animales donde se expresan los miRNAs. Ratón (mmu, mus musculus), rata (rno, rattus norvegicus) y humano (hsa, homo sapiens). Valor p estadísticamente significativo cuando p<0.05.

Tabla 5C.2. miRNAs expresados en corteza cerebral sin cambios de expresión tras pMCAO. Los miRNAs están ordenados de mayor a menor expresión en cerebro control (columna log2 control).

miRNA	valor p	log2 control	miRNA	valor p	log2 control	miRNA	valor p	log2 control
mmu/rno-miR-9	0.114	12.1	mmu/rno-miR-30a-5p	0.105	8.6	mmu/rno-miR-136	0.118	7.2
rno-miR-363-5p	0.279	12.1	mmu/rno-miR-128a	0.479	8.5	mmu/rno-miR-379	0.303	7.2
hsa-miR-423	0.112	11.5	mmu/rno-miR-184	0.727	8.4	mmu/rno-miR-134	0.302	7.2
hsa-miR-368	0.247	11.3	mmu/rno-let-7b	0.123	8.4	mmu-miR-375	0.973	7.2
mmu/rno-miR-140	0.313	10.8	mmu/rno-miR-27b	0.302	8.4	mmu-miR-293	0.425	7.2
mmu/rno-miR-29a	0.496	10.8	rno-miR-501	0.793	8.3	mmu/rno-miR-122a	0.081	7.1
mmu/rno-miR-125b	0.495	10.6	mmu/rno-miR-335	0.075	8.2	mmu/rno-miR-130a	0.831	7.0
mmu/rno-miR-29c	0.871	9.9	mmu/rno-miR-143	0.398	8.2	mmu/rno-miR-298	0.334	7.0
rno-miR-352	0.333	9.8	mmu/rno-miR-26b	0.889	8.2	mmu-miR-126-5p/rno-miR-126*	0.176	6.9
mmu/rno-let-7d	0.124	9.6	mmu/rno-miR-107	0.916	8.2	mmu/rno-miR-100	0.439	6.9
mmu/rno-miR-326	0.228	9.6	mmu/rno-miR-145	0.598	8.2	hsa-miR-181d	0.847	6.9
mmu/rno-miR-181a	0.843	9.6	mmu/rno-let-7f	0.104	8.2	mmu/rno-miR-541	0.056	6.9
mmu/rno-miR-29b	0.298	9.5	mmu/rno-miR-30b	0.115	7.9	mmu/rno-miR-199a	0.644	6.8
mmu/rno-miR-125a	0.420	9.3	mmu/rno-miR-31	0.292	7.9	mmu/rno-miR-200c	0.723	6.8
mmu/rno-miR-103	0.211	9.3	mmu/rno-miR-218	0.631	7.9	mmu/rno-miR-196b	0.293	6.8
mmu/rno-miR-150	0.145	9.1	mmu/rno-miR-370	0.392	7.9	mmu/rno-miR-224	0.247	6.7
mmu-miR-126-3p/rno-miR-126	0.238	9.1	mmu/rno-miR-128b	0.367	7.8	hsa-miR-513	0.139	6.7
mmu/rno-miR-206	0.196	9.1	mmu/rno-miR-99a	0.113	7.6	mmu-miR-410	0.216	6.6
mmu/rno-miR-23a	0.172	9.1	mmu/rno-miR-142-5p	0.769	7.6	mmu/rno-miR-144	0.103	6.6
mmu/rno-miR-200b	0.576	9.0	mmu/rno-miR-222	0.133	7.6	hsa-miR-346	0.723	6.4
mmu/rno-miR-22	0.480	9.0	rno-miR-336	0.431	7.5	mmu-miR-433-3p/rno-miR-433	0.085	6.3
mmu-miR-9*	0.126	8.9	rno-miR-421	0.846	7.5	mmu/rno-miR-211	0.617	6.2
mmu/rno-miR-26a	0.574	8.9	mmu/rno-miR-376a	0.502	7.4	hsa-miR-490	0.786	6.2
mmu/rno-miR-30c	0.584	8.9	mmu/rno-miR-323	0.158	7.4	hsa-miR-202	0.203	5.9
mmu-miR-422b	0.060	8.8	hsa-miR-376b	0.138	7.4	mmu/rno-let-7d*	0.312	5.9
mmu/rno-miR-195	0.129	8.8	rno-miR-1	0.126	7.3	hsa-miR-215	0.359	5.6
mmu/rno-miR-127	0.464	8.6	mmu/rno-miR-181b	0.311	7.2			

mmu, rno, hsa: especies animales donde se expresan los miRNAs. Ratón (mmu, mus musculus), rata (rno, rattus norvegicus) y humano (hsa, homo sapiens). Log2 control: logaritmo binario de los valores MFI de las muestras control. Análisis estadístico mediante ANOVA. Se ha considerado estadísticamente significativo cuando p<0.05.

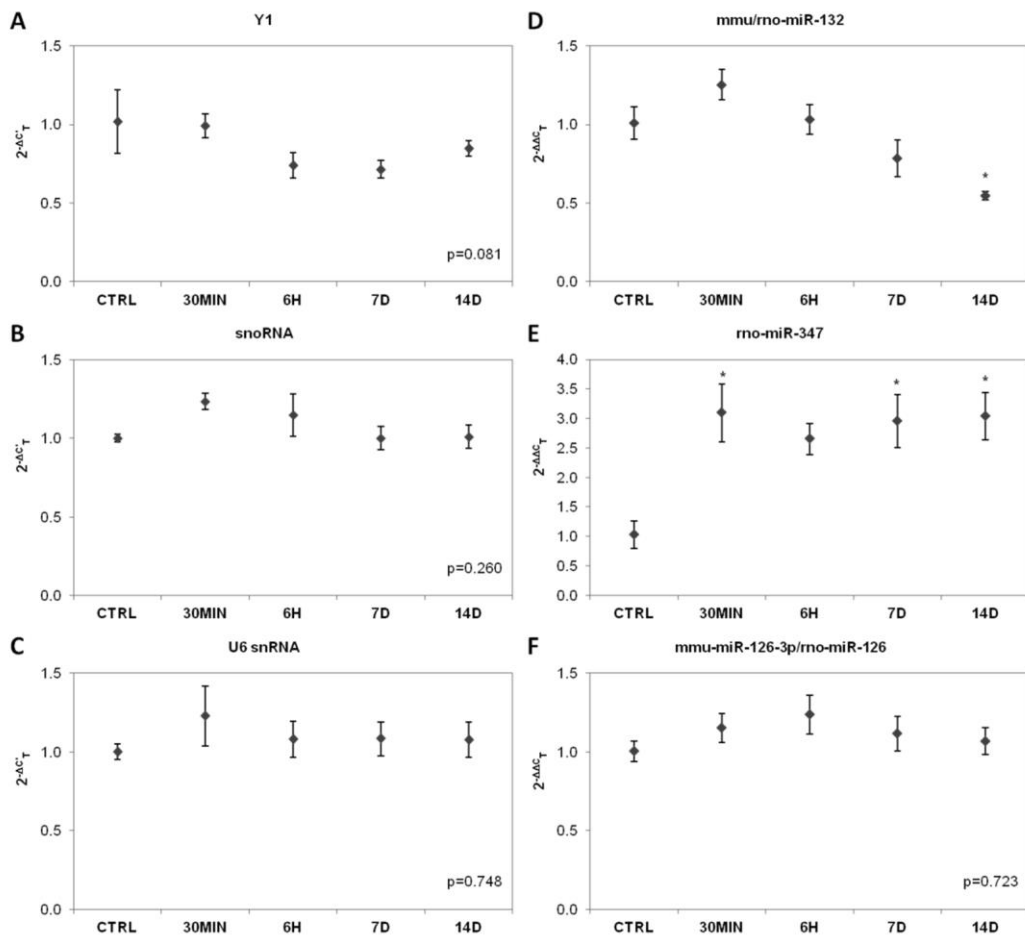


Figura 5C.1. Identificación de miRNAs controles endógenos y validación de perfiles de expresión de miRNAs mediante qPCR. (A-C) Y1, snoRNA y U6 snRNA son miRNAs controles endógenos válidos para cuantificación relativa. Los cambios en la expresión génica de Y1 (A), snoRNA (B) y U6snRNA (C) se ha analizado mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$. (D-F) Validación de los perfiles de expresión en condiciones control e isquémicas de mmu/rno-miR-132 (D), rno-miR-347 (E) y mmu-miR-126-3p/rno-miR-126 (C). Los cambios en la expresión génica de estos miRNAs se han analizado mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ usando como controles endógenos Y1 y snoRNA. Los datos representados son la media \pm EEM; n=3.

*p<0.05 respecto al grupo control (CTRL).

5C.1.3 Predicción de mRNAs diana de los miRNAs diferencialmente expresados en la isquemia cerebral y análisis de función de dichas dianas

Mediante el sitio web microRNA.org (apartado 4.1.9) se identificaron potenciales mRNAs diana de los miRNAs diferencialmente expresados tras la isquemia (Tabla 5C.1). Treinta y uno de los treinta y dos miRNAs diferencialmente expresados se encontraron en

microRNA.org. Las predicciones de las dianas se basaron en los perfiles de expresión de los miRNAs detectados y las dianas predichas comunes a distintos miRNAs se seleccionaron para su posterior análisis considerando que estas dianas tenían más probabilidades de estar reguladas después de una lesión isquémica. Se identificaron noventa dianas potenciales, de las cuales veintitrés habían sido previamente validadas experimentalmente (Anexo V - Tabla I).

Los resultados obtenidos tras analizar la función biológica de estos noventa genes diana mediante el programa *Ingenuity Pathway Analysis* fueron los siguientes: las diez principales funciones biológicas asociadas con estos genes diana incluyeron el desarrollo y función del sistema nervioso ($p < 0.000003$), morfología de órganos ($p < 0.000003$), desarrollo celular ($p < 0.0009$), movimiento celular ($p < 0.002$), ciclo celular ($p < 0.01$), señalización e interacción célula-célula ($p < 0.01$), organización y ensamblaje celular ($p < 0.01$), replicación, recombinación y reparación de DNA ($p < 0.01$), trastornos del desarrollo ($p < 0.01$) y desarrollo embrionario ($p < 0.01$).

Tras el análisis bibliográfico mediante PubMed de estas dianas potenciales se seleccionaron cuarenta y siete de las noventa identificadas. Estos 47 genes habían presentado, en trabajos previamente publicados, alteraciones en su expresión en cerebro post-isquémico o lesionado, o bien participaban en procesos fisiológicos o patológicos capaces de promover el daño o la reparación cerebral después de un accidente cerebrovascular (Tabla 5C.3). La Tabla 5C.4 resume las cuarenta y siete dianas recogidas en la Tabla 5C.3 según su función. Entre ellas, veinticinco se habían relacionado previamente con isquemia o daño cerebral y veintidós tenían funciones significativas en procesos fisiopatológicos cerebrales pero no se habían asociado con la isquemia cerebral.

Tabla 5C.3. Dianas predichas y validadas de los miRNAs diferencialmente expresados en la isquemia cerebral previamente descritas por presentar alteración en cerebro post-isquémico o por participar en procesos cerebrales fisiológicos o patológicos.

	Símbolo Gen	mRNA NCBI Refseq	Nombre del Gen	Funciones cerebrales / <u>Isquemia cerebral</u>	miRNAs significativamente regulados por la isquemia y reguladores potenciales de las dianas	Expresión de los miRNAs
Dianas predichas	<i>Atg12</i>	NM_001038495	<i>ATG12 autophagy related 12 homolog (S. cerevisiae)</i>	Proteína reguladora de autofagia que promueve daño neuronal en ratas sometidas a pMCAO [195,196,197].	mmu/rno-mir-138, mmu/rno-miR-30d, mmu-miR-129-3p/rno-miR-129*, mmu/rno-miR-30e, mmu/rno-miR-292-3p, mmu/rno-miR-98, mmu/rno-miR-292-5p, mmu/rno-let-7c, rno-let-7a	Disminuyen en la fase aguda y tardía de la isquemia
	<i>Tspan2</i>	NM_022589	<i>tetraspanin 2</i>	Diferenciación de células de neuroglía [198].		
	<i>Calm1</i>	NM_031969	<i>calmodulin 1</i>	Regula la migración neuronal [199].	mmu/rno-miR-30e, mmu/rno-miR-292-3p, mmu/rno-miR-99b, mmu/rno-miR-98, mmu/rno-miR-292-5p, mmu/rno-let-7c, rno-let-7a	
	<i>Slc24a2</i>	NM_031743	<i>solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 2</i>	<u>Disminuye su expresión después de pMCAO</u> . Rol neuroprotector [200,201].		

Tabla 5C.3. Continuación

	Símbolo Gen	mRNA NCBI Refseq	Nombre del Gen	Funciones cerebrales / <u>Isquemia cerebral</u>	miRNAs significativamente regulados por la isquemia y reguladores potenciales de las dianas	Expresión de los miRNAs
Dianas predichas	<i>syt4</i>	NM_031693	<i>synaptotagmin IV</i>	<u>Aumenta su expresión después de convulsiones</u> y regula la liberación de glutamato glial [202].	rno-miR-292-5p, rno-miR-30e	Disminuyen en la fase aguda y tardía de la isquemia
	<i>Tp53</i>	NM_030989.3	<i>tumor protein p53</i>	Gen antiapoptótico. Controla la renovación y diferenciación de células madre/progenitoras neuronales [203].	rno-miR-30d, rno-miR-30e	
Dianas validadas	<i>Madd</i>	NM_053585	<i>MAP-kinase activating death domain</i>	<u>Acumulada en el nucléolo tras estimulación con tMCAO en ratas.</u> Marcador de muerte celular neuronal activa [204].	rno-miR-292-5p	
	<i>Myc</i>	NM_012603	<i>myelocytomatosis oncogene</i>	<u>Aumenta en corteza cerebral después de isquemia focal,</u> promueve daño cerebral [205,206].	rno-let-7a	
	<i>Mmp9</i>	NM_031055	<i>matrix metallopeptidase 9</i>	<u>Aumenta</u> y contribuye al daño cerebral después de un ictus [207,208].	rno-miR-132, rno-miR-292-5p	

Tabla 5C.3. Continuación

	Símbolo Gen	mRNA NCBI Refseq	Nombre del Gen	Funciones cerebrales / <u>Isquemia cerebral</u>	miRNAs significativamente regulados por la isquemia y reguladores potenciales de las dianas	Expresión de los miRNAs
Dianas validadas	<i>Pten</i>	NM_031606	<i>phosphatase and tensin homolog</i>	Gen supresor de tumores que inhibe el crecimiento y la migración celular e induce la apoptosis. <u>Disminuye su expresión después de isquemia cerebral focal</u> . Rol en supervivencia neuronal después de isquemia [209,210,211,212].	rno-miR-21	Aumentan en la fase aguda y tardía de la isquemia
	<i>Pcd4</i>	NM_022265.2	<i>programmed cell death 4</i>	Gen proapoptótico [213].		
Dianas predichas	<i>Bnip3l</i>	NM_080888	<i>BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3-like</i>	Promueve muerte celular apoptótica, no apoptótica y autofágica. <u>Proteína regulada por hipoxia que aumenta después de tMCAO en corteza cerebral y estriado de rata</u> [214,215].	mmu/rno-miR-487b, rno-miR-347, mmu/rno-miR-212	
	<i>Arl8b</i>	NM_001024332	<i>ADP-ribosylation factor-like 8B</i>	Rol en formación de neuritas [216].	mmu/rno-miR-487b, rno-miR-347, mmu/rno-miR-320, mmu/rno-miR-324-5p, mmu/rno-miR-212	
	<i>Erap1</i>	NM_030836	<i>endoplasmic reticulum aminopeptidase 1</i>	Regula angiogénesis y respuestas inmunes e inflamatorias al daño [217].		

Tabla 5C.3. Continuación

	Símbolo Gen	mRNA NCBI Refseq	Nombre del Gen	Funciones cerebrales / <u>Isquemia cerebral</u>	miRNAs significativamente regulados por la isquemia y reguladores potenciales de las dianas	Expresión de los miRNAs
Dianas predichas	<i>Acsf4</i>	NM_053623	<i>acyl-CoA synthetase long-chain family member 4</i>	Regula el transporte axonal de vesículas sinápticas y es necesaria para el desarrollo y función sináptica [218,219].	mmu/rno-miR-487b, rno-miR-347, mmu/rno-miR-212, mmu/rno-miR-21	Aumentan en la fase aguda y tardía de la isquemia
	<i>Btg2</i>	NM_017259	<i>BTG family, member 2</i>	Funcionalmente importante durante la neurogénesis. Modulador de supervivencia y diferenciación celular, puede ayudar a proteger contra la muerte celular mediante la inhibición de vías de señalización necróticas y/o apoptóticas. <u>Altamente expresado en cerebro en el núcleo del infarto y peri-infarto</u> [220,221].	mmu/rno-miR-21 (validated), mmu/rno-miR-320, mmu/rno-miR-324-5p, mmu/rno-miR-212	
	<i>Lrrc4</i>	NM_001037336	<i>leucine rich repeat containing 4</i>	Regulador negativo del crecimiento celular con función en el mantenimiento de la función normal del SNC, participando en la diferenciación de células neuronales y gliales [222,223,224].	mmu/rno-miR-351, mmu/rno-miR-483, mmu/rno-miR-494, mmu/rno-miR-542-5p, rno-miR-327, mmu/rno-miR-21	
	<i>Slc4a10</i>	NM_178092	<i>solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter, member 10</i>	Expresado sólo en neuronas, implicado en el control del pH y la excitabilidad neuronal [225]. <u>Disminuye su expresión con la hipoxia en corteza cerebral de ratón</u> [226].	mmu/rno-let-7i, mmu/rno-miR-23b, mmu/rno-miR-341, mmu/rno-let-7e, mmu/rno-miR-338	Disminuyen en la fase aguda de la isquemia

Tabla 5C.3. Continuación

	Símbolo Gen	mRNA NCBI Refseq	Nombre del Gen	Funciones cerebrales / <u>Isquemia cerebral</u>	miRNAs significativamente regulados por la isquemia y reguladores potenciales de las dianas	Expresión de los miRNAs
Dianas predichas	<i>Lox</i>	NM_017061	<i>lysyl oxidase</i>	Enzima formadora de matriz extracelular en sitios dañados de cerebro de rata, implicada en la modulación de la matriz extracelular y en la formación de cicatriz [227].	mmu/rno-let-7i, mmu/rno-miR-23b, mmu/rno-miR-341, mmu/rno-let-7e, mmu/rno-miR-338	Disminuyen en la fase aguda de la isquemia
Dianas validadas	<i>Neurod1</i>	NM_019218	<i>neurogenic differentiation 1</i>	Esencial para la neurogénesis adulta y la supervivencia de progenitores neuronales [228,229].	rno-miR-338	
	<i>Vsnl1</i>	NM_012686	<i>visinin-like 1</i>	<u>Disminuye su expresión después de IMCAO en cerebro de rata</u> . Rol en transducción de señal, proteína sensora del calcio neuronal [158].	rno-miR-494	Aumentan en la fase aguda de la isquemia
Dianas predichas	<i>Pxn</i>	NM_001012147	<i>paxillin</i>	<u>Aumenta su expresión en corteza cerebral de ratón después de MCAO</u> [230]. Implicada en proliferación y migración de células endoteliales primarias [231].	mmu/rno-miR-30e, mmu/rno-miR-292-3p, mmu/rno-miR-99b, mmu/rno-miR-542-3p, mmu/rno-miR-185, mmu/rno-miR-132	Aumentan y disminuyen en la fase aguda y disminuyen en la fase tardía de la isquemia
	<i>Vapa</i>	NM_031631	<i>VAMP (vesicle-associated membrane protein)-associated protein A</i>	Necesaria para neurotransmisión vesicular, <u>aumenta su expresión en un modelo de daño agudo neuronal</u> [232].	mmu/rno-let-7i, mmu/rno-miR-23b, mmu/rno-miR-341, mmu/rno-let-7e, mmu/rno-miR-338, mmu/rno-miR-542-3p, mmu/rno-miR-185, mmu/rno-miR-132	

Tabla 5C.3. Continuación

	Símbolo Gen	mRNA NCBI Refseq	Nombre del Gen	Funciones cerebrales / <u>Isquemia cerebral</u>	miRNAs significativamente regulados por la isquemia y reguladores potenciales de las dianas	Expresión de los miRNAs
Dianas predichas	<i>Tle3</i>	NM_053400	<i>transducin-like enhancer of split 3 (E(sp1) homolog, Drosophila)</i>	Neurogénesis. Sugerido como marcador o mediador de resistencia al daño excitotóxico neuronal. Función en la plasticidad funcional del SNC maduro [233].	mmu/rno-miR-30e, mmu/rno-miR-292-3p, mmu/rno-miR-99b, mmu/rno-miR-351, mmu/rno-miR-483, mmu/rno-miR-494, mmu/rno-miR-542-5p, rno-miR-327	Aumentan y disminuyen en la fase aguda y disminuyen en la fase tardía de la isquemia
	<i>Zdhhc23</i>	NM_213627	<i>zinc finger, DHHC-type containing 23</i>	Regula la distribución y actividad de nNOS y puede estar implicada en condiciones patológicas que incluyen pérdida o supervivencia neuronal [234,235].	mmu/rno-mir-138, mmu/rno-miR-30d, mmu-miR-129-3p/rno-miR-129*, mmu/rno-miR-99b, mmu/rno-miR-351, mmu/rno-miR-483, mmu/rno-miR-494, mmu/rno-miR-542-5p, rno-miR-327, mmu/rno-miR-542-3p, mmu/rno-miR-185, mmu/rno-miR-132	
Dianas validadas	<i>Hmox1</i>	NM_012580	<i>heme oxygenase (decycling) 1</i>	<u>Aumenta su expresión en cerebro de rata después de MCAO [236,237,238].</u> Tiene un rol neuroprotector en modelos animales de ictus [239,240].	rno-let-7e, rno-let-7a, rno-miR-494	
Dianas predichas	<i>Phyhip</i>	NM_001017376	<i>phytanoyl-CoA 2-hydroxylase interacting protein</i>	Puede ser importante para diferentes funciones cerebrales, como inhibición de la angiogénesis o de la diferenciación neuronal. <u>No se han detectado cambios de expresión en corteza de rata después de pMCAO [241].</u>	mmu/rno-let-7e, mmu/rno-miR-338, mmu/rno-miR-487b, rno-miR-347, mmu/rno-miR-212	Aumentan y disminuyen en la fase aguda y aumentan en la fase tardía de la isquemia
Dianas validadas	<i>Tagln</i>	NM_031549	<i>transgelin</i>	<u>Aumenta su expresión después de tMCAO en cerebro de rata [158].</u>	rno-miR-338, rno-let-7e, rno-miR-320, rno-miR-21	

Tabla 5C.3. Continuación

	Símbolo Gen	mRNA NCBI Refseq	Nombre del Gen	Funciones cerebrales / <u>Isquemia cerebral</u>	miRNAs significativamente regulados por la isquemia y reguladores potenciales de las dianas	Expresión de los miRNAs
Dianas validadas	<i>Itgb1</i>	NM_001039254	<i>integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)</i>	Inducido por HIF [242]. Proteína necesaria para la adhesión, migración y supervivencia de las células endoteliales durante la angiogénesis [243]. Crítica para la proliferación de precursores de células granulares de cerebelo [244].	rno-miR-21, rno-let-7e	Aumentan y disminuyen en la fase aguda y aumentan en la fase tardía de la isquemia
Dianas predichas	<i>Arf3</i>	NM_080904	<i>ADP-ribosylation factor 3</i>	Implicado en diferenciación y maduración neuronal [245].	mmu/rno-miR-132, mmu/rno-miR-542-3p, mmu/rno-miR-185	Aumentan en la fase aguda y disminuyen en la fase tardía de la isquemia
	<i>Dpysl5</i>	NM_023023	<i>dihydropyrimidinase-like 5</i>	Rol como regulador negativo de la plasticidad sináptica y positivo de la muerte celular neuronal <u>después de isquemia cerebral</u> [246,247].	mmu/rno-miR-132, mmu/rno-miR-21, mmu/rno-miR-542-3p, mmu/rno-miR-185	Aumentan en la fase aguda y aumentan y disminuyen en la fase tardía de la isquemia
	<i>Nde1</i>	NM_053347	<i>nudE nuclear distribution gene E homolog 1 (A. nidulans)</i>	El complejo de proteínas LIS1-Ndel1-Nde1 participa en corticogénesis, integridad sináptica, neurogénesis adulta, transporte intracelular, mitosis y migración neuronal [248,249].		
	<i>Nptxr</i>	NM_030841	<i>neuronal pentraxin receptor</i>	<u>Disminuye su expresión en corteza cerebral de rata a las 3, 6, 12, 24, 72 horas y 7 días después de isquemia cerebral focal</u> [250]. Sólo se expresa en neuronas [251].		

Tabla 5C.3. Continuación

	Símbolo Gen	mRNA NCBI Refseq	Nombre del Gen	Funciones cerebrales / <u>Isquemia cerebral</u>	miRNAs significativamente regulados por la isquemia y reguladores potenciales de las dianas	Expresión de los miRNAs
Dianas predichas	<i>Opcml</i>	NM_053848	<i>opioid binding protein/cell adhesion molecule-like</i>	Regula la morfología y proliferación de astrocitos corticales. Se detecta en <u>astrocitos reactivos después de daño</u> . [252]. Promueve la formación de sinapsis [253].	mmu/rno-miR-132, mmu/rno-miR-21, mmu/rno-miR-542-3p, mmu/rno-miR-185	Aumentan en la fase aguda y aumentan y disminuyen en la fase tardía de la isquemia
	<i>Sdc1</i>	NM_013026	<i>syndecan 1</i>	Implicado en adhesión célula-matriz, migración, desarrollo neuronal e inflamación [254]. Se expresa principalmente en <u>astrocitos reactivos en cerebro dañado</u> , siendo un modulador de la formación de la cicatriz [255,256]. Su sobreexpresión promueve la angiogénesis [257].		
	<i>Sdc4</i>	NM_012649	<i>syndecan 4</i>	Implicado en adhesión célula-matriz, migración, desarrollo neuronal e inflamación [254]. Se expresa principalmente en <u>astrocitos reactivos en cerebro dañado</u> [255]. Rol en respuestas vasculares al daño [258].		
	<i>Atrn</i>	NM_031351	<i>attractin</i>	Implicado en supervivencia celular bajo estrés oxidativo [259].		

Tabla 5C.3. Continuación

	Símbolo Gen	mRNA NCBI Refseq	Nombre del Gen	Funciones cerebrales / <u>Isquemia cerebral</u>	miRNAs significativamente regulados por la isquemia y reguladores potenciales de las dianas	Expresión de los miRNAs
Dianas predichas	<i>Faah</i>	NM_024132	<i>fatty acid amide hydrolase</i>	Inhibidor de la respuesta neuroprotectora del sistema endocanabinoide [260].	mmu/rno-miR-21, mmu/rno-miR-320, mmu/rno-miR-324-5p, mmu/rno-miR-212, mmu/rno-miR-132, mmu/rno-miR-542-3p, mmu/rno-miR-185	Aumentan en la fase aguda y aumentan y disminuyen en la fase tardía de la isquemia
	<i>Unc5c</i>	NM_199407	<i>unc-5 homolog C (C. elegans)</i>	Implicado en la orientación de los axones y la migración celular durante el desarrollo neuronal. Promueve apoptosis en ausencia de sus ligandos (netrin-1, DCC and UNC5) [261].		
	<i>Rgs4</i>	NM_017214	<i>regulator of G-protein signaling 4</i>	<u>Aumenta su expresión en modelo murino de isquemia cerebral moderada.</u> Se expresa en la vasculatura y tiene un rol en la formación vasos inducida por VEGF [262].	mmu/rno-miR-351, mmu/rno-miR-483, mmu/rno-miR-494, mmu/rno-miR-542-5p, rno-miR-327, mmu/rno-miR-21, mmu/rno-miR-132, mmu/rno-miR-542-3p, mmu/rno-miR-185	
	<i>Nr4a3</i>	NM_031628	<i>nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3</i>	Implicado en supervivencia neuronal y orientación de axones [263]. Regula la respuesta de supervivencia de las células endoteliales a hipoxia , también implicado en el crecimiento de células endoteliales inducido por VEGF [264,265]. <u>Aumenta su expresión en cerebro de rata tras un daño isquémico transitorio</u> [266].	mmu/rno-mir-138, mmu/rno-miR-30d, mmu-miR-129-3p/rno-miR-129*, mmu/rno-miR-30e, mmu/rno-miR-292-3p, mmu/rno-miR-542-3p, mmu/rno-miR-185, mmu/rno-miR-132, mmu/rno-miR-21	

Tabla 5C.3. Continuación

	Símbolo Gen	mRNA NCBI Refseq	Nombre del Gen	Funciones cerebrales / <u>Isquemia cerebral</u>	miRNAs significativamente regulados por la isquemia y reguladores potenciales de las dianas	Expresión de los miRNAs
Dianas predichas	<i>Scn3b</i>	NM_139097	<i>sodium channel, voltage-gated, type III, beta</i>	Gen proapoptótico inducible por p53 [267].	mmu/rno-mir-138, mmu/rno-miR-30d, mmu-miR-129-3p/rno-miR-129*, mmu/rno-miR-30e, mmu/rno-miR-292-3p, mmu/rno-miR-98, mmu/rno-miR-292-5p, mmu/rno-let-7c, rno-let-7a, mmu/rno-miR-21, mmu/rno-miR-320, mmu/rno-miR-324-5p, mmu/rno-miR-212	Aumentan y disminuyen en la fase aguda y tardía de la isquemia
	<i>Dclk1</i>	NM_053343	<i>doublecortin-like kinase 1</i>	Función antiapoptótica. Se expresa en células progenitoras neuronales en proliferación [268,269].	mmu/rno-miR-98, mmu/rno-miR-292-5p, mmu/rno-let-7c, rno-let-7a, mmu/rno-miR-99b, mmu/rno-miR-21, mmu/rno-miR-320, mmu/rno-miR-324-5p, mmu/rno-miR-212	
	<i>Cxcl12</i>	NM_001033883	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)</i>	<u>Sobreexpresado en modelos animales de ictus</u> [270,271]. Rol neuroprotector en la regeneración de tejido dañado después de un ictus mediante la inducción de la migración de células progenitoras y la regulación de la neurogénesis [272,273,274,275].	mmu/rno-mir-138, mmu/rno-miR-30d, mmu-miR-129-3p/rno-miR-129*, mmu/rno-miR-99b, mmu/rno-miR-351, mmu/rno-miR-483, mmu/rno-miR-494, mmu/rno-miR-542-5p, rno-miR-327, mmu/rno-miR-21, mmu/rno-miR-542-3p, mmu/rno-miR-185	
Dianas validadas	<i>Vim</i>	NM_031140	<i>vimentin</i>	<u>Aumenta su expresión en astrocitos reactivos después de isquemia</u> . Rol dual después de un insulto isquémico, protector en estadios iniciales pero inhibe la regeneración en estadios tardíos [276,277,278,279].	rno-let-7a, rno-let-7i, rno-miR-338, rno-miR-320	
	<i>Rics / p250GAP</i>	XM_236020	<i>Rho GTPase-activating protein</i>	Proteína implicada en la morfogénesis de dendritas y la plasticidad funcional [280,281].	rno-miR-132	Disminuyen en la fase tardía de la isquemia

Tabla 5C.3. Continuación

	Símbolo Gen	mRNA NCBI Refseq	Nombre del Gen	Funciones cerebrales / <u>Isquemia cerebral</u>	miRNAs significativamente regulados por la isquemia y reguladores potenciales de las dianas	Expresión de los miRNAs
Dianas validadas	MeCP2	NM_022673	<i>methyl CpG binding protein 2</i>	Rol en el control de la respuesta neuronal a la muerte celular (protector), en plasticidad sináptica y en promover la diferenciación neuronal [282,283,284].	mo-miR-132	Disminuyen en la fase tardía de la isquemia

Los resultados recogidos en esta tabla se han obtenido del análisis mediante microRNA.org, miRecords y PubMed. En la columna funciones cerebrales/isquemia cerebral se indica la función descrita para cada gen, se subraya el perfil de expresión descrito tras modelos de isquemia y entre corchetes se refieren las citas bibliográficas. Las celdas se marcan alternativamente en gris y blanco según el patrón de expresión de los miRNAs que potencialmente regulan las dianas.

Tabla 5C.4 Clasificación de las cuarenta y siete dianas predichas recogidas en la Tabla 5C.3 según sus funciones (ver referencias en Tabla 5C.3). Veinticinco dianas han sido previamente relacionadas con isquemia o daño cerebral y veintidós tienen roles conocidos en procesos fisiopatológicos cerebrales pero no han sido asociadas a isquemia cerebral.

	Proceso	Genes
Dianas previamente relacionadas con isquemia cerebral, hipoxia o daño cerebral	neuroprotección, reparación cerebral y supervivencia neuronal	<i>Slc24a2, Btg2, Pxn, Hmox1, Opcml, Sdc1, Sdc4, Rgs4, Nr4a3, Cxcl12, Itgb1, Tagln, Pten</i>
	daño cerebral y muerte celular	<i>Madd, Mmp9, Bnip3l, Dpysl5, Myc, Nptxr</i>
	regulación de la excitabilidad neuronal y transducción de señal	<i>Syt4, Slc4a10, Vsnl1, Vapa</i>
	formación de la cicatriz glial relacionada con astrocitos reactivos	<i>Lox, Sdc1, Sdc4, Vim</i>
Dianas con roles significativos en procesos fisiopatológicos cerebrales y no relacionadas con isquemia cerebral	crecimiento, diferenciación, migración y supervivencia celular	<i>Tspan, Calm1, Tp53, Arl8b, Lrrc4, Neurod1, Arf3, Nde1, Unc5c, Dclk1, MecP2</i>
	neuroprotección, reparación cerebral, supervivencia neuronal y plasticidad sináptica	<i>Erap1, Acsl4, Neurod1, Tle3, Nde1, p250GAP, MecP2, Zdhhc23, Atrn, Dclk1, Tp53</i>
	daño cerebral (muerte neuronal, apoptosis e inhibición de la angiogénesis)	<i>Zdhhc23, Phyhip, Faah, Unc5c, Scn3b, Pdcd4, Atg12</i>

5C.1.4 Análisis de la expresión de las dianas de miRNAs seleccionadas, *Acsl4*, *Arf3*, *Btg2* y *Dpysl5*, después de la pMCAO

De las cuarenta y siete dianas seleccionadas elegimos aleatoriamente cuatro de ellas para analizar su expresión génica a nivel de mRNA y de proteína. Dos de los genes, *Btg2* (*BTG family, member 2*) y *Dpysl5* (*Dihydropyrimidinase-like 5*), habían sido previamente relacionados con isquemia cerebral mientras que los otros dos, *Acsl4* (*acyl-CoA synthetase long-chain family member 4*) y *Arf3* (*ADP-ribosylation factor 3*) podrían tener alguna función después de un insulto isquémico (Tabla 5C.3). *Acsl4* y *Btg2* son potenciales dianas de miRNAs que aumentan en la fase aguda y/o en la fase tardía de la isquemia cerebral (miR-487b, miR-347, miR-212 y miR-21; miR-21, miR-320, miR-324-5p y miR-212,

respectivamente). Arf3 posiblemente esté regulado por miRNAs que aumentan en la fase aguda y miRNAs que disminuyen en la fase tardía (miR-132, miR-542-3p, miR-185). Por último, Dpysl5 es diana potencial de miRNAs que aumentan en la fase aguda y de miRNAs que aumentan o disminuyen en la fase tardía (miR-132, miR-21, miR-542-3p, miR-185).

La expresión del transcrito de Acsl4 no varió en ninguno de los tiempos post-isquemia analizados (Figura 5C.2A), en cambio, la expresión proteica se detectó débilmente en las muestras control, aumentó considerablemente de las 6 a las 72 horas después de la pMCAO ($p < 0.01$ a 6, 24 y 72h) y volvió a niveles cercanos a los control a los 7 y 14 días (Figura 5C.2C).

Los niveles del mRNA de Arf3, aunque parecían disminuir ligeramente desde las 72 horas hasta los 14 días después de la pMCAO, no variaron significativamente en ninguno de los tiempos post-isquemia (Figura 5C.2B). La proteína Arf3, se detectó con niveles de expresión similares en muestras control y a los 7 y 14 días tras la pMCAO y su expresión fue prácticamente indetectable de las 6 a las 72 horas ($p < 0.01$ a 6, 24 y 72h; Figura 5C.2D).

La expresión de Btg2 a nivel de mRNA mostró un aumento seis veces superior al grupo control a los 30 minutos ($p < 0.001$) y cuatro veces superior a las 6 horas ($p < 0.01$) tras la pMCAO. A partir de las 24 horas el mRNA disminuyó pero se mantuvo sobre los niveles del grupo control hasta el día 14 (Figura 5C.2E). El análisis de Btg2 mediante *western blot* mostró dos bandas de aproximadamente 30 y 80kDa con distintos patrones de expresión. La banda de menor peso molecular se detectó débilmente en las muestras control, 6, 24 y 72 horas, y aumentó significativamente a los 7 y 14 días ($p < 0.01$ en ambos casos). En cambio, la banda de 80kDa aumentó en todos los tiempos post-isquemia analizados (desde las 6 horas hasta los 14 días) ($p < 0.05$ a las 6 horas, 24 horas y 7 días) (Figura 5C.2G).

Finalmente, la expresión del transcrito de Dpysl5 aumentó desde los 30 minutos hasta las 72 horas, alcanzando el pico de expresión a las 24 horas y volviendo a los niveles control a los 7 y 14 días después de la pMCAO ($p < 0.01$ a 6 y 24 horas, $p < 0.05$ a 72 horas) (Figura 5C.2F). A nivel proteico, Dpysl5 se detectó en todas las muestras analizadas aumentando su expresión desde las 6 horas tras la pMCAO, siendo mayor la expresión desde las 72 horas hasta los 14 días ($p < 0.05$ a 24h, 7 y 14d) (Figura 5C.2H).

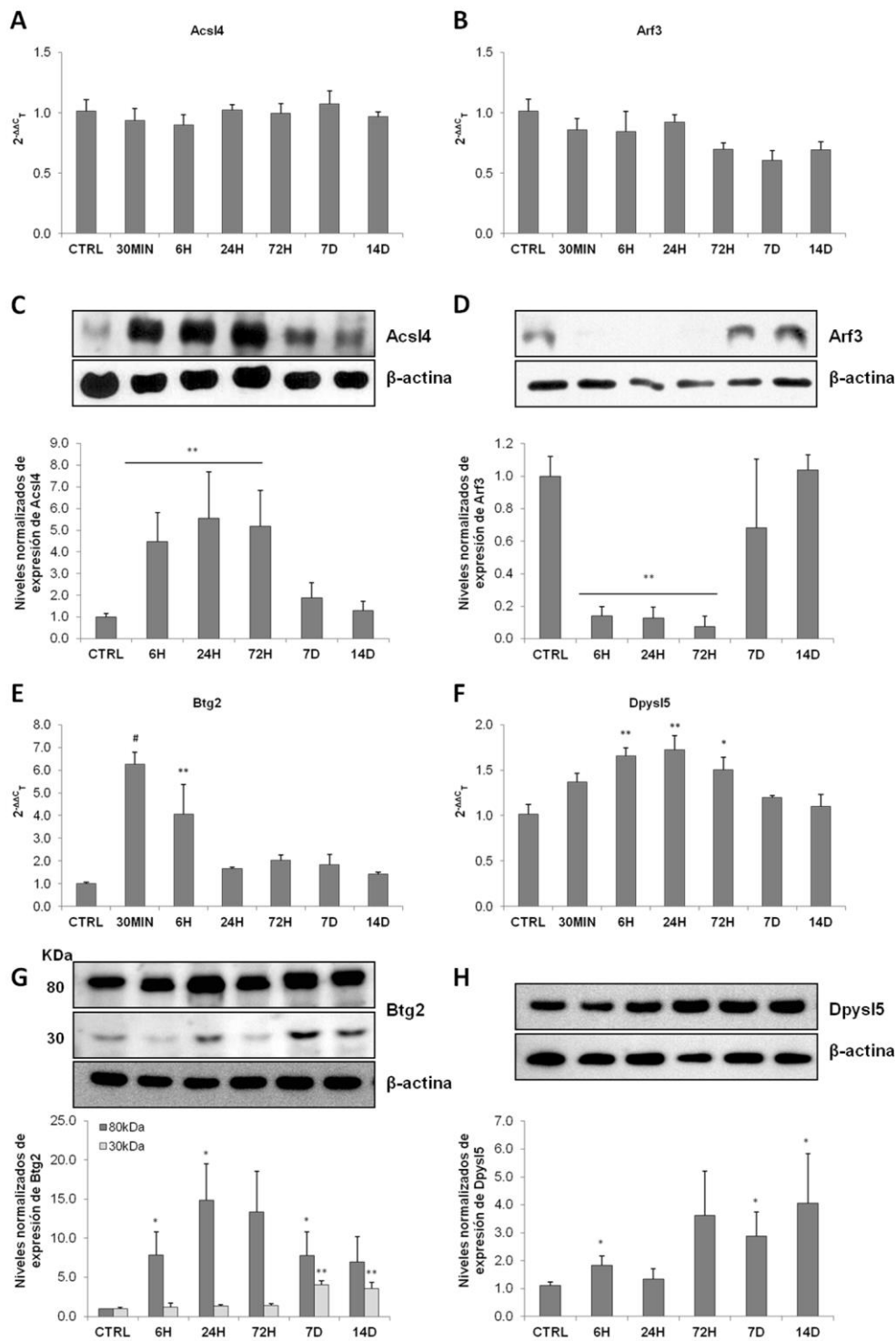


Figura 5C.2. La expresión de las dianas predichas *Acsl4*, *Arf3*, *Btg2* y *Dpysl5* está regulada de forma diferencial tras la isquemia focal en corteza cerebral de rata. (A, B, E, F) Perfiles de expresión del mRNA analizados mediante qPCR, el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ y los controles endógenos *Sdha* e *Ywhaz*. (C, D, G, H) Perfiles de expresión proteicos analizados mediante *western blot*. Los datos del análisis densimétrico de las bandas son la media \pm EEM; n=3. La β -actina se utilizó como control de carga. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ respecto al grupo control (CTRL).

5C.2 SELECCIÓN DEL miR-347: ANÁLISIS DE SU FUNCIÓN MEDIANTE TÉCNICAS DE SOBREENPRESIÓN *IN VITRO* Y MODELO DE APOPTOSIS NEURONAL

Entre los miRNAs diferencialmente expresados se seleccionó el miR-347 para el estudio de su función y de sus dianas. Este miRNA, detectado y validado en esta tesis doctoral como miRNA sobreexpresado después de la pMCAO, se ha identificado que copurifica con polirribosomas en neuronas corticales [186] y que está diferencialmente expresado en la arteria carótida de rata después de angioplastia [285]. Sin embargo, su posible función celular no había sido estudiada.

5C.2.1 Condiciones óptimas de transfección de mimetizadores de miRNAs en neuronas corticales de rata. Validación con el miR-1 y su diana *Pdcd4* como controles positivos

Con el objetivo de realizar el estudio de la función del miR-347 diferencialmente expresado en isquemia cerebral, se determinaron las condiciones óptimas de transfección de mimetizadores de miRNAs en neuronas corticales de rata (apartado 4.4.2). Se evaluó la toxicidad del reactivo de transfección y la eficiencia de transfección mediante un siRNA citotóxico en distintas densidades de siembra. La toxicidad del reactivo de transfección aumentaba cuanto mayor cantidad se utilizaba en las dos densidades de siembra testadas (Figura 5C.3A) y la mayor eficiencia de transfección (~28%) se obtuvo con 0.5µl de reactivo de transfección y 50.000 células/cm² (Figura 5C.3B). Estas condiciones de transfección se validaron al confirmar la disminución de la expresión de la proteína *Pdcd4* tras la sobreexpresión del miR-1 en neuronas corticales de rata (Figura 5C.3C). Este miRNA es específico de músculo y está descrito que regula la expresión de *Pdcd4* (*programmed cell death 4*) por lo que se utilizó como control positivo.

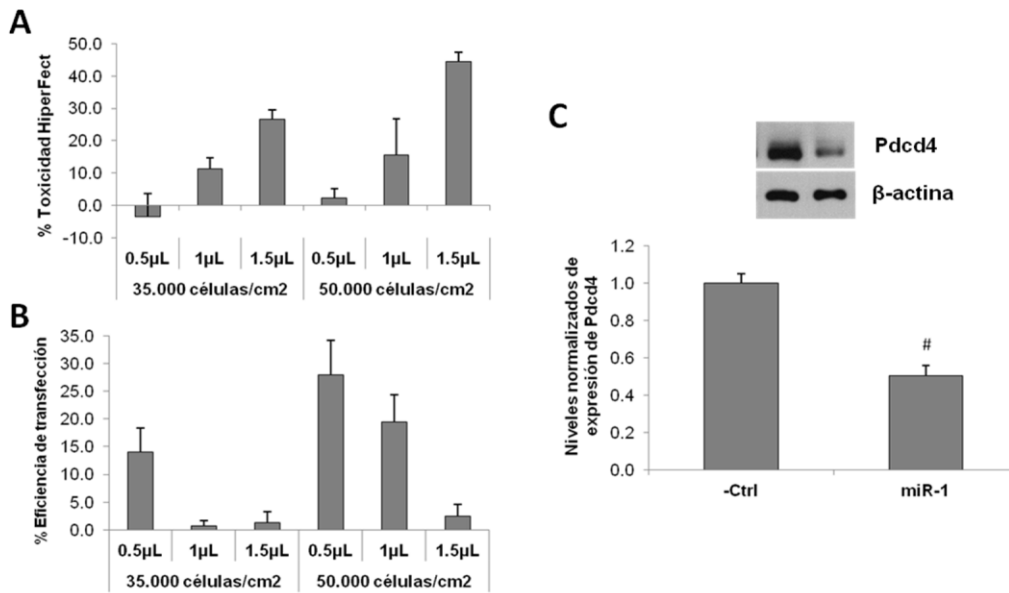


Figura 5C.3. Determinación de las condiciones óptimas de transfección de mimetizadores de miRNAs en cultivo primario de neuronas corticales de rata mediante MTT (A y B) y *western blot* (C). (A) Toxicidad del reactivo de transfección (grupo *Mock*: mezcla que sólo contiene reactivo de transfección y permite seleccionar la cantidad óptima a utilizar) y (B) eficiencia de transfección (grupo AllStarts CD Ctrl – grupo *Mock*; AllStarts CD Ctrl es un siRNA citotóxico que permite determinar la eficiencia de transfección a partir del análisis de la viabilidad celular) en dos densidades celulares distintas. (C) Análisis mediante *western blot* de la expresión de Pdc4 en cultivo de neuronas corticales tras la sobreexpresión del miR-1.

p<0.001 respecto al control negativo (-Ctrl).

5C.2.2 Efecto de la sobreexpresión del miR-347 sobre la viabilidad celular y la expresión de sus dianas potenciales, *Acs14*, *Bnip3l* y *Phyhip*, en neuronas corticales

Con el fin de identificar la función biológica del miR-347, simulamos artificialmente su sobreexpresión en neuronas corticales de rata mediante mimetizadores de miRNAs así como la sobreexpresión del miR-21 como control negativo adicional. El miR-21 es también un miRNA sobreexpresado después de isquemia que protege las neuronas de la muerte isquémica [164]. Entre sesenta y sesenta y cinco horas después de la transfección se evaluaron fenotípicamente los cultivos y se analizó la citotoxicidad celular y la muerte apoptótica. Las neuronas corticales transfectadas con el mimetizador del miR-347 mostraron alteraciones morfológicas respecto al control negativo (-Ctrl) y a las neuronas transfectadas con el miR-21 (Figura 5C.4A). En concreto, los cultivos transfectados con el miR-347

mostraron desprendimiento de neuronas de la placa, presencia de restos celulares en el medio de cultivo y características morfológicas apoptóticas de las neuronas adheridas a la placa, como es la aglutinación de la cromatina, contracción del citoplasma y fragmentación y retracción de neuritas. La sobreexpresión del miR-347 en el grupo transfectado con el mimetizador se confirmó mediante qPCR ($p < 0.05$; Figura 5C.4B). Para la normalización de los resultados de expresión se evaluaron tres miRNAs endógenos candidatos (4.5SRNA, Y1 y U6snRNA) determinando como miRNAs de referencia adecuados 4.5SRNA e Y1 (Figura 5C.5A-C). Cuando evaluamos la liberación de LDH como parámetro de necrosis no detectamos diferencias entre grupos (Figura 5C.5C) mientras que el número de neuronas apoptóticas aumentó al sobreexpresar el miR-347 ($p < 0.05$; Figura 5C.5D). Dado que los miRNAs miR-347 y miR-21 tienen como posible diana *Acsl4*, y *Bnip3l* y *Phyhip* son también dianas putativas del miR-347 (Tabla 5C.3), se analizaron éstas mediante *western blot* y qPCR. Los resultados mostraron que la expresión proteica de *Acsl4*, *Bnip3l* y *Phyhip* aumenta cuando el miR-347 estaba sobreexpresado ($p < 0.001$), mientras que los niveles de los mRNA no variaron (Figura 5C.4E-G). Para la normalización de los resultados de expresión se evaluaron cuatro genes endógenos candidatos *Sdha*, *Ywhaz*, *Hprt* y *Rpl13a*. Los cuatro mostraron una expresión invariable y *Sdha* e *Ywhaz* fueron la mejor combinación identificada por NormFinder para la normalización de los datos (valor de estabilidad 0.036) (Figura 5C.6A-D).

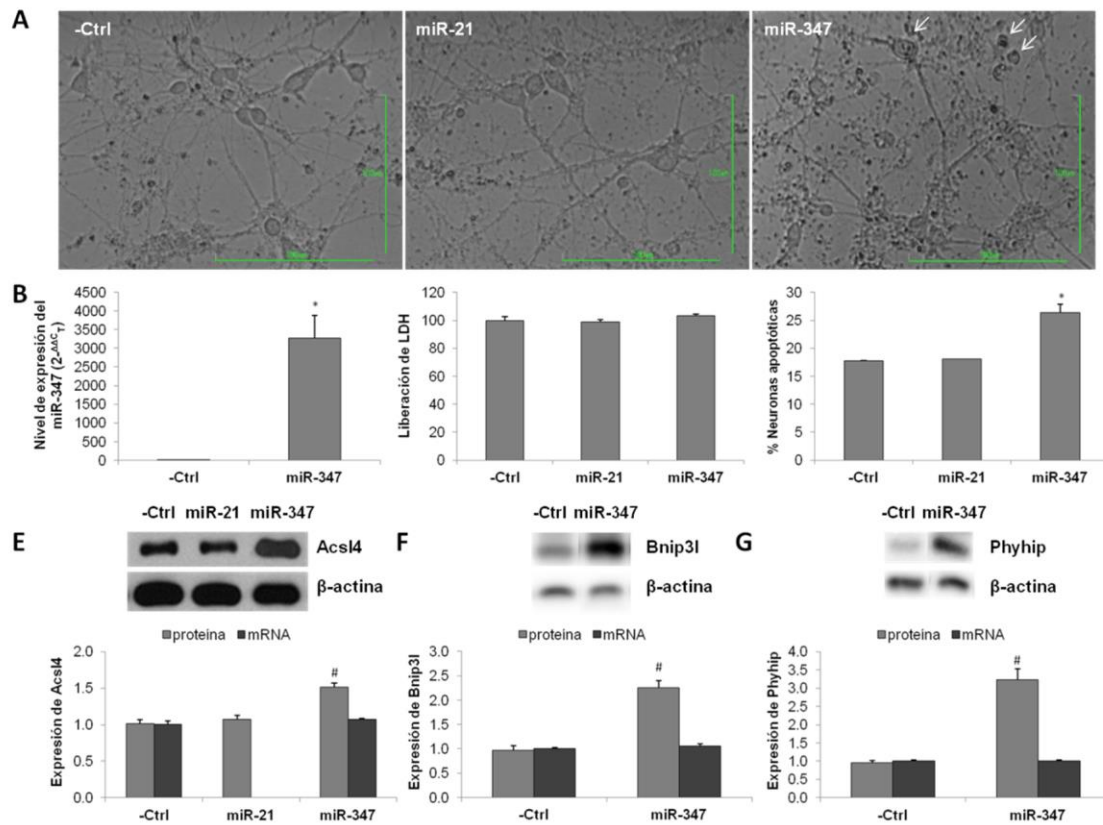


Figura 5C.4. El aumento de expresión del miR-347 induce el aumento de la expresión de *Acs4*, *Bnip3l* y *Phyhip*, así como de apoptosis neuronal. (A) Imagen de contraste de fase mostrando la morfología de las neuronas corticales en cada uno de los grupos al final del experimento de transfección de mimetizadores de miRNAs. Las flechas blancas indican células apoptóticas. Barras de escala (verde) = 100 μ m. (B) Expresión del miR-347 después de transfección con control negativo (-Ctrl) y mimetizador del miR-347, analizado mediante qPCR, el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ y los miRNAs de referencia Y1 y 4.5SRNA. (C, D) Efecto de la sobreexpresión de los miRNAs miR-21 y miR-347 en la liberación de LDH (C) y en la muerte por apoptosis (D) en neuronas corticales de rata. (E) Análisis mediante *western blot* y qPCR de la expresión de *Acs4* en cultivo de neuronas corticales tras la sobreexpresión del miR-21 y miR-347. (F, G) Análisis mediante *western blot* y qPCR de la expresión de *Bnip3l* (F) y *Phyhip* (G) en cultivo de neuronas corticales tras la sobreexpresión del miR-347. Cambios en la expresión analizados mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ y los genes de referencia *Sdha* e *Ywhaz*.

* $p < 0.05$, # $p < 0.001$ respecto al control negativo (-Ctrl).

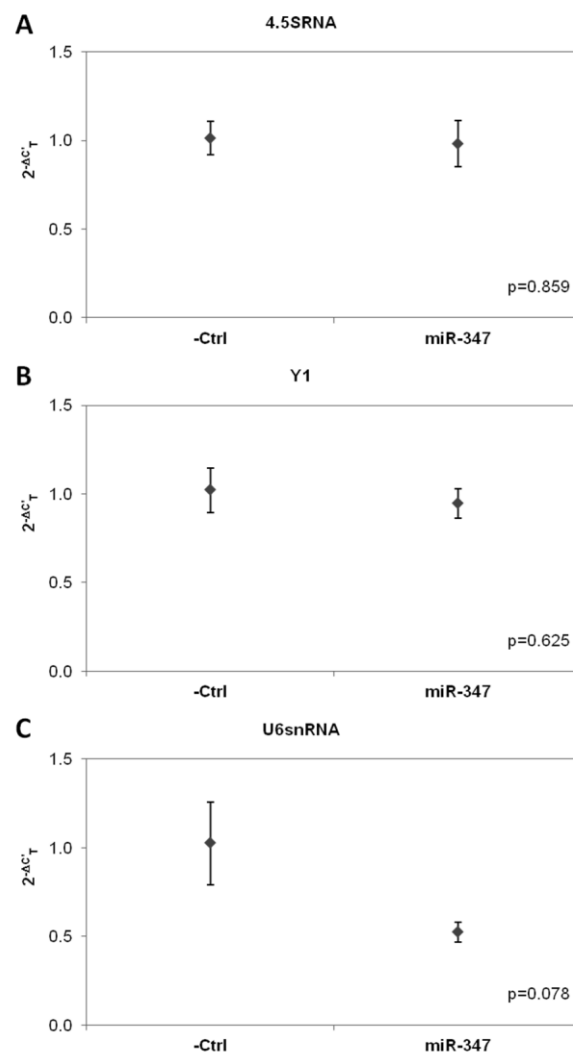


Figura 5C.5. 4.5SRNA y Y1 son miRNAs de referencia adecuados para la cuantificación relativa de miRNAs en neuronas corticales transfectadas con mimetizadores de miRNAs. Cambio en la expresión de 4.5SRNA (A), Y1 (B) y U6snRNA (C) analizado mediante el método $2^{-\Delta C_T}$. Los datos representan la media \pm EEM; n=3.

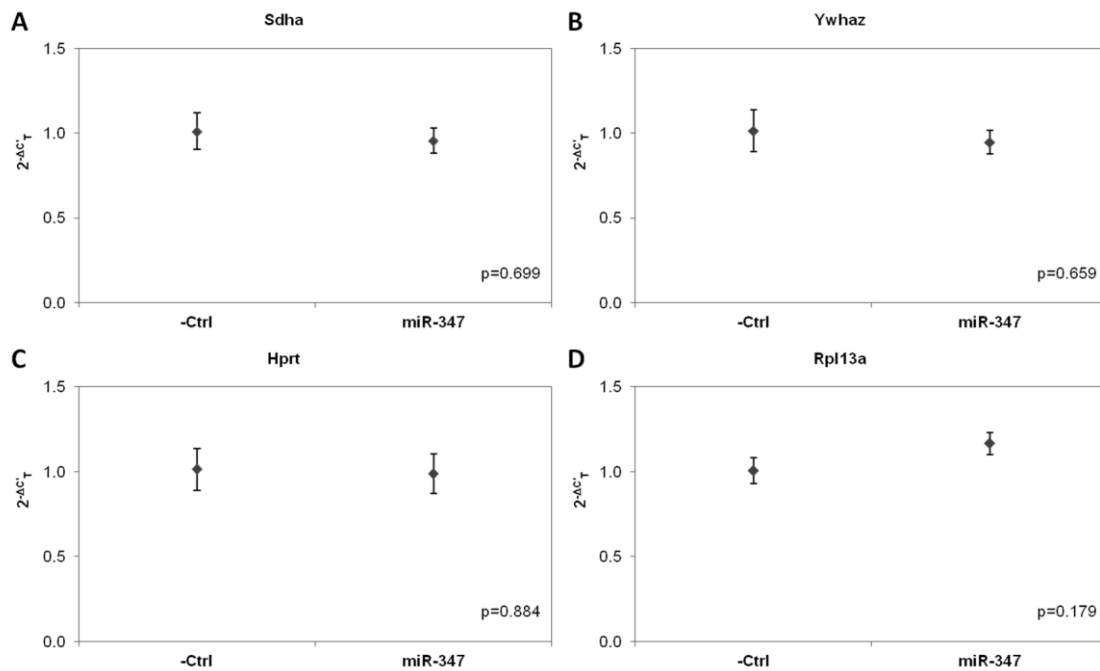


Figura 5C.6. *Sdha* e *Ywhaz* son los genes de referencia adecuados para la cuantificación relativa de la expresión génica en neuronas corticales transfectadas con mimetizadores de miRNAs. Cambio en la expresión de *Sdha* (A), *Ywhaz* (B), *Hprt* (C) y *Rpl13a* (D) analizado mediante el método $2^{-\Delta C_T}$. Los datos representados son la media \pm EEM; n=3.

5C.2.3 Efecto de un modelo *in vitro* de apoptosis sobre la expresión de *Acs14* y *Bnip3l* en neuronas corticales

Para determinar si la apoptosis inducida por la sobreexpresión del miR-347 es la responsable del aumento detectado en la expresión de *Acs14*, *Bnip3l* y *Phyhip* se sometieron neuronas corticales a privación de suero, un insulto apoptótico típico en las neuronas (apartado 4.3.2). Se confirmó la inducción de la apoptosis 48 horas después de la privación de suero mediante cambios morfológicos característicos. Los resultados de *western blot* mostraron que la expresión de *Acs14* y *Bnip3l* disminuye después de la privación de suero ($p < 0.001$; Figura 5C.7A, B) mientras que la expresión de *Phyhip* no varía (Figura 5C.7C). Los resultados de qPCR mostraron que los mRNA de *Acs14* y *Bnip3l* disminuyeron y aumentaron, respectivamente, y el mRNA de *Phyhip* no varió tras la privación de suero (Figura 5C.7A-C). Para la normalización de los resultados de expresión mediante qPCR se evaluaron cuatro genes endógenos candidatos (*Sdha*, *Ywhaz*, *Rpl13a* y *Hprt*), siendo *Sdha* e *Ywhaz* los usados como genes de referencia (Figura 5C.8A-D).

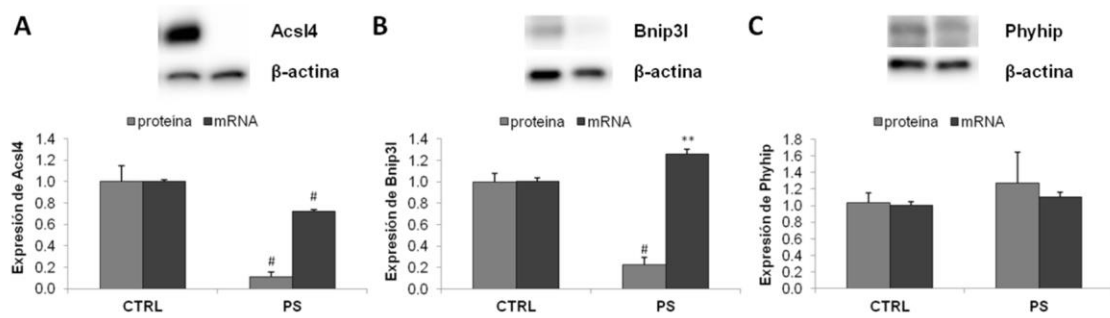


Figura 5C.7. La privación de suero (PS) induce la disminución de la expresión de *Acs4* y *Bnip3l*. Análisis mediante *western blot* y qPCR de la expresión de *Acs4* (A), *Bnip3l* (B) y *Phyhip* (C) después de privación de suero durante 48 horas. Cambio en la expresión del mRNA analizado mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ y los genes de referencia *Sdha* e *Ywhaz*.

** $p < 0.01$, # $p < 0.001$ respecto al control.

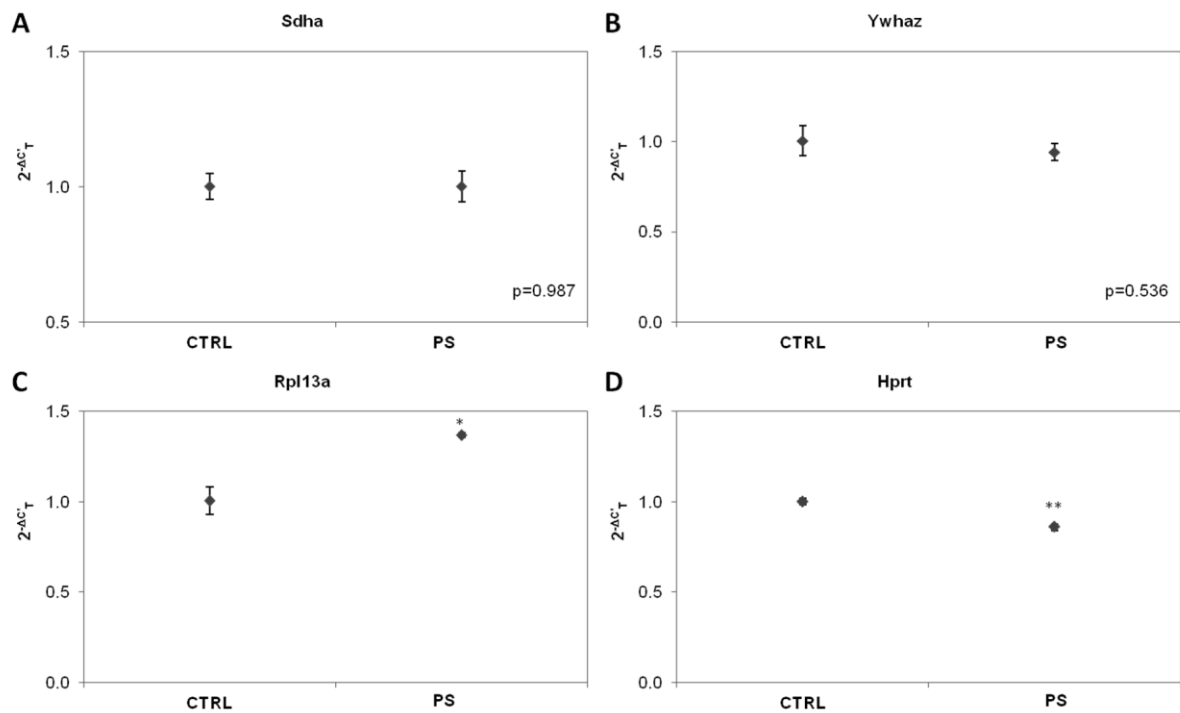


Figura 5C.8. *Sdha* e *Ywhaz* son genes de referencia idóneos para la cuantificación relativa de la expresión génica en neuronas corticales privadas de suero (PS). Cambio en la expresión de *Sdha* (A), *Ywhaz* (B), *Rpl13a* (C) y *Hprt* (D) analizado mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Los datos representan la media \pm EEM; $n = 3$.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ respecto al control (CTRL).

6.DISCUSIÓN

La elucidación de los mecanismos moleculares implicados en la isquemia cerebral conlleva el estudio de las vías moleculares activadas tras el insulto isquémico, la caracterización funcional de éstas y el estudio de los mecanismos de regulación a los cuales están sujetos. Los estudios de expresión génica, en los que son imprescindibles controles endógenos apropiados para obtener conclusiones fiables, aportan nuevos conocimientos acerca de los mecanismos fisiopatológicos de la isquemia cerebral a través de la identificación de los genes diferencialmente expresados ante el potente estímulo génico que supone la isquemia cerebral, pero a su vez, también es importante conocer los mecanismos que regulan esta expresión y que han sido poco estudiados. En este sentido, el descubrimiento de los miRNAs y de su función como reguladores endógenos de la expresión génica es crucial para la comprensión de los perfiles de expresión génica y para aportar nuevos conocimientos en cuanto a la regulación de esta expresión y a las vías de señalización implicadas en la isquemia cerebral a través del estudio de los propios miRNAs y de sus genes diana.

En la presente tesis doctoral se han definido, previamente a los estudios de expresión génica, los controles endógenos óptimos para la normalización de los resultados de cuantificación relativa mediante qPCR en las distintas condiciones experimentales utilizadas en este trabajo. Se ha caracterizado y ampliado el conocimiento acerca de la expresión y función en cerebro de Gcf2/Lrrfip1, proteína que nuestro grupo describió que se sobreexpresa después de la isquemia cerebral pero de la que se disponía de poca información. Y finalmente, se ha identificado el perfil de expresión de miRNAs después de la isquemia cerebral desde la fase aguda hasta la fase tardía de la respuesta isquémica, lo que nos ha llevado a la identificación de nuevos miRNAs y proteínas regulados por la isquemia posiblemente implicados en el daño o la recuperación cerebral después de un ictus.

6.1 VALIDACIÓN DE CONTROLES ENDÓGENOS EN LOS ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA

La selección de los controles endógenos es crucial para la normalización de los resultados de cuantificación relativa de la expresión génica. Esta selección es aún más importante en aquellas situaciones en las que la expresión génica está severamente afectada, como ocurre después de la isquemia cerebral [45,46], y debe validarse en cada condición experimental analizada.

Los algoritmos geNorm [170] y NormFinder [171] son ampliamente utilizados para determinar los genes de referencia más estables de un conjunto de genes candidatos con

una expresión invariable [138,286,287,288,289]. En la presente tesis doctoral sólo se han utilizado estos algoritmos para identificar los genes control (para el análisis de mRNA y miRNA) en los casos en que se han detectado más de dos genes candidatos con expresión estable, ya que ambos *softwares* necesitan un mínimo de tres genes para el análisis.

Mientras que para el modelo de isquemia experimental *in vivo* trabajos previos han definido controles endógenos válidos [128,133,134,135,159], hasta el momento no se han descrito controles endógenos para los estudios de expresión en las distintas condiciones experimentales *in vitro* realizadas en este trabajo (POG, transfección de siRNAs, transfección de miRNAs y modelo de apoptosis por privación de suero).

En el modelo de isquemia *in vivo*, hemos validado el miRNA U6snRNA como el más estable [159] y hemos definido que la mejor combinación de miRNAs para la normalización de resultados, ya que se aconseja usar un mínimo de dos genes control [123], son snoRNA e Y1, miRNAs, no evaluados previamente como controles endógenos para este modelo experimental. Respecto a los genes de referencia para los estudios de expresión de mRNA, los trabajos previos (Tabla 5A.2) sólo evaluaron de dos a cuatro genes control candidatos encontrando que presentan una expresión invariable los genes *Rpl13a*, *Hprt*, *Ppia* y *Gapdh*. En el caso de *Gapdh* los resultados publicados son contradictorios dado que tres estudios validan este gen [128,133,134] mientras que otro lo rechaza como control endógeno [135]. Nuestros resultados muestran que *Gadph*, *Rpl13a* y *Ppia* junto con otros genes candidatos, *β 2m*, *Gusb*, *18SrRNA* y *Oaz1*, no son controles endógenos apropiados para este modelo. En cambio, del mismo modo que describe Meldgaard *et al.* para el modelo pMCAO en ratón [128], en nuestras muestras *Hprt* es un control endógeno válido para el modelo de isquemia *in vivo* y además hemos identificado dos nuevos controles endógenos para este modelo que no habían sido previamente analizados, *Sdha* e *Ywhaz*. De acuerdo con los resultados obtenidos con los algoritmos NormFinder y geNorm estos dos genes son los más estables y la mejor combinación para la normalización de los resultados.

La discrepancia entre los resultados de diferentes estudios puede ser debida a varios factores que influyen en la variabilidad de la expresión de los genes control. De la misma manera que la expresión de genes control puede variar dependiendo de si en el modelo experimental se realiza isquemia permanente (pMCAO) o transitoria (tMCAO) [290], distintas metodologías empleadas para realizar la MCAO, electrocauterización o filamento intraluminal, pueden tener una influencia en la expresión génica. Asimismo, otros factores que deben tenerse en consideración son la recogida de muestra y la muestra control utilizada. Tres regiones cerebrales distintas se recolectaron en los estudios previos: toda la corteza infartada [133,134], todo el hemisferio infartado [128] y la penumbra isquémica

cortical [135]. En nuestro caso recogimos el área cortical infartada y peri-infartada para analizar los cambios en la expresión génica de la región afectada. En cuanto a la muestra control también existen distintas posibilidades: muestras de cerebro de ratas *sham* o *naive* (con cirugía simulada) o hemisferio contralateral sano. Consideramos las ratas *sham* como los mejores controles ya que este control minimiza el sesgo debido a la cirugía. El uso del hemisferio contralateral sano puede llevar a conclusiones erróneas ya que distintos estudios han descrito cambios estructurales así como cambios en la expresión génica en el hemisferio contralateral después de la isquemia [291,292,293]. Por último, el curso temporal estudiado es también un factor relevante. En nuestro caso hemos validado *Sdha* e *Ywhaz* como controles endógenos adecuados para el modelo pMCAO analizando la situación control y a distintos intervalos de tiempo después de la isquemia hasta los 14 días, lo que varía en relación con los tiempos analizados en estudios anteriores [128,133,134,135]. Finalmente, comprobamos el valor de la validación de los controles endógenos utilizando distintos de los genes control evaluados para normalizar la expresión de dos genes implicados en la isquemia cerebral, *Cox-2* y *Bcl2*. *Cox-2* es un mediador inflamatorio que aumenta significativamente su expresión en respuesta a la isquemia [294,295]. *Bcl2* es un protooncogén que codifica una proteína antiapoptótica para la que se ha descrito que participa en mecanismos neuroprotectores en el ictus isquémico, aunque los cambios en su expresión se limitan a un aumento en las neuronas dentro de la región peri-infarto [33,296,297]. En los dos casos se observaron diferencias en los resultados al usar genes control validados o no validados para nuestro modelo. Estas diferencias fueron más críticas cuando los cambios en la expresión del gen analizado eran pequeños, como fue el caso de *Bcl2*, el cual tuvo un patrón de expresión distinto según el control endógeno utilizado.

Para definir los controles endógenos óptimos para el modelo de isquemia *in vitro* se evaluaron los mismos genes candidatos que en el modelo *in vivo* y se identificaron *Rpl13a* y *Sdha* como los genes de referencia para el modelo de POG en astrocitos corticales en el curso temporal analizado. Para la normalización de los resultados de expresión en los experimentos *in vitro* de transfección y de privación de suero se evaluó la estabilidad de los controles endógenos validados en los dos modelos de isquemia (*Hprt*, *Ywhaz*, *Sdha* y *Rpl13a*) y los miRNAs Y1, snoRNA y 4.5SRNA. Los resultados obtenidos reflejan la importancia de la validación de los controles endógenos en cada condición experimental. *Hprt* e *Ywhaz* son los mejores controles para los experimentos de transfección con siRNAs en astrocitos corticales, *Sdha* e *Ywhaz* son los óptimos para la cuantificación del mRNA tanto en los experimentos de transfección de miRNAs como para los de privación de suero en neuronas corticales y, por último, los miRNAs 4.5SRNA e Y1 son los de referencia en los

experimentos de transfección de miRNAs en neuronas corticales para el análisis de expresión de miRNAs.

Considerando todas las variables que pueden influir en la expresión génica y en base a los resultados obtenidos la confirmación y validación de los genes de referencia candidatos es crucial en cada condición experimental individual incluso cuando hayan sido previamente publicados.

6.2 GCF2/LRRFIP1 EN CEREBRO Y EN ISQUEMIA CEREBRAL

Partiendo de la hipótesis de una susceptibilidad individual al daño excitotóxico debido a una alteración de la recaptación de glutamato, nuestro grupo identificó a *Gcf2/Lrrfip1* como el responsable de la represión del promotor polimórfico del transportador de glutamato EAAT2 y mostró la sobreexpresión de esta proteína en cerebro de rata isquémico [93]. *Gcf2/Lrrfip1* pertenece a una pequeña familia de proteínas cuya función y regulación ha sido poco estudiada. Nuestro trabajo previo es el segundo que ha estudiado esta proteína en rata y el único que ha analizado su expresión en cerebro y en el contexto de la isquemia cerebral. En función de la poca información disponible de este gen, principalmente estudiado en humano y ratón, consideramos que era interesante su estudio como posible modulador tanto de vías de daño como de recuperación cerebral tras un ictus isquémico.

Ante la falta de información disponible de *Lrrfip1* en cerebro el primer paso fue la identificación y caracterización de los transcritos de *Lrrfip1* en cerebro de rata. En esta tesis hemos determinado que al menos cinco de los transcritos putativos recogidos por Ensembl y NCBI de *Lrrfip1* se expresan en corteza cerebral: rLrrfip1 (NM_001014269), CRA_i, CRA_g, CRA_h' y rFlap-1 (CRA_a'). El elevado grado de homología entre las nuevas variantes identificadas (denominadas CRA según nomenclatura NCBI) pero no con la proteína de referencia rLrrfip1 y la distinta distribución espacial de los transcritos en cerebro podrían sugerir que isoformas diferentes pudieran ejercer distintas funciones. Hemos determinado que algunas isoformas de *Lrrfip1* están conservadas entre distintas especies. Por lo tanto, respecto a las posibles funciones de estas isoformas de acuerdo a la información disponible sobre sus ortólogos, rLrrfip1 y rFlap-1 (CRA_a') podrían regular positivamente la vía dependiente de β -catenina [104,116] para la que se ha descrito que ejerce un rol protector tanto en la adhesión celular como en el desarrollo neuronal [298,299]. Por otro lado, rFlap-1 regularía la señalización asociada a la vía TLR en cerebro [107,115], vía que puede tener tanto efectos nocivos como beneficiosos en el SNC, contribuyendo a la neuroinflamación y al daño celular, tal como ocurre después de la lesión cerebral isquémica [119,300], o bien

modulando múltiples procesos dinámicos implicados en la reparación celular, tales como la neurogénesis, el crecimiento axonal y la plasticidad estructural [301,302]. Según nuestro conocimiento, ni la isoforma 3 de ratón ni las isoformas 1 y 2 humanas han sido aún estudiadas, por lo que los posibles roles de CRA_g y CRA_h' en el cerebro son desconocidos. Sin embargo, como todas las isoformas de rata identificadas pueden unirse a las proteínas Fli-1 y Dvl, es posible que todas ellas, individualmente o en cooperación, actúen como enlace entre moléculas implicadas en transducción de señal y el citoesqueleto de actina, regulando la función del citoesqueleto y la migración, proliferación, adhesión y morfología celular [303,304,305]. Finalmente, ninguna de las isoformas contiene el dominio de unión a DNA y por lo tanto probablemente no actúen como FTs como se ha descrito para la isoforma 5 humana [93,100,101,106,110]. Esto concuerda con el hecho que ninguna de las isoformas identificadas en cerebro de rata presenta similitud con las isoformas 3, 4 y 5 humanas estudiadas.

Una vez identificados y caracterizados los transcritos expresados en corteza cerebral se procedió al análisis de sus perfiles de expresión y localización subcelular en isquemia cerebral de aquellas variantes para las que se disponía de ensayos de expresión y anticuerpos específicos. Respecto al análisis de la expresión génica de los transcritos rLrrfip1, CRA_g y rFlap-1, los valores C_T obtenidos permitieron concluir que rLrrfip1 es el transcrito predominante en la corteza cerebral, lo que concuerda con la distribución de los transcritos en el *Allen Mouse Brain Atlas* que mostró un bajo nivel de expresión de estos transcritos a nivel basal y una distribución espacial diferencial. Específicamente, el análisis de rLrrfip1 mostró una elevada expresión a largo plazo tanto a nivel de mRNA como de proteína desde la fase aguda hasta la fase tardía de la isquemia, así como un aumento de su expresión en neuronas y astrocitos corticales del área peri-infarto. Por lo tanto, estos resultados confirman el aumento significativo previamente descrito de la proteína rLrrfip1 a las 2 y 24 horas después de la pMCAO [93], concuerdan con resultados recientes que muestran un aumento de la expresión de Lrrfip1 después de privación de suero [97], y sugieren que rLrrfip1 está expresado en todos los tipos celulares del cerebro, ya que se la considera una proteína ubicua [96,98]. En cambio, no hemos confirmado la ausencia de expresión basal de rLrrfip1 [93]. Esta diferencia en los resultados puede ser debida al hecho que se cargó mayor cantidad de proteína para el análisis mediante *western blot* en los experimentos de esta tesis doctoral que en el trabajo publicado previamente. Si bien también existe la diferencia que se ha usado un anticuerpo específico contra rLrrfip1 de rata mientras que en el trabajo publicado el anticuerpo utilizado se generó a partir de un epítipo de LRRFIP1 humano, los resultados obtenidos están en concordancia con los de Kachigian

et al. quién describe la expresión basal de Gcf2/Lrrfip1 en la pared arterial de rata y un aumento significativo de su expresión en la capa media arterial inducida por daño [110] utilizando el mismo anticuerpo contra LRRFIP1 humano que nosotros previamente. Finalmente, la proteína rLrrfip1 se detectó aumentada a los 30 minutos después de la MCAO mientras que su mRNA permanecía aún sin cambios. Esta discordancia puede explicarse por la contribución de regulación post-transcripcional y post-traducciona además del hecho que en mamíferos los mRNA se sintetizan a una tasa mucho más baja que las proteínas, lo cual puede ser más evidente en tiempos cortos analizados como es nuestro caso [306].

Hasta el momento se desconocen los mecanismos que regulan la expresión de *Lrrfip1* y su rol cerebral. La isquemia cerebral es un potente estimulador de la expresión de GET, que incluyen los FTs c-Fos y c-Jun [50], y también promueve la activación de NF- κ B [307]. Nuestros resultados refuerzan la hipótesis de Khachigian *et al.* según el cual el gen *Lrrfip1* podría estar bajo el control transcripcional de factores como c-Fos, c-Jun, c-Myc, c-Ets-1, NF- κ B y Egr-1 [110], ya que se ha detectado un aumento significativo de sus transcritos analizados durante la fase aguda de la isquemia desde tiempos tempranos. En cuanto al rol cerebral de *Lrrfip1*, dado que nuestros datos previos apuntan a los astrocitos como dianas principales de las acciones de *Lrrfip1* [93] utilizamos este tipo celular para llevar a cabo los estudios funcionales. Asimismo, la antigua aproximación neurocéntrica en el desarrollo de terapias neuroprotectoras ha cambiado y actualmente se considera a los astrocitos células diana para el tratamiento del ictus, ya que su supervivencia y función son absolutamente necesarias para la supervivencia neuronal y la recuperación funcional tras un ictus [76]. Previamente a la realización de los estudios funcionales, confirmamos que como en las muestras corticales, la expresión de los transcritos rLrrfip1, rFlap-1 y CRA_g aumentaba en astrocitos sometidos a POG siguiendo distintos patrones de expresión. Concretamente, la isoforma rLrrfip1 aumentó su expresión después de la POG y se localizó en el citoplasma de los astrocitos tanto en condición control como post-POG. Aunque esta isoforma conserva la señal de localización nuclear (NLS) parece que ejercería su función en el citoplasma, como confirmamos vía experimentos de transfección de siRNAs. El presente estudio muestra que rLrrfip1 induce la activación de β -catenina en astrocitos promoviendo su fosforilación en Ser552, tal y como se ha descrito para la isoforma 1 de ratón en macrófagos murinos [104]. Además, rLrrfip1 también está implicado en la fosforilación de Akt (Ser473) y mTOR (Ser2448) y en la regulación de la expresión de GLT-1, tanto a nivel transcripcional como traducciona. Estos resultados confirman que la isoforma rLrrfip1 detectada en corteza cerebral de rata y astrocitos es la ortóloga de la isoforma 1 de ratón y muestran por primera vez que Akt es una diana de rLrrfip1, regulada directa o indirectamente por éste, como se ha

sugerido previamente [118]. A su vez, β -catenina y mTOR son dianas reguladas por Akt [117,308] pero no podemos descartar que rLrrfip1 también regule su expresión independientemente de Akt. Estos resultados apoyan firmemente la idea que rLrrfip1 en la corteza cerebral regula vías de señalización intracelulares implicadas en crecimiento, proliferación, metabolismo y supervivencia celular [298,309,310], lo que concuerda con el papel atribuido a LRRFIP1 en la promoción de la invasión celular y la metástasis en cáncer [97,102,113]. Además, la función neuroprotectora atribuida a las formas activadas de β -catenina [120], Akt [212,311,312] y mTOR [311,313] sugiere un rol protector de rLrrfip1 en la isquemia cerebral a través de la activación de estas vías de señalización y la regulación indirecta de proteínas implicadas en la respuesta inflamatoria y apoptótica, tales como caspasa-12, NF-kappa B, Grp78 [314,315,316] o ANXA1 [317,318]. En cuanto a la expresión de GLT-1, confirmamos mediante los estudios de silenciación y de recaptación de glutamato que rLrrfip1 regula positivamente su expresión en astrocitos de manera fisiológica. Dado que rLrrfip1 tiene una localización citoplasmática probablemente regule la expresión de GLT-1 y los niveles extracelulares de glutamato a través de la activación de la señalización PI3K/Akt/mTOR como se ha descrito previamente [89]. Niveles excesivos de glutamato extracelular en el sistema nervioso son excitotóxicos y llevan a la muerte neuronal [319,320]. El transporte de glutamato, principalmente mediante el transportador de glutamato GLT-1, es el único mecanismo para mantener las concentraciones de glutamato por debajo de los niveles excitotóxicos [86,321,322,323,324]. Por lo tanto, rLrrfip1 se nos presenta como un regulador de este transportador clave para evitar la neurotoxicidad en numerosos procesos neurológicos [325,326,327], no sólo en el ictus. Así pues, nuestros resultados confirman nuestra hipótesis de que cada una de las isoformas de *Lrrfip1* puede tener funciones diferentes o incluso opuestas en cerebro. Previamente describimos la función como represor transcripcional de la isoforma humana GCF2 sobre la expresión de GLT-1/EAAT2 [93] mientras que la isoforma rLrrfip1 estudiada en rata regula positivamente, probablemente a través de la señalización PI3K/Akt/mTOR, la expresión y funcionalidad de GLT-1 en astrocitos.

Finalmente, nuestros resultados muestran la importancia, descrita asimismo por otros autores [291,328], de identificar y analizar individualmente cada uno de los transcritos de un gen antes de realizar estudios de validación de dianas para evitar interpretaciones erróneas debido a un análisis global.

6.3 miRNAs Y SUS mRNAs DIANA EN ISQUEMIA CEREBRAL

Con el descubrimiento de los miRNAs se identificaron importantes reguladores de la expresión génica con un papel fundamental en múltiples procesos biológicos y patológicos [147]. Al iniciar esta tesis doctoral no había trabajos publicados sobre la expresión y función de los miRNAs en isquemia cerebral, pero durante la realización de este trabajo se publicaron algunos estudios en modelos de isquemia experimental que han demostrado la expresión diferencial de estos pequeños RNAs en cerebro isquémico durante la fase aguda [157,158,159]. Sin embargo, nuestro objetivo era evaluar el perfil de expresión en todas las fases de la respuesta isquémica cerebral para identificar miRNAs y dianas potencialmente implicados en los mecanismos de daño y de reparación activados después de un ictus.

Nuestros resultados confirman que los miRNAs están activamente regulados y responden rápidamente a la isquemia, incluso antes de las 3 horas descritas previamente [157], y además muestran por primera vez que los cambios en la expresión de los miRNAs evolucionan durante la respuesta cerebral a la isquemia y persisten, al menos, hasta los 14 días (último tiempo analizado), dando soporte a la idea que los miRNAs puede ser moduladores importantes de mecanismos de daño y reparación cerebral. En este sentido es de particular importancia indicar que algunos de los miRNAs identificados en este trabajo con cambios en su expresión participan en 1) procesos de daño cerebral, neuroprotección y reparación cerebral después de un ictus, incluyendo plasticidad sináptica (mmu/rno-miR-132) [280], 2) respuesta apoptótica al daño por isquemia/reperfusión (mmu/rno-miR-494) [329] y 3) protección neuronal a la muerte isquémica (mmu/rno-miR-21) [164]. La expresión diferencial detectada de los miRNAs mmu/rno-miR-138, mmu/rno-let-7c, rno-let-7a, mmu/rno-let-7i, mmu/rno-miR-23b, mmu/rno-let-7e, mmu/rno-miR-320 and mmu/rno-miR-21 confirmó que se trata de miRNAs regulados por hipoxia (HRMs, *hypoxia-regulated miRNAs*) que están sobreexpresados en cánceres humanos [330]. Del mismo modo, cambios detectados en la expresión de los miRNAs miR-30a-3p, miR-30d, let-7c, let-7a, miR-23, let-7e, miR-320, miR-324-5p, miR-21 y miR-185 también se han detectado en muestras sanguíneas de pacientes jóvenes con ictus [161] mostrando, como en trabajos previos [158,159], una correlación en la expresión de los miRNAs entre las muestras cerebrales y sanguíneas y entre los modelos experimentales de ictus y la patología humana. Además hemos identificado cinco miRNAs diferencialmente expresados en nuestras muestras para los que no se ha descrito previamente que estén regulados por la isquemia: miR-493-5p, miR-434-3p, miR-347, miR-483 y miR-542-5p. Hasta este momento la expresión diferencial de la mayoría de estos miRNAs ha sido asociada principalmente con determinados cánceres, y algunos de ellos se han propuesto como marcadores diagnósticos y pronósticos

de estas enfermedades [331,332,333,334,335]. Entre ellos, es de especial interés el miR-347 en relación con el ictus, ya que es la primera vez que se describe su expresión en cerebro de rata y se identifica como un miRNA regulado por la isquemia. Se ha descrito que este miRNA copurifica con poliribosomas de neuronas de mamíferos [186], sugiriendo un posible rol en plasticidad sináptica, y que se expresa diferencialmente en las arterias carótidas de rata después de una angioplastia [285]. Nuestros resultados muestran un aumento en la expresión del miR-347 en corteza cerebral después de la pMCAO mientras que otros han descrito una disminución en su expresión después de daño en la pared vascular [285], lo que concuerda con la idea de que la expresión específica de tejido es una característica importante en la expresión de los miRNAs [336].

El efecto final de los cambios detectados en los miRNAs diferencialmente expresados sobre procesos de daño, protección o reparación cerebral dependerán de las dianas reguladas por estos miRNAs y de sus funciones específicas en cerebro. Como sabemos que la regulación de las dianas es más potente cuando varios miRNAs se unen a un mRNA determinado [337] seleccionamos las noventa dianas predichas comunes a varios miRNAs obtenidas en distintas búsquedas bioinformáticas, considerando que era más probable que estuviesen reguladas después de un insulto isquémico. Las principales funciones (*top-ranked functions*) detectadas para estas dianas que potencialmente participan en la respuesta isquémica cerebral (desarrollo y función del sistema nervioso, morfología de órganos, desarrollo celular, movimiento celular, ciclo celular, señalización e interacción célula-célula, ensamblaje y organización celular, replicación del DNA, recombinación y reparación, desordenes del desarrollo y desarrollo embrionario) apuntan a una posible implicación de estas dianas en la patología ictal y abren nuevos campos para futuras investigaciones. Veinticinco de las dianas predichas han sido relacionadas anteriormente con isquemia, hipoxia o daño cerebral. En concreto están implicadas (ver referencias de la Tabla 5C.3) en 1) procesos neuroprotectores y de reparación cerebral y en supervivencia neuronal (Slc24a2, Btg2, Pxn, Hmox1, Opcml, Scd1, Sdc4, Rgs4, Nr4a3, Csc12, Itgb1, Tagln y Pten), 2) daño cerebral y muerte celular (Madd, Mmp9, Bnip3l, Dpysl5, Myc y Nptxr), 3) regulación de la excitabilidad neuronal y transducción de señal (Syt4, Slc4a10, Vsnl1 y Vapa) y 4) formación de la cicatriz glial relacionada con astrocitos reactivos (Lox, Sdc1, Sdc4 and Vim). Es interesante indicar, de acuerdo con la información disponible, que los cambios descritos inducidos por la isquemia en alguna de estas dianas estarían de acuerdo con los perfiles de expresión de algunos miRNAs detectados en este trabajo. En concreto, el aumento de Madd [204], Mmp9 [207] y Myc [206], así como la disminución de Vsnl1 [158] concuerda con la disminución y el aumento, respectivamente, de sus miRNAs validados miR-292-5p, miR-132 y miR-292-5p,

let-7a y miR-494, respectivamente. Sin embargo, a pesar de que los perfiles de expresión apuntan a una posible regulación, son necesarios estudios adicionales para confirmar que el aumento de Lox [227] esté regulado por los miRNAs let-7i, miR-23b, miR-341, let-7e y miR-338 y que la disminución de NptxR [250] lo esté por los miRNAs miR-132, miR-21, miR-542-3p y miR-185. Finalmente, también se han identificado como dianas de los miRNAs diferencialmente expresados proteínas con funciones importantes en procesos fisiopatológicos cerebrales pero que no han sido previamente asociadas con la isquemia cerebral. Estas proteínas están implicadas en 1) procesos de crecimiento, diferenciación, migración y supervivencia celular (Tspan, Calm1, Tp53, Arl8b, Lrrc4, Neurod1, Arf3, Nde1, Unc5c, Dclk1 y MecP2), 2) procesos neuroprotectores y de reparación cerebral, supervivencia neuronal y plasticidad sináptica (Erap1, Acs14, Neurod1, Tle3, Nde1, p250GAP, MecP2, Zdhhc23, Atrn, Dclk1 y Tp53), y 3) daño cerebral (muerte neuronal, apoptosis e inhibición de la angiogénesis) (Zdhhc23, Phyh1p, Faah, Unc5c, Scn3b, Pdcd4 y Atg12).

De todas las dianas predichas se analizaron los patrones de expresión de cuatro de ellas, dos de las cuales han sido relacionadas con neuroprotección y reparación cerebral (*Btg2*) [220,221] y muerte neuronal (*Dpysl5*) [247] después de la isquemia, y dos que no han sido estudiadas en isquemia cerebral con anterioridad y pueden estar implicadas en diferenciación y maduración neuronal (*Arf3*) [245] así como en desarrollo y función sináptica (*Acs14*) [218,219]. Hemos descrito por primera vez el perfil de expresión temporal de los genes *Acs14*, *Arf3*, *Btg2* y *Dpysl5* después de isquemia cerebral en corteza de rata. Estas dianas mostraron cambios en su expresión después de la isquemia y las diferencias entre los patrones de mRNA y proteína sugieren que están post-transcripcionalmente reguladas. Además, según nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se ha detectado la expresión diferencial de *Arf3* y *Acs14* en respuesta a la isquemia cerebral. La expresión de *Acs14* y *Arf3* parece estar regulada a nivel traduccional más que a nivel de degradación del mRNA, ya que la expresión de sus transcritos no varió en ninguno de los tiempos post-isquemia analizados mientras sí lo hacía la proteína. *Btg2* es un gen GET [338] que hemos detectado mediante *western blot* en dos formas de distintos pesos moleculares. Ambas bandas detectadas aumentaron tanto desde la fase aguda como en la fase tardía después de la oclusión arterial, dando soporte a resultados previos que describen una sobreexpresión de *Btg2* después del ictus isquémico [221] y sugieren su implicación en procesos de recuperación, como serían la prevención de la apoptosis y la promoción de la neurogénesis [220]. El peso molecular predicho para *Btg2* es alrededor de 20kDa y nosotros detectamos dos bandas de 30 y 80kDa aproximadamente. La primera podría corresponder a

la esperada mientras que la banda de mayor tamaño podría deberse a la interacción con otra proteína ya que se ha descrito que Btg2 forma complejos con distintas proteínas [339]. *Dpysl5* por su parte aumentó desde las 72 horas hasta los 14 días. Aunque se le ha asociado a la muerte neuronal [247], se ha descrito recientemente un rol beneficioso para esta proteína, estando implicada en la generación y supervivencia de nuevas neuronas en áreas neurogénicas de cerebro adulto [340], lo que sugiere que *Dpysl5* podría asumir funciones distintas según su localización. Respecto a *Arf3*, ésta es una proteína ubicua expresada principalmente en tejidos neurales [341] y está implicada en maduración neuronal y formación de sinapsis [342] y en la regulación de proteínas asociadas a neurodegeneración [343]. Además, se ha descrito que células que sobreexpresan *Arf3* tienen una secreción aumentada de MMP-9 [344], metaloproteasa responsable del desarrollo de daño cerebral después de una lesión [208,345]. Por lo tanto, aunque son necesarios estudios adicionales para confirmar las siguientes hipótesis, la disminución en la expresión de *Arf3* en la fase aguda después de la pMCAO podría ser una respuesta protectora, previniendo la secreción de MMP-9, mientras que en la fase tardía, cuando su expresión vuelve a los niveles control, *Arf3* podría promover la diferenciación y maduración neuronal. Finalmente, *Acs/4* es miembro de la familia de acil coenzima (CoA) sintetasas de ácidos grasos de cadena larga en mamíferos, enzimas clave para convertir ácidos grasos de cadena larga en ésteres acil-CoA, la forma metabólicamente activa de los ácidos grasos que participan en diversas vías metabólicas y de señalización [346]. En concreto, *Acs/4* tiene una función importante en el metabolismo del ácido araquidónico [347]. La baja expresión de *Acs/4* detectada en las muestras corticales control está de acuerdo con la idea que esta proteína se expresa de manera abundante durante el desarrollo cerebral mientras que en el cerebro adulto su expresión está restringida principalmente al hipocampo y cerebelo, dónde se ha sugerido que es una proteína esencial para el funcionamiento normal de ambas estructuras [348]. En cuanto a la posible función de *Acs/4* después de un ictus, la información disponible sugiere que el aumento de expresión detectado podría favorecer tanto la reparación como el daño cerebral después de la isquemia focal. Por un lado, *Acs/4* regula la arquitectura de las espinas dendríticas [219], el desarrollo y la transmisión sináptica [218] y la diferenciación neuronal [349]. Por otro lado, se ha descrito que *Acs/4* regula la expresión del mediador inflamatorio Cox-2 [350,351]. Por último mencionar que mientras que la expresión del mRNA de *Acs/4* no variaba a nivel proteico la expresión de *Acs/4* aumentó de las 6 a las 72 horas después de la pMCAO, sugiriendo una regulación post-transcripcional por parte de los miRNAs. En concreto, *Acs/4* podría estar regulado por el

miR-347, el nuevo miRNA regulado por la isquemia detectado y validado por primera vez en este trabajo.

Debido a la sobreexpresión detectada y validada mediante qPCR del miR-347 lo seleccionamos para estudios adicionales como miRNA que podría tener una función después de la isquemia. Inicialmente nuestros resultados mostraron que *in vivo* *Acsf4* aumenta su expresión en la fase aguda y subaguda y retorna a niveles control en la fase tardía, mientras que el miR-347 aumenta su expresión en todos los tiempos analizados en las muestras corticales. Dado que se ha descrito que el miR-347 se expresa en neuronas corticales [186], decidimos usar este tipo celular para testar su función biológica y simulamos el aumento del miR-347 en las neuronas corticales utilizando mimetizadores de miRNAs. El miRNA neuroprotector miR-21, que aumenta después de la isquemia [164], como también ha confirmado nuestro estudio, también se incluyó en el estudio como un control adicional y también como posible regulador de *Acsf4*. Además de *Acsf4*, se analizó la expresión de otras dos dianas putativas del miR-347: *Bnip3l* y *Phyhip*. *Bnip3l* es un miembro sensible a hipoxia de la familia Bcl2 que aumenta su expresión tras tMCAO en corteza y estriado de rata y promueve muerte celular apoptótica y no apoptótica [214,215]. Por su parte, *Phyhip* es una proteína específica de cerebro que puede ser importante en varias funciones cerebrales como la inhibición de la angiogénesis y de la diferenciación neuronal [241]. Nuestros resultados muestran que la sobreexpresión del miR-347 en isquemia cerebral es funcional. La sobreexpresión *in vitro* de este miRNA indujo muerte neuronal por apoptosis y a su vez este miRNA reguló, directa o indirectamente, la expresión de *Acsf4*, *Bnip3l* y *Phyhip* a nivel post-transcripcional en el tiempo analizado (60-65 horas post-transfección). En concreto detectamos que la sobreexpresión del miR-347 indujo la expresión de *Acsf4*, *Bnip3l* y *Phyhip*. En cambio, el aumento del miR-21 no causó ningún efecto en la viabilidad celular, lo que concuerda con resultados previos [164], ni reguló la expresión de *Acsf4*. Por otro lado, para analizar si la apoptosis inducida por la sobreexpresión del miR-347 era la responsable del aumento de expresión de sus potenciales dianas (*Acsf4*, *Bnip3l* y *Phyhip*) utilizamos un modelo *in vitro* de apoptosis en neuronas corticales. Los resultados mostraron que no, la privación de suero indujo la disminución de la expresión de *Acsf4* y *Bnip3l* y no modificó la expresión de *Phyhip*. En conjunto los resultados sugieren que *Acsf4*, *Bnip3l* y *Phyhip* no son dianas del miR-347 pero sí están indirectamente reguladas por este miRNA. A pesar de que se ha descrito que los miRNAs pueden activar la traducción [149], no existen evidencias sobre este mecanismo en isquemia cerebral, y por lo tanto es probable que el miR-347 induzca la sobreexpresión de las tres dianas analizadas a través de la regulación de otras dianas que, a su vez, regulan la expresión de estas

proteínas a nivel post-transcripcional. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales para dilucidar la función de *Acs14* en la respuesta a la isquemia cerebral así como los mecanismos por los cuales el miR-347 induce la apoptosis neuronal.

6.4 DISCUSIÓN GENERAL

Ante una enfermedad con una compleja fisiopatología como el ictus y cuyas opciones terapéuticas actuales presentan grandes limitaciones, el reto es desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para mejorar el tratamiento y pronóstico de los pacientes con ictus isquémico agudo. Con este fin, dilucidar los mecanismos moleculares precisos que rigen la sensibilidad de la unidad neurovascular a la isquemia es un paso crítico en la identificación de las vías de señalización que en última instancia puede ser susceptibles a la manipulación farmacológica para los pacientes con ictus.

A través de estudios de expresión génica y del estudio de los mecanismos reguladores de esta expresión, como son los miRNAs, se aportan nuevos conocimientos acerca de moléculas y vías de señalización reguladas por la isquemia y posiblemente implicadas en la compleja fisiopatología del ictus isquémico, así como sobre potenciales dianas terapéuticas. Hemos demostrado que en estos estudios es determinante analizar de manera exacta la expresión utilizando los controles endógenos óptimos para cada condición experimental particular y la importancia de caracterizar los genes candidatos antes de su validación como potencial diana terapéutica, ya que como hemos descrito para *Gcf2/Lrrfip1* cada isoforma presenta diferentes patrones de expresión y puede ejercer funciones distintas, con lo que el análisis global del gen puede conducir a conclusiones erróneas. En cuanto a los miRNAs, hemos demostrado que están diferencialmente expresados en la isquemia cerebral en función del tiempo de evolución de la misma, desde la fase aguda hasta la fase crónica, y que además de su papel regulador, la identificación de los miRNAs diferencialmente expresados tras isquemia cerebral permite la identificación de nuevas proteínas implicadas en la fisiopatología del ictus a través de la predicción de sus dianas. Una limitación de este trabajo es que no se ha definido el rol preciso de los genes y miRNAs identificados en isquemia cerebral, pero la falta de información previa hacía imprescindible una caracterización inicial de cada uno de ellos en los modelos experimentales.

En conjunto, los resultados obtenidos aumentan el conocimiento acerca de nuevos miRNAs y proteínas no estudiadas previamente en isquemia cerebral y abren nuevas vías de investigación para definir tanto el rol y mecanismo de acción en isquemia del miR-347 y de

DISCUSIÓN

los genes *Gcf2/Lrrfip1*, *Acs14*, *Arf3* como del resto de miRNAs detectados con una expresión diferencial en isquemia cerebral y del gran número de dianas predichas de dichos miRNAs.

7.CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis han permitido extraer las siguientes conclusiones:

7.1- Los estudios de expresión génica y de sus mecanismos reguladores, como los miRNAs, han conducido a la identificación de nuevas proteínas y vías de señalización posiblemente implicadas en la fisiopatología del ictus, así como la identificación de potenciales dianas terapéuticas específicas de tejido y de momento temporal para la recuperación del ictus.

7.2- La evaluación y validación de los controles endógenos o genes de referencia óptimos para cada modelo de isquemia o condición experimental es imprescindible como paso previo a los estudios de expresión génica. En base a nuestros resultados los genes *Sdha* e *Ywhaz* y los miRNAs snoRNA e Y1 son los controles endógenos idóneos para el modelo de isquemia *in vivo* de pMCAO; *Rpl13a* y *Sdha* para el modelo de isquemia *in vitro* de POG; *Hprt* e *Ywhaz* para astrocitos corticales transfectados con siRNAs; *Sdha* e *Ywhaz* para neuronas corticales transfectadas con mimetizadores de miRNAs o privadas de suero, como modelo de apoptosis; y, por último, los miRNAs 4.5SRNA e Y1 para neuronas corticales transfectadas con mimetizadores de miRNAs.

7.3- *Gcf2/Lrrfip1* es un nuevo gen de interés en la respuesta a isquemia cerebral del que se han identificado en corteza cerebral un mínimo de cinco isoformas, tres de las cuales (rLrrfip1, CRA_g y rFlap-1) están diferencialmente expresadas en isquemia cerebral y pueden ejercer diferentes funciones a través de la regulación de distintas vías de señalización.

7.4- rLrrfip1 es la isoforma mayoritaria y activa fisiológicamente Akt, mTOR y β -catenina en astrocitos. Su sobreexpresión desde la fase aguda hasta la fase crónica de la respuesta isquémica sugiere que rLrrfip1 puede ejercer un rol protector en isquemia cerebral mediante la activación de estas vías de señalización y la consecuente regulación de proteínas implicadas en la respuesta isquémica, como hemos confirmado para el transportador de glutamato GLT-1/Eaat2.

7.5- La isoforma rFlap-1 podría tener un rol dual (nocivo/protector) a través de su regulación previamente descrita sobre los TLRs.

7.6- La caracterización de las isoformas de cada gen candidato es imprescindible antes de su validación como dianas terapéuticas, ya que un análisis global obviando el estudio individual de cada una de sus variantes puede conducir a errores de interpretación.

7.7- Para ambas isoformas (rLrrfip1 y rFlap-1), así como para el resto de transcritos identificados, son necesarios estudios adicionales para confirmar su rol en la isquemia cerebral y aumentar el conocimiento sobre este gen tan poco estudiado en este contexto.

7.8- Los miRNAs están diferencialmente regulados en la isquemia cerebral en función del tiempo de evolución de la misma. En concreto, el miR-347 está inducido desde la fase aguda hasta la fase crónica de la isquemia cerebral y contribuye al daño isquémico promoviendo la muerte neuronal apoptótica. Aunque son necesarios más estudios para validar el rol nocivo del miR-347, la inhibición de este miRNA podría ser una opción terapéutica para el daño cerebral inducido por la isquemia.

7.9- A través del análisis de los mRNAs diana de los miRNAs diferencialmente expresados en respuesta a la isquemia se han identificado nuevas proteínas posiblemente implicadas en la fisiopatología del ictus, como Acsl4 y Arf3, con potenciales funciones protectoras. Para ambas proteínas son necesarios estudios adicionales para definir su rol en isquemia cerebral y su potencial como diana terapéutica.

8.BIBLIOGRAFÍA

1. (1988) The World Health Organization MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. WHO MONICA Project Principal Investigators. *J Clin Epidemiol* 41: 105-114.
2. Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, et al. (2009) Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 119: 480-486.
3. N.García-Barragán JM (2012) Enfermedad cerebrovascular. Ictus aterotrombótico. Ictus lacunar. In: Ruiz JS, editor. *Control Global del riesgo cardiometabólico*, vol 1. Madrid: Ediciones Díaz de Santos. pp. 797-809.
4. Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM (2008) Stroke. *Lancet* 371: 1612-1623.
5. Truelsen T, Piechowski-Jozwiak B, Bonita R, Mathers C, Bogousslavsky J, et al. (2006) Stroke incidence and prevalence in Europe: a review of available data. *Eur J Neurol* 13: 581-598.
6. Davalos A, Cendra E, Teruel J, Martinez M, Genis D (1990) Deteriorating ischemic stroke: risk factors and prognosis. *Neurology* 40: 1865-1869.
7. Serena J, Rodriguez-Yanez M, Castellanos M (2006) Deterioration in acute ischemic stroke as the target for neuroprotection. *Cerebrovasc Dis* 21 Suppl 2: 80-88.
8. Allen CL, Bayraktutan U (2008) Risk factors for ischaemic stroke. *Int J Stroke* 3: 105-116.
9. O'Donnell MJ, Xavier D, Liu L, Zhang H, Chin SL, et al. (2010) Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet* 376: 112-123.
10. Bowman TS, Sesso HD, Ma J, Kurth T, Kase CS, et al. (2003) Cholesterol and the risk of ischemic stroke. *Stroke* 34: 2930-2934.
11. Laing SP, Swerdlow AJ, Carpenter LM, Slater SD, Burden AC, et al. (2003) Mortality from cerebrovascular disease in a cohort of 23 000 patients with insulin-treated diabetes. *Stroke* 34: 418-421.
12. Touze E, Gauthier JY, Moulin T, Meder JF, Bracard S, et al. (2003) Risk of stroke and recurrent dissection after a cervical artery dissection: a multicenter study. *Neurology* 61: 1347-1351.
13. Sacco RL, Benjamin EJ, Broderick JP, Dyken M, Easton JD, et al. (1997) American Heart Association Prevention Conference. IV. Prevention and Rehabilitation of Stroke. Risk factors. *Stroke* 28: 1507-1517.
14. Zemke D, Smith JL, Reeves MJ, Majid A (2004) Ischemia and ischemic tolerance in the brain: an overview. *Neurotoxicology* 25: 895-904.
15. Albers GW, Caplan LR, Easton JD, Fayad PB, Mohr JP, et al. (2002) Transient ischemic attack--proposal for a new definition. *N Engl J Med* 347: 1713-1716.
16. Bogousslavsky J, Van Melle G, Regli F (1988) The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. *Stroke* 19: 1083-1092.
17. Adams HP, Jr., Davis PH, Leira EC, Chang KC, Bendixen BH, et al. (1999) Baseline NIH Stroke Scale score strongly predicts outcome after stroke: A report of the Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST). *Neurology* 53: 126-131.
18. Diez-Tejedor E, del Brutto O, Alvarez Sabin J, Munoz M, Abiusi G (2001) [Classification of the cerebrovascular diseases. Iberoamerican Cerebrovascular diseases Society]. *Rev Neurol* 33: 455-464.
19. Foulkes MA, Wolf PA, Price TR, Mohr JP, Hier DB (1988) The Stroke Data Bank: design, methods, and baseline characteristics. *Stroke* 19: 547-554.
20. Teismann IK, Suntrup S, Warnecke T, Steinstrater O, Fischer M, et al. (2011) Cortical swallowing processing in early subacute stroke. *BMC Neurol* 11: 34.
21. Saver JL, Gornbein J, Starkman S (2010) Graphic reanalysis of the two NINDS-tPA trials confirms substantial treatment benefit. *Stroke* 41: 2381-2390.
22. Medcalf RL, Davis SM (2012) Plasminogen activation and thrombolysis for ischemic stroke. *Int J Stroke* 7: 419-425.

23. Lees KR, Bluhmki E, von Kummer R, Brott TG, Toni D, et al. (2010) Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials. *Lancet* 375: 1695-1703.
24. Woodruff TM, Thundyil J, Tang SC, Sobey CG, Taylor SM, et al. (2011) Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Mol Neurodegener* 6: 11.
25. Castillo J, Alvarez-Sabin J, Davalos A, Diez-Tejedor E, Lizasoain I, et al. (2003) [Consensus review. Pharmacological neuroprotection in cerebral ischemia: is it still a therapeutic option?]. *Neurologia* 18: 368-384.
26. Ginsberg MD (2009) Current status of neuroprotection for cerebral ischemia: synoptic overview. *Stroke* 40: S111-114.
27. Arai K, Lok J, Guo S, Hayakawa K, Xing C, et al. (2011) Cellular mechanisms of neurovascular damage and repair after stroke. *J Child Neurol* 26: 1193-1198.
28. Lo EH (2008) A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nat Med* 14: 497-500.
29. Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C (2010) The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron* 67: 181-198.
30. Astrup J, Siesjo BK, Symon L (1981) Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 12: 723-725.
31. Baron JC (2001) Mapping the ischaemic penumbra with PET: a new approach. *Brain* 124: 2-4.
32. Lo EH (2008) Experimental models, neurovascular mechanisms and translational issues in stroke research. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1: S396-405.
33. Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM (2003) Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci* 26: 248-254.
34. Xing C, Hayakawa K, Lok J, Arai K, Lo EH (2012) Injury and repair in the neurovascular unit. *Neurol Res* 34: 325-330.
35. Arundine M, Tymianski M (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 34: 325-337.
36. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22: 391-397.
37. Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA (2003) Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci* 4: 399-415.
38. Mies G, Kohno K, Hossmann KA (1994) Prevention of periinfarct direct current shifts with glutamate antagonist NBQX following occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 14: 802-807.
39. Kunz A, Dirnagl U, Mergenthaler P (2010) Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 24: 495-509.
40. Dijkhuizen RM, Singhal AB, Mandeville JB, Wu O, Halpern EF, et al. (2003) Correlation between brain reorganization, ischemic damage, and neurologic status after transient focal cerebral ischemia in rats: a functional magnetic resonance imaging study. *J Neurosci* 23: 510-517.
41. Chopp M, Zhang ZG, Jiang Q (2007) Neurogenesis, angiogenesis, and MRI indices of functional recovery from stroke. *Stroke* 38: 827-831.
42. Perez de la Ossa N, Davalos A (2007) Neuroprotection in cerebral infarction: the opportunity of new studies. *Cerebrovasc Dis* 24 Suppl 1: 153-156.
43. White BD, Nathe RJ, Maris DO, Nguyen NK, Goodson JM, et al. (2010) Beta-catenin signaling increases in proliferating NG2+ progenitors and astrocytes during post-traumatic gliogenesis in the adult brain. *Stem Cells* 28: 297-307.
44. Gross RE, Mehler MF, Mabie PC, Zang Z, Santschi L, et al. (1996) Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron* 17: 595-606.

45. Kury P, Schroeter M, Jander S (2004) Transcriptional response to circumscribed cortical brain ischemia: spatiotemporal patterns in ischemic vs. remote non-ischemic cortex. *Eur J Neurosci* 19: 1708-1720.
46. Rickhag M, Wieloch T, Gido G, Elmer E, Krogh M, et al. (2006) Comprehensive regional and temporal gene expression profiling of the rat brain during the first 24 h after experimental stroke identifies dynamic ischemia-induced gene expression patterns, and reveals a biphasic activation of genes in surviving tissue. *J Neurochem* 96: 14-29.
47. Allan SM, Rothwell NJ (2001) Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2: 734-744.
48. Morgan JI, Curran T (1991) Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci* 14: 421-451.
49. Lanahan A, Worley P (1998) Immediate-early genes and synaptic function. *Neurobiol Learn Mem* 70: 37-43.
50. Akins PT, Liu PK, Hsu CY (1996) Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia. Friend or foe? *Stroke* 27: 1682-1687.
51. Honkaniemi J, States BA, Weinstein PR, Espinoza J, Sharp FR (1997) Expression of zinc finger immediate early genes in rat brain after permanent middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 17: 636-646.
52. Welsh FA, Moyer DJ, Harris VA (1992) Regional expression of heat shock protein-70 mRNA and c-fos mRNA following focal ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 12: 204-212.
53. Bates S, Read SJ, Harrison DC, Topp S, Morrow R, et al. (2001) Characterisation of gene expression changes following permanent MCAO in the rat using subtractive hybridisation. *Brain Res Mol Brain Res* 93: 70-80.
54. Franklin TB, Krueger-Naug AM, Clarke DB, Arrigo AP, Currie RW (2005) The role of heat shock proteins Hsp70 and Hsp27 in cellular protection of the central nervous system. *Int J Hyperthermia* 21: 379-392.
55. Zhao B, Schwartz JP (1998) Involvement of cytokines in normal CNS development and neurological diseases: recent progress and perspectives. *J Neurosci Res* 52: 7-16.
56. Sriram K, O'Callaghan JP (2007) Divergent roles for tumor necrosis factor-alpha in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol* 2: 140-153.
57. Wang Q, Tang XN, Yenari MA (2007) The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol* 184: 53-68.
58. Vitkovic L, Maeda S, Sternberg E (2001) Anti-inflammatory cytokines: expression and action in the brain. *Neuroimmunomodulation* 9: 295-312.
59. Kadhim HJ, Duchateau J, Sebire G (2008) Cytokines and brain injury: invited review. *J Intensive Care Med* 23: 236-249.
60. Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ (2006) Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol* 66: 232-245.
61. Bajetto A, Bonavia R, Barbero S, Florio T, Schettini G (2001) Chemokines and their receptors in the central nervous system. *Front Neuroendocrinol* 22: 147-184.
62. Mennicken F, Maki R, de Souza EB, Quirion R (1999) Chemokines and chemokine receptors in the CNS: a possible role in neuroinflammation and patterning. *Trends Pharmacol Sci* 20: 73-78.
63. Candelario-Jalil E, Yang Y, Rosenberg GA (2009) Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience* 158: 983-994.
64. Ma Y, Zechariah A, Qu Y, Hermann DM (2012) Effects of vascular endothelial growth factor in ischemic stroke. *J Neurosci Res* 90: 1873-1882.

65. Harvey BK, Hoffer BJ, Wang Y (2005) Stroke and TGF-beta proteins: glial cell line-derived neurotrophic factor and bone morphogenetic protein. *Pharmacol Ther* 105: 113-125.
66. Prieto-Arribas R, Moreno-Gutierrez A, Simal-Hernandez P, Pascual-Garvi JM, Matias-Guiu J, et al. (2008) [Experimental models of cerebral ischemia]. *Rev Neurol* 47: 414-426.
67. Hossmann KA, Traystman RJ (2009) Cerebral blood flow and the ischemic penumbra. *Handb Clin Neurol* 92: 67-92.
68. Busch E, Kruger K, Hossmann KA (1997) Improved model of thromboembolic stroke and rt-PA induced reperfusion in the rat. *Brain Res* 778: 16-24.
69. Yamori Y, Horie R, Handa H, Sato M, Fukase M (1976) Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans. *Stroke* 7: 46-53.
70. Avendano C, Roda JM, Carceller F, Diez-Tejedor E (1995) Morphometric study of focal cerebral ischemia in rats: a stereological evaluation. *Brain Res* 673: 83-92.
71. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM (1981) Focal cerebral ischaemia in the rat: 2. Regional cerebral blood flow determined by [¹⁴C]iodoantipyrine autoradiography following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1: 61-69.
72. Naik P, Cucullo L (2012) In vitro blood-brain barrier models: current and perspective technologies. *J Pharm Sci* 101: 1337-1354.
73. Arumugam TV, Tang SC, Lathia JD, Cheng A, MughalMR, et al. (2007) Intravenous immunoglobulin (IVIG) protects the brain against experimental stroke by preventing complement-mediated neuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 14104-14109.
74. Mattson MP, Barger SW, Begley JG, Mark RJ (1995) Calcium, free radicals, and excitotoxic neuronal death in primary cell culture. *Methods Cell Biol* 46: 187-216.
75. McCarthy KD, de Vellis J (1980) Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 85: 890-902.
76. Zhao Y, Rempe DA (2010) Targeting astrocytes for stroke therapy. *Neurotherapeutics* 7: 439-451.
77. Olney JW (1969) Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164: 719-721.
78. Robinson MB (1998) The family of sodium-dependent glutamate transporters: a focus on the GLT-1/EAAT2 subtype. *Neurochem Int* 33: 479-491.
79. Clements JD, Lester RA, Tong G, Jahr CE, Westbrook GL (1992) The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science* 258: 1498-1501.
80. Storck T, Schulte S, Hofmann K, Stoffel W (1992) Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 10955-10959.
81. Pines G, Danbolt NC, Bjoras M, Zhang Y, Bendahan A, et al. (1992) Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature* 360: 464-467.
82. Kanai Y, Hediger MA (1992) Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* 360: 467-471.
83. Furuta A, Rothstein JD, Martin LJ (1997) Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J Neurosci* 17: 8363-8375.
84. Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG (1995) An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* 375: 599-603.
85. Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG (1997) Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4155-4160.
86. Maragakis NJ, Rothstein JD (2001) Glutamate transporters in neurologic disease. *Arch Neurol* 58: 365-370.

87. Rao VL, Bowen KK, Dempsey RJ (2001) Transient focal cerebral ischemia down-regulates glutamate transporters GLT-1 and EAAC1 expression in rat brain. *Neurochem Res* 26: 497-502.
88. Rao VL, Dogan A, Todd KG, Bowen KK, Kim BT, et al. (2001) Antisense knockdown of the glial glutamate transporter GLT-1, but not the neuronal glutamate transporter EAAC1, exacerbates transient focal cerebral ischemia-induced neuronal damage in rat brain. *J Neurosci* 21: 1876-1883.
89. Wu X, Kihara T, Akaike A, Niidome T, Sugimoto H (2010) PI3K/Akt/mTOR signaling regulates glutamate transporter 1 in astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 393: 514-518.
90. Su ZZ, Leszczyniecka M, Kang DC, Sarkar D, Chao W, et al. (2003) Insights into glutamate transport regulation in human astrocytes: cloning of the promoter for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2). *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 1955-1960.
91. Castillo J, Davalos A, Noya M (1997) Progression of ischaemic stroke and excitotoxic aminoacids. *Lancet* 349: 79-83.
92. Davalos A, Castillo J, Serena J, Noya M (1997) Duration of glutamate release after acute ischemic stroke. *Stroke* 28: 708-710.
93. Mallolas J, Hurtado O, Castellanos M, Blanco M, Sobrino T, et al. (2006) A polymorphism in the EAAT2 promoter is associated with higher glutamate concentrations and higher frequency of progressing stroke. *J Exp Med* 203: 711-717.
94. Olsson T, Mohammed AK, Donaldson LF, Seckl JR (1995) Transcription factor AP-2 gene expression in adult rat hippocampal regions: effects of environmental manipulations. *Neurosci Lett* 189: 113-116.
95. Shimada M, Konishi Y, Ohkawa N, Ohtaka-Maruyama C, Hanaoka F, et al. (1999) Distribution of AP-2 subtypes in the adult mouse brain. *Neurosci Res* 33: 275-280.
96. Rikiyama T, Curtis J, Oikawa M, Zimonjic DB, Popescu N, et al. (2003) GCF2: expression and molecular analysis of repression. *Biochim Biophys Acta* 1629: 15-25.
97. Arakawa R, Bagashev A, Song L, Maurer K, Sullivan KE (2010) Characterization of LRRFIP1. *Biochem Cell Biol* 88: 899-906.
98. Fong KS, de Couet HG (1999) Novel proteins interacting with the leucine-rich repeat domain of human flightless-I identified by the yeast two-hybrid system. *Genomics* 58: 146-157.
99. Liu YT, Yin HL (1998) Identification of the binding partners for flightless I, A novel protein bridging the leucine-rich repeat and the gelsolin superfamilies. *J Biol Chem* 273: 7920-7927.
100. Reed AL, Yamazaki H, Kaufman JD, Rubinstein Y, Murphy B, et al. (1998) Molecular cloning and characterization of a transcription regulator with homology to GC-binding factor. *J Biol Chem* 273: 21594-21602.
101. Suriano AR, Sanford AN, Kim N, Oh M, Kennedy S, et al. (2005) GCF2/LRRFIP1 represses tumor necrosis factor alpha expression. *Mol Cell Biol* 25: 9073-9081.
102. Ohtsuka H, Oikawa M, Ariake K, Rikiyama T, Motoi F, et al. (2011) GC-binding factor 2 interacts with dishevelled and regulates Wnt signaling pathways in human carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 129: 1599-1610.
103. Shen DW, Pouliot LM, Gillet JP, Ma W, Johnson AC, et al. (2012) The transcription factor GCF2 is an upstream repressor of the small GTPase RhoA, regulating membrane protein trafficking, sensitivity to doxorubicin, and resistance to cisplatin. *Mol Pharm* 9: 1822-1833.
104. Yang P, An H, Liu X, Wen M, Zheng Y, et al. (2010) The cytosolic nucleic acid sensor LRRFIP1 mediates the production of type I interferon via a beta-catenin-dependent pathway. *Nat Immunol* 11: 487-494.

105. Wilson SA, Brown EC, Kingsman AJ, Kingsman SM (1998) TRIP: a novel double stranded RNA binding protein which interacts with the leucine rich repeat of flightless I. *Nucleic Acids Res* 26: 3460-3467.
106. Eden S, Constancia M, Hashimshony T, Dean W, Goldstein B, et al. (2001) An upstream repressor element plays a role in Igf2 imprinting. *Embo J* 20: 3518-3525.
107. Bagashev A, Fitzgerald MC, Larosa DF, Rose PP, Cherry S, et al. (2010) Leucine-rich repeat (in Flightless I) interacting protein-1 regulates a rapid type I interferon response. *J Interferon Cytokine Res* 30: 843-852.
108. Goodall AH, Burns P, Salles I, Macaulay IC, Jones CI, et al. (2010) Transcription profiling in human platelets reveals LRRFIP1 as a novel protein regulating platelet function. *Blood* 116: 4646-4656.
109. Majoul I, Shirao T, Sekino Y, Duden R (2007) Many faces of drebrin: from building dendritic spines and stabilizing gap junctions to shaping neurite-like cell processes. *Histochem Cell Biol* 127: 355-361.
110. Khachigian LM, Santiago FS, Raftly LA, Chan OL, Delbridge GJ, et al. (1999) GC factor 2 represses platelet-derived growth factor A-chain gene transcription and is itself induced by arterial injury. *Circ Res* 84: 1258-1267.
111. Shibutani M, Lazarovici P, Johnson AC, Katagiri Y, Guroff G (1998) Transcriptional down-regulation of epidermal growth factor receptors by nerve growth factor treatment of PC12 cells. *J Biol Chem* 273: 6878-6884.
112. Sjoblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, et al. (2006) The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314: 268-274.
113. Ariake K, Ohtsuka H, Motoi F, Douchi D, Oikawa M, et al. (2012) GCF2/LRRFIP1 promotes colorectal cancer metastasis and liver invasion through integrin-dependent RhoA activation. *Cancer Lett* 325: 99-107.
114. Plourde M, Vohl MC, Bellis C, Carless M, Dyer T, et al. (2012) A Variant in the LRRFIP1 Gene Is Associated With Adiposity and Inflammation. *Obesity* (Silver Spring).
115. Dai P, Jeong SY, Yu Y, Leng T, Wu W, et al. (2009) Modulation of TLR signaling by multiple MyD88-interacting partners including leucine-rich repeat Fli-I-interacting proteins. *J Immunol* 182: 3450-3460.
116. Lee YH, Stallcup MR (2006) Interplay of Fli-I and FLAP1 for regulation of beta-catenin dependent transcription. *Nucleic Acids Res* 34: 5052-5059.
117. Fang D, Hawke D, Zheng Y, Xia Y, Meisenhelder J, et al. (2007) Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J Biol Chem* 282: 11221-11229.
118. Rathinam VA, Sharma S, Fitzgerald KA (2010) Catenin' on to nucleic acid sensing. *Nat Immunol* 11: 466-468.
119. Caso JR, Pradillo JM, Hurtado O, Lorenzo P, Moro MA, et al. (2007) Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. *Circulation* 115: 1599-1608.
120. Lei ZN, Zhang LM, Sun FY (2008) Beta-catenin siRNA inhibits ischemia-induced striatal neurogenesis in adult rat brain following a transient middle cerebral artery occlusion. *Neurosci Lett* 435: 108-112.
121. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* (N Y) 10: 413-417.
122. Thellin O, ElMoualij B, Heinen E, Zorzi W (2009) A decade of improvements in quantification of gene expression and internal standard selection. *Biotechnol Adv* 27: 323-333.
123. Kozera B, Rapacz M (2013) Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet* 54: 391-406.
124. Ramos-Cejudo J, Gutierrez-Fernandez M, Rodriguez-Frutos B, Exposito Alcaide M, Sanchez-Cabo F, et al. (2012) Spatial and temporal gene expression differences in

- core and periinfarct areas in experimental stroke: a microarray analysis. *PLoS One* 7: e52121.
125. Read SJ, Parsons AA, Harrison DC, Philpott K, Kabnick K, et al. (2001) Stroke genomics: approaches to identify, validate, and understand ischemic stroke gene expression. *J Cereb Blood Flow Metab* 21: 755-778.
 126. Coulson DT, Brockbank S, Quinn JG, Murphy S, Ravid R, et al. (2008) Identification of valid reference genes for the normalization of RT qPCR gene expression data in human brain tissue. *BMC Mol Biol* 9: 46.
 127. Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR (2000) Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques* 29: 332-337.
 128. Meldgaard M, Fenger C, Lambertsen KL, Pedersen MD, Ladeby R, et al. (2006) Validation of two reference genes for mRNA level studies of murine disease models in neurobiology. *J Neurosci Methods* 156: 101-110.
 129. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, et al. (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 75: 291-295.
 130. Derks NM, Muller M, Gaszner B, Tilburg-Ouwens DT, Roubos EW, et al. (2008) Housekeeping genes revisited: different expressions depending on gender, brain area and stressor. *Neuroscience* 156: 305-309.
 131. Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, et al. (2004) Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques* 37: 112-114, 116, 118-119.
 132. Dheda K, Huggett JF, Chang JS, Kim LU, Bustin SA, et al. (2005) The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Anal Biochem* 344: 141-143.
 133. Harrison DC, Medhurst AD, Bond BC, Campbell CA, Davis RP, et al. (2000) The use of quantitative RT-PCR to measure mRNA expression in a rat model of focal ischemia--caspase-3 as a case study. *Brain Res Mol Brain Res* 75: 143-149.
 134. Medhurst AD, Harrison DC, Read SJ, Campbell CA, Robbins MJ, et al. (2000) The use of TaqMan RT-PCR assays for semiquantitative analysis of gene expression in CNS tissues and disease models. *J Neurosci Methods* 98: 9-20.
 135. Tian YF, Zhang PB, Xiao XL, Zhang JS, Zhao JJ, et al. (2007) The quantification of ADAMTS expression in an animal model of cerebral ischemia using real-time PCR. *Acta Anaesthesiol Scand* 51: 158-164.
 136. Schmittgen TD, Zakrajsek BA (2000) Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* 46: 69-81.
 137. Cook NL, Vink R, Donkin JJ, van den Heuvel C (2009) Validation of reference genes for normalization of real-time quantitative RT-PCR data in traumatic brain injury. *J Neurosci Res* 87: 34-41.
 138. Langnaese K, John R, Schweizer H, Ebmeyer U, Keilhoff G (2008) Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in a rat asphyxial cardiac arrest model. *BMC Mol Biol* 9: 53.
 139. de Jonge HJ, Fehrmann RS, de Bont ES, Hofstra RM, Gerbens F, et al. (2007) Evidence based selection of housekeeping genes. *PLoS One* 2: e898.
 140. Barrera LO, Ren B (2006) The transcriptional regulatory code of eukaryotic cells--insights from genome-wide analysis of chromatin organization and transcription factor binding. *Curr Opin Cell Biol* 18: 291-298.
 141. Struhl K (1991) Mechanisms for diversity in gene expression patterns. *Neuron* 7: 177-181.
 142. Thiel G, Lietz M, Hohl M (2004) How mammalian transcriptional repressors work. *Eur J Biochem* 271: 2855-2862.

143. Camos S, Gubern C, Sobrado M, Rodriguez R, Romera VG, et al. (2014) The high-mobility group I-Y transcription factor is involved in cerebral ischemia and modulates the expression of angiogenic proteins. *Neuroscience* 269: 112-130.
144. Camos S, Gubern C, Sobrado M, Rodriguez R, Romera VG, et al. (2014) Oct-2 transcription factor binding activity and expression up-regulation in rat cerebral ischaemia is associated with a diminution of neuronal damage in vitro. *Neuromolecular Med* 16: 332-349.
145. Ridder DA, Bulashevskaya S, Chaitanya GV, Babu PP, Brors B, et al. (2009) Discovery of transcriptional programs in cerebral ischemia by in silico promoter analysis. *Brain Res* 1272: 3-13.
146. Hobert O (2008) Gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Science* 319: 1785-1786.
147. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281-297.
148. Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W (2010) Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem* 79: 351-379.
149. Steitz JA, Vasudevan S (2009) miRNPs: versatile regulators of gene expression in vertebrate cells. *Biochem Soc Trans* 37: 931-935.
150. Breving K, Esquela-Kerscher A (2010) The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 1316-1329.
151. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843-854.
152. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, et al. (2000) The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403: 901-906.
153. Wienholds E, Plasterk RH (2005) MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett* 579: 5911-5922.
154. Meza-Sosa KF, Pedraza-Alva G, Perez-Martinez L (2014) microRNAs: key triggers of neuronal cell fate. *Front Cell Neurosci* 8: 175.
155. Kapsimali M, Kloosterman WP, de Bruijn E, Rosa F, Plasterk RH, et al. (2007) MicroRNAs show a wide diversity of expression profiles in the developing and mature central nervous system. *Genome Biol* 8: R173.
156. Saugstad JA (2010) MicroRNAs as effectors of brain function with roles in ischemia and injury, neuroprotection, and neurodegeneration. *J Cereb Blood Flow Metab* 30: 1564-1576.
157. Dharap A, Bowen K, Place R, Li LC, Vemuganti R (2009) Transient focal ischemia induces extensive temporal changes in rat cerebral microRNAome. *J Cereb Blood Flow Metab* 29: 675-687.
158. Jeyaseelan K, Lim KY, Armugam A (2008) MicroRNA expression in the blood and brain of rats subjected to transient focal ischemia by middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 39: 959-966.
159. Liu DZ, Tian Y, Ander BP, Xu H, Stamova BS, et al. (2010) Brain and blood microRNA expression profiling of ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, and kainate seizures. *J Cereb Blood Flow Metab* 30: 92-101.
160. Ziu M, Fletcher L, Rana S, Jimenez DF, Digicaylioglu M (2011) Temporal differences in microRNA expression patterns in astrocytes and neurons after ischemic injury. *PLoS One* 6: e14724.
161. Tan KS, Armugam A, Sepramaniam S, Lim KY, Setyowati KD, et al. (2009) Expression profile of MicroRNAs in young stroke patients. *PLoS One* 4: e7689.
162. Lee ST, Chu K, Jung KH, Yoon HJ, Jeon D, et al. (2010) MicroRNAs induced during ischemic preconditioning. *Stroke* 41: 1646-1651.

163. Lusardi TA, Farr CD, Faulkner CL, Pignataro G, Yang T, et al. (2010) Ischemic preconditioning regulates expression of microRNAs and a predicted target, MeCP2, in mouse cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 30: 744-756.
164. Buller B, Liu X, Wang X, Zhang RL, Zhang L, et al. (2010) MicroRNA-21 protects neurons from ischemic death. *FEBS J* 277: 4299-4307.
165. Yin KJ, Deng Z, Huang H, Hamblin M, Xie C, et al. (2010) miR-497 regulates neuronal death in mouse brain after transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 38: 17-26.
166. Yin KJ, Deng Z, Hamblin M, Xiang Y, Huang H, et al. (2010) Peroxisome proliferator-activated receptor delta regulation of miR-15a in ischemia-induced cerebral vascular endothelial injury. *J Neurosci* 30: 6398-6408.
167. Flicek P, Amode MR, Barrell D, Beal K, Brent S, et al. (2012) Ensembl 2012. *Nucleic Acids Res* 40: D84-90.
168. Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132: 365-386.
169. Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, et al. (2007) Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445: 168-176.
170. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, et al. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034.
171. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64: 5245-5250.
172. Betel D, Koppal A, Agius P, Sander C, Leslie C (2010) Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol* 11: R90.
173. Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C (2008) The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res* 36: D149-153.
174. Xiao F, Zuo Z, Cai G, Kang S, Gao X, et al. (2009) miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res* 37: D105-110.
175. Sauvageot CM, Stiles CD (2002) Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 12: 244-249.
176. Romera C, Hurtado O, Botella SH, Lizasoain I, Cardenas A, et al. (2004) In vitro ischemic tolerance involves upregulation of glutamate transport partly mediated by the TACE/ADAM17-tumor necrosis factor-alpha pathway. *J Neurosci* 24: 1350-1357.
177. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, et al. (1986) Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 17: 472-476.
178. Brint S, Jacewicz M, Kiessling M, Tanabe J, Pulsinelli W (1988) Focal brain ischemia in the rat: methods for reproducible neocortical infarction using tandem occlusion of the distal middle cerebral and ipsilateral common carotid arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 8: 474-485.
179. Zhang SJ, Ke Z, Li L, Yip SP, Tong KY (2013) EEG patterns from acute to chronic stroke phases in focal cerebral ischemic rats: correlations with functional recovery. *Physiol Meas* 34: 423-435.
180. Zhu XC, Jiang T, Zhang QQ, Cao L, Tan MS, et al. (2014) Chronic Metformin Preconditioning Provides Neuroprotection via Suppression of NF-kappaB-Mediated Inflammatory Pathway in Rats with Permanent Cerebral Ischemia. *Mol Neurobiol*.
181. De Cristobal J, Cardenas A, Lizasoain I, Leza JC, Fernandez-Tome P, et al. (2002) Inhibition of glutamate release via recovery of ATP levels accounts for a neuroprotective effect of aspirin in rat cortical neurons exposed to oxygen-glucose deprivation. *Stroke* 33: 261-267.

182. Hurtado O, Lizasoain I, Fernandez-Tome P, Alvarez-Barrientos A, Leza JC, et al. (2002) TACE/ADAM17-TNF-alpha pathway in rat cortical cultures after exposure to oxygen-glucose deprivation or glutamate. *J Cereb Blood Flow Metab* 22: 576-585.
183. Galli G, Fratelli M (1993) Activation of apoptosis by serum deprivation in a teratocarcinoma cell line: inhibition by L-acetylcarnitine. *Exp Cell Res* 204: 54-60.
184. Yu SP, Yeh CH, Sensi SL, Gwag BJ, Canzoniero LM, et al. (1997) Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current. *Science* 278: 114-117.
185. Mello CC, Conte D, Jr. (2004) Revealing the world of RNA interference. *Nature* 431: 338-342.
186. Kim J, Krichevsky A, Grad Y, Hayes GD, Kosik KS, et al. (2004) Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 360-365.
187. Sanger F, Coulson AR (1978) The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing. *FEBS Lett* 87: 107-110.
188. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.
189. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
190. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, et al. (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27: 95-125.
191. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
192. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
193. Koh JY, Choi DW (1987) Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J Neurosci Methods* 20: 83-90.
194. Schutte B, Nuydens R, Geerts H, Ramaekers F (1998) Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells. *J Neurosci Methods* 86: 63-69.
195. Kim JS, Nitta T, Mohuczy D, O'Malley KA, Moldawer LL, et al. (2008) Impaired autophagy: A mechanism of mitochondrial dysfunction in anoxic rat hepatocytes. *Hepatology* 47: 1725-1736.
196. Liu CL, Chen S, Dietrich D, Hu BR (2008) Changes in autophagy after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 28: 674-683.
197. Wen YD, Sheng R, Zhang LS, Han R, Zhang X, et al. (2008) Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways. *Autophagy* 4: 762-769.
198. Zheng Y, Cheng XR, Zhou WX, Zhang YX (2008) Gene expression patterns of hippocampus and cerebral cortex of senescence-accelerated mouse treated with Huang-Lian-Jie-Du decoction. *Neurosci Lett* 439: 119-124.
199. Malaterre J, Mantamadiotis T, Dworkin S, Lightowler S, Yang Q, et al. (2008) c-Myb is required for neural progenitor cell proliferation and maintenance of the neural stem cell niche in adult brain. *Stem Cells* 26: 173-181.
200. Cuomo O, Gala R, Pignataro G, Boscia F, Secondo A, et al. (2008) A critical role for the potassium-dependent sodium-calcium exchanger NCKX2 in protection against focal ischemic brain damage. *J Neurosci* 28: 2053-2063.
201. Cuomo O, Pignataro G, Gala R, Boscia F, Tortiglione A, et al. (2007) Involvement of the potassium-dependent sodium/calcium exchanger gene product NCKX2 in the brain insult induced by permanent focal cerebral ischemia. *Ann N Y Acad Sci* 1099: 486-489.

202. Zhang Q, Fukuda M, Van Bockstaele E, Pascual O, Haydon PG (2004) Synaptotagmin IV regulates glial glutamate release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9441-9446.
203. Zheng H, Ying H, Yan H, Kimmelman AC, Hiller DJ, et al. (2008) p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. *Nature* 455: 1129-1133.
204. Smrcka M, Horky M, Otevrel F, Kuchtickova S, Kotala V, et al. (2003) The onset of apoptosis of neurons induced by ischemia-reperfusion injury is delayed by transient period of hypertension in rats. *Physiol Res* 52: 117-122.
205. Ferrer I, Friguls B, Dalfo E, Planas AM (2003) Early modifications in the expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK), stress-activated kinases SAPK/JNK and p38, and their phosphorylated substrates following focal cerebral ischemia. *Acta Neuropathol* 105: 425-437.
206. Huang CY, Fujimura M, Noshita N, Chang YY, Chan PH (2001) SOD1 down-regulates NF-kappaB and c-Myc expression in mice after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 21: 163-173.
207. Hurtado O, Serrano J, Sobrado M, Fernandez AP, Lizasoain I, et al. (2010) Lack of adrenomedullin, but not complement factor H, results in larger infarct size and more extensive brain damage in a focal ischemia model. *Neuroscience* 171: 885-892.
208. Vikman P, Ansar S, Henriksson M, Stenman E, Edvinsson L (2007) Cerebral ischemia induces transcription of inflammatory and extracellular-matrix-related genes in rat cerebral arteries. *Exp Brain Res* 183: 499-510.
209. Lee SM, Zhao H, Maier CM, Steinberg GK (2009) The protective effect of early hypothermia on PTEN phosphorylation correlates with free radical inhibition in rat stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 29: 1589-1600.
210. Liu B, Li L, Zhang Q, Chang N, Wang D, et al. (2010) Preservation of GABAA receptor function by PTEN inhibition protects against neuronal death in ischemic stroke. *Stroke* 41: 1018-1026.
211. Omori N, Jin G, Li F, Zhang WR, Wang SJ, et al. (2002) Enhanced phosphorylation of PTEN in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 954: 317-322.
212. Zhao H, Sapolsky RM, Steinberg GK (2006) Phosphoinositide-3-kinase/akt survival signal pathways are implicated in neuronal survival after stroke. *Mol Neurobiol* 34: 249-270.
213. Cheng Y, Zhu P, Yang J, Liu X, Dong S, et al. (2010) Ischaemic preconditioning-regulated miR-21 protects heart against ischaemia/reperfusion injury via anti-apoptosis through its target PDCD4. *Cardiovasc Res* 87: 431-439.
214. Birse-Archbold JL, Kerr LE, Jones PA, McCulloch J, Sharkey J (2005) Differential profile of Nix upregulation and translocation during hypoxia/ischaemia in vivo versus in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab* 25: 1356-1365.
215. Chinnadurai G, Vijayalingam S, Gibson SB (2008) BNIP3 subfamily BH3-only proteins: mitochondrial stress sensors in normal and pathological functions. *Oncogene* 27 Suppl 1: S114-127.
216. Haraguchi T, Yanaka N, Nogusa Y, Sumiyoshi N, Eguchi Y, et al. (2006) Expression of ADP-ribosylation factor-like protein 8B mRNA in the brain is down-regulated in mice fed a high-fat diet. *Biosci Biotechnol Biochem* 70: 1798-1802.
217. Goto Y, Tanji H, Hattori A, Tsujimoto M (2008) Glutamine-181 is crucial in the enzymatic activity and substrate specificity of human endoplasmic-reticulum aminopeptidase-1. *Biochem J* 416: 109-116.
218. Liu Z, Huang Y, Zhang Y, Chen D, Zhang YQ (2011) Drosophila Acyl-CoA Synthetase Long-Chain Family Member 4 Regulates Axonal Transport of Synaptic Vesicles and Is Required for Synaptic Development and Transmission. *J Neurosci* 31: 2052-2063.
219. Meloni I, Parri V, De Filippis R, Ariani F, Artuso R, et al. (2009) The XLMR gene ACSL4 plays a role in dendritic spine architecture. *Neuroscience* 159: 657-669.

220. el-Ghissassi F, Valsesia-Wittmann S, Falette N, Duriez C, Walden PD, et al. (2002) BTG2(TIS21/PC3) induces neuronal differentiation and prevents apoptosis of terminally differentiated PC12 cells. *Oncogene* 21: 6772-6778.
221. Slevin M, Sanfeliu C, Turu MM, Grau-Olivares M, Ferrer I, et al. (2009) B-cell translocation gene 2 is over-expressed in peri-infarct neurons after ischaemic stroke. *Pathobiology* 76: 129-135.
222. Wu M, Huang H, Chen Q, Li D, Zheng Z, et al. (2007) Leucine-rich repeat C4 protein is involved in nervous tissue development and neurite outgrowth, and induction of glioma cell differentiation. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 39: 731-738.
223. Zhang Q, Wang J, Fan S, Wang L, Cao L, et al. (2005) Expression and functional characterization of LRRC4, a novel brain-specific member of the LRR superfamily. *FEBS Lett* 579: 3674-3682.
224. Zhang QH, Wang LL, Cao L, Peng C, Li XL, et al. (2005) Study of a novel brain relatively specific gene LRRC4 involved in glioma tumorigenesis suppression using the Tet-on system. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 37: 532-540.
225. Jacobs S, Ruusuvuori E, Sipila ST, Haapanen A, Damkier HH, et al. (2008) Mice with targeted Slc4a10 gene disruption have small brain ventricles and show reduced neuronal excitability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 311-316.
226. Chen LM, Choi I, Haddad GG, Boron WF (2007) Chronic continuous hypoxia decreases the expression of SLC4A7 (NBCn1) and SLC4A10 (NCBE) in mouse brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R2412-2420.
227. Gilad GM, Kagan HM, Gilad VH (2001) Lysyl oxidase, the extracellular matrix-forming enzyme, in rat brain injury sites. *Neurosci Lett* 310: 45-48.
228. Gao Z, Ure K, Ables JL, Lagace DC, Nave KA, et al. (2009) Neurod1 is essential for the survival and maturation of adult-born neurons. *Nat Neurosci* 12: 1090-1092.
229. Kuwabara T, Hsieh J, Muotri A, Yeo G, Warashina M, et al. (2009) Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nat Neurosci* 12: 1097-1105.
230. Erdo F, Trapp T, Mies G, Hossmann KA (2004) Immunohistochemical analysis of protein expression after middle cerebral artery occlusion in mice. *Acta Neuropathol* 107: 127-136.
231. Srinivasan R, Zabuawala T, Huang H, Zhang J, Gulati P, et al. (2009) Erk1 and Erk2 regulate endothelial cell proliferation and migration during mouse embryonic angiogenesis. *PLoS One* 4: e8283.
232. Datta A, Park JE, Li X, Zhang H, Ho ZS, et al. (2010) Phenotyping of an in vitro model of ischemic penumbra by iTRAQ-based shotgun quantitative proteomics. *J Proteome Res* 9: 472-484.
233. Feldman JD, Vician L, Crispino M, Hoe W, Baudry M, et al. (2000) rTLE3, a newly identified transducin-like enhancer of split, is induced by depolarization in brain. *J Neurochem* 74: 1838-1847.
234. Cheng C, Chen M, Shi S, Gao S, Niu S, et al. (2007) Effect of peripheral axotomy on gene expression of NIDD in rat neural tissues. *J Mol Neurosci* 32: 199-206.
235. Saitoh F, Tian QB, Okano A, Sakagami H, Kondo H, et al. (2004) NIDD, a novel DHHC-containing protein, targets neuronal nitric-oxide synthase (nNOS) to the synaptic membrane through a PDZ-dependent interaction and regulates nNOS activity. *J Biol Chem* 279: 29461-29468.
236. Fu R, Zhao ZQ, Zhao HY, Zhao JS, Zhu XL (2006) Expression of heme oxygenase-1 protein and messenger RNA in permanent cerebral ischemia in rats. *Neurol Res* 28: 38-45.
237. Sutherland BA, Rahman RM, Clarkson AN, Shaw OM, Nair SM, et al. (2009) Cerebral heme oxygenase 1 and 2 spatial distribution is modulated following injury from hypoxia-ischemia and middle cerebral artery occlusion in rats. *Neurosci Res* 65: 326-334.

238. Yang C, Zhang X, Fan H, Liu Y (2009) Curcumin upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia. *Brain Res* 1282: 133-141.
239. Sakata Y, Zhuang H, Kwansa H, Koehler RC, Dore S (2010) Resveratrol protects against experimental stroke: putative neuroprotective role of heme oxygenase 1. *Exp Neurol* 224: 325-329.
240. Saleem S, Zhuang H, Biswal S, Christen Y, Dore S (2008) Ginkgo biloba extract neuroprotective action is dependent on heme oxygenase 1 in ischemic reperfusion brain injury. *Stroke* 39: 3389-3396.
241. Koh JT, Lee ZH, Ahn KY, Kim JK, Bae CS, et al. (2001) Characterization of mouse brain-specific angiogenesis inhibitor 1 (BAI1) and phytanoyl-CoA alpha-hydroxylase-associated protein 1, a novel BAI1-binding protein. *Brain Res Mol Brain Res* 87: 223-237.
242. Keely S, Glover LE, MacManus CF, Campbell EL, Scully MM, et al. (2009) Selective induction of integrin beta1 by hypoxia-inducible factor: implications for wound healing. *FASEB J* 23: 1338-1346.
243. Carlson TR, Hu H, Braren R, Kim YH, Wang RA (2008) Cell-autonomous requirement for beta1 integrin in endothelial cell adhesion, migration and survival during angiogenesis in mice. *Development* 135: 2193-2202.
244. Blaess S, Graus-Porta D, Belvindrah R, Radakovits R, Pons S, et al. (2004) Beta1-integrins are critical for cerebellar granule cell precursor proliferation. *J Neurosci* 24: 3402-3412.
245. Suzuki I, Owada Y, Suzuki R, Yoshimoto T, Kondo H (2001) Localization of mRNAs for six ARFs (ADP-ribosylation factors) in the brain of developing and adult rats and changes in the expression in the hypoglossal nucleus after its axotomy. *Brain Res Mol Brain Res* 88: 124-134.
246. Brot S, Rogemond V, Perrot V, Chounlamountri N, Auger C, et al. (2010) CRMP5 interacts with tubulin to inhibit neurite outgrowth, thereby modulating the function of CRMP2. *J Neurosci* 30: 10639-10654.
247. Jiang SX, Kappler J, Zurakowski B, Desbois A, Aylsworth A, et al. (2007) Calpain cleavage of collapsin response mediator proteins in ischemic mouse brain. *Eur J Neurosci* 26: 801-809.
248. Korth C (2009) DISCopathies: brain disorders related to DISC1 dysfunction. *Rev Neurosci* 20: 321-330.
249. Shmueli A, Segal M, Sapir T, Tsutsumi R, Noritake J, et al. (2010) Ndel1 palmitoylation: a new mean to regulate cytoplasmic dynein activity. *EMBO J* 29: 107-119.
250. Kim YD, Sohn NW, Kang C, Soh Y (2002) DNA array reveals altered gene expression in response to focal cerebral ischemia. *Brain Res Bull* 58: 491-498.
251. Poulsen TT, Pedersen N, Perin MS, Hansen CK, Poulsen HS (2005) Specific sensitivity of small cell lung cancer cell lines to the snake venom toxin taipoxin. *Lung Cancer* 50: 329-337.
252. Sugimoto C, Maekawa S, Miyata S (2010) OBCAM, an immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule, regulates morphology and proliferation of cerebral astrocytes. *J Neurochem* 112: 818-828.
253. Hachisuka A, Nakajima O, Yamazaki T, Sawada J (2000) Developmental expression of opioid-binding cell adhesion molecule (OBCAM) in rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 122: 183-191.
254. De Luca M, Klimentidis YC, Casazza K, Chambers MM, Cho R, et al. (2010) A conserved role for syndecan family members in the regulation of whole-body energy metabolism. *PLoS One* 5: e11286.
255. Iseki K, Hagino S, Mori T, Zhang Y, Yokoya S, et al. (2002) Increased syndecan expression by pleiotrophin and FGF receptor-expressing astrocytes in injured brain tissue. *Glia* 39: 1-9.

256. Properzi F, Lin R, Kwok J, Naidu M, van Kuppevelt TH, et al. (2008) Heparan sulphate proteoglycans in glia and in the normal and injured CNS: expression of sulphotransferases and changes in sulphation. *Eur J Neurosci* 27: 593-604.
257. Oh JH, Lee HS, Park SH, Ryu HS, Min CK (2010) Syndecan-1 overexpression promotes tumor growth and angiogenesis in an endometrial cancer xenograft model. *Int J Gynecol Cancer* 20: 751-756.
258. Multhaupt HA, Yoneda A, Whiteford JR, Oh ES, Lee W, et al. (2009) Syndecan signaling: when, where and why? *J Physiol Pharmacol* 60 Suppl 4: 31-38.
259. Muto Y, Sato K (2003) Pivotal role of attractin in cell survival under oxidative stress in the zitter rat brain with genetic spongiform encephalopathy. *Brain Res Mol Brain Res* 111: 111-122.
260. Hwang J, Adamson C, Butler D, Janero DR, Makriyannis A, et al. (2010) Enhancement of endocannabinoid signaling by fatty acid amide hydrolase inhibition: a neuroprotective therapeutic modality. *Life Sci* 86: 615-623.
261. Tang X, Jang SW, Okada M, Chan CB, Feng Y, et al. (2008) Netrin-1 mediates neuronal survival through PIKE-L interaction with the dependence receptor UNC5B. *Nat Cell Biol* 10: 698-706.
262. Schmidt-Kastner R, van Os J, H WMS, Schmitz C (2006) Gene regulation by hypoxia and the neurodevelopmental origin of schizophrenia. *Schizophr Res* 84: 253-271.
263. Ponnio T, Conneely OM (2004) nor-1 regulates hippocampal axon guidance, pyramidal cell survival, and seizure susceptibility. *Mol Cell Biol* 24: 9070-9078.
264. Martorell L, Gentile M, Rius J, Rodriguez C, Crespo J, et al. (2009) The hypoxia-inducible factor 1/NOR-1 axis regulates the survival response of endothelial cells to hypoxia. *Mol Cell Biol* 29: 5828-5842.
265. Rius J, Martinez-Gonzalez J, Crespo J, Badimon L (2006) NOR-1 is involved in VEGF-induced endothelial cell growth. *Atherosclerosis* 184: 276-282.
266. Kim Y, Hong S, Noh MR, Kim SY, Huh PW, et al. (2006) Induction of neuron-derived orphan receptor-1 in the dentate gyrus of the hippocampal formation following transient global ischemia in the rat. *Mol Cells* 22: 8-12.
267. Adachi K, Toyota M, Sasaki Y, Yamashita T, Ishida S, et al. (2004) Identification of SCN3B as a novel p53-inducible proapoptotic gene. *Oncogene* 23: 7791-7798.
268. Tuy FP, Saillour Y, Kappeler C, Chelly J, Francis F (2008) Alternative transcripts of Dclk1 and Dclk2 and their expression in doublecortin knockout mice. *Dev Neurosci* 30: 171-186.
269. Verissimo CS, Molenaar JJ, Meerman J, Puigvert JC, Lamers F, et al. (2010) Silencing of the microtubule-associated proteins doublecortin-like and doublecortin-like kinase-long induces apoptosis in neuroblastoma cells. *Endocr Relat Cancer* 17: 399-414.
270. Hill WD, Hess DC, Martin-Studdard A, Carothers JJ, Zheng J, et al. (2004) SDF-1 (CXCL12) is upregulated in the ischemic penumbra following stroke: association with bone marrow cell homing to injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 63: 84-96.
271. Schonemeier B, Schulz S, Hoell V, Stumm R (2008) Enhanced expression of the CXCL12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 after cerebral ischemia in the rat brain. *J Neuroimmunol* 198: 39-45.
272. Fan Y, Shen F, Frenzel T, Zhu W, Ye J, et al. (2010) Endothelial progenitor cell transplantation improves long-term stroke outcome in mice. *Ann Neurol* 67: 488-497.
273. Hiesinger W, Frederick JR, Atluri P, McCormick RC, Marotta N, et al. (2010) Spliced stromal cell-derived factor-1alpha analog stimulates endothelial progenitor cell migration and improves cardiac function in a dose-dependent manner after myocardial infarction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 140: 1174-1180.
274. Li M, Ransohoff RM (2008) Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: a migration from immunology to neurobiology. *Prog Neurobiol* 84: 116-131.

275. Thored P, Arvidsson A, Cacci E, Ahlenius H, Kallur T, et al. (2006) Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells* 24: 739-747.
276. Li L, Lundkvist A, Andersson D, Wilhelmsson U, Nagai N, et al. (2008) Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 28: 468-481.
277. Lu YB, Iandiev I, Hollborn M, Korber N, Ulbricht E, et al. (2011) Reactive glial cells: increased stiffness correlates with increased intermediate filament expression. *FASEB J* 25: 624-631.
278. Pekny M, Wilhelmsson U, Bogestal YR, Pekna M (2007) The role of astrocytes and complement system in neural plasticity. *Int Rev Neurobiol* 82: 95-111.
279. Widestrand A, Fajerson J, Wilhelmsson U, Smith PL, Li L, et al. (2007) Increased neurogenesis and astrogenesis from neural progenitor cells grafted in the hippocampus of GFAP^{-/-} Vim^{-/-} mice. *Stem Cells* 25: 2619-2627.
280. Wayman GA, Davare M, Ando H, Fortin D, Varlamova O, et al. (2008) An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by down-regulating p250GAP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 9093-9098.
281. Impey S, Davare M, Lasiek A, Fortin D, Ando H, et al. (2010) An activity-induced microRNA controls dendritic spine formation by regulating Rac1-PAK signaling. *Mol Cell Neurosci* 43: 146-156.
282. Cassel S, Revel MO, Kelche C, Zwiller J (2004) Expression of the methyl-CpG-binding protein MeCP2 in rat brain. An ontogenetic study. *Neurobiol Dis* 15: 206-211.
283. Russell JC, Blue ME, Johnston MV, Naidu S, Hossain MA (2007) Enhanced cell death in MeCP2 null cerebellar granule neurons exposed to excitotoxicity and hypoxia. *Neuroscience* 150: 563-574.
284. Tsujimura K, Abematsu M, Kohyama J, Namihira M, Nakashima K (2009) Neuronal differentiation of neural precursor cells is promoted by the methyl-CpG-binding protein MeCP2. *Exp Neurol* 219: 104-111.
285. Ji R, Cheng Y, Yue J, Yang J, Liu X, et al. (2007) MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circ Res* 100: 1579-1588.
286. Bonefeld BE, Elfving B, Wegener G (2008) Reference genes for normalization: a study of rat brain tissue. *Synapse* 62: 302-309.
287. McNeill RE, Miller N, Kerin MJ (2007) Evaluation and validation of candidate endogenous control genes for real-time quantitative PCR studies of breast cancer. *BMC Mol Biol* 8: 107.
288. Rhinn H, Marchand-Leroux C, Croci N, Plotkine M, Scherman D, et al. (2008) Housekeeping while brain's storming Validation of normalizing factors for gene expression studies in a murine model of traumatic brain injury. *BMC Mol Biol* 9: 62.
289. Tanic N, Perovic M, Mladenovic A, Ruzdijic S, Kanazir S (2007) Effects of aging, dietary restriction and glucocorticoid treatment on housekeeping gene expression in rat cortex and hippocampus-evaluation by real time RT-PCR. *J Mol Neurosci* 32: 38-46.
290. Bond BC, Virley DJ, Cairns NJ, Hunter AJ, Moore GB, et al. (2002) The quantification of gene expression in an animal model of brain ischaemia using TaqMan real-time RT-PCR. *Brain Res Mol Brain Res* 106: 101-116.
291. Buga AM, Sascau M, Pisoschi C, Herndon JG, Kessler C, et al. (2008) The genomic response of the ipsilateral and contralateral cortex to stroke in aged rats. *J Cell Mol Med* 12: 2731-2753.
292. Keyvani K, Witte OW, Paulus W (2002) Gene expression profiling in perilesional and contralateral areas after ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 22: 153-160.
293. Spiegler M, Villapol S, Biran V, Goyenvalle C, Mariani J, et al. (2007) Bilateral changes after neonatal ischemia in the P7 rat brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 66: 481-490.

294. Candelario-Jalil E, Fiebich BL (2008) Cyclooxygenase inhibition in ischemic brain injury. *Curr Pharm Des* 14: 1401-1418.
295. Sobrado M, Pereira MP, Ballesteros I, Hurtado O, Fernandez-Lopez D, et al. (2009) Synthesis of lipoxin A4 by 5-lipoxygenase mediates PPARgamma-dependent, neuroprotective effects of rosiglitazone in experimental stroke. *J Neurosci* 29: 3875-3884.
296. Chen J, Graham SH, Chan PH, Lan J, Zhou RL, et al. (1995) bcl-2 is expressed in neurons that survive focal ischemia in the rat. *Neuroreport* 6: 394-398.
297. Matsushita K, Matsuyama T, Kitagawa K, Matsumoto M, Yanagihara T, et al. (1998) Alterations of Bcl-2 family proteins precede cytoskeletal proteolysis in the penumbra, but not in infarct centres following focal cerebral ischemia in mice. *Neuroscience* 83: 439-448.
298. Brembeck FH, Rosario M, Birchmeier W (2006) Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev* 16: 51-59.
299. Zhang L, Yang X, Yang S, Zhang J (2011) The Wnt/beta-catenin signaling pathway in the adult neurogenesis. *Eur J Neurosci* 33: 1-8.
300. Hua F, Ma J, Ha T, Kelley JL, Kao RL, et al. (2009) Differential roles of TLR2 and TLR4 in acute focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Brain Res* 1262: 100-108.
301. Hanke ML, Kielian T (2011) Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)* 121: 367-387.
302. Okun E, Griffioen KJ, Mattson MP (2011) Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease. *Trends Neurosci* 34: 269-281.
303. Campbell HD, Fountain S, McLennan IS, Berven LA, Crouch MF, et al. (2002) Fliih, a gelsolin-related cytoskeletal regulator essential for early mammalian embryonic development. *Mol Cell Biol* 22: 3518-3526.
304. Etienne-Manneville S, Hall A (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420: 629-635.
305. Kopecki Z, Arkell R, Powell BC, Cowin AJ (2009) Flightless I regulates hemidesmosome formation and integrin-mediated cellular adhesion and migration during wound repair. *J Invest Dermatol* 129: 2031-2045.
306. Vogel C, Marcotte EM (2012) Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet* 13: 227-232.
307. Ridder DA, Schwaninger M (2009) NF-kappaB signaling in cerebral ischemia. *Neuroscience* 158: 995-1006.
308. Hahn-Windgassen A, Nogueira V, Chen CC, Skeen JE, Sonenberg N, et al. (2005) Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *J Biol Chem* 280: 32081-32089.
309. Marone R, Cmiljanovic V, Giese B, Wymann MP (2008) Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy. *Biochim Biophys Acta* 1784: 159-185.
310. Schmelzle T, Hall MN (2000) TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 103: 253-262.
311. Chong ZZ, Shang YC, Wang S, Maiese K (2012) A Critical Kinase Cascade in Neurological Disorders: PI 3-K, Akt, and mTOR. *Future Neurol* 7: 733-748.
312. Shi GX, Andres DA, Cai W (2011) Ras family small GTPase-mediated neuroprotective signaling in stroke. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 11: 114-137.
313. Chong ZZ, Shang YC, Zhang L, Wang S, Maiese K (2010) Mammalian target of rapamycin: hitting the bull's-eye for neurological disorders. *Oxid Med Cell Longev* 3: 374-391.
314. Florian B, Vintilescu R, Balseanu AT, Buga AM, Grisk O, et al. (2008) Long-term hypothermia reduces infarct volume in aged rats after focal ischemia. *Neurosci Lett* 438: 180-185.
315. Jiang W, Zhang S, Fu F, Zhu H, Hou J (2010) Inhibition of nuclear factor-kappaB by 6-O-acetyl shanzhiside methyl ester protects brain against injury in a rat model of ischemia and reperfusion. *J Neuroinflammation* 7: 55.

316. Yuan Y, Guo Q, Ye Z, Pingping X, Wang N, et al. (2011) Ischemic postconditioning protects brain from ischemia/reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through PI3K-Akt pathway. *Brain Res* 1367: 85-93.
317. Joseph C, Buga AM, Vintilescu R, Balseanu AT, Moldovan M, et al. (2012) Prolonged gaseous hypothermia prevents the upregulation of phagocytosis-specific protein annexin 1 and causes low-amplitude EEG activity in the aged rat brain after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 32: 1632-1642.
318. Tyburczy ME, Kotulska K, Pokarowski P, Mieczkowski J, Kucharska J, et al. (2010) Novel proteins regulated by mTOR in subependymal giant cell astrocytomas of patients with tuberous sclerosis complex and new therapeutic implications. *Am J Pathol* 176: 1878-1890.
319. Choi DW, Rothman SM (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 13: 171-182.
320. Rothman SM, Olney JW (1986) Glutamate and the pathophysiology of hypoxic--ischemic brain damage. *Ann Neurol* 19: 105-111.
321. Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65: 1-105.
322. Gegelashvili G, Robinson MB, Trotti D, Rauen T (2001) Regulation of glutamate transporters in health and disease. *Prog Brain Res* 132: 267-286.
323. Seal RP, Amara SG (1999) Excitatory amino acid transporters: a family in flux. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 431-456.
324. Takahashi M, Billups B, Rossi D, Sarantis M, Hamann M, et al. (1997) The role of glutamate transporters in glutamate homeostasis in the brain. *J Exp Biol* 200: 401-409.
325. Li S, Mallory M, Alford M, Tanaka S, Masliah E (1997) Glutamate transporter alterations in Alzheimer disease are possibly associated with abnormal APP expression. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 901-911.
326. Lin CL, Bristol LA, Jin L, Dykes-Hoberg M, Crawford T, et al. (1998) Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* 20: 589-602.
327. Lipton SA, Rosenberg PA (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330: 613-622.
328. Buga AM, Scholz CJ, Kumar S, Herndon JG, Alexandru D, et al. (2012) Identification of new therapeutic targets by genome-wide analysis of gene expression in the ipsilateral cortex of aged rats after stroke. *PLoS One* 7: e50985.
329. Wang X, Zhang X, Ren XP, Chen J, Liu H, et al. (2010) MicroRNA-494 targeting both proapoptotic and antiapoptotic proteins protects against ischemia/reperfusion-induced cardiac injury. *Circulation* 122: 1308-1318.
330. Kulshreshtha R, Davuluri RV, Calin GA, Ivan M (2008) A microRNA component of the hypoxic response. *Cell Death Differ* 15: 667-671.
331. Bray I, Tivnan A, Bryan K, Foley NH, Watters KM, et al. (2011) MicroRNA-542-5p as a novel tumor suppressor in neuroblastoma. *Cancer Lett* 303: 56-64.
332. Lehmann U, Streichert T, Otto B, Albat C, Hasemeier B, et al. (2010) Identification of differentially expressed microRNAs in human male breast cancer. *BMC Cancer* 10: 109.
333. Patterson EE, Holloway AK, Weng J, Fojo T, Kebebew E (2011) MicroRNA profiling of adrenocortical tumors reveals miR-483 as a marker of malignancy. *Cancer* 117: 1630-1639.
334. Schulte JH, Schowe B, Mestdagh P, Kaderali L, Kalaghatgi P, et al. (2010) Accurate prediction of neuroblastoma outcome based on miRNA expression profiles. *Int J Cancer* 127: 2374-2385.
335. Veronese A, Lupini L, Consiglio J, Visone R, Ferracin M, et al. (2010) Oncogenic role of miR-483-3p at the IGF2/483 locus. *Cancer Res* 70: 3140-3149.

336. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, et al. (2002) Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 12: 735-739.
337. Doench JG, Sharp PA (2004) Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* 18: 504-511.
338. Tirone F (2001) The gene PC3(TIS21/BTG2), prototype member of the PC3/BTG/TOB family: regulator in control of cell growth, differentiation, and DNA repair? *J Cell Physiol* 187: 155-165.
339. Morel AP, Sentis S, Bianchin C, Le Romancer M, Jonard L, et al. (2003) BTG2 antiproliferative protein interacts with the human CCR4 complex existing in vivo in three cell-cycle-regulated forms. *J Cell Sci* 116: 2929-2936.
340. Veyrac A, Reibel S, Sacquet J, Mutin M, Camdessanche JP, et al. (2011) CRMP5 regulates generation and survival of newborn neurons in olfactory and hippocampal neurogenic areas of the adult mouse brain. *PLoS One* 6: e23721.
341. Tsai SC, Adamik R, Tsuchiya M, Chang PP, Moss J, et al. (1991) Differential expression during development of ADP-ribosylation factors, 20-kDa guanine nucleotide-binding protein activators of cholera toxin. *J Biol Chem* 266: 8213-8219.
342. Altman J (1972) Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. II. Phases in the maturation of Purkinje cells and of the molecular layer. *J Comp Neurol* 145: 399-463.
343. Peters PJ, Ning K, Palacios F, Boshans RL, Kazantsev A, et al. (2002) Arfaptin 2 regulates the aggregation of mutant huntingtin protein. *Nat Cell Biol* 4: 240-245.
344. Ho WT, Exton JH, Williger BT (2003) Arfaptin 1 inhibits ADP-ribosylation factor-dependent matrix metalloproteinase-9 secretion induced by phorbol ester in HT 1080 fibrosarcoma cells. *FEBS Lett* 537: 91-95.
345. Phillis JW, O'Regan MH (2004) A potentially critical role of phospholipases in central nervous system ischemic, traumatic, and neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 44: 13-47.
346. Piccini M, Vitelli F, Bruttini M, Pober BR, Jonsson JJ, et al. (1998) *FACL4*, a new gene encoding long-chain acyl-CoA synthetase 4, is deleted in a family with Alport syndrome, elliptocytosis, and mental retardation. *Genomics* 47: 350-358.
347. Cao Y, Traer E, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM (1998) Cloning, expression, and chromosomal localization of human long-chain fatty acid-CoA ligase 4 (*FACL4*). *Genomics* 49: 327-330.
348. Cao Y, Murphy KJ, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM (2000) Expression of fatty acid-CoA ligase 4 during development and in brain. *FEBS Lett* 467: 263-267.
349. Cho YY (2012) A novel role of brain-type ACS4 isotype in neuronal differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 419: 505-510.
350. Maloberti PM, Duarte AB, Orlando UD, Pasqualini ME, Solano AR, et al. (2010) Functional interaction between acyl-CoA synthetase 4, lipooxygenases and cyclooxygenase-2 in the aggressive phenotype of breast cancer cells. *PLoS One* 5: e15540.
351. Nogawa S, Zhang F, Ross ME, Iadecola C (1997) Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J Neurosci* 17: 2746-2755.

9. ANEXOS

Anexo I – Publicaciones derivadas de la tesi doctoral

Gubern C, Hurtado O, Rodríguez R, Morales JR, Romera VG, Moro MA, Lizasoain I, Serena J, Mallolas J. Validation of housekeeping genes for quantitative real-time PCR in in-vivo and in-vitro models of cerebral ischaemia. *BMC Mol Biol.* 2009 Jun 16;10:57. FI: 2.810

Gubern C, Camós S, Ballesteros I, Rodríguez R, Romera VG, Cañadas R, Lizasoain I, Moro MA, Serena J, Mallolas J, Castellanos M. miRNA expression is modulated over time after focal ischaemia: up-regulation of miR-347 promotes neuronal apoptosis. *FEBS J.* 2013 Dec;280(23):6233-46. FI: 4.250

Gubern C, Camós S, Hurtado O, Rodríguez R, Romera VG, Sobrado M, Cañadas R, Moro MA, Lizasoain I, Serena J, Mallolas J, CastellanosM. Characterisation of Gcf2/Lrrfip1 in experimental cerebral ischaemia and its role as a modulator of Akt, mTOR and β -catenin signalling pathways. *Neuroscience.* 2014 Mar 14;268C:48-65. FI: 3.122

Research article

Open Access

Validation of housekeeping genes for quantitative real-time PCR in in-vivo and in-vitro models of cerebral ischaemia

Carme Gubern¹, Olivia Hurtado², Rocío Rodríguez¹, Jesús R Morales², Víctor G Romera¹, María A Moro², Ignacio Lizasoain², Joaquín Serena¹ and Judith Mallolas*¹

Address: ¹Servei de Neurologia, Fundació Privada Institut d'Investigació Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta (IdIBGi), Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta, Girona, Spain and ²Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Madrid, Spain

Email: Carme Gubern - cgubern.girona.ics@gencat.cat; Olivia Hurtado - olhurtad@med.ucm.es; Rocío Rodríguez - rocirodriguez.girona.ics@gencat.cat; Jesús R Morales - jrmorales@med.ucm.es; Víctor G Romera - vromera@gmail.com; María A Moro - neurona@med.ucm.es; Ignacio Lizasoain - ignacio.lizasoain@med.ucm.es; Joaquín Serena - jserena.girona.ics@gencat.cat; Judith Mallolas* - jmallolas.girona.ics@gencat.cat

* Corresponding author

Published: 16 June 2009

Received: 3 November 2008

BMC Molecular Biology 2009, **10**:57 doi:10.1186/1471-2199-10-57

Accepted: 16 June 2009

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2199/10/57>

© 2009 Gubern et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Studies of gene expression in experimental cerebral ischaemia models can contribute to understanding the pathophysiology of brain ischaemia and to identifying prognostic markers and potential therapeutic targets. The normalization of relative qRT-PCR data using a suitable reference gene is a crucial prerequisite for obtaining reliable conclusions. No validated housekeeping genes have been reported for the relative quantification of the mRNA expression profile activated in in-vitro ischaemic conditions, whereas for the in-vivo model different reference genes have been used.

The present study aims to determine the expression stability of ten housekeeping genes (Gapdh, β 2m, Hprt, Ppia, Rpl13a, Oaz1, 18S rRNA, Gusb, Ywhaz and Sdha) to establish their suitability as control genes for in-vitro and in-vivo cerebral ischaemia models.

Results: The expression stability of the candidate reference genes was evaluated using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method and ANOVA followed by Dunnett's test. For the in-vitro model using primary cultures of rat astrocytes, all genes analysed except for Rpl13a and Sdha were found to have significantly different levels of mRNA expression. These different levels were also found in the case of the in-vivo model of pMCAO in rats except for Hprt, Sdha and Ywhaz mRNA, where the expression did not vary. Sdha and Ywhaz were identified by geNorm and NormFinder as the two most stable genes.

Conclusion: We have validated endogenous control genes for qRT-PCR analysis of gene expression in in-vitro and in-vivo cerebral ischaemia models. For normalization purposes, Rpl13a and Sdha are found to be the most suitable genes for the in-vitro model and Sdha and Ywhaz for the in-vivo model. Genes previously used as housekeeping genes for the in-vivo model in the literature were not validated as good control genes in the present study, showing the need for careful evaluation for each new experimental setup.

Background

Oxygen-glucose deprivation (OGD) and middle cerebral artery occlusion (MCAO) are accepted as in-vitro and in-vivo cerebral ischaemia models [1-4]. The permanent MCAO (pMCAO) focal ischaemia model is widely used in stroke research and is helpful in elucidating physiopathological causes and identifying prognostic markers and potential therapeutic targets [5-9].

Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) is a powerful technique for gene expression studies due to its high sensitivity, specificity and broad quantification range for high throughput and accurate expression profiling of selected genes [10]. The data obtained by quantitative RT-PCR (qRT-PCR) is typically normalised with an internal control, often referred to as a housekeeping gene. Up to now, several mathematical methods, such as NormFinder [11], geNorm [12] and $2^{-\Delta CT}$ method [13], have been developed to analyse the variability of the expression of candidate housekeeping genes. The ideal housekeeping gene for qRT-PCR would be one whose mRNA is consistently expressed at the same level in all samples under investigation, regardless of tissue type, disease state, medication or experimental conditions, and would have expression levels comparable to that of the target [14,15]. However, no ideal reference gene has yet been discovered and it is reasonable to suppose that such a gene may not exist. Although different genes have been used, several previous studies have shown that the suitability of a particular reference gene depends on the insult, lesion and experimental conditions applied to the cell culture or experimental animal [16,17]. Therefore, careful evaluation and validation of control genes is required prior to using them in each individual case to avoid possible inaccuracies stemming from the use of an unsuitable reference gene [14,16,18-20].

In addition, no validated housekeeping genes have been reported for the relative quantification of the mRNA expression profile activated in in-vitro ischaemic conditions. With regards to the in-vivo model (pMCAO), *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (Gapdh) [16,21,22], *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerasa* (Ppia) [21-23], *Ribosomal Protein L13A* (Rpl13a) [23] and *Hypoxanthine phosphoribosyltransferase* (Hprt) [16] have previously been accepted as control genes. The aim of this study was to confirm the validity of these reference genes in our pMCAO samples and to test their usefulness as endogenous controls in the in-vitro model using primary cultures of rat astrocytes. Furthermore, we aimed to analyse the expression stability of other reference genes that have been used, *Beta-2 microglobulin* ($\beta 2m$) and *18S rRNA* [24], *Glucoronidase B* (Gusb) [25], *Succinate dehydrogenase complex, subunit A* (Sdha) [14,25,26], *Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide* (Ywhaz) [14,26] and a new candidate gene for the in-vivo model,

Ornithine decarboxylase antizyme 1 (Oaz1), which has been hypothesised as being suitable in experimental conditions involving high protein turn-over [10].

Results

Evaluation and validation of selected candidate housekeeping genes in an in-vitro ischaemia model

The results of gene expression of Gapdh, Hprt, Ppia, 18S rRNA, $\beta 2m$, Oaz1, Gusb, Ywhaz, Sdha and Rpl13a from astrocytes exposed to OGD during 3 hours and collected at 0 minutes, 30 minutes, 2, 6, 24 and 48 hours after reperfusion are shown in Figure 1.

The expression of Gapdh was found to have significant fluctuations in the levels of mRNA ($p < 0.0001$) increasing significantly at 0 h after reperfusion ($p < 0.05$) whereas no significant differences were observed at other points (Figure 1A). The expression of Hprt, in comparison to the control group, was found to fluctuate significantly in all the groups as a whole ($p < 0.0001$). This fluctuation was a significant increase at 0 min ($p < 0.0001$), 30 min ($p < 0.01$) and 6 h after reperfusion ($p < 0.0001$) (Figure 1B). Significant differences in the expression of Ppia were found between time groups ($p < 0.0001$). Levels increased at 0 and 30 min ($p < 0.0001$ in both cases) and at 2 h and 6 h ($p < 0.05$ in both cases) after reperfusion in comparison with the control group (Figure 1C). The 18S rRNA mRNA showed significant level fluctuations ($p < 0.0001$). Levels decreased at 24 h ($p < 0.01$) and 48 h ($p < 0.0001$) after reperfusion (Figure 1D). Changes in $\beta 2m$ mRNA levels were found to be significant between time groups ($p < 0.0001$). $\beta 2m$ expression decreased at 0 min ($p < 0.01$), 30 min and 6 h ($p < 0.0001$ in both cases) and 48 h ($p < 0.05$) in comparison with the control group (Figure 1E). Oaz1 also showed significant differences in expression between groups ($p < 0.0001$). The expression was stable at the first four analysis times but decreased significantly at 24 h ($p < 0.01$) and 48 h ($p < 0.05$) (Figure 1F). Significant fluctuations in the mRNA expression of Gusb were found ($p < 0.0001$) decreasing at 2 h after reperfusion ($p < 0.0001$) (Figure 1G). The expression of Ywhaz was found to have significant fluctuations in mRNA levels ($p < 0.0001$) (Figure 1H). Analysis of the same samples with a specific gene expression assay for Sdha and Rpl13a did not reveal any significant differences in expressions at the different time points when analysis was made ($p = 0.065$ and $p = 0.244$, respectively) (Figure 1I and 1J).

Evaluation and validation of selected candidate housekeeping genes in an in-vivo cerebral ischaemia model

The gene expression of candidate housekeeping genes, $\beta 2m$, Rpl13a, Oaz1, Gapdh, Ppia, Gusb, 18SrRNA, Sdha, Ywhaz and Hprt, in cerebral cortex samples collected at 30 minutes and 2, 6, 24, 48 and 72 hours after pMCAO is shown in Figure 2.

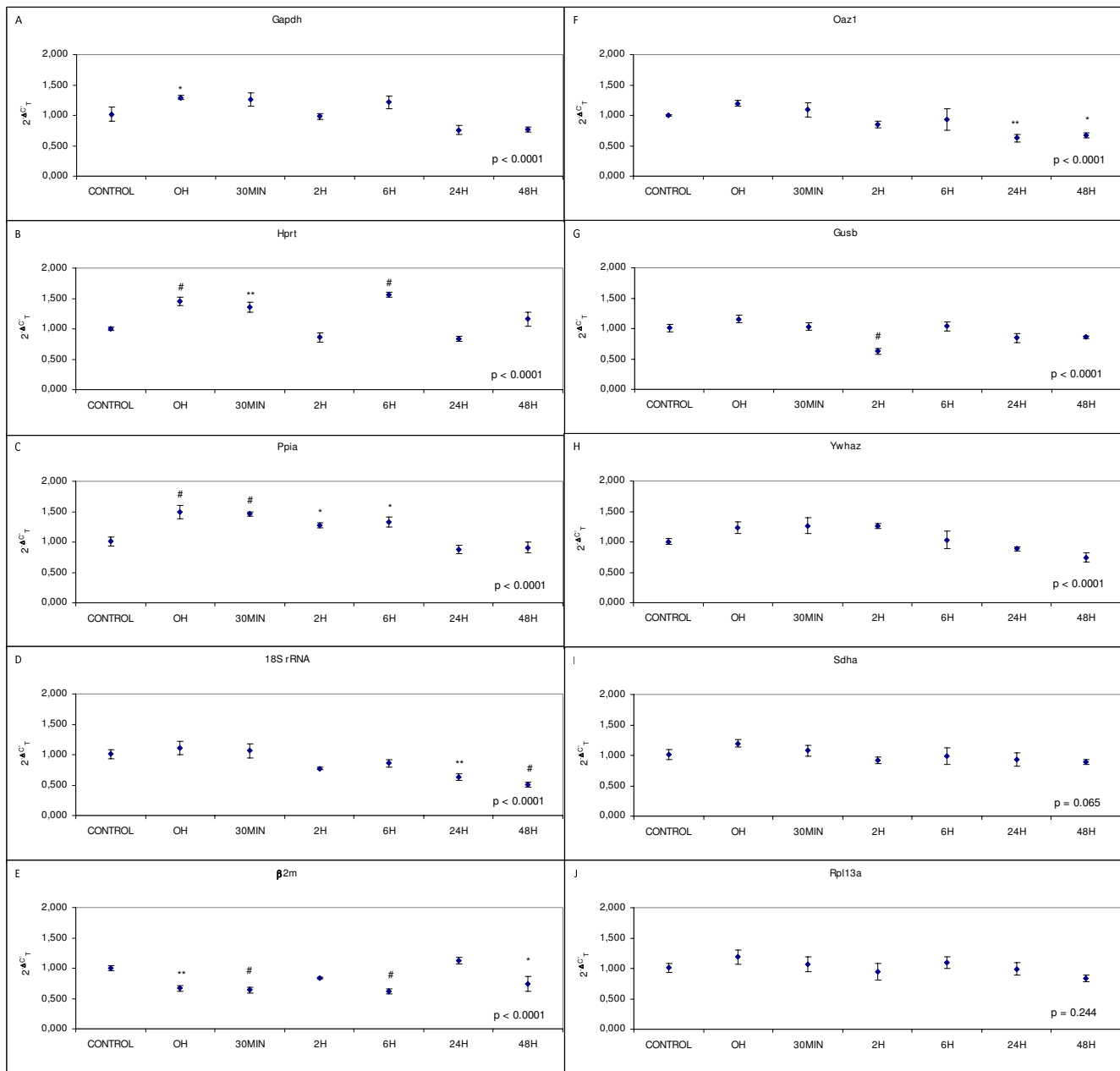


Figure 1
Effects of OGD in astrocyte expression of housekeeping genes: (A) Gapdh, (B) Hprt, (C) Ppia, (D) 18S rRNA, (E) β2m, (F) Oaz1, (G) Gusb, (H) Ywhaz, (I) Sdha and (J) Rpl13a. Fold change in gene expression analysed by the $2^{-\Delta CT}$ (see methods for details). Data are mean ± S.E.M., n = 3: * p < 0.05, ** p < 0.01, # p < 0.0001 vs. control.

β2m expression presented a significant increase at 48 and 72 h (p < 0.0001 in both cases) and was significantly different between groups (p < 0.0001) (Figure 2A). The expression of Rpl13a increased 72 h after pMCAO (p < 0.05) with a significant fluctuation between groups (p < 0.01) (Figure 2B). The level of mRNA variation of Oaz1 was found to be significant for all the time groups taken as a whole (p < 0.01) (Figure 2C). Significant differences

were found between groups for the expression of Ppia (p < 0.0001) with mRNA decreasing significantly at 2 and 6 h (p < 0.01 in both cases) after pMCAO (Figure 2D). The expression of Gusb was found to fluctuate significantly between the different test points (p < 0.0001). At 48 h and 72 h, levels of Gusb mRNA had increased (p < 0.01 and p < 0.0001 respectively) (Figure 2E). The level of the mRNA of 18S rRNA showed significant fluctuation (p < 0.05)

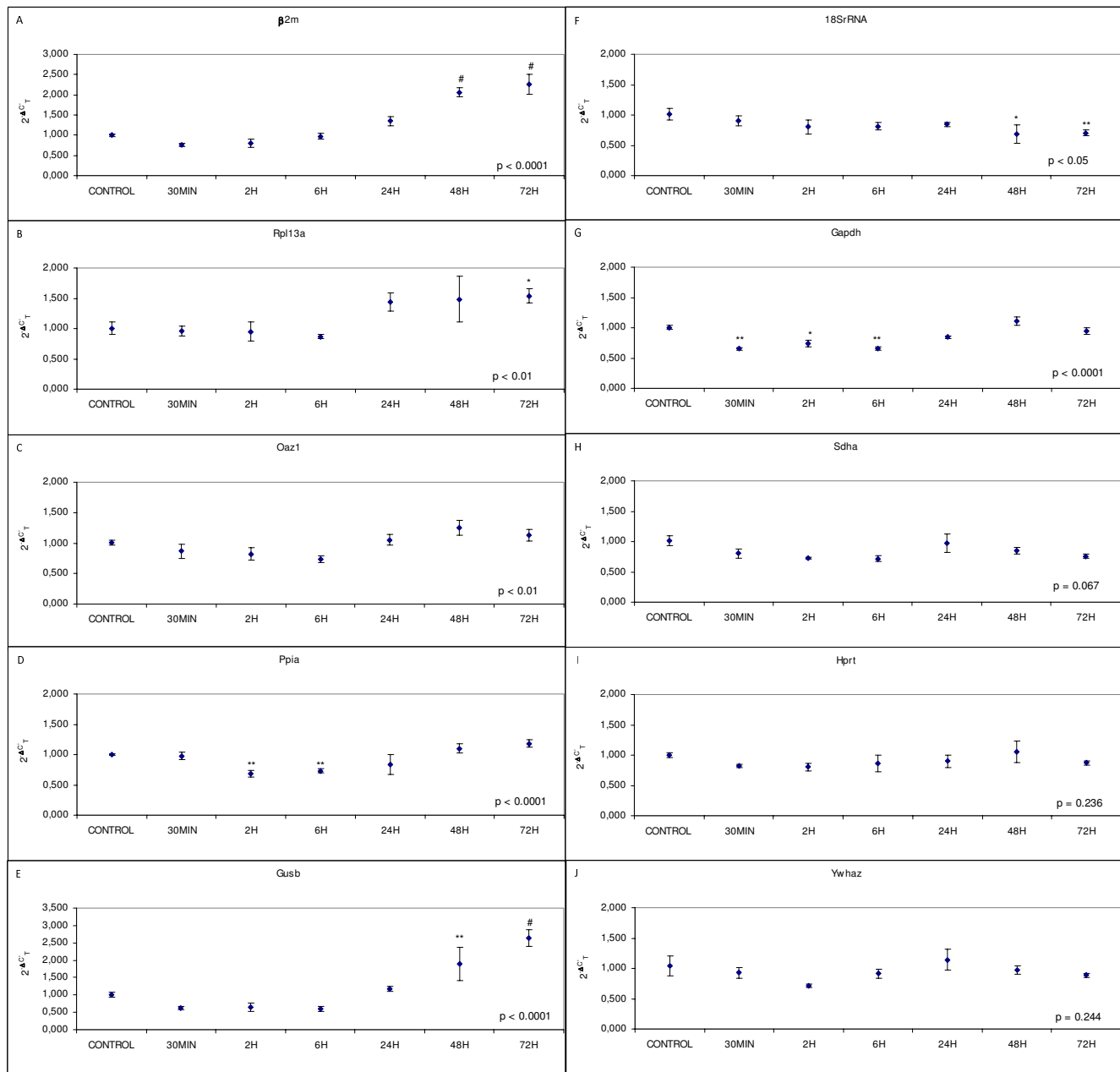


Figure 2
Effects of pMCAO in expression of housekeeping genes: (A) $\beta 2m$, (B) Rpl13a, (C) Oaz1, (D) Ppia, (E) Gusb, (F) 18SrRNA, (G) Gapdh, (H) Sdha, (I) Hprt and (J) Ywhaz. Fold change in gene expression analysed by the $2^{-\Delta CT}$ (see methods for details). Data are mean \pm S.E.M., n = 6: * p < 0.05, ** p < 0.01, # p < 0.0001 vs. control.

decreasing significantly at 48 h (p < 0.05) and 72 h (p < 0.01) (Figure 2F). Changes in Gapdh mRNA levels were found to be significant between time groups (p < 0.0001). Gapdh expression decreased at 30 min (p < 0.01), 2 h (p < 0.05) and 6 h (p < 0.01) in comparison with the control group (Figure 2G). mRNA expression was invariable under in-vivo ischaemic brain conditions for the Sdha (p

= 0.067), Hprt (p = 0.236) and Ywhaz (p = 0.244) genes (Figure 2H–2J).

The stability of these three genes was evaluated using geNorm and NormFinder algorithms. GeNorm identified Ywhaz and Sdha as the most stable pairwise combination of reference genes for the in-vivo ischaemia

model (Figure 3A). Figure 3B shows the pairwise variation value (V) between two sequential normalization factors containing an increasing number of genes. As we only analysed three genes, the figure shows the pairwise variation value of V2/3 (0.000). According to Vandesompele et al. [12], the ideal pairwise variation value is less

than 0.15 and therefore two genes, in our case Ywhaz and Sdha, are enough for normalization. NormFinder identified Ywhaz as the most stable gene with a stability value of 0.023 and, as with geNorm, the best two genes for normalization were Ywhaz and Sdha with a stability value of 0.022 (Table 1).

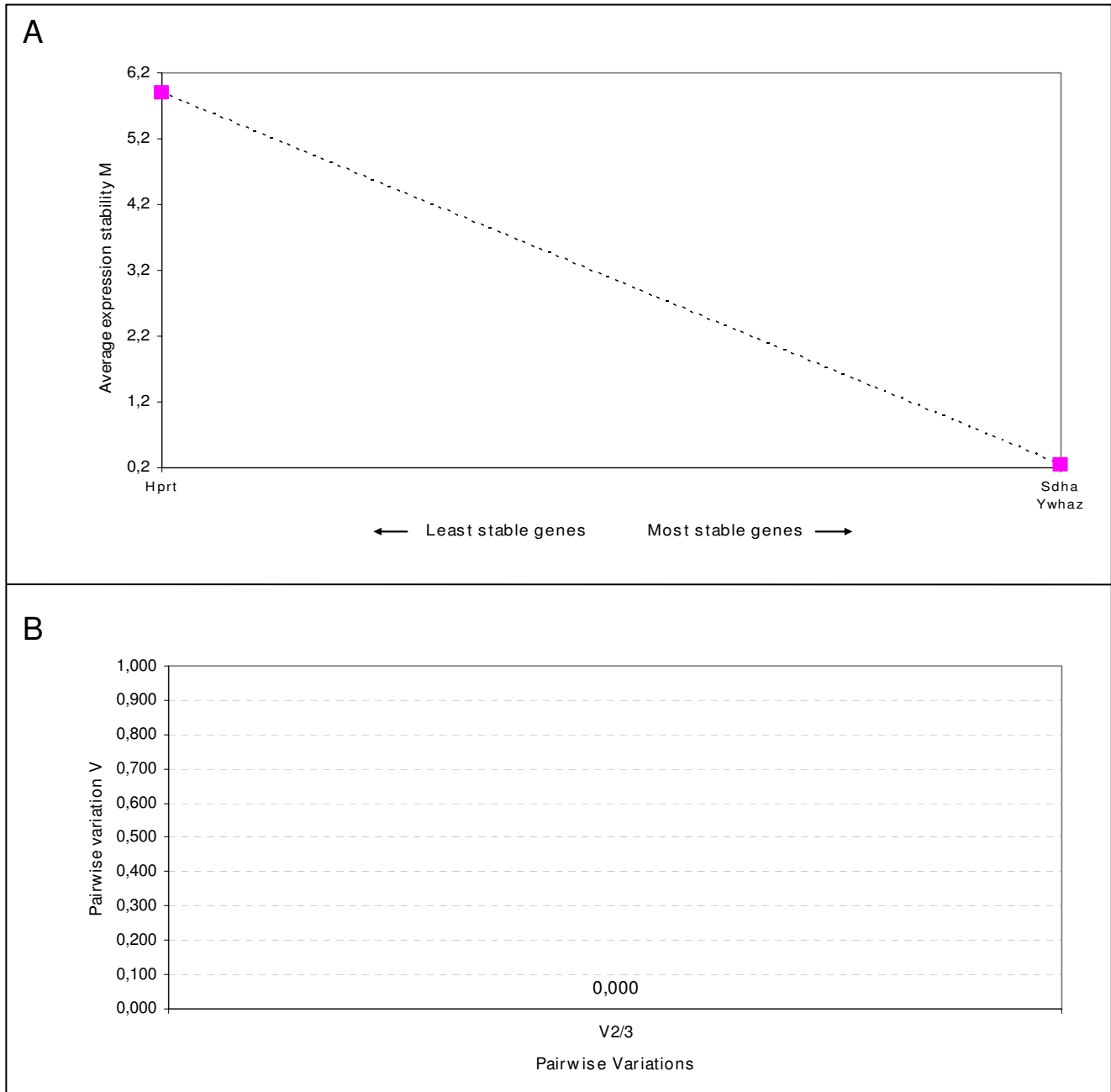


Figure 3
Gene expression stability and determination of the optimum number of genes for normalization of the candidate reference genes for the in-vivo ischaemia model using geNorm analysis. (A) Expression stability plot showing average expression stability values M. (B) Pairwise variation analysis to determine the optimal number of reference genes for use in RT qPCR data normalization. The use of the two most stable genes is sufficient for accurate normalization (cutoff 0.15 according to [12])

Discussion

The selection of the housekeeping gene is crucial to the normalization of quantitative gene expression results. This is even more important in those settings in which gene expression is severely affected, as after cerebral ischaemia.

No validated housekeeping genes have been reported for the relative quantification of the mRNA expression profile activated in in-vitro ischaemic conditions. Our present study discards the use of Gapdh, Ppia, β 2m, 18S rRNA, Hprt, Oaz1, Gusb and Ywhaz as reference genes and finds Rpl13a and Sdha to be the best control genes for the in-vitro model in the conditions we have tested.

With regards to the pMCAO model, four studies have reported the suitability of several reference genes for this ischaemia model. In Table 2 we summarise the methodologies employed and results obtained both for previously published and the present studies. Earlier investigations only tested from two to four candidate control genes finding invariable expressions for Rpl13a, Hprt, Ppia and Gapdh genes. In the case of Gapdh, results were contradictory: three studies validated the gene [16,21,22] whereas another rejected it [23]. Our results show that Gapdh, Rpl13a and Ppia together with other candidate genes, namely β 2m, Gusb, 18S rRNA and Oaz1, are not appropriate as housekeeping genes for the pMCAO model. As previously reported by Meldgaard et al. when using the pMCAO model in mice [16], we have found Hprt to be a suitable housekeeping gene for the in-vivo ischaemia model. Moreover we have identified two new housekeeping genes for this model, Sdha and Ywhaz, which have not been previously analysed. According to the results obtained with the NormFinder and geNorm algorithms, these two genes are more stable and so the best suited for normalization of relative quantification gene expression studies. Several factors have an influence on the variability of control genes and may lead to differences between studies. In the same way that gene control expression may vary depending on whether the model is permanent (pMCAO) or transient (tMCAO) [27], different methodologies employed to perform the pMCAO, electrocautery or intraluminal filament, may have an influence on the gene expression. Sample collection and the control sample used are other factors which must be taken into consider-

ation. Three different cerebral regions have been collected in each previous study: the whole of the infarcted cortex [21,22], the whole of the infarcted hemisphere [16] and the ischaemic penumbra cortex [23]. In our study we have collected the infarcted and peri-infarcted cortical area to analyse changes in gene expression in the affected region. With regards to the control sample there are also different possibilities: brain samples from sham or naive rats, or healthy contralateral hemispheres. We consider sham rats to be the best control because this control minimises bias due to surgery. In our opinion, the use of the healthy contralateral hemisphere may lead to erroneous conclusions because studies have reported structural changes as well as changes in gene expression in the contralateral hemisphere after ischaemia [28-30]. Finally, the time course studied is also a relevant factor. We have validated Sdha, Ywhaz and Hprt as a suitable housekeeping genes for the pMCAO model conducting an analysis of the control situation and after ischaemia at frequent time intervals up to 72 hours, which vary from those used in earlier studies [16,21-23]. Considering all the variables that may influence gene expression, the validation of candidate reference genes in each individual experimental condition is crucial.

The geNorm [12] and NormFinder [11] algorithms are now widely used to determine the most stable reference genes from a set of candidate genes with invariable expression [26,31-34]. We have only used algorithms on genes identified as stable housekeeping genes in the in-vivo model in our analysis as the software requires a minimum of three genes for the analysis.

In order to check the value of the validation of endogenous controls, we have used different housekeeping genes analysed in this study to normalise the expression of cyclooxygenase 2 (Cox2) and Bcl2, genes which are known to be involved in cerebral ischaemia (data not shown). Cox2 is an inflammatory mediator gene which undergoes a significant increase due to ischaemia [35,36]. Bcl2 is a protooncogene that codifies an antiapoptotic protein, which has been described as participating in neuroprotective mechanisms in ischaemic stroke although changes in the expression are limited to an increase in the neurons within the peri-infarct region [37-39]. In the two cases we have observed differences in the results obtained

Table 1: Stability values of housekeeping genes obtained by NormFinder

Ranking	Gene name	Stability value
1	Ywhaz	0.023
2	Sdha	0.034
3	Hprt	0.066
Best combination of two genes	Sdha and Ywhaz	0.022

Table 2: Housekeeping gene validation in the pMCAO model

	Harrison DC 2000	Medhurst AD 2000	Meldgaard M 2006	Tian YF 2007	Gubern C
Focal ischaemia model	pMCAO intraluminal filament	pMCAO intraluminal filament	pMCAO electrocautery	pMCAO intraluminal filament	pMCAO electrocautery
Animal	Male Sprague-Dawley rats	Male Sprague-Dawley rats	Male SJL mice	Male Sprague-Dawley rats	Male Fisher rats
Collected sample	Whole infarcted cortex	Whole infarcted cortex	Whole infarcted hemisphere	Ischaemic penumbra cortex	Infarcted and peri-infarcted cortex region
Time points	Naive, 3, 6, 12 and 24 h (pMCAO and sham)	Contralateral hemisphere, 6 and 24 h	Sham, 30 min, 1, 2, 4, 6, 12, 24 and 48 h, 5 and 10d	Sham, 2 h, 24 h, 3, 7 and 21d	Sham, 30 min, 2, 6, 24, 48 and 72 h
Real-Time PCR	Custom TaqMan assays	Custom TaqMan assays	Custom TaqMan assays	SyberGreen	Inventoried TaqMan assays
Method	Standard curve	Standard curve	%mRNA = $100 \times (1+E)^{\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta CT}$
Statistical analyses	ANOVA	Student's unpaired t-test	Kruskal-Wallis + Dunn's	ANOVA + Tukey	ANOVA + Dunnett's
Suitable controls	Ppia & Gapdh	Ppia & Gapdh	Hprt & Gapdh	Rpl13a & Ppia	Hprt, Sdha & Ywhaz
Unsuitable controls	β -actin			Gapdh, β -actin	Oaz1, Gapdh, Ppia, Rpl13a, B2m, Gusb, 18SrRNA

when suitable and unsuitable control genes are used. These are even more critical when the differences in expression of the analysed gene are minor, as is the case with Bcl2, which has a different expression pattern depending on the housekeeping gene that is used.

Conclusion

In designing any study into relative gene expression quantification it is necessary to perform a validation of the housekeeping genes used which takes into account the specific experimental conditions to be encountered and the time course to be employed.

We report a detailed investigation of the effects of experimental ischaemia on the expression of potential housekeeping genes including genes typically used and new candidates as internal controls in qRT-PCR assays. This analysis was facilitated by the sensitivity and efficiency of real-time quantitative PCR. We determined that Gapdh, Rpl13a and Ppia, which have previously been validated as housekeeping genes in quantitative expression studies with the pMCAO model, had significant differences in their expression in our samples collected at different time points. Our study confirms the suitability of Hprt as a housekeeping gene for this in-vivo model and identifies two new housekeeping genes, Sdha and Ywhaz, which are

more stable than Hprt. We have also identified, to the best of our knowledge for the first time, reference genes (Rpl13a and Sdha) for the OGD in-vitro model using primary astrocyte cultures.

The study also highlights the importance of validating control genes for each individual study as gene expression is influenced by many different factors which can lead to mistaken conclusions.

Methods

All procedures were approved by the Committee of Animal Care of the Universidad Complutense de Madrid, in accordance with the regulations of the European Union (86/609/CEE) and Spanish legislation (RD223/88).

Reference gene selection

Candidate reference genes were selected from those most commonly used in the literature [14,24-26], a new candidate [10], and those previously described as suitable for pMCAO studies [16,21-23] (see Table 3).

In-vitro ischaemia

Rat astrocyte cultures

Primary astrocyte cultures were prepared from neonatal (P0) Wistar rat cortex, as previously described [40,41].

Exposure of astrocyte culture to oxygen-glucose deprivation (OGD)
Oxygen-glucose deprivation was performed as previously described [42]. Culture medium was replaced by a solution containing (in mM) NaCl (130), KCl (5.4), CaCl₂ (1.8), NaHCO₃ (26), MgCl₂ (0.8), NaH₂PO₄ (1.18) and 2% FS bubbled with 95% N₂/5% CO₂ for OGD cells (OGD solution). OGD cells were transferred to an anaerobic chamber (Forma Scientific, Hucoa Erloss, Spain) containing a gas mixture of 95% N₂/5% CO₂ and humidified at 37°C, and maintained at a constant pressure of 0.15 bar. Time of exposure to OGD was 180 min. OGD was terminated by replacing the exposure medium with oxygenated MEM containing 0.6% glucose, 0.029% glutamine, 50 I.U./ml penicillin, 50 Ag/ml streptomycin, 10% FS (reperfusion medium) and returned to the normoxic incubator. Control cultures in a solution identical to OGD solution except that it contained glucose (33 mM; control solution) were kept in the normoxic incubator for the same time period as the OGD, and then incubation solution was replaced with the reperfusion buffer. Cultures were returned to the normoxic incubator until the end of the experiment.

Experimental groups

Astrocyte samples were collected from controls and from the OGD group at 0 minutes, 30 minutes, 2 hours, 6 hours, 24 hours and 48 hours after reperfusion (n = 5 in each group). Astrocytes were collected in RNA Protect Cell Reagent (Qiagen, Barcelona, Spain) and frozen at -80°C until RNA isolation was undertaken.

In-vivo cerebral ischaemia

Permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAO) in rats

Experiments were performed on male Fischer rats weighing 250–300 g. Rats were anaesthetised with 2.5% halothane in a mixture of 70% nitrogen/30% oxygen. Permanent focal cerebral ischemia was induced by ligation of the left common carotid artery (CCA) and occlusion of the ipsilateral distal middle cerebral artery (MCA) as previously described [41,42]. Briefly, for the CCA ligation,

a midline ventral cervical incision was made, and the CCA was isolated and permanently occluded with a silk suture. For the MCA occlusion, a 1-cm incision perpendicular to the line connecting the lateral canthus of the left eye and the external auditory canal was made to expose and retract the temporalis muscle. A 2-mm burr hole was drilled and the MCA was exposed by cutting and retracting the dura. The MCA was elevated and cauterised. Rats in which the MCA was exposed but not occluded served as sham-operated controls (SHAM). Following surgery, subjects were returned to their cages and allowed free access to water and food. The body temperature of animals was monitored throughout the experiment and was maintained at 37.5 ± 0.5°C using a heating pad.

Experimental groups

Brain were removed and cortical infarcted and peri-infarcted tissue was collected from controls and the pMCAO group at 30 minutes, 2 hours, 6 hours, 24 hours, 48 hours and 72 hours after artery occlusion (n = 6 in each group). Samples were quickly transferred to 1.5 mL tubes and frozen at -80°C until RNA isolation was undertaken.

RNA extraction, quantification and retrotranscription

Cerebral cortex frozen samples were immediately transferred to QIAzol lysis reagent (Qiagen) and then homogenised using an Ultra-Turrax T25 homogeniser. RNA was isolated using the RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) in accordance with the manufacturer's instructions and treated with DNase (RNase-free DNase Set, Qiagen) in order to remove any trace of genomic DNA. RNA was quantified spectrophotometrically (GeneQuant, Biochrom) at 260 nm (A₂₆₀) and purity was estimated by an A₂₆₀/A₂₈₀ ratio > 1.8. The integrity, purity, and amount of RNA were verified by visualization of rRNAs after electrophoresis on agarose gel.

Total RNA was isolated from primary glial cultures using the RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen) and total RNA concen-

Table 3: Candidate reference genes

Gene Symbol	Gene Name	TaqMan Assay Number*	Genebank accession
Hprt	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase</i>	Rn01527840_m1	NM_012583
Gapdh	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	Rn99999916_s1	NM_017008
Oaz1	<i>Ornithine decarboxylase antizyme 1</i>	Rn00821793_g1	NM_139081
β2m	<i>Beta-2 microglobulin</i>	Rn00560865_m1	NM_012512
Ppia	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerasa</i>	Rn00690933_m1	NM_017101
Rpl13a	<i>Ribosomal Protein L13A</i>	Rn00821946_g1	NM_173340
18S	<i>Eukaryotic 18S rRNA</i>	Hs99999901_s1	X03205.1
Ywhaz	<i>Tyrosine 3-monooxygenase</i>	Rn00755072_m1	NM_013011.3
Sdha	<i>Succinate dehydrogenase complex, subunit A</i>	Rn00590475_m1	NM_130428.1
Gusb	<i>Glucuronidase, beta</i>	Rn00566655_m1	NM_017015.2

*"m" indicates an assay whose probe spans an exon junction and will not detect genomic DNA. "s" indicates an assay whose probes and primers are designed within a single exon and, hence, will detect genomic DNA. "g" indicates an assay that may detect genomic DNA as the assay probe and primers may also be within a single exon.

tration was measured by fluorescence using a Quant-iT RNA Assay Kit (Invitrogen, Barcelona, Spain). Manufacturers' instructions were followed in both cases.

2 µg of RNA from each cortex samples and 1 µg of RNA from astrocyte samples were reverse transcribed using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Barcelona, Spain) according to the manufacturer's instructions. Two independent RT reactions were performed for all samples.

Real-time PCR

RT-Q-PCR reactions were carried out for all genes of interest in each sample using specific TaqMan® Gene Expression Assays (Table 3) and an ABI PRISM® 7000 Instrument (Applied Biosystems). Each reaction was performed in a final volume of 25 µL containing 11.25 µL cDNA diluted with H₂O, 1.25 µL TaqMan® Gene Expression Assay and 12.5 µL of TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Amplifications were performed starting with a 2 min activation step for Amperase UNG at 50°C, 10 min template denaturation step at 95°C, followed by 40 cycles of 95°C for 15s and 60°C for 1 min. As we used TaqMan® Gene Expression Assays validated with PCR efficiency near 100% for all of them, the expression of each housekeeping gene was obtained using the 2^{-ΔCT} method, a modification of the 2^{-ΔΔC_t} method described by K. Livak et al., where ΔC_t (C_{tTime X} - C_{tControl}) and Control is the calibrator sample representing the 1× expression of each gene [13,24]. All samples were run in triplicate and average values were calculated. Two independent reverse transcriptions were tested for each gene.

As some of the Taqman Gene Expression assays employed are not cDNA specific, we confirmed no genomic DNA contamination of our samples using no-reverse transcription controls. A no-reverse transcription control is a reaction that has been prepared for reverse transcription with RNA and all the components of the retrotranscription kit except for reverse transcriptase.

Statistical analysis

Data are mean ± standard error of the mean (SEM). A statistical test was applied to look for significant differences between experimental conditions for each candidate control gene in each experimental model. The variance equality hypothesis was confirmed for each gene in the two experimental models as Bartlett's test failed to reveal any significant variance with a confidence level of 95% (data not shown). A one-way analysis of variance (ANOVA) test was therefore conducted, followed by Dunnett's post-hoc analysis to compare each time set against the control group mean. A p value < 0.05 was considered statistically significant. Calculations were performed using the 11.0.0 version of SPSS software (SPSS Inc).

Determination of reference gene expression stability

After determining which housekeeping genes had an invariable expression in the in-vivo model using 2^{-ΔCT} method and ANOVA + Dunnett's post hoc analysis, we used two publicly available software tools, geNorm [12] and NormFinder [11], to analyse their gene expression stability. GeNorm calculates a gene-stability measure M, which is the average pairwise variation of a particular gene compared with all other candidate reference genes. A lower value of M indicates the greater stability of the reference gene. NormFinder estimates the overall expression variation of the candidate normalization genes and the variation between sample subgroups of the sample set using a model-based approach.

Authors' contributions

CG performed all the experimental procedures, carried out the analysis and interpretation of data and was the primary author of the manuscript. OH assisted in obtaining and maintaining the primary astrocyte cultures as well as in performing OGD experimental work. RR assisted in RNA purification and in obtaining cDNA from cortex and astrocyte samples. JRM carried out all animal surgery. VGR assisted in animal surgery and tissue sampling. MAM, IL and JS participated in the discussion of data and critically reviewed the manuscript. JM participated in the conception and design of the study, the analysis and interpretation of data and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was partially supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation and the European Regional Development Fund (ERDF) PROFIT grant nos. CIT 090100-2005-15, CIT 090100-2007-43, CIT 090000-2008-11 (J. Mallolas and I. Lizasoain), Spanish Ministry of Science and Innovation, Institut de Salut Carlos III (ISCIII) grant nos. FIS-PI070322 (J. Mallolas), ISCIII retics-RENEVAS-RD06/0026/0005 (MA. Moro) and RD07/0026/2002 (J. Serena) and the Centre d'Innovació i Desenvolupament Empresarial (CIDEM) of the Generalitat de Catalunya (grant no.RDITSCON07-1-0006). C. Gubern was recipient of a BE grant no.2007 BE-100293 from the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR).

References

1. Goldberg MP, Choi DW: **Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury.** *J Neurosci* 1993, **13**:3510-3524.
2. Brint S, Jacewicz M, Kiessling M, Tanabe J, Pulsinelli W: **Focal brain ischemia in the rat: methods for reproducible neocortical infarction using tandem occlusion of the distal middle cerebral and ipsilateral common carotid arteries.** *J Cereb Blood Flow Metab* 1988, **8**:474-485.
3. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM: **Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion.** *J Cereb Blood Flow Metab* 1981, **1**:53-60.
4. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM: **Focal cerebral ischaemia in the rat: 2. Regional cerebral blood flow determined by [¹⁴C]iodoantipyrine autoradiography following middle cerebral artery occlusion.** *J Cereb Blood Flow Metab* 1981, **1**:61-69.

5. Krieger DW, Yenari MA: **Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke: what do laboratory studies teach us?** *Stroke* 2004, **35**:1482-1489.
6. Schwarz DA, Barry G, Mackay KB, Manu F, Naeve GS, Vana AM, Verge G, Conlon PJ, Foster AC, Maki RA: **Identification of differentially expressed genes induced by transient ischemic stroke.** *Brain Res Mol Brain Res* 2002, **101**:12-22.
7. Caso JR, Pradillo JM, Hurtado O, Lorenzo P, Moro MA, Lizasoain I: **Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke.** *Circulation* 2007, **115**:1599-1608.
8. Hurtado O, Pradillo JM, Fernandez-Lopez D, Morales JR, Sobrino T, Castillo J, Alborch E, Moro MA, Lizasoain I: **Delayed post-ischemic administration of CDP-choline increases EAAT2 association to lipid rafts and affords neuroprotection in experimental stroke.** *Neurobiol Dis* 2008, **29**:123-131.
9. Morales JR, Ballesteros I, Deniz JM, Hurtado O, Vivancos J, Nombela F, Lizasoain I, Castrillo A, Moro MA: **Activation of liver x receptors promotes neuroprotection and reduces brain inflammation in experimental stroke.** *Circulation* 2008, **118**:1450-1459.
10. de Jonge HJ, Fehrmann RS, de Bont ES, Hofstra RM, Gerbens F, Kamps WA, de Vries EG, Zee AG van der, te Meerman GJ, ter Elst A: **Evidence based selection of housekeeping genes.** *PLoS ONE* 2007, **2**:e898.
11. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF: **Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets.** *Cancer Res* 2004, **64**:5245-5250.
12. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F: **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.** *Genome Biol* 2002, **3**:RESEARCH0034.
13. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**:402-408.
14. Coulson DT, Brockbank S, Quinn JG, Murphy S, Ravid R, Irvine GB, Johnston JA: **Identification of valid reference genes for the normalization of RT qPCR gene expression data in human brain tissue.** *BMC Mol Biol* 2008, **9**:46.
15. Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR: **Control selection for RNA quantitation.** *Biotechniques* 2000, **29**:332-337.
16. Meldgaard M, Fenger C, Lambertsen KL, Pedersen MD, Ladeby R, Finzen B: **Validation of two reference genes for mRNA level studies of murine disease models in neurobiology.** *J Neurosci Methods* 2006, **156**:101-110.
17. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Iqout A, Heinen E: **Housekeeping genes as internal standards: use and limits.** *J Biotechnol* 1999, **75**:291-295.
18. Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A: **Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR.** *Biotechniques* 2004, **37**:112-119.
19. Dheda K, Huggett JF, Chang JS, Kim LU, Bustin SA, Johnson MA, Rook GA, Zumla A: **The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization.** *Anal Biochem* 2005, **344**:141-143.
20. Derks NM, Muller M, Gaszner B, Tilburg-Ouwens DT, Roubos EW, Kozicz LT: **Housekeeping genes revisited: Different expressions depending on gender, brain area and stressor.** *Neuroscience* 2008, **156**:305-309.
21. Medhurst AD, Harrison DC, Read SJ, Campbell CA, Robbins MJ, Pangalos MN: **The use of TaqMan RT-PCR assays for semiquantitative analysis of gene expression in CNS tissues and disease models.** *J Neurosci Methods* 2000, **98**:9-20.
22. Harrison DC, Medhurst AD, Bond BC, Campbell CA, Davis RP, Philpott KL: **The use of quantitative RT-PCR to measure mRNA expression in a rat model of focal ischemia - caspase-3 as a case study.** *Brain Res Mol Brain Res* 2000, **75**:143-149.
23. Tian YF, Zhang PB, Xiao XL, Zhang JS, Zhao JJ, Kang QY, Chen XL, Qiu F, Liu Y: **The quantification of ADAMTS expression in an animal model of cerebral ischemia using real-time PCR.** *Acta Anaesthesiol Scand* 2007, **51**:158-164.
24. Schmittgen TD, Zakrajsek BA: **Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR.** *J Biochem Biophys Methods* 2000, **46**:69-81.
25. Cook NL, Vink R, Donkin JJ, van den HC: **Validation of reference genes for normalization of real-time quantitative RT-PCR data in traumatic brain injury.** *J Neurosci Res* 2009, **87**:34-41.
26. Langnaese K, John R, Schweizer H, Ebmeyer U, Keilhoff G: **Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in a rat asphyxial cardiac arrest model.** *BMC Mol Biol* 2008, **9**:53.
27. Bond BC, Virley DJ, Cairns NJ, Hunter AJ, Moore GB, Moss SJ, Mudge AW, Walsh FS, Jazin E, Preece P: **The quantification of gene expression in an animal model of brain ischaemia using TaqMan real-time RT-PCR.** *Brain Res Mol Brain Res* 2002, **106**:101-116.
28. Buga AM, Sascau M, Pisoschi C, Herndon JG, Kessler C, Popa-Wagner A: **The genomic response of the ipsilateral and contralateral cortex to stroke in aged rats.** *J Cell Mol Med* 2008, **12**:2731-2753.
29. Spiegler M, Villapol S, Biran V, Goyenvalle C, Mariani J, Renolleau S, Charriaud-Marlangue C: **Bilateral changes after neonatal ischemia in the P7 rat brain.** *J Neuropathol Exp Neurol* 2007, **66**:481-490.
30. Keyvani K, Witte OW, Paulus W: **Gene expression profiling in perilesional and contralateral areas after ischemia in rat brain.** *J Cereb Blood Flow Metab* 2002, **22**:153-160.
31. Rhinn H, Marchand-Leroux C, Croci N, Plotkine M, Scherman D, Escriou V: **Housekeeping while brain's storming Validation of normalizing factors for gene expression studies in a murine model of traumatic brain injury.** *BMC Mol Biol* 2008, **9**:62.
32. McNeill RE, Miller N, Kerin MJ: **Evaluation and validation of candidate endogenous control genes for real-time quantitative PCR studies of breast cancer.** *BMC Mol Biol* 2007, **8**:107.
33. Bonefeld BE, Elfving B, Wegener G: **Reference genes for normalization: a study of rat brain tissue.** *Synapse* 2008, **62**:302-309.
34. Tanic N, Perovic M, Mladenovic A, Ruzdijic S, Kanazir S: **Effects of aging, dietary restriction and glucocorticoid treatment on housekeeping gene expression in rat cortex and hippocampus-evaluation by real time RT-PCR.** *J Mol Neurosci* 2007, **32**:38-46.
35. Sobrado M, Pereira MP, Ballesteros I, Hurtado O, Fernandez-Lopez D, Pradillo JM, Caso JR, Vivancos J, Nombela F, Serena J, et al.: **Synthesis of lipoxin A4 by 5-lipoxygenase mediates PPAR-gamma-dependent, neuroprotective effects of rosiglitazone in experimental stroke.** *J Neurosci* 2009, **29**:3875-3884.
36. Candelario-Jalil E, Fiebich BL: **Cyclooxygenase inhibition in ischemic brain injury.** *Curr Pharm Des* 2008, **14**:1401-1418.
37. Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM: **Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection.** *Trends Neurosci* 2003, **26**:248-254.
38. Matsushita K, Matsuyama T, Kitagawa K, Matsumoto M, Yanagihara T, Sugita M: **Alterations of Bcl-2 family proteins precede cytoskeletal proteolysis in the penumbra, but not in infarct centers following focal cerebral ischemia in mice.** *Neuroscience* 1998, **83**:439-448.
39. Chen J, Graham SH, Chan PH, Lan J, Zhou RL, Simon RP: **bcl-2 is expressed in neurons that survive focal ischemia in the rat.** *Neuroreport* 1995, **6**:394-398.
40. McCarthy KD, de Vellis J: **Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue.** *J Cell Biol* 1980, **85**:890-902.
41. Mallolas J, Hurtado O, Castellanos M, Blanco M, Sobrino T, Serena J, Vivancos J, Castillo J, Lizasoain I, Moro MA, et al.: **A polymorphism in the EAAT2 promoter is associated with higher glutamate concentrations and higher frequency of progressing stroke.** *J Exp Med* 2006, **203**:711-717.
42. Hurtado O, Moro MA, Cardenas A, Sanchez V, Fernandez-Tome P, Leza JC, Lorenzo P, Secades JJ, Lozano R, Davalos A, et al.: **Neuroprotection afforded by prior citicoline administration in experimental brain ischemia: effects on glutamate transport.** *Neurobiol Dis* 2005, **18**:336-345.

CHARACTERIZATION OF GCF2/LRRFIP1 IN EXPERIMENTAL CEREBRAL ISCHEMIA AND ITS ROLE AS A MODULATOR OF AKT, MTOR AND β -CATENIN SIGNALING PATHWAYS

C. GUBERN,^{a*} S. CAMÓS,^a O. HURTADO,^b
R. RODRÍGUEZ,^a V. G. ROMERA,^b M. SOBRADO,^{b†}
R. CAÑADAS,^b M. A. MORO,^b I. LIZASOAIN,^b
J. SERENA,^a J. MALLOLAS^{a,‡} AND M. CASTELLANOS^{a,‡}

^a Grup de Recerca Cerebrovascular, Servei de Neurologia, Institut d'Investigació Biomèdica de Girona (IdIBGi) Dr. Josep Trueta, Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta, Avenida de França s/n, 17007 Girona, Spain

^b Unidad de Investigación Neurovascular, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Avenida Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

Abstract—Leucine-rich repeat in Flightless-1 interaction protein 1 (Lrrfp1) is an up-regulated protein after cerebral ischemia whose precise role in the brain both in healthy and ischemic conditions is unclear. Different Lrrfp1 isoforms with distinct roles have been reported in human and mouse species. The present study aimed to analyze the Lrrfp1 transcriptional variants expressed in rat cortex, to characterize their expression patterns and subcellular location after ischemia, and to define their putative role in the brain. Five transcripts were identified and three of them (Lrrfp1, CRA_g and CRA_a' (Fli-I leucine-rich repeat associated protein 1 – Flap-1)) were analyzed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). All the transcripts were up-regulated and showed differential expression patterns after *in vivo* and *in vitro* ischemia models. The main isoform, Lrrfp1, was found to be up-regulated from the acute to the late phases of ischemia in the cytoplasm of

neurons and astrocytes of the peri-infarct area. This study demonstrates that Lrrfp1 activates β -catenin, Akt, and mammalian target of rapamycin (mTOR) proteins in astrocytes and positively regulates the expression of the excitatory amino acid transporter subtype 2 (GLT-1). Our findings point to Lrrfp1 as a key brain protein that regulates pro-survival pathways and proteins and encourages further studies to elucidate its role in cerebral ischemia as a potential target to prevent brain damage and promote functional recovery after stroke. © 2014 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: Lrrfp1, GLT-1, astrocytes, MCAO, stroke, OGD.

INTRODUCTION

Ischemic stroke results from a reduction in cerebral blood flow triggering a cascade of cellular and molecular events that evolve over time and in space. Excitotoxicity is well established as an important trigger and executioner of tissue damage following cerebral ischemia, leading to necrosis, apoptosis and the expression of genes that initiate post-ischemic inflammation events (Dirnagl et al., 1999). Adopting the hypothesis of individual susceptibility to excitotoxic damage due to impaired glutamate uptake, a functional polymorphism was identified in the promoter of the glutamate transporter excitatory amino acid transporter-2 (EAAT2) gene that creates a new binding site for the repressor transcription factor GC-binding factor 2 (GCF2). Our data confirmed the effective repression of the mutant promoter and provided the first evidence of GCF2 overexpression in ischemic rat brain (Mallolas et al., 2006).

The GC-binding factor 2/Leucine-rich repeat in Flightless-1 interaction protein 1 (GCF2/LRRFIP1) gene belongs to a small family of proteins whose function and regulation has been poorly studied. LRRFIP1 is ubiquitously expressed (Fong and de Couet, 1999; Rikiyama et al., 2003) and localized both in the nucleus and cytoplasm, depending on the cell line and the conditions studied (Wilson et al., 1998; Rikiyama et al., 2003; Arakawa et al., 2010; Yang et al., 2010; Ohtsuka et al., 2011; Shen et al., 2012). The LRRFIP1 gene encodes different splice isoforms in human and mouse species that seem to be differentially regulated (Liu and Yin, 1998; Reed et al., 1998; Fong and de Couet, 1999; Rikiyama et al., 2003; Suriano et al., 2005). Five human LRRFIP1 isoforms have been reported and three of

*Corresponding authors. Address: Grup de Recerca Cerebrovascular, Servei de Neurologia, Institut d'Investigació Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta, Hospital Universitari de Girona, Avenida de França s/n, 17007, Girona, Spain. Tel: +34-972940262; fax: +34-97228296.

E-mail addresses: cgubern@idibgi.org (C. Gubern), judithmallolas@cofigi.org (J. Mallolas).

† Present address: Instituto de Investigación Sanitaria, Servicio de Neurología, HU. La Princesa, Calle de Diego Leon 62, 28006 Madrid, Spain.

‡ Senior authors: Judith Mallolas and Mar Castellanos.

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; BSA, bovine serum albumin; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; Dvl, dishevelled; EAAT2, excitatory amino acid transporter-2; Flap-1, Fli-I leucine-rich repeat associated protein 1; Fli-I, flightless-I; GCF2, GC-binding factor 2; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GLT-1, excitatory amino acid transporter subtype 2; IgGs, immunoglobulins G; Lrrfp1, Leucine-rich repeat in Flightless-1 interaction protein 1; MCA, middle cerebral artery; mTOR, mammalian target of rapamycin; Myd88, myeloid differentiation factor 88; NeuN, neuronal nuclei; NLS, nuclear localization signal; OGD, oxygen–glucose deprivation; pMCAO, permanent middle cerebral artery occlusion; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; qPCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; TLR, toll-like receptor; TRIP, TAR RNA interacting protein.

them, namely, GCF2, LRRFIP1 and TAR RNA interacting protein (TRIP), have been described as functioning, respectively, as (1) a transcriptional repressor (Reed et al., 1998; Khachigian et al., 1999; Eden et al., 2001; Suriano et al., 2005; Mallolas et al., 2006), (2) a modulator of the innate immune response (Arakawa et al., 2010; Bagashev et al., 2010), and (3) an RNA-binding protein and possible regulator of mRNA translation (Wilson et al., 1998; Fong and de Couet, 1999). LRRFIP1 has been identified as one of the cancer-associated genes (Sjoblom et al., 2006) which promotes cell invasion and metastasis (Arakawa et al., 2010; Ohtsuka et al., 2011; Ariake et al., 2012). In addition, LRRFIP1 isoforms also interact with other proteins, such as flightless-I (Fli-I), an actin-binding protein (Liu and Yin, 1998; Wilson et al., 1998; Fong and de Couet, 1999), dishevelled (Dvl), a key molecule in the Wnt signaling cascade (Goodall et al., 2010; Ohtsuka et al., 2011), Toll-like receptor 3 (TLR3), an innate sensor of viral infection (Bagashev et al., 2010) and Drebrin 1 (DBN1), which is involved in the formation of dendritic spines and the stabilization of tight junctions (Majoul et al., 2007; Goodall et al., 2010). With regard to the mouse isoforms, three different proteins have been reported, two of which, Fli-I leucine-rich repeat associated protein 1 (Flap-1) and Lrrfip1, have been studied. The first one has been described as interacting with Fli-I and myeloid differentiation factor 88 (Myd88) and to positively regulate TLR immune response and nuclear factor-kappaB (NF- κ B) activation through Myd88 interaction (Liu and Yin, 1998; Reed et al., 1998; Dai et al., 2009; Bagashev et al., 2010). On the other hand, Lrrfip1 has been described as an intracellular sensor of pathogens that regulates the innate immune response via a β -catenin-dependent pathway (Yang et al., 2010). Both Flap-1 and Lrrfip1 promote β -catenin activation, and Lrrfip1 induces the phosphorylation of β -catenin at Ser552 (Lee and Stallcup, 2006; Yang et al., 2010). Therefore, *LRRFIP1* shows itself to be an interesting gene through which different isoforms may modulate multiple signaling pathways involved in stroke damage and recovery, such as TLR signaling in neuroinflammation and ischemic brain injury (Caso et al., 2007) and β -catenin signaling in stroke-induced neurogenesis (Lei et al., 2008).

The overexpression of Lrrfip1 in cerebral ischemia has been described earlier (Mallolas et al., 2006). The present study aims to identify and describe the transcriptional variants of *Lrrfip1* in rat cerebral cortex, focusing on the ischemic area, in order to describe their expression patterns in ischemic injury and determine the putative role of this protein in the brain through functional studies in rat astrocyte cultures.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

All procedures were approved by the Committee of Animal Care of the Universidad Complutense de Madrid, in accordance with European Union regulations (86/609/CEE) and Spanish legislation (RD223/88).

The protocols followed in the use of commercial kits were always as per the manufacturers' instructions.

Bioinformatics

Novel Lrrfip1 rat variants were identified using Ensembl gene predictions (ENSRNOG00000019892) and related sequences of Entrez Gen at NCBI (National Center for Biotechnology Information) (GeneID: 367314). Ensembl gene predictions are based on experimental evidence from protein and/or near-full-length cDNA available from public sequence databases. "Ensembl known genes" are predicted transcripts that have been mapped to full-length or near-full-length protein sequences already available in the public sequence species-specific database entries from manually curated UniProt/Swiss-Prot, partially manually curated RefSeq and UniProt/TrEMBL databases. Predictions of "Ensembl novel genes" are based on the similarity to protein or cDNA sequences from related species (<http://www.ensembl.org/index.html>) (Flicek et al., 2012). The degree of homology between the transcripts and isoforms identified, the domains and features described for Lrrfip1 and versus mouse and human isoforms were determined using Clustalw2. Sequence data were also aligned against the candidate transcripts using this software to confirm the sequence of the fragments amplified with each polymerase chain reaction (PCR) and to identify the unexpected amplicons (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). The Translate tool (<http://web.expasy.org/translate/>) and the Compute pI/Mw tool (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html) from Expasy (Expert Protein Analysis System) were used to obtain the exact number of aminoacids and the theoretical molecular masses of the Lrrfip1 isoforms detected. Primer 3 software was used for PCR primers design (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) (Rozen and Skaletsky, 2000). The Allen Mouse Brain Atlas was used to analyze the expression levels and spatial distribution of the orthologs of the rLrrfip1, CRA_a' and CRA_g transcripts in the mouse brain. The Brain Explorer 2 software was used for viewing the gene expression data obtained by *in situ* hybridization (ISH) (<http://mouse.brain-map.org/>) (Lein et al., 2007). Clustalw2 software was used to determine which transcript was analyzed in each experiment of the atlas.

Animals

Adult male Fischer rats weighing 250–300 g were used in this study. Rats were housed individually under standard conditions of temperature and humidity and were given a 12-h light/dark cycle with free access to food and water.

Permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAO). Rats were anesthetized with isoflurane 1.5–2% in a mixture of 70% nitrogen/30% oxygen. Permanent focal cerebral ischemia was induced by ligation of the left common carotid artery (CCA) followed by occlusion of the ipsilateral distal middle cerebral artery (MCA) by electrocoagulation as previously described (Gubern et al., 2009). In this model, the infarct was limited to the parietal and sensory-motor cortex. The characteristic changes of ischemic necrosis are mainly limited to the cortex and the subcortical structures and basal ganglia

are usually spared (Pereira et al., 2005). Large infarcts were reproducibly generated in the left MCA territory 24 h after MCA occlusion.

Experimental groups. Groups were randomized to eliminate bias and the investigator was blinded to the time to tissue collection. Brains were removed and cortical ischemic tissue around the MCA territory was collected at 0.5, 2, 6, 24 and 72 h, 7 and 14 days after artery occlusion ($n = 3–5$ in each group). Likewise, control samples from healthy animals were also collected. Samples were quickly frozen at -80°C until RNA and protein isolation and determination were undertaken.

Rat astrocyte cultures

Primary astrocyte cultures were prepared from neonatal (P0–P2) Wistar rat cortex, as previously described (Hurtado et al., 2005), or obtained from Innoprot (Derio, Bizkaia, ES). Cells present in the culture were shown to be astrocytes ($94 \pm 5\%$) after characterization by flow cytometry using a primary specific anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody (1:100 dilution; Chemicon, Temecula, CA, US).

Exposure of astrocyte culture to oxygen–glucose deprivation (OGD). Astrocyte cultures were exposed to OGD as previously described (Gubern et al., 2009). Culture medium was replaced by a solution containing (in mM) NaCl (130), KCl (5.4), CaCl_2 (1.8), NaHCO_3 (26), MgCl_2 (0.8), NaH_2PO_4 (1.18) and 2% FS bubbled with 95% $\text{N}_2/5\%$ CO_2 for OGD cells (OGD solution). OGD cells were transferred to an anaerobic chamber (Forma Scientific, Hucoa Erloss, ES) containing a gas mixture of 95% $\text{N}_2/5\%$ CO_2 and humidified at 37°C , and maintained at a constant pressure of 0.15 bar. Time of exposure to OGD was 180 min. OGD was terminated by replacing the exposure medium with oxygenated MEM containing 0.6% glucose, 0.029% glutamine, 50 I.U./ml penicillin, 50 Ag/ml streptomycin, 10% FS (reperfusion medium) and returned to the normoxic incubator. Control cultures in a solution identical to OGD solution except that it contained glucose (33 mM; control solution) were kept in the normoxic incubator for the same time period as the OGD, and then incubation solution was replaced with the reperfusion buffer. Cultures were returned to the normoxic incubator until the end of the experiment. Two independent experiments were performed.

Experimental groups. Astrocyte samples were collected from controls and OGD groups at 0, 0.5, 2, 6 and 24 h after reperfusion ($n = 3$ in each group). Astrocytes were collected and frozen at -80°C until protein and RNA isolation was undertaken. Control and OGD-exposed astrocytes were fixed in 4% p-formaldehyde 24 h after reperfusion to perform immunocytofluorescence.

RNA extraction, quantification and reverse transcription

RNA was isolated from cerebral cortex and astrocyte cultures using the RNeasy[®] Lipid Tissue Mini Kit and the RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen, Hilden, DE), respectively. Spectrophotometric RNA quantification and RT were performed as previously described (Gubern et al., 2009, 2013). Two independent RT reactions were performed for all samples.

PCR and sequence analysis

Different combinations of primers (Table 1) were used to analyze the expression of the candidate variants in cerebral cortex at control and 24 h post-MCAO. The PCR reaction was conducted with the initial pre-denaturation step at 95°C for 5 min followed by 35 cycles of denaturing at 95°C , and annealing and extension at 72°C , and then a final extension step at 72°C for either 5 or 30 min. The temperature of the annealing step was specific for each primer pair (Table 1). Fifteen microliters of the amplification products were visualized in a 1% or 2% agarose gel containing ethidium bromide by electrophoresis. Expected and unexpected PCR products were automatically sequenced in the ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, US) after performing the sequencing reaction using the BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). The amplification reactions were purified before sequencing using the ExoSAP-IT kit (USB Corporation, Cleveland, OH, US) and the GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) was used for the purification of agarose gel bands when more than one amplicon was obtained in the amplification reaction.

Quantitative real-time PCR (qPCR)

Specific Custom TaqMan[®] Gene Expression Assays (Applied Biosystems) for NM_001014269, CRA_g plus 305-bp amplicon and CRA_a' transcripts were designed following the manufacturer's design guide (sequences of primers and probes of the assays are available upon request). The high homology of the sequences hindered the design of specific assays for CRA_h' and CRA_i variants. The Gene Expression Assay Rn00568080_m1 was used to quantify the mRNA encoding the excitatory amino acid transporter subtype 2 (GLT-1).

qPCR reactions were run in triplicate using the same amount of cDNA in an ABI PRISM[®] 7000 Instrument (Applied Biosystems). All the custom assays were found to have equivalent amplification efficiencies at almost 100% and, therefore, the expression was obtained using the $2^{-\Delta\Delta\text{C}_T}$ method and the difference of 1 C_T is equivalent to a twofold difference in the initial template amount (Yuan et al., 2006). Sdha and Ywhaz were used as reference genes for cortical samples and Sdha and Rpl13a for astrocytes samples, as previously described (Gubern et al., 2009). Hprt and Ywhaz were validated and used as reference genes for data

Table 1. *Lrrfip1* transcript identification using PCR. Primer sequences, annealing temperature and expected and obtained length of amplification products

	Primer	Sequence (5'-3')	Transcript	Ta (°C)	Amplicons expected bp	Amplicons obtained (transcript) bp
A	Lrrfip1-9F	AGCCAAAGAAGTGGAGGTGA	NM_001014269	58	533	533 (NM_001014269)
	Lrrfip1-3R	CTGTGCCCTTGAGTCTGT	CRA_k		533	
			ENSRNOT00000056683		485	
B	Lrrfip1-1F	GAGTCCAGAAGCGCAAAGA	NM_001014269	60	1214	1214 (NM_001014269)
	Lrrfip1-3R	CTGTGCCCTTGAGTCTGT				
C	Lrrfip1-1F Lrrfip1-2R	GAGTCCAGAAGCGCAAAGA CCCTCCGAGCCCCATAGA	ENSRNOT00000026939	60	563	314 (unknown) 344–396 (unknown)
			ENSRNOT00000026961		452	
			CRA_f		452	
			CRA_b		452	
D	Lrrfip1-1F Lrrfip1-5R	GAGTCCAGAAGCGCAAAGA GCTCCAACAAACATTCCCGTT	ENSRNOT00000026961	60	1427	725 (CRA_h')
			ENSRNOT00000026939		1538	
			CRA_b		1427	
			CRA_c		1409	
			CRA_f		1241	
			CRA_d		911	
			CRA_h		785	
E	Lrrfip1-1F Lrrfip1-1R	GAGTCCAGAAGCGCAAAGA GGCCGTTGCTCACCTCAA	ENSRNOT00000026939	57	1892	1018 (CRA_h')
			ENSRNOT00000026961		1781	
			CRA_b		1781	
			CRA_c		1763	
			CRA_f		1595	
			CRA_d		1265	
F	Lrrfip1-3F Lrrfip1-6R	TGGATCCCAGTCCCTTAGTAGAAG GAGGTGGCCGCCATACT	ENSRNOT00000026939	62	268	124 (unknown) Weak bands between 300 and 200 bp, over 200 bp and lower than 100 bp
			ENSRNOT00000026961		202	
			CRA_f		202	
			CRA_e		202	
			CRA_a		202	
			CRA_b		202	
			CRA_c		202	
G	Lrrfip1-4F	GACGACGCGCTCAACCA	CRA_a	56	162	162 (CRA_a')
	Lrrfip1-7R	CCATTTTGTGTCCAGCCATA				
H	Lrrfip1-5F	AACGGCAGCAGAAAGAGGT	CRA_g	60	235	235 (CRA_g)
	Lrrfip1-8R	CCCTGCATGTATTTGCCCTTC				
I	Lrrfip1-6F Lrrfip1-9R	GACTCTTTGGCTCCGACCTT TCTCTCCGTTGGTGGCTATT	CRA_a	55	951	879 (CRA_a')
			CRA_b		951	
			CRA_c		951	
			ENSRNOT00000026961		951	
			ENSRNOT00000026939		951	
			CRA_e		765	
J	Lrrfip1-3F Lrrfip1-9R	TGGATCCCAGTCCCTTAGTAGAAG TCTCTCCGTTGGTGGCTATT	ENSRNOT00000026939	62	1052	914 (CRA_a')
			CRA_a		986	
			CRA_b		986	
			CRA_c		986	
			ENSRNOT00000026961		986	
			CRA_e		800	
			CRA_f		800	
K	Lrrfip1-7F Lrrfip1-10R	GAGGACGACGCGCTCAAC TGTTACGGGAGCCCTTCTCA	CRA_a	60	652	> 500 (unknown) 475 (unknown) 245 (unknown) 169 (CRA_g and CRA_i)
			CRA_e		559	
			CRA_i		169	
			CRA_g		169	

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Primer	Sequence (5'-3')	Transcript	Ta (°C)	Amplicons expected bp	Amplicons obtained (transcript) bp
L		CRA_a	55	1534	1462 (CRA_a')
Lrrfip1-2F	ATGGGCACACAGGGATCG	CRA_e		1255	865 (CRA_g)
Lrrfip1-5R	GCTCCAACAAACATTCCCGTT	CRA_g		865	793 (CRA_i)
		CRA_i		793	Weak bands higher and lower than 1018
M		ENSRNOT00000026939	55	860	305 (unknown)
		ENSRNOT00000026961		749	
Lrrfip1-1F	GAGTCCAGAAGCGCAAAGA	CRA_f		749	
Lrrfip1-11R	CGTCCTGAATCTGGTCTTTAACT	CRA_b		749	
		CRA_c		731	
N		ENSRNOT00000026961	60	69	114 (unknown)
		ENSRNOT00000026939		69	69 (CRA_a')
Lrrfip1-8F	CCCTGCCTACCCAGAATGG	CRA_f		69	
Lrrfip1-2R	CCCTCCGAGCCCCATAGA	CRA_e		69	
		CRA_b		69	
		CRA_c		69	
		CRA_a		69	

Ta, annealing temperature; bp, base pair.

normalization of the siRNA experiments. For proper CRA_a' quantification in cortical samples it was necessary to preamplify this transcript and the reference genes using TaqMan® PreAmp Master Mix (Applied Biosystems). Two independent reverse transcriptions were tested for each assay. 7000 System software v1.2.3 (Applied Biosystems) was used for data analysis.

Protein extraction and quantification

Brain samples were homogenized by sonication during 10–12 s using a homogenization buffer containing a protease inhibitor cocktail and 0.1% Nonidet P40 (Roche, Basel, CH). Astrocytes samples (OGD and siRNA transfected) were homogenized using a lysis buffer (Cell Signalling Technology Inc., Danvers, MA, US) with a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics) and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (1%) and mixed in a vortex every 5 min during 30 min while being maintained in ice. Both homogenized samples were then centrifuged (13,000g during 10 min, at 4 °C) and the supernatant (protein) was collected. Protein quantification was performed using a Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, US) based on the Bradford method.

Western blot analysis

Sixty micrograms of cortical homogenates and 5 µg of astrocyte homogenates were loaded and size-separated in 7% or 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) (90 mA), according to protein molecular weights. Proteins were blotted onto a PVDF membrane (GE Healthcare) and incubated with the specific primary antibody against Lrrfip1 (sc-68386; 1:1000; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, US), which only recognizes the main Lrrfip1 isoform

(NP_001014291); β-catenin phosphorylated at Ser552 (p-β-catenin) (9566; 1:1000; Cell Signalling Technology); β-catenin (9581; 1:1000; Cell Signalling Technology); Akt phosphorylated at Ser473 (p-Akt) (4058; 1:1000; Cell Signalling Technology); Akt (9272; 1:1000; Cell Signalling Technology); mammalian target of rapamycin (mTOR) phosphorylated at Ser2448 (p-mTOR) (2971; 1:1000; Cell Signalling Technology); mTOR (2983; 1:1000; Cell Signalling Technology) and GLT-1 (ab41621; 1:1000; Abcam, Cambridge, UK). β-actin was used as the loading control. Immunoreactive bands were visualized using SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US) or Immobilon Western (Millipore, Billerica, MA, US). Specific signals were quantified with densitometry analysis software (Kodak MI 5.0 SE version, Rochester, NY, US).

Lrrfip1 immunohistochemistry

Twenty-four hours after MCAO, rats and control rats ($n = 2$ in each group) were anesthetized with sodium pentobarbital and brains were fixed and processed to cryoprotection as previously described (Sobrado et al., 2009). Brains were frozen and a series of 40-µm-thick coronal sections were cut with a sliding microtome (Leica SM2000R, Solms, DE) and mounted on glass slides.

Identification of the infarcted tissue in the neocortex was performed by Nissl [0.2% (w/v) Cresyl Violet] staining of slide-mounted coronal sections. Adjacent sections were then processed for immunohistochemistry. Briefly, sections were preincubated with 0.3% Triton X-100 and with 5% bovine serum albumin (BSA) in phosphate buffered saline (PBS) for 1 h at room temperature. After this time, sections were incubated at 4 °C overnight with

rabbit polyclonal antibody against *Lrrfip1* (1:20; Santa Cruz Biotechnology) and with mouse monoclonal antibody against neuronal nuclei (NeuN) (1:100; Millipore) or GFAP (1:500; Millipore), as the primary antibodies. Detection with secondary antibodies was performed using Alexa Fluor[®] 488/594 goat anti-rabbit/mouse immunoglobulins G (IgGs) (1:40; Invitrogen, Carlsbad, CA, US). After washing, sections were counterstained for 5 min at room temperature with DAPI (Invitrogen) before mounting. All brain sections were processed together. Controls performed at the same time without primary antibodies showed very low levels of nonspecific staining. Image acquisition was performed in different channels for Alexa Fluor[®] 488 (pseudo-colored green), Alexa Fluor[®] 594 (pseudo-colored red) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (pseudo-colored blue) on a BD Pathway 855 Bioimager System (Becton–Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, NJ, US) in confocal mode using 20× objective (NA 075 Olympus) using the same settings and an adaptor for glass slides. Five Z sections separated by 2.2- μ m steps were acquired and collapsed into a single stack. Both acquisition and merging of images were carried out according to the Recommended Assay Procedure using BDAttovision software.

Lrrfip1 immunocytofluorescence

Astrocytes were seeded at approximately 10,000 cells/well in 96-well clear bottom imaging tissue culture plates (Becton–Dickinson Biosciences) optimized for imaging applications. Cells were fixed with 4% p-formaldehyde in phosphate buffer for 10 min, permeabilized with 0.25% Triton[®] X-100 in phosphate buffer for 10 min and blocked with 5% BSA in phosphate buffer for 30 min, all at room temperature. Primary antibody staining with rabbit polyclonal antibody against *Lrrfip1* (1:50; Santa Cruz Biotechnology) and with mouse monoclonal antibody against GFAP (1:100; Millipore), secondary antibody staining using Alexa Fluor[®] 488/594 goat anti-rabbit/mouse IgGs (1:40; Invitrogen) and counterstaining (using DAPI; Invitrogen) were performed following BD Biosciences protocols. Images were captured in different channels for Alexa Fluor[®] 488 (pseudo-colored green), Alexa Fluor[®] 594 (pseudo-colored red) and DAPI (pseudo-colored blue) on a BD Pathway 855 Bioimager System (Becton–Dickinson Biosciences) with 40x objectives (NA 075 Olympus). Merging images were obtained according to the Recommended Assay Procedure using BD Attovision software.

Gene silencing by small interfering RNA (siRNA)

Rat astrocytes were plated at a density of 3×10^3 cells/cm² in 6-well plates, previously coated with poly-L-Lysine (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, US), and maintained in antibiotic-free medium for 24 h. The astrocytes were then transfected with a mixture containing basal medium, 2.5 μ l/well DharmaFECT-1 (Dharmacon, Lafayette, CO, US) and either 50 nM/well of ON-TARGETplus Non-Targeting Pool siRNA (D-001810-10; Dharmacon) (negative control, siCTRL) or of ON-TARGETplus

SMARTpool *Lrrfip1* siRNA (L-084833-01; Dharmacon) (si*Lrrfip1*). Twenty-four hours after siRNAs transfection, the medium was replaced by complete astrocyte growth medium and the culture was maintained until 6 days after transfection, when the cells were collected and frozen at -80 °C until protein and RNA isolation was undertaken. The results presented are the mean of at least two independent experiments.

[³H]-Glutamate uptake

Six days after siRNA transfection [³H]-glutamate uptake was determined as previously described (Romera et al., 2004). Briefly, cultures were washed in a control solution and incubated in a control solution containing 3 μ M glutamate and 8 μ Ci/ml of [³H]-glutamate for 90 s, a time in which glutamate uptake was found to proceed linearly with time. In a parallel set of experiments, cultures were incubated during the same time in a solution of the same composition but in which Na⁺ was equiosmotically substituted by choline. At the end of the incubation, solution was collected and cells were lysed by the addition of perchloric acid (0.3 M). [³H]-glutamate uptake was calculated by subtracting the uptake in the absence of Na⁺ from the uptake in its presence and expressed as a percentage of total [³H]-glutamate. The results are the mean of three independent experiments.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM or as a percentage of the indicated number of experiments. Analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post hoc analysis or the Student's unpaired t-test were used for statistical analysis to compare each group against the control group mean. When the data were not normally distributed, the Kruskal–Wallis and the Mann–Whitney tests were used. $p < 0.05$ was considered to be significant ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $##p < 0.001$). Calculations were performed using the SPSS software, Version 11.5.0 (IBM, Armonk, NY, US).

RESULTS

In silico prediction of novel rat *Lrrfip1* variants

Sixteen candidate transcript variants were obtained from Ensembl predictions and NCBI annotations, both periodically updated (see Experimental procedures for details) (Table 2). Thirteen candidate transcripts were taken into account in the final analysis (Fig. 1). The results obtained in the homology analysis of the *Lrrfip1* transcripts showed that the homology of the 2217-bp nucleotide sequence of ENSRNOT00000050191 and CRA_j transcripts to the NCBI reference sequence (*Lrrfip1*; NM_001014269) was 100%. ENSRNOT00000056683 and CRA_k were shorter than NM_001014269 (2157 and 2094 bp, respectively). Apart from the absence of exon 1, CRA_k was identical to NM_001014269. ENSRNOT00000056683 had two deletions in exon 8, one of 48 bp and another of 12 bp. The remaining variants showed a degree of homology

with the reference sequence ranging from 75% of CRA_h to 46% of CRA_a.

At least five different *Lrrfip1* variants are expressed in rat cerebral cortex: *Lrrfip1* (NM_001014269), CRA_i, CRA_g, CRA_h' and CRA_a'

Fourteen different PCR amplifications were performed in order to identify the *Lrrfip1* variants present in the rat cerebral cortex. The expected and obtained results in each PCR amplification (PCR A to PCR N) are shown in Table 1.

Expression of NM_001014269, CRA_i and CRA_g transcripts were detected in rat brain cortex in control and ischemic conditions. CRA_a and CRA_h transcripts were detected with some nucleotide sequence modifications and they were renamed as CRA_a' and CRA_h'. CRA_a' transcript showed a deletion of exon 15 of CRA_a transcript meanwhile CRA_h' lacked exons 3 to 5 of CRA_h transcript. Furthermore, six unexpected bands were detected and sequenced (Table 1 and Fig. 2A). Fig. 2B summarizes the transcript variants and the amplicons detected with the fourteen different PCR amplifications performed.

Characterization of the *Lrrfip1* isoforms identified in rat cerebral cortex

The new *Lrrfip1* transcripts identified in the cerebral cortex (CRA_a', CRA_g, CRA_i and CRA_h') coded for proteins of 627, 428, 404 and 394 amino acids with molecular masses of 71.2, 48.9, 46.1 and 44.9 kDa, respectively, both theoretically calculated as described in Materials and Methods. Table 3 summarizes the information relating to cDNA and protein of the novel variants and its homology with the reference *Lrrfip1* protein (NP_001014291), which consists of 738 amino acids (83 kDa). The most similar variant was CRA_h', which had 65% of amino acid identity whereas the new

isoforms identified shared a high degree of homology between each other (94–100%, Table 4). Moreover, we analyzed whether domains and features described in human and mouse *Lrrfip1* isoforms were present in the *Lrrfip1* rat isoforms identified and their degree of homology versus the mouse and human isoforms reported at NCBI (Table 5). Taking into account all the following information, the exonic structure of each transcript and the number of amino acids of each isoform (Ensembl), we considered that rat *Lrrfip1* reference protein (NP_001014291) could be the ortholog of mouse isoform 1, named r*Lrrfip1* henceforth; CRA_a', the ortholog of mouse Flap-1, as it also contained the serine-rich region described for this protein, named rFlap-1 henceforth; CRA_g, the ortholog of mouse isoform 3; and CRA_h', the ortholog of human isoform 2. Only the reference protein *Lrrfip1* contained the nuclear localization signal (NLS) (100%) and the RNA-binding domain (80%). These isoforms contained neither the DNA-binding domain nor the dsRNA-binding domain. All isoforms contained the sequences of interaction with Fli-1 (LRR-binding region; coiled-coil domain) (97%) and Dvl (96%) while only the isoform CRA_a' harbored the serine-rich region of interaction with Myd88 (90%). Analysis of the homology of rat isoforms with human and mouse isoforms showed that *Lrrfip1* shared an 84% homology with the mouse isoform 1; CRA_h', CRA_i, CRA_g and CRA_a' shared a high degree of homology with the mouse isoform 2, named Flap-1, the mouse isoform 3 and the human isoforms 1 and 2 (87–97%), and that none of the isoforms was similar to human isoforms 3, 4 and 5.

Expression and spatial distribution of the orthologs of r*Lrrfip1*, rFlap-1 and CRA_g transcripts in the mouse brain

The Mouse Allen Brain Atlas provides a gene expression map in the mouse brain of the ortholog of the r*Lrrfip1*

Table 2. Putative *Lrrfip1* transcripts from NCBI and Ensembl

		Transcript ID	Protein ID	bp cDNA	aa	cDNA Score	
NCBI	<i>Lrrfip1</i>	NM_001014269	NP_001014291	2217	738		
	CRA_j	rCT55363	EDL92049	2217	738	100	
	CRA_k	rCT55364	EDL92050	2094	697	100	
	CRA_i	rCT55362	EDL92048	1215	404	74	
	CRA_h	rCT55361	EDL92047	1245	414	75	
	CRA_g	rCT55360	EDL92046	1287	428	70	
	CRA_f	rCT55359	EDL92045	1701	566	55	
	CRA_e	rCT55358	EDL92044	1677	558	54	
	CRA_d	rCT55357	EDL92043	1731	456	68	
	CRA_a	rCT55354	EDL92040	1956	651	46	
	CRA_b	rCT55355	EDL92041	1887	628	50	
	CRA_c	rCT55356	EDL92042	1869	622	50	
	Ensembl		ENSRNOT00000050191	ENSRNOP00000045021	2217	738	100
			ENSRNOT00000056683	ENSRNOP00000053522	2157	718	100
		ENSRNOT00000026961	ENSRNOP00000026961	1887	628	50	
		ENSRNOT00000026939	ENSRNOP00000026939	1998	665	47	

cDNA Score = percentage of cDNA sequence homology between NM_001014269 transcript, reference sequence, and all putative transcripts. aa, amino acids; bp, base pair.

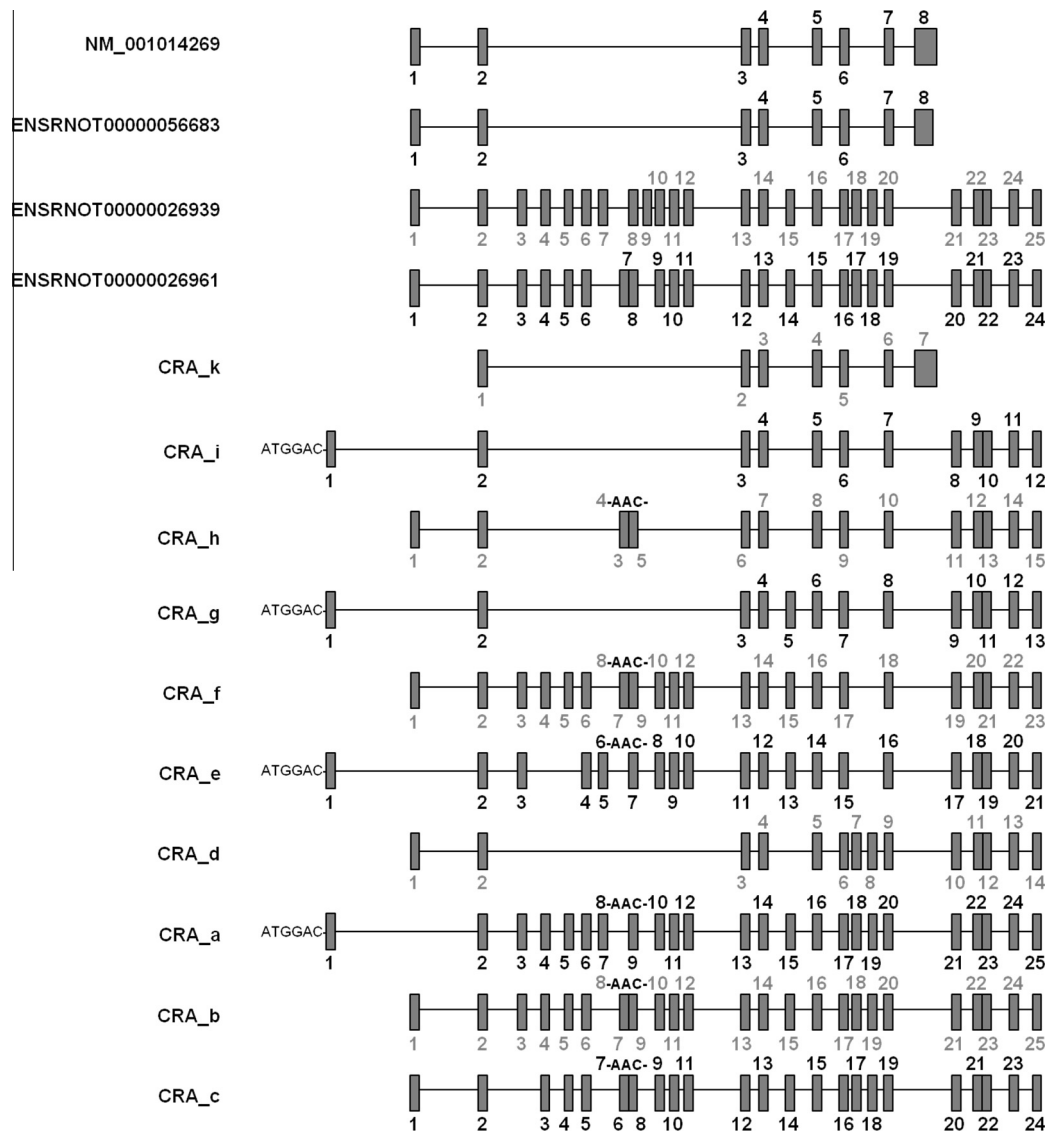


Fig. 1. *Lrrfip1* gene and putative transcripts. Schematic representation of *Lrrfip1* gene organization (NM_001014269) and of the candidate transcripts from Ensembl predictions (ENSRNOG00000019892) and NCBI data base (GeneID: 367314). Transcripts from Ensembl and NCBI predictions are named using ENSRNOT and CRA nomenclature. Exons are shown as vertical bars.

transcript, individually, and of the orthologs of rFlap-1 and CRA_g (rFlap-1–CRA_g), analyzed together. The results showed that rLrrfip1 and rFlap-1–CRA_g transcripts have low expression in the brain with different spatial distribution: rLrrfip1 is mainly expressed in the cerebral cortex and rFlap-1–CRA_g is mainly expressed in the midbrain.

Specifically, with regard to the cerebrum, rFlap-1–CRA_g is present in the cerebral cortex and cerebral nuclei, specifically in the striatum, while rLrrfip1 is only present in the cerebral cortex. All of these transcripts are mainly present in the cortical plate of the cerebral cortex: rFlap-1–CRA_g has low expression in all the areas of the isocortex while rLrrfip1 is only detected at low levels in the somatomotor, somatosensorial, gustatory, agranular insular and retrosplenial areas. rLrrfip1 and rFlap-1–CRA_g are present in the piriform area of the olfactory areas and in the retrohippocampal and hippocampal regions, respectively, of the

hippocampal formation. In the brainstem, rLrrfip1 is mainly expressed in the hindbrain at a low level, specifically in the medulla, is not expressed in the interbrain, and has a low level of expression in the midbrain. However, rFlap-1–CRA_g is mainly expressed in the midbrain at high levels and has a low level of expression both in the interbrain, where it is particularly found in the thalamus, and in the hindbrain, where it is mainly found in the medulla. Finally, rLrrfip1 is nearly undetectable in the cerebellum while rFlap-1–CRA_g has medium levels of expression in the cerebellar cortex and low expression levels in the cerebellar nuclei.

Up-regulated expression patterns of *Lrrfip1* transcripts and rLrrfip1 protein after MCAO

A specific expression assay design was possible for only three (rLrrfip1, CRA_g and rFlap-1) of the five transcripts identified. Due to the high homology of the exon

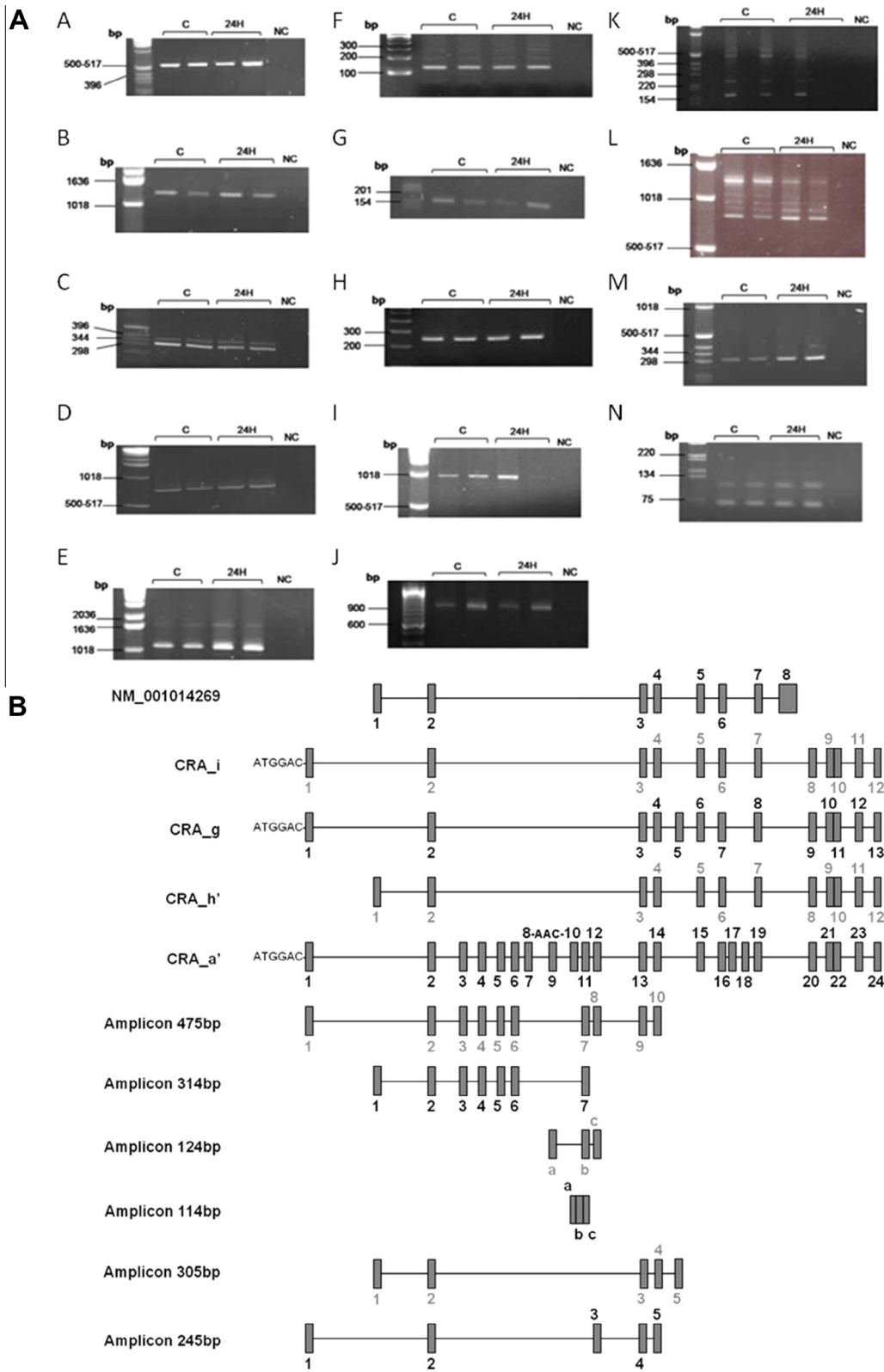


Fig. 2. Expression of *Lrrfp1* transcript variants in cerebral cortex at control (C) and 24 h (24H) post-MCAO determined by conventional PCR. NC: negative control for PCR. (A) As Table 1: A – PCR A; B – PCR B; C – PCR C; D – PCR D; E – PCR E; F – PCR F; G – PCR G; H – PCR H; I – PCR I; J – PCR J; K – PCR K; L – PCR L; M – PCR M; and N – PCR N. (B) schematic representation of *Lrrfp1* transcript variants and amplicons identified in cerebral cortex. Exons are shown as vertical bars.

Table 3. cDNA and protein information of Lrrfip1 variants identified and amino acidic sequence homology versus the reference protein NP_001014291 (Lrrfip1)

	cDNA		Protein		
	N° of exons	bp	N° of aa	MW (kDa)	Score
Lrrfip1	8	2217	738	83	
CRA_i	12	1215	404	46.1	59
CRA_h'	12	1185	394	44.9	65
CRA_g	13	1287	428	48.9	56
CRA_a'	24	1830	627	71.2	38

N°, number; bp, base pair; aa, amino acids; MW, molecular weight; Score = percentage of homology versus Lrrfip1 (NP_001014291).

Table 4. Amino acidic sequence homology among the novel detected isoforms

Isoforms	Score	
CRA_h'	CRA_i	95
CRA_h'	CRA_g	95
CRA_h'	CRA_a'	95
CRA_i	CRA_g	100
CRA_i	CRA_a'	100
CRA_g	CRA_a'	94

Score = percentage of homology among isoforms.

architecture of CRA_i and CRA_h' with the other transcripts, it was not possible to design specific expression assays that would permit individual analysis. The antibody used only recognized rLrrfip1, the reference Lrrfip1 sequence published at NCBI (NM_001014269/NP_001014291). The specific assay for CRA_g transcript quantified the CRA_g transcript together with the corresponding transcript of the 305-bp amplicon identified with PCR M (Fig. 2A–M). The mean C_T values of the control group obtained for the transcripts were 27.0 ± 0.2 for rLrrfip1 and 29.9 ± 0.3 for CRA_g.

The expression profiles of each transcript (rLrrfip1, CRA_g and rFlap-1) and of the rLrrfip1 protein are shown in Fig. 3. rLrrfip1 mRNA expression increased significantly from 2 h after MCAO ($p < 0.001$) to a peak at 24 h ($p < 0.01$), which was three times greater than control values. Peak expression was maintained 7 days after MCAO ($p < 0.001$ for 72 h and $p < 0.05$ for 7 days). The expression at 14 days decreased but still remained above control values ($p < 0.01$) (Fig. 3A). At protein level, rLrrfip1 was expressed in both control and ischemic conditions and an rLrrfip1 overexpression was detected at all the times analyzed after MCAO (Fig. 3B). rLrrfip1 gradually increased from 0.5 to 24 h, at which time it reached its maximum level (fourfold change). Afterward, from 72 h to 14 days, rLrrfip1 protein gradually decreased without returning to the control level ($p < 0.001$ for 6 h; $p < 0.01$ for 24 and 72 h; $p < 0.05$ for 7 days). Joint analysis of CRA_g transcript and the transcript of the 305-bp amplicon identified showed a significant increase from 30 min to 7 days, with the highest level being at 6 h (2.4-fold change over control; $p < 0.05$ for 30 min, 6 h, 72 h and 7 days; $p < 0.001$ for 24 h; Fig. 3C). The expression pattern of rFlap-1 variant

showed a significant increase at 6 and 24 h (2.6 and 2.4-fold changes, respectively, $p < 0.001$; Fig. 3D).

rLrrfip1 protein is up-regulated in cortical neurons and astrocytes of the peri-infarct area after MCAO

According to the double immunofluorescence staining in equivalent brain sections in MCA territory, rLrrfip1 was expressed and up-regulated after MCAO in cortical neurons (NeuN-positive cells) and astrocytes (GFAP-positive cells) (Fig. 4). Control animals showed low rLrrfip1 immunoreactivity in neurons, with a rounded appearance, and astrocytes (Fig. 4A, E, respectively). The same was detected in the contralateral brain tissue of MCAO-exposed animals (Fig. 4D, H). Permanent MCAO induced an increase in rLrrfip1 expression in soma and neurites mainly in neurons located in the peri-infarct area (NeuN-positive, Fig. 4C). Moreover, the expression of rLrrfip1 was also increased in reactive astroglial cells in the core and mostly in peri-infarct area (GFAP-positive, Fig. 4F, G) after ischemia. No colocalization with the nuclear staining, DAPI, was observed in these cells. Staining of cellular marker of reactive astrocytes was very low in control animals and in the contralateral hemisphere of MCAO-exposed animals (Fig. 4E, H, respectively).

Lrrfip1 expression increases after OGD in cultured astrocytes and rLrrfip1 protein is localized in the cytoplasm

Since our previous data pointed to astrocytes as a major target of Lrrfip1 actions (Mallolas et al., 2006), we focused on the analysis of the expression profile of the Lrrfip1 transcripts and the studied isoform not only in cortical samples of MCAO-exposed animals but also in rat-cultured astrocytes submitted to *in vitro* ischemia by OGD. First, before qPCR analysis, we confirmed that the different transcripts (rLrrfip1, CRA_g and rFlap-1) were expressed in astrocytes by conventional PCR (PCRs A, H and I of Table 1, respectively; data not shown). rLrrfip1 gradually increased from 0 to 2 h after reperfusion, reaching the maximum at 2 h (4.2-fold change; $p < 0.01$ for 0 and 0.5 h; $p < 0.001$ for 2 h; Fig. 5A). CRA_g increased from 0 to 2 h after reperfusion achieving similar expression levels at all time points (2.4–3-fold changes; $p < 0.001$ 0, 0.5 and 2 h; Fig. 5B). The expression pattern of rFlap-1 showed a biphasic profile, first increased from 0 to 0.5 h ($p < 0.05$ 0 h; $p < 0.01$ 0.5 h), returned to control levels at 2 h and significantly increased and reached a peak of expression at 6 h (2.3-fold change; $p < 0.001$; Fig. 5C). At protein level, rLrrfip1 gradually increased from 5 h to reach statistical significance at 24 h of reperfusion ($p < 0.01$ for 24 h; Fig. 5D). The double immunofluorescence staining showed a significant increase in rLrrfip1 and GFAP expression in the OGD group ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively) and that rLrrfip1 was located in the cytoplasm of control and OGD-exposed astrocytes at 24-h post reperfusion (Fig. 5E).

Table 5. Conservation of domains and features described for human and mouse Lrrfip1 isoforms in the rat isoforms identified. Homology of rat isoforms versus Lrrfip1 mouse and human isoforms reported at NCBI. Homology equal or greater than 80% is in bold. Human and mouse isoforms not reported in the literature are marked in gray. Mouse and human isoforms corresponding to some of the rat isoforms according to homology degree, number of amino acids and exonic structure are underlined

	NLS ¹ (%)	DNA-binding domain ² (%)	RNA-binding domain ³ (%)	dsRNA-binding domain ⁴ (%)	Sequence of interaction with			Mouse isoforms			Human isoforms				
					Myd88 Serine-rich region (Flap-1) ⁵ (%)	Fli-I LRR-binding region (coiled- coil domain) ⁶ (%)	Dvl 42–208aa human isoform 5 ⁷ (%)	1 (%)	2 (Flap-1) (%)	3 (%)	1 (%)	2 (%)	3 (LRRFIP1) (%)	4 (TRIP) (%)	5 (GCF2) (%)
Lrrfip1	100	46	80	70	10	97	96	84	40	55	35	61	54	54	54
CRA_h'	28	13	25	63	10	97	96	69	97	92	88	91	59	59	59
CRA_i	28	13	25	63	10	97	96	62	90	97	93	87	54	54	54
CRA_g	28	20	25	70	10	97	96	59	91	97	93	87	57	51	51
CRA_a'	28	15	15	72	90	97	96	38	90	92	88	87	39	39	35

Lrrfip1 = NP_001014291; NLS, nuclear localization signal; Myd88, myeloid differentiation factor88; Fli-I, flightless-I; LRR, leucine-rich repeat; Dvl, dishevelled. Mouse isoform 1 = NP_001104781; Mouse isoform 2 = NP_032541; Mouse isoform 3 = NP_001104782; Human isoform 1 = NP_001131022; Human isoform 2 = NP_001131023; Human isoform 3 = NP_001131024; Human isoform 4 = NP_004726; Human isoform 5 = NP_001131025.

¹ Reed et al. (1998).

² Rikiyama et al. (2003).

³ Wilson et al. (1998).

⁴ Bagashev et al. (2010).

⁵ PS50324.

⁶ Fong and de Couet (1999).

⁷ Ohtsuka et al. (2011).

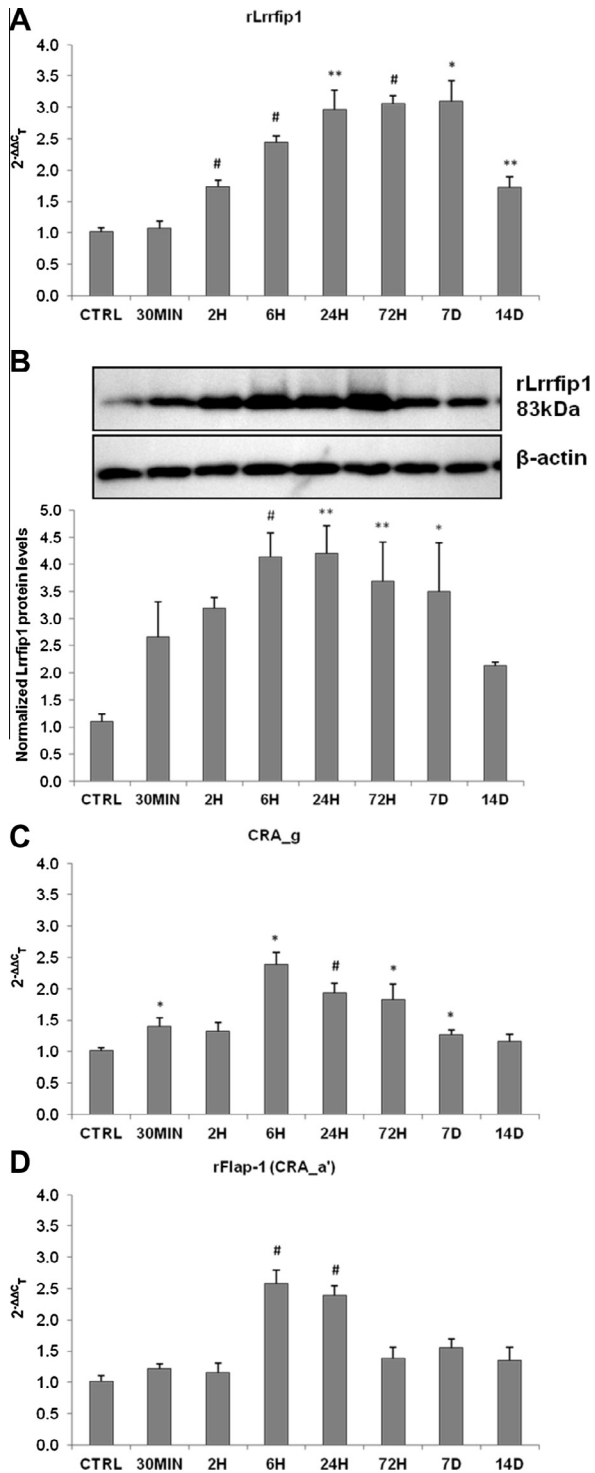


Fig. 3. Differential expression of rat *Lrrfp1* transcripts (NM_0001014269; CRA_g and CRA_a') and reference *Lrrfp1* protein (NP_001014291) in cerebral cortex from control rats and 0.5, 2, 6, 24, 72 h, 7 and 14 days after MCAO. (A) rLrrfp1 (NM_0001014269), (C) CRA_g and (D) rFlap-1 (CRA_a'). Fold change in gene expression analyzed by the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ and *Sdh* and *Ywhaz* as reference genes. Data are mean \pm SEM, $n = 3-5$; ANOVA followed by Dunnett's post hoc analysis (rFlap-1) and the Student's unpaired t-test (rLrrfp1 and CRA_g). (B) rLrrfp1 protein levels in cerebral ischemia. β -actin was used as loading control. Data of the densitometric analysis of bands are mean \pm SEM, $n = 3-5$ /group; ANOVA followed by Dunnett's post hoc analysis, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # $p < 0.001$ vs. control group.

rLrrfp1 knockdown reduces p- β -catenin (Ser552), p-Akt (Ser473), p-mTOR (Ser2448) and GLT-1 expression and glutamate uptake in astrocytes

It has recently been described that the *Lrrfp1* isoform 1 of mouse promotes phosphorylation of β -catenin at Ser552 in macrophages (Yang et al., 2010) and, since the activation of the Akt kinase results in β -catenin phosphorylation at Ser552 (Fang et al., 2007), it has been postulated that the phosphatidylinositol-3-OH-Akt pathway could be involved in activating β -catenin downstream of *Lrrfp1* (Rathinam et al., 2010). As we have demonstrated that the rat reference *Lrrfp1* protein was the ortholog of the mouse isoform 1, we decided to determine whether it also regulates β -catenin activation and Akt activity in astrocytes; furthermore, as GLT-1, also named EAAT2, is the main glutamate transporter in astrocytes in adult tissue (Robinson, 1998), following our earlier study (Mallolas et al., 2006) we decided to determine whether rLrrfp1 regulates its expression physiologically in these cells. To these aims, rat astrocytes were transfected with *Lrrfp1*-specific siRNAs (siLrrfp1). rLrrfp1 inhibition was detected six days after transfection (39%; $p < 0.01$; Fig. 6A). rLrrfp1 knockdown correlated with reduced expression of the phosphorylated forms of β -catenin (Ser552; 33%; $p < 0.01$), Akt (Ser473; 32%; $p < 0.01$) and mTOR (Ser2448; 29%; $p < 0.05$) (Fig. 6B–D, respectively). In addition, on analyzing GLT-1 expression, we confirmed a reduction at protein and mRNA levels (37%; $p < 0.01$ and 41%; $p < 0.001$, respectively) in the siLrrfp1-transfected astrocytes (Fig. 6E, F), which correlated with a reduction in glutamate uptake (39%; $p < 0.001$; Fig. 6G).

DISCUSSION

Although *Lrrfp1* is a poorly studied protein, the information available about it, including our own previous finding that it is a regulator of GLT-1 expression, suggests that it could play a role in cerebral ischemia. As a necessary prior step to a study of its role in cerebral ischemia, our aim in this study was to characterize *Lrrfp1* in the brain. The present study has identified that at least five different *Lrrfp1* transcripts are expressed in the rat brain and that three of them are up-regulated, showing different expression patterns, after MCAO in the cerebral cortex and after OGD in astrocytes. Focusing on rLrrfp1, the main isoform and the ortholog of mouse isoform 1, it was found to be up-regulated from acute to late phases of ischemia in cortical neurons and astrocytes. We have confirmed that rLrrfp1 induces phosphorylation of β -catenin at Ser552 in astrocytes as previously reported for mouse macrophages (Yang et al., 2010) and, in addition, we have shown for the first time that rLrrfp1 induces Akt and mTOR phosphorylation at Ser473 and Ser2448, respectively, and positively regulates the expression of the GLT-1.

First, we identified and characterized the *Lrrfp1* transcripts in rat brain. We have found that at least five of the putative *Lrrfp1* transcripts are expressed in the

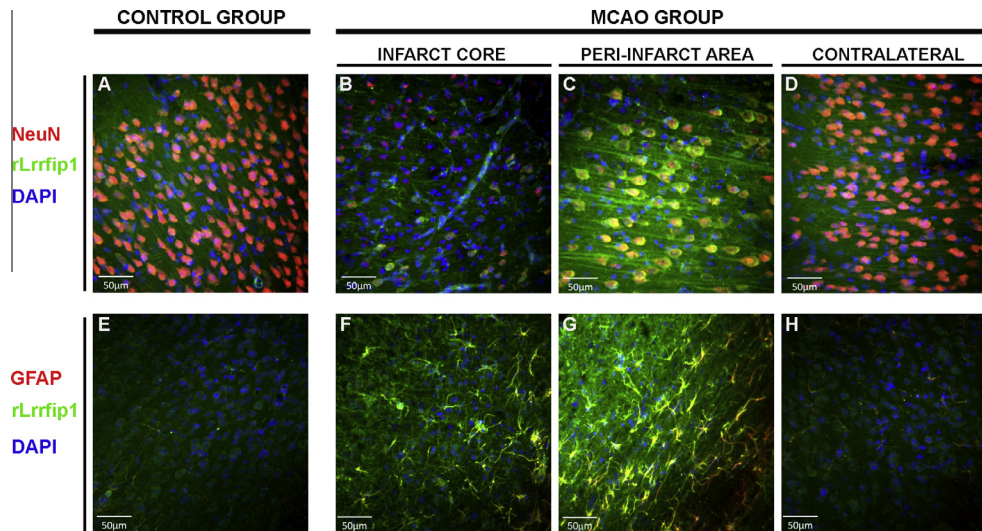


Fig. 4. Immunohistochemical localization of rLrrfp1 in rat brain after focal ischemia. Double immunofluorescence of rLrrfp1 (green) and cellular markers (red) for neurons (NeuN) and astrocytes (GFAP) located at the infarct core (B, F), peri-infarct area (C, G) and contralateral tissue (D, H) in brain sections of ischemic (MCAO) animals and in equivalent areas in brain sections from control animals (A, E). DAPI was used to stain the cell nuclei (blue). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

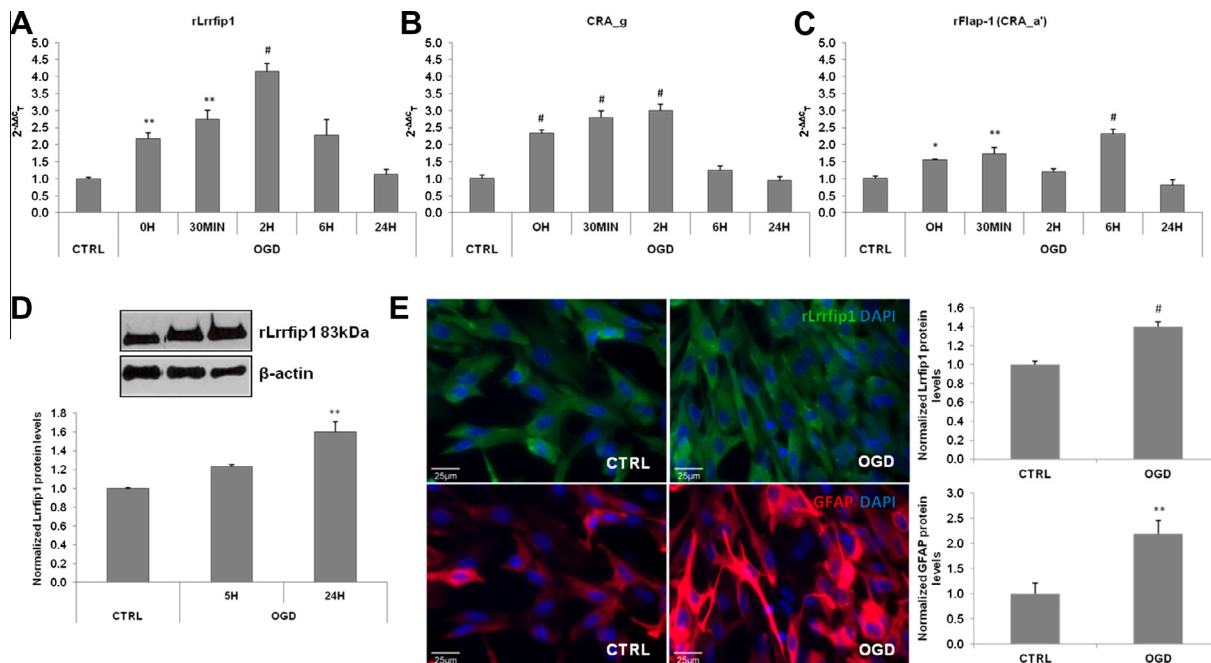


Fig. 5. Expression of *Lrrfp1* transcripts (NM_0001014269; CRA_g and CRA_a') and, expression and subcellular localization of reference rLrrfp1 protein (NP_001014291) in rat astrocytes from control and at different times after OGD. (A) rLrrfp1 (NM_0001014269), (B) CRA_g and (C) rFlap-1 (CRA_a') fold change expression at control, 0, 0.5, 2, 6 and 24 h after reperfusion analyzed by $2^{-\Delta\Delta C_T}$ and *Sdha* and *Rpl13a* as reference genes. Data are mean \pm SEM, $n = 3$ /group; ANOVA followed by Dunnett's post hoc analysis (CRA_g and rFlap-1) and the Student's unpaired t-test (rLrrfp1). (D) rLrrfp1 protein levels at control, 5 and 24 h after reperfusion. β -actin was used as loading control. Data of the densitometric analysis of bands are mean \pm SEM, $n = 3$; ANOVA followed by Dunnett's post hoc analysis. (E) Double immunofluorescence of rLrrfp1 (green) and cellular marker for astrocytes, GFAP (red), in control (CTRL) and 24 h of reperfusion after OGD (OGD). DAPI was used to stain the cell nuclei (blue). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # $p < 0.001$ vs. control group. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

cerebral cortex: rLrrfp1 (NM_001014269), CRA_i, CRA_g, CRA_h' and rFlap-1 (CRA_a'). The high degree of homology among the newly identified variants (CRA_) but not with the reference *Lrrfp1* protein and the different spatial distribution of each transcript in the brain might suggest that distinct *Lrrfp1* isoforms can

play different roles. We have determined that some *Lrrfp1* isoforms are conserved among different species. Therefore, with regard to the possible functions of these isoforms according to the available information about their orthologs, rLrrfp1 and rFlap-1 may both positively regulate the β -catenin-dependent pathway (Lee and

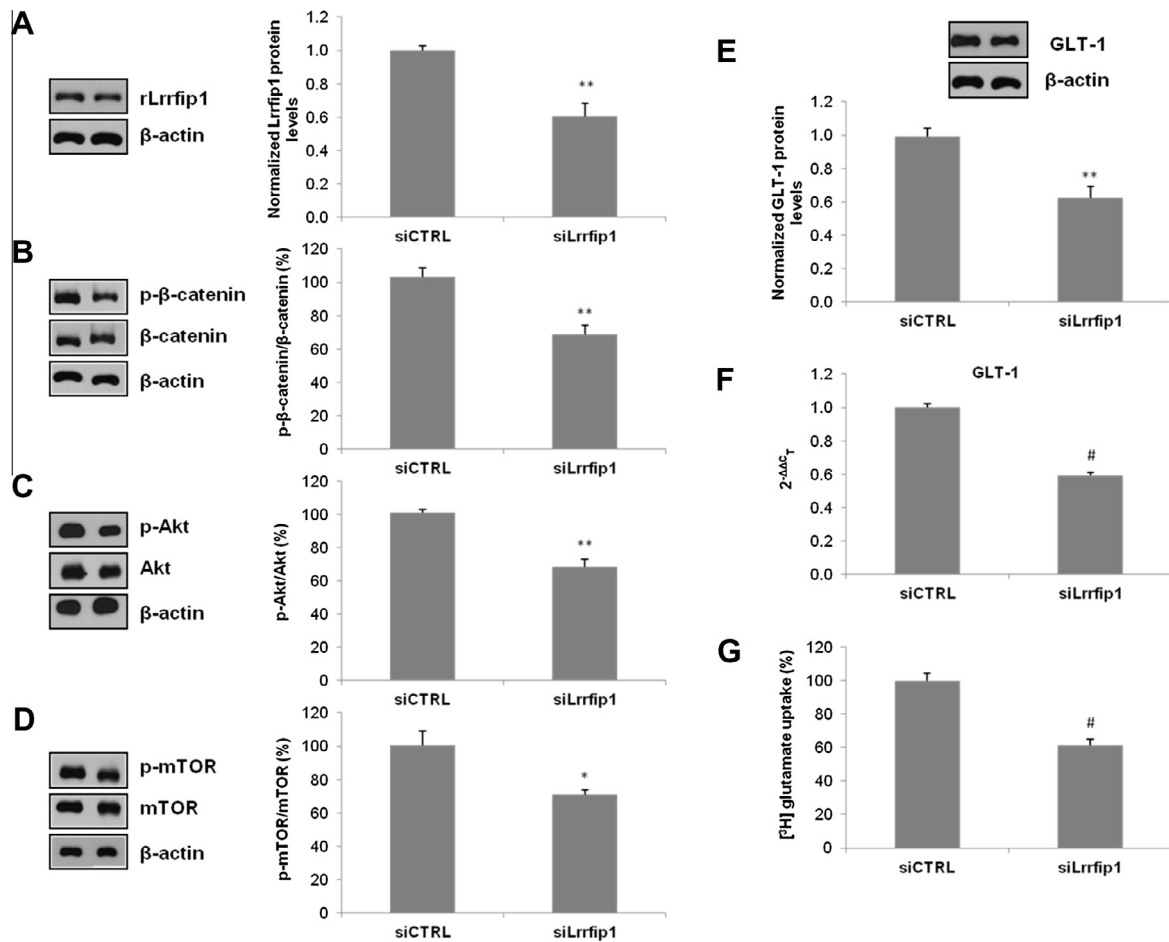


Fig. 6. Western blot analysis of (A) rLrrfp1, (B) % p-β-catenin(Ser552)/β-catenin, (C) % p-Akt(Ser473)/Akt, (D) % p-mTOR(Ser2448)/mTOR and (E) GLT-1 expression in siRNA-transfected astrocytes, control (siCTRL) and against Lrrfp1 (siLrrfp1), at day six after transfection. (F) Glt-1 mRNA expression and (G) glutamate uptake was also evaluated. Data represent the means ± SEM of 2–3 independent experiments; ANOVA analysis, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # $p < 0.001$ vs. siCTRL group.

Stallcup, 2006; Yang et al., 2010), which is described as performing a protective role in both cell adhesion and neural development (Brembeck et al., 2006; Zhang et al., 2011). On the other hand, rFlap-1 would regulate brain TLR-associated signaling (Dai et al., 2009; Bagashev et al., 2010), which may have either detrimental (Caso et al., 2007; Hua et al., 2009) or beneficial (Hanke and Kielian, 2011; Okun et al., 2011) effects on the CNS. To the best of our knowledge, neither mouse isoform 3 nor human isoforms 1 and 2 have yet been studied, so the possible roles of CRA_g and CRA_h' in the brain are unknown. However, as all the rat isoforms identified may bind to Fli-1 and Dvl proteins, it is possible that all of them, whether individually or in co-operation, act as a link between molecules involved in signal transduction and the actin cytoskeleton, regulating the function of the cytoskeleton, cell migration, proliferation, adhesion, and morphology (Campbell et al., 2002; Etienne-Manneville and Hall, 2002; Kopecki et al., 2009). Finally, neither of the isoforms contained the DNA-binding domain and therefore they probably do not function as transcription factors as has been described for human isoform 5 (Reed et al., 1998; Khachigian et al., 1999; Eden et al., 2001; Suriano et al., 2005; Mallolas et al., 2006). This

agrees with the finding that none of the isoforms identified in the rat brain resemble human isoforms 3 to 5.

With regard to the gene expression analysis of rLrrfp1, CRA_g and rFlap-1 transcripts, the mean C_T values obtained allow us to conclude that rLrrfp1 is the predominant transcript in the cerebral cortex, which agrees with the distribution of the transcripts in the Allen Mouse Brain Atlas that shows a low expression level of these transcripts at basal level and a differential spatial distribution. Specifically, the analysis of rLrrfp1 showed a long-term high expression at both mRNA and protein level from the acute to the late phase of ischemia as well as an up-regulation both in cortical neurons and astrocytes of the peri-infarct area. Therefore, these results confirm the previously described significant increase in the rLrrfp1 protein at 2- and 24-h post-MCAO (Mallolas et al., 2006), agree with recent results showing an increased expression of Lrrfp1 after serum starvation (Arakawa et al., 2010), and suggest that rLrrfp1 is expressed in all cellular types of the brain, as it is considered a ubiquitous protein (Fong and de Couet, 1999; Rikiyama et al., 2003). The present results are also in concordance with Khachigian et al., who found that GCF2 was basally expressed in normal rat artery wall and that injury dramatically increased GCF2

expression in the media layer (Khachigian et al., 1999). Finally, Lrrfip1 protein is found to be increased at 30 min after MCAO whereas the mRNA remains still unchanged; this discordance could be explained by the contribution of post-transcriptional and post-translational regulation in addition to the fact that mRNAs are produced at a much lower rate than proteins in mammals, which could be more evident at the shorter times analyzed as is the case here (Vogel and Marcotte, 2012).

The brain role of Lrrfip1 remains unknown. Since our previous data pointed to astrocytes as a major target of Lrrfip1 actions (Mallolas et al., 2006), we focused our functional study on this cellular type. As in the cortical samples, the expression of rLrrfip1, rFlap-1 and CRA_g transcripts increases in astrocytes after OGD with different expression patterns. Specifically, rLrrfip1 is up-regulated and localized in the cytoplasm of astrocytes both in control and OGD conditions. Although this isoform conserves the NLS, it seems that it exerts its function in the cytoplasm, as we confirmed via siRNA transfection experiments. The present study shows that rLrrfip1 induces β -catenin activation in astrocytes, as reported for the mouse isoform 1 in mouse macrophages (Yang et al., 2010). In addition, rLrrfip1 is also involved in Akt and mTOR phosphorylation and in the regulation of GLT-1 expression, both at transcriptional and translational levels. These results confirm that the rLrrfip1 isoform detected in rat cortex and astrocytes is the ortholog of mouse isoform 1 and show for the first time that Akt is a downstream target of rLrrfip1, regulated directly or indirectly by it, as previously suggested (Rathinam et al., 2010). In turn, β -catenin and mTOR are downstream targets of Akt (Hahn-Windgassen et al., 2005; Fang et al., 2007), but we cannot discard that rLrrfip1 also regulates its expression independently of Akt. These results strongly support the idea that rLrrfip1 regulates key intracellular pathways involved in cell growth, proliferation, metabolism, and survival (Schmelzle and Hall, 2000; Brembeck et al., 2006; Marone et al., 2008), in agreement with the role attributed to LRRFIP1 in promoting cell invasion and metastasis in cancer (Arakawa et al., 2010; Ohtsuka et al., 2011; Ariake et al., 2012). In addition, the neuroprotective function attributed to the activated forms of β -catenin (Lei et al., 2008), Akt (Zhao et al., 2006; Shi et al., 2011; Chong et al., 2012) and mTOR (Chong et al., 2010, 2012) suggests a protective role of rLrrfip1 in cerebral ischemia through the activation of these pathways and the indirect regulation of proteins involved in the inflammatory and apoptotic response, such as caspase-12, NF-kappa B, Grp78 (Florian et al., 2008; Jiang et al., 2010; Yuan et al., 2011) or ANXA1 (Tyburczy et al., 2010; Joseph et al., 2012). With regard to GLT-1 expression, we have confirmed in this study that, physiologically, rLrrfip1 regulates positively its expression in astrocytes. Given that rLrrfip1 has a cytoplasmic location, it probably regulates GLT-1 expression and the levels of extracellular glutamate through the activation of the PI3K/Akt/mTOR signaling,

as previously described (Wu et al., 2010). Excessive levels of extracellular glutamate in the nervous system are excitotoxic and lead to neuronal death (Rothman and Olney, 1986; Choi and Rothman, 1990) and glutamate transport, mainly by GLT-1, is the only mechanism for maintaining glutamate concentrations below excitotoxic levels (Takahashi et al., 1997; Seal and Amara, 1999; Danbolt, 2001; Gegelashvili et al., 2001; Maragakis and Rothstein, 2001). Therefore, rLrrfip1 appears as a regulator of this key transporter to avoid neurotoxicity in numerous neurological processes (Lipton and Rosenberg, 1994; Li et al., 1997; Lin et al., 1998). Our results confirm that each Lrrfip1 isoform can have different or even opposing functions. We previously described a transcriptional repression function of human GCF2 isoform over a polymorphic promoter of GLT-1 (Mallolas et al., 2006). In the present study, the Lrrfip1 rat isoform studied positively regulates, probably through the activation of PI3K/Akt/mTOR signaling, the expression and functionality of GLT-1 in astrocytes. Finally, this study supports the importance, previously described (Bugá et al., 2008, 2012), of individually identifying and analyzing each transcript of a gene in order to avoid misinterpretations that may result from a global analysis performed before target validation.

In summary, this is the first report to identify the different transcriptional variants of Lrrfip1 in the brain and to characterize their differential expression patterns and the subcellular location of the main isoform rLrrfip1 in ischemic conditions. Moreover, we have identified Akt, mTOR and β -catenin as the downstream targets of rLrrfip1 through which it is able to regulate important pathways and proteins involved in cerebral ischemia, such as the GLT-1. Taken together, these findings suggest a physiological protective role for Lrrfip1 in the brain, and the up-regulation detected after focal ischemia suggests that Lrrfip1 may be a neuroprotective protein in cerebral ischemia. In addition, since different Lrrfip1 isoforms may have complementary or opposing roles in the brain, our work opens up new lines of investigation in the identification of their roles in stroke and other settings and helps to further characterize the *Lrrfip1* gene.

Acknowledgments—This work was partially supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation and the European Regional Development Fund (ERDF) PROFIT [Grant Nos. CIT 090100-2005-15, CIT 090100-2007-43, CIT 090000-2008-11 (J.M. and I.L.)], the Spanish Ministry of Science and Innovation, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) [Grant Nos. FIS-PI070322 (J.M.), RD06/0026/0005 (I.L.) and RD07/0026/2002 (M.C.)], the Centre d'Innovació i Desenvolupament Empresarial (CIDEM) of the Generalitat de Catalunya [Grant No. RDITSCON07-1-0006], the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) [Grant Nos. SAF2012-33216 (M.A.M.), SAF2011-13354 (I.L.), CSD2010-00045 (M.A.M.)] and by the Madrid Regional Government [Grants S2010/BMD-2336 (M.A.M.) and S2010/BMD-2349 (I.L.)]. C. Gubern received BE grant no. 2007 BE-100293 from the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR). Finally, we would like to thank Andrew Hughes for performing a linguistic revision of the article.

REFERENCES

- Arakawa R, Bagashev A, Song L, Maurer K, Sullivan KE (2010) Characterization of LRRFIP1. *Biochem Cell Biol* 88:899–906.
- Ariake K, Ohtsuka H, Motoi F, Douchi D, Oikawa M, Rikiyama T, Fukase K, Katayose Y, Egawa S, Unno M (2012) GCF2/LRRFIP1 promotes colorectal cancer metastasis and liver invasion through integrin-dependent RhoA activation. *Cancer Lett* 325:99–107.
- Bagashev A, Fitzgerald MC, Larosa DF, Rose PP, Cherry S, Johnson AC, Sullivan KE (2010) Leucine-rich repeat (in Flightless I) interacting protein-1 regulates a rapid type I interferon response. *J Interferon Cytokine Res* 30:843–852.
- Brembeck FH, Rosario M, Birchmeier W (2006) Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev* 16:51–59.
- Buga AM, Sascau M, Pisoschi C, Herndon JG, Kessler C, Popa-Wagner A (2008) The genomic response of the ipsilateral and contralateral cortex to stroke in aged rats. *J Cell Mol Med* 12:2731–2753.
- Buga AM, Scholz CJ, Kumar S, Herndon JG, Alexandru D, Cojocaru GR, Dandekar T, Popa-Wagner A (2012) Identification of new therapeutic targets by genome-wide analysis of gene expression in the ipsilateral cortex of aged rats after stroke. *PLoS One* 7:e50985.
- Campbell HD, Fountain S, McLennan IS, Berven LA, Crouch MF, Davy DA, Hooper JA, Waterford K, Chen KS, Lupski JR, Ledermann B, Young IG, Matthaei KI (2002) Fliih, a gelsolin-related cytoskeletal regulator essential for early mammalian embryonic development. *Mol Cell Biol* 22:3518–3526.
- Caso JR, Pradillo JM, Hurtado O, Lorenzo P, Moro MA, Lizasoain I (2007) Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. *Circulation* 115:1599–1608.
- Choi DW, Rothman SM (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 13:171–182.
- Chong ZZ, Shang YC, Wang S, Maiese K (2012) A critical kinase cascade in neurological disorders: PI3-K, Akt, and mTOR. *Future Neurol* 7:733–748.
- Chong ZZ, Shang YC, Zhang L, Wang S, Maiese K (2010) Mammalian target of rapamycin: hitting the bull's-eye for neurological disorders. *Oxid Med Cell Longev* 3:374–391.
- Dai P, Jeong SY, Yu Y, Leng T, Wu W, Xie L, Chen X (2009) Modulation of TLR signaling by multiple MyD88-interacting partners including leucine-rich repeat Fli-I-interacting proteins. *J Immunol* 182:3450–3460.
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1–105.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22:391–397.
- Eden S, Constancia M, Hashimshony T, Dean W, Goldstein B, Johnson AC, Keshet I, Reik W, Cedar H (2001) An upstream repressor element plays a role in Igf2 imprinting. *EMBO J* 20:3518–3525.
- Etienne-Manneville S, Hall A (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420:629–635.
- Fang D, Hawke D, Zheng Y, Xia Y, Meisenhelder J, Nika H, Mills GB, Kobayashi R, Hunter T, Lu Z (2007) Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J Biol Chem* 282:11221–11229.
- Flicek P, Amode MR, Barrell D, Beal K, Brent S, Carvalho-Silva D, Clapham P, Coates G, Fairley S, Fitzgerald S, Gil L, Gordon L, Hendrix M, Hourlier T, Johnson N, Kahari AK, Keefe D, Keenan S, Kinsella R, Komorowska M, Koscielny G, Kulesha E, Larsson P, Longden I, McLaren W, Muffato M, Overduin B, Pignatelli M, Pritchard B, Riat HS, Ritchie GR, Ruffier M, Schuster M, Sobral D, Tang YA, Taylor K, Trevanion S, Vandrovicova J, White S, Wilson M, Wilder SP, Aken BL, Birney E, Cunningham F, Dunham I, Durbin R, Fernandez-Suarez XM, Harrow J, Herrero J, Hubbard TJ, Parker A, Proctor G, Spudich G, Vogel J, Yates A, Zadissa A, Searle SM (2012) Ensembl 2012. *Nucleic Acids Res* 40:D84–D90.
- Florian B, Vintilescu R, Balseanu AT, Buga AM, Grisk O, Walker LC, Kessler C, Popa-Wagner A (2008) Long-term hypothermia reduces infarct volume in aged rats after focal ischemia. *Neurosci Lett* 438:180–185.
- Fong KS, de Couet HG (1999) Novel proteins interacting with the leucine-rich repeat domain of human flightless-I identified by the yeast two-hybrid system. *Genomics* 58:146–157.
- Gegelashvili G, Robinson MB, Trotti D, Rauen T (2001) Regulation of glutamate transporters in health and disease. *Prog Brain Res* 132:267–286.
- Goodall AH, Burns P, Salles I, Macaulay IC, Jones CI, Ardissino D, de Bono B, Bray SL, Deckmyn H, Dudbridge F, Fitzgerald DJ, Garner SF, Gusnanto A, Koch K, Langford C, O'Connor MN, Rice CM, Stemple D, Stephens J, Trip MD, Zwaginga JJ, Samani NJ, Watkins NA, Maguire PB, Ouwehand WH (2010) Transcription profiling in human platelets reveals LRRFIP1 as a novel protein regulating platelet function. *Blood* 116:4646–4656.
- Gubern C, Camos S, Ballesteros I, Rodriguez R, Romera VG, Canadas R, Lizasoain I, Moro MA, Serena J, Mallolas J, Castellanos M (2013) miRNA expression is modulated over time after focal ischaemia: up-regulation of miR-347 promotes neuronal apoptosis. *FEBS J* 280:6233–6246.
- Gubern C, Hurtado O, Rodriguez R, Morales JR, Romera VG, Moro MA, Lizasoain I, Serena J, Mallolas J (2009) Validation of housekeeping genes for quantitative real-time PCR in in-vivo and in-vitro models of cerebral ischaemia. *BMC Mol Biol* 10:57.
- Hahn-Windgassen A, Nogueira V, Chen CC, Skeen JE, Sonenberg N, Hay N (2005) Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *J Biol Chem* 280:32081–32089.
- Hanke ML, Kielian T (2011) Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)* 121:367–387.
- Hua F, Ma J, Ha T, Kelley JL, Kao RL, Schweitzer JB, Kalbfleisch JH, Williams DL, Li C (2009) Differential roles of TLR2 and TLR4 in acute focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Brain Res* 1262:100–108.
- Hurtado O, Moro MA, Cardenas A, Sanchez V, Fernandez-Tome P, Leza JC, Lorenzo P, Secades JJ, Lozano R, Davalos A, Castillo J, Lizasoain I (2005) Neuroprotection afforded by prior citicoline administration in experimental brain ischemia: effects on glutamate transport. *Neurobiol Dis* 18:336–345.
- Jiang W, Zhang S, Fu F, Zhu H, Hou J (2010) Inhibition of nuclear factor-kappaB by 6-O-acetyl shanzhiside methyl ester protects brain against injury in a rat model of ischemia and reperfusion. *J Neuroinflammation* 7:55.
- Joseph C, Buga AM, Vintilescu R, Balseanu AT, Moldovan M, Junker H, Walker L, Lotze M, Popa-Wagner A (2012) Prolonged gaseous hypothermia prevents the upregulation of phagocytosis-specific protein annexin 1 and causes low-amplitude EEG activity in the aged rat brain after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 32:1632–1642.
- Khachigian LM, Santiago FS, Rafty LA, Chan OL, Delbridge GJ, Bobik A, Collins T, Johnson AC (1999) GC factor 2 represses platelet-derived growth factor A-chain gene transcription and is itself induced by arterial injury. *Circ Res* 84:1258–1267.
- Kopecki Z, Arkell R, Powell BC, Cowin AJ (2009) Flightless I regulates hemidesmosome formation and integrin-mediated cellular adhesion and migration during wound repair. *J Invest Dermatol* 129:2031–2045.
- Lee YH, Stallcup MR (2006) Interplay of Fli-I and FLAP1 for regulation of beta-catenin dependent transcription. *Nucleic Acids Res* 34:5052–5059.

- Lei ZN, Zhang LM, Sun FY (2008) Beta-catenin siRNA inhibits ischemia-induced striatal neurogenesis in adult rat brain following a transient middle cerebral artery occlusion. *Neurosci Lett* 435:108–112.
- Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ, Chen L, Chen TM, Chin MC, Chong J, Crook BE, Czaplinska A, Dang CN, Datta S, Dee NR, Desaki AL, Desta T, Diep E, Dolbeare TA, Donelan MJ, Dong HW, Dougherty JG, Duncan BJ, Ebbert AJ, Eichele G, Estin LK, Faber C, Facer BA, Fields R, Fischer SR, Fliss TP, Frensley C, Gates SN, Glattfelder KJ, Halverson KR, Hart MR, Hohmann JG, Howell MP, Jeung DP, Johnson RA, Karr PT, Kawal R, Kidney JM, Knapik RH, Kuan CL, Lake JH, Laramie AR, Larsen KD, Lau C, Lemon TA, Liang AJ, Liu Y, Luong LT, Michaels J, Morgan JJ, Morgan RJ, Mortrud MT, Mosqueda NF, Ng LL, Ng R, Orta GJ, Overly CC, Pak TH, Parry SE, Pathak SD, Pearson OC, Puchalski RB, Riley ZL, Rockett HR, Rowland SA, Royall JJ, Ruiz MJ, Sarno NR, Schaffnit K, Shapovalova NV, Sivisay T, Slaughterbeck CR, Smith SC, Smith KA, Smith BI, Sotd AJ, Stewart NN, Stumpf KR, Sunkin SM, Sutram M, Tam A, Teemer CD, Thaller C, Thompson CL, Varnam LR, Visel A, Whitlock RM, Wohnoutka PE, Wolkey CK, Wong VY, Wood M, Yaylaoglu MB, Young RC, Youngstrom BL, Yuan XF, Zhang B, Zwingman TA, Jones AR (2007) Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445:168–176.
- Li S, Mallory M, Alford M, Tanaka S, Masliah E (1997) Glutamate transporter alterations in Alzheimer disease are possibly associated with abnormal APP expression. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:901–911.
- Lin CL, Bristol LA, Jin L, Dykes-Hoberg M, Crawford T, Clawson L, Rothstein JD (1998) Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* 20:589–602.
- Lipton SA, Rosenberg PA (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330:613–622.
- Liu YT, Yin HL (1998) Identification of the binding partners for flightless I, A novel protein bridging the leucine-rich repeat and the gelsolin superfamilies. *J Biol Chem* 273:7920–7927.
- Majoul I, Shirao T, Sekino Y, Duden R (2007) Many faces of drebrin: from building dendritic spines and stabilizing gap junctions to shaping neurite-like cell processes. *Histochem Cell Biol* 127:355–361.
- Mallolas J, Hurtado O, Castellanos M, Blanco M, Sobrino T, Serena J, Vivancos J, Castillo J, Lizasoain I, Moro MA, Davalos A (2006) A polymorphism in the EAAT2 promoter is associated with higher glutamate concentrations and higher frequency of progressing stroke. *J Exp Med* 203:711–717.
- Maragakis NJ, Rothstein JD (2001) Glutamate transporters in neurologic disease. *Arch Neurol* 58:365–370.
- Marone R, Cmilianovic V, Giese B, Wymann MP (2008) Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy. *Biochim Biophys Acta* 1784:159–185.
- Ohtsuka H, Oikawa M, Ariake K, Rikiyama T, Motoi F, Katayose Y, Unno M, Johnson AC (2011) GC-binding factor 2 interacts with dishevelled and regulates Wnt signaling pathways in human carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 129:1599–1610.
- Okun E, Griffioen KJ, Mattson MP (2011) Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease. *Trends Neurosci* 34:269–281.
- Pereira MP, Hurtado O, Cardenas A, Alonso-Escolano D, Bosca L, Vivancos J, Nombela F, Leza JC, Lorenzo P, Lizasoain I, Moro MA (2005) The nonthiazolidinedione PPARgamma agonist L-796,449 is neuroprotective in experimental stroke. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:797–805.
- Rathinam VA, Sharma S, Fitzgerald KA (2010) Catenin on to nucleic acid sensing. *Nat Immunol* 11:466–468.
- Reed AL, Yamazaki H, Kaufman JD, Rubinstein Y, Murphy B, Johnson AC (1998) Molecular cloning and characterization of a transcription regulator with homology to GC-binding factor. *J Biol Chem* 273:21594–21602.
- Rikiyama T, Curtis J, Oikawa M, Zimonjic DB, Popescu N, Murphy BA, Wilson MA, Johnson AC (2003) GCF2: expression and molecular analysis of repression. *Biochim Biophys Acta* 1629:15–25.
- Robinson MB (1998) The family of sodium-dependent glutamate transporters: a focus on the GLT-1/EAAT2 subtype. *Neurochem Int* 33:479–491.
- Romera C, Hurtado O, Botella SH, Lizasoain I, Cardenas A, Fernandez-Tome P, Leza JC, Lorenzo P, Moro MA (2004) In vitro ischemic tolerance involves upregulation of glutamate transport partly mediated by the TACE/ADAM17-tumor necrosis factor-alpha pathway. *J Neurosci* 24:1350–1357.
- Rothman SM, Olney JW (1986) Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol* 19:105–111.
- Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132:365–386.
- Schmelzle T, Hall MN (2000) TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 103:253–262.
- Seal RP, Amara SG (1999) Excitatory amino acid transporters: a family in flux. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:431–456.
- Shen DW, Pouliot LM, Gillet JP, Ma W, Johnson AC, Hall MD, Gottesman MM (2012) The transcription factor GCF2 is an upstream repressor of the small GTPase RhoA, regulating membrane protein trafficking, sensitivity to doxorubicin, and resistance to cisplatin. *Mol Pharm* 9:1822–1833.
- Shi GX, Andres DA, Cai W (2011) Ras family small GTPase-mediated neuroprotective signaling in stroke. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 11:114–137.
- Sjoblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, Mandelker D, Leary RJ, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Buckhaults P, Farrell C, Meeh P, Markowitz SD, Willis J, Dawson D, Willson JK, Gazdar AF, Hartigan J, Wu L, Liu C, Parmigiani G, Park BH, Bachman KE, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE (2006) The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314:268–274.
- Sobrado M, Pereira MP, Ballesteros I, Hurtado O, Fernandez-Lopez D, Pradillo JM, Caso JR, Vivancos J, Nombela F, Serena J, Lizasoain I, Moro MA (2009) Synthesis of lipoxin A4 by 5-lipoxygenase mediates PPARgamma-dependent, neuroprotective effects of rosiglitazone in experimental stroke. *J Neurosci* 29:3875–3884.
- Suriano AR, Sanford AN, Kim N, Oh M, Kennedy S, Henderson MJ, Dietzmann K, Sullivan KE (2005) GCF2/LRRFIP1 represses tumor necrosis factor alpha expression. *Mol Cell Biol* 25:9073–9081.
- Takahashi M, Billups B, Rossi D, Sarantis M, Hamann M, Atwell D (1997) The role of glutamate transporters in glutamate homeostasis in the brain. *J Exp Biol* 200:401–409.
- Tyburczy ME, Kotulska K, Pokarowski P, Mieczkowski J, Kucharska J, Grajkowska W, Roszkowski M, Jozwiak S, Kaminska B (2010) Novel proteins regulated by mTOR in subependymal giant cell astrocytomas of patients with tuberous sclerosis complex and new therapeutic implications. *Am J Pathol* 176:1878–1890.
- Vogel C, Marcotte EM (2012) Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet* 13:227–232.
- Wilson SA, Brown EC, Kingsman AJ, Kingsman SM (1998) TRIP: a novel double stranded RNA binding protein which interacts with the leucine rich repeat of flightless I. *Nucleic Acids Res* 26:3460–3467.
- Wu X, Kihara T, Akaike A, Niidome T, Sugimoto H (2010) PI3K/Akt/mTOR signaling regulates glutamate transporter 1 in astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 393:514–518.
- Yang P, An H, Liu X, Wen M, Zheng Y, Rui Y, Cao X (2010) The cytosolic nucleic acid sensor LRRFIP1 mediates the production of type I interferon via a beta-catenin-dependent pathway. *Nat Immunol* 11:487–494.
- Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart Jr CN (2006) Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 7:85.
- Yuan Y, Guo Q, Ye Z, Pingping X, Wang N, Song Z (2011) Ischemic postconditioning protects brain from ischemia/reperfusion injury

by attenuating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through PI3K-Akt pathway. *Brain Res* 1367:85–93.
Zhang L, Yang X, Yang S, Zhang J (2011) The Wnt /beta-catenin signaling pathway in the adult neurogenesis. *Eur J Neurosci* 33:1–8.

Zhao H, Sapolsky RM, Steinberg GK (2006) Phosphoinositide-3-kinase/akt survival signal pathways are implicated in neuronal survival after stroke. *Mol Neurobiol* 34:249–270.

(Accepted 27 February 2014)
(Available online 14 March 2014)

Gubern C, Camós S, Ballesteros I, Rodríguez R, Romera VG, Cañadas R, Lizasoain I, Moro MA, Serena J, Mallolas J, Castellanos M. "miRNA expression is modulated over time after focal ischaemia: up-regulation of miR-347 promotes neuronal apoptosis". *FEBS Journal* . Vol. 280, issue 23 (2013) : 6233-6246

<http://onlinelibrary.wiley.com/wol1/doi/10.1111/febs.12546/full> <http://dx.doi.org/10.1111/febs.12546>

© 2013 FEBS

Abstract

Despite the large number of molecules reported as being over-expressed after ischaemia, little is known regarding their regulation. miRNAs are potent post-transcriptional regulators of gene expression, and reports have shown differentially miRNA expression in response to focal cerebral ischaemia. The present study analysed miRNA expression from acute to late phases of ischaemia to identify specific ischaemia-related miRNAs, elucidate their role, and identify potential targets involved in stroke pathophysiology. Of 112 miRNAs, 32 showed significant changes and different expression profiles. In addition to the previously reported differentially expressed miRNAs, new ischaemia-regulated miRNAs have been found, including miR-347. Forty-seven genes involved in brain functions or related to ischaemia are predicted to be potential targets of the differentially expressed miRNAs after middle cerebral artery occlusion. Analysis of four of these targets (*Acsl4*, *Arf3*, *Btg2* and *Dpysl5*) showed them to be differentially regulated by ischaemia at the transcriptional or post-transcriptional level. *Acsl4*, *Bnip3l* and *Phyhip*, potential targets of miR-347, were up-regulated after miR-347 over-expression, inducing neuronal apoptotic death. Our findings suggest that miR-347 plays an important role in regulating neuronal cell death, identify *Acsl4* as a new protein requiring study in ischaemia, and provide an important resource for future functional studies of miRNAs after ischaemia.

Keywords

Acsl4; *Arf3*; cerebral cortex; MCAO; miR-347

Anexo II - Secuencias nucleotídicas de los seis amplicones no esperados y detectados de *Lrrfip1* mediante PCR convencional y secuenciación automática (apartado 5B.1.2)

>Amplicón 475bp

**GAGGACGACGCGCTCAACCAGATCGCGCGTGAGGCGGAGGCTAGGCTTGCAGCGAA
GCGTGCAGCCC GCGCCGAGGCTCGAGAGATCCGGATGAAGGAGCTGGAACGGCAGCA
GAAAGAGATCTATCAAGTCCAAAAGAAATATTATGGGCTGGACACAAAATGGGGCGAC
ATCGAGCAGTGGATGGAAGACAGCGAGCGCTACTCCCGTAGATTCCGGAGAAACGCC
TCG GCTTCTGACGAAGACGAGCGCTTGTCCGTGGGTAGTCGCGGCAGCCTAAGGGCG
TCCATGCTGGATGAGAGCAGCCTCTATGGGGCTCGGAGGGGAAGCACCAGTGGTTCT
CGAGCACCTTCAGAGTATGGCGGCCACCTCAACTCCAGCTCCCGGGCCTCTTCTAGGG
CCAGCTCTGCGAGGGCCAGTCCTGTGGTAGAAGAAGACCGGACAAAGACTTCGCTG
AGAAGGGCTCCCGTAACA**

>Amplicón 314bp

**GAGTCCAGAAGCGCAAAGACTGGCGGAGGCTAGGCTTGCAGCGAAGCGTGCAGCCC
GCGCCGAGGCTCGAGAGATCCGGATGAAGGAGCTGGAACGGCAGCAGAAAGAGATCT
ATCAAGTCCAAAAGAAATATTATGGGCTGGACACAAAATGGGGCGACATCGAGCAGTG
GATGGAAGACAGCGAGCGCTACTCCCGTAGATTCCGGAGAAACGCCCTCGGCTTCTGA
CGAAGACGAGCGCTTGTCCGTGGGTAGTCGCGGCAGCCTAAGGGCGTCCATGCTGGA
TGAGAGCAGCCTCTATGGGGCTCGGAGGG**

>Amplicón 124bp

**TGGATCCCAGTCCCTTAGTAGAAGATCTGGCAGGGCGTCCATGCTGGATGAGAGCAG
CCTCTATGGGGCTCGGAGGGGAAGCACCAAGTGGTTCTCGAGCACCTTCAGAGTATGGC
GGCCACCTC**

>Amplicón 114bp

**CCCTGCCTACCCAGAATGGACCCCGGCCCTTCGTTCTGTGCAATGCTGCCCGGCCTGC
AGGGAGTTACTGGGCGTCCATGCTGGATGAGAGCAGCCTCTATGGGGCTCGGAGGG**

>Amplicón 305bp

**GAGTCCAGAAGCGCAAAGACTGGCGGAGGCTAGGCTTGCAGCGAAGCGTGCAGCCC
GCGCCGAGGCTCGAGAGATCCGGATGAAGGAGCTGGAACGGCAGCAGAAAGAGGTAG
AAGAAAGACCGGACAAAGACTTCGCTGAGAAGGGCTCCCGTAACATGCCAGCCTGT
CTGCAGCCACACTGGCATCTCTGGGCGGGACTTCCTCCCGGAGAGGGAGTGGAGACA
CCTCCATCTCCATGGACACCGAGGCATCCATCAGGGAGATCAAGGAACTTAATGAGTT
AAAGGACCAGATTCAGGACG**

>Amplicón 245bp

**GGACGACGCGCTCAACCAGATCGCGCGTGAGGCGGAGGCTAGGCTTGCAGCGAAGC
GTGCAGCCC GCGCCGAGGCTCGAGAGATCCGGATGAAGGAGCTGGAACGGCAGCAGA
AAGAGCCTTCAGAGTATGGCGGCCACCTCAACTCCAGCTCCCGGGCCTCTTCTAGGG**

**CCAGCTCTGCGAGGGCCAGTCCTGTGGTAGAAGAAAGACCGGACAAAGACTTCGCTGA
GAAGGGCTCCCGTAACA**

Anexo III - Secuencias nucleotídicas de los transcritos y secuencias aminoacídicas de las isoformas de *Lrrfip1* detectados en corteza cerebral (apartado 5B.1.3)

III.a) Secuencias de cDNA de los transcritos. Los distintos exones se han diferenciado mediante el uso de negrita.

> Lrrfip1 (NM_001014269.1)

ATGACCAGCCCAGAGGGCGCGCAAACAAGGAAATCGACTGTCTGAGTCCAGAAGC
GCAAAGACTGGCGGAGGCTAGGCTTGCAGCGAAGCGTGCAGCCCCGCCGAGGCTC
GAGAGATCCGGATGAAGGAGCTGGAACGGCAGCAGAAAGAG**GTAGAAGAAAGACCGG**
ACAAGACTTCGCTGAGAAGGGCTCCCGTAACATGCCAGCCTGTCTGCAGCCACACT
GGCATCTCTGGGCGGGACTTCCTCCCGGAGAGGGAGTGGAGACACCTCCATCTCCATG
GACACCGAGGCATCCATCAGGGAGATCAAG**ACTCTCTGGCCGAAGTTGAGGAGAAA**
TACAAGAAGGCTATGGTCTCCAACGCCAGCTAGACAACGAGAAGACCAACTTCATG
TACCAGGTGGACACACTGAAGGACATGCTGCTGGAGCTGGAAGAGCAGCTGGCCGA
GTCTCAGAGGCAATACGAGGAGAAGAACAAGGAGTTCGAGAGGGAGAAGCATGCCCA
CAGCATCTACAGTTCCAGTTTGCCGAAGTGAAAGAGGCCCTGAGGCAAAGGGGAAGAA
ATGCTCGAAAAACAT**GGAATAATCCTAAATTCAGAAATAGCCACCAACGGAGAGACTT**
CGGACACAGTAAATGATGTTGGGTACCAAGCGCCCACGAAGATAACAAAAGAAGAGC
TGAATGCCCTCAAGGCAGCTGGGGAAGGGACACTAGGAAAAGCCAAAGAAGTGGAGG
TGAAAAGGAAATTGTGGAGAAAGTGGGGCAAAGAGAAACCTTACAGGATTCTGAGCAA
GAACAGCCCAA**ACTCAACACAGGAAAGGATTGTGTGGACAGAGGGGTGTTACATCCTG**
GTGAAAAGGCTGAGAACCAAAGACCCGTTGAAGACAGTGCCCTGTCCCCGGGACCACT
AGCAGGGGGCCAAGTGTGAGCAAGAGGTT**CAGAGCCAAGATCAAGAAAACACTTCCATC**
CTCAAAAGCCCAGAGCAGATTGAGTCACACGAGGTCACAAACAAGTCAGACAGTAGGG
ACAGCAACTCCCCTGAACCATCTAGCTGCCGGGGAGGTCTAGACAGTGAAGTGT**CAGG**
GCCCACTGCCTTGGGTATCAAAAACCAAAGTGAAA**ACTCTATGGATAGTCAGGGTAAAG**
AAAACCAAGAAGATTTGGGAAAAGGTAGCTTTGAACCACGTCCAGACCACGTTTTGGGG
CAAACACCTGAAATTGACAAGGTGAGCTGTACAGACTCAAGGGGCACAGGTGGGAACC
ACCTGGAGGATGTGGTACAGGCAGGGGACACCATAGTTGAGGACCAAGTAGGGACAAT
GGCCTCTGCAGAGCAAAGCAAAGCATGGAGAATCACATTGGAAGAAGTCTGAACGAT
GGGCTGGGGCAGAGCTCAGAGAGAGA**ACTCGCCCATGAAGCAGCTGAGCTTGAGGAG**
GCCCTCACTCAGAGTTCACAGGCAGGCGGAGAGAACACCGTTACTGAGGCTGAAGATG
CAGCAGTAAGAGATGAGAAGCCCCTCCAGGCAGACGTCCAGGCAACCCCTGCAGCTCC
CACAGTTCAGAGCGGCCATCAGGACACGACAGGGCCAGGTAGCACAGACACCAAGCA
CACATCACCTCACGCAAAGAACGTAACA**AAAGCAAAGAGCGAGCAGCAGGCAGAGGCC**
TTGGATTACCCCAGAAGAAGACTAAGAACAAGAAGAAGAACAAGAAGAAGAAAGC
TGCAGCTCCCATGGAAACCTGCAAAGATGCTAACGAGGAGTCAAGCTGTCAGGACCCA
GATGTGGGTGATGGGGAGGAAGAAGAGCGGGTCCAGGCCACCGACAAGAAATGGGCG
GCAGAGACCCCAGA**ACTGAAAGAAGATCCTCAAAGTCGGCCAAGTGGGAAACAGAACG**
ACGCGGAGGAGGACAGCGGTCCAGCTGAAGGTCCACAGACGTCTTGATCAGAACA
GTCTGCAGTGTGCAGACGGGGACATCTCCCAGTAGGCAGGAAAGGTCCCCAAAGGG
ATGCCTCTCAGATAGGTGGTGAAGAGGGACTTGTGCCCTCCCAACATCCAGGCCAGGC
AGATGAGAAGGGTATTGAGGGCCACAGCGTAGACAACAGTGACCTGTCAGGGGGAGCTG
GGGGCTTCAATT**CAGAAAGTGGAGAGCAGGCAAGAGAGGAGGTTGGGAACAGCAAG**
AGTAAAGAGGATTGCACCATGTCGTGA

>CRA_i

ATGGACATGGGCACACAGGGATCGGGGCGCAAGCGGCTCCCCAACCGGGAGCGGCT
GACGGCGGAGGACGACGCGCTCAACCAGATCGCGCGTGAGGCGGAGGCTAGGCTTG
CAGCGAAGCGTGCAGCCC GCGCCGAGGCTCGAGAGATCCGGATGAAGGAGCTGGAAC
GGCAGCAGAAAGAGGTAGAAGAAAGACCGGACAAAGACTTCGCTGAGAAGGGCTCC
CGTAACATGCCCAGCCTGTCTGCAGCCACACTGGCATCTCTGGGCGGGACTTCCTCCC
GGAGAGGGAGTGGAGACACCTCCATCTCCATGGACACCGAGGCATCCATCAGGGAGAT
CAAGGACTCTCTGGCCGAAGTTGAGGAGAAATACAAGAAGGCTATGGTCTCCAACGC
CCAGCTAGACAACGAGAAGACCAACTTCATGTACCAGGTGGACACACTGAAGGACAT
GCTGCTGGAGCTGGAAGAGCAGCTGGCCGAGTCTCAGAGGCAATACGAGGAGAAGA
ACAAGGAGTTCGAGAGGGAGAAGCATGCCACAGCATCCTACAGTTCCAGTTTGCCGA
AGTGAAAGAGGCCCTGAGGCCAAAGGGAAGAAATGCTCGAAAAACATGGAATAATCCTA
AATTCAGAAATAGCCACCAACGGAGAGACTTCGGACACAGTAAATGATGTTGGGTAC
CAAGCGCCACGAAGATAACAAAAGAAGAGCTGAATGCCCTCAAGGCAGCTGGGGA
AGGGACACTAGATGTTAGGTTGAAAAAGCTCATTGATGAACGGGAATGTTTGGTGGAGC
AGGTTAAGAAGCTCAAAGGGCAGCTGGAAGGAAGACAGAAGAACAGCAGGCCAGAC
CTTCTGAGATCAGAGGACAGTATCTTGGAGAATGGGACTGACGTGCACGTCATGGAT
CTACAGAGAGATGCCAACAGACAGATCAGCGACCTCAAATTTAACTTGCAAAATCTGA
GCAAGAGATTGCTGCCTTAGAACAAAATGTAATAAGGTTAGAGAGCCAAGTAACGCGC
TACAGATCAGCTGCCGAAAACGCAGAAAAAATAGAAGACGAACTAAAGGCGGAAAA
ACGGAAGCTCCAAGAGAGCTTCGCTCCGCACTGGACAAAACAGAAGAGCTTGAGGT
GAGCAACGGCCACCTAGTAAAGCGACTGGAAAAGATGAAAGCCAACCGCAGCGCACTC
TTGTCCCAGCAATAA

>CRA_h'

ATGACCAGCCCAGAGGGCGCGCAAAACAAGGAAATCGACTGTCTGAGTCCAGAAGC
GCAAAGACTGGCGGAGGCTAGGCTTGACGCGAAGCGTGCAGCCC GCGCCGAGGCTC
GAGAGATCCGGATGAAGGAGCTGGAACGGCAGCAGAAAGAGGTAGAAGAAAGACCGG
ACAAGACTTCGCTGAGAAGGGCTCCCGTAACATGCCCAGCCTGTCTGCAGCCACACT
GGCATCTCTGGGCGGGACTTCCTCCCGGAGAGGGAGTGGAGACACCTCCATCTCCATG
GACACCGAGGCATCCATCAGGGAGATCAAGGACTCTCTGGCCGAAGTTGAGGAGAAA
TACAAGAAGGCTATGGTCTCCAACGCCAGCTAGACAACGAGAAGACCAACTTCATG
TACCAGGTGGACACACTGAAGGACATGCTGCTGGAGCTGGAAGAGCAGCTGGCCGA
GTCTCAGAGGCAATACGAGGAGAAGAACAAGGAGTTCGAGAGGGAGAAGCATGCCCA
CAGCATCCTACAGTTCCAGTTTGCCGAAGTGAAAGAGGCCCTGAGGCCAAAGGGAAGAA
ATGCTCGAAAAACATGGAATAATCCTAAATTCAGAAATAGCCACCAACGGAGAGACTT
CGGACACAGTAAATGATGTTGGGTACCAAGCGCCACGAAGATAACAAAAGAAGAGC
TGAATGCCCTCAAGGCAGCTGGGGAAGGGACACTAGATGTTAGGTTGAAAAAGCTCAT
TGATGAACGGGAATGTTTGGTGGAGCAGGTTAAGAAGCTCAAAGGGCAGCTGGAAGG
AAGACAGAAGAACAGCAGGCCAGACCTTCTGAGATCAGAGGACAGTATCTTGGAGAA
TGGGACTGACGTGCACGTCATGGATCTACAGAGAGATGCCAACAGACAGATCAGCGA
CCTCAAATTTAACTTGCAAAATCTGAGCAAGAGATTGCTGCCTTAGAACAAAATGTAAT
AAGGTTAGAGAGCCAAGTAACGCGCTACAGATCAGCTGCCGAAAACGCAGAAAAAAT
AGAAGACGAACTAAAGGCGGAAAAACGGAAGCTCCAAGAGAGCTTCGCTCCGCAC
TGGACAAAACAGAAGAGCTTGAGGTGAGCAACGGCCACCTAGTAAAGCGACTGGAAAA
GATGAAAGCCAACCGCAGCGCACTCTTGTCCCAGCAATAA

>CRA_g

ATGGACATGGGCACACAGGGATCGGGGCGCAAGCGGCTCCCCAACCGGGAGCGGCT
GACGGCGGAGGACGACGCGCTCAACCAGATCGCGCGTGAGGCGGAGGCTAGGCTTG
CAGCGAAGCGTGCAGCCC GCGCCGAGGCTCGAGAGATCCGGATGAAGGAGCTGGAAC
GGCAGCAGAAAGAGGTAGAAGAAAGACCGGACAAAGACTTCGCTGAGAAGGGCTCC
CGTAACATGCCAGCCTGTCTGCAGCCACACTGGCATCTCTGGGCGGGACTTCCTCCC
GGAGAGGGAGTGGAGACACCTCCATCTCCATGGACACCGAGGCATCCATCAGGGAGAT
CAAGGAACCTTAATGAGTTAAAGGACCAGATTCAGGACGTAGAAGGCAAATACATGCA
GGGATTGAAAGAGATGAAGACTCTCTGGCCGAAGTTGAGGAGAAATACAAGAAGGCT
ATGGTCTCCAACGCCAGCTAGACAACGAGAAGACCAACTTCATGTACCAGGTGGACA
CACTGAAGGACATGCTGCTGGAGCTGGAAGAGCAGCTGGCCGAGTCTCAGAGGCAATA
CGAGGAGAAGAACAAGGAGTTCGAGAGGGAGAAGCATGCCACAGCATCTACAGTT
CCAGTTTGCCGAAGTGAAGAGGGCCCTGAGGCAAAGGGAAGAAATGCTCGAAAAACA
TGGAATAATCCTAAATTCAGAAATAGCCACCAACGGAGAGACTTCGGACACAGTAAATG
ATGTTGGGTACCAAGCGCCACGAAGATAACAAAAGAAGAGCTGAATGCCCTCAAGGC
AGCTGGGGAAGGGACACTAGATGTTAGTTGAAAAAGCTCATTGATGAACGGGAATGT
TTGTTGGAGCAGGTAAAGAAGCTCAAAGGGCAGCTGGAAGGAAGACAGAAGAACAGCA
GGCCAGACCTTCTGAGATCAGAGGACAGTATCTTGGAGAATGGGACTGACGTGCACGT
CATGGATCTACAGAGAGATGCCAACAGACAGATCAGCGACCTCAAATTTAAACTTGCA
AAATCTGAGCAAGAGATTGCTGCCTTAGAACAAAATGTAATAAGGTTAGAGAGCCAAG
TAACGCGCTACAGATCAGCTGCCGAAAACGCAGAAAAAATAGAAGACGAACTAAAGGC
GGAAAAACGGAAGCTCCAAAGAGAGCTTCGCTCCGCACTGGACAAAACAGAAGAGCT
TGAGGTGAGCAACGGCCACCTAGTAAAGCGACTGGAAAAGATGAAAGCCAACCGCA
GCGCACTCTTGTCACAGCAATAA

>CRA_a'

ATGGACATGGGCACACAGGGATCGGGGCGCAAGCGGCTCCCCAACCGGGAGCGGCT
GACGGCGGAGGACGACGCGCTCAACCAGATCGCGCGTGAGGCGGAGGCTAGGCTTG
CAGCGAAGCGTGCAGCCC GCGCCGAGGCTCGAGAGATCCGGATGAAGGAGCTGGAAC
GGCAGCAGAAAGAGATCTATCAAGTCCAAAAGAAATATTATGGGCTGGACACAAAATG
GGGCGACATCGAGCAGTGGATGGAAGACAGCGAGCGCTACTCCCGTAGATTCCGGAG
AAACGCCTCGGCTTCTGACGAAGACGAGCGTTGTCCGTGGGTAGTCGCGGCAGCCT
AAGGGTGCAGCCGAGCTGGAGTACGGGAGTCCCTACGCCTGGACTAACGGACTCTT
TGGCTCCGACCTTGCCCTTCCAGCAGTGGCCTTGCTTCAAACCCCTGCCTACCCAG
AATGGACCCCGGCGTCCATGCTGGATGAGAGCAGCCTCTATGGGGCTCGGAGGGGA
AGCACCAGTGGTTCTCGAGCACCTTCAGAGTATGGCGGCCACCTCAACTCCAGCTCCC
GGCCTCTTCTAGGGCCAGCTCTGCGAGGGCCAGTCCTGTGGTAGAAGAAAGACCGG
ACAAAGACTTCGCTGAGAAGGGCTCCCGTAACATGCCAGCCTGTCTGCAGCCACACT
GGCATCTCTGGGCGGGACTTCTCCCGGAGAGGGAGTGGAGACACCTCCATCTCCAT
GGACACCGAGGCATCCATCAGGGAGATCAAGACTCTCTGGCCGAAGTTGAGGAGAA
ATACAAGAAGGCTATGGTCTCCAACGCCAGCTAGACAACGAGAAGACCAACTTCATGT
ACCAGGTGGACACACTGAAGGACATGCTGCTGGAGCTGGAAGAGCAGCTGGCCGAGT
CTCAGAGGCAATACGAGGAGAAGAACAAGGAGTTCGAGAGGGAGAAGCATGCCACA
GCATCCTACAGTTCCAGTTTGCCGAAGTGAAGAGGGCCCTGAGGCAAAGGGAAGAAA
TGCTCGAAGAAATCCGACAGCTGCAACAGAAACAGGCGGGTTATATCAGGGAGATTTCT
GATCTTCAGGAAACGATAGAATGGAAAGACAAAAAGATAGGGGCATTAGAGAGACAGA
AAGAGTTCTTTGATTCCATAAGGAGCGAACGAGATGACCTCAGAGAAGAGACAGTCA
AGCTGAAGGAGGAGTTGAAGAAACATGGAATAATCCTAAATTCAGAAATAGCCACCAAC
GGAGAGACTTCGGACACAGTAAATGATGTTGGGTACCAAGCGCCCACGAAGATAACAA
AAGAAGAGCTGAATGCCCTCAAGGCAGCTGGGGAAGGGACACTAGATGTTAGGTTGAA
AAAGCTCATTGATGAACGGGAATGTTTGTGGAGCAGGTAAAGAAGCTCAAAGGGCAG
CTGGAAGGAAGACAGAAGAACAGCAGGCCAGACCTTCTGAGATCAGAGGACAGTATCT
TGAGAAATGGGACTGACGTGCACGTCTGATCTACAGAGAGATGCCAACAGACAGAT

**CAGCGACCTCAAATTTAACTTGCAAATCTGAGCAAGAGATTGCTGCCTTAGAACAA
AATGTAATAAGGTTAGAGAGCCAAAGTAACGCGCTACAGATCAGCTGCCGAAAACGCAG
AAAAATAGAAGACGAACAAAGGCGGAAAAACGGAAGCTCCAAAGAGAGCTTCGCTC
CGCACTGGACAAAACAGAAGAGCTTGAGGTGAGCAACGGCCACCTAGTAAAGCGAC
TGAAAAGATGAAAGCCAACCGCAGCGCACTCTTGTCCAGCAATAA**

III.b) Proteína

>Lrrfip1

MTSPEGAQNKEIDCLSPEAQRLEARLAAKRAARAEAREIRMKELERQQKEVEERPKDFA
EKGSRNMPSLSAATLASLGGTSSRRGSGDTSISMDTEASIREIKDSLAEVEEKYKKAMVSNA
QLDNEKTNFMYQVDTLKDMLLELEEQLAESQRQYEEKNKEFEREKHAHSILQFQFAEVKEA
LRQREEMLEKHGIIILNSEIATNGETS DTVNDVGYQAPTKITKEELNALKAAEGTLDVRLKLI
VKKVEIKVQRETLQDSEQEQPKLNTGKDCVDRGVLHPGEKAENQRPVEDSALSPGPLA
GAKCEQEVQSQDQENTSILKSPEQIESHEVTNKSDSRDSNSPEPSSCRGGLDSEVSGPTAL
GIKNQSENSMDSQKQENQEDLGKGSFEPDPDHLVGGTPEIDKVSCTDSRGTGGNHLEDVV
QAGDTIVEDQVGTMASAEQSKSMENHIGRSLNDGLGQSSERELAHEAAELEEEALTQSSQA
GGENTVTEAEDA AVRDEKPLQADVQATPAAPTQVSGHQD TTGPGSTDTKHTSPHAKERNK
AKSEQQAEALDSPQKKTKNKKKKNKKKAAAPMETCKDANEESSCQDPDVGDEEEERV
QATDKKWA AETPELKEDPQSRPSGKQND AEEDSGPAEGPTDVL DQNSLQCADGDISPVG
RKGPQRDASQIGGEEGLVPSQHPGQADEKGI EGHSVDNSDLSGELGGFNSESGEQAREE
VGNSKSKEDCTMS

>CRA_h'

MTSPEGAQNKEIDCLSPEAQRLEARLAAKRAARAEAREIRMKELERQQKEVEERPKDFA
EKGSRNMPSLSAATLASLGGTSSRRGSGDTSISMDTEASIREIKDSLAEVEEKYKKAMVSNA
QLDNEKTNFMYQVDTLKDMLLELEEQLAESQRQYEEKNKEFEREKHAHSILQFQFAEVKEA
LRQREEMLEKHGIIILNSEIATNGETS DTVNDVGYQAPTKITKEELNALKAAEGTLDVRLKLI
DERECLLEQVKKLKGQLEGRQKNSRPDLLRSEDSILENGTDVHVMDLQRDANRQISDLKFK
LAKSEQEIAALEQNVIRLESQVTRYRSA AENA EKIEDELKAEKRKLQRELRSALDKTEELEV
SNGHLVVRLEKMKANRSALLSQQ

>CRA_i

MDMGTQGSGRKRLPNRERLTAEDDALNQIAREAEARLAAKRAARAEAREIRMKELERQQK
EVEERPKDFAEKGSRNMPSLSAATLASLGGTSSRRGSGDTSISMDTEASIREIKDSLAEVE
EKYKKAMVSNAQLDNEKTNFMYQVDTLKDMLLELEEQLAESQRQYEEKNKEFEREKHAHSI
LQFQFAEVKEALRQREEMLEKHGIIILNSEIATNGETS DTVNDVGYQAPTKITKEELNALKAA
EGTLDVRLKLI DERECLLEQVKKLKGQLEGRQKNSRPDLLRSEDSILENGTDVHVMDLQR
DANRQISDLKFKLAKSEQEIAALEQNVIRLESQVTRYRSA AENA EKIEDELKAEKRKLQREL
SALDKTEELEVSNHGLVVRLEKMKANRSALLSQQ

>CRA_g

MDMGTQGSGRKRLPNRERLTAEDDALNQIAREAEARLAAKRAARAEAREIRMKELERQQK
EVEERPKDFAEKGSRNMPSLSAATLASLGGTSSRRGSGDTSISMDTEASIREIKELNELKD
QIQDVEGKYMQLKEMKDSLAEVEEKYKKAMVSNAQLDNEKTNFMYQVDTLKDMLLELEE
QLAESQRQYEEKNKEFEREKHAHSILQFQFAEVKEALRQREEMLEKHGIIILNSEIATNGETS
DTVNDVGYQAPTKITKEELNALKAAEGTLDVRLKLI DERECLLEQVKKLKGQLEGRQKNS
RPDLLRSEDSILENGTDVHVMDLQRDANRQISDLKFKLAKSEQEIAALEQNVIRLESQVTRYR
SAAENA EKIEDELKAEKRKLQRELRSALDKTEELEVSNHGLVVRLEKMKANRSALLSQQ

>CRA_a'

MDMGTQGSGRKRLPNRERLTAEDDALNQUIAREAEARLAAKRAARAEAREIRMKELERQQK
EIYQVQKKYYGLDTKWGDIEQWMEDSERYSRFRFNASASDEDERLSVGSRGSLRVQPEL
EYGSPYAWTNGYDGDYCGSQSLRRRSGRGLFGSDLGLPSSGLASKPLPTQNGPRASMLD
ESSLYGARRGSTSGSRAPSEYGGHLNSSSRASSRASSARASPVVEERPKDFAEKGSRN
MPSLSAATLASLGGTSSRRGSGDTSISMDTEASIREIKDSLAEVEEKYKKAMVSNAQLDNEK
TNFMYQVDTLKDMLLEEEQLAESQRQYEEKNKEFEREKHAHSILQFQFAEVKEALRQREE
MLEEIRQLQQKQAGYIREISDLQETIEWKDKKIGALERQKEFFDSIRSERDDLREETVKLKEE
LKKHGIILNSEIATNGETSDTVNDVGYQAPTKITKEELNALKAAEGTLDVRLKKLIDERECLL
EQVKKLKGQLEGRQKNSRPDLLRSEDSILENGTDVHVMDLQRDANRQISDLKFKLAKSEQEI
AALEQNVIRLESQVTRYRSAENAIEDELKAEKRKLQRELSALDKTEELEVSNHGLVKR
LEMKANRSALLSQQ

Anexo IV- Dominios y características descritas para las isoformas humanas (LRRFIP1, GCF2 AND TRIP) y de ratón (Flap-1) (apartado 5B.1.3)

Señal putativa de localización nuclear (NLS, *Nuclear localization signal*) (Isoforma 3 humana (NP_001131024), 4 (NP_004726) y 5 (NP_001131025)) [100]

KKTKNKKKKKNKKKK

Dominio de unión a DNA (429-528aa isoforma 5 humana (NP_001131025)) [96] (presente también en isoformas humanas 3 (NP_001131024) y 4 (NP_004726))

KEVPAHSTEVGRDHNEEEGEETGLRDEKPIKTEVPGSPAGTEGNCQEATGPSTVDTQNEP
LDMKEPDEEKSDQQGEALDSSQKTKNKKKKKNKKKKSPVP

Dominio de unión a RNA (540-559aa isoforma 4 humana (NP_004726)) [105] (presente también en isoformas humanas 3 (NP_001131024) y 5 (NP_001131025))

SSQKTKNKKKKKNKKKKSPV

Dominio de unión a RNA de doble cadena (23-355aa isoforma 3 humana (NP_001131024)) [107]

AEARLAAKRAARAEAREIRMKELERQQKEEDSERYSRRSRRNTSASDEDERMSVGSRGSL
RVEERPEKDFTEKGSRNMPGLSAATLASLGGTSSRRGSGDTSISIDTEASIREIKELNELKDQ
IQDVEGKYMQLKEMKDSLAEVEEKYKKAMVSNALDNEKTNFMYQVDTLKDMLELEEQ
LAESRRQYEEKNKEFEREKHAHSILQFQFAEVKEALKQREEMLEKHGIILNSEIATNGETS
LNNVGYQGPTKMTKEELNALKSTGDGTLGRASEVEVKNEIVANVGKREILHNTEKEQHTED
TVKDCVDIEVFPAGENTEDQKSS EDT

Región rica en serina (*Serine-rich region*) (PS50324) (116-197aa isoforma 2 de ratón, Flap-1 (NP_032541))

SQSLSRRSGRGLSCSNLGLPSSGLASKPLSTQNGSRASMLDESSLYGARRGSACGSRAP
EYGSHLNSSSRASSRASSARAS

Región de unión a repetición rica en leucina (*LRR-binding region*), dominio hélice superenrollada (*coiled-coil*) de interacción con FLII a través de su motivo LRR (Isoforma 4 humana (NP_004726)) (presente también en isoformas humanas 3 (NP_001131024) y 5 (NP_001131025))

SLAEVEEKYKKAMVSNAQLDNEKTNFMYQVDTLKDMLLEEEQLAESRRQYEEKNKEFERE
KHAHSILQFQFAEVKEALKQREEMLE

Dominio de interacción con Dvl3 a través de su dominio PDZ (42-208aa isoforma 5 humana (NP_001131025)) [102]

MKELERQQKEVEERPEKDFTEKGSRNMPGLSAATLASLGGTSSRRGSGDTSISIDTEASIRE
IKDSLAEVEEKYKKAMVSNAQLDNEKTNFMYQVDTLKDMLLEEEQLAESRRQYEEKNKEF
EREKHAHSILQFQFAEVKEALKQREEMLEKHGIILNSEIATNGE

Anexo V - Potenciales dianas de los miRNAs diferencialmente expresados tras la isquemia. Resultados obtenidos mediante los sitios web microRNA.org y miRecords (apartado 5C.1.3)

Tabla I – Noventa dianas predichas y validadas de los miRNAs diferencialmente expresados a lo largo del tiempo después de isquemia focal.

	Símbolo Gen	Secuencia de referencia (Refseq) mRNA en NCBI	Nombre del Gen	miRNAs significativamente regulados por la isquemia y reguladores potenciales de las dianas	Expresión de los miRNAs
Dianas predichas	<i>Atg12</i>	NM_001038495	ATG12 autophagy related 12 homolog (S. cerevisiae)	mmu/rno-mir-138, mmu/rno-miR-30d, mmu-miR-129-3p/rno-miR-129*, mmu/rno-miR-30e, mmu/rno-miR-292-3p, mmu/rno-miR-98, mmu/rno-miR-292-5p, mmu/rno-let-7c, rno-let-7a	Disminuyen en fase aguda y tardía de la isquemia
	<i>Dync1li2</i>	NM_031026	dynein, cytoplasmic 1 light intermediate chain 2		
	<i>Tspan2</i>	NM_022589	tetraspanin 2		
	<i>Obfc2a</i>	NM_001014216	oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold containing 2A	mmu/rno-mir-138, mmu/rno-miR-30d, mmu-miR-129-3p/rno-miR-129*, mmu/rno-miR-98, mmu/rno-miR-292-5p, mmu/rno-let-7c, rno-let-7a, mmu/rno-miR-99b	
	<i>Hnf1a</i>	NM_012669	HNF1 homeobox A		
	<i>Rqcd1</i>	NM_001009357	rcd1 (required for cell differentiation) homolog 1 (S. pombe)		
	<i>Scn2a1</i>	NM_012647	sodium channel, voltage-gated, type II, alpha 1		
	<i>Sh2b3</i>	NM_031621	SH2B adaptor protein 3		

Tabla I – Continuación

	Símbolo Gen	Secuencia de referencia (Refseq) mRNA en NCBI	Nombre del Gen	miRNAs significativamente regulados por la isquemia y reguladores potenciales de las dianas	Expresión de los miRNAs
Dianas predichas	<i>Calm1</i>	NM_031969	calmodulin 1		Disminuyen en fase aguda y tardía de la isquemia
	<i>Slc24a2</i>	NM_031743	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 2	mmu/rno-miR-30e, mmu/rno-miR-292-3p, mmu/rno-miR-99b, mmu/rno-miR-98, mmu/rno-miR-292-5p, mmu/rno-let-7c, rno-let-7a	
	<i>Trak2</i>	NM_133560	trafficking protein, kinesin binding 2		
Dianas validadas	<i>synt4</i>	NM_031693	synaptotagmin IV	rno-miR-292-5p, rno-miR-30e	
	<i>Tp53</i>	NM_030989.3	tumor protein p53	rno-miR-30d, rno-miR-30e	
	<i>Madd</i>	NM_053585	MAP-kinase activating death domain	rno-miR-292-5p	
	<i>Mgst1</i>	NM_134349	microsomal glutathione S-transferase 1		
	<i>Myc</i>	NM_012603	myelocytomatosis oncogene	rno-let-7a	
	<i>Kcnj16</i>	NM_053314	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 16	rno-let-7e, rno-miR-292-5p	
	<i>Mmp9</i>	NM_031055	matrix metalloproteinase 9	rno-miR-132, rno-miR-292-5p	

Tabla I – Continuación

	Símbolo Gen	Secuencia de referencia (Refseq) mRNA en NCBI	Nombre del Gen	miRNAs significativamente regulados por la isquemia y reguladores potenciales de las dianas	Expresión de los miRNAs
Dianas validadas	<i>PTEN</i>	NM_031606	phosphatase and tensin homolog	rno-miR-21	Aumentan en fase aguda y tardía de la isquemia
	<i>PDCD4</i>	NM_022265.2	programmed cell death 4		
Dianas predichas	<i>Bnip3l</i>	NM_080888	BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3-like	mmu/rno-miR-487b, rno-miR-347, mmu/rno-miR-212	
	<i>Limk2</i>	NM_024135	LIM domain kinase 2	mmu/rno-miR-487b, rno-miR-347, mmu/rno-miR-320, mmu/rno-miR-324-5p	
	<i>Arl8b</i>	NM_001024332	ADP-ribosylation factor-like 8B	mmu/rno-miR-487b, rno-miR-347, mmu/rno-miR-320, mmu/rno-miR-324-5p, mmu/rno-miR-212	
	<i>Erap1</i>	NM_030836	endoplasmic reticulum aminopeptidase 1		
	<i>Asam</i>	NM_173154	adipocyte-specific adhesion molecule	mmu/rno-miR-487b, rno-miR-347, mmu/rno-miR-320, mmu/rno-miR-324-5p, mmu/rno-miR-21	
	<i>Acs14</i>	NM_053623	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	mmu/rno-miR-487b, rno-miR-347, mmu/rno-miR-212, mmu/rno-miR-21	
	<i>RGD1359108</i>	NM_001007702	similar to RIKEN cDNA 3110043O21		

Tabla I – Continuación

	Símbolo Gen	Secuencia de referencia (Refseq) mRNA en NCBI	Nombre del Gen	miRNAs significativamente regulados por la isquemia y reguladores potenciales de las dianas	Expresión de los miRNAs
Dianas predichas	<i>Wrb</i>	NM_199373	tryptophan rich basic protein	mmu/rno-miR-487b, rno-miR-347, mmu/rno-miR-212, mmu/rno-miR-21	Aumentan en fase aguda y tardía de la isquemia
	<i>Btg2</i>	NM_017259	BTG family, member 2	mmu/rno-miR-21 (validated), mmu/rno-miR-320, mmu/rno-miR-324-5p, mmu/rno-miR-212	
	<i>Lrrc4</i>	NM_001037336	leucine rich repeat containing 4	mmu/rno-miR-351, mmu/rno-miR-483, mmu/rno-miR-494, mmu/rno-miR-542-5p, rno-miR-327, mmu/rno-miR-21	
	<i>Slc4a10</i>	NM_178092	solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter, member 10	mmu/rno-let-7i, mmu/rno-miR-23b, mmu/rno-miR-341, mmu/rno-let-7e, mmu/rno-miR-338	Disminuyen en fase aguda de la isquemia
	<i>Syne1</i>	NM_001029909	spectrin repeat containing, nuclear envelope 1		
	<i>Lox</i>	NM_017061	lysyl oxidase		
Dianas validadas	<i>Neurod1</i>	NM_019218	neurogenic differentiation 1	rno-miR-338	
	<i>Tpm1</i>	NM_019131	tropomyosin 1, alpha		
	<i>Pla2g4b</i>	NM_001107764	phospholipase A2, group IVB (cytosolic)		
	<i>Cox4i2</i>	NM_053472	cytochrome c oxidase subunit IV isoform 2		

Tabla I – Continuación

	Símbolo Gen	Secuencia de referencia (Refseq) mRNA en NCBI	Nombre del Gen	miRNAs significativamente regulados por la isquemia y reguladores potenciales de las dianas	Expresión de los miRNAs
Dianas validadas	<i>Fgf16</i>	NM_021867	fibroblast growth factor 16		Aumentan en fase aguda de la isquemia
	<i>Scn3a</i>	NM_013119	sodium channel, voltage-gated, type III, alpha	rno-miR-494	
	<i>Vsn1</i>	NM_012686	visinin-like 1		
Dianas predichas	<i>B4galt6</i>	NM_031740	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 6	mmu/rno-mir-138, mmu/rno-miR-30d, mmu-miR-129-3p/rno-miR-129*, mmu/rno-miR-30e, mmu/rno-miR-292-3p, mmu/rno-miR-542-3p, mmu/rno-miR-185, mmu/rno-miR-132	Aumentan y disminuyen en fase aguda y disminuyen en fase tardía de la isquemia
	<i>Pxn</i>	NM_001012147	paxillin	mmu/rno-miR-30e, mmu/rno-miR-292-3p, mmu/rno-miR-99b, mmu/rno-miR-542-3p, mmu/rno-miR-185, mmu/rno-miR-132	
	<i>Vapa</i>	NM_031631	VAMP (vesicle-associated membrane protein)-associated protein A	mmu/rno-let-7i, mmu/rno-miR-23b, mmu/rno-miR-341, mmu/rno-let-7e, mmu/rno-miR-338, mmu/rno-miR-542-3p, mmu/rno-miR-185, mmu/rno-miR-132	
	<i>Tle3</i>	NM_053400	transducin-like enhancer of split 3 (E(sp1) homolog, Drosophila)	mmu/rno-miR-30e, mmu/rno-miR-292-3p, mmu/rno-miR-99b, mmu/rno-miR-351, mmu/rno-miR-483, mmu/rno-miR-494, mmu/rno-miR-542-5p, rno-miR-327	
	<i>Zdhc23</i>	NM_213627	zinc finger, DHHC-type containing 23	mmu/rno-mir-138, mmu/rno-miR-30d, mmu-miR-129-3p/rno-miR-129*, mmu/rno-miR-99b, mmu/rno-miR-351, mmu/rno-miR-483, mmu/rno-miR-494, mmu/rno-miR-542-5p, rno-miR-327, mmu/rno-miR-542-3p, mmu/rno-miR-185, mmu/rno-miR-132	

Tabla I – Continuación

	Símbolo Gen	Secuencia de referencia (Refseq) mRNA en NCBI	Nombre del Gen	miRNAs significativamente regulados por la isquemia y reguladores potenciales de las dianas	Expresión de los miRNAs
Dianas predichas	<i>Kcnc3</i>	NM_053997	potassium voltage gated channel, Shaw-related subfamily, member 3	mmu/rno-let-7i, mmu/rno-miR-23b, mmu/rno-miR-341, mmu/rno-let-7e, mmu/rno-miR-338, mmu/rno-miR-542-3p, mmu/rno-miR-185, mmu/rno-miR-132, mmu/rno-miR-351, mmu/rno-miR-483, mmu/rno-miR-494, mmu/rno-miR-542-5p, rno-miR-327	Aumentan y disminuyen en fase aguda y disminuyen en fase tardía de la isquemia
Diana validada	<i>Hmox1</i>	NM_012580	heme oxygenase (decycling) 1	rno-let-7e, rno-let-7a, rno-miR-494	
Diana predicha	<i>Phyhip</i>	NM_001017376	phytanoyl-CoA 2-hydroxylase interacting protein	mmu/rno-let-7e, mmu/rno-miR-338, mmu/rno-miR-487b, rno-miR-347, mmu/rno-miR-212	Aumentan y disminuyen en fase aguda y aumentan en fase tardía de la isquemia
Dianas validadas	<i>Tagln</i>	NM_031549	transgelin	rno-miR-338, rno-let-7e, rno-miR-320, rno-miR-21	
	<i>Itgb1</i>	NM_001039254	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	rno-miR-21, rno-let-7e	

Tabla I – Continuación

	Símbolo Gen	Secuencia de referencia (Refseq) mRNA en NCBI	Nombre del Gen	miRNAs significativamente regulados por la isquemia y reguladores potenciales de las dianas	Expresión de los miRNAs
Dianas predichas	<i>Arf3</i>	NM_080904	ADP-ribosylation factor 3	mmu/rno-miR-132, mmu/rno-miR-542-3p, mmu/rno-miR-185	Aumentan en la fase aguda y disminuyen en la fase tardía de la isquemia
	<i>Emp2</i>	NM_001007721	epithelial membrane protein 2	mmu/rno-miR-351, mmu/rno-miR-483, mmu/rno-miR-494, mmu/rno-miR-542-5p, rno-miR-327, mmu/rno-miR-542-3p, mmu/rno-miR-185, mmu/rno-miR-132	
	<i>Calu</i>	NM_001033898	calumenin	mmu/rno-miR-132, mmu/rno-miR-21, mmu/rno-miR-542-3p, mmu/rno-miR-185	Aumentan en la fase aguda y aumentan y disminuyen en la fase tardía de la isquemia
	<i>Ccdc117</i>	NM_001017502	coiled-coil domain containing 117		
	<i>Chp</i>	NM_024139	calcium binding protein p22		
	<i>Dpysl5</i>	NM_023023	dihydropyrimidinase-like 5		
	<i>Fads1</i>	NM_053445	fatty acid desaturase 1		
	<i>Ncf1</i>	NM_053734	neutrophil cytosolic factor 1		
	<i>Nde1</i>	NM_053347	nudE nuclear distribution gene E homolog 1 (A. nidulans)		

Tabla I – Continuación

	Símbolo Gen	Secuencia de referencia (Refseq) mRNA en NCBI	Nombre del Gen	miRNAs significativamente regulados por la isquemia y reguladores potenciales de las dianas	Expresión de los miRNAs
Dianas predichas	<i>Nptxr</i>	NM_030841	neuronal pentraxin receptor	mmu/rno-miR-132, mmu/rno-miR-21, mmu/rno-miR-542-3p, mmu/rno-miR-185	Aumentan en la fase aguda y aumentan y disminuyen en la fase tardía de la isquemia
	<i>Opcml</i>	NM_053848	opioid binding protein/cell adhesion molecule-like		
	<i>Pfkfb2</i>	NM_001033964, NM_001033965	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2		
	<i>Prkx</i>	NM_001033963	protein kinase, X-linked		
	<i>Sdc1</i>	NM_013026	syndecan 1		
	<i>Sdc4</i>	NM_012649	syndecan 4		
	<i>Snx27</i>	NM_152847	sorting nexin family member 27		
	<i>Atrn</i>	NM_031351	attractin		
	<i>Faah</i>	NM_024132	fatty acid amide hydrolase		
	<i>Fgl2</i>	NM_053455	fibrinogen-like 2		

Tabla I – Continuación

	Símbolo Gen	Secuencia de referencia (Refseq) mRNA en NCBI	Nombre del Gen	miRNAs significativamente regulados por la isquemia y reguladores potenciales de las dianas	Expresión de los miRNAs
Dianas predichas	<i>LOC619574</i>	NM_001034959	hypothetical protein LOC619574		Aumentan en la fase aguda y aumentan y disminuyen en la fase tardía de la isquemia
	<i>Ppp1r3b</i>	NM_138912	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3B		
	<i>Sv2b</i>	NM_057207	synaptic vesicle glycoprotein 2b	mmu/rno-miR-21, mmu/rno-miR-320, mmu/rno-miR-324-5p, mmu/rno-miR-212, mmu/rno-miR-132, mmu/rno-miR-542-3p, mmu/rno-miR-185	
	<i>Unc5c</i>	NM_199407	unc-5 homolog C (C. elegans)		
	<i>Cbx7</i>	NM_199117	chromobox homolog 7		
	<i>lqsec3</i>	NM_207617	IQ motif and Sec7 domain 3		
	<i>Rgs4</i>	NM_017214	regulator of G-protein signaling 4	mmu/rno-miR-351, mmu/rno-miR-483, mmu/rno-miR-494, mmu/rno-miR-542-5p, rno-miR-327, mmu/rno-miR-21, mmu/rno-miR-132, mmu/rno-miR-542-3p, mmu/rno-miR-185	
	<i>Nr4a3</i>	NM_031628	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	mmu/rno-mir-138, mmu/rno-miR-30d, mmu-miR-129-3p/rno-miR-129*, mmu/rno-miR-30e, mmu/rno-miR-292-3p, mmu/rno-miR-542-3p, mmu/rno-miR-185, mmu/rno-miR-132, mmu/rno-miR-21	Aumentan y disminuyen en la fase aguda y en la fase tardía de la isquemia

Tabla I – Continuación

	Símbolo Gen	Secuencia de referencia (Refseq) mRNA en NCBI	Nombre del Gen	miRNAs significativamente regulados por la isquemia y reguladores potenciales de las dianas	Expresión de los miRNAs
Dianas predichas	<i>Il6ra</i>	NM_017020	interleukin 6 receptor	mmu/rno-mir-138, mmu/rno-miR-30d, mmu-miR-129-3p/rno-miR-129*, mmu/rno-miR-30e, mmu/rno-miR-292-3p, mmu/rno-miR-98, mmu/rno-miR-292-5p, mmu/rno-let-7c, rno-let-7a, mmu/rno-miR-21, mmu/rno-miR-320, mmu/rno-miR-324-5p, mmu/rno-miR-212	Aumentan y disminuyen en la fase aguda y en la fase tardía de la isquemia
	<i>Scn3b</i>	NM_139097	sodium channel, voltage-gated, type III, beta		
	<i>Zbtb43</i>	NM_001012094	zinc finger and BTB domain containing 43		
	<i>lpmk</i>	NM_134417	inositol polyphosphate multikinase	mmu/rno-mir-138, mmu/rno-miR-30d, mmu-miR-129-3p/rno-miR-129*, mmu/rno-miR-30e, mmu/rno-miR-292-3p, mmu/rno-miR-21, mmu/rno-miR-320, mmu/rno-miR-324-5p, mmu/rno-miR-212, mmu/rno-miR-542-3p, mmu/rno-miR-185, mmu/rno-miR-132	
	<i>Dclk1</i>	NM_053343	doublecortin-like kinase 1	mmu/rno-miR-98, mmu/rno-miR-292-5p, mmu/rno-let-7c, rno-let-7a, mmu/rno-miR-99b, mmu/rno-miR-21, mmu/rno-miR-320, mmu/rno-miR-324-5p, mmu/rno-miR-212	
	<i>Rwd4a</i>	NM_001034994	RWD domain containing 4A	mmu/rno-mir-138, mmu/rno-miR-30d, mmu-miR-129-3p/rno-miR-129*, mmu/rno-miR-99b, mmu/rno-miR-21, mmu/rno-miR-320, mmu/rno-miR-324-5p, mmu/rno-miR-212	
	<i>Cxcl12</i>	NM_001033883	chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)	mmu/rno-mir-138, mmu/rno-miR-30d, mmu-miR-129-3p/rno-miR-129*, mmu/rno-miR-99b, mmu/rno-miR-351, mmu/rno-miR-483, mmu/rno-miR-494, mmu/rno-miR-542-5p, rno-miR-327, mmu/rno-miR-21, mmu/rno-miR-542-3p, mmu/rno-miR-185	

Tabla I – Continuación

	Símbolo Gen	Secuencia de referencia (Refseq) mRNA en NCBI	Nombre del Gen	miRNAs significativamente regulados por la isquemia y reguladores potenciales de las dianas	Expresión de los miRNAs
Dianas predichas	<i>Crebl2</i>	NM_001015027	cAMP responsive element binding protein-like 2	mmu/rno-let-7i, mmu/rno-miR-23b, mmu/rno-miR-341, mmu/rno-let-7e, mmu/rno-miR-338, mmu/rno-miR-132, mmu/rno-miR-21, mmu/rno-miR-542-3p, mmu/rno-miR-185	Aumentan y disminuyen en la fase aguda y en la fase tardía de la isquemia
	<i>Rhoq</i>	NM_053522	ras homolog gene family, member Q	mmu/rno-let-7i, mmu/rno-miR-23b, mmu/rno-miR-341, mmu/rno-let-7e, mmu/rno-miR-338, mmu/rno-miR-21, mmu/rno-miR-320, mmu/rno-miR-324-5p, mmu/rno-miR-212	
Diana validada	<i>Vim</i>	NM_031140	vimentin	rno-let-7a, rno-let-7i, rno-miR-338, rno-miR-320	
Dianas validadas	<i>Rics / p250GAP</i>	XM_236020	Rho GTPase-activating protein	rno-miR-132	Disminuyen en la fase tardía de la isquemia
	<i>MeCP2</i>	NM_022673	methyl CpG binding protein 2		
	<i>Capn8</i>	NM_133309	calpain 8		